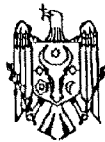




MD 4685 C1 2020.12.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **4685** (13) **C1**
(51) Int.Cl: *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2018 0042 (22) Data depozit: 2016.11.09 (31) Nr.: 62/252,814; 62/406,726 (32) Data: 2015.11.09; 2016.10.11 (33) Țara: US; US (41) Data publicării cererii: 2018.09.30, BOPI nr. 9/2018	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.03.31, BOPI nr. 3/2020 (85) 2018.06.06 (86) PCT/US2016/061113, 2016.11.09 (87) WO 2017/083371 A1, 2017.05.18
(71) Solicitant: OMEROS CORPORATION, US; UNIVERSITY OF LEICESTER, GB (72) Inventatori: DEMOPULOS Gregory A., US; DUDLER Thomas, US; SCHWAEBLE Hans- Wilhelm, GB (73) Titular: OMEROS CORPORATION, US; UNIVERSITY OF LEICESTER, GB (74) Mandatar autorizat: ANDRIEȘ Ludmila	

(54) Metodă de tratament al stărilor asociate cu activarea complementului
dependentă de MASP-2

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la metode de inhibare a
efectelor activării complementului dependente
de MASP-2 la un subiect uman, care suferă de
microangiopatie trombotică (TMA) asociată cu
transplantul de celule stem hematopoietice.
Metodele includ etapa de administrare la
subiectul, care are nevoie de aceasta, a unei

2
cantități de agent inhibitor al MASP-2, care
inhibă eficient activarea complementului
dependentă de MASP-2.

Secvențe: 71
Revendicări: 10
Figuri: 60

MD 4685 C1 2020.12.31

(54) Methods for treating conditions associated with MASP-2-dependent complement activation

(57) Abstract:

1
The invention relates to methods of inhibiting the effects of MASP-2-dependent complement activation in a human subject suffering from thrombotic microangiopathy (TMA) associated with hematopoietic stem cell transplant. The methods comprise the step of administering, to a subject in need thereof,

2
an amount of a MASP-2 inhibitory agent effective to inhibit MASP-2-dependent complement activation.

Sequences: 71

Claims: 10

Fig.: 60

(54) Метод лечения состояний, связанных с MASP-2-зависимой активацией комплемента

(57) Реферат:

1
Изобретение относится к способам ингибирования эффектов MASP-2-зависимой активации комплемента у человека, страдающего от тромботической микроангиопатии (ТМА), связанной с трансплантатом гемопоэтических стволовых клеток. Способы включают стадию введения субъекту, нуждающемуся

2
в этом, количества MASP-2 ингибирующего средства, которое эффективно ингибирует MASP-2-зависимую активацию комплемента.

Последовательности: 71

П. формулы: 10

Фиг.: 60

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

Sistemul complementului oferă în stadiul precoce un mecanism de inițiere, amplificare și
 5 dirijare al răspunsului imun la o infecție microbiană și alte leziuni acute (M.K. Liszewski and
 J.P. Atkinson. *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd.,
 1993 New York) la oameni și la alte vertebrate. În timp ce activarea complementului oferă o primă
 apărare de primă linie împotriva agenților patogeni potențiali, activitățile complementului, care
 promovează un răspuns imun protector, pot, de asemenea, să reprezinte o amenințare potențială
 10 pentru organismul-gazdă (K.R. Kalli et al., *Springer Semin. Immunopathol.* no 15, 1994, p.
 417-431; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig.* no 24, 1994, p. 219-228). De exemplu, produsele
 proteolizei C3 și C5 recrutează și activează neutrofilele. Deși sunt indispensabile pentru apărarea
 organismului-gazdă, neutrofilele activate sunt nediscriminatorii în eliberarea de enzime
 distrugătoare și pot provoca leziuni ale organelor. În plus, activarea complementului poate
 15 determina depunerea componentelor litice ale complementului pe celulele organismului-gazdă din
 apropiere, precum și pe țintele microbiene, rezultând cu liza celulei gazdă.

Sistemul complementului a fost, de asemenea, implicat în patogeniza numeroaselor stări de
 boală acută și cronică, incluzând: infarct miocardic, accident vascular cerebral, sindromul de
 insuficiență acută respiratoare (ARDS), leziuni de reperfuzie, șoc septic, permeabilitatea crescută a
 20 capilarelor după arsuri termice, inflamație bypass postcardiopulmonară, respingerea transplantului,
 poliartrită reumatoidă, scleroza difuză, miastenia gravis și boala Alzheimer. În aproape toate aceste
 stări, complementul nu este cauza apariției lor, ci este unul din multitudinea de factori implicați în
 patogeneză. Cu toate acestea, activarea complementului poate fi un mecanism patologic major și
 reprezintă un punct eficient pentru controlul clinic în multe dintre aceste stări de boală.
 25 Recunoașterea în ascensiune a importanței leziunii tisulare mediate de complement într-o varietate
 de stări de boală subliniază necesitatea unor medicamente inhibitoare eficiente ale
 complementului. Până în prezent, Eculizumab (Solaris®), un anticorp împotriva C5, este singurul
 medicament care este direcționat asupra complementului și care a fost aprobat pentru uz uman.
 Mai mult decât atât, C5 este una dintre mai multe molecule efectoare, care acționează în stadiile
 30 ulterioare în sistemul complementului, iar blocarea C5 nu inhibă activarea sistemului
 complementului. Prin urmare, un inhibitor al etapelor de inițiere a activării complementului ar
 avea avantaje semnificative față de un inhibitor în etapele ulterioare ale reacției sistemului
 complement.

În prezent, este larg acceptat faptul, că sistemul complementului poate fi activat prin trei căi
 35 distincte: calea clasică, calea lectinei și calea alternativă. Calea clasică este de obicei declanșată de
 un complex constituit din anticorpi ai organismului-gazdă legați la o particulă străină (adică un
 antigen) și pentru generarea unui răspuns imun umoral specific este necesară o expunere prealabilă
 a unui antigen. Deoarece activarea căii clasice depinde de un răspuns imun adaptiv anterior al
 organismului-gazdă, o astfel de cale clasică este parte a sistemului imunitar dobândit. În schimb, atât
 40 calea lectinei, cât și calea alternativă sunt independente de imunitatea adaptivă și sunt parte a
 sistemului imunitar congenital.

Activarea sistemului complementului conduce la activarea ulterioară a zimogenelor factorilor
 de serin protează. Prima etapă în activarea căii clasice este legarea unei molecule specifice de
 recunoaștere, C1q, cu antigenul, legat de moleculele IgG și IgM. C1q este asociată cu proenzimele
 45 serin proteazei C1r și C1s ca un complex notat C1. După legarea moleculei C1q cu complexul imun,
 scindarea autoproteolitică a situsului Arg-Ile C1r este însoțită de scindarea și activarea C1s mediată
 de C1r, care astfel dobândește capacitatea de a scinde C4 și C2. C4 este scindat în două fragmente,
 desemnate C4a și C4b, și, în mod similar, C2 este scindat în C2a și C2b. Fragmentele C4b sunt
 abile să formeze legături covalente cu grupe hidroxil sau amino adiacente și să genereze C3
 50 convertaza (C4b2a) prin interacțiune necovalentă cu fragmentul C2a al C2 activate. C3 convertaza
 (C4b2a) activează C3 prin scindare proteolitică în subcomponentele C3a și C3b, conducând la
 generarea C5 convertazei (C4b2a3b), care, prin scindarea C5, conduce la formarea complexului de
 atac membranar (C5b combinat cu C6, C7, C8 și C9, denumit și "MAC"), care poate perturba
 membranele celulare, conducând la liză celulară. Formele activate ale C3 și C4 (C3b și C4b) sunt
 55 depuse covalent pe suprafețele țintă străine, care sunt recunoscute de receptorii complementului pe
 multiple fagocite.

Indiferent de aceasta, prima etapă în activarea sistemului complement prin calea lectinei este,
 de asemenea, legarea moleculelor specifice de recunoaștere, care este urmată de activarea
 proenzimelor serin proteazelor asociate. Însă, în locul legării complexelor imune cu ajutorul C1q,
 60 moleculele de recunoaștere în calea lectinei cuprind un grup de proteine de legare a carbohidraților
 (lectină fixatoare de manan (MBL), H-ficolină, M-ficolină, L-ficolină și lectină CL-11 de tip C),

denumite colectiv lectine (J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572, 2002, p. 387- 400; Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* no 21, 2003, p. 547, 578; Teh et al., *Immunology*, no 101, 2000, 225- 232; J. Luet et al., *Biochim Biophys Acta*, no 1572, 2002, p. 387-400; Holmskov et al., *Annu Rev Immunol.* no 21, 2003, p. 547-578; Teh et al., *Immunology*, no 101, 2000, p. 225-232; Hansen et al., *J. Immunol.* no 185 (10), 2010, p. 6096-6104).

Ikeda și colab. primii au demonstrat că, analogic lui C1q, MBL poate activa sistemul complementului după legarea la eritrocitele acoperite cu manan de drojdie într-un mod dependent de C4 (Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* no 262, 1987, p. 7451-7454). MBL, membru al familiei de proteine coleine, este o lectină dependentă de calciu, care se leagă cu carbohidrații la grupele 3 și 4-hidroxi orientate în planul ecuatorial al inelului de piranoză. De aceea liganzii principali pentru MBL sunt D manoză și N-acetil-D-glucosamina, în timp ce carbohidrații, care nu se potrivesc cu această cerință sterică, au o afinitate nedetectabilă pentru MBL (Weis et al., *Nature*, no 360, 1992, p. 127-134). Interacțiunea dintre MBL și zaharurile monovalente este extrem de slabă, cu constante de disociere de obicei în interval milimolar de o singură cifră. MBL realizează o legătură strânsă specifică cu liganzii glicani prin aviditate, adică prin interacțiunea simultană cu reziduuri multiple de monozaharide situate în imediata vecinătate a celorlalte (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* no 299, 1992, p. 129-136). MBL recunoaște fragmentele de carbohidrați, care decorează în mod obișnuit suprafețele microorganismelor, cum ar fi bacteriile, drojdiile, paraziții și unele virusuri. Dimpotrivă, MBL nu recunoaște D galactoza și acidul sialic, penultimul și ultimul zahar care decorează de obicei complexe de glicoconjugate "mature", prezente pe glicoproteinele plasmiei și suprafeței celulare la mamifere. Această specificitate de legare este considerată a promova recunoașterea suprafețelor "străine" și protejează de "autoactivare". Cu toate acestea, MBL nu se leagă cu afinitate mare la grupele "precursorilor" glicanilor cu conținut înalt de manoză pe glicoproteinele și glicolipidele N- legate, sechestrate în reticulul endoplasmatic și în aparatul Golgi din celule de mamifere (Maynard et al., *J. Biol. Chem.* no 257, 1982, p. 3788-3794). Prin urmare, celulele deteriorate sunt ținte potențiale pentru activarea căii lectinei prin legarea cu MBL.

Ficolinele posedă un alt tip de domeniu de lectină, decât MBL, numit domeniu asemănător fibrinogenului. Ficolinele leagă resturile de zahăr într-un mod independent de Ca^{++} . La om au fost identificate trei tipuri de ficoline (L-ficolină, M-ficolină și H-ficolină). Cele două ficoline serice, L-ficolină și H-ficolină, au în comun o specificitate pentru N-acetil-D-glucosamină; cu toate acestea, H-ficolina leagă, de asemenea, și N-acetil-D-galactozamina. Diferența în specificitatea L-ficolinei, H-ficolinei, CL-11 și MBL în raport cu zaharurile înseamnă, că diferite lectine pot fi complementare și țintite diferit, deși și glicoconjugate, care parțial se dublează. Acest concept este susținut de raportul recent publicat că, din lectinele cunoscute participante în calea lectinei, numai L-ficolina se leagă în mod specific la acidul lipoteichoic, un glicoconjugat de membrană celulară, găsit pe toate bacteriile Gram pozitive (Lynch et al., *J. Immunol.* no 172, 2004, p. 1198-1202). Secvențele aminoacide ale coleinelor (adică, MBL) și ficolinelor nu prezintă nici o asemănare semnificativă. Cu toate acestea, cele două grupe de proteine au organizații de domeniu similare și, în mod similar C1q, se assemblează în structuri oligomere, care maximizează abilitatea lor de legare în multisiteu.

Concentrațiile serice de MBL sunt extrem de variabile în populațiile sănătoase și acest lucru este controlat genetic prin polimorfisme mutații atât în regiunile promotor, cât și în cele care codifică gena MBL. Nivelul de expresie a MBL, ca o proteină de fază acută, este suplimentar reglată în creștere în procesul inflamației. L-ficolina este prezentă în ser în concentrații similare cu cele ale MBL. De aceea, eficiența ramurii L-ficolinice a căii lectinei este potențial comparabilă cu cea a ramurii MBL. MBL și ficolinele pot funcționa, de asemenea, ca opsonine, care permit fagocitelor să fie direcționate asupra suprafețelor decorate cu MBL și ficolină (Jack et al., *J. Leukoc. Biol.*, no 77(3), 2004, p. 328-336; Matsushita and Fujita, *Immunobiology*, no 205(4-5), 2002, p. 490-497; Aoyagi et al., *J. Immunol.*, no. 174(1), 2005, p. 418-425). Această opsonizare necesită interacțiunea acestor proteine cu receptorii fagocitelor (Kuhlman et al., *J. Exp Med.*, no 169, 1989, p. 1733; Matsushita et al., *J. Biol.Chem.*, no 271, 1996, p. 2448-54), a căror identitate nu a fost stabilită.

MBL umană formează o interacțiune specifică și cu afinitate înaltă prin domeniul său asemănător cu collagenul cu serin proteaze unice de tipul C1r/C1, denumite serin proteaze asociate cu MBL (MASP). Până în prezent, au fost descrise trei MASP-uri. Mai întâi, a fost identificată și caracterizată o singură enzimă "MASP", caracterizată ca enzima responsabilă pentru inițierea cascadei reacțiilor complementului (adică, reacțiilor de scindare a C2 și C4) (Matsushita et al., *J. Exp. Med.* no 176(6), 1992, p. 1497-1502; Ji et al., *J. Immunol.* no 150, 1993, p. 571-578). S-a determinat ulterior că activitatea MASP reprezintă, de fapt, activitatea unui amestec de două

proteaze: MASP-1 și MASP-2 [1]. Cu toate acestea, s-a demonstrat că un singur complex MBL-MASP-2 este suficient pentru activarea complementului [2]. Mai mult decât atât, numai MASP-2 a scindat C2 și C4 cu un grad înalt de transformare [3]. Prin urmare, MASP-2 este o protează responsabilă de activarea C4 și C2 pentru a genera C3 convertaza, C4b2a. Aceasta este o diferență semnificativă de complexul C1 al căii clasice, în care acțiunea coordonată a două serin proteaze specifice (C1r și C1s) conduce la activarea sistemului complementului. Mai mult decât atât, a fost izolată a treia protează nouă, MASP-3 (Dahl, M. R. et al., *Immunity*, no 15, 2001, p. 127-135). MASP-1 și MASP-3 reprezintă produse alternativ combinate ale unei și aceleiași gene.

10 MASP conțin organizații de domenii identice cu cele aleClr și Cls, componente enzimaticale ale complexului C1 (Sim et al., *Biochem.Soc Trans.*, no 28, 2000, p. 545). Aceste domenii includ un domeniu N-terminal Clr/Clf/factorului de creștere al endoteliului vaselor (VEGF) al ariciului de mare/proteinei morfogenetice osoase (CUB); un domeniu similar factorului de creștere epidermal; un al doilea domeniu CUB; un tandem al domeniilor proteinelor reglatoare ale complementului și un domeniu de serin protează. Ca și în proteazele C1, activarea MASP-2 se produce prin scindarea unei legături Arg-Ile adiacente domeniului serin proteazei, ceea ce conduce la scindarea enzimei în lanțurile A și B legate cu disulfură, în care ultimul dintre aceste lanțuri constă din domeniul serin proteazei.

20 MBL se poate asocia, de asemenea, cu o formă alternativă combinată de MASP-2, cunoscută ca proteină asociată cu MBL de 19 kDa (Map19) sau proteină mică asociată cu MBL (sMAP), care nu posedă activitatea catalitică a MASP2 (Stover, J. *Immunol.* no 162, 1999, p. 348190; Takahashi și colab., *Int. Immunol.*, no 11, 1999, p. 859-863). Map19 cuprinde primele două domenii ale MASP-2, urmate de o secvență suplimentară din patru aminoacizi unici. Funcția Map19 este neclară (Degn et al., *J. Immunol. Metode*, 2011). Genele MASP-1 și MASP-2 sunt localizate pe cromozomii umani 3 și, respectiv, 1 (Schwaeble et al., *Immunobiology*, no 205, 2002, p. 455-466).

25 Un șir de date obținute atestă, că există diferite complexe MBL-MASP și că fracția cea mai mare din MASP din ser nu formează complexe cu MBL (Thiel et al., *J. Immunol.*, no165, 2000, p. 878-887). Atât H, cât și L-ficolina se leagă cu toate MASP-urile și activează calea lectinei a complementului, la fel ca și MBL (Dahl et al., *Immunity*, no 15, 2001, p. 127-135; Matsushita et al., *J. Immunol.*, no 168, 2002, p. 3502-3506). Atât calea lectinei, cât și calea clasică formează o C3 convertază comună (C4b2a) și cele două căi converg în această etapă.

30 Calea lectinei este recunoscută ca având un rol major în apărarea gazdei împotriva infecției într-un organism-gazdă, care nu a fost supus infectării. Dovezi convingătoare privind implicarea MBL în protecția organismului-gazdă sunt prezentate în investigațiile pacienților cu niveluri serice reduse de MBL funcțional [4]. Acești pacienți prezintă sensibilitate la infecții bacteriene și fungice recurente. Aceste simptome sunt, de obicei, evidente la varste fragede, în timpul unei perioade distincte de rezistență redusă a organismului, pe măsura reducerii titrului anticorpilor materni, dar înainte de a se dezvolta un răspuns umoral cu formarea unui repertoriu complet al anticorpilor. Acest sindrom deseori rezultă din mutații în câteva situsuri din porțiunea colagenă a MBL, care interferează cu formarea corectă a oligomerilor MBL. Însă, deoarece MBL poate funcționa ca o opsonină independent de complement, nu se știe în ce măsură susceptibilitatea crescută la infecție se datorează dereglării activării complementului.

40 Spre deosebire de căile clasice și de lectină, nici unul din inițiatorii căii alternative nu au demonstrat că realizează funcțiile de recunoaștere pe care le îndeplinesc C1q și lectinele în celelalte două căi. În prezent, este acceptat faptul, că calea alternativă este supusă în mod spontan unei activări ciclice cu un nivel redus, care poate fi ușor amplificat pe suprafețe străine sau pe alte suprafețe anormale (bacterii, drojdii, celule infectate viral sau țesuturi deteriorate), care sunt lipsite de elemente moleculare proprii, care controlează activarea spontană a complementului. Există patru proteine plasmatice implicate direct în activarea căii alternative: C3, factorii B și D și properdina.

50 Deși există o multitudine de dovezi ale implicării atât a căii clasice, cât și a căii lectinei de activare a complementului în patogeneza bolilor umane neinfecțioase, rolul căii lectinei numai urmează să fie elucidat. Studiile recente oferă dovezi, că activarea căii lectinei poate fi responsabilă de activarea complementului și de inflamația asociată în leziunea ischemică/de reperfuzie. Collard et al. (2000) au relatat, că celulele endoteliale cultivate, supuse stresului oxidativ, leagă MBL și prezintă depunerea C3 la acțiunea asupra lor a serului uman (Collard et al., *Am. J. Pathol.*, no 156, 2000, p. 1549-1556). În plus, tratarea serurilor umane cu anticorpi monoclonali blocați anti-MBL conduce la inhibarea legării MBL și activării complementului. Aceste concluzii au fost precizate pe un model experimental cu șobolani cu reperfuzie ischemică

miocardică, în care la șobolanii tratați cu un anticorp de blocare îndreptat împotriva MBL de șobolan s-a înregistrat o reducere semnificativă a deteriorării miocardului după ocluzia unei artere coronare, comparative cu șobolanii tratați cu un anticorp de control (Jordan et al., *Circulation*, no 104, 2001, p. 1413-1418). Mecanismul molecular al legării MBL cu endoteliul vascular după un stres oxidativ este încă neclar; dar un studiu recent sugerează că activarea căii lectinei după un stres oxidativ poate fi mediată prin legarea MBL cu citokeratinele endoteliului vascular și nu cu glicoconjugate (Collard et al., *Am. J. Pathol.*, no 159, 2001, p. 1045-1054). În alte studii a fost determinat rolul căii clasice și căii alternative în patogeniza leziunii în ischemie/de reperfuzie, iar rolul căii lectinei în această boală rămâne controversat (Riedermann, N.C. et al., *Am. J. Pathol.*, no 162, 2003, p. 363-367).

Un studiu recent a arătat, că MASP-1 (și posibil, de asemenea, MASP-3) este necesară pentru a transforma enzima de activare a căii alternative, a factorului D, din forma sa de zimogen în forma sa activă enzimatic [5]. Importanța fiziologică a acestui proces este subliniată de absența activității funcționale a căii alternative în plasma șoarecilor cu deficit de MASP-1/3. Generarea proteolitică a C3b din C3 nativ este necesară pentru funcționarea căii alternative. Deoarece C3 convertaza a căii alternative (C3bBb) conține C3b ca o subunitate esențială, întrebarea privind originea primului C3b prin calea alternativă prezintă o problemă neclară și necesită cercetări ample.

C3 aparține unei familii de proteine (împreună cu C4 și α -2 macroglobulina), care conțin o modificare rară posttranslațională, cunoscută ca legătură tioester. Grupa tioester este compusă dintr-o glutamine, a cărei grupă carbonil terminală formează o legătură tioester covalentă cu grupa sulfhidril a unei cisteine fără trei aminoacizi. Această legătură este instabilă, iar glutamil-tioesterul electrolit poate reacționa cu fragmente nucleofile, cum ar fi grupele hidroxil sau amino, și astfel formează o legătură covalentă cu alte molecule. Legătura tioesterului este relativ stabilă când se sechestrează într-un buzunar hidrofob al C3 intact. Cu toate acestea, scindarea proteolitică a C3 până la C3a și C3b are drept rezultat expunerea legăturii tioestere foarte reactive pe C3b și, în urma atacului nucleofil cu porțiuni adiacente conținând grupele hidroxil sau amino, C3b devine legat covalent cu ținta. Pe lângă rolul său bine documentat în atașarea covalentă a C3b cu țintele complementului, se consideră că tioesterul C3 are un rol esențial în declanșarea căii alternative. Conform "teoriei activării în gol", acceptate pe larg, calea alternativă este inițiată prin generarea convertazei în fază fluidă, iC3Bb, care este formată din C3 cu tioester hidrolizat (iC3, C3 (H₂O)) și factorul B (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol.*, no 7, 1984, p. 143-162). C3b asemănător C3 (H₂O) este generat din C3 nativ printr-o hidroliză spontană lentă a tioesterului intern, prezent în proteină (Pangburn, M. K. et al., *J. Exp. Med.*, no 154, 1981, p. 856-867). Datorită activității C3(H₂O)Bb convertazei, moleculele C3b sunt depuse pe suprafața țintă, inițiind astfel calea alternativă.

Foarte puțină informație este despre inițiatorii activării căii alternative. Se consideră, că activatorii includ pereți de celule de drojdie (zimosan), numeroase polizaharide pure, eritrocite de iepure, anumite imunoglobuline, virusuri, fungi, bacterii, celule tumorale de animale, paraziți și celule deteriorate. Singura caracteristică comună a acestor activatori este prezența carbohidraților, însă, datorită complexității și varietății structurilor carbohidraților, este dificilă stabilirea determinantelor moleculare comune pentru recunoaștere. S-a acceptat opinia, că activarea căii alternative este reglată prin echilibrul fin între componentele inhibitoare ale acestei căi, cum ar fi Factorul H, Factorul I, DAF și CR1 și properdina, care este singurul regulator pozitiv al căii alternative (Schwaebler W.J. and Reid K.B., *Immunol Today*, no 20(1), 1999, p. 17-21).

Adițional la mecanismul de activare aparent neregulat, descris mai sus, calea alternativă poate de asemenea asigura o amplificare de ansă puternică pentru C3 convertază (C4b2a) a căii lectinei/clasice, deoarece orice C3b generat poate participa împreună cu factorul B în formarea C3 convertazei adiționale (C3bBb) a căii alternative. C3 convertază căii alternative este stabilizată prin legarea properdinei. Properdina prelungește perioada de înjumătățire a C3 convertazei căii alternative de șase până la zece ori. Adăugarea C3b la C3 convertaza căii alternative conduce la formarea C5 convertazei căii alternative.

Se consideră, că toate cele trei căi (adică clasică, a lectinei și alternativă) se converg în C5, la scindarea cărei se formează produse cu multiple efecte proinflamatorii. Calea convergentă a fost menționată drept cale a produselor finale de activare a complementului. C5a reprezintă în exclusivitate o anafilatoxină puternică, care provoacă modificări ale tonusului mușchiului neted și vaselor, precum și ale permeabilității vasculare. Este, de asemenea, o chemotaxină și un activator puternic al neutrofililor și monocitelor. Activarea celulară mediată de C5a poate amplifica în mod semnificativ răspunsurile inflamatorii prin inducerea eliberării mai multor mediatori inflamatorii suplimentari, incluzând citokine, enzime hidrolitice, metaboliți ai acidului arahidonic și forme

active de oxigen. Scindarea C5 conduce la formarea C5b9, cunoscută și ca complex de atac membranar (MAC). În prezent există dovezi convingătoare, că depunerea sublitică a MAC poate avea un rol important în procesul inflamației, adițional la rolul său de complex de formare a porilor litici.

- 5 Adițional la rolul său esențial în apărarea imună, sistemul complementului contribuie la deteriorarea țesuturilor în numeroase stări clinice. Astfel, există o necesitate stringentă de a elabora inhibitori ai complementului, terapeutic eficienți pentru a preveni aceste efecte adverse.

- 10 Descrierea invenției este destinată pentru a face cunoștință cu alegerea conceptelor într-o formă simplificată, care sunt descrise în cele ce urmează în capitolul "Descrierea detaliată a invenției". Această descriere a esenței invenției nu are drept scop nici identificarea semnelor cheie ale obiectului revendicat, nici utilizarea în calitate de informație auxiliară la determinarea volumului obiectului revendicat.

- 15 Intr-un aspect, prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a leziunii celulelor endoteliale microvasculare și/sau a formării trombilor la un subiect care suferă de microangiopatie trombotică (TMA), cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de anticorp inhibitor MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2. În unele variante de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei TMA, selectate din grupa constând din sindrom hemolitic uremic (aHUS), purpură trombotică trombocitopenică (TTP) și sindrom hemolitic uremic atipic (HUS). În unele variante de realizare
20 înainte de administrarea compoziției subiectul trebuie să prezinte unul sau mai multe simptome selectate din grupa constând din (i) anemie, (ii) trombocitopenie (iii) insuficiență renală și (iv) creșterea creatininei, și compoziția se administrează într-o cantitate eficientă și timp de o perioadă suficientă pentru a îmbunătăți unul sau mai multe dintre simptomele menționate. În unele variante de realizare agentul inhibitor MASP-2 reprezintă un anticorp anti-MASP-2 sau un fragment al
25 acestuia. În unele variante de realizare agentul inhibitor MASP-2 este un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau un fragment al acestuia, care se leagă specific la o porțiune din SECV ID NR: 6. În unele variante de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă leziunea celulelor endoteliale microvasculare.

- 30 Intr-un alt aspect invenția prevede o metodă de inhibare a activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect care suferă sau prezintă risc de a dezvolta sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS), cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de agent inhibitor de MASP-2 eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2. Într-o variantă de realizare înainte de administrarea compoziției subiectul trebuie să prezinte unul sau mai multe simptome selectate din grupa constând din (i) anemie, (ii)
35 trombocitopenie (iii) insuficiență renală și (iv) creșterea creatininei, și compoziția este administrată într-o cantitate eficientă și timp de o perioadă suficientă pentru a îmbunătăți unul sau mai multe dintre simptomele menționate. Într-o variantă de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de a dezvolta aHUS, care nu depinde de factorul H. Într-o variantă de realizare subiectul suferă de aHUS asociat cu factorul I, factorul B sau cofactorul de membrană CD46. Într-o variantă de realizare
40 agentul inhibitor MASP-2 este un anticorp anti-MASP-2 sau fragment al acestuia, cum ar fi un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau un fragment al acestuia, care se leagă specific cu o porțiune din SECV ID NR: 6. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă leziunea celulelor endoteliale microvasculare. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea trombului.

- 45 Intr-un alt aspect invenția prevede o metodă de reducere a probabilității dezvoltării simptomelor clinice asociate cu aHUS la un subiect cu risc de instalare a sindromului hemolitic uremic atipic (aHUS). Metoda, conform acestui aspect al invenției, cuprinde (a) determinarea prezenței unui marker genetic la subiectul cunoscut de a fi asociat cu aHUS; (b) monitorizarea periodică a subiectului pentru a determina prezența sau absența a cel puțin de unui simptom
50 selectat din grupa constând din anemie, trombocitopenie, insuficiență renală și creșterea creatininei; și (c) administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate dintr-un agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2 în cazul prezenței a cel puțin de unui dintre următoarele simptome: anemie, trombocitopenie, insuficiență renală sau creșterea creatininei, în care compoziția este administrată într-o cantitate
55 eficientă și timp de o perioadă suficientă pentru a îmbunătăți unul sau mai multe simptome. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor MASP-2 este un anticorp anti-MASP-2 sau un fragment al acestuia, cum ar fi un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau un fragment al acestuia, care se leagă specific cu o porțiune din SECV ID NR: 6. Într-o variantă de realizare a metodei etapa (a) cuprinde efectuarea unui test genetic de screening pe o probă prelevată de la subiect și

identificarea prezenței a cel puțin de unui marker genetic asociat cu aHUS într-o genă selectată din grupa constând din factorul complementului H (CFH), factorul I al complementului (CFI), factorul B al complementului (CFB), cofactorul membranei CD46, C3, proteina asemănătoare cu factorul complementului H (CFHR1), trombodulina proteică anticoagulantă (THBD), proteina 3 asemănătoare cu factorul complementului H (CFHR3) și proteina 4 asemănătoare cu factorul complementului H (CFHR4). Intr-o variantă de realizare metoda prevede suplimentar monitorizarea subiectului pentru apariția unui eveniment, despre care se știe că este asociat cu declanșarea simptomelor clinice aHUS, și administrarea la subiect a compoziției care cuprinde agentul inhibitor MASP-2 înainte, în timpul sau după apariția evenimentului declanșator. Într-o variantă de realizare, evenimentul asociat cu declanșarea simptomelor clinice aHUS este selectat din grupa constând din expunerea de lungă durată la un medicament, o infecție, o tumoră malignă, o leziune, un transplant de organe sau țesut și sarcină. Într-o variantă de realizare infecția este o infecție bacteriană. Într-o variantă de realizare compoziția se administrează subcutanat. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă leziunea celulelor endoteliale microvasculare. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea trombului.

Intr-un alt aspect, invenția prevede o metodă de inhibare a activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect care suferă sau prezintă risc de a dezvolta sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS) asociat unei infecții, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate dintr-un agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2. Într-o variantă de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de a dezvolta aHUS ne-enteric asociat cu o infecție cu *S. pneumoniae*. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor MASP-2 este un anticorp anti-MASP-2 sau fragment al acestuia, cum ar fi un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau un fragment al acestuia care se leagă specific la o porțiune din SECV ID NR: 6. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă leziunea celulelor endoteliale microvasculare. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea trombului.

Intr-un alt aspect invenția prevede o metodă de tratare a unui subiect care suferă de sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS), care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții care conține o cantitate dintr-un agent inhibitor MASP-2 eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2, administrarea agentului inhibitor MASP-2 fiind realizată printr-un cateter intravenos sau printr-o altă metodă de administrare prin cateter. Într-o variantă de realizare metoda prevede adițional tratarea pacientului cu plasmefereză. Într-o variantă de realizare compoziția cu conținut de agent inhibitor MASP-2 se administrează în absența plasmeferezei. Într-o variantă de realizare compoziția cu conținut de agent inhibitor MASP-2 se administrează printr-un cateter în prima perioadă de timp, cuprinzând în continuare administrarea compoziției cu conținut de agent inhibitor MASP-2 în a doua perioadă de timp, în care compoziția este administrată subcutanat. Într-o variantă de realizare metoda mai prevede determinarea periodică a nivelului cel puțin de un factor al complementului, în care determinarea unui nivel redus cel puțin de un factor al complementului, în comparație cu o valoare standard sau la un subiect sănătos, indică necesitatea de a continua tratamentul cu compoziția. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 este un anticorp anti-MASP-2 sau fragment al acestuia, cum ar fi un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau un fragment al acestuia, care se leagă specific la o porțiune din SECV ID NR: 6. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă leziunea celulelor endoteliale microvasculare. Într-o realizare, agentul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea trombului.

Intr-un alt aspect invenția prevede o metodă de tratare a unui subiect care suferă de purpura trombocitopenică (PTT) sau care prezintă simptome, care indică un diagnostic de PTT, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții care conține o cantitate dintr-un agent inhibitor al MASP-2 eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2, în care agentul inhibitor MASP-2 se administrează subiectului printr-un cateter intravenos sau prin altă metodă de administrare prin cateter. Într-o variantă de realizare subiectul prezintă cel puțin de unul sau mai multe simptome selectate din grupa constând din implicarea în procesul patologic a sistemului nervos central, trombocitopenie, afectare cardiacă severă, afectare pulmonară severă, infarct gastro-intestinal și gangrenă. Într-o variantă de realizare subiectul este testat pozitiv pentru prezența unui inhibitor al ADAMTS13, iar metoda prevede adițional administrarea unui imunosupresor. Într-o variantă de realizare compoziția cuprinzând agentul inhibitor al MASP-2 se administrează în prima perioadă de timp în absența plasmeferezei. Într-un exemplu de realizare subiectul este testat pozitiv pentru prezența unui inhibitor al ADAMTS-13, iar metoda prevede

suplimentar administrarea ADAMTS-13. Într-o variantă de realizare metoda prevede adițional tratarea pacientului cu plasmefereză. Într-o variantă de realizare compoziția cu conținut de un agent inhibitor al MASP-2 se administrează în prezența plasmeferezei. Într-o variantă de realizare compoziția cu conținut de un agent inhibitor al MASP-2 se administrează printr-un cateter în prima perioadă de timp, cuprinzând în plus administrarea compoziției cu conținut de un agent inhibitor al MASP-2 în a doua perioadă de timp, în care compoziția se administrează subcutanat în perioada a doua de timp. Într-o variantă de realizare metoda mai prevede determinarea periodică a nivelului cel puțin de un factor al complementului, în care determinarea unui nivel redus cel puțin de un factor al complementului, în comparație cu o valoare standard sau un subiect sănătos, indică necesitatea de a continua tratamentul cu compoziția. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 este un anticorp anti-MASP-2 sau fragment al acestuia, cum ar fi un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau un fragment al acestuia, care se leagă specific la o porțiune din SECV ID NR: 6. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă leziunea celulelor endoteliale microvasculare. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea trombului.

Într-un alt aspect invenția prevede o metodă de tratare a unui subiect care suferă de purpură trombocitopenică refractară (TTP) cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate dintr-un agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2. Într-o variantă de realizare compoziția se administrează subcutanat. Într-o variantă de realizare metoda mai prevede determinarea periodică a nivelului cel puțin de un factor al complementului, în care determinarea unui nivel redus cel puțin de un factor al complementului, în comparație cu o valoare standard sau la un subiect sănătos, indică necesitatea de a continua tratamentul cu compoziția. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 este un anticorp anti-MASP-2 sau fragment al acestuia, cum ar fi un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau un fragment al acestuia, care se leagă specific la o porțiune din SECV ID NR: 6. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă leziunea celulelor endoteliale microvasculare. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea trombului.

Într-un alt aspect prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei microangiopatii trombotice (TMA), în care TMA este cel puțin de una dintre (i) TMA asociate cancerului; (ii) TMA asociate chimioterapiei sau (iii) TMA asociate transplantului, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate dintr-un agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2. În unele exemple de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei TMA asociate cancerului și agentul inhibitor al MASP-2 se administrează sistemic subiectului într-o cantitate eficientă pentru a reduce riscul de dezvoltare a TMA sau pentru a reduce severitatea TMA. În unele variante de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a TMA asociate chimioterapiei și agentul inhibitor MASP-2 se administrează sistemic subiectului înainte, în timpul sau după chimioterapie într-o cantitate eficientă pentru reducerea riscului de a dezvolta TMA sau reducerea severității TMA. În unele variante de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a TMA asociate transplantului și agentul inhibitor al MASP-2 se administrează sistemic subiectului înainte, în timpul sau după procedura de transplant, într-o cantitate eficientă pentru a reduce riscul de dezvoltare a TMA sau a reduce severitatea TMA. În unele variante procedura de transplant este un transplant de celule stem hematopoietice alogene. În unele variante de realizare anterior sau în momentul dat subiectul administrează un tratament cu un inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare metoda cuprinde suplimentar administrarea la subiect a unui inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului, cum ar fi un anticorp anti-C5 umanizat sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, cum ar fi ecilizumab.

Într-un alt aspect invenția prevede o metodă de inhibare a activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect, care suferă sau prezintă risc de a dezvolta sindromul Upshaw-Schulman (USS), cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2. În unele variante de realizare metoda prevede tratarea unui subiect cu risc de a dezvolta USS, în care metoda cuprinde administrarea unei cantități de un agent inhibitor al MASP-2 timp de o perioadă de timp eficientă pentru ameliorarea sau prevenirea unui sau a mai multor simptome clinice asociate cu TTP. În unele variante de realizare metoda prevede suplimentar monitorizarea

periodică a subiectului privind prezența unui eveniment cunoscut de a fi asociat cu declanșarea simptomelor clinice ale TTP și administrarea agentului inhibitor al MASP-2 după depistarea evenimentului. În unele variante de realizare metoda prevede suplimentar monitorizarea periodică a subiectului și la determinarea prezenței anemiei, trombocitopeniei sau creșterii creatinei se administrează un agent inhibitor al MASP-2. În unele variante de realizare anterior sau în momentul dat subiectul administrează un tratament cu un inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare metoda cuprinde suplimentar administrarea la subiect a unui inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului, cum ar fi un anticorp anti-C5 umanizat sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, cum ar fi eculizumab.

Intr-un alt aspect invenția prevede o metodă de inhibare a activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect care suferă de boala Degos, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate dintr-un agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2. În unele variante de realizare anterior sau în momentul dat subiectul administrează un tratament cu un inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare metoda cuprinde suplimentar administrarea la subiect a unui inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului, cum ar fi un anticorp anti-C5 umanizat sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, cum ar fi eculizumab.

Intr-un alt aspect invenția prevede o metodă de inhibare a activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect care suferă de sindromul antifosfolipidic catastrofal (CAPS), care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate dintr-un agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2. În unele variante de realizare anterior sau în momentul dat subiectul administrează un tratament cu un inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare metoda cuprinde suplimentar administrarea la subiect a unui inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului, cum ar fi un anticorp anti-C5 umanizat sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, cum ar fi eculizumab.

În unele exemple de realizare ale oricărei dintre metodele, conform prezentei invenții, agentul inhibitor al MASP-2 este un anticorp inhibitor al MASP-2 sau un fragment al acestuia. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 are funcția efectoare redusă. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 nu inhibă în mod semnificativ calea clasică. În unele variante de realizare agentul inhibitor al MASP-2 este un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau fragment al acestuia, care se leagă specific la o porțiune din SECV ID NR: 6. În unele variante de realizare anticorpul anti-MASP-2 sau fragmentul acestuia este selectat din grupa constând dintr-un anticorp recombinant, un anticorp având funcție efectoare redusă, un anticorp himeric, un anticorp umanizat și un anticorp uman. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 este un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ și F(ab')₂. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 este o moleculă cu un singur lanț. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor MASP-2 este selectat din grupa constând dintr-o moleculă IgG1, o moleculă IgG2 și o moleculă IgG4. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 este o moleculă IgG4 cuprinzând o mutație S228P. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 leagă MASP-2 umană cu o constantă de disociere KD de 10 nM sau mai mică. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă depunerea C3b într-o analiză *in vitro* în 1% ser uman cu IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin. În unele exemple de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă depunerea C3b în 90% ser uman cu IC₅₀ de 30 nM sau mai puțin.

În unele variante de realizare ale oricărei dintre metodele, conform prezentei invenții, anticorpul monoclonal inhibitor al MASP-2 sau fragmentul său de legare la antigen conține: (a) o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și (b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii)

lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 89-97 din SECV ID NR: 70. În unele variante de realizare anticorpul monoclonal inhibitor al MASP-2 cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu notată ca SEQ ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor notată ca SEQ ID NO: 70. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 sau fragmentul acestuia de legare la antigen recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop, recunoscut de un anticorp de referință, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

Intr-un alt aspect al invenției sunt prevăzute metode pentru inhibarea formării trombilor la un subiect care suferă de sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS), care cuprinde administrarea la subiect a unei cantități dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare a antigenului, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul unui subiect care suferă de aHUS în cel puțin de 40%, comparativ cu serul subiectului netratat. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul unui subiect care suferă de aHUS la un nivel cel puțin de 20% mai înalt (de exemplu, cel puțin de 30% mai înalt, cel puțin de 40% mai înalt sau cel puțin de 50% mai înalt) decât efectul său inhibitor asupra depunerii C5b-9 în serul de la același subiect. În unele variante subiectul este în faza acută a aHUS. În unele variante subiectul este în faza de remisiune a aHUS. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor MASP-2 este un anticorp monoclonal sau fragment al acestuia, care se leagă specific la o porțiune din SECV ID NR: 6. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 sau fragmentul acestuia este selectat din grupa constând dintr-un anticorp recombinant, un anticorp având funcție efectoare redusă, un anticorp himeric, un anticorp umanizat și un anticorp uman. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 este un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ și F(ab')₂. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor MASP-2 este o moleculă cu un singur lanț. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor MASP-2 este selectat din grupa constând dintr-o moleculă IgG1, o moleculă IgG2 și o moleculă IgG4. În unele variante de realizare, anticorpul inhibitor MASP-2 este o moleculă IgG4 cuprinzând o mutație S228P. În unele variante de realizare, anticorpul inhibitor al MASP-2 leagă MASP-2 uman cu o constantă de disociere KD de 10 nM sau mai mică. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor de MASP-2 inhibă depunerea C3b într-o analiză in vitro în 1% ser uman la IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin. În unele exemple de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC₅₀ de 30 nM sau mai puțin. În unele variante de realizare anticorpul monoclonal inhibitor al MASP-2 sau fragmentul său de legare a antigenului cuprinde: (a) o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și (b) o regiune variabilă a catenei ușoare cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul CDR-L3 ușor cuprinzând secvența de aminoacizi de la 89-97 din SECV ID NR: 70. În unele variante de realizare anticorpul monoclonal inhibitor al MASP-2 cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu notată ca SEQ ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor notată ca SEQ ID NO: 70. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 sau fragmentul de legare la antigen al acestuia recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop, recunoscut de un anticorp de referință, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o metodă de tratare a unui subiect care suferă de aHUS rezistent la terapia cu plasmă, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2. Intr-o realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 este un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau fragmentul acestuia, care se leagă în mod specific la MASP-2 uman. Intr-o realizare anticorpul sau fragmentul acestuia este selectat din grupa constând dintr-un anticorp recombinant, un anticorp având funcție efectoare redusă, un anticorp himeric, un anticorp umanizat și un anticorp uman. În unele variante de realizare anterior sau în momentul dat subiectul administrează un tratament cu un inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului, în care inhibitorul activării componentelor terminale ale complementului este un anticorp uman anti-C5 sau fragment al

acestui de legare a antigenului . Intr-o variantă de realizare metoda cuprinde în plus tratarea pacientului cu plasmefereză. Într-o realizare compoziția, cuprinzând anticorpul inhibitor al MASP-2, se administrează în absența plasmeferezei.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o metodă de tratare a unui subiect care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2 . Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 este un anticorp monoclonal anti-MASP-2 sau fragmentul acestuia, care se leagă în mod specific la MASP-2 uman. Intr-o variantă de realizare anticorpul sau fragmentul acestuia este selectat din grupa constând dintr-un anticorp recombinant, un anticorp având funcție efectoare redusă, un anticorp himeric, un anticorp umanizat și un anticorp uman. Într-o variantă de realizare subiectul anterior sau în momentul dat administrează tratament cu un inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei complementului C5. Intr-o variantă de realizare subiectul suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, care este rezistentă la tratamentul cu o transfuzie de trombocite și/sau rezistentă la tratamentul cu plasmefereză. Într-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează într-o cantitate eficientă pentru a îmbunătăți cel puțin de unul sau mai mulți parametri clinici asociați cu TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, cum ar fi creșterea numărului de trombocite (de exemplu, cel puțin de dublă, cel puțin de triplă, cel puțin de patru ori a numărului de trombocite înregistrat înainte de tratament), o creștere a haptoglobinei și/sau o reducere a lactatdehidrogenazei.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede o metodă de tratare a unui subiect uman, care suferă de TMA persistentă asociată cu transplant de celule stem hematopoietice (HSCT-TMA) cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu un conținut de o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare a antigenului, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2. Intr-o variantă de realizare metoda cuprinde în continuare identificarea unui subiect cu TMA persistentă asociată cu transplant de celule stem hematopoietice înainte de etapa de administrare la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare a antigenului, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2. Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 este un anticorp monoclonal sau fragment al acestuia, care se leagă în mod specific la MASP-2 uman. Intr-o variantă de realizare anticorpul sau fragmentul acestuia de legare a antigenului este selectat din grupa constând dintr-un anticorp recombinant, un anticorp având funcție efectoare redusă, un anticorp himeric, un anticorp umanizat și un anticorp uman. Într-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 nu inhibă în mod semnificativ calea clasică. Într-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă depunerea C3b în 90% ser uman cu IC₅₀ de 30 nM sau mai puțin. Într-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 sau fragmentul său de legare a antigenului cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 ale secvenței de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67 și regiunea variabilă a lanțului ușor cuprinzând CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 ale secvenței de aminoacizi notată ca SEQ ID NO: 70. Într-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează pacientului în absența plasmeferezei. Intr-o variantă de realizare subiectul anterior sau în momentul dat administrează tratament cu un anticorp anti-C5 umanizat sau fragment al acestuia de legare a antigenului, astfel în acest caz inhibitorul activării componentelor terminale ale complementului este un anticorp anti-C5 umanizat sau fragment al acestuia de legare a antigenului. Intr-un exemplu de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 este livrat subiectului sistemic. Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 sau fragmentul acestuia de legare a antigenului se administrează într-o cantitate eficientă pentru a îmbunătăți cel puțin de unul sau mai mulți dintre următorii parametri clinici asociați cu TMA persistentă asociată cu transplant de celule stem hematopoietice: (i) creșterea numărului de trombocite (de exemplu, cel puțin de dublă, cel puțin de triplă, cel puțin de patru ori a numărului de trombocite înregistrat înainte de tratament)); (ii) creșterea haptoglobinei; (iii) reducerea lactatdehidrogenazei (LDH) și/sau (iv) reducerea creatininei.

Intr-un alt aspect prezenta invenție prevede compoziții pentru inhibarea efectelor adverse ale activării complementului dependente de MASP2, care cuprinde o cantitate terapeutic eficientă dintr-un agent inhibitor al MASP2, cum ar fi un anticorp inhibitor al MASP-2 și un purtător farmaceutic acceptabil. Sunt de asemenea prevăzute metode producere a unui medicament pentru utilizare pentru inhibarea efectelor adverse ale activării complementului dependente de MASP-2 la subiecții vii, care au nevoie de aceasta, cuprinzând o cantitate terapeutic eficientă dintr-un agent

inhibitor al MASP-2 într-un purtător farmaceutic. Sunt prevăzute, de asemenea, metode fabricare a medicamentelor pentru utilizare pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2 pentru tratamentul fiecărei dintre stările, afecțiunile și tulburările descrise în continuare.

Metodele, compozițiile și medicamentele din prezenta invenție sunt utile pentru inhibarea efectelor adverse ale activării complementului dependente de MASP-2 *in vivo* la mamifere, incluzând oamenii, care suferă sau prezintă risc de a dezvolta microangiopatie trombotică (TMA), așa cum se descrie în continuare.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1- fig. 60, care reprezintă:

fig. 1 - schema, care ilustrează structura genomică a MASP 2 umană;

fig. 2A - schema principală, care ilustrează structura domeniului proteinei MASP-2 umane;

fig. 2B - schema principală, care ilustrează structura domeniului proteinei MAP19 umane;

fig. 3 - schema, care ilustrează strategia de knock-out a MASP-2 murină;

fig. 4 - schema, care ilustrează construcția minigenă a MASP-2 umană;

fig. 5A - rezultatele, care demonstrează că deficiența MASP-2 conduce la pierderea activării C4 mediate de calea lectinei, măsurate prin lipsa depunerii de C4b pe manan, așa cum se descrie în Exemplul 2;

fig. 5B - rezultatele, care demonstrează că deficiența MASP-2 conduce la pierderea activării C4 mediate de calea lectinei, măsurate prin lipsa depunerii de C4b pe zimosan, așa cum se descrie în Exemplul 2;

fig. 5C - rezultatele, care demonstrează nivelurile relative de activare ale C4 în probele serice obținute din MASP-2+/-; MASP-2/- și tulpinile de tip sălbatic, măsurate prin depunerea de C4b pe manan și pe zimosan, așa cum se descrie în Exemplul 2;

fig. 6 - rezultatele, care demonstrează că adăugarea de MASP-2 recombinantă murină la probele de ser MASP-2/- recuperează activarea C4 mediată de calea lectinei într-o manieră dependentă de concentrația proteinei, măsurate prin depunerea C4b pe manan, așa cum se descrie în Exemplul 2;

fig. 7 - rezultatele, care demonstrează că calea clasică este funcțională în tulpina MASP-2/-, așa cum se descrie în Exemplul 8;

fig. 8A - rezultatele, care demonstrează că fragmentul Fab2 al anticorpului #11 anti-MASP-2 inhibă formarea C3-convertazei, așa cum se descrie în Exemplul 10;

fig. 8B - rezultatele, care demonstrează că fragmentul Fab2 al anticorpului # 11 anti-MASP-2 se leagă cu MASP-2 de șobolan nativă, așa cum se descrie în Exemplul 10;

fig. 8C - rezultatele, care demonstrează că fragmentul Fab2 al anticorpului # 41 anti-MASP-2 inhibă scindarea C4, așa cum se descrie în Exemplul 10;

fig. 9 - rezultatele, care demonstrează că toate fragmentele Fab2 testate ale anticorpilor anti-MASP-2, care au inhibat formarea de C3 convertază, de asemenea, inhibă scindarea C4, așa cum se descrie în Exemplul 10;

fig. 10 - schema, care ilustrează polipeptidele recombinante derivate din MASP-2 de șobolan, care au fost utilizate pentru cartografierea epitopilor fragmentelor Fab2 care blochează anticorpii anti MASP-2, așa cum se descrie în Exemplul 11;

fig. 11 - rezultatele, care demonstrează legarea fragmentului Fab2 al anticorpilor # 40 și # 60 anti-MASP-2 cu polipeptidele MASP-2 de șobolan, cum se descrie în Exemplul 11;

fig. 12 - rezultatele, care demonstrează clearance-ul azotului de uree din sânge pentru șoareci fără mutații (+/+) și MASP-2 (-/-) peste 24 și 48 de ore după reperfuzie într-un model experimental de leziune ischemică/ de reperfuzie renală, cum se descrie în Exemplul 12;

fig. 13A - rezultatele, care prezintă nivelele inițiale de proteină VEGF în complexul coroidian (RPE) izolat de la șoareci de tip sălbatic (+/+) și MASP-2 (-/-), cum se descrie în Exemplul 13;

fig. 13B - rezultatele, care arată nivelele inițiale de proteină VEGF în complexul coroidian (RPE) în ziua 3 la șoarecii de tip sălbatic (+/+) și MASP-2 (-/-) după leziunea indusă de laser într-un model experimental de degenerare maculară, cum se descrie în Exemplul 13;

fig. 14 - rezultatele, care arată volumul mediu de neovascularizare coroidală (CNV) în ziua a șapte după leziunea indusă de laser la șoarecii de tip sălbatic (+/+) și MASP-2 (-/-), cum se descrie în Exemplul 13;

fig. 15A și 15B - curbele de răspuns la doză pentru inhibarea depunerii de C4b (fig. 15A) și inhibarea activării trombinei (fig. 15B) după administrarea unui fragment Fab2 al anticorpului anti-MASP-2 în ser de șobolani sănătoși, cum se descrie în Exemplul 14;

fig. 16A și 16B - agregarea plachetară măsurată (exprimată ca suprafață de agregare) la șoarecii MASP-2 (-/-) (fig. 16B), comparativ cu agregarea plachetară la șoarecii de tip sălbatic netratați și la șoarecii de tip sălbatic la care calea de activare a complementului este inhibată cu un

agent depletor pe bază de factor din venin de cobră (CVF) și un inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului (antagonist al C5aR) (fig. 16A) într-un model experimental de reacție Schwartzman localizată a coagulării intravasculare diseminate, cum se descrie în exemplul 15;

5 fig. 17 - ilustrarea grafică a nivelelor azotului de uree din sânge (BUN) măsurate fie la șobolanii recipienți de transplant WT (+/+) (B6), sau MASP-2 (-/-) ai rinichilor de la donatori WT (+/+), cum se descrie în Exemplul 16;

fig. 18 - ilustrarea grafică a procentului supraviețuirii șoarecilor WT (+/+) și MASP-2 (-/-) în funcție de numărul de zile după infecția microbiană în modelul experimental de ligare și puncție cecală (CLP), cum se descrie în Exemplul 17;

10 fig. 19 - ilustrarea grafică a numărului de bacterii, măsurate la șoarecii WT (+/+) și MASP-2 (-/-) după infecția microbiană în modelul experimental de ligare și puncție cecală (CLP), cum se descrie în Exemplul 17;

fig. 20 - graficul Kaplan-Mayer, care ilustrează procentul de supraviețuire a șoarecilor WT (+/+), MASP-2 (-/-) și C3 (-/-) peste șase zile după provocarea cu administrare intranasală de *Pseudomonas aeruginosa*, cum se descrie în Exemplul 18;

fig. 21 - ilustrarea grafică a nivelului depunerii de C4b, măsurat ca procent de control, în probele prelevate la momente diferite după administrarea subcutanată a 0,3 mg/kg sau 1,0 mg/kg de anticorp monoclonal anti-MASP-2 murină la șoarecii WT, cum se descrie în Exemplul 19;

20 fig. 22 - ilustrarea grafică a nivelului depunerii de C4b, măsurat ca procent de control, în probele prelevate la momente diferite după administrarea intraperitoneală a 0,6 mg/kg de anticorp monoclonal anti-MASP-2 murină la șoarecii WT, cum se descrie în Exemplul 19;

fig. 23 - ilustrarea grafică a volumului mediu de neovascularizare coroidală (CNV) în ziua a șapte după leziunea indusă cu laser la șoarecii WT (+/+) pretratați cu o singură injecție intraperitoneală de 0,3 mg/kg sau 1,0 mg/kg de anticorp monoclonal anti-MASP-2 murină, așa cum se descrie în Exemplul 20;

fig. 24A - ilustrarea grafică a procentului supraviețuirii șoarecilor MASP-2 (-/-) și WT (+/+) după infectare cu 5×10^8 /100 μ l UFC de *N. meningitidis*, cum se descrie în Exemplul 21;

30 fig. 24B - ilustrarea grafică a semnificației log unității formatoare de colonii (UFC)/ml de *N. meningitidis* recuperate la momente diferite de timp în probele de sânge prelevate de la șoarecii MASP-2 KO (-/-) și WT (+/+) infectați cu 5×10^8 UFC/100 μ l *N. meningitidis*, cum se descrie în Exemplul 21;

fig. 25A - ilustrarea grafică a procentului supraviețuirii șoarecilor MASP-2 KO (-/-) și WT (+/+) după infectare cu 2×10^8 UFC/100 μ l *N. meningitidis*, așa cum se descrie în Exemplul 21;

35 fig. 25B - ilustrarea grafică a semnificației log UFC/ml de *N. meningitidis* recuperate la momente diferite de timp în probele de sânge prelevate de la șoarecii WT (+/+) infectați cu 2×10^8 UFC/100 μ l *N. meningitidis*, cum se descrie în Exemplul 21;

fig. 25C - ilustrarea grafică a semnificației log UFC/ml de *N. meningitidis* recuperate la momente diferite de timp în probele de sânge prelevate de la șoarecii MASP-2 KO (-/-) infectați cu 2×10^8 UFC/100 μ l *N. meningitidis*, cum se descrie în Exemplul 21;

40 fig. 26A - ilustrarea grafică a rezultatelor testului de depunere C3b, care demonstrează că șoarecii MASP-2 (-/-) păstrează o cale clasică funcțională, cum se descrie în Exemplul 22;

fig. 26B - ilustrarea grafică a rezultatelor testului de depunere C3b pe plăcile acoperite cu zimosan, demonstrând că șoarecii MASP-2 (-/-) păstrează o cale alternativă funcțională, cum se descrie în Exemplul 22;

45 fig. 27A - ilustrarea grafică a pierderii tisulare induse de ischemia miocardică/leziunea de reperfuzie (MIRI) după ligarea ramificației anterioare stângi a arterei coronare (LAD) și reperfuziei la șoarecii C4 (-/-) (n = 6) și pentru control la animalele WT unipare (n = 7), care prezintă zona de risc (AAR) și mărimea infarctului (INF) cum se descrie în Exemplul 22;

50 fig. 27B - ilustrarea grafică a dependenței mărimei infarctului (INF) de zona de risc (AAR) la șoarecii C4 (-/-) și WT, tratați cum se descrie în fig. 42A, demonstrând că șoarecii C4 (-/-) sunt la fel de susceptibili la MIRI, ca și șoarecii folosiți pentru control WT (linie punctată), cum se descrie în Exemplul 22;

fig. 28A - ilustrarea grafică a rezultatelor unui test de depunere a C3b utilizând serul de la șoareci WT, șoareci C4 (-/-) și ser de la șoareci C4 (-/-) preincubați cu manan, cum se descrie în Exemplul 22;

55 fig. 28B - ilustrarea grafică a rezultatelor unui test de depunere a C3b în ser de la șoareci WT, C4 (-/-) și MASP-2 (-/-) amestecat cu diferite concentrații de fragment mAb al anticorpului anti-MASP-2 murină (mAbM11), cum se descrie în Exemplul 22;

fig. 28C - ilustrarea grafică a rezultatelor unui test de depunere a C3b în ser uman de la subiecți WT (C4 suficienți) și ser cu deficiență de C4 și în ser de la subiecții cu deficiență de C4, preincubat cu manan, cum se descrie în Exemplul 22;

5 fig. 28D - ilustrarea grafică a rezultatelor unui test de depunere a C3b în ser uman de la subiecți WT (C4 suficienți) și C4 deficienți amestecat cu fragment mAb al anticorpului uman anti-MASP-2 (mAbH3), cum se descrie în Exemplul 22;

10 fig. 29A - ilustrarea grafică a analizei comparative a activității C3 convertazei în plasma de la diferite tulpini de șoareci cu deficit de complement, testate fie în condiții de testare specifice pentru calea lectinei de activare, sau în condiții de testare specifică pentru calea clasică de activare, cum se descrie în Exemplul 22;

fig. 29B - ilustrarea grafică a cineticii rezolvării în timp a activității C3 convertazei în plasma de la diferite tulpini de șoareci cu deficit de complement, testate în condiții specifice pentru calea lectinei de activare, cum se descrie în Exemplul 22;

15 fig. 30 - rezultatele Western blottingului, care demonstrează activarea C3 umană, arătată prin prezența lanțului a', prin substraturile de trombină FXIa și FXa, cum se descrie în Exemplul 23;

fig. 31 - rezultatele testului de depunere a C3 în probele de ser obținute de la șoarecii WT, MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11 (-/-)/C4(-/-) și C4(-/-), așa cum se descrie în Exemplul 23;

20 fig. 32A - graficul supraviețuirii Kaplan-Meier, care prezintă procentul supraviețuirii, în funcție de timp după expunerea la o radiație de 7,0 Gy, a șoarecilor de control și a șoarecilor tratați cu anticorp anti-MASP-2 murină (mAbM11) sau cu anticorp anti-MASP-2 umană (mAbH6), cum se descrie în Exemplul 29;

25 fig. 32B - graficul supraviețuirii Kaplan-Meier, care prezintă procentul supraviețuirii, în funcție de timp după expunerea la o radiație de 6,5 Gy, a șoarecilor de control și a șoarecilor tratați cu anticorp anti-MASP-2 murină (mAbM11) sau anticorp anti-MASP-2 umană (mAbH6), cum se descrie în Exemplul 29;

fig. 33 - graficul supraviețuirii Kaplan-Meier, care prezintă procentul supraviețuirii șoarecilor MASP-2 KO și WT după administrarea unei doze infecțioase de $2,6 \times 10^7$ UFC de *N. meningitidis* serogrupa A Z2491, demonstrând că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați de mortalitatea indusă de *N. meningitidis*, așa cum se descrie în Exemplul 30;

30 fig. 34 - graficul supraviețuirii Kaplan-Meier, care prezintă procentul supraviețuirii șoarecilor MASP-2 KO și WT după administrarea unei doze infecțioase de 6×10^6 UFC de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58, demonstrând că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați de mortalitatea indusă de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58, așa cum se descrie în Exemplul 30;

35 fig. 35 - ilustrarea grafică a semnificației log UFC/ml de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58, recuperată la diferite momente de timp, în probele de sânge prelevate de la șoarecii MASP-2 KO și WT după infectare intraperitoneală cu 6×10^6 UFC de *N. meningitidis* serogrupa B tulpină MC58 ($n = 3$ la momente diferite de timp pentru ambele grupe de șoareci, rezultatele sunt exprimate ca valoare medie $\pm$ SEM), demonstrând că, deși șoarecii MASP-2 KO au fost infectați cu aceeași doză de *N. meningitidis* serogrupa B tulpină MC58, ca și șoarecii WT, șoarecii MASP-2 KO au un clearance mai înalt al bacteremiei, comparativ cu șoarecii WT, cum se descrie în Exemplul 30;

40 fig. 36 - ilustrarea grafică a valorilor medii ale scorului morbidității la șoarecii MASP-2 și WT peste 3, 6, 12 și 24 de ore după infectare cu 6×10^6 UFC/100 μ l de *N. meningitidis* serogrupa B tulpină MC58, demonstrând că șoarecii cu deficit de MASP-2 prezintă rezistența la infecție, cu scoruri ale morbidității mult mai joase peste 6 ore, cum se descrie în Exemplul 30;

45 fig. 37 - graficul supraviețuirii Kaplan-Meier, care prezintă procentul supraviețuirii șoarecilor după administrarea unei doze infecțioase de 4×10^6 μ l UFC de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58, urmate de administrarea peste 3 ore după infectare fie a anticorpului inhibitor al MASP-2 (1 mg/kg) sau a anticorpului izotip de control, demonstrând că anticorpul anti-MASP-2 este eficient pentru tratarea și îmbunătățirea supraviețuirii la subiecții infectați cu *N. meningitidis*, cum se descrie în Exemplul 31;

50 fig. 38 - ilustrarea grafică a semnificației log UFC/ml de culturi viabile de *N. meningitidis* serogrupa B-MC58, recuperate la diferite intervale de timp în concentrație de 20% ser uman după infectare intraperitoneală cu $6,5 \times 10^6$ UFC/100 μ l de tulpină *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58 peste 0, 30, 60 și 90 de minute după incubare în prezența: (A) serului uman normal (NHS) plus anticorp anti-MASP-2 uman; (B) serului uman normal (NHS) plus anticorp izotip de control; (C) MBL -/- ser uman; (D) serului uman normal (NHS) și (E) serului uman normal inactivat prin încălzire (NHS), care arată că uciderea dependentă de complement a *N. meningitidis* în serul uman

este semnificativ mai manifestă la adiția anticorpului anti-MASP-2 uman, cum se descrie în Exemplul 32;

fig. 39 - ilustrarea grafică a semnificației log UFC/ml de culturi viabile de *N. meningitidis* serogrupa B-MC58, recuperate la diferite intervale de timp în probele de ser de șoarece, demonstrând că în serul șoarecilor MASP-2 -/- este prezent un nivel mai înalt de activitate bactericidă în ceea ce privește *N. meningitidis*, decât în serul șoarecilor WT, cum se descrie în Exemplul 32;

fig. 40 - graficul hemolizei (determinat prin eliberarea hemoglobinei din eritrocitele lizate de șoarece (Crry/C3 -/-) în supernatant, măsurată prin fotometrie) eritrocitelor murine acoperite cu manan sub acțiunea serului uman într-o varietate de concentrații serice. Serurile testate includ: ser (HI) NHS inactivat termic, MBL -/-, NHS +anticorp anti-MASP-2 și NHS pentru control, cum se descrie în Exemplul 33;

fig. 41 - graficul hemolizei (determinat prin eliberarea hemoglobinei din eritrocitele lizate de șoarece WT în supernatant, măsurată prin fotometrie) eritrocitelor murine neacoperite neacoperite cu manan sub acțiunea serului uman într-o varietate de concentrații serice. Serurile testate includ: ser (HI) NHS inactivat termic, MBL -/-, NHS +anticorp anti-MASP-2 și NHS pentru control, demonstrând că inhibarea MASP-2 inhibă liza mediată de complement a eritrocitelor murine WT nesensibilizate, cum se descrie în Exemplul 33;

fig. 42 - graficul hemolizei (determinat prin eliberarea hemoglobinei din eritrocitele lizate de șoarece (CD55/59 -/-) în supernatant, măsurată prin fotometrie) eritrocitelor murine neacoperite sub acțiunea serului uman într-o varietate de concentrații serice. Serurile testate include: ser (HI) inactivat termic NHS, MBL -/-, NHS +anticorp anti-MASP-2 și NHS pentru control, așa cum se descrie în Exemplul 33;

fig. 43 - graficul procentului supraviețuirii în funcție de timp (zile) după expunere la o radiație de 8 Gy la șoarecii de control și la șoarecii tratați cu anticorp MASP-2 anti-uman (mAbH6), cum se descrie în Exemplul 34;

fig. 44 - graficul timpului apariției ocluziunii microvasculare după injectarea lipopolizaharidei (LPS) la șoarecii MASP-2 -/- și WT, arătând procentul șoarecilor cu formarea trombului, măsurat peste 60 de minute, demonstrând că formarea trombilor este detectată peste 15 minute la șoarecii WT, până la 80% din șoarecii WT demonstrând formarea de trombi peste 60 de minute; în contrast, niciunul dintre șoarecii MASP-2 -/- nu a prezentat formare de trombi în timp de 60 minute (criteriul log de rang: $p = 0,0005$), cum se descrie în Exemplul 35;

fig. 45 - graficul procentului supraviețuirii șoarecilor de control tratați cu soluție fiziologică ($n = 5$) și a șoarecilor tratați cu anticorpi anti-MASP-2 ($n = 5$) în modelul experimental de HUS indus cu STX/LPS în funcție de timp (ore), demonstrând că toți șoarecii de control au murit timp de 42 de ore, în timp ce, în contrast, 100% din șoarecii tratați cu anticorpi anti-MASP-2 au supraviețuit pe tot parcursul experimentului, cum se descrie în Exemplul 36;

fig. 46 - graficul, în funcție de timp după inducerea leziunii, al procentului șoarecilor cu ocluzie microvasculară în modelul experimental de iradiere UV fluoresceină izocianat/dextran (FITC/dextran UV) după tratamentul cu anticorp izotip de control sau cu anticorp mAbH6 uman anti-MASP-2 (10 mg/kg), administrat la 16 ore și cu 1 oră înainte de injectarea FITC/Dextranului, cum se descrie în Exemplul 37;

fig. 47 - graficul timpului ocluziei în minute pentru șoarecii tratați cu anticorpul anti-MASP-2 uman (mAbH6) și anticorpul izotip de control, în care datele sunt raportate ca puncte de dispersare cu valori medii (bare orizontale) și bare standard de eroare (bare verticale). Testul statistic, folosit pentru analiză, este t testul Student pentru o selecție; în care simbolul "*" indică $p = 0,0129$, cum se descrie în Exemplul 37; și

fig. 48 - graficul timpului până la ocluzie în minute pentru șoarecii de tip sălbatic, șoarecii MASP-2 KO și șoarecii de tip sălbatic pretratați cu anticorp anti-MASP-2 umană (mAbH6) administrat intraperitoneal în cantitate de 10 mg/kg cu 16 ore înainte și încă cu o oră înainte de inducerea trombozei într-un model de leziune a celulelor endoteliale, indusă cu FITC-dextran/lumină de intensitate joasă (800-1500), cum se descrie în Exemplul 37;

fig. 49 - graficul Kaplan-Meier, care prezintă procentul șoarecilor cu trombi în funcție de timp în microangiopatia trombotică indusă cu FITC-Dextran la șoarecii tratați cu doze crescânde anticorp inhibitor al MASP-2 uman (mAbH6) sau de anticorp izotip de control, cum se descrie în Exemplul 39;

fig. 50 - graficul timpului mediu până la debutul (minute) formării trombilor în funcție de doză de mAbH6 (* $p < 0,01$ comparativ cu controlul), cum se descrie în Exemplul 39;

fig. 51 - graficul Kaplan-Meier, care prezintă procentul de șoareci cu ocluzie microvasculară în funcție de timp în microangiopatia trombotică indusă de FITC-Dextran la șoarecii tratați cu doze crescând anticorp inhibitor al MASP-2 uman (mAbH6) sau de anticorp izotip de control, cum se descrie în Exemplul 39;

5 fig. 52 - graficul timpului mediu până la ocluzia microvasculară în funcție de doza de mAbH6 (* $p < 0,05$ în comparație cu controlul), cum se descrie în Exemplul 39;

fig. 53A - graficul nivelului depunerii de MAC în prezența sau în absența anticorpului monoclonal (OMS646) uman anti-MASP-2 în condiții de testare specifice pentru calea lectinei, demonstrând că OMS646 inhibă depunerea MAC, mediată de lectină, cu o valoare IC_{50} de
10 aproximativ 1 nM, cum se descrie în Exemplul 40;

fig. 53B - graficul nivelului depunerii MAC în prezența sau în absența anticorpului monoclonal (OMS646) uman anti-MASP-2 în condiții de testare specifice pentru calea clasică, demonstrând că OMS646 nu inhibă depunerea MAC, mediată de calea clasică, cum se descrie în Exemplul 40 ;

15 fig. 53C - graficul nivelului depunerii MAC în prezența sau în absența anticorpului monoclonal (OMS646) uman anti-MASP-2 în condiții de testare specifice pentru calea alternativă, demonstrând că OMS646 nu inhibă depunerea MAC, mediată de calea alternativă, cum se descrie în Exemplul 40 ;

fig. 54 - graficul profilului farmacocinetic (PK) al anticorpului monoclonal (OMS646) uman anti-MASP-2 la șoareci, prezentând concentrația de OMS646 (valoarea medie $n=3$ animale/grupe)
20 în funcție de timp după administrarea dozei indicate, cum se descrie în Exemplul 40;

fig. 55A - graficul răspunsului farmacodinamic (PD) al anticorpului monoclonal (OMS646) uman anti-MASP-2, măsurat ca o reducere a activității sistemice a căii lectinei la șoareci după administrare intravenoasă, cum se descrie în Exemplul 40;

25 fig. 55B - graficul răspunsului farmacodinamic (PD) al anticorpului monoclonal (OMS646) uman anti-MASP-2, măsurat ca o reducere a activității sistemice a căii lectinei la șoareci după administrare subcutanată, cum se descrie în Exemplul 40;

fig. 56 - graficul efectului inhibitor al anticorpului anti-MASP-2 (OMS646), comparativ cu sCR1 asupra depunerii C5b-9, indusă de serul aHUS pe celulele HMEC-1 ADP-activate, cum se descrie în Exemplul 41;

30 fig. 57 - graficul efectului inhibitor al anticorpului anti-MASP-2 (OMS646), comparativ cu sCR1 asupra formării trombului, indusă de serul aHUS pe celulele HMEC-1 ADP-activate, cum se descrie în Exemplul 42;

fig. 58 - graficul modificării medii a numărului de trombocite, în funcție de momentul inițial de timp (săptămâni) la subiecții, care suferă de microangiopatie trombotică asociată cu transplant de celule stem hematopoietice (HSCT-TMA), după tratamentul cu anticorp (OMS646) inhibitor al MASP-2, cum se descrie în Exemplul 46;

35 fig. 59 - graficul modificării medii a lactatdehidrogenazei (LDH), în funcție de momentul inițial de timp (săptămâni) la subiecții, care suferă de HSCT-TMA persistentă după tratamentul cu anticorp (OMS646) inhibitor al MASP-2, cum se descrie în Exemplul 46; și

40 fig. 60 - graficul modificării medii a haptoglobinei în funcție de momentul inițial de timp (săptămâni) la subiecții, care suferă de HSCT-TMA după tratamentul cu anticorp (OMS646) inhibitor al MASP-2, cum se descrie în Exemplul 46.

DESCRIEREA LISTEI SECVENȚELOR

45 SEQ ID NO:1 ADNc al MAp19 umane

SEQ ID NO:2 proteina MAp19 umană (cu secvența lider)

SEQ ID NO:3 proteina MAp19 umană (matură)

SEQ ID NO:4 ADNc al MASP-2 umane

SEQ ID NO:5 proteina MASP-2 umană (cu secvența lider)

50 SEQ ID NO:6 proteina MASP-2 umană (matură)

SEQ ID NO:7 ADN genomic al MASP-2 umane (exonii 1-6)

ANTIGENE: (REFERITOARE LA PROTEINA MASP-2 MATURĂ)

SEQ ID NO:8 secvența domeniului CUBI (aa 1-121)

SEQ ID NO:9 secvența domeniului CUBEGF (aa 1-166)

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

SEQ ID NO:11 regiunea EGF (aa 122-166)

SEQ ID NO:12 domeniul serin-proteazei (aa 429 – 671)

SEQ ID NO:13 domeniul serin-proteazei inactivat (aa 610-625 cu mutația Ser618 în Ala)

SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL (peptide domeniului CUB1)

- SEQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (peptida domeniului CUBI)
- SEQ ID NO:16 TFRSDYSN (nucleul regiunii, care leagă MBL)
- SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (nucleul regiunii, care leagă MBL)
- 5 SEQ ID NO:18 IDECQVAPG (PEPTIDA EGF)
- SEQ ID NO:19 ANMLCAGLES GGK DSCR GDSSG GALV (nucleul, care leagă serin-proteaza)
- INHIBITORI AI PEPTIDELOR:
- 10 SEQ ID NO:20 ADNc MBL cu lungime completă
- SEQ ID NO:21 proteina MBL cu lungime completă
- SEQ ID NO:22 OGK-X-GP (consensus de legare)
- SEQ ID NO:23 OGKLG
- SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G
- 15 SEQ ID NO:25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO
- SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG
- SEQ ID NO:27 GAOGSOGKEKGAOGPGPOGPOGKMGPKGEOGDO (H-ficolina umană)
- SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (ficolina p35 umană)
- 20 SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (site de scindare C4)
- INHIBITORII EXPRESIEI:
- SEQ ID NO:30 ADNc al domeniului CUBI-EGF (nucleotidele 22-680 din SEQ ID NO:4)
- SEQ ID NO:31
- 5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3' Nucleotidele 12-45 din SEQ ID NO:4 inclusiv site-ul de inițiere a translării MASP-2 (sens)
- 25 SEQ ID NO:32
- 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' Nucleotidele 361-396 in SEQ ID NO:4, care codifică regiunea, care conține siteul de legare a MASP-2 MBL (sens)
- SEQ ID NO:33
- 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3' Nucleotidele 610-642 in SEQ ID NO:4, care codifică regiunea, care conține domeniul CUBI
- 30 PRIMERII DE CLONARE:
- SEQ ID NO:34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (5' PCR pentru CUB)
- SEQ ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (3' PCR pentru CUB)
- SEQ ID NO:36 GGAATTCCTACAGGGCGCT (3' PCR pentru CUBIEGF)
- 35 SEQ ID NO:37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (3' PCR pentru CUBIEGFCUBI)
- SEQ ID NOS:38-47 reprezintă primerii de clonare pentru anticorpii umanizați
- SEQ ID NO:48 reprezintă o legătură peptide din 9 aminoacizi
- VECTOR DE EXPRESIE:
- 40 SEQ ID NO:49 reprezintă o inserție minigenă MASP-2
- SEQ ID NO: 50 reprezintă ADNc MASP-2 murină
- SEQ ID NO: 51 reprezintă o proteină MASP-2 murină (cu secvență lider)
- SEQ ID NO: 52 reprezintă o proteină MASP-2 murină matură
- SEQ ID NO: 53 reprezintă ADNc MASP-2 de șobolan
- SEQ ID NO: 54 reprezintă o proteină MASP-2 de șobolan (cu secvență lider)
- 45 SEQ ID NO: 55 reprezintă o proteină MASP-2 de șobolan matură
- SEQ ID NO: 56-59 reprezintă oligonucleotide pentru mutageneza site-direcționată a MASP-2 murine, utilizate pentru generarea MASP-2A umane
- SEQ ID NO: 60-63 reprezintă oligonucleotide pentru mutageneza site-direcționată a MASP-2 murine, utilizate pentru generarea MASP-2A murine
- 50 SEQ ID NO: 64-65 reprezintă oligonucleotide pentru mutageneza site-direcționată a MASP-2 de șobolan, utilizate pentru generarea MASP-2A de șobolan
- SEQ ID NO: 66 AND, care codifică regiunea variabilă a lanțului greu (VH) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) (fără peptida de semnalizare)
- 55 SEQ ID NO: 67 polipeptida regiunii variabile (VH) a lanțului greu 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)
- SEQ ID NO: 68 polipeptida regiunii variabile (VH) a lanțului greu 17N16mc
- SEQ ID NO: 69: ADN, care codifică regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 70: polipeptida regiunii variabile (VL) a lanțului ușor 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)

SEQ ID NO: 71: polipeptida regiunii variabile (VL) a lanțului ușor 17N16_dc17N9

Prezenta invenție se bazează pe descoperirea surprinzătoare de către inventatorii prezentei invenții a posibilității inhibării căii lectinei MASP-2 mediate, menținând în același timp calea clasică intactă. Prezenta invenție descrie, de asemenea, utilizarea MASP-2 în calitate de o țintă terapeutică pentru inhibarea deteriorării celulare asociate cu activarea căii complementului mediate de lectină, menținând intactă componenta căii clasice (dependentă de C1q) a sistemului imun.

I. DEFINIȚII

Cu excepția cazului în care se definește în mod specific aici, toți termenii utilizați aici au aceeași semnificație, înțeleasă de specialiștii în domeniul tehnicii prezentei invenții. Următoarele definiții sunt prezentate pentru a oferi claritate cu privire la termenii, așa cum sunt utilizați în descriere și revendicări pentru a descrie prezenta invenție.

Așa cum se utilizează aici, termenul "activarea complementului dependentă de MASP-2" cuprinde activarea dependentă de MASP-2 a căii lectinei, care se produce în condiții fiziologice (adică, în prezența Ca^{++}), conducând la formarea C3 convertazei C4b2a a căii lectinei și, după acumularea C3b, a produsului de scindare a C3, la formarea C5 convertazei C4b2a(C3b)_n, care s-a constatat, că este prima cauză a opsonizării.

Așa cum este utilizat aici, termenul "cale alternativă" se referă la activarea complementului care este declanșată, de exemplu, de zimosanul din pereții celulari ai fungilor și de drojdie, lipopolizaharida (LPS) din membranele externe ale microbilor Gram negativi și eritrocitele de iepure, precum și de multe polizaharide pure, eritrocite de iepure, virusuri, bacterii, celule tumorale animale, paraziți și celule deteriorate și care se crede în mod tradițional că provin din generarea proteolitică spontană a C3b din factorul complementului C3.

Așa cum este utilizat aici, termenul "calea lectinei" se referă la activarea complementului, care se produce prin legarea specifică a proteinelor serice și non-serice de legare a carbohidraților, incluzând lectina fixatoare de manoză (MBL), CL-11 și ficolinele (H-ficolină, M-ficolină sau L-ficolină).

Așa cum este utilizat aici, termenul "cale clasică" se referă la activarea complementului, care se declanșează de anticorpii legați la o particulă străină și pentru care este necesară legarea moleculei de recunoaștere C1q.

Așa cum este utilizat aici, termenul "agent inhibitor al MASP-2" se referă la orice agent care se leagă sau direct interacționează cu MASP-2 și inhibă eficient activarea complementului dependentă de MASP2, incluzând anticorpi anti-MASP-2 și fragmente de legare MASP-2 ale acestora, peptide naturale și sintetice, compuși micromoleculari, receptori MASP-2 solubili, inhibitori de expresie și inhibitori naturali izolați și includ, de asemenea, peptide care concurează cu MASP-2 pentru legarea la o altă moleculă de recunoaștere (de exemplu, MBL, H-ficolină, M-ficolină sau L-ficolină) în calea lectinei, dar nu cuprinde anticorpi care se leagă de astfel de alte molecule de recunoaștere. Agenții inhibitori ai MASP-2, utili în metoda prezentei invenții, pot reduce activarea complementului dependentă de MASP-2 mai mult de 20%, cum ar fi mai mult de 50%, cum ar fi mai mult de 90%. Într-o variantă de realizare agentul inhibitor MASP-2 reduce activarea complementului dependentă de MASP2 mai mult de 90% (adică rezultă cu activarea complementului MASP-2 de numai 10% sau mai puțin).

Așa cum este utilizat aici, termenul "anticorp" cuprinde anticorpi și fragmente de anticorpi ai acestora, derivate de la orice mamifer producător de anticorpi (de exemplu, șoarece, șobolan, iepure și primat, incluzând omul) sau dintr-un hibridom, selecție de fagi, expresie recombinantă sau animale transgenice (sau alte metode producere a anticorpilor sau a fragmentelor de anticorpi), care se leagă în mod specific la o polipeptidă țintă, cum ar fi, de exemplu, polipeptidele MASP-2 sau porțiuni ale acestora. Nu se intenționează de a limita termenul "anticorp" în ceea ce privește sursa anticorpului sau modul în care acesta este produs (de exemplu, din hibridom, selecție de fagi, expresie recombinantă, animal transgenic, sinteza peptidelor, etc.). Exemplele de anticorpi includ: anticorpi policlonali, monoclonali și recombinanți; anticorpi pan-specifici, multispecifici (de exemplu, anticorpi bispecifici, anticorpi trispecifici); anticorpi umanizați; anticorpi murini; chimerici, murini-umani, murini-primate, anticorpi monoclonali umani-primate și anticorpi anti-idiotip și poate fi orice anticorp intact sau fragment al acestuia. Așa cum este utilizat aici, termenul "anticorp" cuprinde nu numai anticorpi policlonali sau monoclonali intacti, ci și fragmente ale acestora (cum ar fi dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), lanțuri unice (ScFv), variante sintetice ale acestora, variante prezente în mod natural, proteine de fuziune cuprinzând o porțiune de anticorp cu un fragment de legare a antigenului cu specificitate cerută, anticorpi

umanizați, anticorpi himerici și orice altă configurație modificată a moleculei de imunoglobulină, care cuprinde un situs sau un fragment de legare a antigenului (situs de recunoaștere a epitopului) cu specificitate cerută.

Un "anticorp monoclonal" se referă la o populație de anticorpi omogeni, în care anticorpul monoclonal este compus din aminoacizi (care apar natural și non-natural) și care sunt implicați în legarea selectivă a unui epitop. Anticorpii monoclonali sunt foarte specifici pentru antigenul țintă. Termenul "anticorp monoclonal" cuprinde nu numai anticorpi monoclonali intacti și anticorpi monoclonali cu lungime completă, ci și fragmente ale acestora (cum ar fi Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), lanțuri unice (ScFv), variante ale acestora, proteine de fuziune cuprinzând o porțiune de anticorp cu un fragment de legare a antigenului, anticorpi monoclonali umanizați, anticorpi monoclonali himerici și orice altă configurație modificată a moleculei de imunoglobulină, care cuprinde un fragment de legare a antigenului (situs de recunoaștere a epitopului) cu specificitate cerută și abilitate de a se lega de un epitop. Nu se intenționează de a limita termenul "anticorp" în ceea ce privește sursa anticorpului sau modul în care acesta este produs (de exemplu, din hibridom, selecție de fagi, expresie recombinantă, animale transgenice, etc.). Termenul include imunoglobuline complete, precum și fragmente etc., descrise mai sus, sub definiția "anticorp".

Așa cum este utilizat aici, termenul "fragment de anticorp" se referă la o porțiune derivată sau care se referă la un anticorp cu lungime completă, cum ar fi, de exemplu, un anticorp anti-MASP2, care cuprinde, în general, regiunea care leagă antigenul sau regiunea variabilă a acestuia. Exemplele ilustrative de fragmente de anticorp includ: fragmentele Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab')₂ și Fv, fragmentele scFv, diacorpi, anticorpi liniari, molecule de anticorpi cu un singur lanț și anticorpi multispecifici, formați din fragmente de anticorpi.

Așa cum este utilizat aici, un fragment de anticorp "cu un singur lanț Fv" sau "scFv" cuprinde domeniile V_H și V_L ale unui anticorp, în care aceste domenii sunt prezente într-un singur lanț polipeptidic. În general, polipeptida Fv cuprinde în plus un linker polipeptidic între domeniile V_H și V_L, care permite scFv să formeze structura dezirabilă pentru legarea antigenului.

Așa cum este utilizat aici, un "anticorp himeric" este o proteină recombinantă, care conține domenii variabile și regiuni de determinare a complementarității, derivată de la un anticorp de specie non-umană (de exemplu, rozătoare), în timp ce restul moleculei de anticorp derivă dintr-un anticorp uman.

Așa cum este utilizat aici, un "anticorp umanizat" este un anticorp himeric care cuprinde o secvență minimă, care este conformă regiunilor de determinare a complementarității specifice, derivate dintr-o imunoglobulină non-umană transplantată într-un cadru de anticorp uman. Anticorpii umanizați sunt, de obicei, proteine recombinante în care numai regiunile, care determină complementaritatea anticorpului, sunt de origine non-umană.

Așa cum este utilizat aici, termenul "lectină fixatoare de manoză" ("MBL") este echivalent cu proteina fixatoare de manan ("MBP").

Așa cum este utilizat aici, "complexul de atacare a membranei" ("MAC") se referă la un complex din cele cinci componente terminale ale complementului (C5b combinat cu C6, C7, C8 și C9), care se inseră și perturbă membranele (denumit de asemenea C5b-9).

Așa cum este utilizat aici, "un subiect" include toate mamiferele, incluzând, fără a se limita la oameni, primate non-umane, câini, pisici, cai, oi, capre, vaci, iepuri, porci și rozătoare.

Așa cum se utilizează aici, reziduurile aminoacizilor sunt abreviate după cum urmează: alanină (Ala; A), asparagină (Asn; N), acid aspartic (Asp; D), arginină (Arg; R), cisteină (Cys; C), acid glutamic (Glu; E), glutamină (Gln; Q), histidină (His; H), izoleucină (Ile; I), leucină (Leu; L), lizină (Lys; K), metionină (Met; M), fenilalanină (Phe; F), prolină (Pro; P), serină (Ser; S), treonină (Thr; T), triptofan (Trp; W), tirozină (Tyr; Y) și valină (Val; V).

În sensul cel mai larg, aminoacizii naturali pot fi împărțiți în grupuri pe baza caracteristicilor chimice ale lanțului lateral al aminoacizilor respectivi. Prin aminoacid "hidrofob" se înțelege fie Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys sau Pro. Prin aminoacid "hidrofil" se înțelege fie Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg, sau His. Această grupare a aminoacizilor poate fi în continuare subclasată după cum urmează. Prin "aminoacid hidrofil neîncărcat" se înțelege fie Ser, Thr, Asn, sau Gln. Prin aminoacid "cu proprietăți acide" se înțelege fie Glu, sau Asp. Prin aminoacid "cu proprietăți bazice" se înțelege fie Lys, Arg, sau His.

Așa cum este utilizat aici, termenul "substituție conservativă aminoacidă" este ilustrat printr-o substituție între aminoacizii din fiecare dintre următoarele grupe: (1) glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină, (2) fenilalanină, tirozină și triptofan, (3) serină și treonină, (4) aspartat și glutamat, (5) glutamină și asparagină și (6) lizină, arginină și histidină.

Termenul "oligonucleotidă", așa cum este utilizat aici, se referă la un oligomer sau polimer al acidului ribonucleic (ARN) sau al acidului dezoxiribonucleic (ADN) sau al mimetecilor acestora. Acest termen cuprinde, de asemenea, acele oligonucleobaze compuse din nucleotide naturale, zaharuri și legături covalente internucleozide (între lanțurile principale), precum și oligonucleotidele cu modificări sintetice.

Așa cum este utilizat aici, un "epitop" se referă la situsul pe o proteină (de exemplu, o proteină MASP-2 umană), care este legată cu un anticorp. "Epitopii suprapuși" includ cel puțin de un (de exemplu, doi, trei, patru, cinci sau șase) reziduu de aminoacid obișnuit, incluzând epitopi liniari și neliniari.

Așa cum este utilizat aici, termenii "polipeptidă", "peptidă" și "proteină" sunt utilizați interschimbabil și înseamnă orice lanț legat cu peptidă de aminoacizi, indiferent de lungimea sau modificarea post-translațională. Proteina MASP-2, descrisă aici, poate conține sau poate fi o proteină de tip sălbatic sau pot fi variante, care nu au mai mult de 50 (de exemplu, nu mai mult de una, două, trei, patru, cinci, șase, șapte, opt, nouă, zece, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 sau 50) substituții conservative aminoacide. Substituțiile conservative includ de obicei substituții în următoarele grupe: glicină și alanină; valină, izoleucină și leucină; acid aspartic și acid glutamic; asparagină, glutamină, serină și treonină; lizina, histidina și arginina; și fenilalanină și tirozină.

În unele variante de realizare proteina MASP-2 umană poate avea o secvență de aminoacizi care este identică sau are o identitate ce depășește 70% (de exemplu, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 sau 100%) cu proteina MASP-2 umană având secvența de aminoacizi prezentă în SECV ID NR: 5.

În unele exemple de realizare, fragmentele peptidice pot constitui cel puțin de 6 (de exemplu, cel puțin de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 sau 600 sau mai multe) reziduuri de aminoacizi în lungime (de exemplu, cel puțin de 6 reziduuri de aminoacizi substituenți, descrise în SECV ID NR: 5). În unele variante de realizare un fragment peptidic antigenic al unei proteine MASP-2 umane poate avea o lungime mai mică de 500 (de exemplu mai mică de 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 sau 6) reziduuri de aminoacizi (de exemplu, mai mică de 500 de reziduuri de aminoacizi substituenți, descrise în secvența SECV ID NR: 5).

Procentul (%) identității secvenței de aminoacizi este definit ca procentul aminoacizilor dintr-o secvență candidat, care sunt identici cu aminoacizii dintr-o secvență de referință după alinierea secvențelor și, dacă este necesar, introducerea intervalelor, pentru a obține procentul maxim al identității secvenței. Alinierea în scopul determinării procentului de identitate a secvenței poate fi realizată în moduri diferite, care sunt cunoscute unui specialist în domeniu, de exemplu, utilizând software de calculator disponibile în mod public, cum ar fi software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 sau Megalign (DNASTAR). Parametrii potriviți pentru măsurarea alinierii, incluzând orice algoritmi necesari pentru realizarea alinierii maxime pe întreaga lungime a secvențelor comparate, pot fi determinați prin metode cunoscute.

II. Descrierea generală a invenției

Lectinele (MBL, M-ficolina, H-ficolina, L-ficolina și CL-11) sunt molecule specifice de recunoaștere, care declanșează sistemul complementului congenital, iar sistemul include calea lectinei de inițiere și bucla de amplificare a căii terminale asociată cu aceasta, care amplifică activarea inițiată de lectină a moleculelor efectoare de terminale. C1q reprezintă o moleculă specifică de recunoaștere, care inițiază sistemul complementului dobândit și acest sistem include calea clasică de inițiere și bucla de amplificare a căii terminale asociată cu aceasta, care amplifică activarea C1q inițiată a moleculelor efectoare terminale. Aceste două sisteme majore de activare a complementului sunt denumite sistem al complementului dependent de lectină și, respectiv, sistem al complementului dependent de C1q.

Adițional la rolul său esențial în apărarea imună, sistemul complementului contribuie la deteriorarea țesuturilor în numeroase stări clinice. Astfel, există o necesitate stringentă de a elabora inhibitori ai complementului terapeutic eficienți pentru a preveni aceste efecte adverse. Recunoscând faptul, că este posibilă inhibarea căii lectinei mediate de MASP-2, în timp ce calea clasică se menține intactă, se constată că ar fi extrem de dezirabilă inhibarea specifică numai a sistemului de activare a complementului, care cauzează o patologie concretă fără sistarea completă a capacităților de apărare imună ale complementului. De exemplu, în stările de boală în care

activarea complementului este mediată predominant de sistemul complementului dependent de lectină, ar fi avantajoasă inhibarea specifică numai a acestui sistem. Aceasta ar menține intact sistemul de activare a complementului dependent de C1q, care reglează procesarea complexelor imune și contribuie la apărarea organismului-gazdă de infecții.

- 5 Componenta proteică, preferată pentru direcționarea elaborării agenților terapeutici în vederea inhibării specifice a sistemului complementului dependent de lectină, este MASP-2. Dintre toate componentele proteice cunoscute ale sistemului complementului dependent de lectină (MBL, H-ficolină, M-ficolină, L-ficolină, MASP-2, C2-C9, Factorul B, Factorul D și properdina) numai MASP-2 este atât unică pentru sistemul complementului dependent de lectină, cât și pentru
- 10 funcționarea sistemului. Lectinele (MBL, H-ficolina, M-ficolina, L-ficolina și CL-11) sunt, de asemenea, componente unice în sistemul complementului dependent de lectină. Cu toate acestea, pierderea oricărei dintre componentele lectinei nu necesar ar împiedica activarea sistemului datorită cantității excesive de lectină. Pentru a garanta inhibarea activării sistemului complementului dependente de lectină ar fi necesară inhibarea a tuturor celor cinci lectine. Mai
- 15 mult decât atât, deoarece MBL și ficolinele sunt, de asemenea, cunoscute ca având activitate opsonică independentă de complement, inhibarea funcției lectinei ar conduce la pierderea acestui mecanism benefic de protecție a organismului-gazdă de infecție. Dimpotrivă, această activitate opsonică a lectinei, dependentă de complement, va rămâne intactă în cazul, în care MASP-2 ar fi ținta de inhibare a activării căii lectinei. Un avantaj suplimentar al MASP-2 ca ținta terapeutică de
- 20 inhibare a activării sistemului complementului dependentă de lectină este acela, că concentrația plasmatică de MASP-2, comparativ cu orice alte proteine ale complementului, este cea mai joasă (≈ 500 ng/ml); prin urmare, pentru atingerea inhibării complete vor fi suficiente, respectiv, concentrații joase de inhibitori cu afinitate înaltă ai MASP-2 (Moller Kristensen, M. și colab., J. Immunol Methods 282: 159-167, 2003).

25 III. ROLUL MASP-2 ÎN MICROANGIOPATIILE TROMBOTICE ȘI METODELE TERAPEUTICE DE UTILIZARE A AGENȚILOR DE INHIBARE AI MASP-2

- Microangiopatia trombotică (TMA) este o patologie caracterizată prin prezența cheaguri de sange în vasele de sange mici (Benz, K. ; et al., Curr Opin Nephrol Hypertens 19 (3): 242-7 (2010)). Se consideră, că factorul principal este stresul sau leziunea endoteliului vascular. Tabloul
- 30 clinic și datele de laborator în TMA includ trombocitopenie, anemie, purpură și insuficiență renală. Exemplele de TMA clasice includ sindromul hemolitic uremic (HUS) și purpura trombotică trombocitopenică (TTP). O particularitate patologică caracteristică a TMA este activarea plachetară și formarea de microtrombi în arteriolele și venulele mici. Activarea complementului inițiată, cel puțin de parțial, de o leziune sau stres la nivelul endoteliului microvascular este implicată și în alte TMA, incluzând sindromul antifosfolipidic catastrofal (CAPS), boala Degos sistemică și TMA asociată cancerului, chimioterapiei și transplantului.

- Dovada directă a rolului patologic al complementului într-o serie de nefrite se datorează studiilor efectuate la pacienții cu deficiențe genetice în componentele specifice ale complementului. Un șir de rapoarte au evidențiat asocierea leziunii renale cu deficiențe ale
- 40 factorului H de reglare a complementului (Ault, BH, Nephrol., 14: 1045-1053, 2000; Levy, M. et al., Kidney Int. 30: 949-56, 1986; Pickering, M.C. et al., Nat Genet., 31: 424 8, 2002). Deficitul de factor H rezultă cu reducerea concentrațiilor plasmatice ale factorilor B și C3 datorită consumului, asociat activării, al acestor componente. Nivelurile circulante de C5b9 sunt, de asemenea, înalte în serul acestor pacienți, ceea ce indică indirect activarea complementului. Glomerulonefrita membranoproliferativă (MPGN) și sindromul hemolitic uremic idiopatic (HUS) se asociază cu un
- 45 deficit de factor H sau cu mutații ale factorului H. Porcinele cu deficit de factor H (Jansen, J.H. et al., Kidney Int. 53: 331-49, 1998) și șoarecii cu knock-out al factorului H (Pickering, M.C., 2002) manifestă simptome asemănătoare MPGN, confirmând importanța factorului H în reglarea complementului. Deficitul altor componente ale complementului se asociază cu boala renală,
- 50 asociată dezvoltării lupusului eritematos sistemic (SLE) (Walport, M.J., Davies et al., Ann.NY.Acad.Sci.815: 267-81, 1997). Deficitul de C1q, C4 și C2 predisune la dezvoltarea SLE prin mecanisme legate de eliberarea defectă a complexelor imune și a materialului apoptotic. La mulți dintre acești pacienți cu SLE apare nefrită de lupus, caracterizată prin depunerea complexelor imune pe întreaga suprafață a glomerulului.

55 aHUS

Sindromul hemolitic uremic atipic (aHUS) face parte dintr-un grup de afecțiuni numite "microangiopatii trombotice". HUS (aHUS) în forma sa atipică este boala asociată cu reglarea defectuoasă a complementului și poate fi sporadică sau familială. Cazurile familiale de aHUS sunt asociate cu mutații în genele, care codifică activarea complementului sau proteinele reglatoare ale

complementului, incluzand factorul complementului H, factorul I, factorul B, cofactorul CD46 membranar, precum și proteina 1 asemănătoare cu factorul H al complementului (CFHR1) și proteină 3 asemănătoare cu factorul H al complementului (CFHR3). (Zipfel, P. F. et al., *PloS Genetics* 3 (3): e41 (2007)). Caracteristica unificatoare a acestei game variate de mutații genetice asociate cu aHUS este predispoziția la activarea sporită a complementului pe suprafețele celulare sau tisulare. De aceea, un aspect al prezentei invenții cuprinde tratarea unui pacient, care suferă de aHUS asociat cu o deficiență a factorului H, prin administrarea unei cantități eficiente dintr-un agent inhibitor al MASP-2. Un alt aspect al prezentei invenții prevede tratarea unui pacient, care suferă de HUS asociat cu deficit de factor I, factor B, cofactor de membrană CD46, CFHR1 sau CFHR3, prin administrarea unei cantități eficiente de un agent inhibitor al MASP-2.

În prezent s-au înregistrat progrese semnificative în ceea ce privește înțelegerea fiziopatologiei moleculare, bazate pe activarea sporită a complementului în aHUS provocată de diverse seturi de factori mutanți ai complementului. Acest mecanism este cel mai bine elucidat pentru mutațiile factorului H. Factorul H reprezintă o proteină serică prezentă în exces, care conține 20 de domenii scurte de repetări consensus (SCR), care acționează ca un regulator negativ al activării complementului, atât în soluție, cât și pe suprafețele celulelor organismului-gazdă. El țintește forma activată a C3 și, împreună cu factorul I și alți cofactori, promovează inactivarea acesteia, împiedicând activarea ulterioară a complementului. Pentru un control eficient al activării complementului pe suprafețele celulelor organismului gazdă, factorul H trebuie să interacționeze cu celulele gazdă, interacțiune mediată de domeniile SCR 16-20. Toate mutațiile factorului H asociate cu aHUS, descrise până în prezent, sunt grupate în regiunea C-terminală care cuprinde domeniile (SCR) 16-20. Aceste proteine mutante ale factorului H sunt complet funcționale în controlul activării C3 în soluție, dar nu pot interacționa cu suprafețele celulelor organismului gazdă și, prin urmare, nu pot controla activarea C3 pe suprafețele celulare (Exp Med 204 (6): 1249-56 (2007)). Astfel, anumite mutații ale factorului H se asociază cu aHUS, deoarece proteina mutantă a factorului H nu reușește să interacționeze cu suprafețele celulei organismului gazdă și, astfel, nu poate modula eficient cu reducerea activării complementului pe suprafețele celulelor organismului gazdă, incluzând și pe endoteliul microvascular. În consecință, imediat ce se produce activarea inițială a C3, la pacienții cu mutații ale factorului H activarea ulterioară a complementului pe suprafețele endoteliale microvasculare evoluează fără modificări. Această activare necontrolată a complementului conduce, în cele din urmă, la leziuni progresive ale endoteliului vascular, agregarea trombocitară și coagularea microvasculară ulterioară și hemoliza cauzată de stresul direct al pasajului hematiilor prin microvasele parțial ocluzionate. Astfel, manifestările bolii aHUS și tabloul clinic și datele de laborator sunt direct determinate de un defect în reglarea negativă a complementului pe suprafața endoteliului microvascular.

Analogic mutației factorului H, mutațiile cu pierderea funcției în modulatorul negativ ai complementului, factorul I și proteina cofactorului membranos (CD46) sunt, de asemenea, legate de aHUS. Contrariul s-a observat pentru factorul B proteina C3, în cazurile în care s-a dovedit, că aHUS se asociază cu mutații cu dobândirea unor funcții noi în aceste proteine (Pediatr Nephrol 25 (12): 2431-42 (2010)). Astfel, o serie de date convergente implică activarea complementului în patogeneza aHUS. Acest punct de vedere este susținut în mod convingător de eficacitatea terapeutică a eculizumabului, un anticorp monoclonal care blochează proteina C5 terminală a complementului în tratamentul aHUS.

În timp ce rolul central al complementului ca mecanism efector în aHUS este larg acceptat, mecanismele declanșatoare, care inițiază activarea complementului, și căile moleculare implicate sunt neelucidate. Nu toți indivizii, purtători ai mutațiilor descrise mai sus, dezvoltă aHUS. De fapt, studiile familiale au sugerat, că frecvența manifestării genei aHUS constituie doar 50% (Ann Hum Genet 74 (1): 17-26 (2010)). Evoluția bolii sugerează, că aHUS se dezvoltă mai frecvent după un eveniment inițiator, cum ar fi un epizod infecțios sau o traumă. Se știe, că agenții infecțioși activează sistemul complementului. În absența imunității adaptive preexistente, activarea complementului de către agenții infecțioși poate fi inițiată în primul rând prin calea lectinei. Astfel, activarea căii lectinei, declanșată de o infecție, poate reprezenta o inițiere a declanșatorului pentru amplificarea patologică ulterioară a activării complementului la indivizii predispuși aHUS, ceea ce poate conduce, în cele din urmă, la progresia bolii. În consecință, un alt aspect al prezentei invenții prevede tratarea unui pacient, care suferă cu aHUS asociat unei infecții, prin administrarea unei cantități eficiente de un agent inhibitor al MASP-2.

Alte forme de leziuni ale țesutului organismului gazdă vor activa complementul prin calea lectinei, în special leziunile endoteliului vascular. Celulele endoteliale vasculare umane supuse stresului oxidativ răspund, de exemplu, la expresia fragmentelor de suprafață care leagă lectinele și

activează calea lectinei complementului (Am. Pathol 156 (6): 1549-56 (2000)). Leziunea vasculară după ischemie/reperfuzie, de asemenea, activează complementul prin calea lectinei *in vivo* (Scand J. Immunol., 61 (5), p. 426-34 (2005)). În acest context activarea căii lectinei are consecințe patologice pentru organismul gazdă, iar inhibarea căii lectinei prin blocarea MASP-2 previne ulterior leziunea țesutului organismului gazdă și rezultatele adverse (Schwaebler PNAS 2011).

Astfel, se știe că și alte procese, care provoacă aHUS, activează calea lectinei a complementului. Prin urmare, e posibil că calea lectinei reprezintă mecanismul inițial de activare a complementului, care este amplificat inadecvat într-o manieră dereglată la indivizi predispuși genetic la aHUS, inițiind astfel patogeniza aHUS. Prin inferență, agenții care blochează activarea complementului prin calea lectinei, incluzând anticorpii anti-MASP-2, sunt de așteptat să prevină progresia bolii sau să reducă exacerbările la indivizii susceptibili de aHUS.

În susținerea acestui concept, studiile recente au identificat *S. pneumonia* ca agent etiologic important în cazurile pediatrice de aHUS. (Nefrologie (Carlton), 17: 48-52 (2012), Pediatr Infect Dis J. 30 (9): 736-9 (2011)). Această etiologie particulară pare să aibă un prognostic nefavorabil, cu o mortalitate și o morbiditate semnificativă pe termen lung. În special, aceste cazuri au implicat infecții non-enterice, care au condus la manifestări de microangiopatie, uremie și hemoliză, fără a evidenția mutații concomitente în genele complementului, cunoscute pentru predispunere la aHUS. Este important de remarcat faptul, că *S. pneumonia* este deosebit de eficientă în activarea complementului și o face în mod predominant prin calea lectinei. Astfel, în cazurile de HUS ne-enteric, asociat cu o infecție pneumococică, se așteaptă ca manifestările microangiopatiei, uremiei și hemolizei să fie determinate predominant de activarea căii lectinei și se așteaptă ca agenții care blochează calea lectinei, inclusiv anticorpii anti-MASP-2, să prevină progresia aHUS sau să reducă severitatea bolii la acești pacienți. În consecință, într-un alt aspect prezenta invenție prevede tratarea unui pacient, care suferă de aHUS ne-enteric, asociat cu infecție cu *S. pneumonia*, prin administrarea unei cantități eficiente de un agent inhibitor al MASP-2.

În contextul celor menționate, în unele variante de realizare la depistarea unui subiect cu risc de dezvoltare a insuficienței renale asociate cu aHUS, este prevăzută o metodă de reducere a probabilității de a dezvolta aHUS sau de a dezvolta insuficiență renală asociată cu aHUS, cuprinzând administrarea unei cantități de agent inhibitor al MASP-2 pentru o perioadă de timp eficientă pentru ameliorarea sau prevenirea insuficienței renale la subiect. În unele exemple de realizare, metoda mai prevede etapa de determinare a faptului dacă subiectul este expus riscului de a dezvolta aHUS înainte de debutul oricărui simptom asociat cu aHUS. În alte variante de realizare metoda prevede determinarea riscului de dezvoltare a aHUS în debutul cel puțin de a unui sau mai multor simptome, care indică aHUS (de exemplu, prezența anemiei, trombocitopeniei și/sau insuficienței renale), și/sau în prezența microangiopatiei trombotice într-o biopsie prelevată de la subiect. În cadrul determinării faptului că un subiect se expune riscului de a dezvolta aHUS, se determină prezența unei predispoziții genetice pentru a dezvolta aHUS, care poate fi efectuată prin evaluarea informațiilor genetice (de exemplu dintr-o bază de date, conținând genotipul subiectului) sau prin realizarea cel puțin de a unui test genetic de selecție pentru a determina prezența sau absența unui marker genetic asociat cu aHUS (adică determinarea prezenței sau absenței unei mutații genetice asociate cu aHUS în genele, care codifică factorul H al complementului (CFH), factorul I CFF), factorul B (CFB), cofactorul membranelor CD46, C3, proteina 1 asemănătoare cu factorul H al complementului (CFHR1) sau THBD (proteina anticoagulantă codificatoare trombodulina) sau proteina 3 asemănătoare cu factorul H al complementului (CFHR3), sau proteina 4 asemănătoare cu factorul H al complementului (CFHR4)), fie prin secvențierea genomului sau prin analiza genetică specifică (de exemplu, analiza PCR) și/sau determinarea prezenței la subiect a unui istoric familial de aHUS. Metodele de screening genetic pentru prezența sau absența unei mutații genetice asociate cu aHUS sunt bine cunoscute, de exemplu, 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.

De exemplu, frecvența generală de manifestare a genei în boala, în care se produc mutații ale factorului H al complementului (CFH) constituie 48%, iar manifestarea genei pentru mutațiile în CD46 constituie 53%, pentru mutațiile în CFI - 50%, pentru mutațiile în C3 - 56% și pentru mutațiile în THBD constituie 64% (Caprioli J. et al., Blood, 108: 1267-79 (2006), Noris et al., Clin J Am Soc Nephrol 5: 1844-59 (2010)). Cum se descrie în publicația Caprioli et al., (2006), menționată anterior, la un număr semnificativ de indivizi cu o mutație în factorul H al complementului (CFH) nu dezvoltă niciodată aHUS și se presupune, că activitatea suboptimală CFH la acești indivizi este suficientă pentru a proteja organismul gazdă de efectele activării

complementului în condiții fiziologice, totuși activitatea suboptimală CFH nu este suficientă pentru a preveni depunerea C3b pe celulele endoteliale vasculare în cazul, în care expunerea la un agent, care activează complementul, produce cantități mai mari, decât cele normale, de C3b.

- 5 În consecință, într-o variantă de realizare se prevede o metodă de inhibare a activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect, care suferă sau prezintă risc de a dezvolta sindrom hemolitic uremic atipic, care nu depinde de factorul H, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții care conține o cantitate de agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2. Într-o altă variantă de realizare se prevede o metodă de inhibare a activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect cu risc de a
- 10 dezvolta sindromul hemolitic uremic atipic dependent de factorul H, cuprinzând monitorizarea periodică a subiectului pentru a determina prezența sau absența anemiei, trombocitopeniei sau creșterea creatininei și tratarea cu un agent inhibitor al MASP-2 la determinarea prezenței trombocitopeniei anemice sau creșterii creatininei. Într-o altă variantă de realizare se prevede o metodă de reducere a probabilității instalării simptomelor clinice asociate cu aHUS la un subiect
- 15 cu risc de a dezvolta aHUS dependent de factorul H, cuprinzând administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 înainte sau în timpul sau după un eveniment (de exemplu, chimioterapie), infecție (de exemplu, infecție bacteriană), malignitate, leziune, transplant de organe sau țesuturi sau sarcină.

- Intr-o variantă de realizare se prevede o metodă de reducere a probabilității instalării simptomelor clinice asociate cu aHUS la un subiect cu risc de a dezvolta aHUS, cuprinzând
- 20 monitorizarea periodică a subiectului pentru a determina prezența sau absența anemiei, trombocitopeniei sau creșterea creatininei și tratarea cu un agent inhibitor al MASP-2 la determinarea prezenței anemiei, trombocitopeniei sau creșterea creatininei.

- Intr-o altă variantă de realizare se prevede o metodă de reducere a probabilității instalării simptomelor clinice asociate cu aHUS la un subiect cu risc de a dezvolta aHUS, care cuprinde
- 25 administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 înainte sau în timpul sau după un eveniment cunoscut de a fi asociat cu (de exemplu, chimioterapie), infecție (de exemplu, infecție bacteriană), tumori maligne, leziuni, transplant de organe sau țesuturi sau sarcină.

- În unele exemple de realizare agentul inhibitor al MASP-2 se administrează timp o perioadă cel puțin de una, două, trei, patru zile sau mai multe, înainte, în timpul sau după evenimentul asociat
- 30 cu declanșarea simptomelor clinice aHUS și poate fi repetată la indicația medicului până când starea se rezolvă sau este controlată. Într-o setare pre-aHUS, agentul inhibitor al MASP-2 poate fi administrat sistemic, cum ar fi administrarea intraarterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, nazală, subcutanată sau altă administrare parenterală.

- În unele variante de realizare la stabilirea diagnosticului inițial de aHUS sau la un subiect care
- 35 prezintă unul sau mai multe simptome, care corespund unui diagnostic de aHUS (de exemplu, prezența anemiei, trombocitopeniei și/sau a insuficienței renale), subiectul este tratat cu o cantitate eficientă de un agent inhibitor al MASP-2 (de exemplu un anticorp anti-MASP-2) în calitate de terapie de primă linie în absența plasmeferezei sau în combinație cu plasmefereză. Ca terapie de primă linie, agentul inhibitor al MASP-2 poate fi administrat subiectului sistemic, cum ar fi
- 40 administrarea intraarterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, nazală, subcutanată sau altă administrare parenterală. În unele variante de realizare agentul inhibitor al MASP-2 se administrează la un subiect ca terapie de primă linie în absența plasmaferezei pentru a evita complicațiile posibile ale plasmaferezei, incluzând hemoragia, infecția și expunerea la tulburări și/sau alergii inerente donatorului de plasmă, sau la un subiect cu contraindicații pentru plasmefereză sau într-un cadru unde plasmafereza nu este disponibilă.
- 45

- În unele variante de realizare metoda cuprinde administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect care suferă de aHUS printr-un cateter (de exemplu, intravenos) pentru o primă perioadă de timp (de exemplu, cel puțin de o zi până la o săptămână sau două săptămâni), urmată de administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 subcutanat pentru a doua perioadă de timp (de
- 50 exemplu, timp de o perioadă mai îndelungată cel puțin de două săptămâni sau mai mult). În unele exemple de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp are loc în absența plasmeferezei. În unele variante de realizare metoda cuprinde suplimentar determinarea la subiect a nivelului cel puțin de un factor al complementului (de exemplu C3, C5) înainte de tratament și opțional în timpul tratamentului, în care determinarea unui nivel redus cel puțin de un factor al complementului, comparativ cu o valoare standard sau cu nivelul la un subiect sănătos, indică
- 55 necesitatea continuării tratamentului cu agent inhibitor al MASP-2.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp anti-MASP-2, la un subiect care suferă sau prezintă risc de a dezvolta aHUS, fie intravenos, intramuscular, fie, de preferință, subcutanat. Tratamentul poate fi de lungă durată și

se administrează zilnic, lunar, dar, de preferință, la fiecare două săptămâni. Anticorpus anti-MASP-2 poate fi administrat în calitate de monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

HUS

- 5 Ca și HUS atipic, forma tipică de HUS se manifestă sub formă de tablou clinic și date de laborator, caracteristice pentru o microangiopatie trombotică (TMA). HUS tipic, cu toate acestea, este frecvent o boală pediatrică și de obicei nu are nici o componentă familială sau asociere directă cu mutații în genele complementului. Etiologia HUS tipic este strâns legată de infecția cu anumiți agenți patogeni intestinali. Pacienții prezintă de obicei insuficiență renală acută, hemoglobinurie și
- 10 trombocitopenie, care de obicei însoțesc un episod de diaree sângeroasă. Starea este cauzată de o infecție enterică cu *Shigella dysenteriae*, *Salmonella* sau tulpini enterohemoragice, producătoare de toxina similară shiga, de *E. coli*, cum ar fi *E. Coli* O157:H7. Agenții patogeni sunt achiziționați din alimente contaminate sau din aprovizionarea cu apă. HUS este o urgență medicală și are o mortalitate de 5-10%. O parte semnificativă a supraviețuitorilor dezvoltă boala renală cronică
- 15 (Corrigan and Boineau, *Pediatr Rev* 22 (11): 365-9 (2011)) și poate necesita transplant de rinichi.

- Coagularea microvasculară în HUS tipic apare predominant, dar nu exclusiv, în microvasculatura renală. Fiziopatologia de bază este mediată de toxina Shiga (STX). Excretată de microbi enteropatici în lumenul intestinal, STX traversează bariera intestinală, pătrunde în fluxul sanguin și se leagă cu celulele endoteliale vasculare prin receptorul globotriosil ceramidă CD77
- 20 (Boyd and Lingwood *Nephron* 51: 207 (1989)), care se exprimă în mod preferențial pe endoteliul glomerular și mediază efectul toxic al STX. După legarea cu endoteliul, STX induce o serie de evenimente care distrug endoteliul vascular, activează leucocitele și pot cauza formarea de trombi vWF-dependenți (Forsyth et al., *Lancet* 2: 411-414 (1989); Zoja et al., *Kidney Int.* 62: 846-856 (2002), Zanchi et al., *J. Immunol.*, 181: 1460-1469 (2008), Morigi et al., *Blood* 98: 1828-1835 (2001), Guessou et al., 73: 8306-8316 (2005)). Acești microtrombi obstrucționează sau
- 25 ocluzionează arteriolele și capilarele rinichilor și ale altor organe. Obstrucția fluxului sanguin în arteriole și capilare, prin microtrombi, mărește forța de deviere aplicată pe hematii la trecerea acestora prin vasele de sange îngustate. Aceasta poate conduce la distrugerea hematiilor sub acțiunea forței de deviere și la formarea de fragmente de hematii, numite schistocite. Prezența schistocitelor este o constatare caracteristică în HUS. Acest mecanism este cunoscut sub denumirea de hemoliza microangiopatică. În plus, obstrucția fluxului sanguin are drept rezultat ischemia, inițierea unui răspuns inflamator mediat de complement, care cauzează leziuni suplimentare organului afectat.

- Calea lectinei a complementului contribuie la patogeneza HUS prin două mecanisme principale: 1) activare directă mediată de MASP-2 a cascadei de coagulare cauzate de leziuni endoteliale și 2) activare ulterioară a complementului mediată de lectină, indusă de ischemia rezultată din blocarea inițială a fluxului sanguin microvascular.

- STX lezează celulele endoteliale microvasculare, iar celulele endoteliale lezate se știe că activează sistemul complementului. Așa cum se discută detaliat mai sus, activarea complementului
- 40 după leziunea celulară endotelială este condusă predominant de calea lectinei. Celulele endoteliale vasculare umane supuse stresului oxidativ răspund prin exprimarea fragmentelor de suprafață, care leagă lectinele și activează calea lectinei a complementului (Collard et al., *Am J Pathol.*, 156 (5): 1549-56 (2000)). Leziunea vasculară după o ischemie/reperfuzie activează, de asemenea, complementul prin calea lectinei in vivo (*Scand J Immunol* 61 (5): 426-34 (2005)). Activarea căii lectinei în acest context are consecințe patologice pentru organismul gazdă și inhibarea căii lectinei prin blocarea MASP-2 previne ulterior leziunea țesutului organismului gazdă și rezultatele adverse (Schwaebler et al., *PNAS* (2011)). Adicional la activarea complementului, s-a demonstrat că
- 45 activarea dependentă de lectină a MASP-2 conduce la scindarea protrombinei cu formarea trombinei și inițierea coagulării. Astfel, activarea căii lectinei a complementului de către celulele endoteliale lezate poate activa direct sistemul de coagulare. Calea lectinei a complementului, în virtutea activării protrombinei, mediate de MASP-2, este probabil calea moleculară dominantă, care leagă leziunea endotelială inițial, cauzată de STX, cu tromboza de coagulare și microvasculară, care se produce în HUS. Prin urmare, este de așteptat ca inhibitorii căii lectinei, incluzând, dar fără a se limita, anticorpii care blochează funcția MASP-2, să prevină sau să
- 50 atenueze coagularea microvasculară, tromboza și hemoliza la pacienții care suferă de HUS. Într-adevăr, administrarea de anticorpi anti-MASP-2 protejează semnificativ șoarecii într-un model experimental de HUS tipic. Cum se descrie în exemplul 36 și se prezintă în fig. 45, toți șoarecii de control expuși acțiunii STX și LPS, au dezvoltat HUS sever și mureau sau au murit timp de 48 de ore. Pe de altă parte, după cum se arată în fig. 45, toți șoarecii tratați cu un anticorp anti-MASP-2

și apoi expuși acțiunii STX și LPS au supraviețuit (criteriul exact Fisher $p < 0,01$; $N = 5$). Astfel, terapia anti-MASP-2 protejează semnificativ șoarecii în acest model experimental de HUS. Este de așteptat ca administrarea unui agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp anti-MASP-2, să fie eficientă în tratamentul pacienților cu HUS și să asigure protecția împotriva coagulării, trombozei și hemolizei microvasculare, cauzate de infecția cu *E. coli* enteropatici sau alți agenți patogeni producători de STX.

În timp ce aici este prezentat pentru HUS, cauzat de STX, se așteaptă ca terapia anti-MASP-2 poate fi, de asemenea, benefică pentru sindroame asemănătoare HUS, provocate de leziuni endoteliale cauzate de alți agenți toxici. Aceștia includ așa agenți, cum ar fi mitomicina, ticlopidina, ciclatina, chinina, ciclosporina, bleomicina, precum și alte medicamente pentru chimioterapie și medicamente imunosupresive. Astfel, este de așteptat ca terapia cu anticorpi anti-MASP-2 sau cu alte modalități care inhibă activitatea MASP-2 să prevină sau să limiteze în mod eficient coagularea, formarea trombilor și distrugerea hematiilor și să prevină instalarea insuficienței renale în HUS și în alte boli legate de TMA (de exemplu, aHUS și TTP).

Pacienții, care suferă de HUS, prezintă deseori diaree și vărsături, numărul de trombocite la ei este de obicei redus (trombocitopenie), este redus și numărul de hematii (anemie). O fază de diaree pre-HUS durează în mod obișnuit aproximativ patru zile, timp în care subiecții cu risc pentru dezvoltarea HUS prezintă de obicei unul sau mai multe dintre următoarele simptome, adițional la diareea severă: nivelul hematocritului sub 30%, cu semne de destrucție intravasculară a eritrocitelor, trombocitopenie (număr de trombocite $< 150 \times 10^3/\text{mm}^3$) și/sau tulburarea funcției renale (concentrația serică de creatinină depășind limita superioară a intervalului de referință pentru vârstă). Prezența oligoanuriei (cantitatea de urină eliminată $\leq 0,5$ ml/kg/h timp de > 1 zi) poate fi utilizată ca măsură pentru progresia evoluției HUS (C. Hickey et al., Arch Pediatr Adolesc Med 165 (10): 884-889 (2011)). Testarea se efectuează de obicei pentru depistarea infecției cu bacteria *E. coli* (*E. coli* O157:H7) sau cu specii *Shigella* sau *Salmonella*. La subiectul, care a fost testat pozitiv pentru infecția cu *E. coli* enterogenic (de exemplu, *E. coli* O157:H7), utilizarea antibioticelor este contraindicată, deoarece utilizarea antibioticelor poate crește riscul de a dezvolta HUS prin creșterea producției de STX (Wong C. et al., N. Engl. J. Med. 342:1930-1936 (2000)). La subiecții testați pozitiv pentru *Shigella* sau *Salmonella*, antibioticele se administrează de obicei pentru a elimina infecția. Alte terapii de primă linie bine stabilite pentru HUS includ extinderea volumului, dializă și plasmefereză.

În conformitate cu cele relatate mai sus, în unele variante de realizare la depistarea unui subiect care suferă de unul sau mai multe simptome, asociate cu o fază pre-HUS și cu risc de dezvoltare a HUS (adică subiectul prezintă una sau mai multe dintre următoarele simptome: diaree, nivelul hematocritului sub 30%, cu determinarea destrucției intravasculară a eritrocitelor, trombocitopenie (numărul trombocitelor mai puțin de $150 \times 10^3/\text{mm}^3$) și/sau tulburarea funcției renale (concentrația serică de creatinină depășind limita superioară a intervalului de referință pentru vârstă)), se prevede o metodă de reducere a riscului de apariție a HUS sau de reducere a probabilității instalării insuficienței renale la subiect, care cuprinde administrarea unei cantități de un agent inhibitor al MASP-2 pentru o perioadă de timp eficientă pentru ameliorarea sau prevenirea deteriorării funcției renale. În unele variante de realizare agentul inhibitor al MASP-2 se administrează timp cel puțin de una, două, trei, patru sau mai multe zile și poate fi repetat, în conformitate cu indicațiile unui medic, până la rezolvarea sau controlarea stării. Într-un pre-HUS stabilit agentul inhibitor al MASP-2 se poate administra sistemic, cum ar fi administrarea intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, nazală, orală, subcutanată sau altă administrare parenterală.

Tratamentul infecției cu *E. coli* O157: H7 cu antibiotice bactericide, în special cu β -lactame, s-a asociat cu un risc crescut de apariție a HUS (Smith et al., Pediatr Infect Dis J 31 (1): 37-41 (2012)). În unele exemple de realizare la depistarea unui subiect, care suferă de simptome asociate cu o fază pre-HUS, și se știe că subiectul are o infecție cu *E. coli* enterogenic, pentru care utilizarea antibioticelor este contraindicată (de exemplu, *E. coli* O157:H7), se prevede o metodă de reducere a riscului de apariție a HUS sau de reducere a probabilității instalării insuficienței renale prin administrarea unei cantități de un agent inhibitor al MASP-2 pentru o primă perioadă de timp, eficientă pentru a inhiba sau a preveni apariția oligoanuriei la subiect (de exemplu, cel puțin de una, două, trei sau patru zile) și administrarea agentului inhibitor al MASP-2 în prima perioadă de timp se realizează în absența unui antibiotic. În unele variante de realizare metoda cuprinde în continuare administrarea agentului inhibitor al MASP-2 în combinație cu un antibiotic pentru a doua perioadă de timp (cum ar fi timp cel puțin de una până la două săptămâni).

În alte exemple de realizare, în cazul unui subiect care suferă de simptome asociate cu o fază pre-HUS, în care subiectul este cunoscut că are o infecție cu *Shigella* sau *Salmonella*, este

prevăzută o metodă pentru reducerea riscului de dezvoltare a HUS sau pentru reducerea probabilității dezvoltării insuficienței renale la subiect, care cuprinde administrarea unei cantități dintr-un agent inhibitor al MASP-2 și pentru o perioadă de timp eficientă pentru inhibarea sau prevenirea prezenței oligoanuriei la subiect, în care administrarea agentului inhibitor al MASP-2 este fie în prezența sau în absența unui antibiotic adecvat.

În unele exemple de realizare, la stabilirea unui diagnostic inițial de HUS sau la un subiect care prezintă unul sau mai multe simptome, care indică un diagnostic de HUS (de exemplu, prezența insuficienței renale sau anemiei hemolitice microangiopatie în absența nivelului redus de fibrinogen sau a trombocitopeniei), tratamentul prevede administrarea unei cantități eficiente de un agent inhibitor al MASP-2 (de exemplu, un anticorp anti-MASP-2), ca terapie de primă linie, în absența plasmeferezei sau în combinație cu plasmafereza. Ca terapie de primă linie, agentul inhibitor al MASP-2 se poate administra sistemic, cum ar fi administrarea intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, nazală, subcutanată sau altă administrare parenterală. În unele variante de realizare agentul inhibitor al MASP-2 se administrează ca terapie de primă linie în absența plasmeferezei pentru a evita complicațiile plasmeferezei, cum ar fi hemoragia, infecția și expunerea la tulburări și/sau alergii inerente donorului de plasmă, sau la un subiect care prezintă contraindicații pentru plasmafereză sau în condiții în care plasmafereza nu este disponibilă.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect care suferă de HUS printr-un cateter (de exemplu, intravenos) pentru o primă perioadă de timp (de exemplu, în faza acută care durează cel puțin de o zi până la o săptămână sau două săptămâni), urmată de administrarea subcutanată a unui agent inhibitor al MASP-2 pentru a doua perioadă de timp (de exemplu, pentru o perioadă îndelungată de timp cel puțin de două săptămâni sau mai mult). În unele exemple de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp se realizează în absența plasmeferezei. În unele variante de realizare metoda prevede suplimentar determinarea la subiect a nivelului cel puțin de un factor de complement (de exemplu, C3, C5) înainte de tratament și opțional în timpul tratamentului, în care determinarea unui nivel redus cel puțin de un factor de complement, comparativ cu o valoare standard sau la un subiect sănătos, este o indicație a necesității unui tratament și determinarea unui nivel normal este un indice de îmbunătățire.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp anti-MASP-2, la un subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a HUS, fie subcutanat, fie intravenos. Tratamentul preferabil se administrează zilnic, dar poate fi administrat și mai rar: săptămânal sau lunar. Tratamentul va continua cel puțin de la o săptămână până la 3 luni. Anticorpul anti-MASP-2 poate fi administrat în monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

TTP

Purpura trombocitopenică trombocică (TTP) este o tulburare a sistemului de coagulare a sângelui, care pune viața în pericol, cauzată de disfuncții autoimune sau ereditare, care activează cascada de coagulare sau sistemul complementului (George, JN, N Engl J Med; 354:1927-35 (2006)). Aceasta rezultă cu numeroase cheaguri microscopice, sau trombi, în vasele de sânge mici în tot corpul. Hematiile din sange sunt supuse stresului de deviere, care le distruge membranele, conducând la hemoliză intravasculară. Reducerea fluxului sanguin și leziunile endoteliale formate determină afectarea organelor, inclusiv a creierului, inimii și rinichilor. TTP se caracterizează clinic prin trombocitopenie, anemie hemolitică microangiopatică, modificări neurologice, insuficiență renală și febră. În perioada anterioară schimbului de plasmă, rata mortalității în timpul episoadelor acute constituia 90%. Chiar și în cazul schimbului de plasmă, supraviețuirea în primele șase luni constituie aproximativ 80%.

TTP apare în rezultatul inhibării genetice sau dobândite a enzimei ADAMTS-13, o metaloprotează responsabilă de scindarea multimerilor mari ai factorului von Willebrand (vWF) în fragmente mai mici. Inhibarea sau deficitul ADAMTS-13 conduce în final la creșterea coagulării (Tsai, H.J. Am. Soc Nephrol 14: 1072-1081, (2003)). ADAMTS-13 reglează activitatea vWF; în absența acesteia, vWF formează multimeri mari, care sunt mai susceptibili să lege plachetele, la pacienți manifestându-se prin agregarea plachetelor și tromboză microvasculară.

Sindromul Upshaw-Schulman (USS, de asemenea, descris ca TTP congenitală) este o deficiență congenitală a activității ADAMTS13, datorată mutațiilor genei ADAMTS13 (Schulman et al., Blood, 16 (1): 943-57, 1960; Upshaw et al., Engl. J. Med., 298 (24): 1350-2, 1978). Numeroase mutații în ADAMTS13 au fost identificate la indivizi cu TTP congenitală (Kinoshita et al., International Journal of Hematology, 74: 101-108 (2001), Levy et al., Nature, 413 (6855): 488-494 (2001), Kakame et al., PNAS 99 (18): 11902-11907 (2002), Savasan et al., Blood, 101: 4449-

- 4451 (2003), Matsumoto et al., Blood 103: 1305-1310 și Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144: 742-754 (2008)). Subiecții cu USS prezintă de obicei 5-10% din activitatea normală a ADAMTS13 (Kokame et al., PNAS 99 (18): 11902-11907, 2002). Deși TTP și USS dobândite au unele similitudini, USS prezintă unele diferențe importante în caracteristicile clinice. USS se instalează, de obicei, în pruncie sau în copilărie și se caracterizează prin hiperbilirubinemie severă cu testul Coombs negativ imediat după naștere, cu răspuns la perfuzia cu plasmă proaspătă și recăderi frecvente (Savasan et al., Blood, 101: 4449-4451, 2003). În unele cazuri pacienții cu această deficiență ADAMTS13 congenitală au un fenotip slab la naștere și dezvoltă simptome asociate cu TTP în situații clinice cu valori înalte ale factorului von Willebrand, cum ar fi infecția sau sarcina.
- De exemplu, Fujimura et al., a comunicat despre 9 femei japoneze din 6 familii cu USS confirmat genetic, care au fost diagnosticate cu această tulburare în timpul primei sarcini. Trombocitopenia apărea în timpul celui de-al doilea până la al treilea trimestru în fiecare dintre cele 15 sarcini, adesea după TTP. Toate aceste femei s-au dovedit a fi cu deficiență severă a activității ADAMTS13 (Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144: 742-754, 2008).
- În conformitate cu cele menționate, în unele variante de realizare la depistarea unui subiect cu sindrom Upshaw-Schulman (adică, se știe că subiectul prezintă deficiența activității ADAMTS13 și/sau că subiectul are una sau mai multe mutații ale genei ADAMTS13, se propune o metodă de reducere a probabilității dezvoltării simptomelor clinice de TTP congenitală (de exemplu, trombocitopenie, anemie, febră și/sau insuficiență renală) prin administrarea unei cantități de agent inhibitor al MASP-2 (de exemplu, un anticorp MASP-2) pentru o perioadă de timp, eficientă pentru ameliorarea sau prevenirea unuia sau mai multor simptome clinice asociate cu TTP. În unele variante de realizare metoda cuprinde suplimentar etapa de determinare la acest subiect a riscului de dezvoltare a simptomelor asociate cu TTP congenitală înainte de debutul oricărui simptom asociat cu TTP sau la debutul a cel puțin de unuia sau mai multor simptome care indică TTP (de exemplu, prezența anemiei, trombocitopeniei și/sau insuficienței renale). Determinarea riscului de dezvoltare a simptomelor asociate cu TTP congenitală (adică, subiectul are USS) include depistarea mutației în gena care codifică ADAMTS13 și/sau a deficienței activității ADAMTS13 și/sau prezenței unui istoric familial de USS. Metodele de screening genetic pentru depistarea prezenței sau absenței unei mutații genetice asociate cu USS sunt bine cunoscute, de exemplu, Kinoshita et al., International Journal of Hematology, 74: 101-108 (2001); Levy et al., Nature, 413 (6855): 488-494 (2001); Kokame et al., PNAS 99 (18): 11902-11907 (2002); Savasan et al., Blood, 101: 4449-4451 (2003); Matsumoto et al., Blood, 103: 1305-1310 (2004) și Fujimura et al., Brit. J. Haemat 144: 742-754 (2008).
- Intr-o variantă de realizare la un subiect diagnosticat cu USS se prevede o metodă de reducere a probabilității dezvoltării simptomelor clinice asociate cu TTP, care cuprinde monitorizarea periodică a subiectului pentru a determina prezența sau absența anemiei, trombocitopeniei sau creșterii creatininei și tratarea cu un agent de inhibare al MASP-2 (de exemplu, un anticorp MASP-2) la determinarea prezenței anemiei, trombocitopeniei sau creșterii creatininei sau în prezența unui eveniment cunoscut de a fi asociat cu declanșarea simptomelor clinice ale TTP, de exemplu, acțiunea îndelungată a unui medicament (de exemplu, chimioterapie), infecției (de exemplu, infecție bacteriană), o tumoră malignă, traumă, transplant sau sarcină.
- Intr-o altă variantă de realizare se prevede o metodă de tratare a unui subiect cu USS și care prezintă simptome clinice asociate cu TTP, care cuprinde administrarea unei cantități de un agent inhibitor al MASP-2 (de exemplu un anticorp MASP-2) pentru o perioadă de timp, eficientă pentru ameliorarea sau prevenirea unui sau mai multe simptome clinice asociate cu TTP.
- TTP poate fi cauzată, de asemenea, de un auto-anticorp împotriva ADAMTS-13. În plus, TTP se poate dezvolta în timpul cancerului mamar, cancerului tractului gastrointestinal sau de prostată (George JN., Oncology (Williston Park), sarcinii în al doilea trimestru sau postpartum), George JN., Curr Opin Hematol 10: 339-344 (2003)) sau este asociată cu boli, cum ar fi HIV sau boli autoimune, cum ar fi lupusul eritematos sistemic (Hamasaki K et al., Clin Rheumatol.22: 355-8 (2003)). TTP pot fi, de asemenea, cauzate de anumite terapii medicamentoase, inclusiv cu heparină, chinină, ingredient imuno-mediat, agenți chimioterapeutici anticancer (bleomicină, cisplatină, citozină arabinozidă, daunomicină gemcitabină, mitomicină C și tamoxifen), ciclosporină A, contraceptive orale, penicilină, rifampicină și medicamente anti-plachetare, incluzând ticlopidină și clopidogrel (Azarm, T. et al., J Res Med Sci., 16: 353-357 (2011)). Alți factori sau stări asociate cu TTP sunt toxinele, cum ar fi veninurile de albine, sepsisul, splenectomia, transplantul, vasculita, chirurgia vasculară și infecțiile, cum ar fi pneumonia streptococică și citomegalovirusul (Moake JL., N Engl J Med., 347: 589-600 2002)). TTP, din

cauza deficienței funcționale a ADAMTS-13, poate să apară ca o consecință a leziunii celulare endoteliale asociate cu infecția cu *S. pneumonia* (Pediatr Nephrol., 26: 631-5 (2011)).

Schimbul de plasmă este tratamentul standard în TTP (Rock GA et al., N Engl J Med 325: 393-397 (1991)). Schimbul de plasmă restabilește activitatea ADAMTS-13 la pacienții cu defecte genetice și elimină autoanticorpii ADAMTS-13 la pacienți cu TTP autoimună dobândită (Tsai, H-M, Hematol Oncol Clin North Am., 21 (4): 609-v (2007)). În terapie de obicei se mai adaugă agenți suplimentari, cum ar fi medicamente imunosupresoare (George, JN, N Engl J Med, 354: 1927-35 (2006)). Cu toate acestea, schimbul de plasmă este inefficient la aproximativ 20% dintre pacienți, recidiva apare la mai mult de o treime dintre pacienți, iar plasmafereza este costisitoare și dificilă din punct de vedere tehnic. În plus, mulți pacienți nu tolerează schimbul de plasmă. În consecință, în TTP persistă o necesitate critică de tratamente suplimentare și mai eficiente.

Deoarece TTP este o tulburare a cascadei de coagulare a sângelui, tratamentul cu antagoniști ai sistemului complementului poate contribui la stabilizarea și corectarea bolii. Deși activarea patologică a căii complementare alternative este legată de aHUS, rolul activării complementului în TTP este mai puțin elucidat. Deficiența funcțională a ADAMTS13 este importantă pentru susceptibilitatea TTP, însă nu este suficientă pentru a provoca episoade acute. Factorii de mediu și/sau alte variații genetice pot contribui la manifestarea TTP. De exemplu, genele care codifică proteinele implicate în reglarea cascadei de coagulare, vWF, funcției plachetare, componentelor suprafeței vaselor endoteliale sau sistemului complementului pot fi implicate în dezvoltarea microangiopatiei trombotice acute (Galbusera, M. et al., Haematologica, 94: 166-170 (2009)). În particular, s-a demonstrat că activarea complementului joacă un rol critic; serul în microangiopatia trombotică asociată cu deficiența ADAMTS-13 a determinat depunerea de C3 și MAC și activarea ulterioară a neutrofilelor, care ar putea fi lichidate prin inactivarea complementului (Ruiz-Torres MP et al., Thromb Haemost, 93: 443-52 (2005)). În plus, s-a demonstrat recent că în timpul episoadelor acute de TTP se înregistrează niveluri crescute de C4d, C3bBbP și C3a (M. Réti et al., J Thromb Haemost, Feb. 28 (2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x. [în curând va apărea publicația electronică]), în concordanță cu activarea căii clasice/lectinei și alternative. Această cantitate crescută de activare a complementului în episoadele acute poate iniția calea de activare terminală și poate fi responsabilă pentru o exacerbare suplimentară a TTP.

Rolul ADAMTS-13 și vWF în TTP este cu certitudine responsabil de activarea și agregarea trombocitelor și implicarea ulterioară în stresul de deviere și depunere în microangiopatii. Trombocitele activate interacționează și declanșează atât căile clasice, cât și cele alternative ale complementului. Activarea complementului mediată de plachete crește nivelul de mediatori inflamatorii C3a și C5a (Peerschke E et al., Mol Immunol, 47: 2170-5 (2010)). Trombocitele pot servi, astfel, drept ținte ale activării clasice a complementului în TTP ereditară sau autoimună.

Așa cum s-a menționat mai sus, calea lectinei a complementului, în virtutea activării protrombinei mediate de MASP-2, este calea moleculară dominantă care leagă leziunea endotelială cu coagularea și tromboza microvasculară, care se produce în HUS. În mod similar, activarea căii lectinei a complementului poate dirija în mod direct sistemul de coagulare în TTP. Activarea căii lectinei poate fi inițiată ca răspuns la leziunea inițială a endoteliului, cauzată de deficiența ADAMTS-13 în TTP. Prin urmare, este de așteptat ca inhibitorii căii lectinei, incluzând, dar fără a se limita la anticorpi care blochează funcția MASP-2, să atenueze microangiopatiile asociate cu coagularea microvasculară, tromboză și hemoliza la pacienții care suferă de TTP.

Pacienții, care suferă de TTP, prezintă în camera de urgență, de obicei, unul sau mai multe dintre următoarele simptome: purpură, insuficiență renală, nivel redus de trombocite, anemie și/sau tromboză, inclusiv accident vascular cerebral. Standardul actual de asistență medicală în TTP implică administrarea prin cateter (de exemplu, intravenos sau o altă formă de cateter), apoi plasmafereza de substituție timp de două săptămâni sau mai mult, de obicei de trei ori pe săptămână până la administrare zilnică. Dacă subiectul prezintă test pozitiv pentru prezența unui inhibitor al ADAMTS13 (adică, un anticorp endogen împotriva ADAMTS13), atunci plasmafereza poate fi realizată în combinație cu terapie imunosupresoare (de exemplu, corticosteroizi, rituxan sau ciclosporină). Subiecții cu TTP refractar (aproximativ 20% din pacienții cu TTP) nu răspund la un tratament cel puțin de două săptămâni cu plasmefereză.

În conformitate cu cele menționate, într-o variantă de realizare la stabilirea diagnosticului inițial de TTP sau la un subiect care prezintă unul sau mai multe simptome, care indică un diagnostic de TTP (de exemplu, implicarea sistemului nervos central, trombocitopenie severă (un număr de trombocite egal sau mai mic de 5000/μl, în cazul în care nu se administrează aspirină, mai mic sau egal cu 20.000/μl la administrarea aspirinei), implicare severă cardiacă, leziune pulmonară severă, infarct gastrointestinal sau gangrenă), este prevăzută o metodă de tratare a

subiectului cu o cantitate eficientă de un agent inhibitor al MASP-2 (de exemplu, un anticorp anti-MASP-2) ca terapie de primă linie în absența plasmeferezei sau în combinație cu plasmafereza. Ca terapie de primă linie, agentul inhibitor MASP-2 poate fi administrat sistemic, cum ar fi administrarea intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, nazală, subcutanată sau altă administrare parenterală. În unele variante de realizare, agentul inhibitor al MASP-2 se administrează ca terapie de primă linie în absența plasmeferezei pentru a evita complicațiile posibile ale plasmeferezei, cum ar fi hemoragia, infecția și expunerea la tulburări și/sau alergii inerente donatorului de plasmă sau la un subiect cu contraindicații pentru plasmefereză sau în condiții în care plasmafereza nu este disponibilă. În unele variante de realizare, agentul inhibitor al MASP-2 se administrează subiectului care suferă de TTP în combinație (inclusiv administrarea concomitentă) cu un agent imunosupresor (de exemplu, corticosteroizi, rituxan sau ciclosporină) și/sau în combinație cu ADAMTS-13 concentrat.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect care suferă de TTP printr-un cateter (de exemplu, intravenos) în prima perioadă de timp (de exemplu, în faza acută, care durează cel puțin de o zi până la o săptămână sau două săptămâni), urmată de administrarea subcutanată a unui agent inhibitor al MASP-2 timp de a doua perioadă de timp (de exemplu, o perioadă îndelungată cel puțin de două săptămâni sau mai mult). În unele exemple de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp se realizează în absența plasmeferezei. În unele exemple de realizare metoda se utilizează pentru a menține subiectul, pentru a preveni suferințele subiectului de la unul sau mai multe simptome asociate cu TTP.

Intr-o altă variantă de realizare se prevede o metodă de tratare a unui subiect care suferă de TTP refractar (adică a unui subiect, care nu a răspuns la cel puțin de două săptămâni de terapie cu plasmafereză) prin administrarea unei cantități de inhibitor al MASP-2 eficiente pentru a reduce unul sau mai multe simptome ale TTP. Intr-o realizare inhibitorul MASP-2 (de exemplu, un anticorp anti-MASP-2) se administrează subcutanat sau pe altă cale parenterală unui subiect cu TTP refractar o perioadă îndelungată, cel puțin de două săptămâni sau mai mult. Administrarea poate fi repetată la indicația medicului, până când starea este rezolvată sau este controlată.

În unele variante de realizare metoda prevede suplimentar determinarea nivelului cel puțin de un factor al complementului (de exemplu, C3, C5) la subiect înainte de tratament și opțional în timpul tratamentului, în care depistarea unui nivel redus cel puțin de un factor al complementului, comparativ cu o valoare standard sau cu un subiect sănătos, indică necesitatea continuării tratamentului cu agentul inhibitor al MASP-2.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi a unui anticorp anti-MASP-2, la un subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a TTP, fie subcutanat, fie intravenos. Tratamentul se administrează, de preferință, zilnic, dar poate administrat mai rar, cum ar fi la două săptămâni. Tratamentul se continuă până când numărul de trombocite la subiect depășește 150.000/ml timp cel puțin de două zile consecutive. Anticorpul anti-MASP-2 se poate administra sub formă de monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

Intr-un exemplu de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 uman cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC₅₀ de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, F(ab)² și F(ab')², în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P și/sau în care anticorpul nu inhibă semnificativ calea clasică. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea alternativă. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea clasică sau calea alternativă (adică inhibă calea lectinei, lăsând intacte căile clasice și alternative ale complementului).

Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul subiectului, care suferă de TTP, cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor de MASP-2 inhibă

formarea trombilor în serul subiectului, care suferă de TTP, la un nivel ce depășește cel puțin de 20% sau mai mult (cum ar fi cel puțin de 30%, cel puțin de 40%, cel puțin de 50%) efectul inhibitor asupra depunerii C5b-9 în ser.

5 Intr-o variantă de realizare anticorpii inhibitori al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul pacientului cu TTP cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

10 Intr-o variantă de realizare anticorpii inhibitori al MASP-2 se administrează subiectului printr-un cateter intravenos sau prin altă metodă de administrare prin cateter.

Intr-o variantă de realizare prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect, care suferă de TTP, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) Lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) Lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) Lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acestuia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70.

In unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67 . In unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SECV ID NR: 70 .

35 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 umană, recunoscută de anticorpii de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu , notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

40 Boala Degos

Boala Degos, cunoscută și sub denumirea de papuloză atrofică malignă, este o TMA foarte rară, care afectează endoteliul vaselor mici ale pielii, ale tractului gastro-intestinal și ale SNC. Această vasculopatie cauzează ocluzia venulelor și a arteriolelor, rezultând cu leziuni ale pielii, ischemie intestinală și tulburări ale SNC, inclusiv accidente vasculare cerebrale, epilepsie și tulburări cognitive. În piele, necroza țesutului conjunctiv se datorează ocluziei trombotice a arterelor mici. Totuși, cauza bolii Degos nu este cunoscută. Sunt implicate vasculitele, coagulopatia sau disfuncția primară a celulelor endoteliale. Supraviețuirea în boala Degos constituie 50% de la doi până la trei ani. Deși pentru ameliorarea simptomelor se utilizează medicamente antiplachetare, anticoagulante și imunosupresoare, un tratament eficient pentru boala Degos nu există.

50 Deși mecanismul bolii Degos nu este cunoscut, calea complementului este implicată. Margo și colab. au identificat depuneri semnificative de C5b-9 în piele, în tractul gastro-intestinal și în vasele cerebrale la patru pacienți cu boală Degos în stadiul terminal (Margo et al., Am J Clin Pathol 135 (4): 599-610, 2011). Tratamentul experimental cu eculizumab inițial s-a dovedit a fi eficient în tratamentul leziunilor cutanate și intestinale, dar nu a prevenit progresia bolii sistemice (Garrett-Bakelman F. et al., "C5b-9 is a potential effector in the pathophysiology of Degos disease; a case report of treatment with eculizumab" (Abstract), Jerusalem: International Society of Hematology, 2010, Poster # 156 și Polito J. et al., "Early detection of systemic Degos disease

(DD) or malignant atrophic papulosis (MAP) may increase survival” (Abstract), San Antonio, TX: American College of Gastroenterology; 2010, Poster # 1205).

Mulți pacienți care suferă de boala Degos au defecte de coagulare a sângelui. Pentru această boală este caracteristică ocluzia trombotică a arterelor mici din piele. Deoarece în această boală este implicată calea complementului, așa cum se descrie aici pentru alte TMA, este de așteptat ca inhibitorii căii lectinei, incluzând, dar fără a se limita, anticorpi care blochează funcția MASP-2, să fie benefici în tratarea pacienților, care suferă de boala Degos.

In conformitate cu aceasta, într-o altă variantă de realizare invenția prevede metode de tratare a bolii Degos prin administrarea la un subiect care suferă de boala Degos sau cu o stare care rezultă din boala Degos a unei compoziții cuprinzând o cantitate terapeutic eficientă de un agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp MASP-2, într-un purtător farmaceutic. Subiectului, care suferă de boala Degos sau cu o stare care rezultă din boala Degos, agentul inhibitor al MASP-2 se administrează sistemic, cum ar fi administrarea intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, subcutanată sau altă administrare parenterală sau potențial pentru agenții non-peptiderici - prin administrare orală. Anticorpul anti-MASP-2 se poate administra sub formă de monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

Intr-un exemplu de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 uman cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC₅₀ de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab)² și F(ab')², în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P și/sau în care anticorpul nu inhibă semnificativ calea clasică. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea alternativă. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea clasică sau calea alternativă (adică inhibă calea lectinei, lăsând intacte căile clasice și alternative ale complementului).

Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul subiectului, care suferă de boala Degos, cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat. În unele variante de realizare anticorpul inhibitor de MASP-2 inhibă formarea trombilor în serul subiectului, care suferă de boala Degos, la un nivel ce depășește cel puțin de 20% sau mai mult (cum ar fi cel puțin de 30%, cel puțin de 40%, cel puțin de 50%) efectul inhibitor asupra depunerii C5b-9 în ser.

Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul pacientului cu boala Degos cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează subiectului printr-un cateter intravenos sau prin altă metodă de administrare prin cateter.

Intr-o variantă de realizare prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect, care suferă de boala Degos, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acestuia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o

identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70.

5 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67. În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi, notată ca SECV ID NR: 70 .

10 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 umană, recunoscută de anticorpul de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu , notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

15 Sindromul antifosfolipidic catastrofal (CAPS)

Sindromul antifosfolipidic catastrofal (CAPS) este o variantă extremă a sindromului anticorpului antifosfolipidic (APLA). CAPS se caracterizează prin tromboză venoasă și arterială datorată anticorpilor patogeni. CAPS este o TMA cu tromboză de multiple organe, ischemie și insuficiență de organe. Ca și alte TMA, este caracteristică ocluzia vaselor mici în diferite organe. Rată mortalității în CAPS este înaltă, constituind aproximativ 50% și deseori se asociază cu infecții sau traume. Pacienții au anticorpi antifosfolipidici, în general IgG.

20 Din punct de vedere clinic, CAPS implică cel puțin de trei organe sau țesuturi cu dovezi histopatologice de ocluzie a vaselor mici. Tromboza periferică poate implica venele și arterele din sistemul nervos central, cardiovascular, renal sau pulmonar. Pacienții sunt tratați cu antibiotice, anticoagulante, corticosteroizi, schimb de plasmă și imunoglobulină intravenos. Cu toate acestea, moartea poate rezulta din insuficiență funcțională multiplă de organe.

25 În CAPS este implicată calea complementului. De exemplu, studiile efectuate pe modele experimentale pe animale indică, că inhibarea complementului poate fi un mijloc eficient de prevenire a trombozei asociate cu CAPS (Shapira L. et al., Arthritis Rheum 64 (8): 2719-23, 2012). Mai mult decât atât, Shapira et al. au relatat în continuare că administrarea ecilizumabului la un subiect, care suferă de CAPS, în doze care blochează calea complementului, a întrerupt evenimentele trombotice progresive acută și a cauzat evoluția inversă a trombocitopeniei (Lim W., Curr Opin Hematol 18(5): 361-5, 2011). Prin urmare, așa cum se descrie aici pentru alte TMA, este de așteptat ca inhibitorii căii lectinei, incluzând, dar fără a se limita, anticorpi care blochează funcția MASP-2, să fie benefici în tratarea pacienților care suferă de CAPS.

30 În conformitate cu aceasta, într-o altă variantă de realizare invenția prevede metode de tratare a CAPS prin administrarea la un subiect care suferă de CAPS sau cu o stare care rezultă din CAPS a unei compoziții cuprinzând o cantitate terapeutic eficientă de un agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp MASP-2, într-un purtător farmaceutic. Subiectului, care suferă de CAPS sau cu o stare care rezultă din CAPS, agentul inhibitor al MASP-2 se administrează sistemic, cum ar fi administrarea intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, subcutanată sau altă administrare parenterală sau potențial pentru agenții non-peptiderici - prin administrare orală. Anticorpul anti-MASP-2 se poate administra sub formă de monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi ecilizamab.

45 Într-un exemplu de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 umană cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC₅₀ de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab)² și F(ab')², în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respective este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P și/sau în care anticorpul nu inhibă semnificativ calea clasică. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea alternativă. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea clasică sau calea alternativă (adică inhibă calea lectinei, lăsând intacte căile clasice și alternative ale complementului).

Intr-o variantă de realizare anticorpur inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul subiectului, care suferă de CAPS, cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat. In unele variante de realizare anticorpur inhibitor de MASP-2 inhibă formarea trombilor in serul subiectului, care suferă de CAPS, la un nivel ce depășește cel puțin de 20% sau mai mult (cum ar fi cel puțin de 30%, cel puțin de 40%, cel puțin de 50%) efectul inhibitor asupra depunerii C5b-9 in ser.

Intr-o variantă de realizare anticorpur inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi in serul pacientului cu CAPS cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

Intr-o variantă de realizare anticorpur inhibitor al MASP-2 se administrează subiectului printr-un cateter intravenos sau prin altă metodă de administrare prin cateter.

Intr-o variantă de realizare prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect, care suferă de CAPS, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorpur inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acesteia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzand o cantitate de un anticorpur inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67 . In unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorpur inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SECV ID NR: 70 .

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzand un anticorpur inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 umană, recunoscută de anticorpur de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu , notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor , notată ca SECV ID NR: 70.

TMA asociată cancerului

Neoformațiunile maligne sistemice de orice tip pot conduce la manifestări clinice și patologice de TMA (Batts and Lazarus, *Bone Marrow Transplantation* 40: 709-719, 2007). TMA asociată cancerului se depistează deseori în plămâni și pare a fi asociată cu emboli tumorali (Francis KK et al., *Commun Oncol* 2:339-43, 2005). Embolii tumorali pot reduce fluxul sanguin și, astfel, pot conduce la o stare de hipoperfuzie în arteriolele și venulele afectate. Se presupune, ca stresul și leziunile țesutului rezultate vor activa calea lectinei complementului în mod localizat. Calea lectinei activată, la rândul ei, poate activa cascada de coagulare prin scindarea dependentă de MASP-2 a protrombinei în trombină, conducând la o stare protrombotică caracteristică pentru TMA. Inhibarea MASP-2, în acest context, este de așteptat să reducă activarea localizată a trombinei și, astfel, să atenueze starea protrombotică.

Prin urmare, așa cum se descrie aici pentru alte TMA, este de așteptat ca inhibitorii căii lectinei, incluzând, dar fără a se limita, anticorpi care blochează funcția MASP-2, să fie benefici în tratarea pacienților care suferă de TMA asociată cancerului.

In conformitate cu aceasta, într-o altă variantă de realizare invenția prevede metode tratare sau

prevenire a TMA asociată cancerului prin administrarea la un subiect care suferă sau cu risc de dezvoltare a TMA asociată cancerului a unei compoziții cuprinzând o cantitate terapeutic eficientă de un agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp MASP-2, într-un purtător farmaceutic. Subiectului, care suferă sau cu risc de dezvoltare a TMA asociată cancerului, agentul inhibitor al MASP-2 se administrează sistemic, cum ar fi administrarea intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, subcutanată sau altă administrare parenterală sau potențial pentru agenții non-peptiderici - prin administrare orală. Anticorpul anti-MASP-2 se poate administra sub formă de monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

Intr-un exemplu de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 uman cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC₅₀ de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab)² și F(ab')², în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P și/sau în care anticorpul nu inhibă semnificativ calea clasică. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea alternativă. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea clasică sau calea alternativă (adică inhibă calea lectinei, lăsând intacte căile clasice și alternative ale complementului).

Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul subiectului, care suferă de TMA asociată cancerului, cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul pacientului, care suferă de TMA asociată cancerului, cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează subiectului printr-un cateter intravenos sau prin altă metodă de administrare prin cateter.

Intr-o variantă de realizare prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect, care suferă de TMA asociată cancerului, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acestuia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70).

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67 . În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SECV ID NR: 70 .

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 umană recunoscută de anticorpul de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

TMA asociate chimioterapiei cancerului

TMA asociată chimioterapiei este o stare, care implică trombocitopenie, anemie hemolitică microangiopatică și disfuncție renală, care se dezvoltă la 2-10% dintre pacienții cu antecedente de neoplasme maligne tratate cu agenți chimioterapeutici, cum ar fi gemcitabină, mitomicină, oxaliplatină, etc. TMA asociată cu chimioterapia este însoțită de rezultate clinice ineficiente cu mortalitate înaltă (Blake-Haskins et al., Clin Cancer Res 17 (18): 5858-5866, 2011).

Etiologia TMA asociate chimioterapiei se presupune că include o deteriorare nespecifică toxică a endoteliului microvascular. Într-un model experimental pe animale cu TMA indusă de mitomicină a fost demonstrată o leziune directă a celulelor endoteliale (Dlott J. et al., Ther Apher Dial 8: 102-11, 2004). S-a demonstrat, că lezarea celulelor endoteliale printr-o varietate de mecanisme activează calea lectinei complementului. De exemplu, Stahl et al. au relatat, că celulele endoteliale, expuse la stresul oxidativ, activează calea lectinei complementului atât in vitro, cât și in vivo (Collard et al., Am J Pathol., 156 (5): 1549-56, 2000; La Bonte et al., J. Immunol. 15; 188 (2): 885-91, 2012). In vivo, acest proces conduce la tromboză și s-a demonstrat, că inhibarea căii lectinei previne tromboza (La Bonte et al., J Immunol., 15, 188 (2): 885-91, 2012). Mai mult decât atât, așa cum se demonstrează în Exemplele 37-39 din prezenta descriere, în modelul experimental murin cu TMA, în care fotoexcitarea localizată FITC-Dex s-a utilizat pentru a induce leziuni localizate ale microvasculaturii, cu dezvoltarea ulterioară a unui răspuns TMA, s-a relevat că inhibarea MASP-2 poate preveni TMA. Astfel, leziunea microvasculară a endoteliului cu agenți chimioterapeutici poate activa calea lectinei a complementului, care apoi creează o stare protrombotică localizată și promovează un răspuns TMA. Deoarece activarea căii lectinei și crearea unei stări protrombotice este dependentă de MASP-2, este de așteptat ca inhibitorii MASP-2, incluzând, dar fără a se limita, anticorpi care blochează funcția MASP-2, să atenueze răspunsul TMA și să reducă riscul de TMA asociate chimioterapiei cancerului.

În conformitate cu aceasta, într-o altă variantă de realizare invenția prevede metode de tratare sau prevenire a TMA asociate chimioterapiei cancerului prin administrarea la un subiect care suferă sau cu risc de dezvoltare a TMA asociate chimioterapiei cancerului a unei compoziții cuprinzând o cantitate terapeutic eficientă de un agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp MASP-2, într-un purtător farmaceutic. Subiectului, care a suportat, suportă sau va suporta chimioterapie, agentul inhibitor al MASP-2 se administrează sistemic, cum ar fi administrarea intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, subcutanată sau altă administrare parenterală sau potențial pentru agenții non-peptiderici - prin administrare orală. Anticorpul anti-MASP-2 se poate administra sub formă de monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

Într-un exemplu de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 uman cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC₅₀ de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab)² și F(ab')², în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P și/sau în care anticorpul nu inhibă semnificativ calea clasică. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea alternativă. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea clasică sau calea alternativă (adică inhibă calea lectinei, lăsând intacte căile clasice și alternative ale complementului).

Într-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul subiectului, care suferă de TMA asociată chimioterapiei cancerului, cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

Într-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul pacientului, care suferă de TMA asociată chimioterapiei cancerului, cel puțin de 30%, cum ar fi cel

puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

5 Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează subiectului printr-un cateter intravenos sau prin altă metodă de administrare prin cateter.

Intr-o variantă de realizare prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect, care suferă de TMA asociată chimioterapiei cancerului, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care
10 conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de
15 aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acestuia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR: 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67)
20 și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70.

In unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la
25 antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67. In unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SECV ID NR: 70.

30 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 uman recunoscut de anticorpul de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

35 TMA asociată transplantului

TMA asociată transplantului (TA-TMA) este un sindrom devastator, care poate apărea la pacienții cu transplant, cum ar fi recipienții de transplant de celule stem hematopoietice alogene (de exemplu, Batts and Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40: 709-719, 2007). Patogeneza
40 acestei stări este puțin elucidată, dar probabil implică o confluență a răspunsurilor, care culminează cu leziune celulară endotelială (Laskin B.L. et al., Blood 118 (6): 1452-62, 2011). Așa cum s-a discutat mai sus, leziunea celulară endotelială este un stimulent prototip pentru activarea căii lectinei și generarea unui mediu protrombotic.

Datele recente susțin în continuare rolul activării complementului prin calea lectinei în patogeneza TA-TMA. Laskin et al. au demonstrat că depunerea C4d în arteriolele renale este mult
45 mai frecventă la subiecții cu TA-TMA histologică (75%), comparativ cu martorii (8%) (Laskin B.L. et al., Transplantation, 27; 96(2):217-23, 2013). Astfel, C4d poate fi un marker al patologiei TA-TMA, implicând fixarea localizată a activării complementului prin calea lectinei sau clasică.

Deoarece activarea căii lectinei și crearea unei stări protrombotice este dependentă de MASP-2, este de așteptat ca inhibitorii MASP-2, incluzând, dar fără a se limita, anticorpi care blochează
50 funcția MASP-2, să atenueze răspunsul TMA și să reducă riscul de TMA asociat transplantului (TA-TMA).

In conformitate cu aceasta, într-o altă variantă de realizare invenția prevede metode de tratare sau de prevenire a TMA asociată transplantului prin administrarea la un subiect care suferă sau cu risc
55 de dezvoltare a TMA asociată transplantului a unei compoziții cuprinzând o cantitate terapeutic eficientă de un agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp anti-MASP-2, într-un purtător farmaceutic. Subiectului, care a suportat, suportă sau va suporta o procedură de transplant, agentul inhibitor al MASP-2 se administrează sistemic, cum ar fi administrarea intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie, subcutanată sau altă administrare parenterală sau potențial pentru agenții non-peptiderici - prin administrare orală. Anticorpul anti-MASP-2 se poate

administra sub formă de monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab. Într-o altă variantă de realizare invenția prevede metode de tratare sau prevenire a TMA asociată transplantului de celule stem alogene la un subiect până la, în timpul sau după transplant de celule stem alogene prin administrarea unei compoziții cuprinzând o cantitate de un agent inhibitor al

5 MASP-2, cum ar fi un anticorp anti-MASP-2

Intr-un exemplu de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 uman cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC₅₀ de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab)² și F(ab')², în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P și/sau în care anticorpul nu inhibă semnificativ calea clasică. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea alternativă. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și nu inhibă semnificativ calea clasică sau calea alternativă (adică inhibă calea lectinei, lăsând intacte căile clasice și alternative ale complementului).

20 Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul subiectului, care suferă de TMA asociată transplantului, cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

25 Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul pacientului, care suferă de TMA asociată transplantului, cel puțin de 30%, cum ar fi cel puțin de 40%, cum ar fi cel puțin de 50%, cum ar fi cel puțin de 60%, cum ar fi cel puțin de 70%, cum ar fi cel puțin de 80%, cum ar fi cel puțin de 85%, cum ar fi cel puțin de 90%, cum ar fi cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat.

30 Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează subiectului printr-un cateter intravenos sau prin altă metodă de administrare prin cateter.

Intr-o variantă de realizare prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect, care suferă de TMA asociată transplantului, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acesteia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR: 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70).

50 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67. În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SECV ID NR: 70.

55 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 uman recunoscut de

anticorpu de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

IV. ROLUL MASP-2 ÎN ALTE BOLI ȘI STĂRI ȘI METODE TERAPEUTICE, ÎN CARE SE UTILIZEAZĂ AGENȚI DE INHIBARE AI MASP-2

5 PATOLOGII RENALE

Activarea sistemului complementului este implicată în patogeneza unei mari varietăți de boli renale; inclusiv în glomerulonefrita mezangioproliferativă (nefropatia IgA, boala lui Berger) (Endo, M. et al., Clin Nephrology 55: 185-191, 2001), glomerulonefrita membranoasă (Kerjashki D., Arch B Cell Pathol 58: 253-71, 1990, Brenchley, P.E. et al., Kidney Int., 41: 933-7, 1992; 10 Salant, D.J. et al., Kidney Int. 35: 976-84, 1989), glomerulonefrita membranoproliferativă (glomerulonefrita mezangiocapilară) (Bartlow, B.G. et al., Kidney Int. 15: 294-300, 1979; Meri, S. et al., J. Exp Med., 175: 939-50, 1992), glomerulonefrita postinfecțioasă acută (glomerulonefrita poststreptococică), glomerulonefrita crioglobulinemică (Ohsawa, I., et al., Clin Immunol 101: 59-66, 2001), nefrită lupică (Gatenby, P.A., Autoimmunity 11:61-6,1991) și nefrită în purpura 15 Henoch-Schonlein (Endo M. et al., Am. J. Kidney Dis 35: 401-407, 2000). Implicarea complementului într-o boală renală a fost determinată de mai multe decenii, dar persistă încă discuții ample cu privire la rolul său exact în debutul, dezvoltarea și faza de rezolvare a bolii renale. În condiții normale contribuția complementului este benefică pentru organismul gazdă, dar activarea necorespunzătoare și depunerea complementului pot contribui la afectarea țesutului.

Există dovezi semnificative că glomerulonefrita, inflamația glomerulelor, este adesea inițiată prin depunerea complexelor imune pe structurile glomerulare sau tubulare, declanșând activarea complementului, inflamația și deteriorarea țesutului. Kahn și Sinniah au demonstrat o depunere crescută a C5b9 în membranele bazale tubulare în biopsiile prelevate de la pacienții cu diferite forme de glomerulonefrită (Kahn, T. N. et al., Histopath., 26: 351-6, 1995). Într-un studiu al 25 pacienților cu nefrologie IgA (Alexopoulos, A. et al., Nephrol. Dial Transplant 10: 1166-1172, 1995) depunerea C5b9 în structurile tubulare epiteliale/membranei bazale a corelat cu nivelurile plasmatice ale creatininei. Într-un alt studiu al nefropatiei membranoase s-a demonstrat o relație între rezultatul clinic și nivelurile urinare de sC5b-9 (Kon, S. P. et al., Kidney Int. 48: 1953-58, 1995). S-a constatat o corelație pozitivă între nivelurile crescute de sC5b-9 cu prognostic nefavorabil. Lehto et al., au determinat niveluri crescute de CD5-9, un factor de reglare al 30 complementului care inhibă complexul de atac membranar din membranele plasmatice, precum și de C5b-9 în urina de la pacienții cu glomerulonefrită membranoasă (Lehto, T. et al., Kidney Int. 47: 1403-11, 1995). Analiza histopatologică a probelor de biopsie, prelevate de la aceiași pacienți, a demonstrat depunerea proteinelor C3 și C9 în glomerul, în timp ce exprimarea CD5-9 în aceste 35 țesuturi a fost diminuată, comparativ cu cea din țesutul renal normal. Aceste studii diferite sugerează, că glomerulonefrita îndelungată mediata de complement conduce la excreția urinară a proteinelor complementului, care corelează cu gradul de afectare a țesutului și pronosticul bolii.

Inhibarea activării complementului în diferite modele experimentale pe animale cu glomerulonefrită a demonstrat, de asemenea, importanța activării complementului în etiologia bolii. Într-un model de glomerulonefrită membranoproliferativă (MPGN), perfuzarea antiserului 40 anti-Thy1 la șobolani cu deficit de C6 (care nu pot sintetiza C5b9) conducea la o proliferare celulară glomerulară cu 90% mai mică, o reducere de 80% a infiltrației plachetare și macrofagale (un marker de extindere a matricei mezangiale) și cu o proteinurie mai redusă cu 50%, comparativ cu șoarecii fără mutații (Brandt, J. et al., Kidney Int. 49: 335-343, 1996). Aceste rezultate indică, 45 că C5b-9 are rol de mediator major al leziunii tisulare cu complement, în acest model de ser anti-timocitar pe șobolani. Într-un alt model de glomerulonefrită, infuzia de doze crescând membrană bazală glomerulară de iepure anti-șobolan a produs o migrație a leucocitelor polimorfonucleare (PMN) dependentă de doză, care a fost atenuat prin tratamentul anterior cu factor de venin de cobra (pentru a consuma complementul) (Scandrett, A.L. et al., Am. J. Physiol., 268: F256-F265, 50 1995). Șobolani, care au fost tratați cu factor de venin de cobra au prezentat, de asemenea, histopatologie diminuată, reducerea proteinuriei îndelungate și niveluri scăzute de creatinină, comparativ cu șobolani de control. Utilizând trei modele de glomerulonefrită (GN) la șobolani (ser antitimocitar, Concavalin A, anti-Concavalin A și nefrită pasivă Heymann), Couser et al., au demonstrat eficacitatea terapeutică potențială a abordărilor de inhibare a complementului prin 55 utilizarea proteinei recombinante sCR1 (Couser, W.G., et al., J. Am., Soc Nephrol 5: 1888-94, 1995). Șobolani tratați cu sCR1 au prezentat o reducere semnificativă a migrației leucocitelor polimorfonucleare, trombocitelor și macrofagelor, reducerea mezangiolizei și proteinuriei, comparativ cu șobolani de control. Dovezi suplimentare privind importanța activării complementului în glomerulonefrită au fost furnizate prin utilizarea unui MoAb anti-C5 în

modelul cu șoareci NZB/W F1. MoAb anti-C5 inhibă scindarea C5, blocând generarea de C5a și C5b-9. Terapia continuă cu MoAb anti-C5 timp de 6 luni a condus la ameliorarea semnificativă a evoluției glomerulonefritei. Un anticorp monoclonal uman MoAb anti-C5 (5G1.1), care împiedică scindarea componentei complementului uman C5 în componentele sale pro-inflamatorii, este în curs de elaborare de către Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, ca tratament potențial pentru glomerulonefrită.

Dovezi directe privind rolul patologic al complementului în leziunile renale sunt furnizate de studiile pacienților cu deficiențe genetice ale componentelor specifice ale complementului. O serie de publicații au evidențiat o asociere a bolii renale cu deficiențe ale factorului H de reglare al complementului (Ault, B.H., *Nephrol.*, 14: 1045-1053, 2000; Levy, M. et al., *Kidney Int.* 30: 949-56, 1986, Pickering, M.C. et al., *Nat Genet.*, 31: 424-8, 2002). Deficitul de factor H conduce la reducerea concentrațiilor plasmatice ale factorului B și C3 și la consumul de C5b-9. Atât glomerulonefrita membranoproliferativă atipică (MPGN), cât și sindromul hemolitic uremic idiopatic (HUS) se asociază cu deficiența factorului H. Porcii cu deficitul factorului H (Jansen, J.H. et al., *Kidney Int.* 53: 331-49, 1998) și șoareci cu knockout factorului H (Pickering, M.C., 2002) prezintă simptome asemănătoare MPGN, confirmând importanța factorului H în reglarea complementului. Deficiențele altor componente ale complementului se asociază cu boala renală pe fondul evoluției lupusului eritematos sistemic (SLE) (Walport, M.J., Davies et al., *Ann.NY.Acad.Sci.*815: 267-81, 1997). Deficitul de C1q, C4 și C2 predispune la dezvoltarea SLE prin mecanisme legate dereglarea eliminării complexelor imune și al materialului apoptotic. La mulți dintre acești pacienți cu SLE apare nefrită lupică, caracterizată prin depunerea complexelor imune în întregul glomerul.

Dovezi suplimentare, care leagă activarea complementului și patologia renală, au fost furnizate prin identificarea la pacienți a autoanticorpilor direcționați împotriva componentelor complementului, dintre care unele au fost direct legate de patologia renală (Trouw, L.A. et al., *Mol Immunol.*, 38: 199-206, 2001). Un număr de astfel de autoanticorpi prezintă un grad atât de înalt de corelare cu patologia renală, încât pentru a indica această activitate a fost introdus termenul de factor nefritic (NeF). În studiile clinice aproximativ 50% dintre pacienții, la care sunt prezenți factorii nefritici, au dezvoltat MPGN (Spitzer, R. E. et al., *Clin Immunol., Immunopathol.*, 64: 177-83). C3NeF este un autoanticorp direcționat împotriva C3 convertazei căii alternative (C3bBb) și stabilizează această conversie, promovând, astfel, activarea căii alternative (Daha, M. R. et al., *J. Immunol.*, 116: 17, 1976). De asemenea, autoanticorpul cu o specificitate pentru C3 convertaza căii clasice (C4b2a), numit C4NeF, stabilizează această conversie și, astfel, promovează activarea căii clasice (Daha, M.R. et al., *J. Immunol.*, 125: 2051-2054, 1980; Halbwachs, L., et al., *J. Clin Invest.*, 65: 1249-56, 1980). Anticorpii anti-C1q au fost descriși ca fiind legați de nefrită la pacienții cu SLE (Hovath, L. et al., *Clin Exp., Rheumatol.*, 19: 667-72, 2001, Siegert, C. et al., *J.Rheumatol.* 18, 230-34, 1991, Siegert, C. et al., *Clin Exp., Rheumatol.*, 10:19-23, 1992) și o creștere a titrului acestor autoanticorpi anti-C1q se consideră ca prezicând o instalare a nefritei (Coremans, I.E. et al., *Am. J. Kidney Dis.*, 26: 595-601, 1995). Depozitele imune, prelevate din rinichi postmortem de la pacienți cu SLE, au prezentat acumularea în rinichi a acestor autoanticorpi anti-C1q (Mannick, M. et al., *Arthritis Rheumatol.*, 40: 1504-11, 1997). Toate aceste fapte indică rolul patologic al acestor autoanticorpi. Cu toate acestea, nu toți pacienții cu autoanticorpi anti-C1q dezvoltă o patologie renală și, de asemenea, unii indivizi sănătoși au titru redus de autoanticorpi anti-C1q. (Siegert, C.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67:204-9, 1993).

Adițional la căile alternative și clasice de activare a complementului, calea lectinei poate avea, de asemenea, un rol patologic important în patologia renală. Nivelurile înalte de MBL, serin-protează asociată cu MBL și produse de activare a complementului au fost detectate prin tehnici imunohistochimice în materialul biopsic renal, prelevat de la pacienți diagnosticați cu diferite afecțiuni renale, inclusiv cu nefrită în purpura Henoch Schonlein (Endo, M. et al., *Am. J. Kidney Dis* 35: 401-407, 2000), glomerulonefrită crioglobulinemică (Ohsawa, I. et al., *Clin Immunol* 101: 59-66, 2001) și neuropatie IgA (Endo M. et al., *Nephrology* 55: 185-191, 2001). Prin urmare, în pofida faptului, că o asociere între bolile renale și complement este cunoscută de câteva decenii, datele despre modul în care complementul influențează exact aceste boli renale sunt departe de a fi complete.

TULBURĂRI SANGVINE

Sepsisul este cauzat de o reacție generalizată a pacientului la invazia microorganismelor. O funcție majoră a sistemului de complement este de a dirija răspunsul inflamator la invaziile bacteriene și de alți agenți patogeni. În concordanță cu acest rol fiziologic, activarea

complementului a fost demonstrată în numeroase studii ca având un rol major în patogeniza sepsisului (Bone, R. C., *Annals, Intern Med.*, 115: 457-469, 1991). Definirea manifestărilor clinice ale sepsisului este în continuă evoluție. Sepsisul este, de obicei, definit ca răspuns sistemic al organismului gazdă la o infecție. Totuși, în multiple situații, la pacienții cu simptome septice nu există semne clinice evidente pentru infecție (de exemplu, culturi bacteriene pozitive în sânge). Această discrepanță a fost mai întâi luată în considerare la o conferință pentru atingerea consensului în a. 1992, când a fost introdus termenul de "sindrom de răspuns inflamator sistemic" (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) și pentru care nu este necesară prezența definitivă a infecției bacteriene (Bone, R.C. et al., *Crit. Care Med* 20: 724-726, 1992). În prezent există o opinie generală, că sepsisul și SIRS sunt însoțite de incapacitatea de a regla răspunsul inflamator. În contextul acestei revizuirii scurte, vom lua în considerare definiția clinică a sepsisului, care include, de asemenea, septicemia severă, șocul septic și SIRS.

Sursa predominantă de infecție la pacienții septici înainte de sfârșitul anilor 1980 era bacteria gram negativă. Se știe că lipopolizaharida (LPS), componenta principală a peretelui celular al bacteriilor gram negative, stimulează eliberarea mediatorilor inflamatori din diferite tipuri de celule și induce simptome infecțioase acute atunci când este injectată la animale (Haeney, M.R. et al., *Antimicrobial Chemotherapy* 41 Suppl A): 41-6, 1998). Este interesant, că spectrul microorganismelor responsabile de dezvoltarea afecțiunii pare să fi trecut de la bacterii predominant gram negative la sfârșitul anilor 1970 și 1980 la bacterii predominant gram pozitive în prezent, din motive care în prezent sunt neclare (Martin, G.S. et al., *N. Eng. Med* 348: 1546-54, 2003).

Numeroase studii au arătat importanța activării complementului în medierea inflamației și contribuția la caracteristicile șocului, în special ale șocului septic și hemoragic. Atât organismele gram negative, cât și cele gram pozitive provoacă șocul septic. LPS este un activator potențial al complementului, predominant prin calea alternativă, deși apare și o activare a căii clasice mediate de anticorpi (Fearon, D.T., et al., *N. Engl. J. Med.*, 292: 937-400, 1975). Componentele principale ale peretelui celular al bacteriilor gram pozitive sunt peptidoglicanul și acidul lipoteichoic, ambele componente fiind activatori puternici ai căii alternative a complementului, deși în prezența anticorpilor specifici pot activa și calea clasică a complementului (Joiner, K.A., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:461-2, 1984).

Sistemul complementului a fost inițial implicat în patogeniza sepsisului, când cercetătorii au observat că anafilatoxinele C3a și C5a mediază o diversitate de reacții inflamatorii, care pot apărea și în timpul sepsisului. Aceste anafilatoxine induc vasodilatație și o creștere a permeabilității microvasculare, evenimente care joacă un rol central în șocul septic (Schumacher, W. A. et al., *Agents Actions* 34: 345-349, 1991). În plus, anafilatoxinele induc bronhospasm, eliberarea histaminei din celulele mastocite și agregarea trombocitelor. Mai mult decât atât, ele exercită numeroase efecte asupra granulocitelor, cum ar fi chemotaxia, agregarea, adeziunea, eliberarea enzimelor lizosomale, generarea de anioni toxici de superoxid și formarea leucotrienelor (Shin, H.S. et al., *Science* 162: 361-363, 1968; Vogt, W., *Complement* 3: 177-86, 1986). Se consideră, că aceste efecte biologice joacă un anumit rol în dezvoltarea complicațiilor sepsisului, cum ar fi șocul sau sindromul de insuficiență respiratoare acută (ARDS) (Hammerschmidt, D.E. et al., *Lancet* 1: 947-949, 1980; Slotman, G.T. et al., *Surgery* 99: 744-50, 1986). Mai mult decât atât, nivelurile înalte de anafilatoxină C3a se asociază cu un rezultat fatal în sepsis (Hack, C.E., et al., *Am. J. Med.*, 86:20-26). În unele modele experimentale de șoc la animale, anumite tulpini cu deficit de complement (de exemplu, cele cu deficit de C5) sunt mai rezistente la acțiunea infuziilor cu LPS (Hseuh, W., et al., *Immunol.* 70:309-14, 1990).

S-a constatat, că blocarea generării C5a cu anticorpi în timpul debutului sepsisului la rozătoare, îmbunătățește foarte mult supraviețuirea (Czermak, B.J., et al., *Nat. Med.*, 5: 788-792, 1999). Constatări similare au fost făcute și atunci când receptorul C5a (C5aR) a fost blocat fie cu anticorpi, fie cu un inhibitor micromolecular (Huber-Lang, M.S. et al., *FASEB J.* 16: 1567-74, 2002; Riedemann, N.C. et al., *J. Clin Invest.* 110: 101-8, 2002). Studiile experimentale anterioare la maimuțe au sugerat, că blocarea cu anticorpi a C5a atenuează șocul septic indus de *E. coli* și sindromul de insuficiență respiratoare la adulți (Hangen, D.H. et al., *J. Surg. Res.* 46: 195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., *J. Clin Invest.*, 77: 1812-16, 1986). La persoanele, care suferă de sepsis, nivelul de C5a s-a dovedit a fi crescut și se asocia cu rate de supraviețuire semnificativ reduse, împreună cu o insuficiență multiorganică, comparativ cu cel al pacienților cu sepsis mai puțin sever și la supraviețuitori (Nakae, H. et al., *Res. Cun. Chem. Pathol. Pharmacol* 84: 189-95, 1994; Nakae et al., *Surg.*, 26, 225-99, 1996; Bengtson, A. et al., *Arch Surg* 123: 645-649, 1988). Mecanismele prin care C5a își exercită efectele nocive în timpul sepsisului trebuie încă investigate

mai detaliat, dar datele recente sugerează că generarea de C5a în timpul sepsisului compromise în mod semnificativ funcțiile imune congenitale ale neutrofililor sanguine (Huber-Lang, M.S. et al., J. Immunol. 169: 3223-31, 2002), capacitatea lor de a exprima o insuficiență respiratorie și capacitatea lor de a genera citokine (Riedemann, N.C. et al., Immunity 19: 193-202, 2003). În plus, generarea C5a în timpul sepsisului pare să aibă efecte procoagulante (Laudes, I.J., et al., Am. J. Pathol., 160: 1867-75, 2002). Proteina CI INH modulatorie de compliment a demonstrat, de asemenea, eficacitate în modelele experimentale pe animale cu sepsis și ARDS (Dickneite, G., Behring Ins. Mitt. 93:299-305, 1993).

Calea lectinei poate avea, de asemenea, un anumit rol în patogenizarea sepsisului. S-a demonstrat, că MBL se poate lega cu o serie de microorganisme importante din punct de vedere clinic, incluzând atât bacterii gram negative, cât și gram pozitive, și pentru a activa calea lectinei (Neth, O., et al., Infect Immun 68: 688, 2000). Acidul lipoteichoic (LTA) este din ce în ce mai mult considerat în calitate de analog gram pozitiv al LPS. El este un imunostimulator puternic, care induce eliberarea de citokine din fagocitele mononucleare și din sângele integral (Morath, S. et al., J. Exp. Med., 195: 1635, 2002; Morath, S. et al., Infect. Immun. 70: 938, 2002). Recent s-a demonstrat, că L-ficolina se leagă în mod specific cu LTA, izolat din numeroase specii de bacterii gram pozitive, incluzând *Staphylococcus Aureus*, și activează calea lectinei (Lynch, N.J., et al., J. Immunol. 172: 1198-02, 2004). De asemenea, s-a arătat că MBL se leagă cu LTA din *Enterococcus Spp* în care lanțul poliglicerofosfat este substituit cu grupe glicozil, dar nu cu LTA de la alte nouă specii, inclusiv *S. Aureus* (Polotsky, V.Y. et al., Infect. Immun. 64: 380, 1996).

Intr-un aspect al invenției se prevede, astfel, o metodă de tratare a sepsisului sau a unei stări care rezultă din sepsis, prin administrarea unei compoziții cuprinzând o cantitate terapeutic eficientă de un agent inhibitor al MASP-2 într-un purtător farmaceutic la un subiect care suferă de sepsis sau de o afecțiune care rezultă din sepsis incluzând, fără limitare, sepsisul sever, șocul septic, sindromul de insuficiență respiratorie acută, care rezultă din sepsis, și sindromul de răspuns inflamator sistemic. Metodele asociate sunt prevăzute pentru tratamentul altor afecțiuni ale sângelui, inclusiv al șocului hemoragic, anemiei hemolitice, purpurii trombotice trombocitopenice autoimune (TTP), sindromului hemolitic uremic (HUS), sindromului hemolitic uremic atipic (aHUS) sau al altor afecțiuni distructive ale măduvei osoase/sângelui, prin administrarea unei compoziții cuprinzând o cantitate terapeutic eficientă de un agent inhibitor al MASP-2 într-un purtător farmaceutic la un subiect care suferă de o astfel de afecțiune. Agentul inhibitor al MASP-2 se administrează subiectului sistemic, cum ar fi prin administrare intra-arterială, intravenoasă, intramusculară, inhalatorie (în special în cazul ARDS), administrare subcutanată sau altă administrare parenterală sau potențial prin administrare orală pentru agenți nepeptidici. Compoziția de agent inhibitor al MASP-2 poate fi combinată cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari pentru combaterea sechelelor de sepsis și/sau șocului. Pentru septicemia avansată sau șoc, sau starea de stres care rezultă din aceasta, compoziția inhibitoare a MASP-2 se poate administra în mod adecvat într-o formă de dozare cu acțiune rapidă, cum ar fi prin administrarea intravenoasă sau intraarterială a unui bolus de soluție conținând compoziția de agent inhibitor al MASP-2. Administrarea repetată poate fi efectuată la indicația unui medic până la rezolvarea situației.

COAGULOPATII

Au fost relevate dovezi privind rolul sistemului complementului în coagularea intravasculară diseminată (DIC), cum ar fi DIC secundară în traumatismele majore corporale.

Studiile anterioare au arătat, că șoarecii C4-/- nu sunt protejați împotriva leziunilor de reperfuzie renale. (Zhou, W. et al., "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury", J Clin Invest 105: 1363-1371 (2000)). Pentru a investiga abilitatea șoarecilor C4-/- de a activa complementul fie prin calea clasică, fie prin calea lectinei, a fost măsurată trecerea C3 în C4-/- în plasmă în teste specifice fie pentru calea clasică, fie pentru calea de activare a lectinei. Deși nu s-a observat scindarea C3, când s-a declanșat activarea prin calea clasică, s-a observat o activare dependentă de calea lectinei foarte eficientă a C3 în serul deficient de C4 (fig. 30). Se poate observa că depunerea C3b pe manan și zimosan este sever compromisă la șoarecii MASP-2-/-, chiar și în condiții experimentale, ceea ce, conform numeroaselor lucrări publicate anterior despre activarea căii alternative, ar trebui să fie permisivă pentru toate cele trei căi. Atunci când se utilizează același ser în godeurile acoperite cu complecși de imunoglobulină în loc de manan sau zimosan, depunerile de C3b și scindarea factorului B se observă în serurile de la șoareci MASP-2+/+ și în serurile de la șoarecii MASP-2-/-, dar nu în seruri cu depleția C1q. Aceasta indică că activarea căii alternative este facilitată în serul MASP-2-/-, când C3b inițial este furnizat prin

activitate clasică. Fig. 30C ilustrează constatarea surprinzătoare, că C3 în plasmă cu deficit de C4 poate fi activat în mod eficient într-o manieră dependentă de calea lectinei.

Această "cale de ocolire a activării C4" este eliminată prin inhibarea activării căii lectinei prin preincubarea plasmei cu manan sau manoză solubilă.

- 5 Activarea aberantă, non-imună, a sistemului complementului este potențial periculoasă pentru om și poate juca, de asemenea, un rol important în activarea căii hematologice, în special, în situații de traumatism sever, în care se activează atât căile inflamatorii, cât și cele hematologice. În condiții normale de sănătate, conversia C3 constituie <5% din proteina C3 totală plasmatică. În cazul unei infecții severe răspândite, inclusiv în septicemie și boala complexului imun, conversia C3 se restabilește până la aproximativ 30%, nivelurile complementului fiind frecvent mai reduse, decât în mod obișnuit, datorită creșterii utilizării și modificărilor în distribuția rezervelor. Activarea imediată a căii C3, depășind 30%, generează de obicei dovezi clinice evidente privind vasodilatația și pierderea lichidelor în țesuturi. La o conversie C3 depășind 30% mecanismele de inițiere sunt predominant neimune și manifestările clinice rezultate sunt nocive pentru pacient.
- 15 Nivelurile de complement C5 în starea de sănătate și în boala controlată apar mult mai stabile, decât C3. Reduceri semnificative ale nivelurilor și/sau de conversie a C5 se asociază cu răspunsul pacientului la politrauma atipică (de exemplu, accidente de trafic rutier) și dezvoltarea probabilă a sindroamelor de plămân de șoc. Astfel, orice dovezi de activare a complementului C3 peste 30% din rezervele vasculare sau de orice implicare a C5 sau a ambelor pot fi considerate a fi probabil un predictor al unei modificări patologice nocive la pacient.

- 20 Ambele C3 și C5 eliberează anafilatoxine (C3a și C5a), care acționează asupra celulelor mastocite și bazofilelor, care eliberează substanțe chimice vasodilatatoare. S-au stabilit gradienti chemotactici pentru ghidarea celulelor polimorfonucleare (PMN) în centrul tulburărilor imunologice (un răspuns benefic), dar aici se deosebesc deoarece C5a are un efect specific de aglomerare (agregare) asupra acestor celule fagocitare, prevenind deplasarea lor aleatorie departe de locul de reacție. Într-un control normal al infecției, C3 activează C5. Cu toate acestea, în politrauma C5 pare a fi activat semnificativ, generând anafilatoxine C5a sistemic. Această activitate necontrolată determină ca polimorfele să se acumuleze în sistemul vascular, iar aceste aglomerări sunt apoi introduse în capilarele plămânilor, pe care le blochează și ca urmare a eliberării superoxidului generează efecte locale dăunătoare. Deși, nu se dorește limitarea prin teorie, mecanismul probabil este important în patogeniza sindromului de insuficiență respiratoare acută (ARDS), deși această opinie a fost recent exprimată. Anafilatoxinele C3a in vitro s-au dovedit a fi agenți puternici de agregare parchetară, dar implicarea lor in vivo este mai puțin definită, iar eliberarea substanțelor plachetare și plasminei în reparația plăgii poate implica numai secundar complementul C3. Este posibil ca elevarea prelungită a activării C3 să fie necesară pentru a genera DIC.

- Adițional la efectele celulare și vasculare ale componentei complementului activat, descris mai sus, care ar putea explica legătura dintre traumă și DIC, descoperirile științifice emergente au identificat legături moleculare directe și interacțiuni funcționale între complement și sistemele de coagulare. Datele de susținere au fost obținute pe baza studiilor efectuate la șoarecii cu deficit de C3. Deoarece C3 este componenta generală pentru fiecare dintre căile complementului, se presupune că șoarecii cu deficit de C3 nu au toate funcțiile complementului. Surprinzător, totuși, șoarecii cu deficit de C3 sunt perfect capabili să activeze componentele terminale ale complementului. (Huber-Lang, M. et al., "Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway", Nat. Med 12: 682-687 (2006)). Studiile aprofundate au arătat că activarea independentă de C3 a componentelor terminale ale complementului este mediată de trombină, enzima care limitează viteza cascadei de coagulare. (Huber et al., 2006) Componentele moleculare, care mediază activarea trombinei în urma activării complementului inițial, rămân imperceptibile.

- 50 Prezenta invenție a elucidat ceea ce se crede a fi baza moleculară a interacțiunii între cascadele complementului și de coagulare și a identificat MASP-2 ca punct de control central, care leagă cele două sisteme. Studiile biochimice privind specificitatea substratului MASP-2 au identificat protrombina ca un posibil substrat, adițional la bine cunoscutele proteine complementare C2 și C4. MASP-2 scindează în mod specific protrombina în locurile relevante funcțional, generând trombină, enzima care limitează viteza cascadei de coagulare. (Krarup, A. et al., "Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2" PLoS. ONE. 2: e623 (2007)) Trombina, generată de MASP-2, este abilă să promoveze depunerea fibrinei într-un anumit sistem reconstituit in vitro, care demonstrează relevanța funcțională a scindării MASP-2. (Krarup et al., 2007). Cum se discută în exemplele prezentate în continuare, inventatorii au

confirmat în continuare semnificația fiziologică a acestei descoperiri prin documentarea activării trombinei în serul normal de rozătoare după activarea căii lectinei și au demonstrat că acest proces este blocat prin neutralizarea MASP-2 cu anticorpi monoclonali.

5 MASP-2 poate reprezenta un punct de ramificație central în calea lectinei, abil să promoveze activarea atât a sistemului complementului, cât și a sistemelor de coagulare. Deoarece activarea
căii lectinei este un răspuns fiziologic la multe tipuri de leziuni traumatiche, inventatorii consideră
că inflamația sistemică concurentă (mediată de componentele complementului) și coagularea
diseminată (mediată prin calea de coagulare) poate fi explicată prin capacitatea MASP-2 de a
10 activa ambele căi. Aceste descoperiri sugerează în mod clar rolul MASP-2 în generarea DIC și
beneficiul terapeutic al inhibării MASP-2 în tratarea sau prevenirea DIC. MASP-2 poate asigura
legătura moleculară între complement și sistemul de coagulare și activarea căii lectinei, în
condițiile unui traumatism poate iniția direct activarea sistemului de coagulare prin axa MASP-2-
trombină, asigurând mecanismul de legătură între traumatism și DIC. În conformitate cu un aspect
al prezentei invenții, inhibarea MASP-2 ar inhiba activarea căii lectinei și ar reduce generarea
15 ambelor anafilatoxine C3a și C5a. Pentru a genera DIC se crede că este necesară amplificarea de
lungă durată a activării C3.

Coagularea microcirculatorie (trombi în capilare și în vasele mici de sânge) are loc în așa stări,
cum ar fi șocul septic. S-a constatat rolul căii lectinei în șocul septic, evidențiat cu fenotipul
protejat în modelele experimentale de sepsis cu șoareci MASP-2 (-/-), descrise în Exemplul 17 și
20 fig. 18 și 19. Mai mult decât atât, cum s-a demonstrat în exemplul 15 și fig. 16A și 16B, șoarecii
MASP-2 (-/-) sunt protejați în modelul experimental de reacție Schwartzman localizată de
coagulare intravasculară diseminată (DIC), un model de coagulare microvasculară localizată.

V. AGENȚII INHIBITORI AI MASP-2

Intr-un aspect prezenta invenție prevede metode inhibare a activării complementului
25 dependente de MASP2 la un subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei
microangiopatii trombotice. Agenții inhibitori ai MASP-2 se administrează într-o cantitate
eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2 la un subiect viu. În
practica acestui aspect al invenției, agenții inhibitori ai MASP 2 includ: molecule care inhibă
30 activitatea biologică a MASP-2 (cum ar fi inhibitori micromoleculari, anticorpi anti-MASP-2 sau
peptide blocante, care interacționează cu MASP-2 sau care interferează cu o interacțiune proteină-
proteină) și molecule care reduc expresia MASP-2 (cum ar fi moleculele de acid nucleic MASP-2
antisens, moleculele de ARNi specifice MASP-2 și ribozimele MASP-2), prevenind, astfel,
activarea căii lectinei a complementului de către MASP-2. Agenții inhibitori ai MASP-2 pot fi
utilizați sub formă de monoterapie ca terapie primară sau în combinație cu alte terapii, cum ar fi
35 terapia adjuvantă, pentru a spori beneficiile terapeutice ale altor tratamente medicale.

Inhibarea activării complementului dependente de MASP 2 se caracterizează prin cel puțin de
una din următoarele modificări într-o componentă a sistemului complementului, care apare ca
urmare a administrării unui agent inhibitor al MASP-2 în conformitate cu metodele prezentei
invenții: inhibarea generării sau producerii produselor sistemului de activare a complementului
40 dependentă de MASP-2: C4b, C3a, C5a și/sau C5b9 (MAC) (măsurate, de exemplu, cum se
descrie în Exemplul 2), reducerea activării complementului evaluată într-un test hemolitic
utilizând hematii nesensibilizate de iepure și cobai (măsurată, de exemplu, cum se descrie în
Exemplul 33), reducerea scindării C4 și a depunerii C4b (măsurată, de exemplu, cum se descrie în
Exemplul 2) sau reducerea scindării C3 și depunerii C3b (măsurată, de exemplu, cum se descrie în
45 Exemplul 2).

Conform prezentei invenții, se utilizează agenți inhibitori ai MASP-2, eficienți în inhibarea
sistemului de activare a complementului dependentă de MASP-2. Agenții inhibitori ai MASP-2,
utili în practica acestui aspect al invenției, includ, de exemplu, anticorpi anti-MASP-2 și fragmente
ale acestora, peptide inhibitoare a MASP-2, substanțe micromoleculare, receptori solubili
50 pentru MASP-2 și inhibitori de expresie. Agenții inhibitori ai MASP-2 pot inhiba sistemul de
activare a complementului dependentă de MASP-2 prin blocarea funcției biologice a MASP-2. De
exemplu, un agent inhibitor poate bloca eficient interacțiunile proteină-proteină MASP-2, interfere
cu dimerizarea sau asamblarea MASP-2, blochează legarea Ca^{2+} , interferează cu situsul activ al
serin proteazei MASP-2 sau poate reduce expresia proteinei MASP-2.

55 În unele variante de realizare agenții inhibitori ai MASP 2 inhibă selectiv activarea
complementului de MASP-2, menținând sistemul de activare a complementului dependent de C1q
funcțional intact.

Intr-o variantă de realizare un agent inhibitor al MASP-2, util în metodele prezentei invenții,
este un agent inhibitor specific al MASP-2, care se leagă specific la o polipeptidă cuprinzând

SECV ID NR: 6 cu o afinitate cel puțin de zece ori mai mare, decât la alte antigene din sistem complementului. Intr-o altă variantă de realizare un agent inhibitor al MASP-2 se leagă în mod specific la o polipeptidă cuprinzând SECV ID NR: 6 cu o afinitate de legare cel puțin de 100 ori mai mare, decât la alte antigene din sistemul complementului. Afinitatea de legare a agentului inhibitor al MASP-2 poate fi determinată utilizând un test de legare potrivit.

Polipeptida MASP-2 reprezintă o structură moleculară similară cu MASP-1, MASP-3 și C1r și C1s proteazelor sistemului complementului C1. Molecula de ADNc, prezentă în SECV ID NR: 4, codifică un exemplu reprezentativ de MASP-2 (care constă din secvența de aminoacizi prezentă în SECV ID NR: 5) și furnizează polipeptidă MASP-2 umană cu o secvență lider (aa 15), care este scindată după secreție, rezultând cu forma matură de MASP-2 umană (SECV ID NR: 6). După cum se arată în fig. 2, gena MASP-2 umană cuprinde doisprezece exoni. ADNc MASP-2 uman este codificat de exonii B, C, D, F, G, H, I, J, K și L. O îmbinare alternativă are drept rezultat o proteină de 20 kDa denumită proteină 19 asociată cu MBL ("MAp19" referindu-se, de asemenea, la "sMAP") (SECV ID NR: 2), codificată de SECV ID NR: 1, care rezultă din exonii B, C, D și E, cum se arată în fig. 2. Molecula de ADNc, descrisă în SECV ID NR: 50, codifică MASP-2 murină (constând din secvența de aminoacizi prezentă în SECV ID NR: 51) și furnizează polipeptida MASP-2 murină cu o secvență lider, care este scindată după secreție, rezultând cu forma matură a MASP-2 murină (SECV ID NR: 52). Molecula de ADNc, descrisă în SECV ID NR: 53, codifică MASP-2 de șobolan (constând din secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 54) și furnizează polipeptida MASP-2 de șobolan cu o secvență lider, care este scindată după secreție, rezultând cu forma matură a MASP-2 de șobolan (SECV ID NR: 55).

Specialiștii în domeniu vor recunoaște, că secvențele descrise în SECV ID NR: 4, SECV ID NR: 50 și SECV ID NR: 53 reprezintă alele singulare ale MASP-2 umană, murină și de șobolan, respectiv, și că se așteaptă să apară variația alelică și splicingul alternativ. Variantele alele ale secvențelor nucleotidice, arătate în SECV ID NR: 4, SECV ID NR: 50 și SECV ID NR: 53, incluzând cele care conțin mutații silențioase și cele în care mutațiile duc la modificări ale secvenței de aminoacizi, se includ în scopul prezentei invenții. Variantele alelice ale secvenței MASP-2 pot fi clonate cu ADNc de sondare sau din bibliotecile genomice de la indivizi diferiți, conform procedurilor standard.

Domeniile proteinei MASP-2 umane (SECV ID NR: 6) sunt prezentate în fig. 1 și 2A și includ un domeniu N terminal C1r/C1s/factorului de creștere al endoteliului vaselor (Vegf) al ariciului de mare/proteinei morfogenogene osoase (CUBI) (aa1-121 din SECV ID NR: 6), un domeniu asemănător factorului de creștere epidermal (aa 122-166), un domeniu CUBI secund (aa 167-293), precum și un tandem al domeniilor proteinei de control al activității complementului și domeniului serin proteazei. Splicingul alternativ al genei MASP-2 rezultă cu MAp19, prezentată în fig. 1. MAp19 este o proteină neenzimatică, care conține regiunea N terminală CUBI-EGF a MASP-2 cu patru reziduuri adiționale (EQSL), derivate din exonul E, cum se arată în fig. 1.

S-a arătat că mai multe proteine se leagă sau interacționează cu MASP-2 prin interacțiunile dintre proteină și proteină. De exemplu, este cunoscut faptul că MASP-2 se leagă, formând complexe dependente de Ca^{2+} , cu proteinele lectinei MBL, H-ficolină și L-ficolină. S-a demonstrat, că fiecare complex MASP-2/lectină activează complementul prin scindarea dependentă de MASP-2 a proteinelor C4 și C2 (Ikeda, K. et al., J. Biol Chem., 262: 7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp., Med., 176: 1497-2284, 2000; Matsushita, M. et al., J. Immunol., 168: 3502-3506, 2002). Studiile au arătat, că domeniile CUBI-EGF ale MASP-2 sunt esențiale pentru asocierea MASP-2 cu MBL (Thielens, N. M. et al., J. Immunol., 166: 5068, 2001). S-a demonstrat, de asemenea, că domeniile CUBI-EGF-CUBII mediază dimerizarea MASP-2, care este necesară pentru formarea unui complex MBL activ (Wallis, R. et al., J. Biol.Chem., 275: 30962-30969, 2000). Prin urmare, pot fi identificați agenți inhibitori ai MASP-2, care se leagă sau interferează cu regiunile țintă ale MASP-2, cunoscute a fi importante pentru activarea complementului dependentă de MASP-2.

ANTICORPII ANTI-MASP-2

În unele variante de realizare ale acestui aspect al invenției agentul inhibitor al MASP-2 cuprinde un anticorp anti-MASP-2, care inhibă sistemul de activare a complementului dependentă de MASP-2. Anticorpii anti-MASP-2, utili în acest aspect al invenției, includ anticorpi policlonali, monoclonali sau recombinanți, derivați de la orice mamifer producător de anticorpi și pot fi anticorpi multispecifici, himerici, umanizați, anti-idiotip și fragmente de anticorpi. Fragmentele de anticorpi includ: Fab, Fab', F(ab)², F(ab')², fragmente Fv, fragmente scFv și anticorpi cu un singur lanț, cum se descriu în continuare.

În literatura de specialitate au fost descriși mai mulți anticorpi anti-MASP-2, dintre care unii sunt enumerați în continuare în Tabelul 1. Acești anticorpi anti-MASP-2, descriși anterior, pot fi analizați pentru abilitatea lor de a inhiba sistemul de activare a complementului dependentă de MASP-2, folosind testele descrise aici. De exemplu, au fost identificați anticorpi Fab2 anti-MASP-2 de șobolan, care blochează activarea completă a complementului dependentă de MASP-2, cum este descris mai detaliat în Exemplele 10 și 11 în continuare. După ce un anticorp anti-MASP-2 este identificat ca funcționând ca agent inhibitor al MASP-2, el poate fi utilizat pentru a produce anticorpi anti-idiotip și pentru a identifica alte molecule de legare MASP-2, cum se descrie în continuare.

10 ANTICORPI SPECIFICI MASP-2, DESCRIȘI ÎN LITERATURA DE SPECIALITATE
Tabelul 1

ANTIGEN	TIPUL DE ANTICORP	REFERINȚĂ
Recombinant MASP-2	Policlonal de șobolan	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
Recombinant uman CCP1/2-SP fragment (MoAb 8B5)	MoAb de șobolan (subclasa IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Metode</i> 282:159-167, 2003
Recombinant uman MAp19 (MoAb 6G12) (reacții încrucișate cu MASP-2)	MoAb de șobolan (subclasa IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Metode</i> 282:159-167, 2003
hMASP-2	MoAb (S/P) murin MoAb (N-term) murin	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 35:409, April 1998
hMASP-2 (domeniul CCP1-CCP2-SP)	MoAb murin: Nimoab101, produs de celulele liniei de hibridom 03050904 (ECACC)	WO 2004/106384
hMASP-2 (în lungime completă-marcată cu histidină)	MoAbs murin: NimoAb104, produs de celulele liniei de hibridom M0545YM035 (DSMZ) NimoAb108, produs de celulele liniei de hibridom M0545YM029 (DSMZ) NimoAb109 produs de celulele liniei de hibridom M0545YM046 (DSMZ) NimoAb110 produs de celulele liniei de hibridom M0545YM048 (DSMZ)	WO 2004/106384

ANTICORPI ANTI-MASP-2 CU FUNCȚIE EFECTOARE REDUSĂ

În unele variante ale acestui aspect al invenției anticorpilor anti-MASP-2 au funcție efectoare redusă în ceea ce privește reducerea inflamației, care poate să apară din activarea complementului pe calea clasică. Abilitatea moleculelor IgG de a declanșa calea clasică a complementului s-a dovedit a fi localizată în porțiunea internă Fc a moleculei (Duncan, A. R. et al., *Nature* 332: 738-740 1988). Moleculele IgG, în care porțiunea Fc a moleculei a fost îndepărtată prin scindare enzimatică, sunt lipsite de această funcție efectoare (Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). În consecință, anticorpilor cu funcție efectoare redusă pot fi generați ca urmare a lipsei porțiunii Fc a moleculei, datorită prezenței secvenței Fc construite genetic, care minimizează funcția efectoare sau care este fie izotip IgG2, sau IgG4 uman.

25 Anticorpilor cu funcție efectoare redusă pot fi produși prin manipularea biologică moleculară standard a porțiunii Fc a lanțurilor grele IgG, cum se descrie în Exemplul 9 din prezenta descriere și, de asemenea, cum descriu Jolliffe et al., *Int'l Rev. Immunol.* 10: 241-250, 1993 și Rodrigues et

- al., J. Immunol. 151: 6954-6961, 1998. Anticorpii cu funcție efectoare redusă includ, de asemenea, izotipurile IgG2 și IgG4 umane, care au o abilitate redusă de a activa complementul și/sau de a interacționa cu receptorii Fc (Ravetch, J.V. et al., Annu. Rev. Immunol., 9: 457-492, 1991; Isaacs, J.D. et al., J. Immunol., 148: 3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G. et al., Immunol., Today 14: 215-221, 1993). Anticorpii umanizați sau complet umani specifici pentru MASP-2 umană, conținând izotipuri IgG2 sau IgG4, pot fi produși prin una sau mai multe metode cunoscute unui specialist în domeniu, cum se descrie de Vaughan, T.J. et al., Nature Biotechnical 16: 535-539, 1998.

PRODUCEREA ANTICORPILOR ANTI-MASP-2

- Anticorpii anti-Masp-2 pot fi produși folosind polipeptide Masp-2 (de exemplu, Masp-2 cu lungime completă) sau folosind peptide antigenice purtătoare de epitop Masp-2 (de exemplu, o porțiune a polipeptidei MASP-2). Peptidele imunogene pot avea dimensiuni în limitele a cinci reziduuri de aminoacizi. De exemplu, polipeptida MASP-2, incluzând întreaga secvență de aminoacizi a SEQ ID NO: 6, poate fi folosită pentru a induce anticorpi anti-Masp-2, utili în metoda prezentei invenții. Domeniile Masp-2 concrete, cunoscute a fi implicate în interacțiunile proteină-proteină, cum ar fi domeniile CUBI și CUBIEGF, precum și regiunea care cuprinde situsul activ de serin protează, pot fi exprimate ca polipeptide recombinante, cum se descrie în Exemplul 3 și utilizate ca antigene. În plus, peptidele care cuprind o porțiune cel puțin de 6 aminoacizi ai polipeptidei MASP-2 (SEQ ID NO: 6) sunt, de asemenea, utile pentru a induce anticorpi MASP-2. Exemple suplimentare de antigene derivate MASP-2, utile pentru a induce anticorpi MASP-2, sunt prezentate în continuare în Tabelul 2. Peptidele și polipeptidele MASP-2, utilizate pentru a produce anticorpi, pot fi izolate ca polipeptide naturale sau peptide recombinante sau sintetice și polipeptide recombinante catalitic inactive, cum ar fi MASP-2A, cum se descrie în continuare în Exemplele 5, 7. În unele variante de realizare ale acestui aspect al invenției anticorpii anti-MASP-2 se obțin utilizând o tulpină de șoarece transgenic, cum se descrie în Exemplele 8 și 9 și sunt prezentate în continuare.

- Antigenele utile pentru producerea anticorpilor anti-MASP-2 includ, de asemenea, polipeptide recombinante, cum ar fi recombinante MASP-2 sau o porțiune a acestora cu o polipeptidă de imunoglobulină sau cu o proteină fixatoare de maltoză. Imunogenul polipeptidic poate fi o moleculă cu lungime completă sau o porțiune din aceasta. Dacă porțiunea de polipeptidă este asemănătoare cu o haptенă, o astfel de porțiune poate fi în mod avantajos cuplată sau legată de un purtător macromolecular (cum ar fi hemocianina limfatică (KLH), albumina serică bovină (BSA) sau toxina tetanică) pentru imunizare.

ANTIGENE DERIVATE DIN MASP-2

Tabelul 2

SEQ ID NO:	Secvența Amino Acidă
SEQ ID NO:6	Proteina MASP-2 umană
SEQ ID NO:51	Proteina MASP-2 murină
SEQ ID NO:8	Domeniul CUBI al MASP-2 umană (aa 1-121 din SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	Domeniile CUBIEGF ale MASP-2 umană (aa 1-166 din SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	Domeniile CUBIEGFCUBII ale MASP-2 umană (aa 1-293 din SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	Domeniul EGF al MASP-2 uman (aa 122-166 din SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:12	Domeniul serin-proteazei al MASP-2 umană (aa 429-671 din SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:13	GKDSCRGDAGGALVFL forma mutantă inactivată de serin-protează (aa 610-625 din SEQ ID NO:6 cu mutația Ser 618)
SEQ ID NO:14	TPLGPKWPEPVFGRL peptida CUBI umană
SEQ ID NO:15:	TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATL CGQ peptida CUBI umană
SEQ ID NO:16:	TFRSDYSN MBL regiunea de legare în domeniul CUBI uman
SEQ ID NO:17:	FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF MBL regiunea de legare în domeniul CUBI uman

SEQ ID NO:	Secvența Amino Acidă
SEQ ID NO:18	IDECQVAPG EGF peptidă
SEQ ID NO:19	ANMLCAGLESGGKDSRGDSGGALV peptida din situsul serin-proteazei active

ANTICORPI POLICLONALI

Anticorpul policlonal împotriva MASP-2 se poate prepara prin imunizarea unui animal cu polipeptidă MASP-2 sau cu o porțiune imunogenă utilizând metode bine cunoscute specialiștilor în domeniu. De exemplu, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera," in *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), pagina 105 și cum se descrie în continuare în Exemplul 6. Imunogenitatea unei polipeptide MASP-2 poate fi crescută prin utilizarea unui adjuvant, incluzând geluri minerale, cum ar fi hidroxidul de aluminiu sau adjuvantul Freund (complet sau incomplet), substanțe active de suprafață, cum ar fi lizolecitină, polioli polietilenpolipropilenoxid, polianioni, emulsii uleioase, hemocianină de melci și dinitrofenol. Nivelurile de anticorpi policlonați sunt, de obicei, mai înalte la animale, cum ar fi cai, vaci, câini, pui, șobolani, șoareci, iepuri, porci de guineea, capre sau oi. În mod alternativ, un anticorp anti-MASP-2, util în prezenta invenție, poate fi, de asemenea, derivat de la un primat subuman. Tehnicile generale pentru creșterea anticorpilor folositori în scopuri diagnostice și terapeutice la babuini sunt descrise, de exemplu, de Goldenberg et al., WO 91/11465 și de Losman, M.J., et al., *Int. J. Cancer* 46: 310, 1990. Serurile, care conțin anticorpi imunologic activi, sunt apoi produse din sângele animalelor astfel imunizate, folosind proceduri standard bine cunoscute în domeniu.

ANTICORPI MONOCLONALI

În unele variante de realizare agentul inhibitor al MASP-2 este un anticorp monoclonal anti-MASP-2. Anticorpul monoclonal anti-MASP-2 este foarte specific, fiind îndreptat împotriva unui singur epitop MASP-2. Așa cum este utilizat aici termenul „monoclonal” indică caracterul anticorpului, ca fiind obținut dintr-o populație substanțial omogenă de anticorpi și nu trebuie interpretat ca necesitând producție de anticorpi prin orice metodă particulară. Anticorpul monoclonal pot fi obținuți utilizând orice tehnică, care asigură producerea de molecule de anticorpi pe linii celulare continue în cultură, cum ar fi metoda hibridomului, descrisă de Kohler, G., et al., *Nature* 256 : 495, 1975, sau pot fi realizate prin metode ADN recombinant (de exemplu, US 4816567, Cabilly). Anticorpul monoclonal pot fi, de asemenea, izolați din bibliotecile de anticorpi de fagi, folosind tehnicile descrise de Clackson, T., et al., *Nature* 352: 624- 628, 1991, și Marks, J. D., et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1991. Astfel de anticorpi pot fi din orice clasă de imunoglobuline, incluzând IgG, IgM, IgE, IgA, IgD și orice subclasă a acestora.

De exemplu, anticorpul monoclonal pot fi obținuți prin injectarea la un mamifer potrivit (de exemplu, un șoarece BALB/c) a unei compoziții, care conține o polipeptidă MASP-2 sau o porțiune a acesteia. După o perioadă predeterminată de timp, de la șoarece se prelevă splenocitele și se suspendă într-un mediu de cultură celulară. Splenocitele apoi se hibridizează cu o linie de celule imortalizate pentru a forma un hibridom. Hibridoamele formate sunt crescute în culturi de celule și se testează abilitatea lor de a produce un anticorp monoclonal împotriva MASP-2. Un exemplu, care descrie în continuare producerea de anticorpi monoclonali anti-MASP-2 este prezentat în Exemplul 7. (A se vedea, de asemenea, și *Current Protocols in Immunology*, vol. 1., John Wiley & Sons, paginile 2.5.1-2.6.7, 1991.)

Anticorpul monoclonal uman se poate obține prin utilizarea șoarecilor transgenici, proiectați pentru a produce anticorpi umani specifici ca răspuns la provocarea antigenică. În această tehnică elementele locilor lanțului ușor și greu de imunoglobulină umană se introduc în tulpini de șoareci, derivate de la liniile de celule stem embrionare, care conțin perturbări țintite ale locilor lanțului greu și lanțului ușor de imunoglobulină endogenă. Șoarecii transgenici pot sintetiza anticorpi umani specifici pentru antigene umane, cum ar fi antigene MASP-2, descrise aici, și șoarecii pot fi utilizați pentru a produce anticorpul MASP-2 uman secretor de hibridoame prin hibridizarea celulelor B de la aceste animale cu liniile de celule de mielom potrivite folosind tehnologia Kohler-Milstein, ca cea descrisă în continuare în Exemplul 7. Șoarecii transgenici cu un genom de imunoglobulină umană sunt comercial disponibili (de exemplu, de la Abgenix, Inc., Fremont, CA și Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Metode obținere a anticorpilor umani de la șoareci transgenici sunt descrise, de exemplu, de Green, L. L., et al., *Nature Genet.* 7:13, 1994; Lonberg, N. et al., *Nature* 368: 856, 1994 și Taylor, L. D. et al., *Int. Immun.* 6: 579, 1994.

Anticorpul monoclonal pot fi izolați și purificați din culturile de hibridom printr-o varietate de tehnici bine stabilite. Astfel de tehnici de izolare includ cromatografia de afinitate cu proteină A pe Sefaroză, cromatografia cu excludere dimensională și cromatografia de schimb ionic (de exemplu,

Coligan la paginile 2.7.1-2.7.12 și paginile 2.9.1-2.9.3; Baines et al, „Purification of Immunoglobulin G (IgG)”, in Metode in Molecular Biology, The Humana Press, Inc., Vol. 10, pag. 79-104, 1992).

După obținere anticorpilor policlonali, monoclonali sau anticorpilor derivați din fagi sunt mai întâi testați pentru legarea specifică cu MASP-2. O diversitate de teste, cunoscute specialiștilor în domeniu, se pot utiliza pentru detectarea anticorpilor, care se leagă în mod specific cu MASP-2. Exemplele de teste includ Western blot sau analiza de imunoprecipitare prin metode standard (de exemplu, cum se descrie de Ausubel al.), imuno-electroforeza, testele de imunosorbție cu marcarea enzimică, dot blot, testele de inhibare sau de concurență și testele de tip sandwich (cum se descrie de Harlow and Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). După identificarea anticorpilor, care se leagă în mod specific cu MASP-2, se testează abilitatea anticorpilor anti-MASP-2 de a funcționa ca agent inhibitor al MASP-2 într-unul dintre multitudinea testelor, cum ar fi, de exemplu, testul de scindare C4 lectin-specifică (descriș în Exemplul 2) și testul de depunere a C3b (descriș în Exemplul 2) sau un test de depunere a C4b (descriș în Exemplul 2).

Afinitatea anticorpilor monoclonali anti-MASP-2 poate fi determinată de un specialist în domeniu (de exemplu, Scatchard, A., NY Acad., Sci., 51: 660-672, 1949). Într-o variantă de realizare anticorpilor monoclonali anti-MASP-2, utili în metodele prezentei invenții, se leagă cu MASP-2 cu o afinitate de legare <100 nM, de preferință <10 nM și cel mai preferabil <2 nM. În unele variante de realizare anticorpul monoclonal inhibitor al MASP-2, util în metodele prezentei invenții, este un anticorp monoclonal inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare a antigenului, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) Lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acestuia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR: 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70).

ANTICORPI HIMERICI/UMANIZAȚI

Anticorpilor monoclonali, utili în metoda prezentei invenții, includ anticorpi himerici în care o porțiune din lanțul greu și/sau ușor este identică sau omoloagă cu secvențele corespunzătoare din anticorpilor derivați dintr-o specie particulară sau dintr-o anumită clasă sau subclasă de anticorpi, în timp ce restul lanțului (lanțurilor) este identic sau omolog cu secvențele corespunzătoare din anticorpilor derivați dintr-o altă specie sau dintr-o altă clasă sau subclasă de anticorpi, precum și fragmente de astfel de anticorpi (US 4816567, Cabilly; Morrison, S.L. et al., Proc., Nat'l Acad. Sci., USA 81: 6851-6855, 1984).

O formă de anticorp himeric, util în prezenta invenție, este un anticorp monoclonal umanizat anti-MASP-2. Formele umanizate de anticorpi non-umani (de exemplu, murini) reprezintă anticorpi himerici, care conțin secvențe minime derivate din imunoglobulină non-umană. Anticorpilor monoclonali umanizați se produc prin transferarea regiunilor determinante de complementaritate non-umane (de exemplu, de șoarece) din domeniile variabile ale lanțurilor grele și ușoare ale imunoglobulinei murine într-un domeniu variabil uman. De obicei, reziduurile de anticorpi umani sunt apoi substituite în regiunile cadru ale omologilor non-umani. Mai mult decât atât, anticorpilor umanizați pot conține reziduuri, care nu se găsesc în anticorpul receptor sau în anticorpul donator. În general, anticorpul umanizat va cuprinde în esență toate, cel puțin, unul și, de obicei, două domenii variabile, în care toate sau practic toate fragmentele hipervariabile de ansă corespund fragmentelor hipervariabile de ansă ale unei imunoglobuline non-umane și toate sau aproape toate regiunile de cadru Fv sunt regiuni de cadru Fv ale secvenței de imunoglobulină umană. Anticorpul umanizat opțional va conține, de asemenea, cel puțin de o porțiune dintr-o regiune constantă de imunoglobulină (Fc), care de regulă este parte a imunoglobulinei umane. Pentru mai multe detalii - Jones, P.T., et al., Nature 321: 522-525, 1986; Reichmann, L. et al., Nature 332: 323-329, 1988 și Presta, Curr. Opin. Struct. Biol. 2: 593-596, 1992.

Anticorpul umanizat, util în prezenta invenție, includ anticorpi monoclonali umani incluzând cel puțin de o regiune CDR3 care leagă MASP-2. În plus, porțiunile Fc pot fi înlocuite astfel încât să producă IgA sau IgM, precum și anticorpi IgG umani. Astfel de anticorpi umanizați vor avea o utilitate clinică deosebită deoarece vor recunoaște în mod specific MASP-2 umană, dar nu vor evoca un răspuns imun la oameni împotriva anticorpului în sine. În consecință, ele sunt mai potrivite pentru administrarea in vivo la oameni, în special atunci când este necesară administrarea repetată sau pe termen lung.

Un exemplu de generare a unui anticorp umanizat anti-MASP-2 dintr-un anticorp monoclonal anti-MASP-2 murin este prezentat aici în Exemplul 6. Tehnicile de producere a anticorpilor monoclonali umanizați sunt, de asemenea, descrise în literatura de specialitate, de exemplu, Jones, P.T. et al., *Nature* 321: 522, 1986; Carter, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285, 1992; Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437, 1992; Singer, I.I., et al., *J. Immun.* 150: 2844, 1993; Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pag. 399-434, 1996 și US 5,693,762, Queen, 1997. În plus, există entități comerciale care pot sintetiza anticorpi umanizați din regiuni specifice de anticorpi murini, cum ar fi Protein Design Labs (Mountain View, CA).

ANTICORPI RECOMBINANȚI

Anticorpul anti-MASP-2 pot fi, de asemenea, obținuți folosind metode recombinante. De exemplu, anticorpul uman pot fi obținuți utilizând biblioteci de secvențe exprimate ale imunoglobulinelor umane (disponibile, de exemplu, de la Stratagene, Corp., La Jolla, CA), pentru a produce fragmente de anticorpi umani (V_H , V_L , Fv, Fd, Fab sau $F(ab')_2$). Aceste fragmente sunt apoi folosite pentru a construi anticorpi umani în general, folosind tehnici similare cu cele pentru producerea anticorpilor himerici.

ANTICORPI ANTI-IDIOTIP

După identificarea anticorpilor anti-MASP-2 cu activitate inhibitoare dorită, acești anticorpi pot fi utilizați pentru a genera anticorpi anti-idiotip, asemănători cu o porțiune din MASP-2, utilizând tehnici bine cunoscute în domeniu. De exemplu, Greenspan, N.S. et al., *FASEB J.* 7: 437, 1993. De exemplu, anticorpul care se leagă cu MASP-2 și inhibă competitiv o interacțiune a proteinei MASP-2, necesară activării complementului, pot fi utilizați pentru a genera anti-idiotip, care se aseamănă cu situsul de legare MBL pe proteina MASP-2 și, prin urmare, leagă și neutralizează un ligand de legare al MASP-2 cum ar fi, de exemplu, MBL.

FRAGMENTE DE IMUNOGLOBULINĂ

Agente inhibitorii ai MASP-2, utili în metoda prezentei invenții, cuprind nu numai molecule de imunoglobulină intactă, dar și fragmentele bine cunoscute, incluzând fragmentele Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ și Fv, fragmentele scFv, diacorpi, anticorpi liniari, molecule de anticorpi cu un singur lanț și anticorpi multispecifici formați din fragmente de anticorpi.

Este bine cunoscut, că doar o mică parte dintr-o moleculă de anticorp, paratop, este implicată în legarea anticorpului cu epitopul său (de exemplu, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc, NY, 1986). Regiunile pFc' și Fc ale anticorpului sunt efectori ai căii clasice a complementului, dar nu sunt implicate în legarea antigenului. Un anticorp, din care regiunea pFc' a fost scindată enzimatic, sau care a fost produs fără regiunea pFc' este desemnat ca fragment $F(ab')_2$ și el păstrează ambele situsuri de legare a antigenului ale unui anticorp intact. Un fragment izolat $F(ab')_2$ este examinat ca un fragment monoclonal bivalent din cauza celor două situsuri de legare a antigenului. În mod similar, un anticorp, din care regiunea Fc a fost scindată enzimatic, sau care a fost produs fără regiunea Fc este desemnat ca fragment Fab și el păstrează unul dintre situsurile de legare a antigenului ale unei molecule de anticorp intact.

Fragmentele de anticorpi pot fi obținute prin hidroliză proteolitică, cum ar fi prin digestie cu pepsină sau papaină a anticorpilor întregi prin metode uzuale. De exemplu, fragmentele de anticorpi pot fi produse prin scindarea enzimatică a anticorpilor cu pepsină pentru a obține un fragment 5S, denumit $F(ab')_2$. Acest fragment poate fi scindat în continuare utilizând un agent de reducere a tiolului pentru a produce fragmente monovalente de 3.5S Fab'. Opțional, reacția de clivaj poate fi efectuată utilizând un grup de blocare pentru grupele sulfhidril, care rezultă din scindarea legăturilor disulfurice. Ca o alternativă, o scindare enzimatică cu utilizarea pepsinei produce în mod direct două fragmente Fab monovalente și un fragment Fc. Aceste metode sunt descrise în literatura de specialitate, de exemplu, US 4331647, Goldenberg; Nisonoff, A. et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230, 1960; Porter, R.R., *Biochem. J.* 73: 119, 1959; Edelman et al., in *Metode in Enzymology* 1: 422, Academic Press, 1967 și de Coligan la paginile 2.8.1-2.8.10 și 2.10.- 2.10.4.

În unele variante de realizare utilizarea fragmentelor de anticorpi, lipsite de regiunea Fc, este preferată pentru a evita activarea căii clasice a complementului, care este inițiată după legarea Fc cu receptorul Fc Γ . Există mai multe metode prin care se poate produce un MoAb, care evită interacțiunile receptorului Fc Γ . De exemplu, regiunea Fc a unui anticorp monoclonal poate fi îndepărtată chimic utilizând scindarea parțială cu enzime proteolitice (cum ar fi digestia cu ficină), generând astfel, de exemplu, fragmente de anticorp care leagă antigenul, cum ar fi fragmentele Fab sau F(ab)₂ (Mariani, M. et al., Mol Immunol., 28: 69-71, 1991). În mod alternativ, izotipul Γ 4 IgG uman, care nu leagă receptorii Fc Γ , poate fi utilizat în timpul construirii unui anticorp umanizat așa cum se descrie aici. Anticorpii, anticorpii cu un singur lanț și domeniile de legare a antigenului, lipsite de domeniul Fc, pot fi, de asemenea, proiectate folosind tehnicile recombinante descrise aici.

FRAGMENTE DE ANTICORP CU UN SINGUR LANȚ

În mod alternativ, se poate crea o peptidă cu un singur lanț, care leagă moleculele, specifice pentru MASP-2, în care sunt asociate regiunile Fv ale lanțului greu și ușor. Fragmentele Fv pot fi legate printr-un linker peptidic pentru a forma o proteină de legare a antigenului cu un singur lanț (scFv). Aceste proteine de legare a antigenului cu un singur lanț se prepară prin construirea unei gene structurale conținând secvențe de ADN, care codifică domeniile V_H și V_L, care sunt legate printr-o oligonucleotidă. Gena structurală este inserată într-un vector de expresie, care este introdus ulterior într-o celulă-gazdă, cum ar fi E. coli. Celulele gazdă recombinante sintetizează o polipeptidă cu un singur lanț cu o peptidă linker, care unește cele două domenii V. Metodele de producere a scFv sunt descrise în literatura de specialitate, de exemplu, Whitlow, et al., "Metode: A Companion to Metode in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., Science 242:423, 1988; U.S. Patent No. 4,946,778, to Ladner; Pack, P., et al., Bio/Technology 11:1271, 1993.

În calitate de exemplu ilustrativ, scFv specific MASP-2 se poate obține prin expunerea limfocitelor la polipeptidă MASP-2 in vitro și selectarea vizualizatorului bibliotecii de anticorpi în fagi sau în vectori similari (de exemplu, prin utilizarea proteinei sau a peptidei MASP-2 imobilizate sau marcate). Genele, care codifică polipeptidele, având domenii potențiale de legare a polipeptidei MASP-2, se pot obține prin screeningul bibliotecilor randomizate ale peptidelor pe vizualizatorul fagului sau pe vizualizatorul bacteriei, cum ar fi E. coli. Aceste biblioteci randomizate de vizualizare a peptidelor se pot utiliza pentru a screeningul peptidelor, care interacționează cu MASP-2. Tehnicile pentru crearea și screeningul unor astfel de biblioteci randomizate de vizualizare a peptidelor sunt bine cunoscute în domeniu (US 5223409, Lardner; US 4.946.778, Ladner; US 5403484, Lardner; US 5.571.698, Lardner și Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press, Inc., 1996) și bibliotecile randomizate de vizualizare a peptidelor și kiturile pentru screeningul unor astfel de biblioteci sunt comercial disponibile, de exemplu, de la CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, California), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.) și Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ).

O altă formă a unui fragment de anticorp MASP-2, utilă în acest aspect al invenției, este o peptidă care codifică o singură regiune hipervariabilă (CDR), care se leagă cu un epitop pe un antigen MASP-2 și inhibă activarea complementului dependentă de MASP-2. Peptidele CDR ("unități de recunoaștere minime") se pot obține prin construirea genelor care codifică CDR ale unui anticorp corespunzător. Astfel de gene se prepară, de exemplu, prin utilizarea reacției în lanț a polimerazei pentru a sintetiza regiunea variabilă din ARN al anticorpului, producător de celule (de exemplu, Larrick et al., Metode: A Companion to Metode in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), pag. 166, Cambridge University Press, 1995 și Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

Anticorpii MASP-2, descriși aici, se administrează la un subiect, care are nevoie de aceasta, pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2. În unele variante de realizare agentul inhibitor al MASP-2 este un anticorp monoclonal anti-MASP-2 umană sau umanizat cu afinitate înaltă cu funcție efectoare redusă.

INHIBITORII PEPTIDELOR

În unele variante de realizare ale acestui aspect al invenției agentul inhibitor al MASP-2 conține inhibitori ai peptidei MASP-2 izolați, incluzând inhibitori peptidici naturali izolați și inhibitori peptidici sintetici, care inhibă sistemul de activare a complementului dependentă de MASP-2. Așa cum se utilizează aici, termenul "inhibitori ai peptidei MASP-2 izolați" se referă la

peptide care inhibă activarea complementului dependentă de MASP-2 prin legare, concurând cu MASP-2, pentru legarea cu o altă moleculă de recunoaștere (de exemplu, MBL, H ficolină, M ficolină sau L ficolină) în calea lectinei și/sau interacționează direct cu MASP-2 pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2, care sunt în esență pure și nu conțin în esență alte substanțe, cu care ele pot fi găsite în natură, într-o așa măsură, încât să fie potrivite și adecvate pentru utilizarea lor posibilă.

Inhibitorii peptidici au fost utilizați cu succes in vivo pentru a preveni interacțiunile proteină-proteină și efectele negative asupra situsurilor catalitice. De exemplu, peptidele, inhibitori ai moleculelor de adeziune, structural apropiate de LFA 1, au fost recent aprobate pentru utilizare în practica clinică în tratamentul coagulopatiilor (Ohman, E. M. et al., *European Heart J.* 16:50-55). Au fost descrise peptide liniare scurte (<30 aminoacizi), care previn sau care acționează negative asupra adeziunii dependente de integrină (Murayama, O., et al., *J. Biochem.*, 120: 445-51). Peptidele mai lungi, cu lungime între 25 și 200 reziduuri de aminoacizi, au fost, de asemenea, utilizate cu succes pentru blocarea adeziunii dependente de integrină (Zhang, L. et al., *J. Biol Chem* 271 (47): 29953-57, 1996). În general, inhibitorii peptidici mai lungi au afinități mai mari și/sau viteze de disociere mai lente, decât peptidele scurte și, prin urmare, pot fi inhibitori mai activi. S-a demonstrat că inhibitorii peptidici ciclici sunt inhibitori eficienți ai integrinelor in vivo pentru tratamentul bolilor inflamatorii umane (Jackson, D.Y., et al., *J. Med. Chem.*, 40: 3359-68, 1997). O metodă de producere a peptidelor ciclice implică sinteza peptidelor, în care aminoacizii terminali ai peptidei sunt cisteine, permițând astfel peptidei să existe într-o formă ciclică prin legătura disulfurică dintre aminoacizii terminali, care s-a dovedit că ameliorează afinitatea și timpul de înjumătățire in vivo pentru tratamentul neoplasmelor hematopoietice (de exemplu, U.S. Patent No. 6,649,592, Larson).

INHIBITORII SINTETICI AI PEPTIDEI MASP-2

Peptidele inhibitoare ale MASP-2, utile în metodele acestui aspect al invenției, sunt exemplificate de secvențele de aminoacizi, care imită regiunile țintă importante pentru funcționarea MASP-2. Peptidele inhibitoare, utile în practica metodelor prezentei invenții, variază în dimensiuni de la aproximativ 5 aminoacizi până la aproximativ 300 de aminoacizi. Tabelul 3 prezintă o listă cu exemple de peptide inhibitoare, care pot fi utile în acest aspect al prezentei invenții. O peptidă inhibitoare a MASP-2 poate fi testată pentru abilitatea de a funcționa ca agent inhibitor al MASP-2 într-unul din mai multe teste, incluzând, de exemplu, un test de clivaj C4 specific pentru lectină (descriș în Exemplul 2) și un test de depunere C3b în Exemplul 2).

În unele variante de realizare, peptidele inhibitoare ale MASP-2 sunt derivate din polipeptidele MASP-2 și sunt selectate dintre proteina MASP-2 matură completă (SECV ID NR: 6) sau dintr-un domeniu particular al proteinei MASP-2 cum ar fi, de exemplu, domeniul CUBI (SECV ID NR: 8), domeniul CUBIEGF (SECV ID NR: 9), domeniul EGF (SECV ID NR: 11) și domeniul serin proteazei (SECV ID NR: 12). Așa cum s-a descriș anterior, regiunile CUBEGFCUBII s-au dovedit a fi necesare pentru dimerizare și legare cu MBL (Thielens et al., Supra). În particular, într-un studiu în care s-a identificat prezența la o persoană a unei mutații homozigote Asp105 în Gly105, rezultând cu pierderea MASP-2 din complexul MBL, s-a relatat că secvența peptidică TFRSDYN (SECV ID NR: 16) în domeniul CUBI al MASP-2 este implicată în legarea cu MBL (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New England J. Med.* 349:554-560, 2003).

În unele variante de realizare peptidele inhibitoare ale MASP-2 sunt derivate din proteinele lectinei, care se leagă cu MASP-2 și sunt implicate în calea lectinei a complementului. S-au identificat mai multe lectine diferite implicate în această cale, incluzând lectina fixatoare de manan (MBL), L-ficolina, M-ficolina și H-ficolina. (Ikeda, K. et al., *J. Biol Chem.*, 262: 7451-7454, 1987; Matsushita, M. et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1497-2284, 2000; Matsushita, et al., *J. Immunol.*, 168: 3502-3506, 2002). Aceste lectine sunt prezente în ser ca oligomere ale subunităților omotrimerice, fiecare având fibre de collagen N terminale cu domenii de recunoaștere a carbohidraților. Aceste lectine diferite s-au dovedit a se lega cu MASP-2, iar complexul lectină/MASP-2 activează complementul prin scindarea proteinelor C4 și C2. H-ficolina are o regiune amino terminală din 24 aminoacizi, un domeniu asemănător cu collagenul cu 11 repetiții Gly-Xaa-Yaa, un domeniu de gât din 12 aminoacizi și un domeniu asemănător fibrinogenului din 207 aminoacizi (Matsushita, M. et al., *J. Immunol.* 168: 3502-3506, 2002). H-ficolina se leagă cu GlcNAc și aglutinează eritrocitele umane acoperite cu LPS derivat din *S. typhimurium*, *S. minnesota* și *E. coli*. H-ficolina s-a dovedit a fi asociată cu MASP-2 și MAP19 și activează calea lectinei. L-ficolina/P35, de asemenea, se leagă cu GlcNAc și s-a dovedit a fi asociată cu MASP-2 și MAP19 în serul uman și s-a demonstrat, că acest complex activează calea lectinei (Matsushita, M. et al., *J. Immunol.*, 164: 2281, 2000). În consecință, peptidele inhibitoare ale MASP-2, utile în

prezenta invenție, pot cuprinde o regiune din cel puțin de 5 aminoacizi selectați dintre proteina MBL (SECV ID NR: 21), proteina H-ficolinei (numărul de acces Genbank NM_173452), proteina M-ficolinei (numărul de acces Genbank O00602) și proteina L-ficolinei (numărul de acces Genbank NM_015838).

- 5 Mai precis, oamenii de știință au identificat că situsul de legare a MASP-2 pe MBL se încadrează în cele 12 Gly-X-Y triplete "GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS" (SECV ID NR: 26) între articulație și gât în porțiunea C terminală a domeniului de tip collagen al MBP (Wallis, R. et al., J. Biol., Chem., 279: 14065, 2004). Această regiune a situsului de legare a MASP-2 este, de asemenea, foarte conservativă în
- 10 H-ficolina umană și L-ficolina umană. A fost descris un situs de legare consens, care este prezent în toate cele trei proteine ale lectinei, cuprinzând secvența de aminoacizi "OGK-X-GP" (SECV ID NR: 22), în care litera "O" reprezintă hidroxiprolina și litera "X" este un reziduu hidrofob (Wallis et al., 2004, supra). În consecință, în unele variante de realizare peptidele inhibitoare ale MASP-2, utile în acest aspect al prezentei invenții, conțin cel puțin de 6 aminoacizi în lungime și cuprind
- 15 SECV ID NR: 22. S-a dovedit că peptidele, derivate din MBL, care includ secvența de aminoacizi "GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SECV ID NR: 24) leagă MASP-2 in vitro (Wallis, et al., 2004, supra). Pentru a amplifica legarea cu MASP-2 peptidele pot fi sintetizate flancate cu două triplete GPO la fiecare capăt pentru a spori formarea helixelor triple, cum se determină în proteina MBL nativă (Wallis, R. et al., J. Biol.Chem., 279: 14065, 2004).
- 20 Peptidele inhibitoare ale MPSP-2 pot fi, de asemenea, derivate din H-ficolina umană, care include secvența "GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO" (SECV ID NR: 27) din regiunea de legare consens a MASP-2 din H-ficolină. Sunt incluse, de asemenea, peptidele derivate din L-ficolina umană, care includ secvența "GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO" (SEQ ID NO:28) din regiunea de legare consens a
- 25 MASP-2 în L-ficolină.

Peptidele inhibitoare ale MPSP-2 pot fi, de asemenea, derivate din situsul de scindare C4, cum ar fi "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SECV ID NR: 29), care este situsul de scindare C4, legat cu porțiunea terminală C a antitrombinei III (Glover, G.I., et al., *Mol. Immunol.* 25:1261 (1988)).

30 EXEMPLE DE PEPTIDE INHIBITORE ALE MASP-2

Tabelul 3

SEQ ID NO	Sursa
SEQ ID NO:6	Proteina MASP-2 umană
SEQ ID NO:8	Domaniul CUBI al MASP-2 (aa 1-121 din SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	Domaniile CUBIEGF ale MASP-2 (aa 1-166 din SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	Domaniile CUBIEGFCUBII ale MASP-2 (aa 1-293 din SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	Domaniul EGF al MASP-2 (aa 122-166)
SEQ ID NO:12	Domaniul serin-proteazei al MASP-2 (aa 429-671)
SEQ ID NO:16	Regiunea de legare a MBL în MASP-2
SEQ ID NO:3	MAp19 uman
SEQ ID NO:21	Proteina MBL umană
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, în care "O" = hidroxiprolină și "X" reprezintă un reziduu aminoacid hidrofob	Situsul de legare consens a peptide sintetice din MBL uman și ficolinele umane
SEQ ID NO:23 OGKLG	Situsul principal de legare a MBL uman
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	Tripletele 6-10- ale MBP umane demonstrează legare cu MASP-2
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKL GPOGGPOGPO	Tripletele MBP umane cu GPO adăugate pentru a amplifica formarea helixelor triple
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQG LRGLQGPOGKLGPNOG PSGSOGPKGQKGDGKS	Tripletele 1-17 ale MBP umane

SEQ ID NO	Sursa
SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQGPO GPOGKMGPKEGEOGDO	H-Ficolina umană (Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGT NGKRGERGPOGPOGKAGP OGPNGAOGEO	L-Ficolina umană P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPF LVFI	Situsul de scindare a C4 umane

Notă: Litera "O" reprezintă hidroxiprolină. Litera "X" reprezintă un reziduu hidrofob.

Peptidele, derivate din situsul de scindare a C4, precum și alte peptide care inhibă situsul serin proteazei MASP-2, pot fi modificate chimic astfel încât ele devin inhibitori ireversibili ai proteazei. De exemplu, modificările adecvate pot include, dar nu sunt neapărat limitate la, halometil cetonele (Br, Cl, I, F) la C terminal, Asp sau Glu, sau atașate la catenele laterale funcționale; grupele haloacetil (sau alte grupe α -haloacetil) pe grupe amino sau pe alte catene laterale funcționale; grupe epoxide sau cu conținut de imine pe grupe amino sau carboxil terminale sau pe catene laterale funcționale; sau esteri imidați pe grupe amino sau carboxil terminale sau pe catene laterale funcționale. Astfel de modificări ar permite avantajul de a inhiba permanent enzima prin atașarea covalentă a peptidei. Aceasta ar putea rezulta cu doze eficiente mai mici și/sau cu necesitatea unei administrări mai puțin frecvente a inhibitorului peptidei.

Adițional la peptidele inhibitoare descrise mai sus, peptidele inhibitoare ale MASP-2, utile în metoda prezentei invenții, includ peptide conținând regiunea CDR3 care leagă MASP-2 la MoAb anti-MASP-2, obținută cum se descrie aici. Secvența regiunilor CDR, utilizată pentru sinteza peptidelor, poate fi determinată prin metode cunoscute în domeniu. Regiunea variabilă a lanțului greu este o peptidă care, în general, variază de la 100 până la 150 de aminoacizi în lungime. Regiunea variabilă a lanțului ușor este o peptidă care, în general, variază de la 80 la 130 de aminoacizi în lungime. Secvențele CDR din regiunile variabile ale lanțului greu și ușor includ numai aproximativ 3-25 de secvențe aminoacide, care pot fi ușor secvențiate de un specialist în domeniu.

Specialiștii în domeniu vor recunoaște, că variațiile în esență omoloage ale peptidelor inhibitoare ale MASP-2, descrise mai sus, vor prezenta, de asemenea, activitate inhibitoare a MASP2. Exemplele de variații includ, dar nu sunt neapărat limitate la, peptide care au inserții, deleții, înlocuiri și/sau aminoacizi suplimentari pe porțiunile carboxil terminale sau amino-terminale ale peptidelor și amestecurile acestora. În consecință, acele peptide omoloage cu activitate inhibitoare a MASP-2 sunt considerate a fi utile în metodele prezentei invenții. Peptidele descrise pot include, de asemenea, motive de duplicare și alte modificări cu substituții conservative. Variantele conservative sunt descrise în altă parte aici și includ schimbul unui aminoacid cu un altul cu o sarcină, dimensiune sau hidrofobie asemănătoare și altele asemenea.

Peptidele inhibitoare ale MASP-2 pot fi modificate pentru a crește solubilitatea și/sau pentru a maximiza sarcina pozitivă sau negativă pentru a se asemana mai mult cu segmentul din proteina intactă. Atât timp cât derivatul menține funcțional proprietatea dezirabilă de inhibare a MASP-2, derivatul poate avea sau poate să nu aibă structura aminoacidă primară exactă a unei peptide descrise aici. Modificările pot include substituția aminoacidului cu unul din cei douăzeci de aminoacizi cunoscuți sau cu un alt aminoacid, cu un aminoacid derivatizat sau substituit cu caracteristici dezirabile auxiliare, cum ar fi rezistența la degradarea enzimatică sau cu un aminoacid D sau substituirea cu o altă moleculă sau compus, cum ar fi un carbohidrat, care imită confirmarea și funcția naturală a aminoacidului, a aminoacizilor sau a peptidei; deleția aminoacidului; inserția aminoacidului cu unul din cei douăzeci de aminoacizi cunoscuți sau cu un alt aminoacid, cu un aminoacid derivatizat sau substituit cu caracteristici dezirabile auxiliare, cum ar fi rezistența la degradarea enzimatică sau cu un aminoacid D sau substituirea cu o altă moleculă sau compus, cum ar fi un carbohidrat, care imită confirmarea și funcția naturală a aminoacidului, a aminoacizilor sau a peptidei; sau substituție cu o altă moleculă sau compus, cum ar fi un carbohidrat sau acid nucleic monomer, care imită conformația naturală, distribuția sarcinii și funcția peptidei parentale. Peptidele pot fi, de asemenea, modificate prin acetilare sau amidare.

Sinteza peptidelor inhibitoare derivate se poate baza pe tehnici cunoscute de biosinteză a peptidelor, biosinteză a carbohidraților și altele asemenea. Ca punct de plecare, specialistul se

poate baza pe un program de calculator potrivit pentru a determina conformația unei peptide interes. După ce conformația peptidei, dezvăluite aici, devine cunoscută, specialistul poate determina într-un mod rațional designul substituțiilor care pot fi efectuate la unul sau mai multe situsuri pentru a realiza un derivat, care menține conformația de bază și distribuția sarcinii peptidei inițiale, dar care poate avea caracteristici care lipsesc sau sunt îmbunătățite, comparativ cu cele găsite în peptida parentală. După identificarea moleculelor derivate candidate, derivații pot fi testați pentru a determina dacă acționează ca agenți inhibitori ai MASP 2 folosind testele descrise aici.

SCREENINGUL PEPTIDELOR, CARE INHIBĂ MASP-2

Pentru a genera și examina peptidele, care imită structurile moleculare ale regiunilor de legare cheie ale MASP-2 și inhibă activitățile complementului dependente de MASP-2, se poate utiliza, de asemenea, modelarea moleculară și proiectarea moleculară rațională. Structurile moleculare utilizate pentru modelare includ regiunile CDR ale anticorpilor monoclonali anti-MASP-2, precum și regiunile țintă cunoscute a fi importante pentru funcția MASP-2, inclusiv regiunea necesară pentru dimerizare, regiunea implicată în legarea cu MBL și situsul activ al serin proteazei, cum se descrie anterior. Metodele de identificare ale peptidelor, care se leagă la o anumită țintă, sunt bine cunoscute în domeniu. De exemplu, imprimarea moleculară poate fi utilizată pentru construcția *de novo* a structurilor macromoleculare, cum ar fi peptidele care se leagă la o anumită moleculă. (De exemplu, Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites," *TRIP* 2(5) 1994).

Drept exemplu ilustrativ, o metodă de preparare a imitatorilor peptidelor, care leagă MASP-2, este prezentată în continuare. Sunt polimerizați monomerii funcționali ai unei peptide cunoscute de legare a MASP-2 sau regiunii de legare a unui anticorp anti-MASP-2, care efectuează inhibarea MASP-2 (matrița). Apoi se îndepărtează matrița, urmând polimerizarea clasei secunde monomeri în golul lăsat de matriță, pentru a furniza o nouă moleculă, care prezintă una sau mai multe proprietăți dezirabile, similare cu matrița. Adicional la prepararea peptidelor în acest mod, se pot prepara și alte molecule de legare MASP-2, care sunt agenți inhibitori ai MASP2, cum ar fi polizaharide, nucleozide, medicamente, nucleoproteine, lipoproteine, carbohidrați, glicoproteine, steroizi, lipide și alte materiale biologice active. Această metodă este utilă pentru proiectarea unei game largi de mimetice biologice, care sunt mai stabile decât omologii lor naturali, deoarece acestea sunt în mod obișnuit preparate prin polimerizarea radicalilor liberi ai monomerilor funcționali, rezultând un compus cu catena principală nebiodegradabilă.

SINTEZA PEPTIDELOR

Peptidele inhibitoare MASP-2 pot fi preparate folosind tehnici bine cunoscute în domeniu, cum ar fi tehnica de sinteză în fază solidă descrisă inițial de Merrifield, în J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-2154, 1963. Sinteza automată poate fi realizată, de exemplu, utilizând Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Foster City, California), în conformitate cu instrucțiunile furnizate de producător. Alte tehnici sunt descrise, de exemplu, de Bodanszky, M. et al., *Peptide Synthesis*, ediția a doua, John Wiley & Sons, 1976, precum și în alte lucrări de referință cunoscute specialiștilor în domeniu.

Peptidele pot fi, de asemenea, preparate utilizând tehnici de inginerie genetică standarde cunoscute specialiștilor în domeniu. De exemplu, peptida poate fi produsă în mod enzimatic prin introducerea acidului nucleic, care codifică peptide, într-un vector de expresie, exprimând ADN și translând ADN în peptidă în prezența aminoacizilor necesari. Peptida este apoi purificată, folosind tehnici cromatografice sau electroforetice sau cu o proteină-transportoare, care poate fi fuzionată și apoi scindată cu peptidă prin inserarea în vectorul de expresie în fază cu secvența de codificare a peptidei a unui secvențe de acid nucleic care codifică proteina transportoare. Peptida proteinei de fuziune poate fi izolată folosind tehnici cromatografice, electroforetice sau imunologice (cum ar fi legarea cu o rășină prin intermediul unui anticorp la proteina transportoare). Peptida poate fi scindată folosind metodă chimică sau enzimatic, de exemplu, cu hidrolaze.

Peptidele inhibitoare ale MASP-2, utile în metoda prezentei invenții, pot fi, de asemenea, produse în celulele gazdă recombinante, urmând tehnicile uzuale. Pentru a exprima o secvență care codifică peptida inhibitoare a MASP-2, o moleculă de acid nucleic, care codifică peptide, trebuie să fie legată în mod operabil cu secvențele de reglare, care controlează expresia transcripțională, într-un vector de expresie și apoi introduse într-o celulă gazdă. Adicional la secvențele reglatoare transcripționale, cum ar fi promotorii și amplificatorii, vectorii de expresie pot include secvențe reglatoare de translație și o genă marker, care sunt potrivite pentru selectarea celulelor, care poartă vectorul de expresie.

Moleculele de acid nucleic, care codifică o peptidă inhibitoare a MASP-2, pot fi sintetizate cu "mașini genetice" folosind protocoale, cum ar fi metoda fosforamidului. Dacă este necesar un ADN dublu catenar sintetizat chimic pentru o aplicație, cum ar fi sinteza unei gene sau a unui fragment de genă, fiecare catenă complementară se construiește separat. Producția de gene scurte (60 până la 80 perechi de baze) este tehnic simplă și poate fi realizată prin sintetizarea filamentelor complementare și apoi hibridarea lor. Pentru producerea de gene mai lungi, genele sintetice (dublu catenare) sunt asamblate în formă modulară din fragmente monocatenare, care au lungimea între 20 și 100 nucleotide. (De exemplu, Glick and Pasternak, "Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA", ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; and Climie, S., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:633, 1990).

INHIBITORI MICROMOLECULARI

În unele variante de realizare agenții inhibitori ai MASP-2 sunt inhibitori micromoleculari, incluzând substanțe naturale și sintetice, care au o greutate moleculară mică, cum ar fi, de exemplu, peptide, peptidomimetice și inhibitori nepeptidici (inclusiv oligonucleotide și compuși organici). Inhibitorii micromoleculari ai MASP-2 pot fi generați pe baza structurii moleculare a regiunilor variabile ale anticorpilor anti-MASP-2.

Inhibitorii micromoleculari pot fi, de asemenea, proiectați și generați pe baza structurii cristaline a MASP-2 utilizând un design computațional al medicamentului (Kuntz I. D. et al., Science 257: 1078, 1992). Structura cristalină a MASP-2 de șobolan a fost descrisă (Feinberg, H. et al., EMBO J. 22: 2348-2359, 2003). Utilizând metoda descrisă de Kuntz et al., coordonatele structurii cristaline a MASP-2 sunt utilizate ca intrări pentru un program de calculator, cum ar fi DOCK, care furnizează o listă de structuri micromoleculare, care se așteaptă să se lege cu MASP-2. Utilizarea unui astfel de program de calculator este bine cunoscută unui specialist în domeniu. De exemplu, structura cristalină a inhibitorului proteazei HIV-1 a fost utilizată pentru a identifica liganzi unici nepeptidici, care sunt inhibitori ai proteazei HIV-1 prin evaluarea potrivirii compușilor, găsiți în baza de date Cambridge Crystallographic, la locul de legare al enzimei utilizând programul DOCK (Kuntz, I.D. et al., J. Mol. Biol., 161: 269-288, 1982; DesJarlais, R.L. et al., PNAS 87: 6644-6648, 1990).

Lista structurilor micromoleculare, identificate printr-o metodă computațională ca inhibitori potențiali ai MASP-2, sunt analizate utilizând un test de legare a MASP-2, cum se descrie în Exemplul 10. Compușii micromoleculari, determinați că se leagă cu MASP-2, sunt apoi analizați printr-un test funcțional, cum se descrie în Exemplul 2, pentru a determina dacă acestea inhibă activarea complementului dependentă de MASP2.

RECEPTORII SOLUBILI AI MASP-2

Alți agenți inhibitori potriviți ai MASP-2 se consideră că includ receptori solubili ai MASP-2, care pot fi produși utilizând tehnici cunoscute specialiștilor în domeniu.

INHIBITORI DE EXPRESIE AI MASP-2

Intr-o altă variantă de realizare a acestui aspect al invenției, agentul inhibitor al MASP-2 este un inhibitor de expresie al MASP2, abil să inhibe activarea complementului dependentă de MASP-2. În practica acestui aspect al invenției inhibitorii de expresie ai MASP-2 reprezentativi includ molecule de acid nucleic al MASP- 2 antisens (cum ar fi ARNm antisens, ADN antisens sau oligonucleotide antisens), ribozime MASP-2 și molecule ARNi MASP-2.

Moleculele ARN și ADN anti-sens acționează pentru a bloca direct translația ARNm MASP-2 prin hibridizarea cu ARNm MASP-2 și prevenirea translației proteinei MASP-2. O moleculă de acid nucleic antisens poate fi construită în mai multe moduri diferite, cu condiția ca aceasta să fie abilă să interfereze cu exprimarea MASP-2. De exemplu, o moleculă de acid nucleic anti-sens poate fi construită prin inversarea regiunii de codificare (sau a unei porțiuni a acesteia) din ADNc MASP-2 (SECV ID NR: 4), în raport cu orientarea ei normală, pentru transcripție, ceea ce permite transcrierea complementului său.

Molecula de acid nucleic antisens este de obicei în esență identică cel puțin de o porțiune din gena țintă sau genele țintă. Totuși, pentru inhibarea expresiei acidul nucleic nu trebuie să fie perfect identic. În general, o omologie mai mare poate fi utilizată pentru a compensa utilizarea unei molecule de acid nucleic antisens mai scurte. Identitatea procentuală minimă constituie de obicei nu mai mult de 65%, dar o identitate procentuală mai mare poate exercita o reprimare mai eficientă a expresiei secvenței endogene. Se preferă în esență o identitate procentuală ce depășește semnificativ 80%, deși identitatea de la 95% până la identitatea absolută este de obicei cea mai preferată.

Molecula de acid nucleic antisens nu trebuie să aibă același tip de intron sau exon ca și gena țintă, iar segmentele ne-codificatoare ale genei țintă pot fi la fel de eficiente în obținerea suprimării

antisens a expresiei genelor țintă ca și segmentele de codificare. O secvență ADN cel puțin de circa 8 nucleotide poate fi utilizată ca moleculă de acid nucleic antisens, deși este preferată o secvență mai lungă. În prezenta invenție un exemplu reprezentativ de un agent inhibitor util al MASP-2 este o moleculă de acid nucleic MASP-2 antisens, care este în cel puțin de nouăzeci la sută identică cu ADNc MASP-2 complementar, constând din secvența de acid nucleic prezentată în SECV ID NO: 4. Secvența de acid nucleic prezentată în SECV ID NR: 4 codifică proteina MASP-2, constând din secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 5.

Direcționarea oligonucleotidelor antisens pentru legarea cu ARNm MASP-2 este un alt mecanism, care poate fi utilizat pentru a reduce nivelul de sinteză al proteinelor MASP-2. De exemplu, sinteza poligalacturonazei și a receptorului pentru acetilcolină de tip 2 muscarinic este inhibată de oligonucleotidele antisens direcționate către secvențele lor ARNm respective (US 5,739,119, Cheng și US 5,759,829, Shewmaker). Mai mult decât atât, au fost demonstrate exemple de inhibiție antisens cu ciclina proteinei nucleare, gena de rezistență la multiple medicamente (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptorul pentru GABAA striatal și EGF uman (de exemplu, US 5,801,154, Baracchini; US 5,789,573, Baker; US 5,718,709, Considine și US 5,610,288, Reubenstein).

S-a descris un sistem, care permite unui specialist în domeniu, să determine oligonucleotidele utile în prezenta invenție, care implică sondarea pentru situsuri potrivite în ARNm țintă utilizând scindarea Rnazei H ca indicator pentru accesibilitatea secvențelor din transcripturi. (Scherr, M., et al., Nucleic Acids Res. 26: 5079-5085, 1998; Lloyd et al., Nucleic Acids Res. 29: 3665-3673, 2001). Un amestec de oligonucleotide antisens, complementare la anumite regiuni ale transcriptiei MASP-2, se adaugă la extractele celulare, care exprimă MASP-2, cum ar fi hepatocitele, și le hibridizează pentru a crea un sit receptiv la ribonucleaza H. Această metodă poate fi combinată cu selecția de secvențe, asistată de calculator, care poate prezice selectarea optimă a secvenței pentru compozițiile antisens, pe baza abilității lor relative de a forma dimeri, «agrafe» sau alte structuri secundare, care ar reduce sau ar preveni legarea specifică cu ARNm țintă într-o celulă gazdă. Analizele acestor structuri secundare și recomandări de selectare a situsului țintă pot fi realizate utilizând software de analiză a primerului OLIGO (Rychlik, I., 1997) și algoritmul BLASTN 2.0.5 (Altschul, S.F. et al., Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402, 1997). Compușii antisens direcționați către secvența țintă, de preferință, cuprind de la aproximativ 8 până la aproximativ 50 nucleotide în lungime. Oligonucleotidele antisens, cuprinzând aproximativ 9 până la aproximativ 35 de nucleotide, sunt deosebit de preferate. Inventatorii presupun, că toate compozițiile de oligonucleotide în intervalul de la 9 până la 35 nucleotide (adică cele de la 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 sau 35 sau ceva aproximativ în lungime) sunt extrem de preferate pentru practica metodelor bazate pe oligonucleotide antisens ale invenției. Regiunile țintă foarte preferate ale ARNm MASP-2 sunt acele amplasate în apropierea nemijlocită de codonul de inițiere a translației AUG și acele secvențe care sunt în esență complementare cu regiunile 5' ale ARNm, de exemplu, între regiunile -10 și +10 ale secvenței nucleotide a genei MASP-2 (SECV ID NR: 4). Exemple de inhibitori ai expresiei MASP-2 sunt prezentate în Tabelul 4.

EXEMPLE DE INHIBITORI AI EXPRESIEI MASP-2

Tabelul 4

SEQ ID NO:30 (nucleotidele 22-680 din SEQ ID NO:4)	Secvența acidului nucleic al ADNc MASP-2 (SECV ID NR: 4), care codifică CUBIEGF
SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTC CTGGGC3	Nucleotidele 12-45 din SEQ ID NO:4 inclusiv situsul de inițiere al translației MASP-2 (sens)
SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTCCGCTCCGACTCCAACG AGAAG3'	Nucleotidele 361-396 din SEQ ID NO:4, care codifică regiunea care conține situsul de legare MBL MASP-2 (sens)
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATC CCAAA3'	Nucleotidele 610-642 din SEQ ID NO:4, care codifică regiunea care conține domeniul CUBII

Așa cum s-a menționat mai sus, termenul "oligonucleotidă", așa cum este utilizat în prezenta descriere, se referă la un oligomer sau polimer al acidului ribonucleic (ARN) sau al acidului dezoxiribonucleic (ADN) sau al mimetizilor acestuia. Acest termen cuprinde, de asemenea, acele baze oligonucleotide compuse din nucleotidele naturale, zaharuri și legăturile covalente internucleozide (de schelet), precum și oligonucleotidele cu modificări, care nu apar în mod natural. Aceste modificări permit să se introducă anumite proprietăți dorite, care nu sunt oferite de oligonucleotidele naturale, cum ar fi proprietățile toxice reduse, stabilitate crescută împotriva

degradării nucleazei și absorbție celulară îmbunătățită. În exemplele de realizare ilustrative, compuși antisens ai prezentei invenții diferă de ADN nativ prin modificarea scheletului fosfodiesteric pentru a prelungi durata de viață a oligonucleotidei antisens, în care substituenții fosfat sunt înlocuiți cu fosforotioați. În mod similar, unul sau ambele capete ale oligonucleotidei pot fi substituite cu unul sau mai mulți derivați de acridină, care se intercalează între perechile de nucleotide adiacente din interiorul unei catene de acid nucleic.

O altă alternativă la antisens este folosirea "ARN de interferență" (ARNi). ARN dublu catenari (dsARN) pot provoca silențierea genei la mamifere in vivo. Funcția naturală a ARNi și cosupresia se pare a fi protecția genomului împotriva invaziei cu elemente genetice mobile, cum ar fi retrotranspozonoamele și virusurile, care produc ARN aberant sau dsARN în celula gazdă, când acestea devin active (de exemplu, Jensen, J., et al., *Nat Genet* 21: 209-12, 1999). Moleculele de ARN dublu catenar se pot prepara prin sinteza a două filamente de ARN, abile să formeze o moleculă de ARN dublu catenar, fiecare având o lungime de la aproximativ 19 până la 25 nucleotide (de exemplu, 19-23 nucleotide). De exemplu, o moleculă de dsARN, utilă în metodele prezentei invenții, poate conține ARN corespunzător unei secvențe și complementului ei, enumerate în Tabelul 4. De preferință, cel puțin de o catenă de ARN are 3' terminal «adeziv» de 1-5 nucleotide. Lanțurile ARN sintetizate se combină în condiții care formează o moleculă dublu catenară. Secvența ARN poate conține cel puțin de o porțiune de 8 nucleotide din SECV ID NR: 4 cu o lungime totală de 25 nucleotide sau mai mică. Proiectarea secvențelor siARN pentru o anumită țintă este o practică obișnuită pentru un specialist în domeniu. Sunt disponibile servicii comerciale, care construiesc secvențe siRNA și garantează cel puțin de 70% de reducere a expresiei (Qiagen, Valencia, Calif).

DsARN poate fi administrat sub formă de o compoziție farmaceutică și se obține prin metode cunoscute, în care un acid nucleic se introduce într-o celulă țintă dorită. Metodele utilizate frecvent pentru transferul genei includ fosfatul de calciu, DEAE-dextran, electroporarea, microinjecția și metodele virale. Astfel de metode sunt descrise de Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

Ribozimele pot fi, de asemenea, utilizate pentru a reduce cantitatea și/sau activitatea biologică a MASP-2, cum ar fi ribozimele care țintesc ARNm MASP-2. Ribozimele sunt molecule de ARN catalitice, care pot scinda moleculele de acid nucleic cu o secvență, care este complet sau parțial omoloagă cu secvența ribozimei. Este posibilă proiectarea transgenelor ribozimei, care codifică ribozimele ARN care se cuplează în mod specific cu un ARN țintă și scindează scheletul fosfodiesterului într-o locație specifică, inactivând, astfel, funcția ARN țintă. În realizarea acestei scindări, ribozima înseși nu este modificată și astfel este capabilă să recicleze și să scindeze alte molecule. Incluziunea secvențelor de ribozime în ARN antisens conferă ARN activitate de scindare a acestora, crescând astfel activitatea structurilor antisens.

Ribozimele, utile în practica invenției, conțin de obicei o regiune de hibridizare cel puțin de aproximativ nouă nucleotide care este complementară în secvența de nucleotide la cel puțin de o parte a ARNm MASP-2 țintă și o regiune catalitică care este adaptată pentru a scinda ARNm MASP-2 țintă (EPA nr. 0 321 201; W0 88/04300; Haseloff, J. et al., *Nature* 334: 585-591, 1988; Fedor, M.J. et al., *Proc Natl Acad.* 87: 1668-1672, 1990; Cech, T.R. et al., *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 599-629, 1986).

Ribozimele pot fi direcționate nemijlocit asupra celulei sub formă de oligonucleotide ARN, care încorporează secvențe de ARN sau sunt introduse în celulă ca vector de expresie, care codifică ARN ribozimal necesar. Ribozimele pot fi utilizate și aplicate în mod similar celui descris pentru polinucleotidele antisens.

ARN și AND antisens, ribozimele și molecule de ARNi, utile în metodele prezentei invenții, pot fi preparate prin orice metodă cunoscută în domeniu de sinteză a moleculelor de ADN și ARN. Acestea includ tehnici de sintetizare chimică a oligodeoxiribonucleotidelor și oligoribonucleotidelor bine cunoscute în domeniu, cum ar fi, de exemplu, sinteza chimică a fosforamiditei în fază solidă. În mod alternativ, moleculele de ARN pot fi generate prin transcripția in vitro și in vivo a secvențelor de ADN, care codifică molecula de ARN antisens. Astfel de secvențe de ADN pot fi încorporate într-o mare varietate de vectori, care încorporează promotorii polimerazei ARN potrivii, cum ar fi promotorii polimerazei T7 sau SP6. În mod alternativ, structurile ADNc antisens, care sintetizează ARN antisens constitutiv sau inducibil, în funcție de promotorul utilizat, pot fi introduse în mod stabil în liniile celulare.

Diferite modificări bine cunoscute ale moleculelor de ADN pot fi introduse ca un mijloc de creștere a stabilității și a timpului de înjumătățire. Modificările utile includ, dar nu se limitează la acestea, adăugarea secvențelor de flancare ale ribonucleotidelor sau deoxiribonucleotidelor la capetele

5' și/sau 3' ale moleculei sau utilizarea fosforotioatului sau 2' O-metil, înlocuind legăturile fosfodiesterice cu scheletul oligodeoxiribonucleotidic.

VI. COMPOZIȚII FARMACEUTICE ȘI METODE DE LIVRARE. DOZAREA

Intr-un alt aspect invenția prevede compoziții pentru inhibarea efectelor adverse ale activării complementului dependente de MASP-2 la un subiect care suferă de o boală sau o stare descrisă aici, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate terapeutic eficientă de un agent inhibitor al MASP-2 și un purtător farmaceutic acceptabil. Agenții inhibitori ai MASP-2 se pot administra unui subiect, care are nevoie de acesta, în doze eficiente din punct de vedere terapeutic, pentru tratarea sau ameliorarea stărilor asociate cu activarea complementului dependentă de MASP-2. O doză terapeutic eficientă se referă la o cantitate de agent inhibitor al MASP-2 suficientă pentru a conduce la ameliorarea simptomelor asociate cu boala sau cu starea.

Toxicitatea și eficiența terapeutică a agenților inhibitori ai MASP 2 pot fi determinate prin proceduri farmaceutice standard utilizând modele cu animale experimentale pe animale, cum ar fi modelul MASP-2 +/- murin cu șoareci, care exprimă transgena MASP-2 umană, descrisă în Exemplul 1. Utilizând astfel de modele experimentale pe animale, pot fi determinate utilizând metode standard nivelul absenței efectelor adverse (NOAEL) și doza minimă eficientă (MED). Raportul dozelor, prin care se caracterizează NOAEL și MED, reprezintă un indice terapeutic, care este exprimat ca raportul NOAEL/MED. Agenții inhibitori ai MASP-2, care prezintă indicatori terapeutici mari, sunt cei mai preferați. Datele, obținute în testele de cultură celulară și studiile pe animale, pot fi utilizate pentru determinarea diapazonului dozelor pentru administrare umană. Doza de agent inhibitor al MASP-2 se situează, de preferință, într-un interval de concentrații circulante, care includ MED cu toxicitate joasă sau fără toxicitate. Doza poate varia în acest interval, în funcție de forma medicamentoasă și de calea de administrare utilizată.

Pentru orice formulare a unui compus doza terapeutic eficientă poate fi estimată utilizând modele experimentale pe animale. De exemplu, într-un model experimental pe animale poate fi determinată doza pentru a obține un interval de concentrație plasmatică circular, care include MED. Nivelurile cantitative de agent inhibitor al MASP-2 în plasmă pot fi, de asemenea, măsurate, de exemplu, prin cromatografie lichidelor de înaltă performanță.

Adițional la studiile de toxicitate, doza eficientă poate fi, de asemenea, estimată pe baza cantității de proteină MASP-2 prezentă la un subiect viu și a afinității de legare a agentului inhibitor al MASP-2. S-a relevat, că niveluri de MASP-2 sunt prezente în serul persoanelor sănătoase în cantități nu prea mari în limite de 500 ng/ml și nivelurile de MASP-2 la un anumit subiect pot fi determinate folosind un test cantitativ pentru MASP-2, descris de Moller-Kristensen M., et al., J. Immunol. Methods 282: 159-167, 2003.

În general, doza de compoziții administrate cu conținut de agenți inhibitori ai MASP-2 variază în funcție de așa factori, cum ar fi vârsta, greutatea, înălțimea, sexul, starea generală a pacientului și istoricul medical anterior. În calitate de ilustrare, agenții inhibitori ai MASP-2, cum ar fi anticorpii anti-MASP-2, pot fi administrați în doze variind de la circa 0,010 până la 10,0 mg/kg, de preferință 0,010 până la 1,0 mg/kg, mai preferabil de 0,010 până la 0,1 mg/kg de masă corporală a subiectului. În unele variante compoziția conține o combinație de anticorpi anti-MASP-2 și peptide inhibitoare ale MASP-2.

Eficacitatea terapeutică a compozițiilor inhibitoare ale MASP-2 și a metodelor din prezenta invenție la un subiect dat și dozele adecvate pot fi determinate în conformitate cu testele de complement bine cunoscute specialiștilor în domeniu. Complementul generează numeroase produse specifice. În ultimul deceniu au fost elaborate teste sensibile și specifice, care sunt comercial disponibile pentru majoritatea acestor produse de activare, incluzând fragmentele mici de activare C3a, C4a și C5a și fragmentele mari de activare iC3b, C4d, Bb și sC5b-9. Majoritatea dintre aceste analize utilizează anticorpi monoclonali, care reacționează cu noi antigeni (neoantigeni) expuși pe fragment, dar nu pe proteinele native din care s-au format, făcând aceste teste foarte simple și specifice. Cele mai multe se bazează pe tehnologia ELISA, deși radioimunoanaliza încă este folosită uneori pentru C3a și C5a. Aceste ultime teste măsoară atât fragmentele neprocesate, cât și fragmentele lor "desArg", care sunt formele principale prezente în circulație. Fragmentele neprocesate și C5a_{desArg} sunt eliminate rapid prin legarea cu receptorii de suprafață celulară și sunt, prin urmare, prezente în concentrații foarte reduse, în timp ce C3_{adesArg} nu se leagă cu celulele și se acumulează în plasmă. Măsurarea C3a este un indicator sensibil, independent de calea de activare a complementului, al activării complementului. Calea alternativă de activare a complementului poate fi evaluată prin măsurarea fragmentului Bb. Detectarea produsului fazei lichide a activării căii de atac a membranei, sC5b-9, atestă că complementul este activat complet. Deoarece atât calea lectinei, cât și calea clasică generează aceleași produse de

activare, C4a și C4d, măsurarea acestor două fragmente nu oferă nici o informație referitor la aceea, în care din aceste două căi au fost generate produsele de activare.

Inhibarea activării complementului dependente de MASP-2 este caracterizată prin cel puțin de una din următoarele modificări într-o componentă a sistemului complementului, care apare ca urmare a administrării unui agent inhibitor al MASP-2 în conformitate cu metodele prezentei invenții: inhibarea generării sau producerii produselor sistemului de activare a complementului dependentă de MASP-2: C4b, C3a, C5a și/sau C5b-9 (MAC) (măsurate, de exemplu, așa cum se descrie în Exemplul 2, reducerea scindării C4 și depunerii C4b (măsurată, de exemplu, cum se descrie în Exemplul 10) sau reducerea scindării C3 și depunerii C3b (măsurate, de exemplu, cum se descrie în exemplul 10).

AGENȚI ADIȚIONALI

Compozițiile și metodele, care conțin agenți inhibitori ai MASP-2, pot cuprinde opțional unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari, care pot amplifica activitatea agentului inhibitor al MASP-2 sau care asigură funcții terapeutice conexe într-un mod aditiv sau sinergic. De exemplu, în contextul tratării unui subiect care suferă de TTP, în care subiectul este pozitiv pentru un inhibitor al ADAM-TS13, pot fi administrați unul sau mai mulți agenți inhibitori ai MASP-2 în combinație (incluzând, administrarea concomitentă) cu unul sau mai mulți agenți imunosupresori. Agenții imunosupresori adecvați includ: corticosteroizi, rituxan, ciclosporină, etc. În contextul tratării unui subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a HUS sau aHUS, unul sau mai mulți agenți inhibitori ai MASP-2 pot fi administrați în combinație (incluzând administrarea concomitentă) cu un antibiotic potrivit. În contextul tratării unui subiect care suferă sau prezintă risc de a dezvolta aHUS, unul sau mai mulți agenți inhibitori ai MASP-2 pot fi administrați în combinație (incluzând administrarea concomitentă) cu alți agenți inhibitori ai complementului, cum ar fi eculizumab (Soliris), TT- 30, anticorp la factorul B sau alți agenți, care inhibă componentele terminale ale complementului sau amplificarea căii alternative.

Includerea și selecția agentului (agenților) suplimentar (i) va fi determinată pentru a obține un rezultat terapeutic desirabil. În unele variante de realizare agentul inhibitor al MASP-2 poate fi administrat în combinație cu unul sau mai mulți agenți antiinflamatori și/sau analgezici. Agenții antiinflamatori și/sau analgezici potriviți includ: antagoniști ai receptorilor de serotonină; agonști ai receptorilor serotoninici; antagoniști ai receptorului histaminic; antagoniști ai receptorului pentru bradikinină; inhibitori de kallikreină; antagoniști ai receptorilor de tahichinină, incluzând antagoniști ai subtipului receptorului neurokininei 1 și neurokininei 2; antagoniști ai receptorului peptidei genei calcitoninei (CGRP); antagoniști ai receptorilor de interleukină; inhibitori de enzime activi în calea sintetică de activare a metaboliților acidului arachidonic, incluzând inhibitori ai fosfolipazei, inclusiv inhibitorii izoformei PLA₂ și inhibitorii izoformei PLCT, inhibitori ai ciclooxigenazei (COX) (care pot fi inhibitori ai COX-1, COX-2 sau inhibitori neselectivi ai COX-1 și -2), inhibitori ai lipooxigenazei; antagoniști ai receptorului de prostanoïd, incluzând antagoniștii subtipului receptorului de eicosanoïd EP-1 și EP-4 și antagoniștii subtipului receptorului de tromboxan; antagoniști ai receptorilor de leucotrienă, incluzând antagoniștii ai subtipului receptorului de leucotrienă B4 și antagoniștii ai subtipului receptorului de leucotrienă D4; agonști ai receptorilor opioizi, incluzând agonștii subtipului receptorului μ -opioïd, δ -opioïd și agonștii subtipului receptorului κ -opioïd; agonștii și antagoniștii receptorului purinergic, incluzând antagoniștii receptorului P_{2X} și agonștii receptorului P_{2Y}; substanțe sensibile la adenozintrifosfat (ATP); substanțe, care deschid canalele de potasiu; inhibitori ai MAP kinazei; inhibitori ai acetilcolinei colinomimetice și agonști ai receptorilor alfa-adrenergici (incluzând agonști alfa-1, alfa-2 și alfa-1 și 2 neselectivi).

Agenții inhibitori ai MASP 2 din prezenta invenție pot fi, de asemenea, administrați în combinație cu unul sau mai mulți inhibitori ai complement, cum ar fi inhibitorul C5. Până în prezent, Eculizumab (Solaris®), un anticorp împotriva C5, este singurul medicament, direcționat asupra complementului, care a fost aprobat pentru uz uman. Cu toate acestea, s-a demonstrat că anumiți agenți farmacologici blochează complementul in vivo. K76COOH și mesilatul de nafamstat sunt doi agenți, care au demonstrat o anumită eficacitate în modelele experimentale de transplant pe animale (Miyagawa, S. et al., Transplant Proc. 24: 483-484, 1992). S-a demonstrat că heparinele micromoleculare sunt eficiente în reglarea activității complementului (Edens, R. E. et al., Complement Today, pp. 96-120, Basel: Karger, 1993). Se crede că acești inhibitori micromoleculari pot fi utili ca agenți pentru utilizare în combinație cu agenții inhibitori ai MASP-2 din prezenta invenție.

Alți inhibitori ai complementului, care apar în mod natural, pot fi utili în combinație cu agenții inhibitori ai MASP-2 din prezenta invenție. Inhibitorii biologici ai complementului includ factorul

1 solubil al complementului (sCR1). Acesta este un inhibitor natural, care poate fi găsit pe membrana exterioară a celulelor umane. Alți inhibitori ai membranei includ DAF, MCP și CD59. Formele recombinante au fost testate pentru activitatea lor anticomplementară *in vitro* și *in vivo*. sCR1 s-a dovedit a fi eficient în xenotransplant, în care sistemul complementului (atat calea alternativă, cât și clasică) asigură declanșarea unui sindrom de respingere hiperactivă în câteva minute de perfuzare a sangelui prin noul organ transplantat (Platt, J.L. et al., *Immunol.* 11: 450-6, 1990; Marino, I.R. et al., *Transplant Proc.*, 1071: 6, 1990; Johnstone, P.S. et al., *Transplantation* 54: 573-6, 1992). Utilizarea sCR1 protejează și prelungește timpul de supraviețuire al organului transplantat, implicând calea de activare a complementului în patogeneza supraviețuirii organelor (Leventhal, J.R. et al., *Transplantation* 55: 857-66, 1993; Pruitt, S.K. et al., *Transplantation* 57: 363-70, 1994).

Inhibitorii complementului adiționali potriviți pentru utilizare în combinație cu compozițiile din prezenta invenție includ, de exemplu, MoAb, cum ar fi un anticorp anti-C5 (de exemplu, eculizumab), care este elaborat de Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut, și MoAbs anti-properdină.

PURTĂTORI FARMACEUTICI ȘI SISTEME DE LIVRARE

În general, compozițiile de agent inhibitor al MASP-2 din prezenta invenție, combinate cu oricare alți agenți terapeutici selectați, se conțin în mod adecvat într-un purtător farmaceutic acceptabil. Purtătorul este netoxic, biocompatibil și este selectat astfel încât să nu afecteze negativ activitatea biologică a agentului inhibitor al MASP-2 (și a oricărui alt agent terapeutic combinat cu acesta). Exemple de purtători farmaceutici acceptabili pentru peptide sunt descrise în US 5,211,657, Yamada. Anticorpii anti-MASP2 și peptidele inhibitoare, utile în prezenta invenție, pot fi formulate în preparate în forme solide, semi-solide, gel, lichide sau gazoase, cum ar fi tablete, capsule, pulbere, granule, unguente, soluții, supozitoare, forme pentru inhalare și injecții, care să permită administrarea orală, parenterală sau chirurgicală. Invenția se referă, de asemenea, la administrarea locală a compozițiilor prin aplicarea unui înveliș din medicament pe dispozitive medicale și alte instrumente asemănătoare.

Purtătorii potriviți pentru administrare parenterală prin injecție, perfuzare sau irigare și livrare topică include: apă distilată, soluție salină tamponată cu fosfat fiziologic, soluții Ringer normale sau lactate, soluție de dextroză, soluția Hank sau propandiol. În plus, uleiurile sterile nevolatile pot fi utilizate ca solvent sau ca mediu de suspendare. Pentru acest scop se poate utiliza orice ulei biocompatibil, inclusiv mono- sau digliceridele sintetice. În plus, acizii grași, cum ar fi acidul oleic, se folosesc pentru prepararea preparatelor injectabile. Purtătorul și agentul pot fi compuși sub formă de gel, suspensie, gel polimerizabil sau nepolimerizabil, pastă sau cremă.

Purtătorul poate cuprinde, de asemenea, un vehicul de livrare pentru susținerea regimului de eliberare (adică, prolongat, întârziat sau reglat) al agentului (agenților) sau pentru a intensifica eliberarea, absorbția, stabilitatea sau farmacocinetica agentului (agenților) terapeutic(i). Un astfel de vehicul de livrare poate include, de exemplu, microparticule, microsfele, nanosfele sau nanoparticule compuse din proteine, lipozomi, carbohidrați, compuși organici sintetici, compuși anorganici, hidrogeluri polimerice sau copolimerice și miclele polimerice. Sistemele potrivite de hidrogel și micelare includ: copolimerii PEO:PHB:PEO și complexe copolimer/ciclodextrină (WO 2004/009664 A2) și PEO și complexe PEO/ciclodextrină (US nr. 2002/0019369 A1). Astfel de hidrogeluri pot fi injectate local în locul acțiunii intenționate sau subcutanat, sau intramuscular pentru a forma un depozit cu eliberare susținută.

Pentru administrare intraarticulară agentul inhibitor al MASP-2 poate fi transportat în purtători lichizi sau geluri, descriși mai sus, care sunt injectabili, vehicule de eliberare susținută descrise mai sus, care sunt injectabile, sau cu un derivat de acid hialuronic sau acid hialuronic.

Pentru administrarea orală a agenților nepeptidergici agentul inhibitor al MASP-2 poate fi transportat într-o umplutură sau un diluant inert, cum ar fi zaharoza, amidonul de porumb sau celuloza.

Pentru administrare topică agentul inhibitor al MASP-2 poate fi transportat în unguent, loțiune, cremă, gel, picături, supozitoare, spray, lichid sau pulbere sau în sisteme de gel sau microcapsulare de livrare printr-un plastru transdermal.

Diferite sisteme de administrare nazală și pulmonară, incluzând aerosoli, inhalatoare cu doză măsurată, inhalatoare cu pulbere uscată și nebulizatoare, sunt elaborate și pot fi adaptate în mod adecvat pentru livrarea compozițiilor prezentei invenții într-un vehicul de eliberare în aerosol, prin inhalare sau nebulizat.

Pentru administrare intratecală (IT) sau intracerebroventriculară (ICV) a compozițiilor prezentei invenții pot fi utilizate sisteme potrivite pentru administrare sterilă (de exemplu, lichide, geluri, suspensii, etc.).

- 5 Compozițiile, conform prezentei invenții, pot include, de asemenea, excipienți biocompatibili, cum ar fi agenți de dispersare sau de umectare, agenți de suspendare, diluanți, tampoane, agenți de stimulare a penetrării, emulsifianți, lianți, agenți de îngroșare, agenți de aromatizare (pentru administrare orală).

5 PURTĂTORI FARMACEUTICI PENTRU ANTICORPI ȘI PEPTIDE

- 10 Mai concret, în ceea ce privește anticorpii anti-MASP-2 și peptidele inhibitoare, formulările care le conțin pot fi administrate parenteral ca doze injectabile de soluții sau suspensii ale compusului într-un diluant fiziologic acceptabil cu un purtător farmaceutic care poate fi un lichid steril, cum ar fi apă, soluție fiziologică, glicerol sau etanol. În plus, în compozițiile cu conținut de anticorpi anti-MASP-2 și peptide inhibitoare pot fi prezente substanțe auxiliare, cum ar fi agenți de umectare sau emulsifiere, agenți tensioactivi, substanțe tampon, etc. Componentele suplimentare
- 15 ale compozițiilor farmaceutice includ uleiuri (cum ar fi de origine animală, vegetală sau sintetică), de exemplu, ulei de soia și ulei mineral. În general, glicolii, cum ar fi propilenglicolul sau polietilenglicolul, sunt purtători lichizi preferați pentru soluțiile injectabile.

- 20 Anticorpii anti-MASP-2 și peptidele inhibitoare pot fi, de asemenea, administrate sub forma unei injecții depozit sau a unui preparat implant, care pot fi formulate în așa mod încât să permită eliberarea susținută sau pulsatilă a agenților activi.

20 PURTĂTORI FARMACEUTIC ACCEPTABILI PENTRU INHIBITORII EXPRESIEI

- 25 Mai concret, inhibitorii de expresie, utili în metodele invenției, sunt furnizați în compoziții care conțin un inhibitor de expresie, cum s-a descris mai sus, și un purtător sau diluant farmaceutic acceptabil. Compoziția poate conține adițional un sistem de dispersie coloidală.

- 30 Compozițiile farmaceutice cu conținut de inhibitori de expresie pot include, dar nu se limitează la, soluții, emulsii și formulări care conțin lipozomi. Aceste compoziții pot fi preparate dintr-o varietate de componente care includ, dar nu se limitează la, lichide preformate, componente solide auto-emulsifiante și semisolidale auto-emulsifiante. Prepararea unor astfel de compoziții implică de obicei combinarea inhibitorului de expresie cu unul sau mai mulți dintre următoarele substanțe:
- 35 tampoane, antioxidanți, polipeptide micromoleculare, proteine, aminoacizi, carbohidrați, incluzând glucoză, zaharoză sau dextrină; agenți de chelare, cum ar fi EDTA, glutation și alți stabilizatori și excipienți. Soluția fiziologică tamponată neutră sau soluția fiziologică, amestecate cu albumină serică nespecifică, sunt exemple de diluanți potriviți.

- În unele variante de realizare compozițiile pot fi preparate și formulate ca emulsii, care de obicei reprezintă sisteme eterogene dintr-un lichid dispersat în altul sub formă de picături (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, vol.1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., NY, 1988). Exemplele de emulgatori naturali utilizați în formulările de emulsie includ acacia, ceara de albine, lanolină, lecitină și fosfatide.

- 40 Intr-o variantă de realizare compozițiile, care includ acizi nucleici, pot fi formulate ca microemulsii. O microemulsie, așa cum se utilizează aici, se referă la un sistem de apă, ulei și de substanță amfifilă, care reprezintă o soluție lichidă simplă optic izotropă și termodinamic stabilă (Rosoff in Pharmaceutical Dosage Forms, voi 1). Metoda, conform invenției, poate, de asemenea, să utilizeze lipozomi pentru transferul și eliberarea oligonucleotidelor antisens la locul necesar.

- 45 Compozițiile farmaceutice și formulările inhibitorilor de expresie pentru administrare topică pot include plasturi transdermali, unguente, loțiuni, creme, geluri, picături, supozitoare, spray-uri, lichide și pulberi. Se pot utiliza purtători farmaceutici uzuali, precum baze apoase, pulverulente sau uleioase și agenți de îngroșare, etc.

MODURI DE ADMINISTRARE

- 50 Compozițiile farmaceutice cu conținut de agenți inhibitori ai MASP-2 pot fi administrate în diferite moduri, în funcție de care mod de administrare, local sau sistemic, este cel mai potrivit pentru afecțiunea care se tratează. În plus, așa cum s-a descris mai sus, în legătură cu procedurile de reperfuzie extracorporală, agenții inhibitori ai MASP-2 pot fi administrați prin introducerea compozițiilor prezentei invenții în sângele sau plasma circulantă. Adițional, compozițiile prezentei invenții pot fi eliberate prin aplicarea unui înveliș pe dispozitivul medical implantabil sau prin
- 55 introducerea compoziției în interiorul dispozitivului medical implantabil.

LIVRAREA SISTEMICĂ

Așa cum se utilizează aici termenii "livrare sistemică" și "administrare sistemică" intenționează să includă, dar nu se limitează, căile orale și parenterale, incluzând căile intramusculare (IM), subcutanate, intravenoase (IV), intraarteriale, inhalatorii, topice, transdermale, nazale, rectale,

vaginale și alte căi de administrare, care conduc în mod eficient la dispersarea agentului eliberat într-un singur sau în mai multe situsuri de acțiune terapeutică intenționată. Căile preferate de livrare sistemică pentru compozițiile prezentei invenții includ: intravenoasă, intramusculară, subcutanată și inhalatoare. Se va înțelege, că calea exactă de administrare sistemică pentru agenții selectați, utilizați în compozițiile particulare ale prezentei invenții, va fi determinate, inclusive, având în vedere susceptibilitatea agentului la căile de transformare metabolică, asociate cu calea de administrare dată. De exemplu, agenții peptidici pot fi administrați cel mai adecvat pe alte căi, decât pe cale orală.

Anticorprii și polipeptidele inhibitoare ale MASP-2 pot fi administrate la un subiect, care are nevoie de acesta, prin orice metode potrivite. Metodele de administrare ale anticorpilor și polipeptidelor MASP-2 includ administrarea orală, pulmonară, parenterală (de exemplu intramusculară, intraperitoneală, intravenoasă (IV) sau prin injectare subcutanată), inhalatorie (cum ar fi pentru o formulare de pulbere fină), transdermală, rectală sau sublinguală în forme de dozare potrivite pentru fiecare cale de administrare.

Cu titlul de exemplu reprezentativ anticorprii și peptidele inhibitoare ale MASP-2 pot fi introduse într-un corp viu prin aplicarea pe o membrană a organismului, capabilă să absoarbă polipeptidele, de exemplu, pe membranele nazale, gastrointestinale și rectale. De obicei polipeptidele se aplică pe membrana absorbantă în combinație cu un amplificator de permeabilitate. (de exemplu, Lee, V.H.L., Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Sys. 5:69, 1988; Lee, V.H.L., J. Controlled Release 13: 213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., J. Controlled Release 13:241, 1990). De exemplu, STDHF este un derivat sintetic al acidului fusidic, un surfactant steroidic, care are o structură similară cu sărurile biliare, și a fost utilizat ca un potențator de permeabilitate pentru administrare nazală. (Lee, W.A., Biopharm., 22, Nov./Dec.1990).

Anticorprii și polipeptidele inhibitoare ale MASP-2 pot fi introduse în asociere cu o altă moleculă, cum ar fi o lipidă, pentru a proteja polipeptidele de degradare enzimatică. De exemplu, atașarea covalentă a polimerilor, în special a polietilenglicolului (PEG), a fost utilizată pentru a proteja anumite proteine de hidroliza enzimatică în organism și pentru a prelungi astfel timpul de înjumătățire (Fuertges, F. et al., J. Controlled Release 11: 139, 1990). S-a relatat despre existența mai multor sisteme de polimeri pentru administrarea proteinelor (Bae, Y.H., et al., J. Controlled Release 9:271, 1989; Hori, R., et al., Pharm. Res. 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., J. Pharm. Sci. 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., J. Controlled Release 10:195, 1989; Asano, M., et al., J. Controlled Release 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., J. Controlled Release 9:195, 1989; Makino, K., J. Controlled Release 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:219, 1989).

Recent au fost elaborați lipozomi cu stabilitate serică și circulantă îmbunătățită de odată și jumătate de ori (de exemplu, US 5.741.516, Webb). În plus, au fost revizuite diferite metode preparare a lipozomilor și a substanțelor similare lipozomilor ca purtători potențiali de medicament (de exemplu, US 5.567.434, Szoka; US 5.552.157, Yagi; US 5 565 213, Nakamori; US 5.738.868, Shinkarenko și US 5.795.587, Gao).

Pentru aplicațiile transdermale anticorprii și polipeptidele inhibitoare ale MASP-2 pot fi combinate cu alți ingrediente adecvați, cum ar fi purtători și/sau adjuvanți. Nu există nici o limitare a naturii acestor alte ingrediente, cu excepția faptului că acestea trebuie să fie farmaceutic acceptabile pentru administrarea necesară și să nu degradeze activitatea ingredientilor activi ai compoziției. Exemplele de medii potrivite includ unguente, creme, geluri sau suspensii, cu sau fără collagen purificat. Anticorprii și polipeptidele inhibitoare ale MASP-2 pot fi, de asemenea, impregnate în plasturi transdermali, plasturi și în bandaje, de preferință, în formă lichidă sau semi-lichidă.

Compozițiile prezentei invenții pot fi administrate sistemic periodic la intervale determinate pentru a menține un nivel dezirabil al efectului terapeutic. De exemplu, compozițiile pot fi administrate, cum ar fi prin injecție subcutanată, la fiecare două până la patru săptămâni sau la intervale mai puțin frecvente. Regimul de dozare va fi determinat de către medic, având în vedere diverși factori care pot influența acțiunea combinației de agenți. Acești factori vor include evoluția stării, care urmează a fi tratată, vârsta, sexul și greutatea corporală a pacientului și alți factori clinici. Doza de fiecare agent individual va varia în funcție de agentul inhibitor al MASP-2, inclus în compoziție, precum și de prezența și originea oricărui vehicul de eliberare a medicamentului (de exemplu, un vehicul cu eliberare prelungită). În plus, doza poate fi ajustată în funcție de variația frecvenței de administrare și a comportamentului farmacocinetic al agentului (agenților) livrat (livrați).

LIVRAREA LOCALĂ

Așa cum este utilizat aici, termenul "local" cuprinde aplicarea unui medicament pe sau în jurul unui loc de acțiune intenționată și poate include, de exemplu, administrarea topică pe piele sau pe alte țesuturi afectate, administrarea oftalmică, intratecală (IT), intracerebroventriculară (ICV), administrare intraarticulară, intracavitară, intracraniană sau intraveziculară, plasare sau irigare. Administrarea locală poate fi preferată pentru administrarea unei doze mai mici, pentru a evita efectele secundare sistemice și pentru un control mai precis al timpului de livrare și de concentrare a agenților activi în locul de livrare locală. Administrarea locală furnizează o concentrație cunoscută în locul țintă, indiferent de variabilitatea metabolismului, fluxului sanguin, etc., la diferiți pacienți. Controlul îmbunătățit al dozării este, de asemenea, asigurat de modul direct de livrare.

Administrarea locală a unui agent inhibitor al MASP-2 poate fi realizată în contextul metodelor chirurgicale pentru tratarea unei boli sau stări, cum ar fi, de exemplu, în timpul intervențiilor, cum ar fi chirurgia by-pass arterială, aterectomia, procedurile cu laser, procedurile ultrasonice, angioplastia cu balon și plasarea unui stent. De exemplu, un inhibitor al MASP-2 poate fi administrat unui subiect împreună cu o procedură de angioplastie cu balon. O procedură de angioplastie cu balon implică introducerea unui cateter, având un balon deflatat într-o arteră. Balonul deflat este poziționat în imediata apropiere a plăcii aterosclerotice și este umflat astfel încât placa este comprimată spre peretele vascular. Ca urmare, suprafața balonului este în contact cu stratul de celule endoteliale vasculare de pe suprafața vasului de sânge. Agentul inhibitor al MASP-2 poate fi atașat la cateterul de angioplastie cu balon într-o modalitate, care permite eliberarea agentului pe locul aflării plăcii aterosclerotice. Agentul poate fi atașat la cateterul cu balon în conformitate cu procedurile standard cunoscute în domeniu. De exemplu, agentul poate fi depozitat într-un compartiment al cateterului balonului până când balonul este umflat, moment în care este eliberat în mediul local. În mod alternativ, agentul poate fi impregnat pe suprafața balonului, astfel încât să intre în contact cu celulele peretelui arterial pe măsură ce balonul este umflat. Agentul poate fi, de asemenea, administrat într-un cateter cu balon perforat, cum ar fi cele descrise de Flugelman, M.Y. et al., *Circulation* 85: 1110-1117, 1992. A vedea, de asemenea, WO 95/23161 pentru un exemplu de procedură pentru atașarea unei proteine terapeutice la un cateter de angioplastie cu balon. De asemenea, agentul inhibitor al MASP-2 poate fi inclus într-un strat de gel sau într-o acoperire polimerică aplicată pe un stent sau poate fi încorporat în materialul stentului, astfel încât stentul să elibereze agentul inhibitor al MASP-2 după plasarea lui vasculară.

Compozițiile inhibitoare ale MASP-2, utilizate în tratamentul artritelor și al altor tulburări musculoscheletale, pot fi administrate local prin injecție intra-articulară. Astfel de compoziții pot include în mod adecvat un vehicul cu eliberare susținută. Ca un alt exemplu de caz, în care poate fi dorită eliberarea locală, compozițiile inhibitoare ale MASP-2, utilizate în tratamentul stărilor urogenitale, pot fi instilate intravezical sau în alte structuri urogenitale.

ÎNVELIȘURI PE UN DISPOZITIV MEDICAL

Agenții inhibitori ai MASP-2, cum ar fi anticorpii și peptidele inhibitoare pot fi imobilizate pe o suprafață (sau în interiorul) unui dispozitiv medical implantabil sau atașabil. Suprafața modificată va fi de obicei în contact cu țesutul viu după implantare într-un corp al animalului. Prin "dispozitiv medical implantabil sau atașabil" se înțelege orice dispozitiv, care este implantat sau atașat țesutului unui organism animal pe perioada funcționării normale a dispozitivului (de exemplu, stenturi și dispozitive implantabile de livrare a medicamentelor). Astfel de dispozitive medicale implantabile sau atașabile pot fi fabricate, de exemplu, din nitroceluloză, diazoceluloză, sticlă, polistiren, polivinilclorură, polipropilenă, polietilenă, dextran, sefaroză, agar, amidon, nailon, oțel inoxidabil, titan și polimeri biodegradabili și/sau biocompatibili. Legarea proteinei cu un dispozitiv poate fi realizată prin orice tehnică, care nu distruge activitatea biologică a proteinei legate, de exemplu prin atașarea la dispozitiv a unui sau a ambelor reziduuri N- C-terminale ale proteinei. De asemenea, atașarea poate fi făcută la una sau mai multe zone interne ale proteinei. Se pot folosi, de asemenea, multiple atașamente (atât interne, cât și capete ale proteinei). O suprafață a unui dispozitiv medical implantabil sau atașabil poate fi modificată pentru a include grupe funcționale (de exemplu carboxil, amidă, amino, eter, hidroxil, ciano, nitril, sulfanamido, acetilnică, epoxid, silanică, anhidrică, succinimică, azido) pentru imobilizarea proteinei pe aceasta. Metodele de interacțiune chimică includ, dar nu se limitează, formarea derivaților de ester, eteri, amide, azido și sulfanamido, cianat și altor legături cu grupele funcționale disponibile pe anticorpii sau pe peptidele inhibitoare ale MASP-2. Anticorpii sau fragmentele inhibitoare ale MASP-2 pot fi, de asemenea, atașate necovalent prin adăugarea la proteina secvenței unui marcaj afin, cum ar fi GST (D.B. Smith and K.S. Johnson, *Gene* 67:31, 1988), polihistidine (E. Hochuli et al.,

J. Chromatog., 411: 77, 1987) sau biotină. Astfel de marcaje afine pot fi utilizate pentru atașarea reversibilă a proteinei la un dispozitiv.

Proteinele pot fi, de asemenea, atașate covalent la suprafața unui corp de dispozitiv, de exemplu, prin activarea covalentă a suprafeței dispozitivului medical. Cu titlu de exemplu reprezentativ, proteinele matricelulare pot fi atașate la corpul dispozitivului prin oricare dintre următoarele perechi de grupe reactive (un membru al perechii fiind prezent pe suprafața corpului dispozitivului și celălalt membru al perechii fiind prezent pe proteinele matricelulare): grupa hidroxil/grupa acidului carboxilic pentru a produce o legătură esterică; grupa hidroxil/grupa de anhidridă pentru a produce o legătură esterică; grupa hidroxil/grupa izocianat pentru a produce o legătură uretanică. O suprafață a unui corp de dispozitiv, care nu posedă grupe reactive potrivite poate fi prelucrată prin tratarea plasmăi cu o sarcină de frecvență înaltă (RFGD) pentru a genera grupe reactive pentru a permite depunerea proteinelor matricelulare (de exemplu, tratarea plasmăi cu oxigen pentru introducerea grupelor cu conținut de oxigen; tratarea cu plasmă propil-amino pentru introducerea grupelor amino).

Agenții inhibitori ai MASP-2 cu conținut de molecule de acid nucleic, cum ar fi ARNi sau ADN antisens, codificatori ai inhibitorilor peptidei, pot fi încorporați în matrice poroase atașate la un corp de dispozitiv. Matricele poroase reprezentative, utile pentru realizarea stratului de suprafață, sunt cele preparate din collagenul tendonului sau pielii, disponibile dintr-o varietate de surse comerciale (de exemplu, Sigma and Collagen Corporation) sau matricele de collagen, preparate cum este descris în US 4,394,370, Jefferies și US 4,975,527, Koezuka. Un material colagenos este denumit UltraFiber™ și este disponibil de la Norian Corp. (Mountain View, California).

Anumite matrice polimerice pot fi, de asemenea, utilizate, dacă se dorește, și includ polimeri de ester acrilic și polimeri ai acidului lactic (US 4.526.909 și US 4.563.489, Urist. Exemplele particulare de polimeri utili sunt polimerii ortoesterilor, anhidridelor, propilen cofumaratelor sau un polimer al unuia sau al mai multor monomeri ai acidului α -hidroxicarboxilic (de exemplu, acidul α -hidroxiacetic (acidul glicolic) și/sau acidul α -hidroxipropionic (acidul lactic)).

SCHEME DE TRATMENT

În aplicațiile profilactice compozițiile farmaceutice se administrează la un subiect susceptibil sau cu risc de o afecțiune asociată cu activarea complementului dependentă de MASP-2 într-o cantitate suficientă pentru a elimina sau a reduce riscul de apariție a simptomelor afecțiunii. În aplicațiile terapeutice compozițiile farmaceutice se administrează la un subiect suspectat sau deja suferind de o afecțiune asociată cu activarea complementului dependentă de MASP-2 într-o cantitate terapeutic eficientă, suficientă pentru a ameliora sau cel puțin de a reduce parțial simptomele afecțiunii. În ambele scheme de tratament: profilactic și terapeutic, compozițiile cu conținut de agenți inhibitori ai MASP-2 pot fi administrate în câteva doze până la subiect se obține un rezultat terapeutic suficient. Aplicarea compozițiilor inhibitoare ale MASP-2 din prezenta invenție poate fi realizată printr-o singură administrare a compoziției sau administrări de un număr limitat de repetări pentru tratamentul unei stări acute, de exemplu, al leziunilor de reperfuzie sau altor leziuni traumatice. În mod alternativ, compoziția poate fi administrată la intervale periodice pentru o perioadă îndelungată de timp în tratamentul stărilor cronice, de exemplu, al artritelor sau psoriazisului.

Metodele și compozițiile prezentei invenții pot fi utilizate pentru a inhiba inflamația și procesele conexe, care rezultă în mod obișnuit din procedurile medicale și chirurgicale de diagnosticare și terapeutice. Pentru a inhiba astfel de procese, compoziția inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție poate fi aplicată periprocedural. Așa cum este utilizat aici termenul "periprocedural" se referă la administrarea compoziției inhibitoare preprocedural și/sau intraprocedural și/sau postprocedural, adică înainte de procedura, înainte și în timpul procedurii, înainte și după procedură, înainte, în timpul și după procedură, în timpul procedurii, în timpul și după procedură sau după procedură. Aplicarea periprocedurală poate fi realizată prin administrarea locală a compoziției pe locul chirurgical sau procedural, cum ar fi prin injecție sau irigarea continuă sau intermitentă a locului sau prin administrare sistemică. Metodele potrivite de administrare locală perioperatorie a soluțiilor de agent inhibitor al MASP-2 sunt descrise în US 6.420.432, Demopulos și US 6.645.168, Demopulos. Metodele adecvate de administrare locală a compozițiilor condroprotectoare, inclusiv a agentului (agenților) inhibitor(i) ai MASP-2 sunt dezvăluite în WO 01/07067 A2. Metodele și compozițiile adecvate pentru administrarea sistemică direcționată a compozițiilor condroprotectoare, inclusiv a agentului (agenților) inhibitor(i) ai MASP-2 sunt dezvăluite în WO 03/063799 A2.

Intr-un aspect al invenției compozițiile farmaceutice se administrează unui subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei microangiopatii trombotice (TMA). Într-o variantă de realizare TMA este selectat din grupa constând din sindrom hemolitic uremic (HUS), purpură trombotică trombocitopenică (TTP) și sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS). Într-o variantă de realizare TMA este aHUS. Într-o variantă de realizare compoziția se administrează unui pacient cu aHUS în timpul fazei acute a bolii. Într-o variantă de realizare compoziția se administrează unui pacient cu aHUS în timpul fazei de remisiune (adică, la un subiect care a fost recuperat sau parțial recuperat dintr-un epizod de fază acută aHUS, o astfel de remisiune se manifestă, de exemplu, prin creșterea numărului de trombocite și/sau concentrații serice reduse de LDH (de exemplu, Loirat C et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:60, 2011, încorporat aici ca referință). Într-o variantă de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei TMA, care este (i) o TMA asociată cancerului; (ii) o TMA asociată chimioterapiei; sau (iii) o TMA asociată transplantului (de exemplu, transplantului de organe, cum ar fi transplantul de rinichi sau transplantul de celule stem hematopoietice alogene). Într-o variantă de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a sindromului Upshaw-Schulman (USS). Într-o variantă de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a bolii Degos. Într-o variantă de realizare subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a sindromului antifosfolipidic catastrofal (CAPS). În aplicațiile terapeutice compozițiile farmaceutice se administrează la un subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei TMA într-o cantitate terapeutic eficientă, suficientă pentru a inhiba formarea trombilor, a elimina sau a reduce cel puțin de parțial simptomele afecțiunii.

Atât în regimul profilactic, cât și în cel terapeutic compozițiile, care conțin agenți inhibitori ai MASP-2, pot fi administrate în mai multe doze până la subiect se obține un rezultat terapeutic suficient. Într-o realizare a invenției agentul inhibitor al MASP-2 conține un anticorp anti-MASP-2, care poate fi administrat în mod adecvat unui pacient adult (de exemplu, o greutate corporală medie a adulților de 70 kg) în doză de la 0,1 mg până la 10.000 mg, mai potrivită fiind de la 1.0 mg până la 5.000 mg, mai potrivită de la 10.0 mg până la 2.000 mg, mai potrivită de la 10.0 mg până la 1.000 mg și încă mai potrivită de la 50.0 mg până la 500 mg. Pentru pacienții pediatrici doza poate fi ajustată proporțional cu greutatea pacientului. Pentru tratamentul TMA aplicarea compozițiilor inhibitoare ale MASP-2 din prezenta invenție poate fi realizată printr-o singură administrare a compoziției sau un număr limitat de administrări consecutive. În mod alternativ, pentru tratamentul TMA compoziția se poate administra la intervale periodice, cum ar fi zilnic, de două ori pe săptămână, săptămânal, o dată la două săptămâni, lunar sau bilunar pentru o perioadă îndelungată de timp.

În unele variante de realizare la un subiect, care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei TMA, anterior sau la momentul dat s-a tratat sau se tratează cu un inhibitor al componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții, conform invenției, cuprinzând un inhibitor al MASP-2 și administrarea suplimentară la subiect a unui inhibitor al componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare inhibitorul componentelor terminale ale complementului este un anticorp uman anti-C5 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. În unele variante de realizare inhibitorul activării componentelor terminale ale complementului este eculizumab.

Intr-un aspect al invenției compozițiile farmaceutice sunt administrate la un subiect susceptibil sau cu risc de dezvoltare aHUS într-o cantitate suficientă pentru a elimina sau a reduce riscul de apariție a simptomelor afecțiunii. În aplicațiile terapeutice compozițiile farmaceutice sunt administrate la un subiect suspectat sau deja suferind de aHUS într-o cantitate terapeutic eficientă, suficientă pentru a ușura, sau cel puțin de parțial, pentru a reduce simptomele afecțiunii. Într-un aspect al invenției înainte de administrare subiectul poate fi examinat pentru a determina dacă prezintă unul sau mai multe simptome ale aHUS, incluzând (i) anemie, (ii) trombocitopenie (iii) insuficiență renală și (iv) creșterea creatininei, iar compoziția din prezenta invenție este apoi administrată într-o cantitate eficientă și pentru o perioadă de timp suficientă pentru a îmbunătăți aceste simptome.

Intr-un alt aspect al invenției compozițiile inhibitoare ale MASP-2 ale prezentei invenții pot fi utilizate pentru a trata profilactic un subiect cu risc crescut de a dezvolta aHUS și astfel de a reduce probabilitatea instalării aHUS la subiect. Prezența la subiect a unui marcher genetic, cunoscut de a fi asociat cu aHUS, este determinată mai întâi prin efectuarea unui test genetic de screening pe o probă, prelevată de la subiect și prin identificarea prezenței a cel puțin de unui marcher genetic, asociat cu aHUS, a factorului H al complementului (CFH), a factorului I (CFI), a

factorului B (CFB), cofactorului membranei CD46, C3, proteinei asemănătoare cu factorul H al complementului (CFHR1), trombodulinei proteice anticoagulante (THBD), proteinei 3 asemănătoare cu factorul H al complementului (CFHR3) sau a proteinei 4 asemănătoare cu factorul H al complementului (CFHR4). Subiectul este apoi monitorizat periodic (de exemplu, lunar, trimestrial, de două ori pe an sau anual) pentru a determina prezența sau absența a cel puțin de unui simptom al aHUS, cum ar fi anemia, trombocitopenia, insuficiența renală și creșterea creatininei. La determinarea prezenței a cel puțin de unuia din aceste simptome, subiectului i se poate administra o cantitate dintr-un agent inhibitor al MASP-2 eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2, într-o cantitate eficientă și pentru o perioadă de timp suficientă pentru a îmbunătăți unul sau mai multe simptome. Într-un alt aspect al prezentei invenții un subiect cu risc crescut de a dezvolta aHUS, datorită faptului că a fost testat și determinat să aibă unul dintre markerii genetici asociați cu aHUS, poate fi monitorizat pentru apariția unui eveniment asociat cu declanșarea simptomelor clinice ale aHUS, inclusiv acțiunea îndelungată a unui medicament, infecție (de exemplu, infecție bacteriană), neoformațiune malignă, traumă, transplant de organe sau țesuturi și sarcină.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție, care conține o cantitate de un agent inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependente de MASP-2 poate fi administrată la un pacient care suferă sau prezintă risc de a dezvolta sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS) asociat unei infecții. De exemplu, un pacient care suferă sau prezintă risc de a dezvolta aHUS ne-enteric asociat cu o infecție *S. pneumonia* poate fi tratat cu compozițiile prezentei invenții.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect care suferă de aHUS poate fi inițial tratat cu o compoziție inhibitoare MASP-2 din prezenta invenție, care este administrată prin linia cateterului, cum ar fi linia cateterului intravenos sau linia cateterului subcutanat, pentru prima perioadă de timp, cum ar fi o oră, douăsprezece ore, o zi, două zile sau trei zile. Subiectul poate fi apoi tratat pentru a doua perioadă de timp cu compoziția inhibitoare a MASP-2, care se administrează prin injecții subcutanate obișnuite, cum ar fi injecții zilnice, de două ori pe săptămână, săptămânale, o dată la două săptămâni, lunar sau bilunar.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție inhibitoare a MASP-2 poate fi administrată la un subiect care suferă de aHUS în absența plasmeferezei (adică un subiect al cărui simptome aHUS nu au fost tratate cu plasmefereză și care nu au fost tratați cu plasmefereză în timpul tratamentului cu compoziția inhibitoare a MASP-2), pentru a evita complicațiile posibile ale plasmaferezei, incluzând hemoragia, infecția și expunerea la tulburări și/sau alergii inerente donatorului de plasmă sau la un subiect cărui îi este contraindicată plasmafereza sau în condiții în care plasmafereza nu este disponibilă.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție poate fi administrată la un subiect care suferă de aHUS concomitent cu tratarea pacientului cu plasmefereză. De exemplu, la un subiect care primește tratament cu plasmefereză poate fi apoi administrată compoziția inhibitoare a MASP-2 urmând sau alternând cu schimbul de plasmă.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect care suferă sau prezintă risc de a dezvolta aHUS și care este tratat cu o compoziție inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție poate fi monitorizat prin determinare periodică, cum ar fi la fiecare douăsprezece ore sau zilnic, a cel puțin de unui factor de complement, în care determinarea unui nivel redus cel puțin de un factor de complement, comparativ cu o valoare standard sau cu un subiect sănătos, indică necesitatea continuării tratamentului cu această compoziție.

Atât în regimul profilactic, cât și în cel terapeutic, compozițiile care conțin agenți inhibitori ai MASP-2, pot fi administrate în mai multe doze până la subiect se obține un rezultat terapeutic suficient. Intr-o realizare a invenției agentul inhibitor al MASP-2 cuprinde un anticorp anti-MASP-2, care poate fi administrat în mod adecvat unui pacient adult (de exemplu, cu o greutate corporală medie a adulților de 70 kg) într-o doză de la 0,1 mg până la 10.000 mg, mai potrivită fiind de la 1.0 mg până la 5.000 mg, mai potrivită de la 10.0 mg până la 2.000 mg, mai potrivită de la 10.0 mg până la 1.000 mg și încă mai potrivită de la 50.0 mg până la 500 mg. Pentru pacienții copii și adolescenți doza poate fi ajustată proporțional cu greutatea corporală a pacientului. Pentru tratamentul aHUS aplicarea compozițiilor inhibitoare ale MASP-2, conform prezentei invenții, poate fi realizată printr-o singură administrare a compoziției sau printr-un număr limitat de administrări consecvente. În mod alternativ, pentru tratamentul aHUS compoziția poate fi administrată la intervale periodice, cum ar fi zilnic, de două ori pe săptămână, săptămânal, o dată la două săptămâni, lunar sau de două ori pe lună, pentru o perioadă îndelungată de timp.

În unele variante de realizare subiectului, care suferă de aHUS, i-a fost administrat anterior sau este administrat la momentul dat un tratament cu un inhibitor al componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții, conform invenției, cuprinzând un inhibitor al MASP-2 și administrarea suplimentară la subiect a unui inhibitor al componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare inhibitorul componentelor terminale ale complementului este un anticorp uman anti-C5 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. În unele variante de realizare inhibitorul componentelor terminale ale complementului este eculizumab.

Intr-un aspect al invenției compozițiile farmaceutice sunt administrate la un subiect susceptibil sau cu risc de dezvoltare a HUS într-o cantitate suficientă pentru a elimina sau pentru a reduce riscul de apariție a simptomelor afecțiunii. În aplicații terapeutice compozițiile farmaceutice sunt administrate la un subiect suspectat sau deja suferind de HUS într-o cantitate terapeutic eficientă, suficientă pentru a ameliora, sau cel puțin, pentru a reduce parțial simptomele afecțiunii.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții probabilitatea tulburării funcției renale la un subiect cu risc de dezvoltare a HUS poate fi redusă prin administrarea unei compoziții inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții, într-o cantitate eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2. De exemplu, un subiect cu risc de dezvoltare a HUS și care urmează a fi tratat cu o compoziție inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții, poate prezenta unul sau mai multe simptome asociate cu HUS, incluzând diaree, nivelul hematocritului mai mic de 30% cu distrugerea intravasculară a eritrocitelor, trombocitopenie și niveluri înalte de creatinină. Cu titlul de exemplu, un subiect cu risc de dezvoltare a HUS și care urmează să fie tratat cu compozițiile inhibitoare ale MASP-2, conform prezentei invenții, poate fi infectat cu E. coli, shigella sau salmonella. Astfel de subiecți infectați cu E. coli, shigella sau salmonella pot fi tratați cu o compoziție inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții, concomitent cu tratamentul cu antibiotice sau, alternativ, pot fi tratați cu o compoziție inhibitoare a MASP-2 fără tratament concomitent cu un antibiotic, în particular pentru infecția cu E. coli enterogenic tratamentul cu antibiotic este contraindicat. Un subiect, infectat cu E. coli enterogenic, care a fost tratat cu un antibiotic poate avea un risc crescut de a dezvolta HUS și poate fi tratat în mod adecvat cu o compoziție inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții, pentru a reduce acest risc. Un subiect, infectat cu E. coli enterogenic, poate fi tratat pentru o primă perioadă de timp cu o compoziție inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție în absența unui antibiotic și apoi pentru a doua perioadă de timp, atât cu o compoziție inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții, cât și cu un antibiotic.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect, care suferă de HUS, poate fi inițial tratat cu o compoziție inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții, care este administrată prin linia cateterului, cum ar fi linia cateterului intravenos sau linia cateterului subcutanat, pentru o primă perioadă de timp, cum ar fi o oră, douăsprezece ore, o zi, două zile sau trei zile. Subiectul poate fi apoi tratat pentru a doua perioadă de timp cu compoziția inhibitoare a MASP-2, administrată prin injecții subcutanate obișnuite, cum ar fi injecții zilnice, o dată la două săptămâni, săptămânale, la fiecare două săptămâni, lunar sau bilunar.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție poate fi administrată unui subiect, care suferă de HUS, în absența plasmeferezei (adică, un subiect al cărui simptome HUS nu au fost tratate cu plasmefereză și care nu au fost tratați cu plasmefereză în momentul tratamentului cu compoziția inhibitoare a MASP-2), pentru a evita complicațiile posibile ale plasmaferezei, incluzând hemoragia, infecția și expunerea la tulburări și/sau alergii inerente donatorului de plasmă sau la un subiect cărui îi este contraindicată plasmafereza sau în cazul în care plasmafereza nu este disponibilă.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție poate fi administrată la un subiect, care suferă de HUS, concomitent cu tratarea pacientului cu plasmefereză. De exemplu, la un subiect care primește tratament cu plasmefereză poate fi apoi administrată compoziția inhibitoare a MASP-2 urmând sau alternând cu schimbul de plasmă.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect care suferă de HUS poate fi inițial tratat cu o compoziție inhibitoare MASP-2 din prezenta invenție, care este administrată prin linia cateterului, cum ar fi linia cateterului intravenos sau linia cateterului subcutanat, pentru prima perioadă de timp, cum ar fi o oră, douăsprezece ore, o zi, două zile sau trei zile. Subiectul poate fi apoi tratat pentru a doua perioadă de timp cu compoziția inhibitoare a MASP-2, care se administrează prin injecții subcutanate obișnuite, cum ar fi injecții zilnice, de două ori pe săptămână, săptămânale, o dată la două săptămâni, lunar sau bilunar.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție inhibitoare a MASP-2 poate fi administrată la un subiect care suferă de HUS în absența plasmeferezei (adică un subiect al cărui simptome HUS nu au fost tratate cu plasmefereză și care nu au fost tratați cu plasmefereză în timpul tratamentului cu compoziția inhibitoare a MASP-2), pentru a evita complicațiile posibile ale plasmaferezei, incluzând hemoragia, infecția și expunerea la tulburări și/sau alergii inerente donatorului de plasmă sau la un subiect căruia îi este contraindicată plasmafereza sau în cazul în care plasmafereza nu este disponibilă.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție poate fi administrată la un subiect care suferă de HUS concomitent cu tratarea pacientului cu plasmefereză. De exemplu, la un subiect care primește tratament cu plasmefereză poate fi apoi administrată compoziția inhibitoare a MASP-2 urmând sau alternând cu schimbul de plasmă.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect care suferă sau prezintă risc de a dezvolta HUS și care este tratat cu o compoziție inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție poate fi monitorizat prin determinare periodică, cum ar fi la fiecare douăsprezece ore sau zilnic, a cel puțin de unii factor de complement, în care determinarea unui nivel redus cel puțin de un factor de complement, comparativ cu o valoare standard sau cu un subiect sănătos, indică necesitatea continuării tratamentului cu această compoziție.

Atat în regimul profilactic, cât și în cel terapeutic, compozițiile care conțin agenți inhibitori ai MASP-2 pot fi administrate în mai multe doze până la subiect se obține un rezultat terapeutic suficient. Intr-o realizare a invenției agentul inhibitor al MASP-2 cuprinde un anticorp anti-MASP-2, care poate fi administrat în mod adecvat unui pacient adult (de exemplu, cu o greutate corporală medie a adulților de 70 kg) într-o doză de la 0,1 mg până la 10,000 mg, mai potrivită fiind de la 1,0 mg până la 5,000 mg, mai potrivită de la 10,0 mg până la 2,000 mg, mai potrivită de la 10,0 mg până la 1,000 mg și încă mai potrivită de la 50,0 mg până la 500 mg. Pentru pacienții pediatrici doza poate fi ajustată proporțional cu greutatea corporală a pacientului. Pentru tratamentul HUS aplicarea compozițiilor inhibitoare ale MASP-2, conform prezentei invenții, poate fi realizată printr-o singură administrare a compoziției sau printr-un număr limitat de administrări consecutive. În mod alternativ, pentru tratamentul aHUS compoziția poate fi administrată la intervale periodice, cum ar fi zilnic, de două ori pe săptămână, săptămânal, o dată la două săptămâni, lunar sau de două ori pe lună, pentru o perioadă îndelungată de timp.

În unele variante de realizare subiectului, care suferă de HUS, i-a fost administrat anterior sau este administrat la momentul dat un tratament cu un inhibitor al componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții, conform invenției, cuprinzând un inhibitor al MASP-2 și administrarea suplimentară la subiect a unui inhibitor al componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare inhibitorul componentelor terminale ale complementului este un anticorp uman anti-C5 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. În unele variante de realizare inhibitorul componentelor terminale ale complementului este eculizumab.

Intr-un aspect al invenției, compozițiile farmaceutice sunt administrate la un subiect susceptibil sau cu risc de dezvoltare a TTP într-o cantitate suficientă pentru a elimina sau a reduce riscul de apariție a simptomelor afecțiunii. În aplicațiile terapeutice compozițiile farmaceutice sunt administrate la un subiect suspectat sau deja suferind de TTP într-o cantitate terapeutic eficientă, suficientă pentru a ameliora, sau cel puțin, pentru a reduce parțial simptomele afecțiunii.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect, care prezintă unul sau mai multe dintre simptomele TTP, incluzând implicarea sistemului nervos central, trombocitopenia, implicarea cardiacă severă, afectarea pulmonară severă, infarctul gastro-intestinal și gangrene, poate fi tratat cu o compoziție inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții. Într-un alt aspect al prezentei invenții un subiect cu un nivel redus de ADAMTS13 și, de asemenea, testat pozitiv pentru prezența unui inhibitor al ADAMTS13 (adică un anticorp), poate fi tratat cu o compoziție inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții. Într-un alt aspect al prezentei invenții un subiect care este testat pozitiv pentru prezența unui inhibitor al ADAMTS13 poate fi tratat cu un imunosupresor (de exemplu, corticosteroizi, rituxan sau ciclosporină) concomitent cu tratamentul cu o compoziție inhibitoare a MASP-2 din prezenta invenție. Într-un alt aspect al prezentei invenții un subiect cu un nivel redus de ADAMTS13 și care este testat pozitiv pentru prezența unui inhibitor al ADAMTS13 poate fi tratat cu ADAMTS13 concomitent cu tratamentul cu o compoziție inhibitoare a MASP-2, conform prezentei invenții.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect care suferă de TTP poate fi inițial tratat cu o compoziție inhibitoare MASP-2 din prezenta invenție, care este administrată prin linia cateterului,

cum ar fi linia cateterului intravenos sau linia cateterului subcutanat, pentru prima perioadă de timp, cum ar fi o oră, douăsprezece ore, o zi, două zile sau trei zile. Subiectul poate fi apoi tratat pentru a doua perioadă de timp cu compoziția inhibitorie a MASP-2, care se administrează prin injecții subcutanate obișnuite, cum ar fi injecții zilnice, de două ori pe săptămână, săptămânale, o

5 dată la două săptămâni, lunar sau bilunar.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție inhibitorie a MASP-2 poate fi administrată la un subiect care suferă de TTP în absența plasmeferezei (adică un subiect al cărui simptome TTP nu au fost tratate cu plasmefereză și care nu au fost tratați cu plasmefereză în timpul tratamentului cu compoziția inhibitorie a MASP-2), pentru a evita complicațiile posibile ale plasmeferezei, incluzând hemoragia, infecția și expunerea la tulburări și/sau alergii inerente donatorului de plasmă sau la un subiect căruia îi este contraindicată plasmafereza sau în cazul în care plasmafereza nu este disponibilă.

10 Intr-un alt aspect al prezentei invenții o compoziție inhibitorie a MASP-2 din prezenta invenție poate fi administrată la un subiect care suferă de TTP concomitent cu tratarea pacientului cu plasmefereză. De exemplu, la un subiect care primește tratament cu plasmefereză poate fi apoi administrată compoziția inhibitorie a MASP-2 urmând sau alternând cu schimbul de plasmă.

Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect care suferă de TTP refractară, adică cu simptome de TTP, care nu răspund adecvat la alt tratament; cum ar fi plasmafereza, poate fi tratat cu o compoziție inhibitorie a MASP-2 din prezenta invenție cu sau fără plasmafereză adițională.

20 Intr-un alt aspect al prezentei invenții un subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a TTP și urmează a fi tratat cu o compoziție inhibitorie a MASP-2 din prezenta invenție poate fi monitorizat prin determinare periodică, cum ar fi la fiecare douăsprezece ore sau zilnic, a cel puțin de unii factor de complement, în care determinarea unui nivel redus cel puțin de un factor de complement, comparativ cu o valoare standard sau cu un subiect sănătos, indică necesitatea

25 continuării tratamentului cu această compoziție.

Atat în regimul profilactic, cât și în cel terapeutic, compozițiile care conțin agenți inhibitori ai MASP-2 pot fi administrate în mai multe doze până la subiect se obține un rezultat terapeutic suficient. Intr-o realizare a invenției agentul inhibitor al MASP-2 cuprinde un anticorp anti-MASP-2, care poate fi administrat în mod adecvat unui pacient adult (de exemplu, cu o greutate corporală medie a adulților de 70 kg) într-o doză de la 0,1 mg până la 10.000 mg, mai potrivită fiind de la 1.0 mg până la 5.000 mg, mai potrivită de la 10.0 mg până la 2.000 mg, mai potrivită de la 10.0 mg până la 1.000 mg și încă mai potrivită de la 50.0 mg până la 500 mg. Pentru pacienții pediatrici doza poate fi ajustată proporțional cu greutatea corporală a pacientului. Pentru tratamentul TTP aplicarea compozițiilor inhibitorie ale MASP-2, conform prezentei invenții, poate fi realizată

35 printr-o singură administrare a compoziției sau printr-un număr limitat de administrări consecutive. În mod alternativ, pentru tratamentul aHUS compoziția poate fi administrată la intervale periodice, cum ar fi zilnic, de două ori pe săptămână, săptămânal, o dată la două săptămâni, lunar sau de două ori pe lună, pentru o perioadă îndelungată de timp.

În unele variante de realizare subiectului, care suferă de TTP, i-a fost administrat anterior sau este administrat la momentul dat un tratament cu un inhibitor al componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții, conform invenției, cuprinzând un inhibitor al MASP-2 și administrarea suplimentară la subiect a unui inhibitor al componentelor terminale ale complementului, care inhibă scindarea proteinei C5 a complementului. În unele

45 variante de realizare inhibitorul componentelor terminale ale complementului este un anticorp uman anti-C5 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului. În unele variante de realizare inhibitorul componentelor terminale ale complementului este eculizumab.

VI. EXEMPLE

Exemplele care urmează ilustrează cel mai bun regim, examinat în prezent pentru aplicarea practică a invenției, dar ele nu trebuie examinate ca limitând volumul invenției. Toate citările din literatura de specialitate sunt incluse în mod expres prin referință.

EXEMPLUL 1

Acest exemplu descrie generarea unei tulpini de șoareci cu deficit de MASP-2 (MASP-2^{-/-}), dar suficientă pentru MAP19 (MAP19^{+/+}).

55 Materiale și metode: Vectorul de direcționare pKO-NTKV 1901 a fost conceput pentru a perturba cele trei exone, care codifică C-terminal al MASP-2 murină, incluzând exonul care codifică domeniul serin proteazei, așa cum se arată în fig. 3. PKO-NTKV 1901 s-a utilizat pentru a transfecta linia de celule E14.1a (SV129 Ola) embrionare murine ES. S-au selectat clone rezistente la neomicină și sensibile la timidin kinază. 600 de clone ES s-au scanat și din acestea s-au

identificat patru clone diferite, care s-au verificat prin southern blot pentru conținutul evenimentului de țintire și recombinare selectivă dezirabil, așa cum se arată în fig. 3. Himerele au fost generate din aceste patru clone pozitive prin transferul de embrioni. Himerele au fost apoi reîncrucișate în fondul genetic C57/BL6 cu crearea masculilor transgenici. Masculii transgenici au fost încrucișați cu femele pentru a genera F1s cu 50% din descendenți manifestând heterozigotitate pentru gena MASP-2 întreruptă. Șoarecii heterozigoți au fost interfecundați pentru a genera descendenți cu deficiența MASP-2 homozigotă, rezultând cu șoareci heterozigoți și sălbatici în raport de 1:2:1, respectiv.

Rezultate și fenotip: S-a constatat că șoarecii homozigoți MASP-2^{-/-} deficienți obținuți s-au dovedit a fi viabili și fertili și MASP-2 deficiența a fost verificată prin southern blot pentru a confirma evenimentul de țintire corectă, prin Northern blot pentru a confirma absența ARNm MASP-2 și pentru a confirma absența proteinei MASP-2 (datele nu sunt prezentate). Prezența ARNm MASP-19 și absența ARNm MASP-2 au fost confirmate în continuare folosind reacția de polimerază în lanț cu transcriere inversă (RT-PCR) în regim de timp real folosind un dispozitiv LightCycler. Șoarecii MASP-2^{-/-} continuau să exprime MASP-19, MASP-1 și ARNm și proteină MASP-3, așa cum s-a așteptat (datele nu sunt prezentate). Prezența și abundența ARNm la șoarecii MASP-2^{-/-} pentru Properdină, Factorul B, Factorul D, C4, C2 și C3 au fost evaluate prin analiza LightCycler și s-a constatat că sunt identice cu cele de la animalele unipare de tip sălbatic de control (datele nu sunt prezentate). Plasma de la șoarecii MASP-2^{-/-} homozigoți este total deficitară de activarea complementului mediată de calea lectinei, așa cum este descris în continuare în Exemplul 2.

Generarea unei tulpini MASP-2^{-/-} pe descendenți genetic puri C57BL6. Șoarecii MASP-2^{-/-} au fost încrucișați invers cu o linie pură C57BL6 timp de nouă generații înainte de utilizarea tulpinii MASP-2^{-/-} în calitate de model experimental pe animale.

O tulpină transgenică de șoarece, care este MASP-2^{-/-}, MASP-19^{+/+} murină și care exprimă o transgenă umană MASP-2 (MASP-2 murină cnoctat sau MASP-2 umană cnoctat) a fost de asemenea generată după cum urmează:

Materiale și metode: O minigenă, care codifică MASP-2 umană, numită "mini hMASP-2" (SEC ID NR: 49), așa cum se arată în fig. 4, a fost construită, incluzând regiunea promotor a genei MASP-2 umane, conținând primii 3 exoni (exonul 1 - exonul 3) urmată de secvența ADNC, care reprezintă secvența de codificare a următorilor 8 exoni, codificând astfel proteina MASP-2 cu lungime completă, condusă de promotorul său endogen. Constructul mini hMASP-2 s-a injectat în ovulele fertilizate ale șoarecilor MASP-2^{-/-} pentru a înlocui gena MASP-2 murină deficitară prin MASP-2 umană exprimată transgenic.

EXEMPLUL 2

Acest exemplu demonstrează, că MASP-2 este necesară pentru activarea complementului prin calea lectinei.

Metode și materiale:

Testul de scindare C4 specific pentru calea lectinei de activare a complementului. Un test de scindare C4 a fost descris de Petersen et al., J. Immunol. Metode 257: 107 (2001), în care se măsoară activarea căii lectinei, cauzată de acidul lipoteicoic (LTA) de la *S. aureus*, care leagă L-ficolina. Analiza, descrisă de Petersen et al., (2001), a fost adaptată pentru a măsura activarea căii lectinei cu MBL prin acoperirea plăcii cu LPS și manan sau zimosan înainte de adăugarea serului de la șoarecii MASP-2^{-/-}, așa cum este descris în continuare. Analiza a fost, de asemenea, modificată pentru a elimina posibilitatea scindării C4 prin calea clasică. Aceasta s-a realizat prin utilizarea unui tampon de diluție a probei conținând 1 M NaCl, care permite legarea cu afinitate înaltă a componentelor de recunoaștere ale căii lectinei cu liganzii lor, dar previne activarea C4 endogenă, excluzând astfel participarea căii clasice în disocierea complexului C1. Succint, în studiul modificat probele de ser (diluante în tampon cu conținut înalt de sare (1M NaCl)) se adaugă pe plăcile acoperite cu un strat de ligand, urmată de adăugarea unei cantități constante de C4 purificat într-un tampon cu o concentrație fiziologică de sare. Complexe de recunoaștere legate, care conțin MASP-2, scindează C4, rezultând cu depunerea C4b.

Metode de cercetare:

1) Plăcile de microtitrare Nunc Maxisorb (Maxisorb, Nunc, Cat. No. 442404, Fisher Scientific) se acoperă cu un strat de 1 μg/ml manan (M7504 Sigma) sau cu orice alt ligand (de exemplu, cum ar fi cele enumerate în continuare) diluat în tampon de înveliș (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6).

În studiu s-au utilizat reactivile următoare:

a) manan (1 μg/godeu manan (M7504 Sigma) în 100 μl de tampon de înveliș):

- b) zimosan (1 µg/godeu zimosan (Sigma) în 100 µl de tampon de înveliș);
c) LTA (1µg/godeu în 100 µl de tampon de înveliș sau 2 µg/godeu în 20 µl metanol)
- 5 d) 1 µg de H-ficolină specifică pentru Mab 4H5 în tampon de înveliș
e) PSA din *Aerococcus viridans* (2 µg/godeu în 100 µl de tampon de înveliș)
f) 100 µl/godeu de *S. aureus* DSM20233 fixat în formalină (OD₅₅₀=0.5) în tampon de înveliș.
- 2) Plăcile se incubează peste noapte la 4°C.
- 3) După incubarea peste noapte, situsurile de legare a proteinei reziduale se saturează prin
10 incubarea plăcilor cu 0.1% HSA-TBS tampon de blocare (0.1% (w/v) HSA în 10 mM Tris-CL, 140 mM NaCl, 1.5 mM NaN₃, pH 7.4) pentru 1-3 ore, apoi plăcile se spală de 3 ori cu TBS/tween/Ca²⁺ (TBS cu 0.05% Tween 20 și 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4).
- 4) Probele de ser, care urmează a fi testate, se diluează în MBL-tampon de legare (1 M NaCl) și probele diluate se adaugă pe plăci și se incubează peste noapte la 4°C. Godeurile numai
15 cu tampon se utilizează în calitate de control negativ.
- 5) După incubarea peste noapte la 4°C, plăcile se spală de 3 ori cu TBS/tween/Ca²⁺. C4 uman (100 µl/godeu de 1 µg/ml diluat în BBS (4 mM barbital, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4)) se adaugă apoi pe plăci și se incubează pentru 90 minute la 37°C. Plăcile se spală repetat de 3 ori cu TBS/tween/Ca²⁺.
- 20 6) Depunerea C4b se detectează cu anticorp de pui anti-C4c uman conjugat cu fosfatază alcalină (diluat 1:1000 în TBS/tween/Ca²⁺), care se adaugă pe plăci și se incubează pentru 90 minute la temperatura camerei. Plăcile apoi se spală repetat de 3 ori cu TBS/tween/Ca²⁺.
- 7) Fosfataza alcalină se detectează prin adăugarea 100 µl de soluție de substrat de *p*-nitrofenil fosfat, se incubează la temperatura camerei pentru 20 minute și se citește OD₄₀₅ într-un cititor de
25 plăci de microtitrare.
- Rezultate: Fig. 5A-B prezintă cantitatea de C4b depus pe manan (fig.5A) și pe zimosan (fig.5B) în diluții ale serului de la șoareci MASP-2+/+ (cruciliți), MASP-2+/- (cercuri umbrite) și MASP-2/- (triunghiuri umbrite). Fig. 5C arată activitatea relativă a C4 convertazei pe plăcile acoperite cu un strat de zimosan (bare albe) sau manan (bare hașurate) de la șoareci MASP-2-/ (n = 5) și șoareci MASP-2/- (n = 4) în raport cu șoarecii de tip sălbatic (n=5), obținută prin
30 măsurarea cantității de C4b depus normalizată la serul șoarecilor de tip sălbatic. Barele de eroare reprezintă deviația standard. Așa cum se arată în fig.5A C, plasma de la șoarecii MASP-2/- este complet deficientă în activarea complementului, mediată de calea lectinei, pe plăcile acoperite cu un strat de manan și zimosan. Aceste rezultate demonstrează clar, că MASP-2 este o componentă
35 efectoare a căii lectinei.
- MASP-2 recombinant reconstituie activarea C4 dependentă de calea lectinei în serul de la șoareci MASP-2/-
- Pentru a stabili, că absența MASP-2 este cauza directă a pierderii activării C4 dependentă de calea lectinei la șoarecii MASP-2/-, efectul adăugării proteinei MASP-2 recombinante în probele de
40 ser a fost examinat în testul de scindare C4, descris mai sus. Se obțin proteinele recombinante ale MASP-2 murine funcțional active și MASP-2A murine catalitic inactive (în care reziduul de serină din domeniul serin proteazei a fost substituit cu reziduul de alanină) și se purifică, așa cum se descrie în continuare în Exemplul 3. Serul combinat de la 4 șoareci MASP-2/- a fost preincubat cu concentrații crescândă proteină MASP-2 murină recombinantă sau MASP-2A murină
45 recombinantă inactivă și activitatea convertazei C4 a fost analizată așa cum s-a descris mai sus.
- Rezultate: După cum se arată în fig. 6, adăugarea proteinei MASP-2 recombinante murine funcțional active (prezentată cu triunghiuri deschise) la serul obținut de la șoarecii MASP-2/- restabilește activarea C4 dependentă de calea lectinei, în timp ce proteina MASP-2A murină catalitic inactivă (prezentată cu stelute) nu a restabilit activarea C4. Rezultatele prezentate în fig. 6
50 sunt normalizate la activarea C4 observată în serul șoarecilor de tip sălbatic (prezentat cu o linie punctată).

EXEMPLUL 3

Acest exemplu descrie expresia recombinantă și producția de proteină a MASP-2 umană, de șobolan și murină recombinantă cu lungime completă, a polipeptidelor derivate din MASP-2 și a formelor mutante catalitic inactivate ale MASP-2

5 Expresia MASP-2 umană, murină și de șobolan cu lungime completă:

Secvența ADNc cu lungime completă a MASP-2 umană (SECV ID NR: 4) a fost, de asemenea, subclonată în vectorul de expresie mamifer pCI Neo (Promega), care conduce exprimarea eucariotă sub controlul regiunii CMV amplificatoare/promotoare (Kaufman R.J. et al., *Nucleic Acids Research* 19: 448-590, 1991; Kaufman, *Metode in Enzymology*, 185: 537-66 (1991)).
 10 ADNc de șoarece cu lungime completă (SECV ID NR: 50) și ADNc MASP-2 de șobolan (SECV ID NR: 53) au fost fiecare subclonate în vectorul de expresie pED. Vectorii de expresie MASP-2 au fost apoi transfectați în linia de celule adezive DXB1 ovariene de hamster chinezesc, folosind procedura de transfecție standard cu fosfat de calciu, descrisă de Maniatis et al., 1989. Celulele transfectate cu aceste constructe cresc foarte încet, ceea ce înseamnă că proteaza codificată este
 15 citotoxică.

Intr-o altă abordare, constructul de minigenă (SECV ID NR: 49), care conține ADNc uman al MASP-2, condus cu promotorul său endogen este transfectat tranzitoriu în celule ovariene de hamster chinezesc (CHO). Proteina MASP-2 umană este secretată în mediul de cultură și izolată așa cum se descrie în continuare.

20 Expresia MASP-2 catalitic inactivă cu lungime completă:

Actualitate: MASP-2 este activată prin scindare autocatalitică după ce subcomponentele de recunoaștere MBL sau ficoline (fie L- ficolina, H-ficolina sau M-ficolina) se leagă cu modelul lor carbohidrat respectiv. Scindarea autocatalitică, care are drept rezultat activarea MASP-2, deseori
 25 apare în timpul procedurii de izolare a MASP-2 din ser sau în timpul purificării după expresia recombinantă. Pentru a obține un preparat proteic mai stabil pentru utilizare ca antigen, a fost creată o formă catalitic inactivă de MASP-2, proiectată ca MASP-2A, creată prin înlocuirea rezidului de serină, care este prezent în triada catalitică a domeniului proteazei, cu un reziduu de alanină la șobolan (SECV ID NR: 55 Ser617 pe Ala617); la șoarece (SECV ID NR: 52 Ser617 pe Ala617); sau la om (SECV ID NR: 3 Ser618 pe Ala618).

30 Pentru a genera proteine MASP-2A umane și murine catalitic inactive, s-a efectuat mutageneza direcționată pe situs folosind oligonucleotidele prezentate în Tabelul 5.

Oligonucleotidele din tabelul 5 au fost proiectate pentru unirea cu regiunea ADNc umană și murină, care codifică serina enzimatic activă și oligonucleotida conține o nepotrivire pentru a transforma codonul serinei în codonul alaninei. De exemplu, s-a utilizat PCR a oligonucleotidelor
 35 SEQ ID NOS: 56-59 în combinație cu ADNc MASP-2 uman (SECV ID NR: 4) pentru a amplifica regiunea de la codonul de start până la serina enzimatic activă și de la serină până la codonul de terminare pentru a genera citirea completă deschisă din MASP-2A mutantă, care conține mutația Ser618 în Ala618. După electroforeză pe gel de agaroză, produsele PCR s-au purificat și s-a generat preparatul discului cromozomilor și suprapuneri adenzine unice, folosind o procedură
 40 standard de creștere. Apoi MASP-2A cu adenzină la capăt a fost clonată în vectorul simplu pGEM-T, transformat în *E. coli*.

O proteină MASP-2A de șobolan catalitic inactivă a fost generată prin kinizarea și renaturarea SECV ID NR: 64 și SECV ID NR: 65 prin combinarea acestor două oligonucleotide în cantități molare egale, încălzind la 100°C timp de 2 minute și răcind lent până la temperatura camerei.
 45 Fragmentul, rezultat din renaturare, conținea capete compatibile cu Pst1 și Xba1 și era inserat în locul fragmentului Pst1-Xba1 al ADNc MASP-2 de șobolan de tip sălbatic (SECV ID NR: 53) pentru a genera MASP-2A de șobolan.

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

5' CTAGAAACACTAATGCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO:65).

50 MASP-2A umană, murină și de șobolan au fost subclonate în continuare în oricare dintre vectorii de expresie de mamifere pED sau pCI Neo și transfectați în linia de celule DXB1 ovariene de hamster chinezesc, așa cum este descris în continuare.

Intr-o altă abordare, o formă catalitic inactivă a MASP-2 este construită utilizând metoda descrisă de Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 276 (28): 25894-25902, 2001. Succint, plasmida care
 55 conține ADNc MASP-2 uman de lungime completă (descrisă de Thiel et al., *Nature* 386: 506, 1997) este tăiată cu *Xho*1 și *Eco*R1 și ADNc MASP2 (descris aici ca SECV ID NR: 4) este clonat în situsurile de restricție corespunzătoare ale vectorului de transfer al pFastBac1 de baculovirus (Life Technologies, NY). Situsul activ de serin protează MASP-2 în Ser618 este apoi înlocuit cu Ala618 prin substituirea oligonucleotidelor dublu catenare, care codifică regiunea peptidă de la

aminoacidul 610 până la 625 (SECV ID NR: 13) cu aminoacizii 610 până la 625 ai regiunii native pentru a crea polipeptida MASP-2 cu lungime completă cu un domeniu al proteazei inactiv.

Construcția plasmidelor de expresie, care conțin regiunile de polipeptidă derivate din MASP-2 umană.

- 5 Următoarele constructe sunt produse utilizând peptida de semnalizare MASP-2 (reziduurile 1-5 din SECV ID NR: 5) pentru a secreta diferite domenii ale MASP-2. Un construct, care exprimă domeniul CUBI al MASP-2 umane (SECV ID NR: 8) se obține prin metoda de amplificare prin PCR a regiunii, care codifică reziduurile 1-121 ale MASP-2 (SECV ID NR: 6) (corespunzător domeniului CUBI N-terminal). Un construct, care exprimă domeniul CUBIEGF al MASP-2 umane (SECV ID NR: 9) se obține prin metoda de amplificare prin PCR a regiunii, care codifică reziduurile 1-166 ale MASP-2 (SECV ID NR: 6) (corespunzător domeniului CUBIEGF N-terminal). Un construct, care exprimă domeniul CUBIEGFCUBII al MASP-2 umane (SECV ID NR: 10) se obține prin metoda de amplificare prin PCR a regiunii, care codifică reziduurile 1-293 ale MASP-2 (SECV ID NR: 6) (corespunzător domeniului CUBIEGFCUBII N-terminal).
- 15 Domeniile, menționate mai sus, sunt amplificate prin PCR utilizând Vent_R polimerazei și pBS MASP-2 ca șablon, conform metodelor PCR stabilite. Secvența primerului 5' a primerului sens (5' CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SECV ID NR: 34) introduce un situs de restricție *Bam*HI (subliniat) la capătul 5' al produselor PCR. Primerii antisens pentru fiecare dintre domeniile MASP-2, prezentate în continuare în Tabelul 5, sunt concepute pentru a introduce un
- 20 codon terminal (caractere aldine) urmat de un situs *Eco*RI (subliniat) la sfârșitul fiecărui produs PCR. După amplificare fragmentele de ADN sunt digerate cu restricțazele *Bam*HI și *Eco*RI și se clonează în situsurile corespunzătoare ale vectorului pFastBac1. Constructele obținute sunt caracterizate prin cartografierea restricțiilor și confirmate prin secvențierea dsADN.

PRIMERII MASP-2 PENTRU PCR

Tabelul 5

Domeniul MASP-2	Primerul 5' PCR	Primerul 3' PCR
SEQ ID NO:8 CUBI (aa 1–121 din SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (aa 1–166 din SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGCT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (aa 1-293 din SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGAT 3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 MASP-2 umană	5'ATGAGGCTGCTGACCTCCTGGGCCTTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_direct	5'TTAAAATCACTAATTATGTTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_invers
SEQ ID NO:4 ADNc MASP-2 uman	5'CAGAGGTGACGCAGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_direct	5'GTGCCCCTCCTGCGTCACCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_invers
SEQ ID NO:50 ADNc MASP-2 murin	5'ATGAGGCTACTCATCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_direct	5'TTAGAAATTACTTATTATGTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_invers
SEQ ID NO:50 ADNc MASP-2 murin	5'CCCCCCTGCGTCACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_direct	5'CTGCAGAGGTGACGCAGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_invers

- 25 Expresia eucariotă a MASP-2 recombinantă și obținerea proteinelor MASP-2A de șoarece, de șobolan și umană enzimatic inactivă.

- 30 Constructele de expresie a MASP-2 și MASP-2A, descrise mai sus, au fost transfectate în celulele DXB1, utilizând procedura de transfecție standard cu fosfat de calciu (Maniatis et al., 1989). MASP-2A s-a obținut într-un mediu fără ser pentru a exclude contaminarea preparatelor cu alte proteine serice. Mediile de cultură au fost recoltate din celulele confluențe fiecare a doua zi (de patru ori în total). Nivelul de MASP-2A recombinantă constituia 1,5 mg/litru de mediu de cultură pentru fiecare dintre cele trei specii.

Purificarea proteinei MASP-2A: MASP-2A (forma mutantă Ser-Ala descrisă mai sus) a fost purificată prin cromatografie de afinitate pe coloane cu MBP-A-agaroză. Această strategie a

permis o purificare rapidă fără utilizarea unor marcher străini. MASP-2A (100-200 ml de mediu de cultură diluat cu un volum egal de tampon de încărcare (50 mM Tris-Cl, pH 7,5, conținând 150 mM NaCl și CaCl_2 25 mM) s-a încărcat pe o coloană pentru cromatografie de afinitate pe MBP-agaroză (4 ml) preechilibrată cu 10 ml de tampon de încărcare. După spălare cu încă 10 ml tampon de încărcare, proteina a fost eluată în 1 ml fracții cu 50 mM Tris Cl, pH 7,5, conținând 1,25 M NaCl și 10 mM EDTA. Fracțiile, conținând MASP-2A, au fost identificate prin electroforeză în gel de poli(acrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu. Dacă este necesar, MASP-2A a fost purificată în continuare prin cromatografie cu schimb de ioni pe o coloană MonoQ (HR 5/5). Proteina a fost dializată cu 50 mM Tris Cl pH 7,5, conținând 50 mM NaCl și încărcată pe coloana echilibrată cu același tampon. După spălare MASP-2A legată a fost eluată cu o soluție cu un gradient de 0,05-1 M NaCl în 10 ml.

Rezultate: Randamentul proteinei MASP-2A a constituit 0.25–0.5 mg în 200 ml de mediu de cultură. Masa moleculară, determinată spectrometria de masă cu desorbția cu laser cu matrită activate/ionizare (MALDI MS) constituia 77,5 kDa, fiind mai mare, decât valoarea calculată a polipeptidei nemodificate (73,5 kDa), datorită glicozilării. Creșterea masei observate se explică prin atașarea glicanilor la fiecare dintre situsurile de N-glicozilare. MASP-2A migrează sub formă de bandă unică pe geluri de poli(acrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu, ceea ce atestă că în timpul biosintezei nu este procesată proteolitic. Masa moleculară medie, determinată prin ultracentrifugare de echilibru, este în concordanță cu valoarea calculată pentru homodimerii polipeptidei glicozilate.

PRODUCEREA POLIPEPTILOR MASP-2 UMANE RECOMBINANTE

O altă metodă de producere a polipeptidelor derivate din MASP-2 și MASP-2A recombinante este descrisă în Thielens, N. M. et al., J. Immunol. 166. 5068-5077, 2001. Succint, celulele de insecte *Spodoptera Frugiperda* (celulele Ready Plaque Sf9 obținute de la Novagen, Madison, WI) sunt cultivate și menținute în mediu de cultură fără ser SF900II (Life Technologies) suplimentat cu 50 UI/ml de penicilină și 50 mg/ml de streptomycină (Life Technologies). Celulele de insectă *Trichoplusia ni* (High Five) (furnizate de Jadwiga Chroboczek, Institutul de Biologie Structurală, Grenoble, Franța) sunt menținute în mediul de cultură TC100 (Life Technologies) conținând 10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, Franța) suplimentat cu 50 UI/ml de penicilină și 50 mg/ml de streptomycină. Baculovirusurile recombinante sunt generate folosind sistemul Bac-to-Bac (Life Technologies). ADN de bacmid este purificat, utilizând sistemul de purificare Qiagen midiprep (Qiagen) și este utilizat pentru transfecția celulelor de insectă SF9, utilizând celfectină în mediul de cultură SF900 II SFM (Life Technologies), așa cum este descris în protocolul producătorului. Particulele de virus recombinant sunt colectate peste 4 zile, apoi titrate cu un test virusologic de formare a plăcilor și se amplifică, așa cum este descris de King and Possee, in *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Chapman and Hall Ltd., London, pp. 111-114, 1992.

Celulele High Five ($1,75 \times 10^7$ celule într-un balon cu volumul de 175 cm² pentru cultivarea culturilor tisulare) sunt infectate cu virusurile recombinante care conțin polipeptide MASP-2 la o multiplicitate de infectare 2 în mediu SF900 II SFM la 28°C timp de 96 de ore. Supernatantele s-au colectat prin centrifugare și s-a adăugat diizopropil fosforfluoridat până la o concentrație finală de 1 mM.

Polipeptidele MASP-2 sunt secretate în mediul de cultură. Supernatantele de cultură sunt dializate împotriva 50 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 50 mM clorhidrat de trietanolamină, pH 8,1 și încărcate cu un consum de 1,5 ml/min pe o coloană Q-Sepharose cu flux rapid (Amersham Pharmacia Biotech) (2,8 x 12 cm), echilibrată cu același tampon. Eluarea se efectuează cu 1,2 litri de același tampon cu un gradient liniar până la 350 mM NaCl. Fracțiile, conținând polipeptidele MASP-2 recombinante, sunt identificate prin analiză Western blot, precipitate prin adăugarea $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ până la 60% (g/v) și lăsate peste noapte la 4°C. Peletele sunt resuspendate în 145 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 50 mM clorhidrat de trietanolamină, pH 7,4 și se aplică pe o coloană TSK G3000 SWG (7,5 x 600 mm) (Tosohaas, Montgomeryville, PA), echilibrată cu același tampon. Polipeptidele purificate sunt apoi concentrate până la 0,3 mg/ml prin ultrafiltrare pe microconcentratori Microsep (masa moleculară exclusă = 10,000) (Filtron, Karlstein, Germania).

EXEMPLUL 4

În acest exemplu se descrie o metodă de producere a anticorpilor policlonali împotriva polipeptidelor MASP-2.

Materiale and metode:

Antigene MASP-2: Antiserul anti-MASP-2 umană policlonal se produce prin imunizarea iepurilor cu următoarele polipeptide izolate MASP-2: MASP-2 umană (SECV ID NR: 6) izolată din ser; MASP-2 umană recombinantă (SECV ID NR: 6), MASP-2A conținând domeniul

proteazei inactive (SECV ID NR: 13), așa cum se descrie în Exemplul 3; și CUBI (SECV ID NR: 8), CUBEGFI (SECV ID NR: 9) și CUBEGFCUBII recombinante (SECV ID NR: 10), exprimate cum se descrie mai sus în Exemplul 3.

Anticorpi policlonali: Șobolani în vârstă de șase săptămâni, vaccinați cu BCG (vaccinul cu bacil Calmette Guerin) se imunizează prin injectarea a 100 μg de polipeptidă MASP-2 în 100 μg/ml în soluție fiziologică sterilă. Injecțiile se efectuează la fiecare 4 săptămâni, titrul de anticorpi fiind monitorizat prin testul ELISA, cum se descrie în Exemplul 5. Supernatantele culturii se colectează pentru purificarea anticorpului prin cromatografie de afinitate cu proteina A.

EXEMPLUL 5

În acest exemplu se descrie o metodă de producere a anticorpilor monoclonali murini împotriva polipeptidelor MASP-2 de șobolan sau umane.

Materiale și metode:

La șoarecii masculi A/J (Harlan, Houston, Texas), cu vârstă de 8 săptămâni, se injectează subcutanat 100 μg de polipeptide rMASP-2 sau rMASP-2A umane sau de șobolan (realizate cum se descrie în Exemplul 3) în adjuvant Freund complet (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) în 200 μl de soluție salină tamponată cu fosfat (PBS), pH 7,4. La intervale de două săptămâni la șoareci se injectează de două ori subcutanat 50 μg de polipeptidă rMASP-2 sau rMASP-2A umană sau de șobolan în adjuvant Freund incomplet. În a patra săptămână la șoareci se injectează 50 μg de polipeptidă rMASP-2 sau rMASP-2A umană sau de șobolan în PBS și peste 4 zile șoarecii se asociază.

Pentru fiecare fuziune se prepară suspensii de celule singulare din splina unui șoarece imunizat și se utilizează pentru fuziunea cu celule de mielom Sp2/0. 5×10^8 de Sp2/0 și 5×10^8 celulele splenice se fuzionează într-un mediu cu conținut de 50% polietilenglicol (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) și 5% dimetilsulfoxid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Celulele se ajustează apoi până la o concentrație de $1,5 \times 10^5$ celule splenice în 200 μl suspensie în mediu Iscove (Gibco, Grand Island, NY), suplimentat cu 10% ser fetal bovin, 100 unități/ml de penicilină, 100 μg/ml de streptomycină, 0,1 mM hipoxantină, 0,4 μM aminopterină și 16 μM timidină. Două sute de microlitri de suspensie de celule se adaugă în fiecare godeu din aproximativ douăzeci de godeuri din plăcile de microcultură cu 96 de godeuri. După aproximativ zece zile, supernatantele de cultură se extrag pentru screening pentru interacțiune cu factorul purificat MASP-2 într-un test ELISA.

Testul ELISA: În godeurile din plăcile ultrasubțiri Immunol 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) se acoperă prin adăugarea a 50 μl de hMASP-2 purificată cu o concentrație de 50 μg/ml sau rMASP-2 de șobolan (sau rMASP-2A) peste noapte la temperatura camerei. Concentrația joasă de MASP-2 pentru acoperire permite selectarea anticorpilor cu afinitate înaltă. După aplicarea învelișului, soluția se îndepărtează prin mișcarea plăcii, în fiecare godeu timp de o oră se adaugă 200 μl de BLOTTO (lapte uscat degresat) în PBS pentru a bloca situsurile nespecifice. Peste o oră godeurile se spală cu tampon PBST (PBS conținând 0,05% Tween 20). Cincizeci de microlitri de supernatant de cultură din fiecare godeu de fuziune se colectează și se amestecă cu 50 μl de BLOTTO și apoi se adaugă în godeurile individuale ale plăcilor de microtestare. După o oră de incubare, godeurile se spală cu PBST. Anticorpii murini legați se detectează apoi prin reacția cu peroxidaza de hrean (HRP) conjugată cu IgG anti-șoarece de capră (Fc specific) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.) și se diluează până la 1:2000 în BLOTTO. Soluția de substrat de peroxidază conținând 0,1% 3,3',5,5' tetrametil benzidină (Sigma, St. Louis, Mo.) și 0,0003% peroxid de hidrogen (Sigma) se adaugă în godeuri pentru apariția culorii timp de 30 de minute. Reacția se stopează prin adăugarea a 50 μl de 2M H₂SO₄ per godeu. Densitatea optică la 450 nm a amestecului de reacție se citește cu un cititor BioTek ELISA (BioTek Instruments, Winooski, Vt.).

Testul de legare a MASP-2:

Supernatantele de cultură, testate pozitiv în testul ELISA MASP-2 descris mai sus, pot fi analizate într-un test de legare pentru a determina afinitatea de legare a agenților inhibitori ai MASP-2, pe care aceștia o posedă pentru MASP-2. Un test similar se poate, de asemenea, utiliza pentru a determina dacă agenții inhibitori se pot lega cu alte antigene în sistemul complementului.

Godeurile de pe plăcile de microtitrare din polistiren (plăci de legare medie cu 96 de godeuri, Corning Costar, Cambridge, MA) se acoperă cu MASP-2 (20 ng/100 μl/godeu, Advanced Research Technology, San Diego, CA) în soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) peste noapte la 4°C. După aspirarea soluției de MASP-2, godeurile se blochează cu PBS conținând 1% albumină serică de bovină (BSA, Sigma Chemical) timp de 2 ore la temperatura camerei. Godeurile neacoperite cu MASP-2 servesc drept control. În godeuri la soluția de blocare se adaugă alicote de

supernatant de hibridom sau MoAb anti-MASP-2 purificați de diferite concentrații. După o incubare timp de 2 ore la temperatura camerei, godeurile se spală intens cu PBS. MASP-2 legat cu MoAb anti-MASP-2 se detectează prin adăugarea IgG de capră anti-șoarece conjugate cu peroxidază (Sigma Chemical) în soluție de blocare și se incubază timp de 1 oră la temperatura camerei. Placa se spală din nou minuțios cu PBS și se adaugă 100 μl de substrat de 3,3',5,5'-tetrametil benzidină (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Reacția TMB se stinge prin adăugarea a 100 μl de 1M acid fosforic și placa se citește la o lungime de undă de 450 nm într-un cititor de microplăci (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Supernatantele de cultură din godeurile pozitive se testează apoi pentru abilitatea de a inhiba activarea complementului într-un test funcțional, cum ar fi testul de scindare C4, descris în Exemplul 2. Celulele din godeurile pozitive se clonează apoi prin diluare limitativă. MoAb se testează din nou pentru interacțiune cu hMASP-2 într-un test ELISA, așa cum se descrie mai sus. Hibridoamele selectate se cultivă în baloane rotative și supernatantul de cultură uzat se colectează pentru purificarea anticorpului prin cromatografie de afinitate cu proteină A.

EXEMPLUL 6

Acest exemplu descrie generarea și producția anticorpilor anti-MASP-2 murini umanizați și fragmentelor de anticorpi.

Anticorpul monoclonal anti-MASP-2 murin se generează la șoareci masculi A/J, așa cum se descrie în exemplul 5. Anticorpul murin apoi se umanizează, așa cum este descris mai jos, pentru a reduce imunogenitatea sa prin înlocuirea regiunilor constante murine cu omologii lor umani pentru a genera IgG himerică și fragmentul Fab al anticorpului, care sunt utili pentru inhibarea efectelor adverse ale activării complementului dependente de MASP-2 la subiecții umani, în conformitate cu prezenta invenție.

1. Clonarea genelor regiunii variabile anti-MASP-2 din celulele de hibridom murin. ARN total se izolează din celulele hibridomului, care secretă MoAb anti-MASP2 (obținut cum se descrie în Exemplul 7), folosind RNazol urmând protocolul producătorului (Biotech, Houston, Texas). Prima catenă a ADNc se sintetizează din ARN total utilizând în calitate de primer oligodezoxiribonucleotid (oligo-dT). PCR se realizează utilizând primerii 3', derivați din regiunea C constantă a imunoglobulinei și seturile de primeri degenerați, derivați din peptida lider sau prima regiune cadru a genelor V_H sau V_K murine în calitate de primeri 5'. PCR de ancoră se efectuează așa cum descrie Chen și Platsucas (Chen, P.F., Scand., J. Immunol., 35: 539-549, 1992). Pentru clonarea genei V_K, ADNc dublu catenar se prepară folosind un primer NotI-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SECV ID NR: 38). Adaptorii renaturați AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3' SECV ID NR: 39) și AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SECV ID NR: 40) sunt ligați la ambele 5' și 3' terminale ale ADNc dublu catenar. Adaptorii la capetele 3' se îndepărtează prin digestia NotI. Produsul digerat se utilizează apoi ca șablon în PCR cu oligonucleotida AD1 ca primer 5' și MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTTC-3' SECV ID NR: 41) ca primer 3'. Fragmentele de ADN cu aproximativ 500 bp se clonează în vectorul pUC19. Se selectează mai multe clone pentru analiza secvenței pentru a verifica dacă secvența clonată cuprinde regiunea constantă a imunoglobulinei murine. Oligonucleotidele NotI-MAK1 și MAK2 derivă din regiunea V_K și ele se află pe a 182 și 84 bp, respectiv, în aval de prima pereche de baze a genei kappa C. Se selectează clonele care includ V_K completă și peptida lider.

Pentru clonarea genei V_H, ADNc dublu catenar se prepară utilizând primerul NotI MAG1 (5'-CGCGGCCGCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SECV ID NR: 42). Adaptorii renaturați AD1 și AD2 sunt ligate la ambele capete 5' și 3' ale ADNc dublu catenar. Adaptorii la capetele 3' se îndepărtează prin digestia NotI. Produsul digerat se utilizează ca șablon în PCR cu oligonucleotida AD1 și MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SECV ID NR: 43) ca primeri. Fragmentele de ADN de la 500 până la 600 bp în lungime se clonează în pUC19. Oligonucleotidele NotI-MAG1 și MAG2 derivă din regiunea C_Γ.7.1 murină și se află pe 180 și 93 bp, respectiv, în aval de prima pereche de baze a genei C_Γ.7.1 murine. Se selectează clonele, care conțin V_H completă și peptida lider.

2. Proiectarea vectorilor de expresie pentru IgG și Fab a MASP-2 himerice. Genele V_H și V_K clonate, descrise mai sus, se utilizează ca șabloane în reacția PCR pentru adăugarea secvenței consens Kozak la capătul 5' și donatorul de fragment de legătură la capătul 3' al secvenței nucleotidice. După analiza secvențelor pentru confirmarea absenței erorilor PCR, genele V_H și V_K se inseră în casetele vectorului de expresie conținând C_Γ1 și C. kappa uman, respectiv, pentru a obține pSV2neoV_H-huC_Γ1 și pSV2neoV_K-huC_Γ1. Plasmidele ADN vectorilor lanțului greu și lanțului ușor, purificate în gradient de CsCl, se utilizează pentru a transfecta celulele COS prin electroporare. Peste 48 de ore

supernatantul de cultură se testează prin ELISA pentru a confirma prezența a aproximativ 200 ng/ml de IgG himeric. Celulele se recoltează și se prepară ARN total. Primul filament de ADNc se sintetizează din ARN total, utilizând oligo dT în calitate de primer. Acest ADNc se utilizează ca șablon în PCR pentru a genera fragmente de Fd și kappa ale ADN. Pentru gena Fd, realizează PCR folosind 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SECV ID NR: 44) în calitate de primer 5' și primer 3', derivat din CH1 (5'-CGGGATCCTCAAACCTTCTGTCCACCTTGG-3' SECV ID NR: 45). Se confirmă că secvența ADN conține domeniul V_H complet și domeniul CH1 al IgG1 umane. După digestia cu enzimele adecvate, fragmentele Fd ADN se inseră în situsurile de restricție HindIII și BamHI ale casetei vectorului de expresie pSV2dhfr-TUS pentru a obține pSV2dhfrFd. Plasmida pSV2 este comercial disponibilă și constă din segmente ADN din diverse surse: pBR322ADN (linie subțire) conține plasmida pBR322 a inițierii replicării ADN (pBR ori) și gena rezistenței ampicilinei la lactamază (Amp); SV40 ADN, reprezentată prin hașurare mai largă și marcată, conține plasmida SV40 inițierii replicării ADN (SV40 ori), promotorul precoce (de la 5' la dhfr și neogene) și semnalul de poliadenilare (de la 3' la dhfr și neogene). Semnalul de poliadenilare derivat din SV40 (pA) se plasează, de asemenea, la capătul 3' al genei Fd.

Pentru gena kappa, PCR se conduce folosind 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SECV ID NR: 46) ca primer 5' și primer 3' (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SECV ID NR: 47), derivat din CK. Se confirmă, că secvența ADN conține regiunile complete V_K și C_K umane. După digestia cu enzime de restricție adecvate, fragmentele kappa de ADN se inseră în situsurile de restricție HindIII și BamHI ale casetei vectorului de expresie pSV2neo-TUS pentru a obține pSV2neoK. Expresia genelor Fd și kappa se conduce de amplificatorul, derivat din HCMV, și de elementele promotorului. Deoarece gena Fd nu include reziduu aminoacidului cisteină, implicat în formarea legăturii disulfurice între lanțuri, acest Fab himeric recombinant conține lanțuri grele și lanțuri ușoare legate necovalent. Acest Fab himeric este desemnat ca cFab.

Pentru a obține Fab recombinant cu o legătură disulfidică între lanțul greu și lanțul ușor, gena Fd de mai sus poate fi extinsă pentru a include secvența de codificare pentru 9 aminoacizi adiționali (EPKSCDKTH SECV ID NR: 48) din regiunea articulată a IgG1 umane. Segmentul ADN BstEII-BamHI, care codifică 30 de aminoacizi la capătul 3' al genei Fd poate fi înlocuit cu segmente AND, care codifică Fd extins, rezultând pSV2dhfrFd/9aa.

3. Expresia și purificarea IgG anti-MASP-2 himerice

Pentru a genera linii celulare, care secretă IgG anti MASP-2 himerice, celulele NSO se transfectă cu ADN pSV2neoV_H-huC.Γ1 și pSV2neoV-huC kappa plasmidic purificat prin electroporare. Celulele transfectate se selectează în prezența a 0,7 mg/ml G418. Celulele se cultivă într-un balon de 250 ml pe un mediu de cultură, care conține ser.

Supernatantul de cultură din eprubeta centrifugată cu un volum de 100 ml de cultură se încarcă pe o coloană PROSEP-A (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.) cu volum de 10 ml. Coloana se spală cu un volum de PBS, egal cu 10 volume de strat de coloană. Anticorpul legat se eluează cu 50 mM tampon citrat, pH 3,0. La fracția care conține anticorpul purificat se adaugă un volum egal de 1 M Hepes, pH 8,0 pentru a ajusta pH până la 7,0. Sărurile reziduale se elimină prin schimb de tampon cu PBS prin ultrafiltrare printr-o membrană Millipore (masa moleculară separată: 3.000). Concentrația de proteină a anticorpului purificat se determină prin metoda BCA (Pierce).

4. Expresia și purificarea Fab anti-MASP-2 himerice

Pentru a genera linii celulare, care secretă Fab anti-MASP-2 himeric, celulele CHO se transfectă cu ADN pSV2dhfrFd (sau pSV2dhfrFd/9aa) și pSV2neokappa plasmidic purificat prin electroporare. Celulele transfectate se selectează în prezența G418 și metotrexatului. Liniile celulare selectate se amplifică în concentrații crescând metotrexat. Celulele reprezintă o singură celulă, subclonată prin diluare limitată. Liniile celulare cu productivitate înaltă, subclonate din celule solitare, se cultivă apoi într-o eprubetă, care se rotește, cu volum de 100 ml în mediu de cultură fără ser.

Fab anti-MASP-2 himeric se purifică prin cromatografie de afinitate utilizând MoAb anti-idiotip de șoarece pentru MoAb MASP-2. MoAb MASP-2 anti-idiotip se poate obține prin imunizarea șoarecilor cu MoAb anti-MASP-2 murin conjugat cu hemocianină de limfă de melc (KLH) și apoi screeningul pentru legarea specifică cu MoAb, care poate concura cu MASP-2 umană. Pentru purificare, 100 ml de supernatant din culturi de celule CHO, care produc cFab sau cFab/9aa, se încarcă pe coloana de afinitate cuplată cu MoAb MASP-2 anti-idiotip. Coloana se spală apoi minuțios cu PBS înainte de eluarea Fab legat cu 50 mM dietilamină, pH 11,5. Sărurile

reziduale se elimină prin înlocuirea tamponului, așa cum se descrie mai sus. Concentrația de proteină a Fab purificat se determină prin metoda BCA (Pierce).

Abilitatea IgG MASP-2 himerice, cFab și cFab/9aa de a inhiba căile de activare a complementului dependente de MASP-2 se poate determina utilizând testul de inhibare descris în Exemplul 2 sau în Exemplul 7.

EXEMPLUL 7

Acest exemplu descrie un test in vitro de scindare C4, utilizat în calitate de screening funcțional pentru identificarea agenților inhibitori ai MASP-2, abili să blocheze activarea complementului dependentă de MASP-2 prin L-ficolină/P35, H-ficolină, M-ficolină sau manan.

Testul de scindare C4: Un test de scindare C4 este descris de Petersen, S. V. et al., J. Immunol. Metode 257: 107, 2001, în care se măsoară activarea căii lectinei, cauzată de acidul lipoteicoic (LTA) din *S. aureus* care leagă L-ficolina.

Reagenți: *S. aureus* fixat în formalină (DSM20233) se prepară după cum urmează: bacteria se cultivă peste noapte la 37°C în mediu de cultură pe bază de sânge-soia-tripton, se spală de trei ori cu PBS, apoi se fixează timp de 1 oră la temperatura camerei în PBS/0,5% formalină și se spală suplimentar de trei ori cu PBS, apoi se resuspendează în tampon de înveliș (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9,6).

Testul: Godeurile unei plăci de microtitrare Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) se acoperă cu: 100 μl de *S. aureus* fixat cu formalină DSM20233 (OD₅₅₀ = 0,5) în tampon de acoperire cu 1 μg L-ficolină în tampon de acoperire. După incubare peste noapte, godeurile se blochează cu 0,1% albumină serică umană (HSA) în TBS (10 mM Tris HCl, 140 mM NaCl, pH 7,4), apoi se spală cu TBS conținând 0,05% Tween 20 și 5 mM CaCl₂. Probele de ser uman se diluează în 20 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0,05% Triton X-100, 0,1% HSA, pH 7,4, care previne activarea endogenă a C4 și disociază complexul C1 (constituit din C1q, C1r și C1s). Agenți inhibitori ai MASP 2, incluzând MoAb anti-MASP-2 și peptide inhibitoare, se adaugă la probele de ser în diferite concentrații. Probele diluate se adaugă pe placă și se incubează peste noapte la 4°C. Peste 24 de ore plăcile se spală bine cu tampon de spălare, apoi în fiecare godeu se adaugă 0,1 μg de C4 umană purificată (obținută așa cum descrie Dodds, A.W. în Metode Enzymol., 223: 46, 1993) în 100 μl de 4 mM barbital, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4. Peste 1,5 ore de expunere la 37°C plăcile se spală repetat și depunerea de C4b se detectează utilizând C4c anti-umană de pui conjugată cu fosfatază alcalină (disponibil de la Immunsystem, Uppsala, Suedia) și se măsoară utilizând substratul colorimetric de p-nitrofenil fosfat.

Testul pentru C4 pe manan: Analiza descrisă mai sus se adaptează pentru măsurarea activării căii lectinei cu MBL prin aplicarea pe placă a unui strat de LSP și manan înainte de adăugarea serului amestecat cu diferiți agenți inhibitori ai MASP-2.

Testul pentru C4 pe H-ficolină (antigenul Hakata): Analiza descrisă mai sus se adaptează pentru măsurarea activării căii lectinei cu H-ficolină prin aplicarea pe placă a unui strat de LSP și H-ficolină înainte de adăugarea serului amestecat cu diferiți agenți inhibitori ai MASP-2.

EXEMPLUL 8

Următorul test demonstrează prezența căii clasice de activare la șoarecii de tip sălbatic și șoarecii MASP-2-/-.

Metode: Complexele imune se generează in situ prin acoperirea plăcilor de microtitrare (Maxisorb, Nunc, cat. nr. 442404, Fisher Scientific) cu 0,1% albumină serică umană în 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7,4 timp de 1 oră la temperatura camerei, urmată de incubare peste noapte la 4°C cu antiser de oaie împotriva serului integral (Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Scotland) diluat 1:1000 în TBS/tween/Ca²⁺. Probele de ser se obțin de la șoareci de tip sălbatic și de la șoareci MASP-2-/- și se adaugă pe plăcile acoperite. Se prepară probe de control, care conțin probe de ser de la șoareci de tip sălbatic și de la șoareci MASP-2-/- cu nivel semnificativ redus de C1q. Serul de șoareci cu nivel redus semnificativ de C1q se prepară utilizând proteina A cuplată cu particule de magnet Dynabeads (Dynal Biotech, Oslo, Norvegia) acoperite cu C1q IgG anti-umane de iepure (Dako, Glostrup, Danemarca), conform instrucțiunilor producătorului. Plăcile se incubează pentru 90 minute la 37°C. C3b legat se detectează cu un anticorp policlonal anti-C3c uman (Dako A 062) diluat în TBS/tw/Ca⁺⁺ până la 1:1000. Anticorpul secundar reprezintă IgG anti- iepure de capră.

Rezultate: Fig. 7 prezintă nivelurile relative de depozite C3b pe plăci acoperite cu IgG în ser de la șoareci de tip sălbatic, ser de la șoareci MASP-2-/-, ser de la șoareci tip sălbatic cu nivel redus semnificativ de C1q și ser de la șoareci MASP-2-/- cu nivel redus semnificativ de C1q. Aceste rezultate demonstrează că la șoarecii MASP-2-/- calea clasică este intactă.

EXEMPLUL 9

Următoarea analiză se utilizează pentru a testa abilitatea unui agent inhibitor al MASP-2 de a bloca calea clasică prin studierea efectului unui agent inhibitor al MASP-2 în condiții, în care calea clasică este inițiată de complexe imune.

- 5 Metode: Pentru a testa efectul unui agent inhibitor al MASP-2 asupra condițiilor de activare a complementului, în cazul în care calea clasică este inițiată de complexe imune, trei exemplare de ser câte 50 μ l conținând 90% NHS se incubează la 37°C în prezența 10 μ g/ml de complex imun (IC) sau PBS și, paralel, în timpul incubării la 37°C se include și cele trei probe (+/-IC), care conțin 200 nM anticorp monoclonal anti-properdină. După incubare timp de două ore la 37°C, la 10 toate probele se adaugă 13 mM EDTA pentru a stopa activarea ulterioară a complementului, apoi probele se răcesc imediat până la 5°C. Probele apoi se depozitează la -70°C până în momentul utilizării lor în analiza produselor de activare a complementului (C3a și sC5b9) utilizând kituri ELISA (Quidel, catalogul nr. A015 și A009), conform instrucțiunilor producătorului.

EXEMPLUL 10

- 15 Acest exemplu descrie identificarea fragmentelor de anticorp Fab2 anti-MASP-2 cu afinitate înaltă, care blochează activitatea MAS-2.

- Fundal și actualitate: MASP-2 este o proteină complexă cu multe domenii funcționale separate, incluzând: situsul (locurile) de legare pentru MBL și ficoline, un situs catalitic de serin protează, un situs de legare pentru substratul proteolitic C2, un situs de legare pentru substratul proteolitic 20 C4, un situs de scindare a MASP-2 pentru autoactivarea zimogenului MASP-2 și două situsuri de legare a Ca^{++} . S-au identificat fragmente de anticorp Fab2, care se leagă cu afinitate înaltă la MASP 2 și fragmentele Fab2 identificate se testează într-un test funcțional pentru a determina abilitatea lor de bloca activitatea funcțională a MASP-2.

- Pentru a bloca activitatea funcțională a MASP-2 un anticorp sau un fragment de anticorp Fab2 25 trebuie să se lege și să interfereze cu un epitop structural pe MASP-2, care este necesar pentru activitatea funcțională a MASP-2. Prin urmare, multe sau toate Fab2- anti-MASP-2 de legătură cu afinitate înaltă nu pot inhiba activitatea funcțională a MASP-2 dacă nu se leagă la epitopii structurali pe MASP-2, care sunt implicați direct în activitatea funcțională a MASP-2.

- Un test funcțional, în care se măsoară inhibarea formării convertazei C3 a căii lectinei, se 30 utilizează pentru a evalua "activitatea de blocare" a fragmentului Fab2 anti-MASP-2. Se știe că rolul fiziologic primar al MASP-2 în calea lectinei este de a genera următoarea componentă funcțională a căii complementare mediate de lectină, și anume a convertazei C3 a căii lectinei. Convertază C3 a căii lectinei este un complex enzimatic deosebit de important (C4bC2a), care scindează proteolitic C3 în C3a și C3b. MASP-2 nu este o componentă structurală a convertazei 35 C3 a căii lectinei (C4bC2a); totuși, activitatea funcțională a MASP-2 este necesară pentru a genera cele două componente proteice (C4b, C2a), care conțin convertaza C3 a căii lectinei. Mai mult decât atât, toate activitățile funcționale separate ale MASP-2, enumerate mai sus, par să fie necesare pentru ca MASP-2 să genereze convertază C3 a căii lectinei. Din aceste motive, testul preferat utilizat în evaluarea "activității de blocare" a fragmentului Fab2 anti-MASP-2 este 40 considerat a fi testul funcțional, în care se măsoară inhibarea formării convertazei C3 a căii lectinei.

- Generarea fragmentelor Fab2 cu afinitate înaltă: Pentru a genera fragmente Fab2 cu afinitate înaltă la proteina MASP-2 de șobolan (SECV ID NR: 55) se utilizează un display de fagi al unei 45 biblioteci de secvențe ale lanțurilor ușoare și lanțurilor grele ale anticorpilor umani și metoda automată de selectare a anticorpilor pentru identificarea Fab2, care interacționează cu liganzii selectați de interes. Pentru screening-ul anticorpilor se utilizează o cantitate cunoscută de proteină de MASP-2 de șobolan (~ 1 mg, >85% puritate). Pentru selectarea anticorpilor cu cea mai bună afinitate se utilizează trei runde amplificare. Pentru screening prin metoda ELISA se selectează aproximativ 250 de secvențe diferite, care exprimă fragmente de anticorpi. Secvențele cu afinitate 50 înaltă ulterior se secvențiază pentru a determina unicitatea anticorpilor diferiți.

Cincizeci de anticorpi unici anti-MASP-2 se purifică și se utilizează 250 μ g de fiecare anticorp Fab2 purificat pentru caracterizarea afinității de legare a MASP-2 și pentru testarea funcțională a căii de activare a complementului, așa cum se descrie detaliat în continuare.

- 55 Analizele utilizate pentru evaluarea activității inhibitoare (de blocare) a fragmentelor Fab2 anti-MASP-2.

1. Testul de măsurare a inhibării formării convertazei C3 a căii lectinei:

Fundal: Convertaza C3 a căii lectinei este un complex enzimatic (C4bC2a), care scindează proteolitic C3 în cele două fragmente proinflamatorii puternice, anafilatoxină C3a și opsonină C3b. Probabil, formarea convertazei C3 este o etapă cheie în calea lectinei în ceea ce privește

medierea inflamației. MASP-2 nu este o componentă structurală a convertazei C3 a căii lectinei (C4bC2a); prin urmare anticorpii anti-MASP-2 (sau Fab2) nu vor inhiba direct activitatea convertazei C3 preexistente. Cu toate acestea, activitatea serin proteazei MASP-2 este necesară pentru a genera cele două componente proteice (C4b, C2a), care conțin convertaza C3 a căii lectinei. De aceea, fragmentul Fab2 al anticorpului anti-MASP-2, care inhibă activitatea funcțională a MASP-2 (adică blocarea Fab2 anti-MASP-2) va inhiba de novo formarea convertazei C3 a căii lectinei. C3 conține o grupă tioester neobișnuită și foarte reactivă, ca parte a structurii sale. După scindarea convertazei C3 în acest test, grupa tioester în C3b poate forma o legătură covalentă cu grupele hidroxil sau amino ale macromoleculelor, imobilizate pe fundul godeurilor plastic, cu ajutorul legăturilor de ester sau amidă, facilitând astfel detectarea C3b prin metoda ELISA.

Mananul de drojdie este un activator cunoscut al căii lectinei. În următoarea metodă pentru măsurarea formării convertazei C3, godeurile din plastic, acoperite cu manan, se incubează timp de 30 de minute la 37°C cu ser diluat de șobolan pentru a activa calea lectinei. Godeurile apoi se spală și se testează pentru C3b, imobilizată în godeuri, utilizând metodele ELISA standard. Cantitatea de C3b generată în această analiză este o reflectare directă a formării de novo a convertazei C3 a căii lectinei. În această analiză fragmentele Fab2 ale anticorpilor anti-MASP-2 în concentrațiile selectate se testează pentru abilitatea lor de a inhiba formarea convertazei C3 și generarea consecutivă a C3b.

Metode:

Plăcile de legare Costar Medium cu 96 de godeuri se incubează peste noapte la 5°C cu manan, diluat în 50 mM tampon carbonat, pH 9,5 la 1 μg/50 mM/godeu. După incubarea peste noapte, fiecare godeu se spală de trei ori cu 200 μl PBS. apoi godeurile se blochează cu 100 μl/godeu de 1% albumină serică de bovină în PBS și se incubează timp de o oră la temperatura camerei cu amestecare ușoară. Fiecare godeu apoi se spală de trei ori cu 200 μl de PBS. Probele de Fab2 anti-MASP-2 se diluează până la concentrații selectate în tampon GVB conținând Ca⁺⁺ și Mg⁺⁺ (4,0 mM barbital, 141 mM NaCl, 1,0 mM MgCl₂, 2,0 mM CaCl₂, 0,1% gelatină, pH 7,4) la 5°C. La probele de mai sus la 5°C se adaugă 0,5% ser de șobolan și se transferă câte 100 μl în fiecare godeu. Plăcile se acoperă cu capace și se incubează timp de 30 de minute într-o baie de apă la 37°C pentru a permite activarea complementului. Reacția se stopează prin transferarea plăcilor din baia de apă cu 37°C într-un recipient conținând un amestec de apă și gheață. Fiecare godeu se spală de cinci ori cu 200 μl soluție PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 în PBS), apoi se spală de două ori cu 200 μl PBS. Soluția de anticorpi primari în diluție 1:10 000 (de iepure anti-C3 umană, DAKO A0062) în volum de 100 μl/godeu se adaugă în PBS, care conține 2,0 mg/ml albumină serică de bovină și se incubează pentru 1 h la temperatura camerei cu amestecare ușoară. Fiecare godeu se spală de 5 ori cu 200 μl PBS. Soluția de anticorpi secundari în diluție 1:10 000 (IgG de capră anti-iepure conjugată cu peroxidază, American Qualex A102PU) în volum de 100 μl/godeu se adaugă în PBS, care conține 2,0 mg/ml albumină serică de bovină și se incubează pentru 1 h la temperatura camerei cu amestecare ușoară pe un dispozitiv de agitare. Fiecare godeu se spală de cinci ori cu 200 μl PBS. Se adaugă 100 μl /godeu de substrat de peroxidază TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) și se incubează la temperatura camerei timp de 10 minute. Reacția cu peroxidază se stopează prin adăugarea a 100 μl /godeu de 1,0 M H₃PO₄ și se măsoară OD₄₅₀.

2. Testul de măsurare a inhibării scindării C4 dependente de MASP-2

Fundal: Activitatea serin proteazei MASP-2 este foarte specifică și au fost identificate doar două substraturi proteice pentru MASP-2: C2 și C4. Scindarea C4 generează C4a și C4b. Fab2 anti-MASP-2 se poate lega cu epitopii structurali pe MASP-2, care sunt implicați direct în scindarea C4 (de exemplu, situsul de legare a MASP-2 pentru C4; situsul catalitic de serin protează a MASP-2) și prin aceasta inhibă activitatea funcțională a MASP-2 de scindare a C4.

Mananul de drojdie este un activator cunoscut al căii lectinei. În următoarea metodă pentru măsurarea activității MASP-2 de scindare a C4, godeurile din plastic acoperite cu manan se incubează timp de 30 de minute la 37°C cu ser diluat de șobolan pentru a activa calea lectinei. Deoarece anticorpii primari, utilizați în acest test ELISA, recunoaște numai C4 uman, serul diluat de șobolan se suplimentează și cu C4 uman (1,0 μg/ml). Godeurile apoi se spală și se testează pentru C4b umană, imobilizată în godeuri, utilizând metodele ELISA standard. Cantitatea de C4b, generată în această analiză, este măsura activității MASP-2 dependente de scindarea C4. În această analiză se testează abilitatea fragmentelor Fab2 anti-MASP-2 în concentrațiile selectate de a inhiba scindarea C4.

Metode: Plăcile de legare Costar Medium cu 96 de godeuri se incubează peste noapte la 5°C cu manan, diluat în 50 mM tampon carbonat, pH 9,5 la 1 μg/50 mM/godeu. Fiecare godeu se spală de

trei ori cu 200 μ l PBS. Apoi godeurile se blochează cu 100 μ l/godeu de 1% albumină serică de bovină în PBS și se incubează timp de o oră la temperatura camerei cu amestecare ușoară. Fiecare godeu apoi se spală de trei ori cu 200 μ l de PBS. Probele de Fab2 anti-MASP-2 se diluează până la concentrații selectate în tampon GVB conținând Ca^{++} și Mg^{++} (4,0 mM barbital, 141 mM NaCl, 1,0 mM MgCl_2 , 2,0 mM CaCl_2 , 0,1% gelatină, pH 7,4) la 5°C. În aceste probe se introduce, de asemenea, 1,0 μ g/ml de C4 umană. (Quidel). La probele de mai sus la 5°C se adaugă 0,5% ser de șobolan și se transferă câte 100 μ l în fiecare godeu. Plăcile se acoperă cu capace și se incubează timp de 30 de min într-o baie de apă la 37°C pentru a permite activarea complementului. Reacția se stopează prin transferarea plăcilor din baia de apă cu 37°C într-un recipient conținând un amestec de apă și gheață. Fiecare godeu se spală de cinci ori cu 200 μ l soluție PBS-Tween 20 (0,05% Tween 20 în PBS), apoi se spală de două ori cu 200 μ l PBS. Soluția conjugată cu biotină de pui anti-C4 umană (Immunsytem AB, Uppsala, Suedia) în diluție 1:700 în volum de 100 μ l/godeu se adaugă în PBS, care conține 2,0 mg/ml albumină serică de bovină și se incubează pentru 1 h la temperatura camerei cu amestecare ușoară. Fiecare godeu se spală de 5 ori cu 200 μ l PBS. În fiecare godeu se adaugă câte 100 μ l streptavidină conjugată cu peroxidază în concentrație de 0,1 μ g/ml (Pierce Chemical #21126) în PBS cu conținut de 2,0 mg/ml BSA și se incubează timp de 1 h la temperatura camerei cu amestecare ușoară pe un dispozitiv de agitare. Fiecare godeu se spală de cinci ori cu 200 μ l PBS. Se adaugă 100 μ l /godeu de substrat de peroxidază TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) și se incubează la temperatura camerei timp de 16 minute. Reacția cu peroxidază se stopează prin adăugarea a 100 μ l /godeu de 1,0 M H_3PO_4 și se măsoară OD_{450} .

3. Testul de legare a fragmentului Fab2 al anticorpului de șobolan anti-MASP-2 cu MASP-2 de șobolan 'Nativă'

Fundal: MASP-2 este prezent, de obicei, în plasmă sub formă de un complex dimeric MASP-2, care include și molecule specifice de lectină (proteină fixatoare de manoză (MBL) și ficoline). Prin urmare, dacă apare interes pentru studierea legării fragmentului Fab2 al anticorpului anti-MASP-2 cu forma relevantă din punct de vedere fiziologic a MASP-2, este important să se elaboreze un test de legare, în care se utilizează interacțiunea în plasma dintre Fab2 și MASP-2 "nativă", dar nu cu MASP-2 recombinată purificată. În acest test de legare, mai întâi se imobilizează complexul MASP-2-MBL "nativ" din 10% ser de șobolan în godeurile acoperite cu manan. Apoi, se studiază afinitatea de legare a diferitor fragmente Fab2 ale anticorpilor anti-MASP-2 cu MASP-2 "nativă" imobilizată folosind o metodă ELISA standard.

Metode: Plăcile de legare Costar Medium cu 96 de godeuri se incubează peste noapte la 5°C cu manan diluat în 50 mM tampon carbonat, pH 9,5 la 1 μ g/50 μ l/godeu. Fiecare godeu se spală de trei ori cu 200 μ l PBS. Godeurile apoi se blochează cu 100 μ l/godeu de 0,5% lapte praf degresat în PBST (PBS cu 0,05% Tween 20) și se incubează timp de o oră la temperatura camerei cu amestecare ușoară. Fiecare godeu apoi se spală de trei ori cu 200 μ l de TBS/Tween/tampon de spălare Ca^{++} (soluție fiziologică Tris-tamponată, 0,05% Tween 20 conținând 5,0 mM CaCl_2 , pH 7,4. Se prepară pe gheață 10% ser de șobolan în tampon de legare cu conținut înalt de sare (20 mM Tris, 1,0 M NaCl, 10 mM CaCl_2 , 0,05% Triton-X100, 0,1% (g/v) albumină serică de bovină, pH 7,4). Se adaugă câte 100 μ l/godeu și se incubează peste noapte la 5°C. Godeurile se spală de trei ori cu 200 μ l TBS/Tween/Tampon de spălare Ca^{++} . Apoi godeurile se spală de două ori cu 200 μ l PBS. Se adaugă câte 100 μ l/godeu de fragment Fab2 al anticorpului anti-MASP-2 de concentrație selectată, diluate în tampon GVB conținând Ca^{++} și Mg^{++} (4,0 mM barbital, 141 mM NaCl, 1,0 mM MgCl_2 , 2,0 mM CaCl_2 , 0,1% gelatină, pH 7,4) și se incubează pentru o oră la temperatura camerei cu amestecare lentă. Fiecare godeu se spală de cinci ori cu 200 μ l PBS. Se adaugă 100 μ l/godeu de fragment Fab2 de anticorp de capră HRP-conjugată (Biogenesis cat. nr. 0500-0099), diluat 1:5000 în 2,0 mg/ml albumină serică de bovină în PBS și se incubează pentru 1 h la temperatura camerei cu amestecare ușoară. Fiecare godeu se spală de 5 ori cu 200 μ l PBS. Se adaugă 100 μ l/godeu de substrat de peroxidază TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) și se incubează la temperatura camerei timp de 70 minute. Reacția cu peroxidază se stopează prin adăugarea a 100 μ l/godeu de 1,0 M H_3PO_4 și se măsoară OD_{450} .

REZULTATE:

Aproximativ 250 de fragmente diferite Fab2, care au reacționat cu afinitate înaltă cu proteina MASP-2 de șobolan au fost selectate pentru screening prin metoda ELISA. Aceste fragmente Fab2 cu afinitate înaltă au fost secvențiate pentru a determina unicitatea diferitor anticorpi și 50 de anticorpi unici anti-MASP-2 au fost purificați pentru analiză ulterioară. 250 μ g din fiecare fragment Fab2 de anticorp purificat s-a utilizat pentru caracterizarea afinității de legare a MASP-2 și testarea funcțională a căii complementului. Rezultatele acestei analize sunt prezentate în continuare în tabelul 6.

FRAGMENTE FAB2 ALE ANTICORPILOR ANTI-MASP-2, CARE BLOCHEAZĂ CĂLEA LECTINEI DE ACTIVARE A COMPLEMENTULUI

Tabelul 6

fragmentul Fab2 al anticorpului #	Convertaza C3 (IC ₅₀ (nM))	K _d	Scindarea C4 IC ₅₀ (nM)
88	0.32	4.1	nu s-a determinat
41	0.35	0.30	0.81
11	0.46	0.86	<2 nM
86	0.53	1.4	nu s-a determinat
81	0.54	2.0	nu s-a determinat
66	0.92	4.5	nu s-a determinat
57	0.95	3.6	<2 nM
40	1.1	7.2	0.68
58	1.3	2.6	nu s-a determinat
60	1.6	3.1	nu s-a determinat
52	1.6	5.8	<2 nM
63	2.0	6.6	nu s-a determinat
49	2.8	8.5	<2 nM
89	3.0	2.5	nu s-a determinat
71	3.0	10.5	nu s-a determinat
87	6.0	2.5	nu s-a determinat
67	10.0	7.7	nu s-a determinat

5 Din datele prezentate în Tabelul 6 se relevă, că din cele 50 fragmente Fab ale anticorpilor anti-MASP-2 testate, șaptesprezece Fab2 s-au identificat ca Fab2, care blochează MASP-2, care potențial inhibă formarea convertazei C3 cu IC₅₀ egală sau mai mică de 10 nM Fab2 (o rată de succes pozitivă de 34%). Opt din cele șaptesprezece Fab2 identificate au IC₅₀ într-un interval subnanomolar. În plus, toate cele șaptesprezece Fab2 blocante ale MASP-2, prezentate în Tabelul 10 6, asigură practic inhibarea completă a formării convertazei C3 în testul cu convertaza C3 a căii lectinei. Fig. 8A ilustrează grafic rezultatele testului de formare a convertazei C3 pentru fragmentul Fab2 al anticorpului # 11, care este reprezentativ pentru celelalte fragmente Fab2 ale anticorpilor testați, rezultatele pentru care sunt prezentate în Tabelul 6. Acesta este un aspect 15 important, deoarece teoretic este posibil ca un fragment Fab2 "blocant" poate inhiba doar parțial funcția MASP-2 chiar și atunci, când fiecare moleculă de MASP-2 este legată cu Fab2.

Deși mananul este un activator cunoscut al căii lectinei, teoretic este posibil ca prezența anticorpilor anti-manan în serul de șobolan să activeze, de asemenea, calea clasică și să genereze 20 C3b prin intermediul convertazei C3 a căii clasice. Cu toate acestea, fiecare dintre cele șaptesprezece fragmente Fab2 ale anticorpilor anti-MASP-2 blocante, enumerate în acest exemplu, potențial inhibă generarea C3b (> 95%), demonstrând, astfel, specificitatea acestui test pentru convertaza C3 a căii lectinei.

25 Testele de legare au fost, de asemenea, realizate cu toate cele șaptesprezece Fab2 blocante pentru a calcula K_d aparent pentru fiecare. Rezultatele testelor de legare a fragmentelor Fab2 ale anticorpilor de șobolan anti-MASP-2 cu MASP-2 de șobolan nativă pentru șase Fab2 blocante sunt, de asemenea, prezentate în Tabelul 6. Fig. 8B ilustrează grafic rezultatele testului de legare cu fragmentul Fab2 al anticorpului # 11. Testări de legare similare s-au efectuat, de asemenea, 30 pentru celelalte Fab2, ale căror rezultate sunt prezentate în Tabelul 6. În general, valorile K_d, obținute pentru legarea fiecăruia dintre cele șase Fab2 cu MASP-2 "nativă" corespunde în mod rezonabil cu IC₅₀ pentru Fab2 în testul funcțional pentru convertaza C3. Există dovezi, că MASP-2 suferă o schimbare conformațională de la forma "inactivă" până la una "activă" după inițierea activității sale de protează (Feinberg et al., EMBO J 22: 2348-59 (2003); Gal et al., J. Biol.Chem 280: 33435-44 (2005)). În plasma normală de șobolan, utilizată în testul de formare a convertazei 35 C3, MASP-2 este prezentă în primul rând în formă de conformație "inactivă" a zimogenului. În contrast, în testul de legare, MASP-2 este prezentă ca parte a unui complex cu MBL, legat cu manan imobilizat; prin urmare, MASP-2 ar fi în conformația "activă" (Petersen et al., J. Immunol Methods 257: 107-16, 2001). În consecință, nu se așteaptă neapărat o corespundere exactă între

IC₅₀ și K_d pentru fiecare dintre cele șaptesprezece Fab2 blocante, testate în aceste două teste funcționale, deoarece în fiecare analiză Fab2 putea lega diferite forme conformaționale de MASP-2. Cu toate acestea, cu excepția Fab2 # 88, pare să existe o corespondență relativ apropiată între IC₅₀ și K_d aparent pentru fiecare din celelalte șaisprezece Fab2, testate în cele două teste (Tabelul 6).

Mai multe Fab2 blocante au fost evaluate pentru inhibarea scindării C4, mediate de MASP-2. Fig. 8C ilustrează grafic rezultatele testului de scindare C4, care prezintă inhibarea cu Fab2 # 41, cu IC₅₀ = 0,81 nM (Tabelul 6). După cum se relevă din fig. 9 toate Fab2 testate inhibă scindarea C4 cu IC₅₀ similare cu cele obținute în testul pentru convertaza C3 (Tabelul 6).

Deși mananul este un activator cunoscut al căii lectinei, teoretic este posibil ca prezența anticorpilor anti-manan în serul de șobolan să activeze, de asemenea, calea clasică și, astfel, să genereze C4b prin scindarea C4 mediată de C1s. Cu toate acestea, s-au identificat mai multe fragmente Fab2 ale anticorpilor anti-MASP-2, care inhibă potențial generarea C4b (> 95%), demonstrând, astfel, specificitatea acestei analize pentru scindarea C4 mediată de MASP-2. C4, asemenea C3, conține o grupă tioester neobișnuită și foarte reactivă ca parte a structurii sale. După scindarea C4 cu MASP-2 în acest test, grupa tioester în C4b poate forma o legătură covalentă cu grupele hidroxil sau amino pe macromoleculele imobilizate pe fundul godeurilor plastice prin legături de ester sau amide, facilitând astfel detectarea C4b în testul ELISA.

Aceste studii demonstrează în mod clar crearea FAB2 cu afinitate înaltă la proteina MASP-2 de șobolan, care blochează funcțional atât activitatea convertazei C4, cât și a convertazei C3, împiedicând astfel activarea căii lectinei.

EXEMPLUL 11

Acest exemplu descrie cartografierea epitopilor unor fragmente Fab2 ale anticorpilor de șobolan anti-MASP-2 blocante, care au fost generate cum se descrie în Exemplul 10.

Metode:

După cum se arată în fig. 10, următoarele proteine, toate cu marcaje N-terminale 6X His, se exprimă în celule CHO, utilizând vectorul pED4:

MASP-2A de șobolan, o proteină MASP-2 cu lungime completă, inactivată prin înlocuirea serinei în centrul activ cu alanină (S613A);

MASP-2K de șobolan, o proteină MASP-2 cu lungime completă, modificată pentru a reduce autoactivarea (R424K);

CUBI-II, un fragment N-terminal al MASP-2 de șobolan, care conține numai domeniile CUBI, EGF-asemănător și CUBII; și

CUBI/EGF asemănător, un fragment N-terminal al MASP-2 de șobolan, care conține doar domeniile de tip CUBI și EGF.

Aceste proteine se purifică din supernatante de cultură prin cromatografie de afinitate cu nichel, așa cum s-a descris anterior (Chen et al., J. Biol.Chem., 276: 25894-02 (2001)).

O polipeptidă C-terminală (CCPII SP), care conține CCPII și domeniul serin proteazei MASP-2 de șobolan, se exprimă în *E. coli* ca proteină de fuziune cu tioredoxină utilizând pTrxFus (Invitrogen). Proteina se purifică din lizatele celulare folosind rășină de afinitate Thiobond. Partenerul de fuziune cu tioredoxină se exprimă din pTrxFus gol în calitate de control negativ.

Toate proteinele recombinante se dializează în tampon TBS și concentrațiile lor se determină prin măsurarea OD la 280 nm.

ANALIZA DOT BLOT:

Diluțiile în serie ale celor cinci polipeptide MASP-2 recombinante, descrise mai sus și prezentate în fig. 10 (și polipeptida tioredoxină ca martor negativ pentru polipeptida CCPII serin-proteazei) se aplică pe o membrană de nitroceluloză sub formă de pete. Cantitatea de proteine aplicate sub formă de pete se modifică între 100 ng și 6,4 pg la fiecare diluție următoare de cinci ori. În experimentele ulterioare cantitatea de proteină aplicată sub formă de pete varia de la 50 ng până la 16 pg, de asemenea, la fiecare diluție următoare de cinci ori. Membranele se blochează cu 5% lapte praf degresat în TBS (tampon de blocare), apoi se incubează cu 1,0 μg/ml de fragment Fab2 al anticorpului anti-MASP-2 în tampon de blocare (conținând 5,0 mM Ca²⁺). Fragmentele Fab2 legate se detectează folosind fragmentul Fab al anticorpului uman conjugat cu HRP (AbD/Serotec; diluat 1/10000) și un kit de detecție ECL (Amersham). O membrană se incubează cu un anticorp policlonal de iepure anti-MASP-2 umană (descriș de Stover et al., J Immunol 163: 6848-59 (1999)) în calitate de control pozitiv. În acest caz, anticorpul legat se detectează utilizând anticorp de capră conjugat cu HRP anti-IgG de iepure (Dako; diluat 1/2000).

Testul de legare a MASP-2

Plăcile pentru ELISA se acoperă cu un strat de MASP-2A recombinantă sau polipeptidă CUBI II în tampon carbonat (pH 9,0) în cantitate de 1,0 µg/godeu peste noapte la 4°C. Godeurile se blochează cu 1% BSA în TBS, apoi se adaugă diluțiile în serie de fragmente Fab2 ale anticorpilor anti-MASP-2 în TBS, conținând 5,0 nM Ca²⁺. Plăcile se incubează timp de o oră la temperatura camerei. După spălarea de trei ori cu TBS/tween/Ca²⁺ se adaugă fragment Fab de anticorp uman conjugat cu HRP (AbD/Serotec) diluat 1/10.000 în TBS/Ca²⁺ și plăcile se incubează încă o oră la temperatura camerei. Anticorpul legat se detectează folosind un kit cu substrat de peroxidază TMB (Biorad).

REZULTATE:

Rezultatele analizei dot blot, care demonstrează reactivitatea Fab2 la interacțiunea cu diferite polipeptide MASP-2 sunt prezentate în continuare în Tabelul 7. Valorile numerice, prezentate în tabelul 7, indică cantitatea de proteină aplicată sub formă de pete, necesară pentru a obține aproximativ jumătate din puterea maximă a semnalului. Așa cum se arată, toate polipeptidele (cu excepția numai a celulelor fuzionate de tioredoxină) sunt recunoscute cu anticorpul controlului pozitiv (anticorpul policlonal seric anti-MASP-2 umană, produsă în iepuri).

REACTIVITATEA CU DIFERITE POLIPEPTIDE ALE MASP-2 RECOMBINANTE DE ȘOBOLAN ÎN ANALIZA DOT BLOT

Tabelul 7

Fab2 al anticorpului #	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF similar	CCPII-SP	Tioredoxină
40	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
41	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
11	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
49	0.16 ng	NR	NR	>20 ng	NR
52	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
57	0.032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
60	0.4 ng	0.4 ng	NR	NR	NR
63	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
66	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
67	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
71	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
81	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
86	0.4 ng	NR	NR	10 ng	NR
87	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
Control pozitiv	<0.032 ng	0.16 ng	0.16 ng	<0.032 ng	NR

S-a înregistrat activitatea căii lectinei în cea de-a doua și a treia săptămână, cu restaurarea completă a căii lectinei la șoareci în a 17 zi după administrarea anticorpului monoclonal anti-MASP-2. NR=absența reacției. Anticorpul pentru control pozitiv reprezintă anticorpul policlonal seric anti-MASP-2 umană, produs în iepuri.

Toate fragmentele Fab2 interacționează cu MASP-2A, precum și cu MASP-2K (datele nu sunt prezentate). Majoritatea fragmentelor Fab2 recunosc polipeptida CCPII-SP, dar nu și fragmentele N-terminale. Cele două excepții sunt Fab2 # 60 și Fab2 # 57. Fab2 # 60 recunoaște MASP-2A și fragmentul CUBI-II, dar nu și polipeptida CUBI/EGF similară sau polipeptida CCPII-SP, sugerând că se leagă cu un epitop în CUBI sau acoperă domeniul CUBI și EGF similar. Fab2 # 57 recunoaște MASP-2A, dar nu și oricare dintre fragmentele MASP-2 testate, indicând că acest fragment Fab2 recunoaște epitopul în CCP1. Fab2 # 40 și # 49 se leagă numai cu MASP-2A completă. În testul de legare ELISA, prezentat în fig. 11, Fab2 # 60, de asemenea, se leagă cu polipeptida CUBI-II, deși cu o afinitate aparent inferioară.

Aceste rezultate demonstrează identificarea unor fragmente Fab2 blocante unice, care acționează în multiple regiuni ale proteinei MASP-2

EXEMPLUL 12

Acest exemplu descrie analiza șoarecilor MASP-2/- în model experimental de ischemie/reperfuzie renală la șoareci.

Fundal/actualitate: Riscul de leziuni de ischemie/reperfuzie (I/R) la nivelul rinichiului la temperatura corpului este relevantă în mai multe stări clinice, incluzând șocul hipovolemic, ocluzia arterei renale și procedurile de fixare transversală.

Leziunile în ischemie-reperfuzie renală (I/R) este o cauză importantă a insuficienței renale acute, asociate cu o rată a mortalității de până la 50% (Levy et al., JAMA 275: 1489-94, 1996; Thadhani et al., N. Engl. J. Med. 334: 1448-60, 1996). Insuficiența renală post-transplant este o complicație generală și periculoasă după un transplant renal (Nicholson et al., Kidney Int. 58: 2585-91, 2000). În prezent nu există un tratament eficient al leziunilor renale în I/R și hemodializa este singurul tratament disponibil. Fiziopatologia leziunilor renale în I/R este complicată. Studiile recente atestă, că calea lectinei de activare a complementului poate avea un rol important în patogeniza leziunii renale în I/R (deVries et al., *Am. J. Path.* 165:1677-88, 2004).

Metode:

Un șoarece MASP-2(-/-) se generează cum s-a descrie în Exemplul 1 și se încrucișează invers pentru cel puțin de 10 generații cu șoareci din linia C57Bl/6. La șase șoareci masculi MASP-2(-/-) și la șase șoareci de tip sălbatic (+/+), cântărind între 22 și 25 g, se administrează o injecție intraperitoneală de Hipnovel (6,64 mg/kg; Roche products Ltd. Welwyn Garden City, UK) și ulterior se anesteziază prin inhalare cu isofluran (Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK). Isofluranul se selectează deoarece este un anestezic ușor inhalator cu toxicitate hepatică minimă; concentrațiile se realizează cu exactitate și animalul se recuperează rapid, chiar și după o anestezie prelungită. Hipnovel se administrează pentru că produce o stare de neuroleptanalgezie la animal, ceea ce înseamnă necesitatea administrării unei cantități mai mici de izofluran. Pentru a menține o temperatură constantă a corpului sub animal se plasează un așternut cald. Apoi se efectuează o incizie abdominală mediană, iar cavitatea corpului se deschide utilizând o pereche de retractoare. Țesutul conjunctiv se elimină deasupra și dedesubtul venei renale și arterelor atât ale rinichiului drept, cât și celui stâng, iar pediculul renal se clampează prin aplicarea clemelor de microaneurism pentru o perioadă de 55 de minute. Această perioadă de ischemie se bazează pe un studiu anterior, efectuat în acest laborator (Zhou et al., J. Clin Invest., 105: 1363-71 (2000)). În plus, se selectează o perioadă ischemică standard de 55 de minute după studierea ischemiei prin metoda de titrare și s-a constatat că 55 de minute provoacă o leziune stabilă, care este, de asemenea, reversibilă, cu o mortalitate redusă sub 5%. După ocluzie, 0,4 ml de soluție fiziologică caldă (37°C) se introduce în cavitatea abdominală și apoi abdomenul se închide pentru perioada de ischemie. După îndepărtarea clemelor de microaneurism, rinichii sunt supravegheați până la schimbarea culorii, o indicație a restabilirii fluxului sanguin în rinichi. O altă cantitate de 0,4 ml de soluție fiziologică caldă se introduce în cavitatea abdominală, iar deschiderea se suturează, după care animalele se returnează în cuștile lor. Probele de sânge caudal se prelevă peste 24 de ore după îndepărtarea clemelor și peste 48 de ore șoarecii se sacrifică și se colectează o probă suplimentară de sânge.

Evaluarea leziunilor renale: Funcția renală se evaluează peste 24 și 48 de ore după reperfuzare la șase șoareci masculi MASP-2(-/-) și șase șoareci WT (+/+). Măsurările creatininei în sânge se efectuează prin spectrometria de masă, care asigură un indice reproductibil al funcției renale (sensibilitate <1,0 μmol/l). Fig. 12 ilustrează graficul clearance-ului azotului ureei pentru grupa de control cu șoareci de tip sălbatic din linia C57Bl/6 și pentru grupa șoarecilor MASP-2(-/-) peste 24 ore și 48 de ore după reperfuzie. După cum se arată în fig. 12, șoarecii MASP-2(-/-) prezintă o reducere semnificativă a cantității de uree din sânge peste 24 și 48 de ore, comparativ cu șoarecii de control de tip sălbatic, indicând un efect funcțional de protecție de la leziunile renale în modelul de leziune în ischemia de reperfuzie.

În general, creșterea ureei în sânge se observa atât la șoarecii WT (+/+), cât și la șoarecii MASP-2(-/-) peste 24 și 48 de ore după procedura chirurgicală și insultele ischemice. Nivelurile de uree din sânge la un animal chirurgical non-ischemic WT (+/+) se determină separat ca constituind 5,8 mmol/l. Adicional la datele prezentate în fig. 12, un animal MASP-2(-/-) prezintă o protecție aproape completă față de insultele ischemice, cu valori de 6,8 și 9,6 mmol/l peste 24 și 48 de ore, respectiv. Acest animal se exclude din analiza grupei ca o potențială depășire, în care nu a putut fi prezentă nici o leziune ischemică. Prin urmare, analiza finală, prezentată în fig. 12, include 5 șoareci MASP-2(-/-) și șase șoareci WT (+/+) și o reducere statistic semnificativă a ureei în sânge se observă peste 24 și 48 de ore la șoarecii MASP-2(-/-) (criteriul t-Student p <0,05). Se poate presupune, că aceste rezultate indică, că inhibarea activității MASP-2 exercită un efect protector sau terapeutic în leziunile renale cauzate de ischemie.

EXEMPLUL 13

Acest exemplu descrie rezultatele, obținute într-un studiu realizat pe model experimental de degenerescență maculară pe șoareci MASP-2/-/.

Fundal/actualitate: Degenerescența maculară legată de vârstă (AMD) este principala cauză a orbirii după vârsta de 55 de ani în lumea industrializată. AMD se manifestă în două forme majore: AMD neovasculară (umedă sau exudativă) și AMD atrofică (uscată sau nonexudativă). Forma neovasculară (umedă) reprezintă 90% din pierderea vizuală severă asociată cu AMD, chiar dacă doar 20% dintre persoanele cu AMD dezvoltă forma umedă. Semnele clinice ale AMD includ multiplele depozite hipertrofice (drusen), atrofia geografică și neovascularizarea coroidală (CNV). În decembrie 2004 FDA a aprobat Macugen (pegaptanib), o nouă clasă de medicamente oftalmice care țintesc în mod specific și blochează efectele factorului de creștere al endoteliului vascular (VEGF), pentru tratamentul formei umede (neovasculare) a AMD (Ng et al., Nat Rev. Drug Discov 5: 123-32 (2006)). Deși Macugen reprezintă o nouă opțiune terapeutică promițătoare pentru un subgrup de pacienți cu AMD, persistă o necesitate stringentă de elaborare a unor tratamente suplimentare pentru această boală complexă. Liniile independente, multiple de investigare implică un rol central activării complementului în patogeneza AMD. Patogenia neovascularizării coroidale (CNV), celei mai grave forme de AMD, poate implica activarea căilor complementului.

În urmă cu douăzeci și cinci de ani Ryan a descris un model de leziune în CNV, indusă cu laser, la animale (Ryan, S.J., Tr. Am., Opth. Soc., LXXVII: 707-745, 1979). Modelul a fost inițial dezvoltat folosind maimuțe rezus, totuși, aceeași tehnologie a fost folosită în continuare pentru a dezvolta modele similare de CNV la o varietate de animale de cercetare, inclusiv la șoareci (Tobe et al., Am., J. Pathol., 1998). În acest model fotocoagularea cu laser se folosește pentru a rupe membrana Bruch, o acțiune care rezultă cu formarea de membrane asemănătoare CNV. Modelul, indus cu laser, acumulează multe dintre caracteristicile importante ale stării la om (Ambati et al., Survey Ophthalmology 48: 257-293, 2003). Modelul murin, indus cu laser, este acum bine stabilit și se utilizează ca bază experimentală într-un număr mare, aflat în creștere, de proiecte de cercetare. Este în general acceptat faptul, că modelul indus cu laser are o similitudine biologică suficientă cu CNV la om, deoarece studiile preclinice privind patogeneza și inhibarea medicamentului, utilizând acest model, sunt relevante pentru CNV la om.

Metode:

Se generează un șoarece MASP-2/-/, cum se descrie în Exemplul 1, și se încrucișează reciproc timp de 10 generații cu șoareci din linia C57Bl/6. În acest studiu se compară rezultatele obținute la șoarecii masculi MASP-2(-/-) și șoarecii MASP-2(+/+) evaluați în procesul CNV, induse cu laser, într-un model accelerat de AMD neovasculară, focusându-se asupra volumului CNV, induse de laser, prin metoda de microscopie confocală de scanare cu laser ca măsură a leziunilor tisulare și pentru determinarea nivelurilor de VEGF, unui factor angiogen puternic implicat în CNV, în epiteliul pigmentar retinian (RPE)/coroidă prin ELISA după leziunea cu laser.

Inducerea neovascularizării coroide (CNV): La ambii ochi ai fiecărui animal în ziua zero se efectuează fotocoagularea cu laser (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 μm, Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA) de un singur colaborator, care nu știe în care grupă de animale a fost indicată administrarea medicamentelor. Petele cu laser se aplică într-un mod standardizat în jurul nervului optic, utilizând un sistem de instalare a lămpilor cu fantă și o lamelă în calitate de lentilă de contact. Punctul final morfologic al leziunii cu laser se consideră apariția unui bule de cavitație, un semn considerat a corela cu deteriorarea membranei Bruch. Detalierea metodei și aprecierea rezultatelor finale sunt descrise în continuare.

Angiografia cu fluoresceină: Angiografia cu fluoresceină se efectuează cu un aparat fotografic și un sistem de imagistică (cameră TRC 50 1A, sistemul ImageNet 2.01, Topcon, Paramus, NJ) peste o săptămână după fotocoagularea cu laser. Fotografii se efectuează cu un obiectiv cu lentile 20 D, care contactează cu lentilele camerei de fund, după injectarea intraperitoneală a 0,1 ml de 2,5% fluoresceină sodică. Un specialist în retina oculară, care nu este implicat în fotocoagularea cu laser sau în angiografie, a evaluat angiogramele cu fluoresceină într-o singură ședință, neavând informații cu privire la manipulațiile anterioare cu animalele.

Volumul neovascularizării coroide (CNV): Peste o săptămână după leziunea cu laser, ochii se enuclează și se fixează cu 4% paraformaldehidă timp de 30 minute la 4°C. Cupele oculare se obțin prin îndepărtarea segmentelor anterioare și se spală de trei ori în PBS, urmată de deshidratare și rehidratare printr-o serie de metanol. După blocarea de două ori cu tampon (PBS conținând 1% albumină serică de bovină și 0,5% Triton X 100) timp de 30 de minute la temperatura camerei, cupele oculare se incubează peste noapte la 4°C cu 0,5% FITC izolectină B4 (Vector laboratories,

Burlingame, CA), diluat cu PBS conținând 0,2% BSA și 0,1% Triton X-100, care leagă reziduurile terminale ale β -D-galactozei pe suprafața celulelor endoteliale și marchează selectiv rețeaua vasculară murină. După două spălări cu PBS conținând 0,1% Triton X-100, partea neurosensorială a retinei se detașează ușor și se separă de nervul optic. Se realizează patru incizii radiale relaxante și complexul scleră-coroid-RPE restant se montează într-un mediu, care împiedică decolorarea preparatului (Immu-Mount Vectashield Mounting Medium, Vector Laboratories) și se îndepărtează lamela.

Probele, incluse în mediu, se examinău cu un microscop confocal de scanare cu laser (TCS SP, Leica, Heidelberg, Germania). Vasele se vizualizează prin excitarea cu lungimea de undă a regiunii albastre a spectrului vizibil al argonului (488 nm) și captarea emisiei între 515 și 545 nm. Pentru toate studiile de imagistică se utilizează un obiectiv de imersie în ulei 40X. Secțiunile optice orizontale (pasul 1 μ m) se obțin de pe suprafața complexului scleră-coroid-RPE. Cel mai adânc plan focal, în care se identifică rețeaua vasculară coroidală din jur, care are legătură cu leziunea, se consideră a fi fundul focarului leziunii. Orice vas din zona țintită cu laser și aflat pe suprafața regiunii, indicate mai sus, se consideră CNV. Imaginile din fiecare secțiune se stochează digital. Zona fluorescenței legate de CNV se măsoară prin analiza computerizată a imaginii cu software, atașat la microscop (TCS SP; Leica). Sumarea întregii zone fluorescente în fiecare secțiune orizontală se utilizează ca un indice, care caracterizează volumul CNV. Obținerea imaginilor se realizează de către un operator, care nu știe, cărei grupe de animale i-a fost indicată administrarea medicamentelor.

Deoarece probabilitatea ca fiecare leziune cu laser, care conduce la dezvoltarea CNV, să fie influențată de apartenența la una sau altă grupă (șoarece, ochi și pată cu laser), se compară volumele medii ale leziunilor, folosind un model mixt liniar, cu sectoare divizate cu măsurări repetate. Factorul complet al sectorului este grupa genetică din care face parte animalul, în timp ce factorul de sector divizat este ochiul. Semnificația statistică se determină la nivel de 0,05. Se construiesc comparații aposterioare ale valorilor medii cu o ajustare Bonferroni pentru comparații multiple.

Analiza factorului creșterii endoteliului vaselor (VEGF) prin metoda ELISA. Peste trei zile după leziune cu 12 pete de laser, complexul coroidian RPE se distruge cu ultrasunet în tampon de liză (20 mM imidazol·HCl, 10 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, 1% Triton X 100, 10 mM NaF, 1 mM molibdat de sodiu și 1 mM EDTA cu inhibitor de protează) pe gheață timp de 15 minute. Nivelurile de proteine VEGF din supernatant se determină cu un kit ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), care recunoaște toate variantele de îmbinare, la lungime de undă de la 450 până la 570 nm (Emax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) și normalizat la valoarea proteinei totale. Măsurătorile duplicate se efectuează de către un operator, care nu a participat la efectuarea fotocoagulării, obținerea imaginilor sau realizarea angiografiei. Cantitatea VEGF este reprezentată ca valoare medie $\pm$ SEM din cel puțin de trei experimente independente și se compară utilizând criteriul U Mann-Whitney. Ipoteza nulă se respinge la $P < 0,05$.

REZULTATE:

Evaluarea nivelurilor VEGF:

Fig. 13A ilustrează grafic nivelurile de proteină VEGF din complexul coroidian RPE izolat de la șoarecii de tip sălbatic din linia C57B16 și de la șoarecii MASP-2(-/-) în ziua zero. După cum se arată în fig. 13A, evaluarea nivelurilor VEGF indică o reducere a nivelelor de bază pentru VEGF la șoarecii MASP-2(-/-), comparativ cu șoarecii de control de tip sălbatic din linia C57bl. Fig. 13B ilustrează grafic nivelurile de proteină VEGF, măsurate în ziua a treia după leziunea indusă cu laser. După cum se arată în fig. 13B nivelurile VEGF cresc semnificativ la șoarecii de tip sălbatic (+/+) peste trei zile după leziunea indusă cu laser, conform studiilor publicate (Nozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 2328-33 (2006)). Cu toate acestea, la șoarecii MASP-2(-/-) se observă niveluri surprinzător de joase de VEGF.

Evaluarea neovascularizării coroidale (CNV):

Adițional la reducerea nivelurilor VEGF după degenerescența maculară, indusă de laser, se determină suprafața CNV până la și după leziunea cu laser. Fig. 14 ilustrează grafic volumul CNV, măsurate la șoarecii de tip sălbatic din linia C57bl și la șoarecii MASP-2(-/-) în ziua a șapte după leziunea, indusă de laser. După cum se arată în fig. 14, în ziua a șapte după leziunea indusă de laser șoarecii MASP-2(-/-) prezintă o reducere de aproximativ 30% a zonei CNV, comparativ cu șoarecii de control de tip sălbatic.

Aceste date indică o reducere a VEGF și a CNV, observată la șoarecii MASP-2(-/-), comparativ cu șoarecii de control de tip sălbatic (+/+), precum și că blocarea MASP-2 cu un inhibitor poate avea un efect preventiv sau terapeutic în tratamentul degenerescenței maculare.

EXEMPLUL 14

Acest exemplu demonstrează, că activarea trombinei poate apărea în urma activării căii lectinei în condiții fiziologice și se caracterizează gradul implicării MASP-2 în procesul patologic. În serul de șobolan sănătos, activarea căii lectinei conduce la activarea trombinei (evaluată după depunerea trombinei) concomitent cu activarea complementului (evaluată după depunerea C4). Așa cum se poate vedea în fig. 15A și 15B, activarea trombinei în acest sistem este inhibată de un anticorp de blocare a MASP-2 (în format Fab2), care se caracterizează printr-o curbă a concentrației-efect de inhibarea activării trombinei (fig. 15B), care este paralelă cu curba concentrației-efect de inhibare a activării complementului (fig. 15A). Aceste date sugerează, că activarea căii lectinei, așa cum se produce în traumă, trebuie să conducă la activarea atât a sistemului complementului, cât și a sistemelor de coagulare într-un proces care depinde în întregime de MASP-2. Prin inferență, anticorpii blocatori ai MASP-2, se pot dovedi a fi eficienți în reducerea cazurilor de coagulare sistemică excesivă, de exemplu coagularea intravasculară diseminată, care este unul dintre semnele distinctive care conduc la mortalitate în cazurile de traumatism major.

EXEMPLUL 15

Acest exemplu prezintă rezultatele obținute folosind un model localizat de reacție Schwartzman de coagulare intravasculară diseminată ("DIC") la șoarecii MASP-2-/- deficitari și șoarecii MASP-2+/+ suficienți pentru a evalua rolul căii lectinei în DIC.

Fundal/actualitate:

Așa cum se descrie mai sus, blocarea MASP-2 inhibă activarea căii lectinei și reduce generarea ambelor anafilatoxine: C3a și C5a. Anafilatoxinele C3a s-au dovedit a fi agenți de agregare puternici ai trombocitelor in vitro, dar implicarea lor in vivo este mai puțin bine definită, iar eliberarea de substanțe trombocitare și plasmină în reparația plăgii poate implica doar secundar complementul C3. În acest exemplu rolul căii lectinei se analizează la șoarecii MASP-2(-/-) și la șoarecii WT (+/+) pentru a se constata necesitatea creșterii îndelungate a activării C3 pentru a genera coagularea intravasculară diseminată.

Metode:

Șoarecii MASP-2 (-/-) utilizați în acest studiu se generează cum se descrie în Exemplul 1 și se încrucișează reciproc timp cel puțin de 10 generații cu C57Bl/6.

În acest experiment se utilizează modelul de reacție localizat Schwartzman. Reacția Schwartzman localizată (LSR) este un răspuns indus de lipopolizaharidă (LPS), cu contribuții bine caracterizate de elementele celulare și umorale ale sistemului imun congenital. Dependența LSR de complement este bine stabilită (Polak, L. et al., Nature 223: 738-739 (1969); Fong J. S. et al., J Exp Med 134: 642-655 (1971)). În modelul LSR, șoarecii se vaccinează timp de 4 ore cu TNF alfa (500 ng, intrascrotal), apoi șoarecii se anesteziază și se preparară pentru microscopia intravitală a mușchiului cremaster. Pentru observare se selectează rețelele de venule postcapilare (cu diametrul de 15-60 μm) cu flux sanguin bun (1-4 mm/s). Animalele se tratează cu anticorpi fluorescenți pentru marcarea selectivă a neutrofilelor sau trombocitelor. Rețeaua de vase se scanează secvențial și imaginile tuturor vaselor din analizele ulterioare se înregistrează digital. După înregistrarea stării bazale a microcirculației, șoarecii se administrează o singură injecție intravenoasă de LPS (100 μg), fie singură, fie cu agenții enumerați în continuare. Aceeași rețea de vase se scanează la fiecare 10 minute timp de 1 oră. Acumularea specifică de fluorofori se identifică prin reducerea fluorescenței de fundal și amplificarea imaginii de prag. Intensitatea reacțiilor se măsoară în imaginile înregistrate. Măsura primară a reacțiilor Schwartzman sunt datele agregate.

În studii se compară șoarecii de tip MASP-2 +/+ suficienți sau șoarecii de tip sălbatic expuși la un agent de diminuare a activării căii complementului cunoscut, la factorul din venin de cobra (CVF) sau la un inhibitor al activării componentelor terminale ale complementului (antagonistul C5aR). Rezultatele (fig.16A) demonstrează, că atât CVF, cât și antagonistul C5aR împiedică apariția agregatelor în rețeaua de vase. În plus, șoarecii MASP-2 -/- deficienți (fig.16B) se caracterizează, de asemenea, prin inhibarea completă a reacției Schwartzman localizate, susținând implicarea căii lectinei. Aceste rezultate demonstrează clar rolul MASP-2 în generarea DIC și susțin utilizarea inhibitorilor MASP-2 pentru tratamentul și prevenirea DIC.

EXEMPLUL 16

Acest exemplu descrie analiza șoarecii MASP-2 (-/-) într-un model experimental de transplant renal murin.

Fundal/actualitate:

Rolul MASP-2 în rezultatul funcțional al transplantului de rinichi se evaluează utilizând un model experimental murin.

Metode:

Rezultatul funcțional al transplantului de rinichi se evaluează utilizând o singură izogrefă de rinichi la șoarecii recipienți uninefrectomizați, cu șase șoareci recipienți de transplant WT (+/+) (B6) și șase șoareci recipienți de transplant MASP-2 (-/-). Pentru a evalua funcția rinichiului transplantat, rinichiul nativ rămas se îndepărtează de la recipient peste 5 zile după transplant și funcția renală se evaluează 24 de ore mai târziu prin măsurarea nivelului de azot ureic din sânge (BUN).

Rezultate:

Fig. 17 ilustrează grafic nivelurile de azot ureic în sânge (BUN) ale rinichiului la 6 zile după transplantul de rinichi la șoarecii recipienți WT (+/+) și la șoarecii recipienți MASP-2 (-/-). După cum se arată în fig. 17, la recipienții cu transplant WT (+/+) (B6) se observă valori înalte ale BUN (nivelurile normale de BUN la șoareci constituie <5 mM), indicând insuficiență renală. În contrast, șoarecii MASP-2 (-/-) recipienți de izogrefă prezentau niveluri semnificativ mai reduse de BUN, ceea ce sugerează ameliorarea funcției renale. Se remarcă faptul, că aceste rezultate se obțin utilizând grefe de la donatorii de rinichi WT (+/+), sugerând că absența numai a căii lectinei funcționale la recipientul transplantului este suficientă pentru a obține un beneficiu terapeutic.

Luate împreună, aceste rezultate indică faptul, că inhibarea tranzitorie a căii lectinei prin inhibarea MASP-2 reprezintă o metodă de reducere a morbidității și a funcției de greafă întârziată în transplantul renal și că această abordare este, probabil, utilă în alte cazuri de transplant.

EXEMPLUL 17

Acest exemplu demonstrează că șoarecii MASP-2 (-/-) sunt rezistenți la șocul septic într-un model experimental de peritonită septică polimicrobiană murină.

Fundal/actualitate:

Pentru a evalua efectele potențiale ale MASP-2 (-/-) în infecție, se evaluează modelul de peritonită septică polimicrobiană pe un model de ligare și puncție cecală (CLP). Acesta se consideră a fi cel mai precis model, care imită evoluția peritonitei septice umane. Modelul de ligare și puncție cecală (CLP) este un model în care cecul este ligat și perforat cu un ac, conducând la pătrunderea continuă a bacteriilor în cavitatea abdominală, care ajung în sânge prin drenaj limfatic și apoi se distribuie în toate organele abdominale, conducând la insuficiență multiorganică și șoc septic (Eskandari et al., *J Immunol* 148 (9): 2724-2730 (1992)). Modelul CLP mimează evoluția sepsisului, observat la pacienți, și induce un răspuns hiperinflamator precoce, urmat de o fază hipoinflamatoare pronunțată. În această fază, animalele sunt foarte sensibile la provocările bacteriene (Wichterman et al., *J. Surg. Res.* 29(2):189-201 (1980)).

Metode: Mortalitatea în infecția polimicrobiană utilizând modelul de ligare și puncție cecală (CLP) se măsoară la șoarecii WT (+/+) (n = 18) și la șoarecii MASP-2 (-/-) (n = 16). Succint, șoarecii MASP-2 deficienți și șoarecii unipari de tip sălbatic se anesteziază și cecul se exteriorizează și se leagă cu 30% mai sus de capătul distal. După aceea, cecul se perforază o dată cu un ac cu diametru de 0,4 mm. Cecul apoi se introduce în cavitatea abdominală și pielea se prinde cu cleme. Supraviețuirea șoarecilor supuși CLP se monitorizează timp de o perioadă de 14 zile după CLP. Peste 16 ore după CLP se colectează un lavaj peritoneal pentru a măsura încărcătura bacteriană. Se prepară diluții în serie de lavaj peritoneal în PBS și se inoculează pe plăci Mueller-Hinton cu incubare ulterioară la 37°C în condiții anaerobe timp de 24 ore după care se determină încărcarea bacteriană.

Peste 16 ore după CLP la șoarecii WT (+/+) și la șoarecii MASP-2 (-/-) se măsoară, de asemenea, răspunsul citokinelor al factorului necrozei tumorii alfa (TNF-alfa) la infecția bacteriană în plămâni și în splină prin reacția cantitativă de polimerizare în lanț în timp real (qRT-PCR). Nivelul seric de TNF-alfa peste 16 ore după CLP la șoarecii WT (+/+) și șoarecii MASP-2 (-/-) se cuantifică, de asemenea, prin ELISA sandwich.

Rezultate: Fig. 18 ilustrează grafic procentul supraviețuirii animalelor tratate cu CLP în funcție de numărul de zile după procedura CLP. După cum se arată în fig. 18, deficiența căii lectinei la șoarecii MASP-2 (-/-) nu sporește mortalitatea șoarecilor după infecția polimicrobiană în modelul de ligare și puncție cecală, comparativ cu șoarecii WT (+/+). Cu toate acestea, așa cum se arată în fig. 19, șoarecii MASP-2 (-/-) prezintă o încărcătură bacteriană semnificativ mai mare (aproximativ o creștere de 1000 de ori a numărului de bacterii) în lavajul peritoneal după CLP, comparativ cu animalele unipare de tip WT (+/+). Aceste rezultate atestă, că șoarecii MASP-2 (-/-) deficienți sunt rezistenți la șocul septic. Eliminarea redusă a bacteriilor la șoarecii MASP-2 deficienți în acest model se datorează unei fagocitoze mediate de C3b, deoarece s-a demonstrat că depunerea C3 este dependentă de MASP-2.

S-a determinat, că răspunsul citokinelor TNF-alfa la infecția bacteriană nu crește la șoarecii MASP-2 (-/-), comparativ cu șoarecii de control WT (+/+) (datele nu sunt prezentate). De asemenea, s-a constatat, că există o concentrație serică semnificativ mai mare de TNF-alfa la șoarecii WT (+/+) peste 16 ore după CLP, în contrast cu șoarecii MASP-2 (-/-), la care nivelul seric de TNF-alfa rămâne aproape neschimbat. Aceste rezultate sugerează, că răspunsul inflamator intens la starea septică este diminuat la șoarecii MASP-2 (-/-) ce permite animalelor să supraviețuiască în prezența unui număr mai mare de bacterii.

Luete împreună, aceste rezultate demonstrează efectele potențial dăunătoare ale influenței calea lectinei de activare a complementului în cazul septicemiei și creșterea mortalității la pacienții cu sepsis generalizat. Aceste rezultate demonstrează în continuare că deficiența MASP-2 modulează răspunsul imun inflamator și reduce nivelurile de expresie ale mediatorilor inflamatori în timpul sepsisului. Prin urmare, se consideră, că inhibarea MASP-2 (-/-) prin administrarea anticorpilor monoclonali inhibitori împotriva MASP-2 ar fi eficientă pentru a reduce răspunsul inflamator la un subiect care suferă de șoc septic.

EXEMPLUL 18

Acest exemplu descrie analiza șoarecilor MASP-2 (-/-) într-un model experimental de infecție intranasală murină.

Fundal/actualitate:

Pseudomonas aeruginosa este un patogen bacterian uman gram-negativ, care provoacă o gamă largă de infecții, în special la persoanele cu sistemul imun compromis. Este o sursă majoră de infecții nosocomiale dobândite, în special de pneumonie intraspitalicească. De asemenea, este responsabilă pentru morbiditatea și mortalitatea semnificativă la pacienții cu fibroză chistică (CF). Infecția pulmonară cu *P. aeruginosa* se caracterizează printr-o recrutare neutrofilă puternică și inflamație pulmonară semnificativă, care rezultă cu o leziune tisulară extensivă (Palanki M. S. et al., J. Med., Chem 51: 1546-1559 (2008)).

În acest exemplu se efectuează un studiu pentru a determina dacă eliminarea căii lectinei la șoarecii MASP-2 (-/-) mărește susceptibilitatea șoarecilor la infecții bacteriene.

Metode: Douăzeci și doi de șoareci WT (+/+), douăzeci și doi de șoareci MASP-2 (-/-) și unsprezece șoareci C3 (-/-) se provoacă prin administrare intranasală de tulpină bacteriană *P. aeruginosa*. Șoarecii se monitorizează în cele șase zile post-infecție și se construiesc diagramele Kaplan-Mayer, care arată procentul supraviețuirii.

Rezultate:

Fig. 20 este o diagramă a procentului de supraviețuire Kaplan-Mayer a șoarecilor WT (+/+), șoarecilor MASP-2 (-/-) sau șoarecilor C3 (-/-) peste șase zile după infecție. După cum se arată în fig. 20, nu se observă diferențe între șoarecii MASP-2 (-/-) și șoarecii WT (+/+). Cu toate acestea, îndepărtarea căii clasice (C1q) la șoarecii C3 (-/-) conduce la o susceptibilitate severă la infecțiile bacteriene. Aceste rezultate demonstrează, că inhibarea MASP-2 nu crește susceptibilitatea la infecții bacteriene, indicând că este posibilă reducerea complicațiilor inflamatorii indesezirabile la pacienții cu traumă prin inhibarea MASP-2 fără a compromite capacitatea pacientului de a lupta împotriva infecțiilor utilizând calea clasică a complementului.

EXEMPLUL 19

Acest exemplu descrie analiza farmacodinamică pentru fragmentele Fab2 de anticorpi anti-MASP-2 reprezentativi cu afinitate înaltă, identificați cum se descrie în Exemplul 10.

Fundal/actualitate:

Cum se descrie în Exemplul 10, în scopul de a identifica anticorpi cu afinitate înaltă, care blochează calea lectinei la șobolani, se utilizează proteina MASP-2 de șobolan pentru căutarea într-un display de fagi al bibliotecii anticorpilor. Această bibliotecă este concepută pentru a asigura o diversitate imunologică mare, fiind construită utilizând numai secvențe genice de imunoglobulină umană. Cum se descrie în exemplul 10, în rezultatul screeningului prin metoda ELISA se identifică aproximativ 250 de clone individuale de fagi, care se leagă cu afinitate înaltă cu proteina MASP-2 de șobolan. Secvențierea acestor clone a permis identificarea a 50 de fagi unici, care codifică anticorpii MASP-2. Din aceste clone se exprimă proteina Fab2, se purifică și se analizează pentru afinitatea de legare MASP-2 și inhibarea funcțională a căii lectinei a complementului.

Așa cum se arată în Tabelul 6 din Exemplul 10, în rezultatul acestei analize se identifică 17 fragmente Fab2 de anticorpi anti-MASP-2 cu activitate de blocare funcțională (cu un coeficient de eficiență al căutării anticorpilor blocați de 34%). Inhibarea funcțională a căii lectinei a complementului cu Fab2 se detectează după nivelul depunerii C4, care este un indicator direct al scindării C4 la acțiunea MASP-2. Foarte important, este că inhibarea în aceeași măsură se

confirmă și la evaluarea activității convertazei C3, ceea ce demonstrează blocarea funcțională a căii lectinei a complementului. Cele 17 Fab2, care blochează MASP-2, identificate, cum se descrie în Exemplul 10, inhibă puternic formarea convertazei C3 cu valori IC_{50} egale sau mai mici de 10 nM. Opt din cele 17 Fab2 identificate au valori IC_{50} în domeniul sub-nanomolar. Mai mult decât atât, toate cele 17 Fab2s, care blochează MASP-2, manifestă inhibarea în esență completă a formării convertazei C3 în testul de convertază C3 în calea lectinei, așa cum se arată în fig.8A-C și rezumate în Tabelul 6 din Exemplul 10. Mai mult decât atât, fiecare din 17 Fab2 de blocare anti-MASP-2, prezentate în Tabelul 6, inhibă puternic generarea de C3b (> 95%), demonstrând astfel specificitatea acestui test pentru convertaza C3 a căii lectinei.

Variante IgG2c de șobolan și izotip de anticorp cu lungime completă IgG2a de șoarece derivă din Fab2 # 11. Acest exemplu descrie caracterizarea parametrilor farmacodinamici in vivo ale acestor izotipuri.

Metode:

Cum se descrie în exemplul 10, proteina MASP-2 de șobolan se utilizează pentru căutarea Fab în display-ul de fagi din biblioteca anticorpilor, din care se identifică Fab2 # 11. Din Fab2 # 11 se obțin variantele de IgG2c de șobolan și variantele IgG2a de șoarece ale izotipurilor de anticorp cu lungime completă. Atât la izotipurile de anticorpi cu lungime completă IgG2c de șobolan, cât și la IgG2a de șoarece s-au determinat caracteristicile pentru parametrii farmacodinamici in vivo după cum urmează.

Studiul in vivo la șoareci:

Pentru a studia efectul dozării anticorpilor anti-MASP-2 asupra activității căii lectinei în plasma in vivo s-a efectuat un studiu farmacodinamic la șoareci. În acest studiu depunerea C4 se măsoară ex vivo într-o analiză a căii lectinei la diferite intervale de timp după administrarea subcutanată (sc) și intraperitoneală (ip) a 0,3 mg/kg sau 1,0 mg/kg de MoAb anti MASP-2 de șoarece (izotip de anticorp cu lungime completă IgG2a de șoarece, derivat din Fab2 # 11).

FIG. 21 ilustrează grafic depunerea C4b specifică în calea lectinei, măsurată ex vivo în probele de ser nediluat prelevate de la șoareci (n = 3 șoareci/grup) la intervale diferite de timp după administrarea subcutanată a 0,3 mg/kg sau 1,0 mg/kg de MoAb anti-MASP-2. Probele de ser, colectate de la șoareci înainte de administrarea anticorpului, au servit ca martori negativi (activitate 100%), în timp ce serul suplimentat in vitro cu 100 nM de același anticorp blocant anti MASP-2 a fost utilizat drept control pozitiv (activitate 0%).

Rezultatele prezentate în FIG. 21 demonstrează o inhibare rapidă și completă a depunerii de C4b după administrarea subcutanată a dozei de 1,0 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 de șoarece. O inhibare parțială a depunerii de C4b se observă după administrarea subcutanată a dozei de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 de șoarece.

Recuperarea căii lectinei continue timp de trei săptămâni după o singură administrare la șoareci a 0,6 mg/kg de MoAb anti-MASP-2. După cum se arată în fig. 22, o scădere semnificativă a activității căii lectinei apare după administrarea anticorpilor, urmând, apoi, inhibarea completă a căii lectinei, care durează aproximativ 7 zile după administrarea intraperitoneală. Restabilirea lentă a căii lectinei se observă în timpul săptămânii a doua și a treia cu restabilirea completă a căii lectinei la șoareci peste 17 zile după administrarea anticorpului monoclonal murin (MoAb) anti-MASP-2.

Aceste rezultate demonstrează, că MoAb anti-MASP-2 de șoarece, derivat din Fab2 # 11, când se administrează sistemic inhibă calea lectinei la șoareci într-o manieră dependentă de doză.

EXEMPLUL 20

Acest exemplu descrie analiza eficienței MoAb anti-MASP-2 de șoarece, derivat din Fab2 # 11, într-un model experimental pe șoareci cu degenerescență maculară legată de vârstă.

Fundal/actualitate:

Cum se descrie în exemplul 10, proteina MASP-2 de șobolan se utilizează pentru a căuta în display-ul de fagi din biblioteca anticorpilor, din care a fost identificat Fab2 # 11 ca fiind un anticorp activ funcțional. Din Fab2 # 11 se generează izotipuri ai anticorpilor IgG2c de șobolan și IgG2a de șoarece cu lungime completă. Parametrii farmacodinamici ai izotipului anticorpului cu lungime completă anti-MASP-2 de IgG2a murin se caracterizează cum se descrie în Exemplul 19. În acest exemplu, anticorpul cu lungime completă anti-MASP-2, derivat din Fab2 # 11, se analizează într-un model experimental pe șoareci de degenerescență maculară asociată vârstei (AMD), descris de Bora P.S. et al, *J Immunol* 174:491-497 (2005).

Metode: Izotipul anticorpului cu lungime completă IgG2a de șoarece, derivat din Fab2 # 11, cum se descrie în Exemplul 19, se testează într-un model experimental murin cu degenerescență maculară legată de vârstă (AMD), așa cum se descrie în Exemplul 13 cu următoarele modificări .

Administrarea MoAb anti-MASP-2 de șoarece

Două doze diferite (0,3 mg/kg și 1,0 mg/kg) de MoAb anti-MASP-2 de șoarece, în asociere cu tratamentul cu MoAb pentru controlul de izotip, se administrează intraperitoneal la șoareci WT (+/+) cu 16 ore înainte de inducerea CNV

5 Inducerea neovascularizării coroide (CNV)

Inducerea neovascularizării coroidale (CNV) și măsurarea volumului CNV se realizează utilizând fotocoagularea cu laser, cum se descrie în Exemplul 13.

Rezultate:

10 Fig. 23 ilustrează grafic suprafața CNV, măsurată peste 7 zile după leziunea cu laser, la șoarecii tratați fie cu MoAb pentru controlul de izotip, sau cu MoAb anti-MASP-2 de șoarece (0,3 mg/kg și 1,0 mg/kg). După cum se relevă din fig. 23, la șoarecii pre-tratați cu 1,0 mg/kg MoAb anti-MASP-2, peste șapte zile după tratamentul cu laser se observă o reducere statistic semnificativă ($p < 0,01$) de aproximativ 50% a CNV. După cum se arată în continuare în fig. 23, se observă că doza de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 nu este eficientă în reducerea CNV. Este de 15 notat faptul, că doza de 0,3 mg/kg de MoAb anti-MASP-2 cauzează o inhibare parțială și tranzitorie a depunerii de C4b, ca urmare a administrării subcutanate, așa cum se descrie în exemplul 19 și se prezintă în fig. 21.

Rezultatele descrise în acest exemplu demonstrează, că blocarea MASP-2 cu un inhibitor, cum ar fi MoAb anti-MASP-2, are un efect preventiv și/sau terapeutic în tratamentul degenerescentei 20 maculare. Se constată, că aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele observate în studiul efectuat la șoarecii MASP-2 (-/-), descris în exemplul 13, în care peste 7 zile după tratamentul cu laser se observă o reducere de 30% a CNV la șoarecii MASP-2 (-/-), comparativ cu șoarecii de control de tip sălbatic. Mai mult decât atât, rezultatele din acest exemplu demonstrează în continuare că anticorpul anti-MASP-2 furnizat sistemic oferă un beneficiu terapeutic local în ochi, 25 evidențiind astfel eficiența metodei sistemice de administrare pentru tratamentul pacienților cu AMD. Astfel, aceste rezultate sunt o dovadă a posibilității utilizării MoAb anti-MASP-2 în tratamentul AMD.

EXEMPLUL 21

30 Acest exemplu demonstrează, că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați de mortalitatea indusă de *Neisseria meningitidis* după infecție cu *N. meningitidis* și au un clearance crescut al bacteremiei, în comparație cu șoarecii de control de tip sălbatic.

Actualitate: *Neisseria meningitidis* este o bacterie diplococică gram-negativă heterotrofică cunoscută pentru rolul ei în meningită și în alte forme de boală meningococică, cum ar fi meningococcemia. *N. meningitidis* este o cauză majoră de morbiditate și mortalitate în perioada 35 copilăriei. Complicațiile severe includ septicemia, sindromul Waterhouse-Friderichsen, insuficiența suprarenală și coagularea intravasculară diseminată (DIC). (de exemplu, Rintala E. et al., Critical Care Medicine 28 (7): 2373-2378 (2000). În acest exemplu rolul căii lectinei se analizează la șoarecii MASP-2 (-/-) și WT (+/+) pentru a vedea dacă șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt sensibili la mortalitatea indusă de *N. meningitidis*.

40 Metode: Șoarecii cu knock-out MASP-2 se generează cum se descrie în Exemplul 1 și se încrucișează reciproc timp cel puțin de 10 generații cu șoarecii din linia C57Bl/6. La șoarecii MASP-2 KO ($n = 10$) și la șoarecii de tip sălbatic C57/B6 ($n = 10$) de zece săptămâni se inoculează prin administrare intravenoasă o doză de 5×10^8 UFC/100 μ l, 2×10^8 UFC/100 μ l sau 3×10^7 UFC/100 μ l de *Neisseria meningitidis* serogrupa A Z2491 în 400 mg/kg dextran de fier. 45 Supraviețuirea șoarecilor după infecție se monitorizează timp de 72 de ore. Probele de sânge se colectează de la șoareci la intervale de o oră după infectare și se analizează pentru a determina nivelul seric (log UFC/ml) de *N. meningitidis* pentru a confirma infectarea și a determina rata de eliminare a bacteriilor din ser.

Rezultate:

50 Fig. 24A ilustrează grafic procentul de supraviețuire al șoarecilor MASP-2 KO și WT după administrarea unei doze infecțioase de 5×10^8 UFC/100 μ l *N. meningitidis*. După cum se arată în fig. 24A, după infectarea cu doza cea mai mare de 5×10^8 UFC/100 μ l de *N. meningitidis* 100% din șoarecii MASP-2 KO au supraviețuit timp de 72 de ore după infectare. Dimpotrivă, numai 20% din șoarecii WT erau încă în viață peste 24 de ore după infectare. Aceste rezultate demonstrează, 55 că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați împotriva mortalității induse de *N. meningitidis*.

Fig. 24B ilustrează grafic log UFC/ml de *N. meningitidis* înregistrat la diferite intervale de timp în probele de sânge prelevate de la șoareci MASP-2 KO și WT infectați cu 5×10^8 UFC/100 μ l *N. meningitidis*. După cum se arată în fig. 24B, la șoarecii WT nivelul de *N. meningitidis* din sange atinge un vârf de aproximativ 6,5 log UFC/ml peste 24 de ore după infectare și coboară până la

zero peste 48 de ore după infectare. În contrast, la șoarecii MASP-2 KO, nivelul de *N. meningitidis* atinge un vârf de aproximativ 3,5 log UFC/ml peste 6 ore după infectare și coboară până la zero peste 36 de ore după infectare.

Fig. 25A ilustrează grafic procentul supraviețuirii șoarecilor MASP-2 KO și WT după infectarea cu 2×10^8 UFC/100 μ l de *N. meningitidis*. După cum se arată în fig. 25A, după infectare cu o doză de 2×10^8 UFC/100 μ l de *N. meningitidis*, 100% din șoarecii MASP-2 KO au supraviețuit pe toată perioada de 72 de ore după infectare. Dimpotrivă, numai 80% din șoarecii WT erau încă în viață peste 24 de ore după infectare. Rezultatele prezentate în fig. 24A demonstrează în continuare, că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați împotriva mortalității induse de *N. meningitidis*.

FIG. 25B ilustrează grafic log UFC/ml de *N. meningitidis* înregistrat la diferite intervale de timp în probele de sânge prelevate de la șoarecii WT infectați cu 2×10^8 UFC/100 μ l *N. meningitidis*. După cum se arată în fig. 25B, nivelul de *N. meningitidis* din sangele șoarecilor WT infectați cu 2×10^8 UFC atinge un vârf de aproximativ 4 log UFC/ml peste 12 ore după infectare și coboară până la zero peste 24 de ore după infectare. Fig. 25C ilustrează grafic log UFC/ml de *N. meningitidis* înregistrat la diferite intervale de timp în probele de sânge prelevate de la șoarecii MASP-2 KO infectați cu 2×10^8 UFC/100 μ l *N. meningitidis*. După cum se arată în fig. 25C, nivelul de *N. meningitidis* din sangele șoarecilor MASP-2 KO infectați cu 2×10^8 UFC atinge un nivel de vârf de aproximativ 3,5 log UFC/ml peste 2 ore după infectare și coboară până la zero peste 3 ore după infectare. Rezultatele prezentate în fig. 24B demonstrează că, deși șoarecii MASP-2 KO au fost infectați cu aceeași doză de *N. meningitidis*, ca și șoarecii WT, șoarecii MASP-2 KO au avut o îmbunătățire a clearance-ului bacteremiei, comparativ cu șoarecii WT.

Procentul de supraviețuire al șoarecilor MASP-2 KO și WT după infectarea cu cea mai mică doză de 3×10^7 UFC/100 μ l *N. meningitidis* constituie 100% peste 72 de ore (datele nu sunt prezentate).

Discuții

Aceste rezultate atestă, că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați împotriva mortalității induse de *N. meningitidis* și au un clearance îmbunătățit al bacteremiei, comparativ cu șoarecii WT. Prin urmare, având în vedere aceste rezultate, este de așteptat ca aplicarea terapeutică a inhibitorilor MASP-2, cum ar fi MoAb anti-MASP-2, să fie eficientă pentru tratarea, prevenirea sau atenuarea efectelor infecției cu bacterii *N. meningitidis* (adică, sepsis și DIC). Mai mult decât atât, aceste rezultate arată, că aplicarea terapeutică a inhibitorilor MASP-2, cum ar fi MoAb anti-MASP-2, nu predispune subiectul la un risc crescut de a dezvolta infecții cu *N. meningitidis*.

EXEMPLUL 22

Acest exemplu descrie descoperirea unei noi căi a lectinei, căii alternative mediate și dependente de MASP-2 de activare a C4 a complementului C3.

Actualitate:

Beneficiul terapeutic principal din utilizarea inhibitorilor activării complementului pentru a limita leziunea miocardului în rezultatul ischemiei/reperfuziei (MIRI) s-a demonstrat în mod convingător într-un model experimental de infarct miocardic la șobolani în urmă cu două decenii. sCR1 recombinant, un derivat trunchiat solubil al receptorului complementului de suprafață celulară de tip 1 (CR1), s-a administrat intravenos, efectul fiind evaluat pe un model experimental in vivo la șobolani cu MIRI. Tratamentul cu sCR1 a redus volumul infarctului cu mai mult de 40% (Weisman, H.F., et al, Science 249: 146-151 (1990)). Potențialul terapeutic al acestui inhibitor recombinant a fost ulterior demonstrat într-un studiu clinic, care arată ca administrarea sCR1 la pacienții cu MI previne insuficiența contractilă în cordul post-ischemic (Shandelya, S., et al., Circulation 87: 536-546 (1993)). Mecanismul principal, care conduce la activarea complementului în țesutul ischemic, cu toate acestea, nu a fost elucidat complet, în mare parte din cauza lipsei unor modele experimentale adecvate, înțelegerea limitată a proceselor moleculare, care conduc la activarea complementului în celulele lipsite de oxigen și influenței reciproce și sinergismului dintre diferite căi de activare a complementului.

În calitate de component fundamental al răspunsului imun, sistemul complementului asigură protecție împotriva microorganismelor invadatoare prin ambele mecanisme: dependent și independent de anticorpi. El dirijează multiple interacțiuni celulare și umorale în răspunsul imun, inclusiv chemotaxia, fagocitoza, adeziunea celulară și diferențierea celulelor B. Trei căi diferite inițiază cascada complementului: calea clasică, calea alternativă și calea lectinei. C1q subcomponenta de recunoaștere a căii clasice se leagă cu o varietate de ținte - complexe imune mai importante - pentru a iniția activarea etapizată a serin proteazelor asociate, C1r și C1s, asigurând mecanismul principal de eliminare a patogenului și complexului imun după inițierea acțiunii

- sistemului imun adaptiv. Legarea C1q cu complexe imune transformă dimerul zimogenului C1r în forma sa activă pentru a scinda și, prin aceasta, a activa C1s. C1s translează legarea în activarea complementului C1q în două etape de scindare: se transformă mai întâi C4 în C4a și C4b și apoi scindează C2 legat cu C4b cu formarea convertazei C3 - C4b2a. Acest complex transformă componentul C3, prezent în exces în plasma, în C3a și C3b. Acumularea de C3b în imediata apropiere a complexului C4b2a modifică specificitatea substratului pentru C3 pe C5 cu formarea convertazei C5 C4b2a (C3b)_n. Complexele convertazei C3 și C5, generate prin activarea căii clasice, sunt identice cu complexe, generate în rezultatul activării căii lectinei. În calea alternativă hidroliza spontană cu nivel redus al componentei C3 rezultă cu depunerea fragmentelor de proteine pe suprafețele celulelor, inițiind activarea complementului pe celulele străine, în timp ce proteinele de reglare legate cu celulele pe țesuturile organismului gazdă previn activarea, prevenind astfel auto-deteriorarea. Asemenea căii alternative, calea lectinei poate fi activată în absența complexelor imune. Activarea este inițiată prin legarea complexului multimolecular de activare a căii lectinei cu modele moleculare patogen-asociate (PAMP), în general, cu structuri de carbohidrați, prezente pe agenții patogeni bacterieni, fungici sau virali sau cu modele de glicozilare aberante pe celulele apoptotice, necrotice, maligne sau lipsite de oxigen (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556 (2000); Walport, M.J., *N. Engl. J. Med.* 344:1058-1066 (2001); Schwaebler, W., et al., *Immunobiology* 205:455-466 (2002); and Fujita, T., *Nat. Rev. Immunol.* 2:346-353 (2002)).
- Lectina fixatoare de manan (MBL) a fost primul subcomponent de recunoaștere a carbohidraților, care a format complexe cu o grupă de serin proteaze noi, denumite serin proteaze asociate-MBL (MASP) și numerotate în funcție de ordinea de descoperire a acestora (adică MASP-1, MASP-2 și MASP-3). La om, complexe de activare a căii lectinei pot fi formate cu patru subcomponente alternative de recunoaștere a carbohidraților cu specificități diferite de legare a carbohidraților, adică cu MBL 2 și cu trei reprezentanți diferiți ai familiei ficolinelor, și anume L-Ficolină, H-ficolină și M-ficolină și MASP. Două forme de MBL, MBL A și MBL C, și ficolina-A formează complexe de activare a căii lectinei cu MASP în plasma de șoarece și șobolan. Anterior a fost clonat și caracterizat MASP-2 și un produs suplimentar trunchiat al genei MASP-2 cu masa de 19 kDa, denumit MAP19 sau sMAP, la om, șoarece și șobolan (Thiel, S. Et al., *Nature* 386: 506-510 (1997), Stover, C.M., et al., *J. Immunol* 162: 3481-3490 (1999), Takahashi, M. Et al., *Int. Immunol* 11: 859-863 (1999) și Stover, C.M., et al., *J. Immunol.*, 163: 6848-6859 (1999)). MAP19/sMAP este lipsit de activitate de protează, dar poate regla activarea căii lectinei prin concurență pentru legarea MASP cu complexe de recunoaștere a carbohidraților (Iwaki, D. et al., *J. Immunol.* 177:8626-8632 (2006)).
- Există dovezi care sugerează că, din cele trei MASP, numai MASP-2 este necesară pentru a transla legarea complexelor de recunoaștere a căii lectinei în activarea complementului (Thiel, S. Et al., 1997); Vorup-Jensen, T. Et al., *J. Immunol.*, 165: 2093-2100 (2000); Thiel, S. Et al., *J. Immunol.*, 165: 878-887 (2000), Rossi, V. Et al., *J. Biol. Chem.*, 276: 40880-40887 (2001)). Această concluzie este confirmată de fenotipul unei tulpini de șoarece, descrise cel mai recent, cu deficiență de MASP-1 și MASP-3. În afară de o întârziere în declanșarea activării complementului, mediate de calea lectinei, in vitro, șoarecii cu deficit de MASP-1/3 mențin activitatea funcțională a căii lectinei. Reconstituirea serului cu deficit de MASP-1 și MASP-3 cu MASP-1 recombinant permite de a depăși această întârziere la activarea căii lectinei, ceea ce înseamnă că MASP-1 poate facilita activarea MASP-2 (Takahashi, M. Et al., *J. Immunol.* 6132-6138 (2008)). Un studiu recent a arătat, că MASP-1 (și, probabil, și MASP-3) este necesar pentru a transforma factorul D de transformare a enzimei de activare a căii alternative din forma sa zimogenă în forma sa activă enzimatic (Takahashi, M. Et al., *J. Exp Med* 207: 29-37 (2010)). Importanța fiziologică a acestui proces este subliniată de absența activității funcționale a căii alternative în plasma șoarecilor cu deficit de MASP-1/3.
- Tulpinile de șoarece, generate recent, cu deficiențe combinate țintite ale subcomponentelor de recunoaștere a carbohidraților căii lectinei MBL A și MBL C mai pot încă iniția activarea căii lectinei prin subcomponentul restant de recunoaștere a ficolinei A a căii lectinei murine - (Takahashi, K., et al., *Microbes Infect.* 4: 773-784 (2002)). Absența oricărei activități funcționale reziduale a căii lectinei la șoarecii cu deficit de MASP-2 permite de a crea un model concludent pentru a studia rolul acestui grup efector al imunității umorale înăscute în sănătate și în boală.
- Disponibilitatea tulpinilor de șoareci cu deficit de C4 și MASP-2 a permis de a defini o cale a lectinei nouă specifică, dar dependentă de MASP-2, calea alternativă de activare a C4 a complementului C3. Contribuția esențială a acestei noi căi a lectinei, mediate de activarea alternativă a C4, în pierderea post-ischemică a țesutului este confirmată de fenotipul protectiv

proeminent al deficienței MASP-2 în MIRI, în timp ce șoarecii cu deficit de C4, testați în același model, nu prezintă protecție.

În acest exemplu, se descrie o nouă cale a lectinei, mediată și dependentă de MASP-2, o cale alternativă de activare a C4 a complementului C3. Relevanța fiziologică a acestei noi căi de activare este stabilită în baza fenotipului de protecție al deficienței MASP-2 într-un model experimental de leziune a miocardului în rezultatul ischemiei/reperfuziei (MIRI), în care animalele cu deficit de C4 nu au fost protejate.

Metode:

Șoarecii cu deficit de MASP-2 nu prezintă anomalii majore. Șoarecii cu deficit de MASP-2 se generează cum se descrie în Exemplul 1. Atât șoarecii heterozigoți (+/-), cât și homozigoți (-/-) cu deficit de MASP-2 sunt sănătoși și fertili și nu prezintă anomalii majore. Speranța lor de viață este similară cu cea a animalelor unipare WT (> 18 luni). Înainte de a studia fenotipul acestor șoareci în modele experimentale de boală, șoarecii din linia MASP-2 -/- se încrucișează reciproc timp de unsprezece generații cu șoareci din linia C57BL/6. Absența totală de ARNm MASP-2 se confirmă prin Northern blot-ul preparatelor ARN hepatic selectate de poli A+, în timp ce ARNm de 1,2kb, care codifică MAP19 sau sMAP (un produs alternativ trunchiat al splicingului genei MASP2) este exprimat în exces.

Analiza prin metoda cantitativă a reacției de polimerază în lanț (qRT-PCR), utilizând perechi de primer specifici fie pentru secvența de codificare pentru domeniul serin proteazei al MASP-2 (lanțul B), fie pentru restul secvenței de codificare pentru lanțul A, relevă că nu este detectabil nici un ARNm care codifică lanțul B în MASP-2 -/-, în timp ce excesul lanțului A perturbat al transcriptului ARNm a crescut semnificativ. În mod similar, excesul de MAP19/sMAP, ARNm codificator, crește la șoareci MASP-2 +/- și șoarecii MASP-2 -/-. Nivelurile plasmatice de MASP-2, determinate prin metoda ELISA pentru 5 animale din fiecare genotip, constituie 300 ng/ml pentru controlurile WT (interval 260-330 ng/ml), 360 ng/ml pentru șoareci heterozigoți (interval 330-395 ng/ml) și nedetectabile la șoarecii MASP-2 -/-. Folosind qRT-PCR s-au stabilit profiluri de expresie ARNm, demonstrând că șoarecii MASP-2 -/- exprima ARNm pentru MBL A, MBL C, ficolină A, MASP-1, MASP-3, C1q, C1rA, C1sA, Factorul B, Factorul D, C4 și C3 într-un exces asemănător cu cel la animalele unipare cu MASP-2 suficient (datele nu sunt prezentate).

Nivelurile de C3 în plasmă la animalele unipare MASP-2/- (n=8) și MASP-2+/+ (n=7) se măsoară utilizând kitul C3 ELISA murin comercial disponibil (Kamiya, Biomedical, Seattle, WA). Nivelurile de C3 la șoarecii cu deficit de MASP-2 (valoarea medie de 0,84 mg/ml, ± 0,34) sunt similare cu cele înregistrate la șoarecii WT de control (valoarea medie 0,92, ± 0,37).

Rezultate.

MASP-2 este esențial pentru activitatea funcțională a căii lectinei.

Cum se descrie în exemplul 2 și se arată în fig. 5, analizele in vitro ale plasmei MASP-2 -/- relevă o absență totală a activității funcționale a căii lectinei pe suprafețele activate acoperite cu manan și zimosan pentru activarea C4. De asemenea, în plasma MASP-2 -/- pe suprafețele acoperite cu N-acetilglucozamină, care se leagă și declanșează activarea prin MBL A, MBL C și ficolină A (nu sunt prezentate datele), nu se detectează nici o scindare a C4 sau a C3 dependentă de calea lectinei.

Analizele serului și ale plasmei șoarecilor MASP-2 -/- demonstrează clar, că MASP-2 este necesar în mod esențial pentru activarea complementului prin calea lectinei. Deficitul total al activității funcționale a căii lectinei, totuși, lasă celelalte căi de activare a complementului intacte. Plasma MASP-2 -/- poate încă activa complementul prin calea clasică (fig. 26A) și calea alternativă (fig. 26B). În fig. 26A și 26B, simbolul "*" indică ser de la șoareci WT (MASP-2 (+/+)); simbolul "●" indică ser de la șoareci WT (C1q epuizat); simbolul "□" indică ser de la șoareci MASP-2 (-/-) și simbolul "δ" indică ser de la MASP-2 (-/-) (C1q epuizat).

Fig. 26A ilustrează grafic, că șoarecii MASP-2 -/- păstrează o cale clasică funcțională. Depunerea C3b s-a testat pe plăci de microtitrare acoperite cu complexe imune (generate in situ prin acoperire cu BSA, apoi adăugând IgG de capră anti-BSA). Fig. 26B ilustrează grafic, că șoarecii cu deficit de MASP-2 păstrează o cale alternativă funcțională. Depunerea C3b s-a testat pe plăci de microtitrare acoperite cu Zimosan în condiții, care permit numai activarea căii alternative (tampon conținând Mg^{2+} și EGTA). Rezultatele, prezentate în fig. 26A și fig. 26B, sunt valori medii din două măsurări și, de obicei, sunt obținute din trei experimente independente. Aceleași simboluri pentru datele pentru plasmă s-au utilizat în toate figurile. Aceste rezultate arată, că la șoarecii cu deficit de MASP-2 este prezentă o cale alternativă funcțională, despre care atestă rezultatele prezentate în fig. 26B în condiții experimentale concepute pentru declanșarea directă a căii alternative, în timp ce atât calea clasică, cât și calea lectinei sunt inactivate.

Calea lectinei de activare a complementului contribuie semnificativ la pierderea țesutului în inflamație în cadrul leziunii miocardului în rezultatul ischemiei/reperfuziei (MIRI).

Pentru a studia contribuția activității funcționale a căii lectinei în MIRI, se compară șoarecii MASP-2 $-/-$ și animalele unipare WT de control într-un model de MIRI cauzat de ligarea tranzitorie și reperfuzia ramificației descendente anterioare stângi a arterei coronare (LAD). Prezența sau absența complementului C4 nu are nici un impact asupra gradului de pierdere a țesutului ischemic în MIRI. S-a evaluat impactul deficienței C4 asupra dimensiunilor infarctului după MIRI experimental. După cum se arată în fig. 27A și fig. 27B, se observă dimensiuni de infarct identice atât la șoarecii cu deficit de C4, cât și la animalele unipare WT. Fig. 27A ilustrează grafic pierderea de țesut indusă de MIRI după ligarea și reperfuzia LAD la șoarecii C4 $-/-$ ($n = 6$) și la șoarecii unipari de control WT ($n = 7$). Fig. 27B ilustrează grafic dependența suprafeței infarctului (INF) de suprafața zonei de risc (AAR), demonstrând în mod clar că șoarecii C4 $-/-$ sunt la fel de susceptibili la MIRI ca și șoarecii de control WT (linia întreruptă).

Aceste rezultate demonstrează că șoarecii cu deficit de C4 nu sunt protejați de MIRI. Acest rezultat a fost neașteptat, deoarece este în conflict cu opinia larg acceptată că fragmentul principal de activare a C4, C4b, este o componentă esențială a căii clasice și lectinei a convertazei C3 - C4b2a. Prin urmare, s-a evaluat posibilitatea depistării activării specifice reziduale a căii lectinei a complementului C3 în plasmă murină și umană cu deficit de C4.

Calea lectinei poate activa complementul C3 în absența C4 prin intermediul unei noi căi alternative de activare a C4 dependentă de MASP-2.

Bazându-se pe rezultatele cercetărilor științifice din anii precedent, care indică existența unei căi alternative de activare a C4 în serul de cobai cu deficit de C4 (May, J.E. și M. Frank, J. Immunol. 111: 1671-1677 (1973)), s-a studiat prezența la șoarecii cu deficiență de C4 a activității funcționale reziduale a căii clasice sau a lectinei și s-a monitorizat activarea C3 în condiții de testare specifice ale căii, care exclud contribuțiile căii alternative.

Depunerea de C3b s-a analizat pe plăci de microtitrare acoperite cu Manan, utilizând plasmă decalcificată la concentrații plasmatice, care împiedică activarea căii alternative (1,25% și mai jos). Deși nu s-a detectat nici o scindare a C3 în plasmă cu deficit de C4, testată pentru activarea căii clasice (date nereprezentate), se observă o activitate reziduală puternică de scindare a C3 în plasma șoarecilor cu deficit de C4 când se inițiază activarea complementului prin calea lectinei. Dependența de calea lectinei se demonstrează prin inhibarea competitivă a scindării C3 după preincubarea diluțiilor plasmei cu deficit de C4 cu Manan solubil (fig.28A). După cum se arată în fig. 28A-D, activarea C3 dependentă de MASP-2 se observă în absența C4. Fig. 28A ilustrează grafic depunerea de C3b sub influența C4 $+/+$ (cruci) și C4 $-/-$ (cercuri necolorate) din plasmă de șoarece. Preincubarea plasmei C4 $-/-$ cu exces de manan în fază lichidă (1 $\mu\text{g/ml}$) înainte de testare inhibă complet depunerea C3 (cercuri colorate). Rezultatele sunt obținute în 3 experimente independente. Fig. 28B ilustrează grafic rezultatele experimentului, în care se amestecă plasmă de la șoareci (1%) de tip sălbatic, șoareci cu deficit de MASP-2 (pătrate necolorate) și C4 $-/-$ cu diferite concentrații de mAbM11 anti-MASP-2 șobolan (axa absciselor) și depunerea C3b se testează pe plăci acoperite cu Manan. Rezultatele reprezintă valorile medii ($\pm$ SD) din 4 teste (câte 2 experimente paralele pentru fiecare tip de plasmă). Fig. 28C ilustrează grafic rezultatele unui experiment în care plasmă umană, combinată cu NHS (cruci), plasmă C4 $-/-$ (cercuri necolorate) și plasmă C4 $-/-$ se preincubează cu 1 $\mu\text{g/ml}$ Manan (cercuri colorate). Rezultatele reprezintă trei experimente independente. Fig. 28D ilustrează grafic inhibarea depunerii de C3b în plasmă umană cu C4 suficient și cu deficit de C4 (1%) cu mAbH3 anti-MASP-2 umană (valoarea medie $\pm$ SD din trei experimente paralele). După cum se arată în fig. 28B, nu se detectează nici o activare C3 dependentă de calea lectinei în plasma MASP-2 $-/-$, testată în paralel, ceea ce înseamnă că această cale de activare alternativă a C3 cu C4 este dependentă de MASP-2.

Pentru a confirma în continuare aceste constatări, s-a creat o serie de mAb inhibitori recombinanți, izolați din display-ul de fagi din bibliotecile de anticorpi prin screeningul afinității față de MASP-2A recombinantă umană și de șobolan (în cazul în care reziduul de serină al domeniului proteazic activ se înlocuiește cu un reziduu de alanină prin mutageneză de site-direcționată pentru a preveni degradarea autolitică a antigenului). Anticorpii recombinanți împotriva MASP-2 (AbH3 și AbM11) se izolează din Biblioteci de combinații de anticorpi (Knappik, A. et al., J. Mol.Biol., 296: 57-86 (2000)), folosind MASP- 2A recombinantă umană și de șobolan în calitate de antigene (Chen, C.B. și Wallis, J. Biol.Chem., 276: 25894-25902 (2001)). Un fragment Fab2 anti-șobolan, care inhibă puternic activarea mediată de calea lectinei a C4 și C3 în plasmă de șoarece ($\text{IC}_{50} \sim 1 \text{ nM}$) se transformă într-un anticorp IgG2a cu lungime completă. Antiserul policlonal anti-MASP-2A murină se induce în șobolani. Aceste instrumente au permis

confirmarea dependenței de MASP-2 a acestei căi noi a lectinei, specifice pentru calea alternativă de activare a C3 cu C4, așa cum se descrie în continuare.

După cum se arată în fig. 28B, M211, un anticorp monoclonal inhibitor care se leagă selectiv cu MASP-2 de șoarece și de șobolan inhibă activarea alternativă cu C4 a C3 la șoareci cu deficit de C4, precum și activarea C3 în plasma șoarecilor WT prin calea lectinei într-o manieră dependentă de concentrație cu valori IC_{50} similare. Toate testele se efectuează cu diluții plasmatiche înalte, ceea ce a determinat disfuncționalitatea căii alternative de activare (concentrația plasmatică maximă fiind de 1,25%).

În scopul investigării prezenței unei căi similare căii lectinei, specifice pentru activarea alternativă a C3 cu C4 la om, s-a analizat plasma unui donator cu o deficiență congenitală de ambele gene C4 umane (adică, C4A și C4B), rezultând cu absența totală a C4 (Yang, Y. et al., *J. Immunol.*, 173: 2803-2814 (2004)). Fig. 28C arată, că plasma acestui pacient activează în mod eficient C3 în diluții plasmatiche înalte (ceea ce face calea de activare alternativă disfuncțională). Modul specific pentru calea lectinei de activare a C3 pe plăcile acoperite cu Manan se demonstrează în plasma murină cu deficit de C4 (fig.28A) și plasmă umană cu deficit de C4 (figura 28C) prin adăugarea concentrațiilor în exces de manan în fază lichidă. Dependența de MASP-2 a acestui mecanism de activare a C3 în plasmă umană cu deficit de C4 se evaluează utilizând AbH3, un anticorp monoclonal care se leagă în mod specific cu MASP-2 umană și suprimă activitatea funcțională a MASP-2. După cum se arată în fig. 28D, AbH3 inhibă depunerea C3b (și C3dg) atât în plasma umană deficientă de C4, cât și în cea cu C4 suficient, cu activitate comparabilă.

Pentru a evalua rolul posibil al altor componente ale complementului în activarea alternativă a C3 cu C4, se testează plasma de la șoareci MASP-1/3 $-/-$ și Bf/C2 $-/-$ concomitent cu plasmă MASP-2 $-/-$, C4 $-/-$ și C1q $-/-$ (în calitate de control) atât în condiții specifice pentru calea lectinei, cât și pentru calea clasică. Cantitatea relativă de scindare C3 este reprezentată în raport cu cantitatea de C3 depusă la utilizarea plasmei șoarecilor WT.

Fig. 29A ilustrează grafic o analiză comparativă a activității convertazei C3 în plasma de la diferite tulpini de șoareci cu deficit de complement, testate în condiții specifice atât activării căii lectinei, cât și activării căii clasice. Probele de plasmă diluate (1%) de la șoareci WT ($n = 6$), șoareci MASP-2 $-/-$ ($n=4$), șoareci MASP-1/3 $-/-$ ($n = 8$), șoarecii C4 $-/-$ ($n=8$), șoareci C4/MASP-1/3 $-/-$ ($n = 8$), șoareci Bf/C2 $-/-$ ($n = 2$) și C1q $-/-$ ($n=2$) se testează în paralel. Reconstituirea plasmei Bf/C2 $-/-$ cu 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de C2 recombinant de șobolan (Bf/C2 $-/-$ + C2) permite restabilirea depunerii C3b. Rezultatele reprezintă valorile medii ($\pm$ SD). ** $p < 0,01$ (comparativ cu plasma de la șoareci WT). După cum se arată în fig. 29A, se observă o depunere C3 semnificativă în plasmă C4 $-/-$, testată în condiții de testare specifice pentru calea lectinei, dar nu în condiții specifice pentru calea clasică. Din nou, nu se observă nici o depunere a C3 în plasma cu deficit de MASP-2 prin calea de activare a căii lectinei, în timp ce în aceeași plasmă se înregistrează depunerea C3 prin calea clasică. În plasma MASP-1/3 $-/-$ depunerea C3 apare atât în condiții de testare specifice pentru calea lectinei, cât și în condiții de testare specific pentru calea clasică. Nu se observă depunerea C3 în plasma cu o deficiență combinată de C4 și MASP-1/3, fie utilizând condiții specific pentru calea lectinei, fie utilizând condiții specifice pentru calea clasică. Nici o depunere a C3 nu se detectează în plasmă C2/Bf $-/-$ nici prin calea lectinei, nici prin calea clasică. Reconstituirea plasmei de șoarece C2/Bf $-/-$ cu C2 recombinant, totuși, restabilește scindarea C3, mediată atât prin calea lectinei, cât și prin calea clasică. Condițiile de testare au fost validate, utilizând plasma C1q $-/-$.

Fig. 29B ilustrează grafic datele studiului cinetic cu rezolvarea în timp a activității convertazei C3 în plasma de la diferite tulpini de șoareci cu deficit de complement: șoareci WT, fB $-/-$, C4 $-/-$, MASP-1/3 $-/-$ și MASP-2 $-/-$ în condiții de testare specifice pentru calea lectinei de activare (1% plasmă, rezultatele se obțin de obicei din trei experimente independente). După cum se arată în fig. 29B, în timp ce nu se observă nici o scindare a C3 în plasma MASP-2 $-/-$, plasma fB $-/-$ scindează C3 cu cinetică similară cineticii din plasma șoarecilor WT. O întârziere semnificativă în conversia C3 în C3b (și C3dg), dependentă de calea lectinei, se observă în plasma C4 $-/-$, precum și în plasmă cu deficit de MASP-1/3. Această întârziere a activării C3 în plasma MASP-1/3 $-/-$ recent s-a demonstrat a fi dependentă de MASP-1, și nu de MASP-3 (Takahashi, M., et al., *J. Immunol.* 180:6132-6138 (2008)).

Discuții

Rezultatele, descrise în acest exemplu, sugerează că activitatea funcțională a MASP-2 este esențială pentru activarea C3 prin calea lectinei atât în prezența, cât și în absența C4. Mai mult decât atât, C2 și MASP-1 sunt necesare pentru funcționarea acestei căi noi alternative, specifice

pentru calea lectinei de activare a C3 cu C4. Analiza comparativă a activității funcționale a căii lectinei în plasma MASP-2 $-/-$, precum și în plasma C4 $-/-$ a evidențiat existența unei căi nerecunoscute anterior independente de C4, dar dependentă de MASP-2, de activare a complementului C3, și a arătat, că C3 poate fi activat într-un mod dependent de calea lectinei în absența totală a C4. În timp ce compozițiile moleculare detaliate și secvența evenimentelor de activare a acestei noi convertaze C3, dependente de MASP-2, persistă neclarificate, rezultatele prezentate atestă, că această cale alternativă de activare a C4 necesită suplimentar prezența complementului C2, precum și a MASP-1. Pierderea activității de scindare a C3, mediată de calea lectinei, în plasma șoarecilor cu deficiență combinată de C4 și MASP-1/3 poate fi explicată prin rolul, descris recent, al MASP-1 de a amplifica activarea complementului dependentă de MASP-2 prin scindarea și activarea directă a MASP-2 (Takahashi, M. et al., J. Immunol., 180: 6132-6138 (2008)). De asemenea, MASP-1 poate amplifica activitatea funcțională a MASP-2 prin abilitatea sa de a scinda C2 (Moller-Kristensen, et al., Int. Immunol., 19: 141-149 (2007)). Ambele activități pot explicate prin viteza redusă cu care plasma MASP-1/3 deficiență scindează C3 prin activarea pe calea lectinei și prin necesitatea MASP-1 pentru susținerea conversiei C3 prin calea alternativă de activare a C4.

Incapacitatea plasmei C2/fB $-/-$ de a activa C3 prin calea lectinei s-a dovedit a fi dependentă de C2, deoarece adiția C2 recombinant de șobolan în plasma C2/fB $-/-$ a restabilit abilitatea plasmei reconstituite de a activa C3 pe plăcile acoperite cu manan.

Constatarea faptului, că deficiența de C4 perturbază în mod specific calea clasică de activare a complementului, în timp ce calea lectinei menține un nivel fiziologic foarte important al activității convertazei C3 prin calea alternativă de activare cu C4 dependentă de MASP-2, necesită o reevaluare a rolului căii lectinei în diferite modele experimentale de boli, incluzând modelul experimental de infecție cu *S. pneumoniae* (Brown, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 16969-16974 (2002), Experimental Allergic Encephalomyelitis (Boos, L.A. et al., Glia 49: 158-160 (2005) și modelele de regenerare a ficatului murin dependentă de C3 (Clark, A. et al., Mol. Immunol. 45: 3125-3132 (2008)).

Ultima grupă menționată demonstrează, că șoarecii cu deficit de C4 pot activa C3 într-un mod independent pe cale alternativă, deoarece inhibarea in vivo a căii alternative prin reducerea mediată de anticorp a activității funcționale a factorului B nu cauza regenerarea ficatului dependentă de scindarea C3 la șoarecii C4 $-/-$. (Clark, A. et al., (2008)). Această cale alternativă de activare a C3 cu C4, mediată cu calea lectinei, poate explica, de asemenea, pierderea unui fenotip de protecție a deficienței C4 în modelul de MIRI, precum și într-un model, descris anterior, de respingere a alogrefei renale (Lin, T. et al., Am. J. Pathol., 168: 1241-1248 (2006)). Spre deosebire de aceasta, rezultatele recente au demonstrat independent un fenotip semnificativ de protecție la șoarecii MASP-2 $-/-$ în modele de transplant renal (Farrar, C. A. et al., Mol. Immunol. 46: 2832 (2009)).

Astfel, rezultatele acestui exemplu confirmă punctual de vedere, că activarea C3 cu C4 pe calea alternativă, dependentă de MASP-2, este un mecanism relevant fiziologic, care poate fi important în condițiile în care disponibilitatea C4 este limitată de activarea C3.

EXEMPLUL 23

Acest exemplu descrie activarea C3 cu substrat de trombină și depunerea C3 pe manan la șoarecii WT (+/+), MASP-2 $-/-$, F11 $-/-$, F11/C4 $-/-$ și C4 $-/-$.

Actualitate:

Cum se descrie în Exemplul 14, s-a constatat că activarea trombinei poate să apară în urma activării căii lectinei în condiții fiziologice, demonstrând extinderea implicării MASP-2 în procesul patologic. C3 joacă un rol central în activarea sistemului complementului. Activarea C3 este necesară pentru activarea complementului atât pe calea clasică, cât și pe calea alternativă. Pentru a determina dacă C3 este activat de substraturile de trombină s-a efectuat un experiment.

Metode

Activarea C3 cu substraturi de trombină.

Activarea C3 se măsoară în prezența următoarelor forme activate de substraturi de trombină: FCXIa uman, FVIIa uman, FXa de bovină, FXa uman, proteina C activată umană și trombina umană. C3 se incubează cu diferite substraturi de trombină, apoi se separă în condiții de reducere pe 10% geluri SDS-poliacrilamidă. După transferul electroforetic, utilizând membrană de celuloză, membrana se incubează cu anti-C3 murină de șobolan monoclonal combinat cu biotină, detectat cu un kit de HRP- streptavidină și dezvoltat utilizând reactivul ECL.

Rezultate

Activarea C3 implică scindarea lanțului α intact în lanțul α' trunchiat și C3a solubil

(nereprezentat în fig. 30). În fig. 30 sunt prezentate rezultatele unei analize Western blot privind activarea C3 uman cu substraturi de trombină, în care lanțul C3 alfa nescindat și produsul lanțului α' de activare sunt arătate prin săgeți. După cum se arată în fig. 30, incubarea C3 cu formele activate de factor XI și de factor X de coagulare umană, precum și de factor X de coagulare activat de bovine, poate scinda C3 in vitro în absența oricăror proteaze ale complementului.

Depunerea C3 pe manan

Testele de depunere a C3 se efectuează pe probe serice obținute de la șoarecii WT, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11 (-/-)/C4(-/-) și C4(-/-). F11 este gena care codifică factorul de coagulare XI. Pentru măsurarea activării C3, plăcile de microtitrare se acoperă cu manan (1 μ g/godeu), apoi se adaugă ser de anti-HSA de ovine (2 μ g/ml) în TBS/tween/ Ca^{2+} . Plăcile se blochează cu 0,1% HSA în TBS și se spală ca mai sus. Probele de plasmă se diluează în 4 mM barbitol, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , pH 7.4, se adaugă pe plăci și se incubează pentru 1,5 ore la 37°C. După spălare, C3b legat se detectează utilizând anticorp de iepure anti-C3c uman (Dako), urmat de anticorp de capră anti-IgG de iepure conjugat cu fosfatază alcalină și pNPP.

Rezultate

Fig. 31 prezintă rezultatele testului de depunere a C3 pe probele de ser, obținute de la șoarecii WT, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4(-/-) și C4 (-/-). După cum se arată în fig. 31, există o cale funcțională a lectinei chiar și în absența completă a C4. După cum se arată în continuare în fig. 31, această activare a complementului, dependentă de noua cale a lectinei, necesită factorul de coagulare XI.

Discuții

Anterior rezultatelor obținute în acest experiment, s-a crezut de către specialiștii din domeniu, că pentru activarea C4 este necesară calea lectinei de activare a complementului. În consecință, datele de la șoarecii cu knockout C4 (și cei cu deficit de C4) au fost interpretate cu presupunerea, că astfel de organisme sunt cu calea lectinei deficitară (adițional la deficiența căii clasice). Rezultatele prezente demonstrează, că această opinie este eronată. Astfel, de exemplu, pot fi eronate concluziile studiilor anterioare, care presupuneau, că calea lectinei nu este importantă în anumite situații de boli bazate pe fenotipul animalelor cu deficit de C4. Datele descrise în acest exemplu atestă, de asemenea, că în contextul fiziologic de ser integru, calea lectinei poate activa componentele cascadei de coagulare. Astfel, se demonstrează, că există o relație reciprocă între complement și coagularea cu implicarea MASP-2.

EXEMPLUL 24

Acest exemplu descrie metode evaluare a efectului unui anticorp anti-MASP-2 asupra lizării hematiilor în probele de sânge de la pacienții cu hemoglobinurie nocturnă paroxistică (PNH).

Fundal/actualitate

Hemoglobinuria nocturnă paroxistică (PNH), denumită și sindromul Marchiafava-Micheli, este o boală a sângelui, care poate pune viața în pericol, caracterizată prin anemie hemolitică intravasculară indusă de complement. Semnul distinctiv al PNH este hemoliza cronică intravasculară, care este o consecință a activării necontrolate a complementului prin cale alternativă. (Lindorfer, M. A. et al., Blood 115 (11) (2010)). Anemia în PNH se datorează distrugerii hematiilor în fluxul de sânge. Simptomele PNH includ: urină roșie, datorită apariției hemoglobinei în urină, și tromboză. PNH poate evolua ca atare, denumită în acest caz PNH primară sau în contextul altor afecțiuni ale măduvei osoase, cum ar fi anemia aplastică, denumită PNH secundară. Tratamentul PNH include transfuzia de sânge în cazul anemiei, anticoagularea în cazul trombozei și utilizarea anticorpului monoclonal eculizumab (Soliris), care protejează celulele sanguine împotriva distrugerii imune prin inhibarea sistemului complementului (Hillmen P. et al., N. Engl. Med. 350 (6): 552-9 (2004)). Cu toate acestea, la o parte semnificativă din pacienții cu PNH, tratați cu eculizumab persistă anemia hemolitică mediată imun, deoarece anticorpul nu blochează activarea complementului prin calea alternativă.

Acest exemplu descrie metodele de evaluare a efectului unui anticorp anti-MASP-2 asupra lizării hematiilor din probele de sânge obținute de la pacienții cu PNH (care nu au fost tratați cu Soliris), incubate cu ser normal uman acidulat omogenizat, care coincide după grupa de sânge.

Metode

Reactive: Eritrocitele de la donatori sănătoși și de la pacienții care suferă de PNH (netratați cu Soliris) se obțin prin venipunctură și se prepară cum se descrie în Wilcox, L. A. et al., Blood 78: 820-829 (1991). Anticorpul anti-MASP-2 cu activitate de blocare funcțională a căii lectinei se generează cum se descrie în Exemplul 10.

Analiza hemolizei

Metoda de determinare a efectului anticorpilor anti-MASP-2 asupra abilității de blocare a

hemolizei eritrocitelor de la pacienții cu PNH se realizează utilizând metoda descrisă de Lindorfer, M.A. et al., Blood 15 (11): 2283-91 (2010) și Wilcox, L.A. et al., Blood 78: 820-829 (1991), ambele surse fiind incluse aici ca referință. Cum descrie Lindorfer et al., eritrocitele din probele de la pacientul cu PNH se centrifughează, supernatantul leuco-trombocitar se aspiră și celulele se spală în tampon de veronal-gelatină (GVB) înainte de fiecare experiment. Eritrocitele se testează pentru susceptibilitate la liza mediată de APC după cum urmează. Serul de la om sănătos, compatibil după grupa de sânge, se diluează cu GVB conținând 0,15 mM CaCl₂ și 0,5 mM MgCl₂ (GVB⁺) și se acidulează până la pH 6,4 (NHS acidulat, aNHS) și se utilizează pentru reconstituirea eritrocitelor până la un hematocrit de 1,6% în 50% aNHS. Amestecurile se incubează apoi la 37°C și peste 1 oră eritrocitele se peletizează prin centrifugare. Densitatea optică a unei părți din supernatantul recuperat se măsoară la 405 nM și se utilizează pentru a calcula procentul lizei. Probele reconstituite în ser-EDTA acidulat se prelucrează în mod similar și se utilizează pentru a determina liza, care nu este mediată de complement (de obicei sub 3%). Liza completă (100%) se determină după incubarea eritrocitelor în apă distilată.

Pentru a determina efectul anticorpilor anti-MASP-2 asupra hemolizei eritrocitelor PNH, eritrocitele de la pacienții cu PNH se incubează în aNHS în prezența concentrațiilor incrementale de anticorpi anti-MASP-2 și prezența/cantitatea de hemoliză se cuantifică ulterior.

Având în vedere faptul, că anticorpul anti-MASP-2 blochează activarea ulterioară a complementului pe calea alternativă, este de așteptat ca anticorpul anti-MASP-2 să fie eficient în blocarea hemolizei eritrocitelor în PNH, mediată de calea alternativă, a și vor fi utili ca mijloc terapeutic pentru tratarea pacienților suferinzi de PNH.

EXEMPLUL 25

Acest exemplu descrie metode evaluare a efectului unui anticorp blocant anti-MASP-2 asupra activării complementului cu crioglobuline în probe de sânge, obținute de la pacienți care suferă de crioglobulinemie.

Fundal/actualitate: Crioglobulinemia se caracterizează prin prezența de crioglobuline în ser. Crioglobulinele reprezintă imunoglobuline simple sau mixte (de obicei anticorpi IgM), care la temperaturi joase se supun agregării reversibile. Agregarea conduce la activarea căii clasice a complementului și la inflamație în rețeaua vasculară, în special, la periferie. Manifestările clinice ale crioglobulinemiei includ vasculită și glomerulonefrită.

Crioglobulinemia poate fi clasificată pe baza compoziției crioglobulinei după cum urmează: crioglobulinemia de tip I sau crioglobulinemia simplă este rezultat al unei imunoglobuline monoclonale, de obicei imunoglobulina M (IgM); crioglobulinemia de tip II și III (crioglobulinemie mixtă), care conține factori reumatoizi (RF), fiind, de obicei, IgM în complexe cu porțiunea Fc a IgG policlonale.

Stările asociate cu crioglobulinemia includ: infecția cu virusul hepatitei C, tulburările limfoproliferative și alte boli autoimune. Complexele imune cu conținut de complex de crioglobulină provoacă un sindrom clinic de inflamație sistemică, posibil datorită abilității lor de a activa complementul. În timp ce complexe imune IgG activează în mod normal calea clasică a complementului, complexe care conțin IgM pot activa, de asemenea, complementul prin calea lectinei (Zhang, M. et al., Mol Immunol 44(1-3): 103-110 (2007) și Zhang, M., et al., J. Immunol., 177 (7): 4727-34 (2006)).

Studiile imunohistochimice au demonstrat în continuare că complexe imune de crioglobulină conțin componente ale căii lectinei, iar biopsiile de la pacienții cu glomerulonefrită crioglobulinemică au prezentat dovezi imunohistochimice ale activării căii lectinei in situ (Ohsawa, I. et al., Clin Immunol 101 (1): 59-66 (2001)). Aceste rezultate sugerează, că în bolile crioglobulinemice calea lectinei poate contribui la inflamații și la rezultate nefavorabile.

Metode

Metoda de determinare a efectului anticorpilor anti-MASP-2 asupra abilității de a bloca efectele adverse ale crioglobulinemiei se efectuează utilizând analiza de conversie a C3 în fază lichidă, cum descrie Ng Y.C. et al., Arthritis and Rheumatism 31 (1): 99-107 (1988), încorporată aici ca referință. După cum descrie Ng et al., În crioglobulinemia mixtă esențială (EMC) factorul reumatoid monoclonal (mRF), de obicei IgM, se complexează cu IgG policlonală cu formarea unui crioprecipitat caracteristic de complexe imune (IC) (crioglobulină de tip II). S-a constatat, că imunoglobulinele și C3 sunt prezente pe pereții vaselor în țesuturile afectate, cum ar fi în piele, nervi și rinichi. După cum descrie Ng et al., mRF marcat cu ¹²⁵I se adaugă la ser (ser uman normal și ser obținut de la pacienți suferinzi de crioglobulinemie), se incubează la 37°C și se măsoară legarea cu eritrocite.

Conversia C3 în fază lichidă se determină în ser (ser normal uman și ser obținut de la pacienți

suferinzi de crioglobulinemie) în prezența sau în absența următoarelor IC: BSA-anti BSA, mRF, mRF plus IgG sau crioglobuline, în prezența sau în absența anticorpilor anti-MASP-2. Fixarea C3 și C4 cu IC se măsoară utilizând un test de coprecipitare cu F(ab')₂ anti-C3 și F(ab')₂ anti-C4.

Având în vedere faptul că, s-a arătat că anticorpul anti-MASP-2 blochează activarea căii lectinei, este de așteptat ca anticorpul anti-MASP-2 să fie eficienți în blocarea efectelor adverse mediate de complement, asociate cu crioglobulinemia, și vor fi utili ca medicament terapeutic pentru tratarea pacienților suferinzi de crioglobulinemie.

EXEMPLUL 26

Acest exemplu descrie metode evaluare a efectului unui anticorp anti-MASP-2 asupra probelor de sânge obținute de la pacienții cu boală de aglutinină rece, care se manifestă sub formă de anemie.

Fundal/actualitate: Boala de aglutinină rece (CAD), este un tip de anemie hemolitică autoimună. Anticorpul aglutininelor la rece (de obicei, IgM) sunt activate de temperaturi joase și leagă și agreghează cu celulele roșii din sânge. Anticorpul de aglutinină rece se combină cu complementul și atacă antigenul pe suprafața celulelor roșii din sânge. Aceasta conduce la opsonizarea celulelor roșii din sânge (hemoliză), care declanșează eliminarea acestora prin sistemul reticuloendotelial. Temperatura, la care se produce aglutinarea, variază de la pacient la pacient. CAD se manifestă sub formă de anemie. Când rata de distrugere a hematiilor din sânge depășește capacitatea măduvei osoase de a produce un număr adecvat de celule care transportă oxigen, apare anemia. CAD poate fi cauzată de o boală sau de o tulburare, denumită "CAD secundară", cum ar fi o boală infecțioasă (pneumonie cu micoplasmă, oreion, mononucleoză), boală limfoproliferativă (limfom, leucemie limfocitară cronică) sau tulburări ale țesutului conjunctiv. Pacienții cu CAD primară sunt considerați a avea o afecțiune limfoproliferativă a măduvei osoase de grad redus. Atât CAD primară, cât și secundară sunt stări dobândite.

Metode

Reactive

Eritrocitele de la donatori sănătoși și de la pacienții care suferă de CAD se obțin prin venipunctură. Anticorpul anti-MASP-2 cu activitate de blocare funcțională a căii lectinei se generează așa cum se descrie în Exemplul 10.

Efectul anticorpilor anti-MASP-2 de a bloca activarea căii lectinei, mediată de aglutinine reci, poate fi determinată după cum urmează. Eritrocitele de la pacienții cu grupă sanguină I cu factorul rezus pozitiv sunt sensibilizați cu aglutinine reci (adică, cu anticorpi IgM) în prezența sau absența anticorpilor anti-MASP-2. Eritrocitele se testează apoi pentru abilitatea de a activa calea lectinei prin măsurarea legării C3.

Având în vedere, că s-a constatat că anticorpul anti-MASP-2 blochează activarea căii lectinei, este de așteptat ca anticorpul anti-MASP-2 să fie eficienți în blocarea efectelor adverse mediate de complement, asociate cu boala de aglutinină la rece și, astfel, să fie utili ca remediu terapeutic pentru tratarea pacienților care suferă de boală de aglutinină la rece.

EXEMPLUL 27

Acest exemplu descrie metode evaluare a efectului unui anticorp anti-MASP-2 asupra lizării hematiilor din sânge în probele de sânge obținute de la șoareci cu sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS)

Fundal/actualitate: Sindromul hemolitic uremic atipic (aHUS) se caracterizează prin anemie hemolitică, trombocitopenie și insuficiență renală, cauzată de trombi plachetari în microcirculația rinichilor și a altor organe. aHUS se asociază cu reglarea defectuoasă a complementului și poate fi sporadic sau ereditar. aHUS se asociază cu mutații în genele care codifică activarea complementului, incluzând factorul H al complementului, cofactorul B și factorul I, precum și factorul H-1 asociat al complementului (CFHR1) și proteina 3 legată cu factorul H al complementului (CFHR3). Zipfel, P. F. et al., PLoS Genetics 3 (3): e41 (2007). Acest exemplu descrie metodele de evaluare a efectului unui anticorp anti-MASP-2 asupra lizei celulelor roșii din sânge în probele de sânge obținute de la șoareci cu aHUS.

Metode

Efectul anticorpilor anti-MASP-2 în tratamentul aHUS se poate determina într-un model experimental pe șoareci cu această boală, la care gena fH endogenă de șoarece se înlocuiește cu un omolog uman, care codifică o formă mutantă de fH, frecvent depistată la pacienții cu aHUS. (Pickering M.C., et al., J. Exp. Med. 204 (6): 1249-1256 (2007), încorporat aici prin referință). După cum descrie Pickering et al., astfel de șoareci dezvoltă o patologie asemănătoare aHUS. Pentru a evalua efectul unui anticorp anti-MASP-2 în tratamentul aHUS, anticorpul anti-MASP-2 se administrează șoarecilor mutanți cu aHUS și se compară liza hematiilor din sânge, care apare la

șoarecii tratați cu anticorpi anti-MASP-2, cu liza eritrocitelor la șoarecii de control netratați. Având în vedere faptul, că s-a constatat că anticorpii anti-MASP-2 blochează activarea căii lectinei, este de așteptat ca anticorpii anti-MASP-2 să fie eficienți în blocarea lizei celulelor roșii din sânge la mamiferele, care suferă de aHUS.

5 EXEMPLUL 28

Acest exemplu descrie metode evaluare a efectului unui anticorp anti-MASP-2 în tratament glaucomului.

Fundal/actualitate: S-a demonstrat că activarea necontrolată a complementului contribuie la progresia leziunilor degenerative ale celulelor ganglionare retiniene (RGC), ale sinapselor și axonilor lor în glaucom. (Tezel G. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51: 5071-5082 (2010)). De exemplu, studiile histopatologice ale țesuturilor umane și studiile in vivo, utilizând diferite modele experimentale pe animale, au demonstrat că în retina glaucomatoasă se sintetizează componentele complementului, inclusiv C1q și C3, și se formează complexul terminal al complementului (Stasi K. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1024-1029 (2006); Kuehn M.H. et al., *Exp Eye Res* 83: 620-628 (2006)). Așa cum se descrie în continuare în Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research* 87: 89-95 (2008), sinteza și depunerea complementului se induce cu ischemia/reperfuzia retiniană și întreruperea cascadei complementului întârzie degenerarea RGC. În acest studiu la șoarecii, purtători de întrerupere țintă a componentei C3 a complementului, se determina întârzierea leziunilor degenerative celulelor ganglionare retiniene (RGC) după ischemia/reperfuzia tranzitorie a retinei, în comparație cu animalele normale.

20 Metode

Metoda de determinare a efectului anticorpilor anti-MASP-2 asupra degenerării RGC se efectuează pe un model experimental de ischemie/reperfuzie a retinei pe animale, așa cum se descrie în Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research* 87: 89-95 (2008), încorporat aici ca referință. Așa cum descrie Kuehn et al., ischemia retinei se induce prin anestezia animalelor, apoi inserarea unui ac de calibru 30 conectat la un rezervor, care conține soluție fiziologică tamponată cu fosfat, prin corneea în camera anterioară a ochiului. Rezervorul cu soluție fiziologică se ridică apoi pentru a produce o presiune intraoculară de 104 mmHg, suficientă pentru a întreruperea completă a circulației prin rețeaua de vase retiniene. Creșterea ischemiei intraoculare se confirmă prin albirea irisului și retinei și ischemia se menține timp de 45 de minute doar la ochiul stâng; ochiul drept servește drept control și în el nu se efectuează cateterizarea. Șoarecii apoi se eutanasează peste 1 sau 3 săptămâni după insultele ischemice. Anticorpii anti-MASP-2 se administrează la șoareci fie local în ochi, fie sistemic pentru a elimina efectul unui anticorp anti-MASP administrat înainte de insultul ischemic.

Imunohistochimia ochilor se efectuează folosind anticorpi împotriva C1q și C3 pentru a detecta depunerea complementului. Leziunea nervului optic poate fi, de asemenea, evaluată utilizând metoda standard de microscopie electronică. Cuantificarea RGC retiniene la supraviețuitori se efectuează utilizând marcarea cu gamma sinucleină.

Rezultate

Așa cum descrie Kuehn et al., la șoarecii de control normali ischemia retiniană tranzitorie rezultă cu modificări degenerative ale nervului optic și depozitele C1q și C3 retiniene sunt detectabile prin imunohistochimie. În contrast, șoarecii cu deficit de C3 prezintă o reducere semnificativă a degenerării axonale, prezentând doar niveluri minore ale leziunilor nervului optic la o săptămână după inducție. Pe baza acestor rezultate, se așteaptă ca rezultate similare să se observe atunci când această analiză se efectuează la șoareci cu knock-out MASP-2 și atunci când anticorpii anti-MASP-2 se administrează unui șoarece normal înainte de insultul ischemic.

EXEMPLUL 29

Acest exemplu demonstrează că un inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp anti-MASP-2, este eficient în tratamentul stărilor după iradiere și/sau în tratamentul, ameliorarea sau prevenirea sindromului acut de iradiere.

Actualitate

Expunerea la doze mari de iradiații ionizante cauzează moarte prin două mecanisme principale: toxicitatea pentru măduva osoasă și declanșarea sindromului gastrointestinal. Toxicitatea pentru măduva osoasă rezultă printr-o reducere a tuturor celulelor hematologice, predisponând organismul la moarte prin infecție și hemoragie. Sindromul gastrointestinal este o formă mai severă și este cauzată de o pierdere a funcției de barieră intestinală datorată dezintegrării stratului epitelial intestinal și a pierderii funcției endocrine intestinale. Aceasta conduce la septicemie și la sindromul de răspuns inflamator sistemic asociat, care rezultă cu deces.

Calea lectinei a complementului este un mecanism imun congenital, care inițiază inflamația ca

răspuns la leziunea tisulară și expunerea la suprafețe străine (adică bacterii). Blocarea acestei căi conduce la îmbunătățirea rezultatelor tratamentului șoarecilor în modele cu leziuni tisulare intestinale ischemice sau cu șoc septic. Se presupune că calea lectinei poate declanșa inflamație excesivă și dăunătoare ca răspuns la leziunea tisulară indusă de radiații. Blocarea căii lectinei poate

- 5 reduce, astfel, leziunea secundară și crește supraviețuirea după expunerea la radiații acute.
Obiectivul studiului efectuat, așa cum se descrie în acest exemplu, a fost de a evalua efectul blocării căii lectinei asupra supraviețuirii șoarecilor într-un model experimental de leziuni prin radiație la administrarea anticorpilor anti-MASP-2 murină.

Metode și materiale

- 10 Materiale

Materialele de testare utilizate în acest studiu sunt: (i) un anticorp (mAbM11) anti-MASP-2 murină cu afinitate înaltă și (ii) un anticorp (mAbH6) anti-MASP-2 umană cu afinitate înaltă, care blochează componenta proteică a MASP-2 a căii lectinei a complementului, produsă în celulele de mamifere transfectate. Concentrațiile de dozare constituie 1 mg/kg de anticorp (mAbM11) anti-MASP-2 murină, 5 mg/kg de anticorp (mAbH6) anti-MASP-2 umană sau soluție fiziologică sterilă. Pentru fiecare sesiune de dozare, se prepară un volum adecvat de soluții proaspete de dozare.

- 15

Animale

- 20 Șoarecii masculi tineri mature din linia Swiss-Webster au fost furnizați de Harlan Laboratories (Houston, TX). Animalele au fost adăpostite în cuști cu fund tare, cu așternut Alpha-Dri și erau asigurați cu hrană certificate pentru rozătoare PMI 5002 (Animal Specialties, Inc., Hubbard OR) și cu apă ad libitum. În cuștile pentru animale se monitoriza permanent temperatura, și se instalează un ciclu de lumină/întuneric de 12 ore/12 ore.

Iradieră

- 25 După o aclimatizare de 2 săptămâni în încăpere specială, șoarecii au fost iradiați cu 6,5 și 7,0 Gy prin expunerea întregului corp în grupe de câte 10 animale cu o intensitate a dozei de 0,78 Gy/min, utilizând un sistem Therapax X-RAD 320 echipat cu un generator de raze X de înaltă stabilitate de 320 kV, tub de raze X din metaloceramică, colimator cu raze X variabile și filtru (Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT). Nivelurile dozei s-au selectat pe baza studiilor anterioare, efectuate cu aceeași specie de șoareci, indicând că LD_{50/30} a fost cuprinsă între 6,5 și 7,0 Gy (datele nu sunt prezentate).

- 30

Prepararea și administrarea medicamentelor

- 35 În conformitate cu protocolul, un anumit volum de soluții inițiale concentrate s-a diluat cu soluție fiziologică răcită pe gheață cu obținerea soluțiilor cu doze de 0,2 mg/ml de anticorp (mAbM11) anti-MASP-2 murină sau 0,5 mg/ml de anticorp (mAbH6) anti-MASP-2 umană. Administrarea anticorpilor mAbM11 și mAbH6 anti-MASP-2 s-a realizat prin injecție intraperitoneală, utilizând un ac de calibrul 25, în funcție de greutatea animalului, pentru a elibera 1 mg/kg de mAbM11, 5 mg/kg de mAbH6 sau de soluție fiziologică în calitate de placebo.

Protocolul studiului

- 40 Șoarecii au fost repartizați aleatoriu în grupe, așa cum se descrie în Tabelul 8. Greutatea și temperatura corpului au fost măsurate și înregistrate zilnic. Șoarecii din grupele 7, 11 și 13 au fost sacrificați în ziua 7 post-iradiere și sângele s-a colectat prin puncție cardiacă sub anestezie profundă. Animalele supraviețuitoare în ziua 30 după iradiere au fost sacrificate în același mod și s-a colectat sângele. Plasma s-a preparat din probele de sange colectate, în conformitate cu protocolul și a fost returnată sponsorului pentru efectuarea analizei.

- 45

Grupele de studiu

Tabelul 8

Nr. grupe	Nr. de șoareci în grupă	Nivelul de iradiere (Gy)	Tratamentul	Programul de dozare
1	20	6.5	Placebo	18 ore înainte de iradiere, 2 ore după iradiere, rapel săptămânal
2	20	6.5	anticorp (mAbM11) anti-MASP-2 murină	18 ore înainte de iradiere
3	20	6.5	anticorp (mAbM11) anti-MASP-2 murină	18 ore înainte de iradiere, 2 ore după iradiere, rapel săptămânal

Nr. grupe	Nr. de șoareci în grupă	Nivelul de iradiere (Gy)	Tratamentul	Programul de dozare
4	20	6.5	anticorp (mAbM11) anti- MASP-2 murină	2 ore după iradiere, rapel săptămânal
5	20	6.5	anticorp (mAbH6) anti- MASP-2 umană	18 ore înainte de iradiere, 2 ore după iradiere, rapel săptămânal
6	20	7.0	Placebo	18 ore înainte de iradiere, 2 ore după iradiere, rapel săptămânal
7	5	7.0	Placebo	2 ore după iradiere
8	20	7.0	anticorp (mAbM11) anti-MASP-2 murină	18 ore înainte de iradiere
9	20	7.0	anticorp (mAbM11) anti- MASP-2 murină	18 ore înainte de iradiere, 2 ore după iradiere, rapel săptămânal
10	20	7.0	anticorp (mAbM11) anti- MASP-2 murină	2 ore după iradiere, rapel săptămânal
11	5	7.0	anticorp (mAbM11) anti- MASP-2 murină	2 ore după iradiere
12	20	7.0	anticorp (mAbH6) anti- MASP-2 umană	18 ore înainte de iradiere, 2 ore după iradiere, rapel săptămânal
13	5	Nu	Nu	Nu

Analiza statistică

Curbele de supraviețuire Kaplan-Meier au fost generate și utilizate pentru a compara timpul mediu de supraviețuire în grupele de tratament utilizând criteriul de rang logaritm și criteriul Wilcoxon. Sunt prezentate valorile medii cu deviațiile standard sau valorile medii cu valoarea erorii standard de la medie. Comparațiile statistice s-au realizat utilizând criteriul bilateral Student unipar între animalele iradiate de control și grupele de tratament individual.

Rezultate

Curbele de supraviețuire Kaplan-Meier pentru grupele iradiate cu doze de 7,0 și 6,5 Gy sunt prezentate în fig. 32A și 32B, respectiv, și sunt rezumate mai jos în Tabelul 9. În general, tratamentul înainte de iradiere cu anticorp (mAbM11) anti-MASP-2 murină crește supraviețuirea șoarecilor iradiați, în comparație cu animalele de control iradiate tratate cu placebo la niveluri de expunere de 6,5 (creștere cu 20%), cât și de 7,0 Gy (creștere cu 30%). La nivelul de expunere de 6,5 Gy tratamentul post-iradiere cu anticorp anti-MASP-2 murină rezultă cu o creștere modestă a supraviețuirii (cu 15%), în comparație cu animalele iradiate de control tratate cu placebo.

Pentru comparație, toate animalele tratate cu un nivel de expunere de 7,0 Gy au arătat creșterea supraviețuirii, comparativ cu animalele de control iradiate tratate cu placebo. Cea mai mare schimbare în supraviețuire s-a înregistrat la animalele care au administrat mAbH6, și anume o creștere a supraviețuirii cu 45%, comparativ cu animalele de control. În plus, la nivelul de expunere de 7,0 Gy, primele cazuri de mortalitate în grupa tratată cu mAbH6 s-au constatat în ziua 15 post-iradiere, comparativ cu ziua 8 post-iradiere pentru animalele de control iradiate și tratate cu placebo, adică supraviețuirea în grupa de animale tratate depășea cu 7 zile supraviețuirea animalelor de control. La nivelul de expunere de 7,0 Gy timpul mediu până la mortalitate pentru șoarecii, la care s-a administrat mAbH6 ($27,3 \pm 1,3$ zile), a fost semnificativ mai mare ($p = 0,0087$), comparativ cu animalele de control ($20,7 \pm 2,0$ zile) la același nivel de expunere.

Procentul modificării greutateii corporale, în comparație cu greutatea corporală cu 1 zi înainte de iradiere (ziua -1), a fost înregistrat pe tot parcursul studiului. O pierdere tranzitorie de greutate s-a constatat la toate animalele iradiate, fără evidențierea unor modificări diferențiale datorate tratamentului cu mAbM11 sau mAbH6, comparativ cu controlul (datele nu au fost prezentate). La sfârșitul studiului toate animalele supraviețuitoare au prezentat o creștere a greutateii corporale,

comparative cu greutatea corporală inițială (ziua -1).

Ratele de supraviețuire la animalele testate expuse iradierii

Tabelul 9

Grupele de testare	Nivelul de expunere	Supraviețuirea (%)	Timpul până la moarte (Media $\pm$ SEM, Zile)	Numărul de zile până la primul caz de deces/ultimul caz de moarte
Iradierie de control	6.5 Gy	65 %	24.0 $\pm$ 2.0	9/16
Administrarea mAbM11 pre-expunere	6.5 Gy	85 %	27.7 $\pm$ 1.5	13/17
Administrarea mAbM11 pre + post-expunere	6.5 Gy	65 %	24.0 $\pm$ 2.0	9/15
Administrarea mAbM11 post-expunere	6.5 Gy	80 %	26.3 $\pm$ 1.9	9/13
Administrarea mAbH6 pre+post-expunere	6.5 Gy	65 %	24.6 $\pm$ 1.9	9/19
iradiere de control	7.0 Gy	35 %	20.7 $\pm$ 2.0	8/17
Administrarea mAbM11 pre-expunere	7.0 Gy	65 %	23.0 $\pm$ 2.3	7/13
Administrarea mAbM11 pre + post-expunere	7.0 Gy	55 %	21.6 $\pm$ 2.2	7/16
Administrarea mAbM11 post-expunere	7.0 Gy	70 %	24.3 $\pm$ 2.1	9/14
Administrarea mAbH6 pre+post-expunere	7.0 Gy	80 %	27.3 $\pm$ 1.3*	15/20

*p = 0.0087 conform criteriului bilateral Student unipar pentru animalele iradiate de control și grupele de animale iradiate și tratate cu una și aceeași doză de iradiere.

Discuții

Sindromul acut de iradiere constă din trei subsindroame definite: hematopoietic, gastrointestinal și cerebrovascular. Sindromul observat depinde doza de iradiere, totodată efectele hematopoietice se observă la om la expuneri semnificative la iradiere parțială sau completă a suprafeței corpului în doză, care depășește 1 Gy. Sindromul hematopoietic se caracterizează prin depresie severă a funcției măduvei osoase, care conduce la pancitopenie cu modificări ale numărului elementelor de sânge, hematiilor și leucocitelor, precum și a trombocitelor, care apar concomitent cu afectarea sistemului imun. În acest caz, cel puțin, se observă un număr redus de neutrofile și trombocite în sângele periferic, neutropenie, febră, și, drept complicații, sepsisului și hemoragia necontrolabilă, care conduc la deces.

În studiul prezent, s-a constatat că administrarea mAbH6 conduce la creșterea supraviețuirii șoarecilor masculi din linia Swiss-Webster, iradiati cu raze X a întregului corp la un nivel de 7,0 Gy. În mod special, la nivelul de expunere de 7,0 Gy, 80% dintre animalele care au administrat mAbH6 au supraviețuit până la 30 de zile, comparativ cu 35% dintre animalele iradiate de control tratate cu placebo. Este important de menționat, că primul caz de deces al animalelor din această grupă s-a înregistrat numai în ziua 15 după iradiere, adică cu 7 zile mai târziu, decât la animalele iradiate de control tratate cu placebo. Curios, că la expunerea la raze X la un nivel mai mic (6,5 Gy), administrarea mAbH6 nu influența asupra supraviețuirii sau întârzierii apariției cazurilor de deces, în comparație cu animalele iradiate de control tratate cu placebo. Pot exista mai multe motive pentru această diferență în răspunsul la nivelurile de expunere, deși verificarea oricărei ipoteze poate necesita studii suplimentare, inclusiv colectarea prealabilă a probelor pentru analiza culturilor microbiologice și pentru estimarea parametrilor hematologici. O explicație poate fi pur și simplu aceea, că numărul de animale repartizate în grupuri poate împiedica vizualizarea

diferențelor subtile legate de tratament. De exemplu, în grupele conținând $n = 20$, diferența de supraviețuire între 65% (mAbH6 la expunere la 6,5 Gy) și 80% (mAbH6 la expunere la 7,0 Gy) este de 3 animale. Pe de altă parte, diferența dintre 35% (placebo în calitate de control la expunere la 7,0 Gy) și 80% (mAbH6 la expunere la 7,0 Gy) este de 9 animale și oferă dovezi convingătoare

despre diferența rezultatelor, existentă în grupele de animale tratate. Aceste rezultate demonstrează, că anticorpii anti-MASP-2 sunt eficienți în tratarea unui mamifer, care prezintă risc sau suferă de efectele dăunătoare ale sindromului acut de iradiere.

EXEMPLUL 30

Acest exemplu demonstrează, că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați de mortalitatea indusă de *Neisseria meningitidis* după infectare sau cu *N. meningitidis* serogrupa A, sau cu *Neisseria meningitidis* serogrupa B.

Metode

Șoarecii cu knock-out MASP-2 (șoareci MASP-2 KO) se generează așa cum se descrie în Exemplul 1. La șoarecii MASP-2 KO cu vârstă de 10 săptămâni ($n = 10$) și la șoarecii de tip sălbatic din linia C57/BL6 (WT) ($n=10$) se inoculează prin injectare intraperitoneală (ip) o doză de $2,6 \times 10^7$ CFU de *Neisseria meningitidis* serogrupa Z2491 în volum de 100 μ l. Doza infecțioasă se administrează șoarecilor împreună cu dextran de fier într-o concentrație finală de 400 mg/kg. Supraviețuirea șoarecilor după infecție se monitorizează timp de 72 de ore.

Intr-un experiment separat, la șoarecii MASP-2 KO de 10 săptămâni ($n = 10$) și la șoarecii de tip sălbatic din linia C57/BL6 ($n = 10$) se inoculează prin injectare i.p. o doză de 6×10^6 CFU de *Neisseria meningitidis* serogrupa B tulpina MC58 într-un volum de 100 μ l. Doza infecțioasă se administrează la șoareci împreună cu dextran de fier într-o doză finală de 400 mg/kg. Supraviețuirea șoarecilor după infecție se monitorizează timp de 72 de ore. De asemenea se determină un scor de boală pentru șoarecii WT și MASP-2 KO timp de 72 de ore după infecție, care se bazează pe parametrii de manifestare a bolii, descriși în continuare în tabelul 10, în conformitate cu schema lui Fransen et al. (2010) cu mici modificări.

Estimarea evoluției bolii asociate cu semnele clinice la șoarecii infectați

Tabelul 10

Semne	Scorul
Normal	0
Blana puțin ciufulită	1
Blană ciufulită, privire lentă și ochi umezi	2
Blană ciufulită, letargie și ochi închiși	3
Stare depresivă și fără mișcare după stimulare	4
Mort	5

Probele de sânge se prelevă de la șoareci la intervale de 1 oră după infectare și se determină nivelul seric (log UFC/ml) de *N. meningitidis* pentru a confirma prezența infecției și a determina rata de eliminare a bacteriilor din ser.

Rezultate

Fig. 33 reprezintă o diagramă Kaplan-Meyer, care ilustrează grafic procentul supraviețuirii șoarecilor MASP-2 KO și WT după administrarea unei doze infecțioase de $2,6 \times 10^7$ UFC de *N. meningitidis* serogrupa A Z2491. După cum se arată în fig. 33, 100% din șoarecii MASP-2 KO au supraviețuit pe tot parcursul perioadei de 72 de ore după infecție. Dimpotrivă, numai 80% din șoarecii WT ($p = 0,012$) erau încă în viață peste 24 de ore după infectare și numai 50% din șoarecii WT erau încă în viață peste 72 de ore după infectare. Aceste rezultate demonstrează, că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați de mortalitatea indusă de *N. meningitidis* serogrupa A Z2491.

Fig. 34 reprezintă o diagramă Kaplan-Meyer, care ilustrează grafic procentul supraviețuirii șoarecilor MASP-2 KO și WT după administrarea unei doze infecțioase de 6×10^6 UFC de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58. După cum se arată în fig. 34, 90% din șoarecii KO MASP-2 au supraviețuit pe toată perioada de 72 de ore după infecție. În contrast, numai 20% din șoarecii WT ($p = 0,0022$) au rămas încă în viață peste 24 de ore după infectare. Aceste rezultate demonstrează, că șoarecii cu deficiență de MASP-2 sunt protejați de mortalitatea indusă de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58.

Fig. 35 ilustrează grafic valoarea log UFC/ml de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58, determinată la momente diferite de timp în probele de sânge prelevate de la șoarecii MASP-2 KO și WT după infectare i.p. cu 6×10^6 UFC de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58 ($n = 3$ la momente de timp diferite pentru ambele grupe de șoareci). Rezultatele sunt exprimate ca valori medii $\pm$ SEM. După cum se arată în fig. 35, la șoarecii WT nivelul de *N. meningitidis* din sânge a atins un vârf de aproximativ 6,0 log UFC/ml la 24 de ore după infectare și s-a redus până la

aproximativ 4,0 log UFC/ml la 36 de ore după infecție. În contrast, la șoarecii MASP-2 KO, nivelul de *N. meningitidis* a atins un vârf de aproximativ 4,0 log UFC/ml la 12 ore după infectare și s-a redus până la aproximativ 1,0 log UFC/ml la 36 de ore după infectare (simbolul "*" indică $p < 0,05$; simbolul "***" indică $p = 0,0043$). Aceste rezultate demonstrează că, deși șoarecii MASP-2 KO au fost infectați cu aceeași doză de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58 ca și șoarecii WT, șoarecii MASP-2 KO au un clearance mai înalt al bacteremiei, în comparație cu șoarecii WT.

Fig. 36 ilustrează grafic scorul mediu al bolii la șoarecii MASP-2 KO și WT la 3, 6, 12 și 24 de ore după infectare cu 6×10^6 UFC de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58. După cum se arată în fig. 36, șoarecii cu deficit de MASP-2 au prezentat o rezistență înaltă la infecție, cu scoruri de boală mult mai mici peste 6 ore (simbolul "*" indică $p = 0,0411$), 12 ore (simbolul "***" indică $p = 0,0049$) și 24 ore (simbolul "***" indică $p = 0,0049$) după infectare, comparativ cu șoarecii WT. Rezultatele din fig. 36 sunt exprimate ca valori medii $\pm$ SEM.

Astfel, rezultatele din acest exemplu demonstrează, că șoarecii cu deficit de MASP-2 sunt protejați de mortalitatea indusă de *Neisseria meningitidis* după infectare sau cu *N. meningitidis* serogrupa A, sau cu *N. meningitidis* serogrupa B.

EXEMPLUL 31

Acest exemplu demonstrează, că administrarea anticorpului anti-MASP-2 după infectare cu *N. meningitidis* crește supraviețuirea șoarecilor infectați cu *N. meningitidis*.

Fundal/actualitate.

Cum se descrie în exemplul 10, proteina MASP-2 de șobolan a fost utilizată pentru selectarea Fab din display-ul de fagi al bibliotecii, din care a fost identificat Fab2 # 11 în calitate de anticorp activ funcțional. Din Fab2 # 11 au fost generați anticorpii cu lungime completă împotriva izotipurilor IgG2c de șobolan și IgG2a de șoarece. Au fost caracterizați parametrii farmacodinamici ai anticorpului anti-MASP-2 cu lungime completă a izotipului IgG2a de șoarece (așa cum se descrie în Exemplul 19).

În acest exemplu, anticorpul anti-MASP-2 de șoarece cu lungime completă, derivat din Fab2 # 11, s-a analizat într-un model experimental pe șoareci cu infecție cu *N. meningitidis*.

Metode

Izotipul IgG2a al anticorpului cu lungime completă anti-MASP-2 murină, derivat din Fab2 # 11, generat așa cum s-a descris mai sus, se testează pe un model experimental cu șoareci infectați cu *N. meningitidis* după cum urmează.

Administrarea anticorpilor monoclonali (MoAb) anti-MASP-2 murină după infectare

Șoarecii din linia C57/BL6 Charles River de nouă săptămâni se tratează cu anticorp inhibitor al MASP-2 de șoarece (1,0 mg/kg) ($n = 12$) sau cu izotip de control al anticorpului ($n = 10$) peste 3 ore după injectarea i.p. a unei doze mari (4×10^6 UFC) de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58.

Rezultate

Fig. 37 reprezintă o diagramă Kaplan-Meier, care ilustrează grafic supraviețuirea șoarecilor după administrarea unei doze infecțioase de 4×10^6 UFC de *N. meningitidis* serogrupa B tulpina MC58, urmată de administrarea la 3 ore după infectare fie a unui anticorp inhibitor al MASP-2 (1,0 mg/kg), sau a anticorpului izotipului – în calitate de control. După cum se arată în fig. 37, 90% din șoarecii tratați cu anticorpi anti-MASP-2 au supraviețuit pe toată perioada de 72 de ore după infectare. Dimpotrivă, numai 50% din șoarecii tratați cu anticorpul izotip în calitate de control au supraviețuit pe toată perioada de 72 de ore după infectare. Simbolul "*" indică $p = 0,0301$, determinat prin compararea celor două curbe de supraviețuire.

Aceste rezultate demonstrează, că administrarea anticorpului anti-MASP-2 este eficientă pentru tratarea și îmbunătățirea supraviețuirii la subiecții infectați cu *N. meningitidis*.

Așa cum s-a demonstrat aici, utilizarea anticorpului anti-MASP-2 în tratamentul unui subiect infectat cu *N. meningitidis* este eficientă când acesta se administrează în decurs de 3 ore după infectare și se așteaptă să fie eficient timp de la 24 ore până la 48 de ore după infectare. Boala meningococică (fie meningococcemia sau meningita) este o urgență medicală, iar terapia se va iniția imediat ce se suspectează o boală meningococică (adică înainte ca *N. meningitidis* să fie identificat pozitiv ca agent etiologic).

În baza rezultatelor pentru șoarecii MASP-2 KO, prezentate în Exemplul 30, se consideră, că administrarea anticorpului anti-MASP-2 înainte de infectarea cu *N. meningitidis* ar fi, de asemenea, eficientă pentru a preveni sau ameliora severitatea infecției.

EXEMPLUL 32

Acest exemplu demonstrează, că administrarea anticorpului anti-MASP-2 este eficientă pentru tratarea infecției cu *N. meningitidis* în serul uman.

Actualitate

Pacienții cu niveluri serice reduse de MBL funcțională se caracterizează prin susceptibilitate înaltă la infecții bacteriene și fungice recurente (Kilpatrick et al., Biochim Biophys Acta 1572: 401-413 (2002)). Se știe că *N. meningitidis* este recunoscut de MBL și s-a arătat că serurile cu

deficit de MBL nu lizează *Neisseria*.
În baza rezultatelor, descrise în Exemplele 30 și 31, s-au efectuat o serie de experimente pentru a determina eficacitatea administrării anticorpului anti-MASP-2 pentru tratarea infecției cu *N. meningitidis* în seruri umane cu deficit de complement și în seruri de control. Experimentele s-au efectuat într-o concentrație înaltă de ser (20%) pentru a păstra calea de activare a complementului.

Metode

1. Activitatea bactericidă serică în diferite seruri umane cu deficit de complement și în seruri umane tratate cu anticorp anti-MASP-2 uman

În acest experiment s-au utilizat următoarele seruri umane cu deficit de complement și seruri umane de control:

Probe de seruri umane testate (arătate în fig. 38)

Tabelul 11

Proba	Tipul de ser
A	Ser normal uman (NHS) + anticorp (Ab) anti-MASP-2 umană
B	NHS + Ab izotip de control
C	MBL -/- ser uman
D	NHS
E	NHS (HI) termoinactivat

Un anticorp recombinant anti-MASP-2 uman se izolează dintr-o Bibliotecă de combinații de anticorpi (Knappik, A. et al., J. Mol.Biol., 296: 57-86 (2000)), folosind MASP-2A umană recombinantă ca antigen (Chen, C.B. and Wallis, J. Biol.Chem., 276: 25894-25902 (2001)). Se identifică un fragment scFv de anticorp uman cu un singur lanț, care inhibă puternic activarea a C4 și C3, mediată de calea lectinei, în plasma umană (IC₅₀ ~ 20 nM) și a fost transformat într-un anticorp anti-IgG4 umană cu lungime completă.

N. meningitidis serogrupa B-MC58 se incubează cu diferite seruri, prezentate în tabelul 11, fiecare într-o concentrație serică de 20% cu sau fără adăugarea anticorpului inhibitor al MASP-2 umană (3 μg în 100 μl de volum total) la 37°C cu agitare. Probele se prelevă la următoarele intervale de timp: la 0, 30, 60 și 90 de min, se plachează și apoi se determină numărul de microorganisme viabile. Serul uman termoinactivat se utilizează în calitate de control negativ.

Rezultate.

Fig. 38 ilustrează grafic valoarea log UFC/ml al numărului de *N. meningitidis* serogrupa B-MC58 viabile, recoltate la diferite intervale de timp din serul uman, și prezentate în tabelul 11. Tabelul 12 prezintă rezultatele utilizării criteriului t Student parametric pentru datele, prezentate în fig. 38.

Rezultatele utilizării criteriului t Student parametric pentru datele, prezentate în fig. 38 (timpul 60 min)

Tabelul 12

	Dif. medie (Log)	Statistic concludentă? P<0.05?	Suma valorilor P
A vs B	-0.3678	Da	*** (0.0002)
A vs C	-1.1053	Da	*** (p<0.0001)
A vs D	-0.2111	Da	** (0.0012)
C vs D	1.9	Da	*** (p<0.0001)

După cum se arată în fig. 38 și în tabelul 12, uciderea dependentă de complement a *N. meningitidis* în 20% ser uman crește semnificativ la adăugarea anticorpului inhibitor al MASP-2 umană.

2. Determinarea uciderii *N. meningitidis* dependente de complement în 20% (v/v) ser de la șoarecii cu deficit de MASP-2.

În acest experiment s-au utilizat următoarele seruri de șoareci cu deficit de complement și seruri de șoareci în calitate de control.

Probele de ser murin testate (prezentate în fig. 39)

Tabelul 13

Probele	Tipul serului
A	WT

B	MASP-2 -/-
C	MBL A/C -/-
D	(HIS) termoinactivat WT

N. meningitidis serogrupa A B-MC58 se incubează cu diferite seruri murine cu deficiență de complement, fiecare într-o concentrație a serului de 20%, la 37°C cu agitare. Probele se colectează la intervale de timp de 0-, 15-, 30-, 60-, 90- și 120, se plachează și apoi se determină numărul de microorganisme viabile. Serul uman termoinactivat se utilizează în calitate de control negativ.

5 Rezultate

Fig. 39 ilustrează grafic valoarea log UFC/ml al numărului de *N. meningitidis* serogrupa B-MC58 viabile, determinat la diferite intervale de timp în probele de ser de la șoareci și prezentate în Tabelul 13. După cum se arată în fig. 39, serurile șoarecilor MASP-2 -/- prezintă un nivel mai înalt de activitate bactericidă pentru *N. meningitidis*, comparativ cu serurile de la șoarecii WT. Simbolul "***" indică $p = 0,0058$, simbolul "****" indică $p = 0,001$. Tabelul 14 prezintă rezultatele

utilizării criteriului t Student parametric pentru datele, prezentate în fig. 39.

Rezultatele utilizării criteriului t Student parametric pentru datele, prezentate în fig. 39.

Tabelul 14

Comparație	Intervalul de timp	Diferența medie (LOG)	Statistic concludentă? ($p < 0.05$)?	Suma valorilor P
A vs. B	60 min.	0.39	da	** (0.0058)
A vs. B	90 min.	0.6741	da	*** (0.001)

15 Astfel, rezultatele din acest exemplu demonstrează, că serul MASP-2 -/- are un nivel mai înalt de activitate bactericidă pentru *N. meningitidis*, decât serul de la șoarecii WT.

EXEMPLUL 33

Acest exemplu demonstrează efectul inhibitor al deficienței MASP-2 asupra lizării celulelor roșii din sânge în probele de sânge obținute într-un model experimental de hemoglobinurie paroxistică nocturnă (PNH).

20 Fundal/actualitate

Hemoglobinuria paroxistică nocturnă (PNH), denumită și sindromul Marchiafava-Micheli, este o boală a sângelui, care poate pune viața în pericol, caracterizată prin anemie hemolitică intravasculară indusă de complement. Semnul distinctiv al PNH este hemoliza intravasculară cronică, mediata de complement, care este o consecință a activării neregulate a căii alternative a complementului datorită absenței reguletoarelor complementare CD55 și CD59 pe eritrocitele PNH, cu hemoglobinurie și anemie ulterioare. (Lindorfer, M. A. et al., Blood 115 (11) (2010); Risitano, A.M., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11: 528-535 (2011)). Anemia în PNH se datorează distrugerii hematiilor din sânge. Simptomele PNH includ: urină roșie, datorită apariției hemoglobinei în urină, dureri de spate, oboseală, dispnee și tromboză. PNH se poate dezvolta ca atare, denumită PNH primară sau în contextul altor afecțiuni ale măduvei osoase, cum ar fi anemia aplastică, denumită PNH secundară. Tratamentul PNH include transfuzia de sânge în cazul anemiei, anticoagulante în cazul trombozei și utilizarea anticorpului monoclonal ecilizumab (Soliris®), care protejează celulele sanguine împotriva distrugerii imune prin inhibarea sistemului complementului (Hillmen P. et al., N. Engl. Med. 350 (6): 552-9 (2004)). Eculizumab (Soliris®) este un anticorp monoclonal umanizat, care întărește componenta complementară C5, blocând scindarea acesteia cu convertazele C5, împiedicând astfel producerea de C5a și asamblarea MAC. Tratamentul pacienților cu PNH cu ecilizumab rezultă cu o reducere a hemolizei intravasculare, măsurată cu lactatdehidrogenază (LDH), ceea ce conduce la stabilizarea hemoglobinei și independent de transfuzie la aproximativ jumătate dintre pacienți (Hillmen P. et al., Mini-Reviews in Medicinal Chimie, vol. 11 (6) (2011)). În timp ce aproape toți pacienții aflați în tratament cu ecilizumab ating niveluri normale sau aproape normale de LDH (datorită controlului hemolizei intravasculare), doar aproximativ o treime dintre pacienți ating o valoare a hemoglobinei care depășește 11 g/dl, iar pacienții tratați în continuare cu ecilizumab continuă să manifeste o anemie moderată până la severă (adică, dependentă de transfuzie) în proporții aproximativ egale (Risitano A.M. et al., Blood 113: 4094-100 (2009)). Așa cum s-a menționat în literatura de specialitate (Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11: 528-535 (2011)), s-a demonstrat că pacienții cu PNH tratați cu ecilizumab conțin fragmente C3 legate cu o parte semnificativă din eritrocitele lor (în timp ce pacienții netratați nu le conțin), conducând la concluzia că fragmentele de C3 legate cu membrana funcționează ca opsonine pe eritrocite în PNH, rezultând cu entraparea

lor în celulele reticuloendoteliale prin receptorii C3 specifici și prin hemoliza extravasculară ulterioară. Prin urmare, strategiile terapeutice, adițional la utilizarea ecilizumabului, sunt necesare pentru acei pacienți, care dezvoltă hemoliză extravasculară mediată de fragmentul C3, deoarece aceștia necesită în continuare transfuzii de hematii.

- 5 Acest exemplu descrie metode evaluare a efectului serului cu deficiență de MASP-2 și al serului tratat cu agent inhibitor al MASP-2 asupra lizării hematiilor din sângele colectat într-un model experimental de PNH la șoareci și demonstrează eficacitatea inhibării MASP-2 la subiecții tratați, care suferă de PNH, și sprijină, de asemenea, utilizarea inhibitorilor MASP-2 pentru ameliorarea efectelor hemolizei extravasculare, mediate de fragmentul C3, la subiecții cu PNH

10 tratați cu un inhibitor C5, cum ar fi ecilizumab.

Metode

Modelul experimental de PNH la animale.

- Proble de sânge se colectează de la șoareci cu gene țargetate cu deficiențe de Crry și C3 (Crry/C3-/-) și de la șoareci cu deficiență de CD55/CD59. La acești șoareci lipsesc regulatorii respectivi ai suprafeței complementului, iar eritrocitele lor sunt, prin urmare, susceptibile la autoliza spontană a complementului, ca și celulele sanguine din sângele omului cu PNH.

Pentru a sensibiliza aceste eritrocite și mai mult, aceste celule se utilizează cu și fără acoperire cu manan și apoi se testează pentru hemoliză în plasma WT C56/BL6, plasma nulă MBL, plasma MASP-2 -/-, NHS umană, plasma MBL -/- umană și NHS tratată cu anticorp anti-MASP-2 umană.

- 20 1. Testul de hemoliza a eritrocitelor murine dublu-deficitare de Crry/C3 și CD55/CD59 în serurile cu depleție/deficiență de MASP-2 și în serurile de control.

Ziua 1. Prepararea hematiilor murine ($\pm$ aplicarea învelișului de manan)

- Materialele includ: sange proaspăt murin, BBS/Mg²⁺/Ca²⁺ (448 mM acid barbituric, 1,8 mM barbiton de sodiu, 145 mM NaCl, pH 7,4; 5 mM Mg²⁺, 5 mM Ca²⁺), clorură de crom, CrCl₃·6H₂O (0,5 mg/ml în BBS/Mg²⁺/Ca²⁺) și manan, 100 μg/ml în BBS/Mg²⁺/Ca²⁺.

- Sângele integral (2 ml) se centrifughează timp de 1-2 minute la 2000xg într-o centrifugă refrigerată la 4°C. Plasma și pelicula leucocitară se aspiră. Proba se spală apoi de trei ori cu resuspendarea peletei de hematii în 2 ml BBS/gelatină/Mg²⁺/Ca²⁺ răcit cu gheață și se repetă etapa de centrifugare. După a treia spălare, peleta se resuspendează în 4 ml BBS/Mg²⁺/Ca²⁺. O alicotă de 30 2 ml de hematii se separă în calitate control neacoperit. La restul de 2 ml se adaugă 2 ml CrCl₃ și 2 ml manan și proba se incubează cu amestecare ușoară la temperatura camerei timp de 5 minute. Reacția se finalizează prin adăugarea a 7,5 ml de BBS/gelatină/Mg²⁺/Ca²⁺. Proba se centrifughează ca mai sus, se resuspendează în 2 ml BBS/gelatină/Mg²⁺/Ca²⁺ și se spală încă de două ori ca mai sus, apoi se depozitează la 4°C.

- 35 Ziua 2. Testul de hemoliză

Materialele includ: BBS/gelatină/Mg²⁺/Ca²⁺ (ca mai sus), seruri de testare, plăci cu fund rotund și cu fund plat cu 96 de godeuri și un spectrofotometru care citește plăci cu 96 de godeuri la 410...414 nm.

- În primul rând se determină concentrația de hematii și concentrația de celule se ajustează până 40 la 10⁹/ml și se stochează la această concentrație. Înainte de utilizare, tamponul de testare se diluează până 10⁸/ml și apoi se folosesc 100 μl per godeu. Hemoliza se măsoară la 410...414 nm (constatând sensibilitate mai mare, decât la 541 nm). Diluțiile serurilor de testare se prepară în BBS/gelatină/Mg²⁺/Ca²⁺ rece ca gheața. 100 μl din fiecare diluție serică se pipetează în godeurile din plăcile cu fund rotund (vezi planul plăcii). Se adaugă 100 μl de preparat de hematii diluat în 45 mod corespunzător (adică, 10⁸/ml) (vezi planul plăcii), se incubează la 37°C timp de aproximativ 1 oră și se observă liza. (Plăcile se pot fotografia în acest moment). Placa se centrifughează apoi la viteză maximă timp de 5 minute. Se aspiră 100 μl din faza lichidă, se transferă pe plăcile cu fund plat și se înregistrează densitatea optică (OD) la 410...414 nm. Peletele de hematii se păstrează (acestea ulterior se lizează cu apă pentru a obține un rezultat invers).

- 50 Experimentul #1

- Sângele proaspăt se colectează de la șoareci cu deficit dublu de CD55/CD59 și sângele de la șoareci cu deficit dublu de Crry/C3 și eritrocitele se prepară așa cum s-a descris în detaliu în protocolul de mai sus. Celulele se împart și pe jumătate din celule se aplică un strat de manan, iar cealaltă jumătate se lasă netratată, ajustând concentrația finală până la 1x10⁸ per ml, din care 100 55 μl se utilizează în testul de hemoliză, care se efectuează așa cum se descrie mai sus.

Rezultatele Experimentului #1: Calea lectinei este implicată în liza eritrocitelor în modelul experimental de PNH pe animale.

Intr-un experiment inițial s-a constatat, că eritrocitele neacoperite cu manan de la șoareci WT nu au fost lizate în nici un ser de șoarece. De asemenea, s-a relevat, că eritrocitele acoperite cu

manan de la șoarecii Crry -/- au fost lizate lent (mai mult de 3 ore la 37 de grade) în serul de șoareci WT, dar ele nu au fost lizate în serul MBL nul. (Datele nu sunt arătate).

S-a constatat, că eritrocitele de la șoarecii Crry -/- acoperite cu manan au fost rapid lizate în serul uman, dar nu în NHS inactivat termic. Foarte important, eritrocitele acoperite cu manan de la șoarecii Crry -/- au fost lizate în NHS diluat până la 1/640 (adică liza s-a produs în toate diluțiile 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 și 1/640). (Datele nu sunt afișate). În această diluție, calea alternativă nu funcționează (activitatea funcțională a căii alternative este redusă semnificativ în concentrație serică sub 8%).

Concluzii din Experimentul #1

Eritrocitele acoperite cu manan de la șoarecii Crry -/- sunt foarte bine lizate în ser uman foarte diluat cu MBL, dar nu și în cel fără MBL. Liza eficientă în fiecare concentrație serică testată atestă, că calea alternativă nu este implicată sau necesară pentru această liză. Incapacitatea serului de la șoarecii cu deficit de MBL și a serului uman de a liza eritrocitele acoperite cu manan de la șoarecii Crry -/- indică, că calea clasică, de asemenea, nu are implicații în liza observată. Deoarece sunt necesare molecule de recunoaștere ale căii lectinei (adică, MBL), această liză este mediată de calea lectinei.

Experimentul #2

Sângele proaspăt se colectează de la șoarecii cu deficit dublu Crry/C3 și CD55/CD59 și eritrocitele acoperite cu manan de la șoarecii Crry -/- se analizează în testul de hemoliză, așa cum se descrie mai sus, în prezența următorului ser uman: MBL nul; WT; NHS pretratat cu anticorp anti-MASP-2 umană; și NHS inactivat termic în calitate de control.

Rezultatele Experimentului #2: inhibitorii MASP-2 preîntâmpină liza eritrocitelor într-un model experimental de PNH la animale.

Serul de la om sănătos (NHS) cu eritrocitele acoperite cu manan de la șoarecii Crry -/-, NHS se incubează în diluții descendente până la 1/640 (adică 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 și 1/640) de ser MBL uman -/-, NHS pretratat cu anticorp monoclonal (mAb) anti-MASP-2 și NHS inactivat termic în calitate de control.

Placa de microtitrare ELISA se centrifughează și eritrocitele nelizate se colectează de pe fundul plăcii cu fund rotund. Supernatantul fiecărui godeu se colectează și cantitatea de hemoglobină, eliberată din eritrocitele lizate, se măsoară prin citirea OD la 415 nm într-un cititor ELISA.

În NHS inactivat termic de control (control negativ), așa cum era de așteptat, nu se observă nici o liză. Eritrocitele de șoarece acoperite cu manan sunt lizate în ser MBL -/- uman la diluții de 1/8 și 1/16. Eritrocitele acoperite cu manan de șoarece sunt lizate în NHS pretratat cu anticorp anti-MASP-2 la diluții de 1/8 și 1/16, în timp ce eritrocitele acoperite cu manan sunt lizate în ser uman WT până la diluții de 1/32.

FIG. 40 grafic ilustrează hemoliza (măsurată prin eliberarea hemoglobinei din eritrocitele de șoarece lizate (Crry/C3 -/-) în supernatant prin fotometrie) eritrocitelor murine acoperite cu manan cu serul uman într-o gamă de diferite concentrații de ser inactivat termic (HI) NHS, MBL -/-, NHS pretratat cu anticorpi anti-MASP-2 și NHS control.

Rezultatele prezentate în fig. 40 atestă, că inhibarea MASP-2 cu anticorp anti-MASP-2 modifică în mod semnificativ CH_{50} și inhibă liza mediată de complement a eritrocitelor sensibilizate cu protecție deficitară față de activarea complementului autolog.

Experimentul #3

Sângele proaspăt se colectează de la șoarecii cu deficit dublu Crry/C3 și CD55/CD59 și eritrocitele acoperite cu manan de la șoarecii Crry -/- se analizează în testul de hemoliză, așa cum se descrie mai sus, în prezența următorului ser: MBL -/-; ser WT; NHS pretratat cu anticorp uman anti-MASP-2; și NHS inactivat termic în calitate de control.

Rezultate

Fig. 41 ilustrează grafic hemoliza (măsurată prin eliberarea hemoglobinei eritrocitelor murine WT lizate în supernatant prin fotometrie) eritrocitelor murine neacoperite cu ser uman într-o gamă de diferite concentrații de ser (HI) NHS inactivat termic, MBL -/-, NHS pre-tratat cu anticorp anti-MASP-2, și NHS în calitate de control. După cum se arată în fig. 41, inhibarea MASP-2 rezultă cu inhibarea lizei mediate de complement a eritrocitelor nesensibilizate de la șoarecii WT.

FIG. 42 ilustrează grafic hemoliza (măsurată prin eliberarea hemoglobinei eritrocitelor murine (CD55/59 -/-) lizate în supernatant prin fotometrie) eritrocitelor murine neacoperite cu ser uman într-o gamă de diferite concentrații de ser (HI) NHS inactivat termic, MBL -/-, NHS pre-tratat cu anticorp anti-MASP-2, și NHS în calitate de control.

Valorile CH_{50} în funcție de concentrațiile serice

Ser	WT	CD55/59 +/-
NHS inactivat termic	Fără liză	Fără liză
Donator MBL AO/XX (MBL deficient)	7.2%	2.1%
NHS + anticorp anti-MASP-2	5.4%	1.5%
NHS	3.1%	0.73%

Notă: "CH₅₀" reprezintă valoarea, la care hemoliza, mediată de complement, atinge 50%.

Astfel, rezultatele din acest exemplu demonstrează, că inhibarea MASP-2 conduce la inhibarea lizei, mediate de complement, a eritrocitelor sensibilizate și nesensibilizate cu protecție deficitară față de activarea complementului autolog. De aceea, inhibitorii MASP-2 pot fi utilizați pentru a trata pacienți care suferă de PNH și pot fi, de asemenea, utilizați pentru ameliorarea (inhibarea, prevenirea sau reducerea severității) hemolizei extravasculare la pacienții cu PNH aflați sub tratament cu un inhibitor de C5, cum ar fi eculizumab (Soliris®).

EXEMPLUL 34

Acest exemplu descrie un studiu adițional la studiului descris mai sus în exemplul 29, furnizând dovezi suplimentare, care confirmă că un inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp anti-MASP-2, este eficient în tratamentul expunerii la radiație și/sau pentru tratamentul, ameliorarea sau prevenirea sindromului acut de iradiere.

Actualitate: În studiul inițial, descris în exemplul 29, s-a demonstrat că tratamentul pre-iradiere al șoarecilor cu un anticorp anti-MASP-2 a îmbunătățit supraviețuirea șoarecilor iradiați, comparativ cu animalele de control iradiate și tratate cu placebo, la ambele niveluri de expunere de 6.5 Gy și 7.0 Gy. În exemplul 29 s-a demonstrat în continuare, că la nivelul expunerii de 6,5 Gy tratamentul post-iradiere cu anticorp anti-MASP-2 a condus la o creștere modestă a supraviețuirii, comparativ cu animalele iradiate de control tratate cu placebo. Acest exemplu descrie un al doilea studiu cu iradiere, care s-a efectuat pentru a confirma rezultatele primului studiu.

Metode

Proiectarea studiului A

Șoarecii din linia Swiss Webster (n = 50) se expun la radiații ionizante (8,0 Gy). Se evaluează efectul asupra mortalității a terapiei cu anticorpi anti-MASP-2 (mAbH6 5 mg/kg), administrați cu 18 ore până la și 2 ore după expunerea la radiații și săptămânal după aceea.

Rezultatele studiului A

După cum se arată în fig. 43, administrarea anticorpului mAbH6 anti-MASP-2 crește supraviețuirea șoarecilor expuși la 8,0 Gy, cu o rată de supraviețuire medie ajustată crescând de la 4 până la 6 zile, comparativ cu șoarecii de control care au administrat placebo și o reducere a mortalității cu 12%, comparativ cu șoarecii de control, care au administrat placebo (criteriul de rang logaritm, p = 0,040).

Proiectarea studiului B

Șoarecii din linia Swiss Webster (n = 50) se expun la radiații ionizante (8,0 Gy) în grupele următoare de control (I: cu placebo) soluție fiziologică în calitate de control; (II: cu doză joasă) anticorp mAbH6 anti-MASP-2 (5 mg/kg) administrat cu 18 ore înainte de iradiere și peste 2 ore după iradiere; (III: cu doză înaltă) mAbH6 (10 mg/kg) administrat cu 18 ore înainte de iradiere și peste 2 ore după iradiere; și (IV: cu doză înaltă post-iradiere) mAbH6 (10 mg/kg) administrat peste 2 ore după iradiere.

Rezultatele studiului B

Administrarea pre- și post-iradiere a anticorpilor anti-MASP-2 a ajustat supraviețuirea medie de la 4 până la 5 zile, comparativ cu animalele de control, care au administrat placebo. Mortalitatea la șoarecii tratați cu anticorpi anti-MASP-2 este mai joasă cu 6-12%, comparativ cu animalele de control, care au administrat placebo. Se observă, de asemenea, absența efectelor nocive semnificative în cadrul tratamentului (datele nu sunt prezentate).

Astfel, rezultatele prezentate în acest exemplu sunt în concordanță cu rezultatele prezentate în exemplul 29 și demonstrează adițional, că anticorpii anti-MASP-2 sunt eficienți în tratarea unui mamifer, care prezintă risc sau suferă de efectele dăunătoare ale sindromului acut de iradiere.

EXEMPLUL 35

Acest studiu investighează efectul deficienței MASP-2 într-un model experimental de tromboză indusă cu LPS (lipopolizaharidă) la șoareci.

Actualitate

Sindromul uremic hemolitic (HUS), care este cauzat de infecția cu E. coli producătoare de toxine Shiga, este principala cauză a insuficienței renale acute la copii. În acest exemplu, s-a utilizat un model experimental Schwartzman de tromboză indusă cu LPS (coagulare

microvasculară) la șoarecii MASP-2 $-/-$ (KO) pentru a determina eficiența inhibării MASP-2 pentru inhibarea sau prevenirea formării trombilor intravasculari.

Metode

- 5 Șoarecii MASP-2 $-/-$ (n = 9) și WT (n = 10) se analizează într-un model experimental Schwarzman de tromboză indusă cu LPS (coagulare microvasculară). La șoareci se administrează LPS Serratia, iar formarea de trombi se monitorizează în timp. Se efectuează o comparație a incidenței microtrombilor și a coagulării microvasculare induse cu LPS.

Rezultate

- 10 Este necesar de subliniat, că la toți șoarecii MASP-2 $-/-$ testați (9/9) după administrarea LPS Serratia nu s-au format trombi intravasculari. În contrast, microtrombii s-au detectat la 7 din 10 șoareci WT, testați în paralel (p = 0,0031, testul exact Fischer). După cum se arată în fig. 44, timpul de apariție a ocluziunii microvasculare după infecția cu LPS s-a măsurat la șoareci MASP-2 $-/-$ și WT, arătând procentul șoarecilor WT cu formarea trombilor, măsurată timp de 60 de minute, cu formarea trombilor detectată deja aproximativ peste 15 minute. Până la 80% din șoarecii WT
- 15 peste 60 de minute au prezentat formare de trombi. În contrast, așa cum se arată în fig. 44, peste 60 de minute la nici unul dintre șoarecii MASP-2 $-/-$ nu s-a detectat formare de trombi (criteriul de rang logaritm: p = 0,0005).

Aceste rezultate demonstrează, că inhibarea MASP-2 este protectivă împotriva formării de trombi intravasculari într-un model HUS.

- 20 EXEMPLUL 36

Acest exemplu descrie efectul anticorpilor anti-MASP-2 într-un model experimental de HUS la șoareci cu utilizarea injectării intraperitoneale a toxinei Shiga 2 purificate (STX2) și LPS.

Fundal

- 25 S-a elaborat un model experimental de șoareci cu HUS utilizând injectarea intraperitoneală a toxinei Shiga 2 purificate (STX2) și LPS. Analiza biochimică și a microcipurilor rinichilor șoarecilor a relevat, că acțiunea STX2 plus LPS diferă de efectele fiecărui agent solitar. Analiza sângelui și serului acestor șoareci a evidențiat neutrofilie, trombocitopenie, hemoliza hematiilor și creșterea nivelului de creatinină serică și a azotului din uree. Mai mult decât atât, analiza histologică și microscopia electronică a rinichilor de șoarece atestă depunerea fibrinei în glomerul,
- 30 congestia hematiilor, formarea microtrombilor și modificări ultrastructurale glomerulare. S-a constatat, că acest model experimental de HUS la animale induce toate simptomele clinice ale patologiei HUS uman la șoarecii din linia C57BL/6, incluzând trombocitopenie, anemie hemolitică și insuficiență renală, care definesc boala umană. (J. Immunol. 187 (1): 172-80 (2011)).

Metode

- 35 Șoarecii femele din linia C57BL/6 cu masa între 18 și 20 g, achiziționați de la Charles River Laboratories, au fost împărțiți în 2 grupe (câte 5 șoareci în fiecare grupă). O grupă de șoareci se pretratează prin injecție intraperitoneală (ip) cu anticorp recombinant mAbM11 anti-MASP-2 (100 μ g per șoarece, corespunzând unei concentrații finale de 5 mg/kg greutate corporală), diluat într-un volum total de 150 μ l soluție fiziologică. În grupa de control se administrează soluție fiziologică
- 40 fără nici un anticorp. Peste șase ore după injectarea i.p. a anticorpului mAbM11 anti-MASP-2, la toți șoarecii se administrează o combinație de injecție i.p. de o doză subletală (3 μ g/animal, corespunzătoare la 150 μ g/kg de greutate corporală) de LPS de *Serratia marcescens* (L6136, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) și o doză de 4,5 μ g/animal (corespunzând la 225 μ g/kg greutate corporală) de STX2 (de două depășind LD₅₀) într-un volum total de 150 μ l. Injectarea soluției
- 45 fiziologice se utilizează pentru control.

- Supraviețuirea șoarecilor se monitorizează la fiecare 6 ore după administrare. Șoarecii se sacrifică de îndată ce ajung în stadiul letargic al patologiei HUS. Peste 36 de ore toți șoarecii se sacrifică și ambii rinichi se prelevă pentru analiza imunohistochimică și scanare cu microscopie electronică. Probele de sânge se prelevă la sfârșitul experimentului prin puncție cardiacă. Serul se
- 50 separă și păstrează congelat la -80°C pentru măsurarea nivelurilor de BUN și de creatinină serică atât în grupul tratat, cât și în cel de control.

Analiza imunohistochimică

- O treime din fiecare rinichi de șoarece s-a fixat în 4% paraformaldehidă timp de 24 ore, s-a prelucrat și s-a înglobat în parafină. Secțiunile cu grosimea de 3 microni s-au tăiat și s-au plasat pe
- 55 lamele pregătite pentru colorarea ulterioară cu hematoxilină și eozină.

Microscopia electronică

Secțiunea mijlocie a rinichilor s-a tăiat în blocuri de aproximativ 1 până la 2 mm³ și s-a fixat peste noapte la 4°C în 2,5% glutaraldehidă în 1 x PBS. Țesutul fixat ulterior s-a prelucrat la Facultatea de Microscopie Electronică din cadrul Universității din Leicester

Secțiuni de criostat

Cealaltă treime din rinichi s-a tăiat în blocuri de aproximativ 1 până la 2 mm³ și s-a congelat în azot lichid și s-a menținut la -80°C pentru secțiunile de criostat și analiza ARNm.

Rezultate

- 5 Fig. 45 ilustrează grafic procentul supraviețuirii șoarecilor tratați cu soluție fiziologică (n = 5) și a șoarecilor tratați cu anticorpi anti-MASP-2 (n = 5) în modelul indus cu STX/LPS în timp (ore). În mod deosebit se cere menționat, că, așa cum se arată în fig. 45, toți șoarecii de control au murit peste 42 de ore. În contrast, 100% dintre șoarecii tratați cu anticorpi anti-MASP-2 au supraviețuit pe tot parcursul experimentului. În concordanță cu rezultatele prezentate în FIG. 45, s-a observat
- 10 că toți șoarecii netratați, care au murit, sau care au trebuit să fie tratați cu semne de boală severă au avut leziuni glomerulare semnificative, în timp ce glomerulul tuturor șoarecilor tratați cu anti-MASP-2 se prezenta normal (datele nu sunt prezentate). Aceste rezultate demonstrează, că inhibitorii MASP-2, cum ar fi anticorpii anti-MASP-2, pot fi utilizați pentru a trata subiecții care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei microangiopatii trombotice (TMA), cum ar fi
- 15 sindromul hemolitic uremic (HUS) (aHUS) sau purpura trombocitopenică trombotică (TTP).

EXEMPLUL 37

Acest exemplu descrie efectul deficienței MASP-2 și inhibării MASP-2 într-un model experimental murin de tromboză în rezultatul leziunilor celulelor endoteliale induse de FITC-dextran/lumină.

- 20 Fundal/Actualitate: Așa cum s-a demonstrat în exemplele 35 și 36, deficiența de MASP-2 (MASP-2 KO) și inhibarea MASP-2 (prin administrarea unui anticorp MASP-2 inhibitor) protejează șoarecii într-un model de HUS tipic, în care șoarecii de control expuși acțiunii STX și LPS au dezvoltat HUS sever și începeau a agoniza sau au murit timp de 48 de ore. De exemplu, așa cum se arată în fig. 54, toți șoarecii tratați cu un anticorp inhibitor MASP-2 și apoi expuși la
- 25 STX și LPS au supraviețuit (criteriul exact Fisher p <0,01; N = 5). Astfel, terapia anti-MASP-2 protejează șoarecii în acest model de HUS.

- Următoarele experimente s-au efectuat pentru a analiza efectul deficienței MASP-2 și a inhibării MASP-2 într-un model experimental de microangiopatie trombotică (TMA) la șoareci în rezultatul leziunilor celulelor endoteliale, indusă cu izotiocianat de fluoresceină (FITC)-dextran,
- 30 pentru a demonstra în continuare beneficiul inhibitorilor MASP-2 în tratamentul HUS, aHUS, TTP și TMA de alte etiologii.

Metode

Microscopie intravitală

- Șoarecii se prepară pentru microscopie intravitală așa cum descrie Frommhold et al., BMC
- 35 Immunology 12: 56-68, 2011. Succint, șoarecii se anesteziază cu injecție intraperitoneală (ip) de chetamină (125 mg/kg greutate corporală, Ketanest, Pfitzer GmbH, Karlsruhe, Germania) și xilazină (12,5 mg/kg greutate corporală, Rompun, Bayer, Leverkusen, Germania) și se plasează pe un așternut cu încălzire pentru a menține temperatura corpului la 37°C. Microscopia intravitală se realizează cu un microscop vertical (Leica, Wetzlar, Germania) cu un obiectiv de imersie (soluție fiziologică) (cu mărire 40/0,75 apertură numerică SW 40/0,75, Zeiss, Jena, Germania). Pentru a
- 40 facilita respirația șoarecii se intubează utilizând tubul PE 90 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA). Artera carotidă stângă se canulează cu tubul PE10 (Becton Dickson și Company, Sparks, MD, USA) pentru colectarea probelor de sânge și administrarea sistemică a anticorpului monoclonal (mAb).

- 45 Prepararea mușchiului cremaster

- Prepararea chirurgicală a mușchiului cremaster pentru microscopia intravitală se realizează așa cum descrie Sperandio et al., Blood, 97: 3812-3819, 2001. Succint, scrotul se deschide și mușchiul cremaster se mobilizează. După incizia longitudinală și extinderea mușchiului pe o sticlă de acoperire, epididimul și testiculul se mișcă lateral și se fixează, oferind acces microscopic complet
- 50 la microcirculația mușchiului cremaster. Venulele mușchiului cremaster se înregistrează cu o cameră CCD (CF8/1; Kappa, Gleichen, Germania) pe un aparat de înregistrare Panasonic S-VHS. Mușchiul cremaster se perfuzează cu soluție fiziologică tamponată cu bicarbonat termoreglată (35°C), așa cum descrie anterior Frommhold et al., BMC Immunology 12: 56-68, 2011.

Fotoexcitarea modelului de leziune cauzat de FITC-dextran.

- 55 O leziune vasculară controlată, dependentă de doza luminii, a endoteliului din venulele și arteriolele mușchiului cremaster se induce prin excitare fototoxică cu (FITC)-dextran (cat. nr. FD150S, Sigma Aldrich, Poole, U.K.). Această procedură inițiază tromboza localizată. În calitate de reactiv fototoxic, se injectează 60 μl de 10% m/v soluție de FITC-dextran prin accesul arterei carotide stângi și se lasă să se răspândească omogen în întregul sânge circulant timp de 10 min.

După selectarea unui venule bine perfuzate, lumina cu halogen de intensitate medie (800-1500) se concentrează asupra vasului studiat pentru a induce fluorescență FITC-dextran și fototoxicitate de la ușoară până la moderată pentru suprafața endotelială pentru a stimula tromboza într-un mod reproductibil, controlat. Intensitatea fototoxică a luminii necesară pentru excitarea FITC-dextranului se generează utilizând o lampă cu halogen (12V, 100W, Zeiss, Oberkochen, Germania). Fototoxicitatea, rezultată din excitarea indusă de lumină a fluorocromului, depinde pragul de intensitate al fluxului de lumină și/sau de durata de iluminare și este cauzată fie de încălzirea directă a suprafeței endoteliale, fie de generarea de radicali reactivi de oxigen, așa cum descrie Steinbauer et al., *Langenbecks Arch Surg* 385: 290 - 298, 2000.

Intensitatea luminii, aplicată pe fiecare vas, se măsoară utilizând un detector cu diode care modifică lungimea de undă pentru măsurători de putere redusă (Labmaster LM-2, Coherent, Auburn, SUA). Analiza off-line a scanărilor video se realizează cu un sistem de analiză a microcirculației asistată de calculator (CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg) și viteza hematiilor se măsoară așa cum descrie Zeintl et al., *Int J Microcirc Clin Exp*. 3): 293-302, 2000.

Aplicarea anticorpului monoclonal (mAbH6) inhibitor al MASP-2 umană și controlul cu placebo înainte de inducerea trombozei.

Folosind o schemă de studiu orb, la șoarecii masculi WT din linia C57BL/6 de vârstă de 9 săptămâni s-a administrat i.p. în injecții fie anticorpul monoclonal recombinant (mAbH6) anti-MASP-2 umană, un inhibitor al activității funcționale a MASP-2 (administrat într-o concentrație finală de 10 mg/kg greutate corporală), sau aceeași cantitate dintr-un anticorp izotip în calitate de control (fără activitate inhibitoare asupra MASP-2) cu 16 ore înainte de inducerea fototoxică a trombozei în modelul experimental de microscopie intravitală a mușchiului cremaster. Cu o oră înainte de inducerea trombozei, s-a administrat a doua doză fie de mAbH6, sau de anticorp de control. Șoarecii cu MASP-2 knockout (KO) au fost, de asemenea, evaluați în acest model.

Anticorpul monoclonal mAbH6 (creat împotriva MASP-2 umană recombinantă) este un inhibitor puternic al activității funcționale a MASP-2 umane, care reacționează încrucișat, se leagă cu MASP-2 și inhibă MASP-2 murină, dar cu o afinitate mai redusă datorită specificității sale de specie (datele nu sunt prezentate). Pentru a compensa afinitatea joasă a mAbH6 la MASP-2 de șoarece, mAbH6 s-a luat într-o concentrație mare (10 mg/kg greutate corporală) pentru a depăși variația specificității de specie și o afinitate mai redusă pentru MASP-2 de șoarece și pentru a asigura blocarea eficientă a activității funcționale a MASP-2 murine *in vivo*.

În acest studiu orb s-a înregistrat timpul necesar pentru o ocluzie completă a fiecărei venule testate (criteriile de selecție: diametre și viteza fluxului sangvin comparabile).

Procentul șoarecilor cu ocluzie microvasculară, timpul de debut și durata până la apariția ocluziei s-a evaluat timp de 60 de min de observație, utilizând înregistrări video cu microscopie intravitală.

Rezultate

Fig. 46 ilustrează grafic, în funcție de timpul după inducerea leziunii, procentul șoarecilor cu ocluzie microvasculară în modelul FITC/Dextran UV după tratamentul cu anticorp de control izotip sau cu anticorpul mAbH6 anti-MASP-2 umană (10 mg/kg) dozat la 16 ore și 1 ora înainte de injectarea FITC/Dextran. După cum se arată în fig. 46, la 85% dintre șoarecii de tip sălbatic, care au primit anticorpul de control izotip, ocluzia se instalează în decurs de 30 de minute sau mai puțin, în timp ce numai la 19% dintre șoarecii de tip sălbatic pre-tratați cu anticorpul (mAbH6) anti-MASP-2 umană ocluzia s-a constatat în aceeași perioadă de timp, iar timpul de ocluzie a întârziat la șoarecii din grupa, în care în cele din urmă ocluzia s-a instalat, tratată cu anticorp anti-MASP-2 umană. Mai mult decât atât, s-a constatat, că la trei dintre șoarecii tratați cu mAbH6 anti-MASP-2 nu s-a observat ocluzie în perioada de observație de 60 de min (adică au fost protejați împotriva ocluziei trombotice).

Fig. 47 ilustrează grafic timpul de ocluzie în minute pentru șoarecii tratați cu anticorpul (mAbH6) anti-MASP-2 umană și cu anticorpul de control izotip. Datele sunt prezentate sub formă de puncte de dispersie cu valori medii (linii orizontale) și linii ale erorilor standard (linii verticale). În această figură se arată timpul de ocluzie la șoarecii, la care ocluzia a fost observată. Astfel, cei trei șoareci tratați cu anticorp MASP-2, la care ocluzia nu s-a instalat în perioada de observație de 60 de min, nu au fost incluși în această analiză (nu a existat nici un șoarece tratat cu control, la care să nu se observe ocluzie). În calitate de criteriu statistic, folosit pentru analiză, s-a utilizat criteriul Stufent impar; în care simbolul "*" indică $p = 0,0129$. După cum se arată în fig. 47, la cei șase șoareci tratați cu anticorpi (mAbH6) anti-MASP-2, la care s-a observat ocluzie, tratamentul cu anticorp anti-MASP-2 prelungea semnificativ timpul de ocluzie venoasă în modelul de tromboză, indusă de leziuni ale celulelor endoteliale cu FITC-dextran/lumină cu o intensitate joasă a luminii

(800...1500), în comparație cu șoarecii tratați cu anticorp de control izotip. Timpul mediu de ocluzie completă pentru anticorpul de control izotip a constituit 19,75 min, în timp ce timpul mediu de ocluzie completă în grupa de șoareci, tratați cu anticorp anti-MASP-2 a constituit 32,5 min.

- 5 Fig. 48 ilustrează grafic timpul până la ocluzie în minute la șoarecii de tip sălbatic, șoarecii MASP-2 KO și șoarecii de tip sălbatic pre-tratați cu anticorp (mAbH6) MASP-2 uman administrat i.p. în doză de 10 mg/kg cu 16 ore înainte și apoi administrat repetat i.v. cu 1 oră înainte de inducerea trombozei în modelul de tromboză indusă de leziuni ale celulelor endoteliale cu FITC-dextran/lumină cu o intensitate joasă a luminii (800...1500). În fig. 48 au fost incluse numai
- 10 animalele, la care s-a constatat ocluzie; n = 2 pentru șoarecii de tip sălbatic, care au administrat anticorp de control izotip; n = 2 pentru MASP-2 KO și n = 4 pentru șoarecii de tip sălbatic, care au administrat anticorp (mAbH6) MASP-2 uman. Simbolul "*" indică p < 0,01. După cum se arată în fig. 48, deficitul de MASP-2 și inhibarea MASP-2 (mAbH6 la 10 mg/kg) au prelungit timpul de instalare a ocluziei venoase în modelul de tromboză indusă de leziuni ale celulelor endoteliale cu
- 15 FITC-dextran/lumină cu o intensitate joasă a luminii (800...1500).

Concluzii

- Rezultatele din acest exemplu demonstrează în continuare, că într-un model murin de TMA un agent inhibitor al MASP-2, care blochează calea lectinei (de exemplu anticorpii care blochează funcția MASP-2), inhibă coagularea și tromboza microvasculară, semnele distinctive ale
- 20 tulburărilor microangiopatice multiple. Prin urmare, este de așteptat ca administrarea unui agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp inhibitor al MASP-2, să fie o terapie eficientă la pacienții care suferă de HUS, aHUS, TTP sau alte tulburări microangiopatice și asigură protecție împotriva coagulării microvasculare și trombozei.

EXEMPLUL 38

- 25 Acest exemplu descrie un studiu, care demonstrează că anticorpul (mAbH6) inhibitor al MASP-2 umană nu influențează asupra funcției trombocitare în plasmă umană bogată în trombocite.

Fundal/Actualitate

- Cum se descrie în Exemplul 37, s-a demonstrat că inhibarea MASP-2 cu anticorpul (mAbH6) inhibitor al MASP-2 umană prelungeste timpul de instalare a ocluziei venoase în modelul
- 30 experimental de tromboză indusă de leziuni ale celulelor endoteliale cu FITC-dextran/lumină. Următorul experiment s-a realizat pentru a determina influența anticorpului (mAbH6) inhibitor al MASP-2 asupra funcției plachetare.

- Metode: Influența anticorpului mAbH6 anti-MASP-2 umană se testează pe agregarea trombocitelor indusă cu ADP după cum urmează. Soluția de anticorp mAbH6 anti-MASP-2 umană
- 35 într-o concentrație de 1 μg/ml sau 0,1 μg/ml se adăugă în 40 μl până la 360 μl soluție de plasmă umană bogată în trombocite proaspăt preparată. Un anticorp de control izotip se utilizează în calitate de control negativ. După adăugarea anticorpilor la plasmă, activarea plachetară se induce prin adăugarea ADP într-o concentrație finală de 2 μM. Analiza se inițiază prin agitarea soluțiilor cu un
- 40 magnet mic într-o cuva cu un volum de 1 ml. Agregarea plachetară se măsoară într-un agregometru plachetar Model 700 Chrono-log cu două canale optic luminescent pentru trombocite din sange integral.

Rezultate

- Procentul agregării în soluții se măsoară timp de cinci minute. Rezultatele sunt prezentate în
- 45 tabelul 13.

Agregarea plachetară timp de 5 min

Tabelul 13

Anticorpul	Amplitudinea (procentul agregării)	Unghiul de înclinație a curbei (procentul agregării în funcție de timp)
Anticorpul (mAbH6) anti-MASP-2 (1 μg/ml)	46%	59
Anticorpul de control izotip (1 μg/ml)	49%	64
Anticorpul (mAbH6) anti-MASP-2 (0.1 μg/ml)	52%	63
Anticorpul de control izotip (0.1 μg/ml)	46%	59

Așa cum se observă din Tabelul 13, nu se atestă o diferență semnificativă între agregarea trombocitelor induse de ADP, tratate cu anticorpii de control sau cu anticorpii mAbH6 anti-MASP-2. Aceste rezultate demonstrează, că anticorpii (mAbH6) anti-MASP-2 umană nu exercită nici un efect asupra funcției plachetare. Prin urmare, rezultatele descrise în exemplul 37, care demonstrează că inhibarea MASP-2 cu anticorpi (mAbH6) inhibitor al MASP-2 umane prelungește timpul de instalare a ocluziei venoase în modelul de tromboză, indusă de leziuni ale celulelor endoteliale cu FITC-dextran/lumină, dar nu exercită efect asupra funcției plachetare. Astfel, inhibarea MASP-2 previne tromboza fără a afecta direct funcția plachetară, dezvăluind un mecanism terapeutic, care este diferit de cel exercitat de agenții antitrombotici existenți.

10 EXEMPLUL 39

Acest exemplu descrie influența inhibării MASP-2 asupra formării trombilor și ocluziei vaselor într-un model experimental murin de TMA.

Fundal/actualitate

15 Călea lectinei joacă un rol dominant în activarea sistemului complementului în condiții de stres sau de leziuni ale celulelor endoteliale. Această activare este amplificată rapid prin calea alternativă, care este disregulată la mulți pacienți care prezintă aHUS. Prevenirea activării MASP-2 și a căii lectinei este, astfel, de așteptat să oprească consecutivitatea reacțiilor enzimactice, care conduc la formarea complexului de atac al membranei, activarea trombocitelor și recrutarea leucocitelor. Acest efect limitează deteriorarea țesuturilor.

20 Adițional, MASP-2 are activitate asemănătoare cu factorul Xa și scindează protrombina cu formarea de trombină. Această activare de către MASP-2 a sistemului de coagulare poate dezechilibra hemostaza și rezulta cu patologia TMA. Astfel, se așteaptă ca inhibarea MASP-2, utilizând un inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorpi inhibitor al MASP-2 care blochează activarea complementului și a sistemelor de coagulare, să îmbunătățească rezultatele în aHUS și în alte stări legate de TMA.

25 Cum s-a descris în Exemplul 37, s-a demonstrat că inhibarea MASP-2 cu anticorpi (mAbH6) inhibitor al MASP-2 umane prelungește timpul de instalare a ocluziei venoase în modelul de tromboză indusă de leziuni ale celulelor endoteliale cu FITC-dextran/lumină. În acest model de TMA, șoarecii au fost sensibilizați prin injectarea intravenoasă de FITC-dextran, urmată de fotoactivarea localizată a FITC-dextranului în microvascularizația mușchiului cremaster la șoarece (Thorlacius H et al., Eur J Clin Invest 30 9): 804-10, 2000; Agero et al., Toxicon 50 (5): 698-706, 2007).

Următorul experiment s-a realizat pentru a determina efectul doză-răspuns al anticorpiului (mAbH6) inhibitor al MASP-2 asupra formării trombilor și ocluziei vasculare într-un model experimental murin de TMA.

35 Metode: Tromboza localizată se induce prin fotoactivarea dextranului marcat cu fluoresceină-izotiocianat (FITC-dextran) în microvascularizația mușchiului cremaster la șoarecii din linia C57 Bl/6 și microscopia intravitală se utilizează pentru a măsura debutul formării trombilor și ocluziei vasului, utilizând metodele descrise în Exemplul 37 cu următoarele modificări. La șoarecii din grupe se administrează mAbH6 (2 mg/kg, 10 mg/kg sau 20 mg/kg) sau anticorpi de control izotip (20 mg/kg) prin injecție intravenoasă (iv) cu o oră înainte de inducerea TMA. Se înregistrează timpul până la debutul formării trombilor și timpul până la ocluzia completă a vaselor. Analiza redării video a imaginilor microscopice intravitale, înregistrate timp de 30 până la 60 de minute se utilizează pentru a evalua dimensiunea vasului, viteza fluxului sanguin, intensitatea luminii, viteza începutului formării trombilor ca echivalent al adeziunii plachetelor, timpul până la începutul formării trombilor, viteza ocluziei complete a vasului și timpul până la ocluzia completă a vaselor. Analiza statistică se realizează utilizând SigmaPlot v12.0.

Rezultate

Inițierea formării trombilor

50 Fig. 49 este un grafic Kaplan-Meier, care prezintă procentul șoarecilor cu trombi în funcție de timp în microangiopatia trombotică indusă de FITC-Dextran la șoarecii tratați cu doze crescând de anticorpi inhibitor al MASP-2 umane (mAbH6 în doză de 2 mg/kg, 10 mg/kg sau 20 mg/kg) sau de anticorpi de control izotip. După cum se arată în fig. 49, inițierea formării trombilor întârzie la șoarecii tratați cu mAbH6 într-o manieră dependentă de doză, comparativ cu șoarecii tratați cu control.

55 Fig. 50 ilustrează grafic timpul mediu (în minute) până la începutul formării trombilor în funcție de doza de mAbH6 (* p <0,01, comparativ cu controlul). După cum se arată în fig. 50, timpul mediu până la debutul formării trombului crește în funcție de majorarea dozei de mAbH6 de la 6,8 minute în grupa de control până la 17,7 minute în grupa tratată cu mAbH6 în doză de 20

mg/kg ($p < 0,01$). Datele experimentale de bază și analiza statistică sunt prezentate în tabelele 14 și 15.

Timpul până la debutul formării trombilor la unii șoareci aparte, înregistrat în baza evaluării înregistrărilor video, este detaliat în continuare în Tabelul 14.

5 Timpul până la debutul formării trombului după leziune indusă cu colorant și lumină

Tabelul 14

Administrarea anticorpului de control		Administrarea anticorpului mAbH6		
Timpul până la inițierea formării trombului (min)	Control	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
	6.07	5.93	12.75	10.00
	1.07	6.95	2.53	10.33
	8.00	8.92	14.00	21.00
	2.40	11.92	3.05	11.50
	8.48	12.75	8.00	19.00
	4.00	12.53	8.17	10.37
	4.00		15.83	22.65
	7.83		11.70	16.37
	6.83		50.67	21.75*
	15.00			32.25*
	15.67			

*in vase nu s-a detectat începutul formării trombilor în timpul perioadei de observație indicate

Analiza statistică, care compară timpul până la debutul ocluziei la animalele, la care s-a administrat anticorp de control și anticorp mAbH6, este prezentată în continuare în Tabelul 15.

10 Timpul până la apariția ocluziei. Datele studiului dependenței doză-efect la inducerea cu FITC-dextroză

Tabelul 15

Statistică	Control	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
Numărul evenimentelor/numărul animalelor (%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/10 (80,0%)
Timpul mediu (min) (95% CI)	6,8 (2,4; 8,5)	10,4 (5,9; 12,8)	11,7 (2,5; 15,8)	17,7 (10,0; 22,7)
Criteriul Wilcoxon valoarea p*		0,2364	0,1963	0,0016
Eveniment = timpul până la debut observat Timpul mediu (minute) și IC 95% se bazează pe estimarea Kaplan-Meier NE = inestimabil * valorile p au fost calculate folosind criteriul de comparație Dunnett-Hsu				

Ocluzie microvasculară.

15 Fig. 51 este un grafic Kaplan-Meier, care arată procentul de șoareci cu ocluzie microvasculară în funcție de timp în microangiopatia trombotică indusă cu FITC-Dextran la șoarecii tratați cu doze crescătoare de anticorp inhibitor al MASP-2 umană (mAbH6 la 2 mg/kg, 10 mg/kg sau 20 mg/kg) sau un anticorp de control izotip. După cum se arată în fig. 51, ocluzia microvasculară completă întârzie în grupele tratate cu mAbH6, comparativ cu șoarecii de control.

20 Fig. 52 ilustrează grafic timpul mediu până la ocluzia microvasculară în funcție de doză de mAbH6 (* $p < 0,05$ comparativ cu controlul). După cum se arată în fig. 52, timpul mediu pentru apariția ocluziei microvasculare complete a crescut de la 23,3 min în grupa de control până la 38,6 minute în grupa, în care s-a administrat mAbH6 de 2 mg/kg ($p < 0,05$). Dozele de 10 mg/kg sau 20 mg/kg de mAbH6 au exercitat același efect (timpul mediu pentru ocluzia microvasculară completă constituia 40,3 și, respectiv, 38 de min) ca și în grupa, în care s-au administrat 2 mg/kg de mAbH6. Datele experimentale de bază și analiza statistică sunt prezentate în tabelele 16 și 17.

25 Timpul apariției ocluziei vaselor la unii șoareci aparte, înregistrați pe baza evaluării primare a înregistrărilor video este detaliat în continuare în Tabelul 16.

Timpul apariției ocluziei după leziunea, indusă la acțiunea luminii și colorantului

Tabelul 16

Administrarea anticorpului de control		Administrarea anticorpului mAbH6		
Timpul până la inițierea ocluziei (minute)	Control	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
	37,50	42,3	30,92	38,00
	29,07	21,91	17,53	28,00
	27,12	24,4	51,38	40,58

	19,38	31,38	36,88	33,00
	19,55	61,17*	26,83	39,10
	18,00	61,55*	40,28	32,03
	16,50		55,83	38,53
	23,33		71,93*	21,75*
	14,83		98,22*	32,25*
	30*			33,17*
	61,8*			

*in vase nu s-a produs ocluzia completă în timpul perioadei de observație indicate

Analiza statistică, care compară timpul până la ocluzia completă la animalele, la care s-a administrat anticorp de control și anticorp mAbH6, este prezentată în continuare în Tabelul 17.

- 5 Timpul până la apariția ocluziei microvasculare. Datele studiului dependenței doză-efect la inducerea cu FITC-dextroză

Tabelul 17

Statistică	Control	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
Numărul evenimentelor/numărul animalelor (%)	9/11 (81.8%)	4/6 (66.7%)	7/9 (77.8%)	7/10 (70.0%)
Timpul mediu (minute) (95% CI)	23.3 (16.5, 37.5)	36.8 (21.9, NE)	40.3 (17.5, NE)	38.0 (28.0, 40.6)
Criteriul Wilcoxon valoarea p*		0.0456	0.0285	0.0260
Eveniment = timpul până la începutul ocluziei				
Timpul mediu (minute) și IC 95% se bazează pe estimarea Kaplan-Meier				
NE = inestimabil				
* valorile p au fost calculate folosind criteriul de comparație Dunnett-Hsu				

Concluzii

- 10 Așa cum s-a rezumat în tabelul 18, inițierea formării trombilor a fost întârziată la șoarecii, la care s-a administrat anticorp mAbH6, într-o manieră dependentă de doză, comparativ cu șoarecii, la care s-a administrat anticorp de control (timpul mediu până la apariția trombozei de la 10,4 până la 17,7 min, față de 6,8 min). Timpul mediu de apariție a ocluziei complete se caracteriza printr-o intarziere in toate grupele, in care s-a administrat mAbH6, comparativ cu grupele in care s-a administrat anticorpul de control (Tabelul 18).

- 15 Timpul până la apariția formării trombilor și ocluziei complete

Tabelul 18

	Control	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
Timpul mediu# până la începerea formării trombilor (min)	6,8	10,4	11,7	17,7*
Timpul mediu# până la apariția ocluziei microvasculare complete (min)	23,3	36,8*	40,3*	38,0*

#Valorile medii se bazează pe estimarea Kaplan-Meier

*p<0.05 comparativ cu controlul (criteriul Wilcoxon, ajustat utilizand criteriul Dunnett-Hsu pentru comparații multiple)

- 20 Aceste rezultate demonstrează, că mAbH6, un anticorp monoclonal uman, care se leagă cu MASP-2 și blochează calea lectinei a sistemului complement, reduce tromboza microvasculară într-o manieră dependentă de doză într-un model experimental de TMA pe șoareci. Prin urmare, este de așteptat ca administrarea unui agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp inhibitor al MASP-2, să fie o terapie eficientă la pacienții care suferă de HUS, aHUS, TTP sau alte tulburări microangiopatie, cum ar fi alte forme de TMA, inclusiv sindromul antifosfolipidic catastrofal
- 25 (CAPS), boala sistemică Degos și TMA asociată cancerului, chimioterapiei și transplantului, asigurând protecția împotriva coagulării microvasculare și trombozei.

EXEMPLUL 40

Acest exemplu descrie identificarea, folosind un display de fagi al unei biblioteci de anticorpi

scFv complet umani, care se leagă cu MASP-2 și inhibă activarea complementului mediată de lectină, lăsând în același timp intacte calea clasică (dependentă de C1q) și componentele căii alternative ale sistemului imun.

Prezentare generală.

- 5 Au fost identificați anticorpi umani anti-MASP-2 cu afinitate înaltă prin screening-ul unui display de fagi al unei biblioteci. Fragmentele variabile ale lanțului ușor și greu al fragmentelor de anticorpi au fost izolate atât în format scFv, cât și într-un format IgG cu lungime completă. Anticorpii umani anti-MASP-2 sunt utili pentru inhibarea leziunilor celulare asociate cu activarea căii alternative a complementului, mediată de calea lectinei, lăsând în același timp intactă
- 10 componenta căii clasice (dependente de C1q) a sistemului imun. În unele variante de realizare, anticorpii inhibitori ai MASP-2 testați au următoarele caracteristici: (a) afinitate înaltă pentru MASP-2 umană (de exemplu, un KD de 10 nM sau mai mică) și (b) inhibarea activării complementului dependentă de MASP-2 în 90% ser uman cu IC₅₀ de 30 nM sau mai mică.

Metode

- 15 Expresia MASP-2 catalitic inactive cu dimensiune completă.
- Secvența de ADNc de lungime completă a MASP-2 umane (SECV ID NR: 4), care codifică polipeptidă MASP-2 umană cu secvența lider (SECV ID NR: 5) a fost subclonată în vectorul de expresie mamifer pCI Neo (Promega), care inițiază exprimarea eucariotă sub controlul regiunii CMV amplificator/promotor (descrisă de Kaufman RJ et al., Nucleic Acids Research 19: 448590, 1991; Kaufman, Method in Enzymology, 185: 53766 (1991)).
- 20 Pentru generarea proteinei MASP-2A umane catalitic inactive, s-a efectuat mutagenizația direcționată pe situs, așa cum se descrie în US2007/0172483, încorporat aici ca referință. După electroforeză pe gel de agaroză, produsele PCR s-au purificat și s-a generat prepararea discului de cromozomi și suprapuneri de adenozină unică, folosind o procedură standard de creștere. MASP-2A obținută cu adenozină terminală a fost apoi clonată în vectorul simplu pGEM-T, transformat în E. coli. MASP-2A umană a fost subclonată suplimentar în oricare dintre vectorii de expresie de mamifere pED sau pCI-Neo.

- 25 Construcția de expresie MASP-2A, descrisă mai sus, a fost transfectată în celule DXB1, utilizând procedura de transfecție standard cu fosfat de calciu (Maniatis et al., 1989). MASP-2A a fost produsă într-un mediu fără ser pentru a se asigura că preparatele nu au fost contaminate cu alte proteine serice. Mediile au fost colectate din celulele confluențe la fiecare a doua zi (de patru ori în total). Nivelul de MASP-2A recombinantă constituia aproximativ 1,5 mg / l de mediu de cultură. MASP-2A (mutantul Ser-Ala, descris mai sus) a fost purificat prin cromatografie de afinitate pe coloane MBP-A-agaroză
- 30

- 35 Analiza MASP-2A prin metoda ELISA pe clonele ScFv de interes, identificate prin panning/conversia scFv și screening-ul de filtrare.

- Un display de fagi al unei biblioteci de secvențe ale regiunii variabile a lanțului greu și lanțului ușor a imunoglobulinei umane a fost supus panningului antigenic cu screening-ul automat ulterior și selecția anticorpilor pentru identificarea anticorpilor scFv cu afinitate înaltă la proteina MASP-2 umană. Au fost realizate trei runde panning a bibliotecii de fagi scFv anti-MASP-2A marcată cu HIS sau cu biotină. Cea de-a treia rundă de panning a fost eluată mai întâi cu MBL și apoi cu TEA (alcalin). Pentru a monitoriza îmbogățirea specifică a fagilor, care prezintă fragmente scFv anti-MASP-2A țintă, s-a efectuat analiza fagului policlonal anti-MASP-2A imobilizată prin metoda ELISA. Genele scFv din runda 3 de panning au fost donate într-un vector de expresie pHOG și s-a realizat un screening de filtrare la scară mică pentru căutarea clonelor specifice anti-MASP-2A.
- 40
- 45

- Coloniile bacteriene, care conțin plasmide, care codifică fragmentele scFv din a treia rundă de panning au fost colectate, amplasate pe membrane de nitroceluloză și crescute peste noapte pe mediu neinducător pentru a produce matrice. În general s-au colectat și analizat 18.000 de colonii din a treia rundă de panning, jumătate din eluarea competitivă și jumătate din eluarea ulterioară cu TEA. Panningul bibliotecii de fagemid scFv împotriva MASP-2A urmat de conversia scFv și screening-ul filtrant a dat 137 de clone pozitive. Clonele 108/137 au dat rezultat pozitiv într-o analiză de legare a MASP-2 prin metoda ELISA (datele nu sunt prezentate), dintre care 45 de clone au fost analizate în continuare pentru capacitatea de a bloca activitatea MASP2 în ser normal uman.
- 50

- 55 Studiul de măsurare a inhibării formării convertazei C3 a căii lectinei.

Un test funcțional, în care se măsoară inhibarea formării convertazei C3 a căii lectinei, s-a utilizat pentru a evalua "activitatea de blocare" a clonelor candidate scFv MASP-2. Activitatea serin proteazei MASP-2 este necesară pentru a genera cele două componente proteice (C4b, C2a), care conțin convertaza C3 a căii lectinei. Prin urmare, fragmentul Fab2 al anticorpului anti-MASP-

2, care inhibă activitatea funcțională a MASP-2 (adică, MASP-2 care blochează scFv), va inhiba de novo formarea convertazei C3 a căii lectinei. C3 conține ca parte a structurii sale o grupă tioester neobișnuit și foarte reactiv. După scindarea C3 cu convertaza C3, grupa tioesterică în C3b poate forma o legătură covalentă cu grupele hidroxi sau amino ale macromoleculelor, imobilizate pe fundul godeurilor de masă plastic, cu ajutorul legăturilor de ester sau amidă, facilitând, astfel, detectarea C3b la utilizarea metodei ELISA.

Mananul de drojdie este un activator cunoscut al căii lectinei. În metoda, descrisă în continuare, de măsurare a formării convertazei C3, godeurile din plastic acoperite cu manan au fost incubate cu ser uman diluat pentru a activa calea lectinei. Godeurile au fost apoi spălate și testate pentru C3b, imobilizat în godeuri, utilizând metoda ELISA standard. Cantitatea de C3b, generată în această analiză, este o reflectare directă a formării de novo a convertazei C3 a căii lectinei. În acest studiu, au fost testate clonele fragmentelor scFv anti-MASP-2 în concentrații selectate pentru capacitatea lor de a inhiba formarea convertazei C3 și generarea ulterioară a C3b.

Metode.

Cele 45 de clone candidate identificate, așa cum s-a descris mai sus, au fost exprimate, purificate și diluate până la una și aceeași concentrație inițială, care a fost din nou diluată în tampon GVB conținând Ca^{++} și Mg^{++} (4,0 mM barbital, 141 mM NaCl, 1,0 mM MgCl_2 , 2,0 mM CaCl_2 , 0,1% gelatină, pH 7,4) pentru a asigura, că toate clonele au aceeași cantitate de tampon. Fiecare din clonele scFv au fost testate de trei ori în concentrație de 2 $\mu\text{g/ml}$. În calitate de control pozitiv s-a utilizat OMS100 Fab2, care a fost testat în concentrație de 0,4 $\mu\text{g/ml}$. Formarea C3c a fost monitorizată permanent în prezența și în absența clonei scFv/IgG.

Manan-ul a fost diluat până la o concentrație de 20 $\mu\text{g/ml}$ (1 $\mu\text{g/godeu}$) în 50 mM tampon carbonat (15 mM Na_2CO_3 + 35 mM NaHCO_3 + 1,5 mM NaN_3), pH 9,5 și s-a aplicat pe o placă ELISA peste noapte la 4°C. A doua zi, plăcile acoperite cu manan au fost spălate de 3 ori cu 200 μl PBS. S-au adăugat apoi în godeuri 100 μl de 1% soluție de blocare și s-au incubat timp de 1 oră la temperatura camerei. Plăcile au fost spălate de 3 ori cu 200 μl PBS și depozitate pe gheață cu 200 μl PBS până la adăugarea probelor.

Serul uman normal a fost diluat până la 0,5% în tampon CaMgGVB și clonele scFv sau controlul pozitiv Fab2 OMS100 au fost adăugate în trei exemplare în acest tampon în concentrații de 0,01 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$ (numai control OMS100) și 10 $\mu\text{g/ml}$ și preincubate timp de 45 de minute pe gheață înainte de adăugarea la placa ELISA blocată. Reacția s-a inițiat prin incubare timp de o oră la 37°C și a fost oprită prin transferarea plăcilor pe o baie de gheață. Depunerea C3b a fost detectată cu un anticorp de iepure anti-C3c α -murin, după care urma adăugarea HRP de capră α -iepure. Control negativ servea tamponul fără anticorpi (fără anticorp = depunere C3b maximă), iar controlul pozitiv a fost tamponul cu EDTA (fără depunerea C3b). Fundalul s-a determinat prin efectuarea aceluiași test cu excepția faptului, că godeurile nu conțineau manan. Semnalul de fond al plăcilor fără manan s-a scăzut din semnalele din godeurile care conțineau manan. În calitate de criteriu de prag a fost stabilită jumătate din activitatea unei clone scFv irelevante (VZV) și a unui tampon solitar.

Rezultate: Pe baza criteriului de prag, s-a constatat, că 13 clone au blocat activitatea MASP-2. Toate cele 13 clone, care produc o supresiune > 50% a căii, au fost selectate și secvențiate, producând 10 clone unice. S-a constatat, că toate cele zece clone au una și aceeași subclasă de lanț ușor, $\lambda 3$, dar trei subclase diferite de lanț greu: VH2, VH3 și VH6. În testul funcțional, cinci din cele zece clone candidate scFv s-au caracterizat prin valori IC_{50} mai mici, decât criteriile țintă cele 25 nM, folosind 0,5% ser uman.

Pentru a identifica anticorpi cu activitate sporită, cele trei clone scFv materne, identificate așa cum s-a descris mai sus, au fost supuse la amestecare a lanțului ușor. Acest proces includea generarea unei biblioteci combinatoriale, formată din VH a fiecăreia dintre clonele materne, asociate în pereche cu o bibliotecă de lanțuri ușoare lambda (VL) umane, derivate de la șase donatori sănătoși. Această bibliotecă a fost apoi testată pentru clone scFv cu afinitate și/sau funcționalitate de legare înaltă.

Compararea activității funcționale după valoarea IC_{50} (nM) a clonelor-fiică principale și a clonelor-mamă corespunzătoare lor (toate în formatul scFv)

Tabelul 19

Clona scFv	Studierea C3 in 1% ser uman (IC_{50} nM)	Studierea C3 in 90% ser uman (IC_{50} nM)	Studierea C4 in 90% ser uman (IC_{50} nM)
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140

17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

În continuare sunt prezentate secvențele regiunilor variabile ale lanțurilor grele (VH) pentru clonele-mamă și clonele-fică, menționate în Tabelul 19.

Sectoarele hipervariabile (CDR) Kabat (31-35 (H1), 50-65 (H2) și 95-107 (H3)) sunt evidențiate cu caractere aldine, iar sectoarele hipervariabile (CDR) Chothia (26-32 (H1), 52-56 (H2) și 95-101 (H3)) sunt subliniate.

17D20_35VH-21N11VL regiunea variabilă a lanțului greu (VH) (SEQ ID NO:67, codificată cu SEQ ID NO:66)

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL**SRGKMGV**SWIRQPPGKALEWLA**HIFSSDE**
KSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVLTMTNMDPVDAT**YYCARIRRG**GIDYWGQGLTVTV
 SS

d17N9 regiunea variabilă a lanțului greu (VH) (SEQ ID NO:68)

QVQLQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDS**VSSTSA**AWN**WIRQSPSRGLEWLGRTYYRS**
KWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT**AVYYCARDPFGVPFDI**WGQGM
 VTVSS

In continuare sunt prezentate secvențele regiunilor variabile ale lanțului ușor (VL) pentru clonele-fică și clonele-mamă.

Sectoarele hipervariabile (CDR) Kabat (24-34 (L1); 50-56 (L2); și 89-97 (L3) sunt evidențiate cu caractere aldine, iar sectoarele hipervariabile (CDR) Chothia (24-34 (L1); 50-56 (L2) și 89-97 (L3) sunt subliniate. Aceste sectoare sunt identice, indiferent de aceea că sunt numerotate după sistemul Kabat sau Chothia.

17D20m_d3521N11 regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) (SEQ ID NO:70, codificată cu SEQ ID NO:69)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS**GEKLGDKYAYWY**QQKPGQSPVLV**MYQDKQRPSGI**
 PERFGSNGNTATLTISGTQAMDEADYYC**QAWDSSTAVF**GGGKLTVL

17N16m_d17N9 regiunea variabilă a lanțului ușor (VL) (SEQ ID NO:71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCAGDNLG**GKRVHWY**QQRPGQAPVLVIYD**DSDRPSGIP**
 DRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYC**QVWDIATDHV**VFGGKLTVLAAAGSEQKL
 ISE

Anticorpii OMS100 și MoAb_d3521N11VL anti-MASP-2, (cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu, notată ca SEQ ID NO: 67 și o regiune variabilă a unui lanț ușor, notată ca SECV ID NR: 70, denumite de asemenea "OMS646" și "mAbH6"), referitor la care s-a demonstrat, că se leagă cu MASP-2 umană cu afinitate înaltă și au capacitatea de a bloca activitatea funcțională a complementului, au fost analizate cu privire la legarea epitopilor prin analiza dot-blot. Rezultatele arată, că anticorpii OMS646 și OMS100 sunt foarte specifici pentru MASP-2 și nu se leagă cu MASP-1/3. Anticorpusul nu s-a legat nici cu MAp19 și nici cu fragmentele MASP-2, care nu conțineau domeniul CCP1 al MASP-2, conducând la concluzia că situsurile de legare includ CCP1.

S-a determinat, că anticorpusul OMS646 anti-MASP-2 se leagă active cu MASP-2 recombinant (Kd 60-250 μ M) cu o selectivitate de 5000 ori mai mare, comparativ cu C1s, C1r sau MASP-1 (tabelul 20):

Afinitatea și specificitatea anticorpilor OMS646 anti-MASP-2 la interacțiunea cu MASP-2, estimate prin metoda ELISA în fază solidă

Tabelul 20

Antigen	K _D (μ M)
MASP-1	>500,000
MASP-2	62±23*
MASP-3	>500,000
C1r uman purificat	>500,000
C1s uman purificat	~500,000

*Valoarea medie±SD; n=12

OMS646 blochează specific activarea componentelor terminale ale complementului, dependentă de calea lectinei

Metode

Efectul OMS646 asupra depunerii complexului de atac membranar (MAC) a fost analizat utilizând condiții specifice pentru calea lectinei, calea clasică și calea alternativă. În acest scop s-a folosit kitul pentru screening-ului complementului Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Suedia) în conformitate cu instrucțiunile producătorului.

Rezultate

Fig. 53A ilustrează grafic nivelul depunerii MAC în prezența sau absența anticorpului anti-MASP-2 (OMS646) în condiții de testare specifice pentru calea lectinei. Fig. 53B ilustrează grafic nivelul depunerii MAC în prezența sau absența anticorpului anti-MASP-2 (OMS646) în condiții de testare specifice pentru calea clasică. Fig. 53C ilustrează grafic nivelul depunerii MAC în prezența sau absența anticorpului anti-MASP-2 (OMS646) în condiții de testare specifice pentru calea alternativă.

După cum se arată în fig. 53A, anticorpul OMS646 blochează activarea mediată de calea lectinei de depunere a MAC cu o valoare IC_{50} de aproximativ 1 nM. Cu toate acestea, OMS646 nu a influențat asupra depunerii MAC, generată de activarea mediată de calea clasică (Fig.53B) sau de activarea mediată de calea alternativă (Fig.53C).

Studierea farmacocineticii și farmacodinamicii anticorpului OMS646 după administrarea intravenoasă (IV) sau subcutanată (SC) a acestuia la șoareci.

Farmacocinetica (PK) și farmacodinamica (PD) anticorpului OMS646 au fost evaluate la șoareci după administrarea anticorpului în doză unică timp de 28 zile. Pentru studiu s-au folosit dozele de 5 mg/kg și 15 mg/kg de OMS646 administrate subcutanat (SC), precum și doză de 5 mg/kg de OMS646 administrată intravenos (IV).

În ceea ce privește profilul farmacocinetic al OMS646, fig. 54 ilustrează grafic dependența concentrației de OMS646 (în medie $n = 3$ animale/grupă) de timpul după administrarea OMS646 în doza menționată. După cum se arată în fig. 54, într-o doză de 5 mg/kg, administrate subcutant, OMS646 atinge concentrația plasmatică maximă de 5-6 $\mu\text{g/ml}$ aproximativ peste 1-2 zile după administrare. Biodisponibilitatea OMS646 în doză de 5 mg/kg SC constituia aproximativ 60%. După cum se arată în continuare în fig. 54, într-o doză de 15 mg/kg SC, OMS646 atinge concentrația plasmatică maximă de 10-12 $\mu\text{g/ml}$ aproximativ peste 1-2 zile după administrare. Pentru toate grupele, OMS646 a fost eliminat lent din circulația sistemică, cu un timp de înjumătățire terminal de aproximativ 8-10 zile. Profilul OMS646 este tipic pentru administrarea anticorpului uman la șoareci.

Activitatea farmacodinamică a OMS646 este ilustrată grafic în fig.55A și 55B. Fig. 55A și 55B prezintă răspunsul farmacodinamic (reducerea activității sistemice a căii lectinei) pentru fiecare șoarece în grupele cu doză de 5 mg/kg, administrate intravenos (fig. 55A) și de 5 mg/kg, administrate subcutanat (fig. 55B). Linia întreruptă indică nivelul inițial în studiu (inhibare maximă; serul unui șoarece intact, la care înainte de testare s-a introdus in vitro un exces de OMS646). După cum se arată în fig. 55A, după administrarea intravenoasă a 5 mg/kg de OMS646, activitatea sistemică a căii lectinei s-a redus imediat până la nivele aproape nedetectabile, iar activitatea căii lectinei se caracteriza doar printr-o restabilire moderată timp de 28 de zile de observație. După cum se arată în fig. 55B, la șoarecii la care s-a administrat o doză de 5 mg/kg de OMS646 subcutanat, s-a observat o inhibare a activității căii lectinei dependentă de timp. Activitatea sistemică a căii lectinei s-a redus până la niveluri aproape nedetectabile timp de 24 de ore după administrarea medicamentului și s-a menținut la niveluri joase timp cel puțin de 7 zile. Activitatea căii lectinei a crescut treptat odată cu trecerea timpului, dar timp de 28 de zile de observație nu a revenit la nivelul de până la doze. Profilul activității căii lectinei în funcție de timp, observat după administrarea dozei de 15 mg/kg subcutanat, a fost similar profilului în doza de 5 mg/kg subcutanat (datele nu sunt prezentate), indicând atingerea efectului farmacodinamic maximal posibil. Mai mult decât atât, aceste date atestă, că administrarea intravenoasă și subcutanată o singură dată în săptămână a dozei de 5 mg/kg de OMS646, este suficientă pentru a asigura suprimarea continuă a activității sistemice a căii lectinei la șoareci.

EXEMPLUL 41

Acest exemplu demonstrează, că anticorpul inhibitor al MASP-2 (OMS646) inhibă depunerea C5b-9, indusă de serul aHUS, pe suprafața celulelor endoteliale microvasculare umane activate (HMEC-1) după acțiunea serului, obținut de la pacienți cu sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS), colectat în timpul fazei acute și fazei de remisiune a bolii.

Fundal/actualitate: Studiul următor s-a efectuat pentru a analiza depunerea C5b-9, indusă cu ser aHUS, pe suprafața celulelor HMEC-1 activate după influența serului pacientului cu aHUS colectat (1) în timpul fazei acute și (2) în timpul fazei de remisiune a bolii în prezența sau absența OMS646, un anticorp anti-MASP-2, care se leagă în mod specific cu MASP-2 și inhibă activarea căii lectinei.

Metode

Pacienți: Pentru acest studiu au fost selectați patru pacienți cu aHUS, examinați atât în faza acută a bolii, cât și în remisiune, printre acei incluși în Registrul Internațional al HUS/TTP

(International Registry of HUS/TTP) și genotipați în Laboratorul de Imunologie și Genetică al Transplantului și Bolilor Rare al Institutului Mario Negri (Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases of the Mario Negri Institute). Un pacient cu aHUS a prezentat o mutație heterozigotă p.R121°C cu factorul H al complementului (CFH) și unul a prezentat autoanticorpi anti-CFH, în timp ce la ceilalți doi pacienți nu s-au depistat mutații sau anticorpi anti-CFH.

În tabelele 21 și 22 sunt prezentate rezultatele screening-ului mutațiilor genei complementului și autoanticorpilor anti-CFH la patru pacienți cu aHUS, analizați în acest studiu deopotrivă cu datele clinice și biochimice, obținute în timpul fazei acute, sau în remisiune.

Parametrii clinici la patru pacienți cu aHUS din acest studiu

Tabelul 21

Cazul nr.	Mutație sau Ab anti-CFH	Faza bolii	trombocite (150...400*10 ³ /μl)	LDH (266...500 UI/l)	Hemoglobină (14...18g/dl)	s-creatinină (0,55...1,25mg/dl)
#1	fără mutații, Ab anti-CFH lipsesc	acută	31,000	1396	12,9	2,37
		remisiune	267,000	n.a.	11,5	3,76
#2	CFH-R1210C	acută	46,000	1962	7	5,7
		remisiune	268,000	440	13,4	7,24
#3	Ab anti-CFH	acută	40,000	3362	9,5	1,77
		remisiune	271,000	338	8,8	0,84
#4	fără mutații, Ab anti-CFH lipsesc	acută	83,000	1219	7,8	6,8
		remisiune	222,000	495	12,2	13

Notă: n.a. = datele lipsesc

Parametrii complementului la patru pacienți cu aHUS din acest studiu

Tabelul 22

Cazul nr.	Mutația sau Ab anti-CFH	Faza bolii	Serul C3 (83-180 mg/dl)	Plasma SC5b-9 (127-400 ng/ml)
#1	fără mutații, Ab anti-CFH lipsesc	acută	51	69
		remisiune	n.a.	117
#2	CFH-R1210C	acută	79	421
		remisiune	119	233
#3	Ab anti-CFH	acută	58	653
		remisiune	149	591
#4	fără mutații, Ab anti-CFH lipsesc	acută	108	n.a.
		remisiune	n.a.	n.a.

15 Metode experimentale: Celulele dintr-o linie celulară endotelială microvasculară umană (HMEC-1) de origine dermică s-au placentat pe lamele și s-au folosit după confluența lor. Celulele HMEC-1 confluențe au fost activate cu 10 μM ADP (adenozindifosfat) timp de 10 min și apoi au fost incubate timp de patru ore cu ser de la cei patru pacienți cu aHUS, descriși mai sus în tabelele 23 și 24, colectat în faza acută a bolii sau în remisiune, sau de la 4 subiecți sănătoși, utilizat în calitate de control. Serul s-a diluat 1: 2 cu mediu de testare (HBSS cu 0,5% BSA) în prezența sau în absența unui anticorp inhibitor al MASP-2, OMS646 (100 μg/ml), generat așa cum se descrie mai sus în Exemplul 40, sau în prezența receptorului solubil de complement 1 (sCR1) (150 μg/ml), în calitate de control pozitiv al inhibării complementului. La sfârșitul etapei de incubare, celulele HMEC-1 au fost tratate cu anticorp de iepure anti-complement uman C5b-9, urmat de anticorp secundar conjugat cu FITC. În fiecare experiment, serul de la un subiect sănătos de control a fost testat în paralel cu serul pacientului cu aHUS (în fază acută și remisiune). Pentru înregistrarea colorării fluorescente pe suprafața celulelor endoteliale s-a utilizat un microscop laser confocal inversat. S-au înregistrat cincisprezece câmpuri în fiecare probă, și s-a evaluat suprafața de colorare fluorescent, utilizând funcțiile specifice încorporate ale software Image J și rezultatele au fost exprimate ca pixel² pe câmp analizat. Câmpurile, caracterizate prin cele mai mici și cele mai mari valori au fost excluse din calcul.

Pentru analiza statistică (analiza cu dispersie monofactorială ANOVA cu testarea ulterioară pe criteriul Tukey pentru comparații multiple) au fost utilizate rezultatele în pixel² pentru 13 campuri, obținute pentru fiecare pacient și subiect de control în fiecare condiție a experimentului.

Rezultate

- 5 Rezultatele analizei depunerii complementului cu serul de la cei patru pacienți cu aHUS sunt prezentate în continuare în tabelul 23A, iar rezultatele cu serul de la patru subiecți sănătoși sunt prezentate în continuare în Tabelul 23B.

Influența inhibitorilor complementului asupra depozitării C5b-9 pe celulele HMEC-1 activate cu ADP, indusă cu serul pacienților cu aHUS

10

Tabelul 23A

Pacientul aHUS #	Faza acută aHUS			Faza de remisie aHUS		
	netratat	+sCR1	+OMS646	netratat	+sCR1	+OMS646
Pacientul #1 (fără mutație, ab anti-CFH lipsește)	5076 ± 562?	551 ± 80*	3312 ± 422**	4507 ± 533?	598 ± 101	1650 ± 223
Pacientul #2 (CFH-R1210C)	5103 ± 648?	497 ± 67*	2435 ± 394*	3705 ± 570?	420 ± 65	2151 ± 250
Pacientul #3 (ab anti-CFH)	3322 ± 421?	353 ± 64*	2582 ± 479	6790 ± 901?	660 ± 83	2077 ± 353
Pacientul #4 (fără mutație, ab anti-CFH lipsește)	4267 ± 488?	205 ± 34*	2369 ± 265**	5032 ± 594?	182 ± 29	3290 ± 552

Influența inhibitorilor complementului asupra depozitării C5b-9 pe celulele HMEC-1 activate cu ADP, indusă cu serul subiecților sănătoși de control (fără aHUS)

Tabelul 23B

Subiectul sănătos de control #	netratat	+sCR1	+OMS646
Subiectul de control #1 (examinat paralel cu pacientul cu aHUS #1)	481 ± 66	375 ± 43	213 ± 57
Subiectul de control #2 (examinat paralel cu pacientul cu aHUS #2)	651 ± 61	240 ± 33	490 ± 69
Subiectul de control #3 (examinat paralel cu pacientul cu aHUS #3)	602 ± 83	234 ± 35	717 ± 109
Subiectul de control #4 (examinat paralel cu pacientul cu aHUS #4)	370 ± 53	144 ± 20	313 ± 36

- 15 Pentru tabelele 23A și 23B: Datele sunt valori medii ± SE. °p<0,001 în raport cu controlul; *p<0,001, **p<0,01 în raport cu faza acută aHUS netratată; p<0,001, p<0,01, p<0,05 în raport cu faza de remisiune aHUS netratată.

- Fig. 56 ilustrează grafic efectul inhibitor al anticorpului anti-MASP-2 (OMS646) și sCR1 asupra depunerii C5b-9, indusă de ser aHUS, pe celulele HMEC-1 activate cu ADP. În fig. 56, datele sunt valori medii ± SE. °p<0,001 în raport cu controlul; *p<0,0001 în raport cu faza acută aHUS; ^p<0,0001 în raport cu faza acută aHUS+sCR1; p<0,0001 în raport cu faza de remisiune aHUS netratată și #p<0,0001 în raport cu faza de remisiune aHUS+sCR1.

- Așa cum se arată în tabelele 23A, 23B și în fig. 56, celulele HMEC-1, activate cu ADP, care au fost expuse influenței serului de la pacienții cu aHUS (colectat în faza acută, sau în stare de remisiune) timp de patru ore în condiții statice, s-au caracterizat printr-o depunere intensă a C5b-9 pe suprafața celulară, detectată prin microscopie confocală. La măsurarea suprafeței, acoperite cu C5b-9, s-a observat o cantitate semnificativ mai mare C5b-9 depus pe celulele, care au fost expuse influenței serului de la pacienții cu aHUS, decât pe celule care au fost expuse influenței serului de la subiecți sănătoși de control, indiferent dacă serul aHUS a fost colectat în faza acută sau în timpul remisiunii. Nu s-a observat nici o diferență în depozitele endoteliale de C5b-9 induse de serul colectat în faza acută și în faza de remisiune aHUS.

Mai mult decât atât, cum este prezentat în tabelele 23A, 23B și fig. 56, adiția anticorpului

OMS646 anti-MASP-2 la serul aHUS (colectat de la pacienți în timpul fazei acute sau în faza de remisiune) conduce la o reducere semnificativă a depunerii C5b-9 pe suprafața celulelor endoteliale, comparativ cu serul aHUS netratat. Însă, efectul inhibitor al OMS646 asupra depunerii C5b-9 a fost mai puțin profund, decât efectul exercitat de inhibitorul complementului cu acțiune largă sCR1. Într-adevăr, s-a observat o diferență statistic concludentă între depozitele de C5b-9 induse de ser aHUS în prezența OMS646, comparativ cu prezența sCR1 (fig. 56 și tabelele 23A și 23B).

Când se calculează valoarea medie pentru cei patru pacienți cu aHUS, procente de reducere a depozitelor de C5b-9 în prezența inhibitorilor complementului (comparativ cu depozitele de C5b-9, induse de serul netratat de la aceiași pacienți, luați ca 100%) au fost după cum urmează.

Faza acută

sCR1 (150 µg/ml): reducere cu 91% a depozitelor de C5b-9

OMS646 (100 µg/ml): reducere cu 40% a depozitelor de C5b-9

Faza de remisie

sCR1 (150 µg/ml): reducere cu 91% a depozitelor de C5b-9

OMS646 (100 µg/ml): reducere cu 54% a depozitelor de C5b-9

Concluzii

Rezultatele, prezentate în acest exemplu, demonstrează că calea lectinei a complementului este stimulată de celulele endoteliale microvasculare activate și că această stimulare este un semnal important pentru activarea excesivă a complementului drept răspuns, caracteristic pentru aHUS. Se demonstrat, de asemenea, că această stimulare a căii lectinei și, drept consecință, reacția de activare excesivă a complementului, apare atât în faza acută, cât și în faza de remisiune clinică aHUS. Mai mult decât atât, probabil, această constatare nu pare a fi limitată numai la un defect concret al complementului, asociat cu aHUS. Așa cum s-a demonstrat în continuare în acest exemplu, inhibarea selectivă a căii lectinei cu un anticorp inhibitor al MASP-2, cum ar fi OMS646, reduce depunerea complementului la pacienții cu aHUS de diverse etiologii.

EXEMPLUL 42

Acest exemplu demonstrează, că un anticorp inhibitor al MASP-2 (OMS646) inhibă agregarea trombocitelor, indusă de serul aHUS, și formarea de trombi pe suprafața celulelor endoteliale microvasculare umane activate (HMEC-1) după influența serului pacientului aHUS, colectat în timpul (1) fazei acute și (2) fazei de remisiune aHUS.

Metode

Pacienți

Au fost examinați trei pacienți (pacienții # 1, # 2 și # 4, descriși în tabelele 21, 22, 23A și 23B din exemplul 41) cu aHUS (un pacient a avut o mutație heterozigotă p.R121°C CFH, la ceilalți doi pacienți a fost detectată o mutație și anticorpi anti-CFH) atât în faza acută a bolii, cât și în faza de remisiune. Pentru acest studiu au fost selectați patru pacienți printre cei incluși în incluși în Registrul Internațional al HUS/TTP (International Registry of HUS/TTP) și genotipați în Laboratorul de Imunologie și Genetică al Transplantului și Bolilor Rare al Institutului Mario Negri (Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases of the Mario Negri Institute). Cinci subiecți sănătoși au fost, de asemenea, selectați ca donatori de sange pentru experimente de perfuzie.

Metode

Celulele HMEC-1 confluențe au fost activate cu 10 µM ADP timp de 10 min și apoi au fost incubate timp de trei ore cu seruri de la trei pacienți cu aHUS (pacienții # 1, #2 și #4, descriși în Exemplul 41), colectate în timpul fazei acute a bolii sau de la aceiași pacienți în faza de remisiune sau cu seruri de control de la subiecți sănătoși. Serul a fost diluat 1: 2 cu mediu de testare (HBSS cu 0,5% BSA), în prezența sau în absența unui anticorp inhibitor al MASP-2, OMS646 (100 µg/ml), cum se descrie în Exemplul 40; sau în prezența sCR1 (150 µg/ml), în calitate de control pozitiv al inhibării complementului. Pentru pacienții # 1 și # 2, godeuri suplimentare au fost incubate cu seruri (din faza acută și de remisiune) diluate 1: 2 cu mediu de testare, care conține 100 µg/ml anticorp de control izotip irelevant sau cu 20 µg/ml OMS646 (pentru ultimul, cazul pacientului # 1 testările s-au realizat numai în faza de remisiune, iar în cazul # 2 - atât în timpul fazei acute cât și în faza de remisiune).

La sfârșitul etapei de incubare, celulele HMEC-1 au fost perfuzate într-o cameră de flux cu sânge integral heparinizat (10 UI/ml), colectat de la subiecți sănătoși (conținând colorantul fluorescent meacarin, care marchează trombocitele) cu o deviere de tensiune, caracteristică pentru microcirculație (60 din/cm², 3 minute). După trei minute de perfuzie, monostraturile celulelor endoteliale au fost fixate în acetonă. S-au înregistrat cincisprezece imagini pentru fiecare probă de

tromb trombocitar pe suprafața celulelor endoteliale cu un microscop laser confocal inversat, și au fost evaluate zonele ocupate de trombi, utilizând software Image J. Campurile, caracterizate prin cele mai mici și cele mai mari valori, au fost excluse din calcul.

- 5 Pentru analiza statistică (analiza de dispersie monofactorială ANOVA, urmată de testul pentru criteriul Tukey pentru comparații multiple) s-au utilizat rezultatele în pixel^2 pentru 13 campuri, obținute pentru fiecare pacient și subiect de control în fiecare condiție a experimentului.

Rezultate

- 10 Rezultatele experimentelor de formare a trombilor cu serurile de la cei trei pacienți cu aHUS sunt prezentate în continuare în Tabelul 24A, iar rezultatele cu serurile de la cinci subiecți sănătoși sunt prezentate în continuare în Tabelul 24B.

Efectul inhibitorilor complementului asupra formării trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$), indusă cu ser aHUS, pe celulele HMEC-1, activate cu ADP

Tabelul 24A

Condițiile experimentului	Faza bolii	Cazul #1 aHUS formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$) (fără mutație, ab anti-CFH lipsește)	Cazul #2 aHUS formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$) (CFH-R1210C)	Cazul #4 aHUS formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$) (fără mutație, ab anti-CFH lipsește)
netratat	acută	5499 ± 600	22320 ± 1273?	10291 ± 1362?
	remisiune	6468 ± 1012?	3387 ± 443?	17676 ± 1106?
+sCR1 (150 $\mu\text{g/ml}$)	acută	4311 ± 676	5539 ± 578*	5336 ± 1214***
	remisiune	573 ± 316	977 ± 102	2544 ± 498
+OMS646 (20 $\mu\text{g/ml}$)	acută	nedeterminat	6974 ± 556*	Nu s-a determinat
	remisiune	832 ± 150	1224 ± 252	Nu s-a determinat
+OMS646 (100 $\mu\text{g/ml}$)	acută	3705 ± 777	9913 ± 984*	2836 ± 509*
	remisiune	3321 ± 945	733 ± 102	1700 ± 321
+ anticorp de control izotip irelevant (100 $\mu\text{g/ml}$)	acută	5995 ± 725	18655 ± 1699	Nu s-a determinat
	remisiune	10885 ± 1380	2711 ± 371	Nu s-a determinat

- 15 Efectul inhibitorilor complementului asupra serurilor de la cinci subiecți sănătoși (care nu suferă de HUS) în studiul cu formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$) pe celulele HMEC-1, activate cu ADP

Tabelul 24B

Condițiile experimentului	Controlul #1 formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$)	Controlul #2 formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$)	Controlul #3 formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$)	Controlul #4 formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$)	Controlul #5 formarea trombilor ($\text{pixel}^2 \pm \text{SE}$)
netratat	2880 ± 510	1046 ± 172	1144 ± 193	735 ± 124	2811 ± 609
+sCR1 (150 $\mu\text{g/ml}$)	5192 ± 637	1527 ± 153	1198 ± 138	2239 ± 243	2384 ± 410
+OMS646 (100 $\mu\text{g/ml}$)	7637 ± 888	1036 ± 175	731 ± 203	2000 ± 356	7177 ± 1477

+ anticorp de control izotip irelevant (100 µg/ml)	6325 ± 697	1024 ± 235	399 ± 82	45269	Nu s-a determinat
Studiu în paralel cu ser de la subiect cu aHUS	#1 (ser din faza acută)	#1 (ser din faza de remisiune)	#2 (ser din faza acută)	#2 (ser din faza de remisiune)	#5 (ser din faza acută și din faza de remisiune)

Pentru tabelele 24A și 24B: Datele sunt valori medii ± SE. °P<0.001 vs control; *P<0.001, ***P<0.05 vs aHUS faza acută netratată; p<0.001, p<0.05 vs aHUS faza de remisiune netratată.

Fig. 57 ilustrează grafic efectul anticorpilor anti-MASP-2 (OMS646) și sCR1 asupra formării trombilor, indusă cu ser aHUS, pe celulele HMEC-1 activate cu ADP. Datele prezentate în Fig. 57 sunt valorile medii ± SE. °P<0.0001, °P<0.01 vs control; *P<0.0001, **P<0.01 vs aHUS faza acută netratată; p<0.0001 vs aHUS faza de remisiune netratată.

Așa cum se arată în Tabelul 24A și Fig.57, o creștere marcantă a zonei acoperite de trombi a fost observată pe celulele HMEC-1, tratate cu ser aHUS, colectat fie în timpul fazei acute, fie în faza de remisiune, comparativ cu celulele expuse la ser de la subiecți sănătoși de control (tabelul 24B și fig. 57). Așa cum se arată în fig. 57 și în tabelul 24A, anticorpul OMS646 (atât la 100 µg/ml, cât și la 20 µg/ml) exercita o inhibare parțială a formării trombilor pe celulele preexpuse la serul aHUS, colectat în timpul fazei acute. Efectul anti-trombogen este comparabil pentru cele două doze diferite de OMS646 și nu se deosebește de efectul sCR1 (Fig. 57 și Tabelul 24A). Adăugarea anticorpului de control izotip irelevant nu exercita efect inhibitor asupra formării trombilor, induse de serul aHUS.

Așa cum este prezentat în continuare în fig. 57 și tabelul 24A, efectul inhibitor al OMS646 a fost și mai evident în cazul serului aHUS, colectat în timpul fazei de remisie. Într-adevăr, adăugarea OMS646, atât la doză de 100 µg/ml, cât și în doză de 20 µg/ml, la serul pacientului aHUS, colectat în faza de remisiune a avut ca rezultat o inhibare aproape completă a formării trombilor, similară inhibării observate la adăugarea sCR1. Anticorpul de control izotip irelevant nu a exercitat efect inhibitor semnificativ.

Când se calculează valoare medie pentru trei pacienți cu aHUS, procentele de reducere a suprafeței celulelor HMEC-1, acoperite cu depozite de trombi (comparativ cu zona, acoperită de depuneri de trombi, indusă de serurile netratate de la aceiași pacienți, luată drept 100%), înregistrate în prezența inhibitorilor complementului au fost după cum urmează:

Faza acută

sCR1 (150 µg/ml): reducere de 60%

OMS646 (100 µg/ml): reducere de 57%

OMS646 (20 µg/ml): reducere de 45%

Faza de remisiune

sCR1 (150 µg/ml): reducere de 85%

OMS646 (100 µg/ml): reducere de 79%

OMS646 (20 µg/ml): reducere de 89%

Discutarea rezultatelor

Rezultatele din acest exemplu demonstrează, că un anticorp inhibitor MASP-2, cum ar fi OMS646 (generat cum se descrie în Exemplul 40), are un efect inhibitor puternic asupra formării trombului, indusă de serul aHUS, pe celulele HMEC-1. În mod surprinzător, efectul inhibitor al OMS646 asupra formării trombilor depășea efectul său asupra depunerilor de C5b-9, induse pe HMEC-1 (cum se descrie în Exemplul 41). De asemenea, este surprinzător că adăugarea OMS646, atât în doză de 100 µg/ml, cât și în doză de 20 µg/ml, la serul pacientului cu aHUS, colectat în faza de remisiune, a condus la o inhibare practică completă a formării trombilor. O altă constatare surprinzătoare este observarea faptului, că OMS646, atât în faza acută cât și în remisiune, a fost la fel de eficient ca și controlul pozitiv sCR1, care este un inhibitor cu acțiune largă și un inhibitor aproape complet al sistemului complementului (Weisman H. et al., Science 249: 146-151, 1990, Lazar H. et al., Circulation 100: 1438-1442, 1999).

Este necesar de remarcat, că serul de control de la subiecții sănătoși a indus, de asemenea, o formare moderată a trombilor pe celulele HMEC-1. Nu s-a observat efect inhibitor consecvent asupra formării trombilor, indusă de serul de control, nici în cazul OMS646, nici în cazul sCR1. Deși nu se dorește legarea de o anumită teorie, se poate presupune, că trombi, induși cu ser de control, nu depind de complement, fapt confirmat de nivelurile foarte reduse de depuneri C5b-9, depistate pe celulele HMEC-1, incubate cu ser de control (vezi exemplul 41).

Concluzie

În concluzie este necesar de menționat, că efectul anti-trombotic observat al unui anticorp inhibitor al MASP-2, cum ar fi OMS646, pare substanțial mai mare, decât s-ar fi așteptat pe baza efectului inhibitor al OMS646 asupra depunerii de C5b-9, observată în acest sistem experimental (cum se descrie în exemplul 41 și se prezintă în fig. 56). De exemplu, Gastoldi et al., Immunobiology 217: 1129-1222 Abstract 48 (2012) în publicația intitulată "Interacțiunea C5a/C5aR mediază activarea complementului și tromboza pe celulele endoteliale în sindromul hemolitic uremic atipic (aHUS)" a constatat, că adăugarea anticorpului anti-C5, care inhibă depunerea de C5b-9 (reducere de 60%), limita formarea trombilor pe celulele HMEC-1 într-o măsură comparabilă (reducere de 60%). În contrast, anticorpul inhibitor al MASP-2 (OMS646 în doză de 100 µg/ml) a inhibat depunerile de C5b-9 cu valori suficient de medii (fază acută = reducere de 40%, fază de remisiune = reducere de 54%) și inhibarea formării trombilor la un procent semnificativ mai mare (faza acută = reducere de 57%, fază de remisiune = reducere de 79%). Pentru comparație, anticorpul OMS646 a inhibat depunerea complementului cu un procent mai mic, decât inhibitorul complementului pentru un control pozitiv (sCR1 la 150 µg/ml, inhibarea depunerii C5b-9 în faza acută = reducere de 91%, în faza de remisiune = 91% reducere), dar el, de asemenea, era eficient ca și controlul sCR1 pozitiv în inhibarea formării trombilor (sCR1 la 150 pg/ml, fază acută = reducere de 60%, fază de remisiune = reducere de 85%). Aceste rezultate demonstrează, că un anticorp inhibitor al MASP-2 (de exemplu, OMS646) este surprinzător de eficient la inhibarea formării trombilor în serul, colectat de la subiecții cu aHUS atât în faza acută, cât și în faza de remisiune.

În conformitate cu cele menționate, într-o variantă de realizare, invenția prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect, care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a microangiopatiei trombotice (TMA), care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții care conține o cantitate de anticorpi inhibitori ai MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2. Într-o variantă de realizare, TMA se selectează din grupa, care constă din sindromul hemolitic uremic (HUS), purpură trombocitopenică trombotică (TTP) și sindromul hemolitic uremic atipic (aHUS). Într-o formă de realizare, TMA este aHUS. Într-o variantă de realizare, compoziția este administrată la un pacient cu aHUS în timpul fazei acute a bolii. Într-o variantă de realizare, compoziția se administrează la un pacient cu aHUS în timpul fazei de remisiune (adică, la un subiect care s-a recuperat sau parțial s-a recuperat după un episod de fază acută aHUS, o astfel de remisiune este confirmată, de exemplu, printr-o creștere a numărului de trombocite și/sau o reducere a concentrațiilor de lactat dehidrogenază (LDH) în ser, de exemplu, așa cum descrie Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, al cărui conținut este încorporat aici prin referință).

Într-o variantă de realizare, anticorpul inhibitor al MASP-2 se caracterizează prin cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 umană cu valoarea KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat se leagă la un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul menționat inhibă depunerea C3b în studiul in vitro în 1% ser uman cu o valoare IC₅₀ de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat inhibă depunerea C3b în 90% ser uman cu o valoare IC₅₀ de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp, selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab) 2 și F(ab') 2, în care anticorpul menționat reprezintă o moleculă monocatenară, în care anticorpul menționat reprezintă o moleculă de IgG2, în care anticorpul menționat reprezintă o moleculă de IgG1, în care anticorpul menționat reprezintă o moleculă de IgG4, în care molecula de IgG4 cuprinde o mutație S228P și/sau în care anticorpul practic nu inhibă calea clasică. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă cu MASP-2 și în mod selectiv inhibă calea lectinei și practic nu inhibă calea alternativă. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă cu MASP-2 și în mod selectiv inhibă calea lectinei și practic nu inhibă calea clasică sau calea alternativă (adică, inhibă calea lectinei, lăsând intacte calea clasică și calea alternativă a complementului).

Într-o variantă de realizare, anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul sanguin al unui subiect, care suferă de TMA, cum ar fi aHUS (în faza acută sau în faza de remisiune) cel puțin de 30%, de exemplu, cel puțin de 40%, de exemplu, cel puțin de 50%, de

exemplu, cel puțin de 60%, de exemplu, cel puțin de 70%, de exemplu, cel puțin de 80%, de exemplu, cel puțin de 85%, de exemplu, cel puțin de 90% și până la 99%, comparativ cu serul netratat. În unele variante de realizare, anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul sanguin al unui subiect suferind de aHUS, la un nivel cel puțin de 20 de procente sau mai mult (de exemplu, cel puțin de 30%, cel puțin de 40%, cel puțin de 50%), depășind efectul inhibitor asupra depunerii de C5b-9 în ser.

Intr-o variantă de realizare, anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea trombilor în serul pacientului cu aHUS în faza de remisiune cel puțin de 30%, de exemplu, cel puțin de 40%, de exemplu, cel puțin de 50%, de exemplu, cel puțin de 60%, de exemplu, cel puțin de 70%, de exemplu, cel puțin de 80%, de exemplu, cel puțin de 85%, de exemplu, cel puțin de 90%, de exemplu, cel puțin de 95% și până la 99%, comparativ cu serul netratat cu anticorp. În unele variante de realizare, anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea trombilor în serul pacientului cu aHUS în faza de remisiune cel puțin de 20 de procente sau mai mult (de exemplu, cel puțin de 30%, cel puțin de 40 %, în aparență, cu 50%) depășind efectul inhibitor asupra depunerii de C5b-9 în ser.

Intr-o variantă de realizare, anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează la un subiect printr-un cateter intravenos sau prin alte metode livrare prin cateter.

Intr-o realizare, invenția prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect care suferă de TMA, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții care conține o cantitate de anticorp inhibitor al MASP-2 sau de un fragment de legare la antigen al acestuia care include (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și (b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 89-97 din SECV ID NR: 70 sau varianta (II) a acestuia, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70.

Intr-o variantă de realizare, TMA se selectează din grupa constând din sindromul hemolitic uremic atipic (aHUS) (sau în faza acută sau în faza de remisiune), HUS și TTP. Într-o variantă de realizare, subiectul este în faza acută a aHUS. Într-o variantă de realizare, subiectul este în faza de remisiune al aHUS.

În unele variante de realizare, metoda cuprinde administrarea la un subiect a unei compoziții care conține o cantitate de anticorp inhibitor al MASP-2 sau de un fragment de legare la antigen al acestuia, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi notată ca secvență SEQ ID NO: 67. În unele variante de realizare, metoda cuprinde administrarea la un subiect a unei compoziții care conține o cantitate de anticorp inhibitor al MASP-2 sau de un fragment de legare la antigen al acestuia, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor cu secvența de aminoacizi notată ca secvență SEQ ID NO: 70.

În unele variante de realizare, metoda cuprinde administrarea la un subiect a unei compoziții care conține un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de un fragment de legare la antigen al acestuia, care recunosc în mod specific cel puțin de o parte din epitop pe MASP-2 umană, recunoscut de anticorpul de control OMS646, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu, notată ca secvență SEQ ID NO: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, denumită secvență SEQ ID NO: 70. Competiția dintre participanții la legare poate fi ușor studiată in vitro, de exemplu, folosind metoda de analiză ELISA și/sau prin introducerea unui marcaj sub formă de grupă reporter specifică în unul din participanții la legare, care poate fi detectat în prezența altui participant (participanți) nemarcat (nemarcați) la legare, pentru a asigura posibilitatea identificării participanților specifici la legare, care se leagă cu unul și același epitop sau cu un epitop suprapus. Astfel, prezenta invenție prevede un anticorp specific sau un fragment de legare la antigen al acestuia, incluzând site-ul de legare la antigen al anticorpului uman, care concurează cu anticorpul de control OMS646 la legarea cu MASP-2 umană.

EXEMPLUL 43

Acest exemplu demonstrează, că anticorpii inhibitori al MASP-2 umană (OMS646) este abilit să inhibe la pacienții cu TMA inducerea apoptozei, mediate cu plasma, în celulele endoteliale microvasculare primare umane (MVEC) de origine dermică.

Fundal/actualitate.

- 5 Se știe, că fiziopatologia TMA include leziunea celulelor endoteliale, indusă de diferiți factori, după care urmează ocluzii ale vaselor mici (de exemplu, ale arteriolelor mici și capilarelor) cu dopuri de trombocite și/sau trombi de fibrină (Hirt-Minkowsk P. et al., Nefron Clin Pract 114: C219-C235, 2010; Goldberg RJ et al, Am J Kidney Dis 56 (6): 1168-1174, 2010). S-a demonstrat, că celulele endoteliale microvasculare (MVEC) sunt expuse unei leziuni apoptice la influența în vitro asupra lor a plasmelor pacienților cu tulburări asociate cu TMA (Stefanescu et al, Voi Blood 112 (2): 340-349, 2008; Mitra D. et al., Blood .. 89: 1224-1234, 1997). Leziunea apoptică asociată cu TMA a fost depistată în celulele endoteliale microvasculare (MVEC), obținute din bioplate tisulare (piele, oase, măduvă osoasă, splină, rinichi, ileon) ale unor astfel de pacienți. S-a relatat, de asemenea, că leziunile apoptice ale MVEC reduc nivelurile de proteine reglatoare ale complementului, legate cu membrane, în MVEC (de exemplu, Mold & Morris, Immunology 102: 359-364, 2001; Christmas et al., Immunology 119: 522, 2006).

- 20 Se consideră, că un ciclu de legătură inversă, care include componentele terminale ale complementului, este implicat în patofiziologia TMA, incluzând sindromul hemolitic-uremic atipic (aHUS), și TMA asociate cu sindromul antifosfolipidic catastrofal (CAPS), boala Degos și TMA asociate cu cancer, chimioterapie anticanceroasă, reacții autoimune și transplant, fiecare dintre aceste condiții fiind cunoscute sau considerate a fi receptivă la terapia anti-C5 cu utilizarea anticorpului monoclonal (mAb) eculizumab (Chapin J. et al., Brit J. Hematol 157: 772-774, 2012; Tsai et al., Br J Haematol 162 (4): 558-559, 2013); Magro C.M. et al., Journal of Rare Diseases 8: 185, 2013).

- 25 Următorul experiment a fost efectuat pentru a analiza abilitatea anticorpului inhibitor al MASP-2 umană (OMS646) de a bloca, la pacienții suferinzi de TMA, inducerea, mediată de plasma, a apoptozei în MVEC umane dermale în probele de plasmă obținute de la pacienți, care suferă de aHUS, de purpură trombocitopenică trombocică (TTP) asociată cu deficitul de ADAMTS13, de sindromul antifosfolipidic catastrofal (CAPS) și boala sistemică Degos, precum și de TMA asociate cu cancer, transplant, boli autoimune și chimioterapie.

Metode

- 35 S-a efectuat un studiu in vitro pentru a analiza eficacitatea unui anticorp inhibitor al MASP-2 (OMS646) de a bloca la pacienții cu TMA inducerea, mediată cu plasmă, a apoptozei în MVEC umane primare de origine dermică așa cum descrie Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2): 340-349, 2008, care este încorporat aici ca referință. Probele de plasma, utilizate în acest test, au fost obținute dintr-o colecție de plasma de la subiecți sănătoși de control și de la pacienți cu microangiopatii trombocitice în faza acută, sau în faza de convalescență. Prezența microangiopatiei la pacienții cu TMA s-a evaluat prin depistarea schistocitelor într-un frotiu de sange periferic. Mai mult decât atât, purpura trombocitopenică trombocică (TTP) s-a diagnosticat așa cum se descrie în publicația Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2): 340-349, 2008.

Cultura celulelor endoteliale (EC)

- 45 Cum se descrie în publicația Stefanescu et al., celulele endoteliale microvasculare umane primare (MVEC) umane primare de origine dermică au fost furnizate de ScienCell Research Labs (San Diego, CA). MVEC s-au exprimat cu CD34 utilizând pasajele 5 și 6 (Blood 89: 1224-1234, 1997). MVEC au fost menținute în flacoane de polistiren, acoperite cu 0,1% gelatină în apă, în mediu ECM1001 (ScienCell Research Labs), care conține supliment pentru creșterea celulelor endoteliale, penicilină, streptomycină și 15% ser bovin fetal. Toate MVEC au fost utilizate în pasajul 2 până la 6. Pasajele au inclus o expunere de 5 până la 10 minute acțiunii 0,25% tripsină-EDTA.

- 50 Testarea apoptozei

- 55 Celulele endoteliale microvasculare tipice (MVEC) umane primare de origine dermică, cunoscute a fi susceptibile la apoptoza, indusă cu plasma TTP/HUS, au fost spălate cu soluție fiziologică tamponată cu fosfat (PBS) și placate pe plăci cu 12 godeuri, acoperite cu 0,1% gelatină în apă la 0.15×10^6 celule viabile/ml. Celulele MVEC placate au fost menținute într-un mediu complet timp de 24 de ore, apoi erau expuse la diferite concentrații (2% până la 20% v/v) de probe de plasma de la pacienții cu TMA sau de plasmă de la donatori sănătoși timp de 18 ore în prezența sau absența anticorpului monoclonal (mAb) anti-MASP-2 (OMS646) (150 μ g / ml) și celulele au fost apoi colectate prin tratate cu tripsină. Fiecare probă de plasma de la pacient cu TMA a fost examinată în două experimente paralele. Gradul de apoptoză, mediată de plasmă, s-a evaluat prin

colorare cu iodură de propidiu (PI), analiza $>5 \times 10^3$ celule analizate într-un citofluorograf și după varfurile A0, determinate cu software de calculator (MCycle Av, Phoenix Flow Systems, San Diego, CA). S-a efectuat cuantificarea fragmentelor de ADN în lizatul de celule, legate cu histonul citoplasmatic, prin metoda ELISA, conform instrucțiunilor producătorului (Roche Diagnostics, Mannheim, Germania).

Rezultate

Rezultatele studiului apoptozei celulelor endoteliale microvasculare (MVEC), induse cu plasma de la pacientul cu TMA, în prezența anticorpului monoclonal (mAb) anti-MASP-2 (OMS646) sunt prezentate în tabelul 25.

Plasma pacientului cu TMA, expusă pe MVEC umane primare de origine dermică în prezența anticorpului monoclonal (mAb) anti-MASP-2 (OMS646)

Tabelul 25

Subiectul #	Vârsta/sex	Diagnosticul clinic (TMA) și alte stări	MAASP-2 ng/ml	Diagnosticul pe bază de Cre/LDH	C5a	sC5-b9	Activitatea ADAMS	Diagnosticul pe bază de activitate a ADAMS	Protecția cu OMS646
#2	41/f	TTP	174	TTP	34,42	772	30%	aHUS	efect
#3	52/f	TTP	150	TTP	48,32	1399	70%	aHUS	fără efect
#4	20/m	TTP	224	TTP	36,9	1187	<10%	TTP	efect
#10	60/f	TTP	175,4	TTP	49,5	4406	64%	aHUS	fără efect
#11	59/f	TTP	144,9	TTP	40,3	1352	<10%	TTP	fără efect
#13	49/f	HUS, Cancer, TTP	142,8	TTP	48,6	3843	86%	aHUS	fără efect
#42	27/m	TTP	341,5	TTP	100,0	5332	<5%	TTP	fără efect
#46	25/f	TTP, Degos, SLE	225,11	TTP	53,9	3426	ND	ND	efect
#48	53/f	TTP, SLE, nefrită post-transplant renal	788,5	aHUS	31,2	1066	66%	aHUS	efect
#49	64/f	TTP, APLAs, CVA	494,5		35,4	2100	ND	ND	efect
#51	25/f	aHUS, APLAs	313,1	TTP	26,8	1595	23%	aHUS	efect
#52	56/f	aHUS, SLE	333,1	TTP	18,9	1103	97%	aHUS	fără efect
#53	56/f	aHUS remisiune	189,9	TTP remisiune	28,69	344	74%	aHUS	fără efect

Abrevieri utilizate în tabelul 25:

“APLAs” = anticorpi antifosfolipidici, asociați cu sindromul antifosfolipidic catastrofal (CAPS).

“SLE” = lupus eritematos sistemic

“CVA” = accident cerebrovascular (insult)

În conformitate cu rezultatele, prezentate în publicația Stefanescu R. et al, Blood Vol 112 (2). 340-349, 2008, se observa apoptoză semnificativă în MVEC primare de origine dermică în prezența a treisprezece probe de plasmă de la pacienți cu TMA în absența anticorpului anti-MASP-

2. În verificările, realizate în paralel, ale probelor de plasmă de la oameni sănătoși s-a constatat absența apoptozei în MVEC (datele nu sunt prezentate). După cum se arată în Tabelul 25, anticorpul monoclonal (mAb) inhibitor al MASP-2 (OMS646) a inhibat apoptoza în MVEC primare, mediată de plasma de la pacienții cu TMA ("Efect" în Tabelul 25) în 6 din cele 13 probe de plasmă de la pacienți testate (46%). În particular, este necesar de menționat, că anticorpul monoclonal (mAb) inhibitor al MASP-2 (OMS646) a inhibat apoptoza în plasma, obținută de la pacienții care suferă de aHUS, TTP, boala Degos, LES, transplant și APLAs (CAPS). Având în vedere, că în șapte probe de plasmă de la pacienții, examinați în acest studiu, anticorpul monoclonal (mAb) anti-MASP-2 nu a blocat apoptoza („fără efect” în Tabelul 25), se cere menționat, că apoptoza poate fi indusă prin mai multe căi, nu toate din care sunt dependente de complement. De exemplu, așa cum se menționează în publicația Stefanescu R. et al., Blood Vol 112 (2): 340-349, 2008, apoptoza într-un test cu celule endoteliale (EC) depinde starea bazală a activării EC, asupra cărora influențează factorii plasmatici, care pot avea un oarecare rol în determinarea nivelului de deteriorare, necesar pentru inducerea apoptozei. Așa cum s-a menționat în continuare de către Stefanescu R. et al., în plasma pacienților cu TMA pot fi prezenți factori adiționali, abili să moduleze apoptoza, cum ar fi citokinele și diverse componente ale sistemului complementului. Prin urmare, datorită acestor factori care complică, nu este surprinzător acel fapt, că anticorpul anti-MASP-2 nu exercită efect de blocare în toate probele de plasma, care au prezentat apoptoză, indusă de plasma de la pacienții cu TMA.

În plus, în această privință, se poate menționa faptul, că s-a realizat o cercetare similară a apoptozei, induse de plasma de la pacienți cu TMA, în prezența anticorpului antiC5 – eculizumab, și s-au obținut rezultate foarte asemănătoare (Chapin et al, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts): Abstract # 3342, 120: 2012). Eficacitatea clinică a eculizumabului, unui produs comercial de mare succes, s-a dovedit a fi mai mare, decât eficacitatea prezentată în acest model, ceea ce permite de a presupune, că în acest model in vitro poate fi subapreciată eficiența medicamentelor, care inhibă complementul.

Aceste rezultate demonstrează, că un anticorp inhibitor al MASP-2, cum ar fi OMS646, eficient inhibă apoptoza, indusă de plasma de la pacienți care suferă de o TMA, cum ar fi aHUS, TTP, boala Degos, LES, transplant și APLAs (CAPS). Este cunoscut faptul, că leziuni endoteliale și apoptoza joacă un rol-cheie în patologia TMA, cum ar fi TTP idiopatică și HUS sporadic (Kim et al, Microvascular Research vol 62 (2): 83-93, 2001). Așa cum se descrie în publicația Dang et al., Blood 93 (4) : 1264-1270, 1999, apoptoza se depistează în pulpa roșie splenică a pacienților cu TTP, dar nu la subiecții sănătoși de control. Dovada apoptozei se depista, de asemenea, în celulele glomerulare renale de origine MVEC la un pacient cu HUS (Arends M. J. et al., Hum Pathol 20:89, 1989). Prin urmare, se poate presupune, ca administrarea unui agent inhibitor al MASP-2, cum ar fi un anticorp inhibitor al MASP-2 (de exemplu, OMS646), va fi o terapie eficientă pentru pacienții care suferă de TMA, cum ar fi aHUS, TTP, sau alte tulburări microangiopatice, cum ar fi o altă formă de TMA, inclusiv CAPS, boala sistemică Degos și TMA asociată cu cancer; TMA asociată cu chimioterapie sau TMA asociată transplantului.

În acest context, într-o variantă de realizare, invenția prevede o metodă de inhibare a leziunii celulelor endoteliale și/sau a apoptozei celulelor endoteliale și/sau a formării trombilor la un subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a microangiopatiei trombotice (TMA), cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții conținând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 eficientă pentru inhibarea activării complementului dependentă de MASP-2. Într-o variantă de realizare, TMA se selectează din grupa constând din sindrom hemolitic uremic atipic (aHUS), purpură trombocitopenică trombotică (TTP) și sindrom hemolitic uremic (HUS). Într-o variantă de realizare, TMA este aHUS. Într-o variantă de realizare, compoziția se administrează unui pacient cu aHUS în timpul fazei acute a bolii. Într-o variantă de realizare, compoziția se administrează la un pacient cu aHUS în timpul fazei de remisiune (adică la un subiect, care a fost recuperat sau parțial recuperat după un episod de fază acută aHUS, o astfel de remisiune confirmată, de exemplu, prin creșterea numărului de trombocite și/sau reducerea conținutului de LDH în ser (Loirat C et al., Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, incorporat aici ca referință).

Într-o variantă de realizare, subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a unei TMA care este (i) TMA asociată cu cancerul; (ii) TMA asociată cu chimioterapie sau (iii) TMA asociată cu transplant (de exemplu, transplant de organe, cum ar fi transplant de rinichi sau transplant de celule stem hematopoietice alogene). Într-o variantă de realizare, subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a sindromului Upshaw-Schulman (USS). Într-o variantă de realizare, subiectul suferă

sau prezintă risc de dezvoltare a bolii Degos. Într-o variantă de realizare, subiectul suferă sau prezintă risc de dezvoltare a sindromului antifosfolipidic catastrofal (CAPS).

In conformitate cu oricare dintre variantele de realizare prezentate aici, anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 umană cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorp menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman cu o valoare IC_{50} de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat inhibă depunerea C3b în 90% ser uman cu o valoare IC_{50} de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp, selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab) 2 și F(ab') 2, în care anticorpul menționat reprezintă o moleculă monocatenară, în care anticorpul menționat reprezintă o moleculă de IgG2, în care anticorpul menționat reprezintă o moleculă de IgG1, în care anticorpul menționat reprezintă o moleculă de IgG4, în care molecula de IgG4 cuprinde o mutație S228P și/sau în care anticorpul practic nu inhibă calea clasică. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă cu MASP-2 și în mod selectiv inhibă calea lectinei și practic nu inhibă calea alternativă. Într-o variantă de realizare, anticorpul se leagă cu MASP-2 și în mod selectiv inhibă calea lectinei și practic nu inhibă calea clasică (adică, inhibă calea lectinei, lăsând intactă calea clasică).

Intr-o variantă de realizare, anticorpul inhibitor MASP-2 inhibă apoptoza celulelor endoteliale microvasculare (MVEC), indusă de plasma, în serul de la un subiect care suferă de TMA, cum ar fi aHUS (în faza acută sau în faza de remisiune), sindromul hemolitic uremic (HUS), purpura trombocitopenică trombotică (TTP), TMA asociată cu cancerul; TMA asociată cu chimioterapia; TMA asociată cu transplant (de exemplu, transplant de organe, cum ar fi transplant de rinichi sau transplant de celule stem hematopoietice alogene sau în serul de la un subiect care suferă de sindromul Upshaw-Schulman (USS) sau în serul de la un subiect care suferă de boala Degos, sau în serul subiectului care suferă de sindrom antifosfolipidic catastrofal (CAPS), în care apoptoza MVEC, indusă de plasma, este inhibată cel puțin de 5%, de exemplu, cel puțin de 10%, de exemplu, cel puțin de 20%, de exemplu, cel puțin de 30%, de exemplu, cel puțin de 40%, de exemplu, cel puțin de 50%, de exemplu, cel puțin de 60%, de exemplu, cel puțin de 70%, de exemplu, cel puțin de 80%, de exemplu, cel puțin de 85%, de exemplu, cel puțin de 90%, de exemplu, cel puțin de 95% până la 99%, comparativ cu serul netratat cu anticorp. În unele variante de realizare, anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă formarea de trombi în serul de la un subiect care suferă de TMA (de exemplu, cum ar fi aHUS (în faza acută sau în faza de remisiune), sindromul hemolitic uremic (HUS), purpura trombocitopenică trombotică, TMA asociată cu cancerul; TMA asociată cu chimioterapia; TMA asociată cu transplant (de exemplu, transplant de organe, cum ar fi transplant de rinichi sau transplant de celule stem hematopoietice alogene sau în serul de la un subiect care suferă de sindromul Upshaw-Schulman (USS) sau în serul de la un subiect care suferă de boala Degos, sau în serul subiectului care suferă de sindrom antifosfolipidic catastrofal (CAPS) la un nivel cel puțin de 20% mai înalt (de exemplu, cel puțin de 30% mai înalt, cel puțin de 40% mai înalt sau cel puțin de 50% mai înalt) decât efectul său inhibitor asupra depunerii C5b-9 în serul sangvin.

Intr-o variantă de realizare anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează subiectului printr-un cateter intravenos sau printr-o altă metodă de livrare prin cateter.

Intr-o variantă de realizare, prezenta invenție prevede o metodă de inhibare a formării trombilor la un subiect, care suferă de TMA (de exemplu, aHUS (în faza acută sau în faza de remisiune), sindromul hemolitic uremic (HUS), purpura trombocitopenică trombotică (TTP), TMA asociată cancerului; TMA asociată chimioterapiei; TMA asociată transplantului (de exemplu, transplantului de organe, cum ar fi transplantul de rinichi sau transplantul de celule stem hematopoietice alogene, sau în serul de la un subiect care suferă de sindromul Upshaw-Schulman (USS) sau în serul de la un subiect care suferă de boala Degos, sau în serul subiectului care suferă de sindrom antifosfolipidic catastrofal (CAPS), care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții, care conține o cantitate de anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment de legare la antigen al acestuia, care include (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și (b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 89-97 din SECV ID NR: 70 sau varianta (II) a acestuia, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de

91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70).

Intr-o variantă de realizare, subiectul suferind de TMA se selectează din grupa constând din TMA asociată cancerului; TMA asociată chimioterapiei; TMA asociată transplantului (de exemplu, transplantului de organe (cum ar fi transplantul de rinichi sau transplantul de celule stem hematopoietice alogene), sindromul Upshaw-Schulman (USS), boala Degos sau sindromul antifosfolipidic catastrofal (CAPS).

În unele variante de realizare, metoda cuprinde administrarea la un subiect a unei compoziții care conține o cantitate de anticorp inhibitor al MASP-2 sau de un fragment de legare la antigen al acestuia, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu care cuprinde o secvență de aminoacizi notată ca secvență SEQ ID NO: 67. În unele variante de realizare, metoda cuprinde administrarea la un subiect a unei compoziții care conține o cantitate de anticorp inhibitor al MASP-2 sau de un fragment de legare la antigen al acestuia, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor cu secvența de aminoacizi notată ca secvență SEQ ID NO: 70.

În unele variante de realizare, metoda cuprinde administrarea la un subiect a unei compoziții care conține un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de un fragment de legare la antigen al acestuia, care recunoșc în mod specific cel puțin de o parte din epitop pe MASP-2 umană, recunoscut de anticorpul de control OMS646, care cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu, notată ca secvență SEQ ID NO: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, denumită secvență SEQ ID NO: 70.

EXEMPLUL 44

Acest exemplu descrie rezultatele inițiale ale unui studiu clinic în faza 2 în scopul de a evalua inofensivitatea și eficiența anticorpului monoclonal complet uman, care inhibă MASP-2 la pacienții adulți cu microangiopatii trombotice (TMA).

Fundal

TMA sunt o familie de tulburări rare, extenuante și care pun viața în pericol, caracterizate prin formare excesivă de trombi (cheagurilor) – agregate plachetare - în microcirculația organelor corpului, de obicei în rinichi și în creier.

Metode

Prima etapă a unui studiu clinic deschis a fazei 2 s-a efectuat la pacienții cu sindrom hemolitic uremic primar atipic (aHUS), cu aHUS rezistent la terapia cu plasmă și cu purpură trombocitopenică trombotică (TTP). În acest studiu clinic al fazei 2 nu s-a folosit placebo, având în vedere caracterul bolii periculos pentru viață.

S-a aplicat screeningul la subiecții de vârstă ≥ 18 , fiind incluși în acest studiu doar acei subiecți, la care a fost diagnosticată una din TMA următoare:

1) aHUS primar, diagnosticat clinic și având activitatea ADAMTS13 $> 10\%$ în plasmă. Potrivii sunt pacienții cu sau fără o mutație documentată în complement sau cu prezența anticorpilor anti-CFH. Pacienții sunt clasificați în funcție de răspunsul lor la terapia cu plasmă (schimb de plasmă sau perfuzie cu plasmă):

- pacienții cu rezistență la terapie cu plasmă, în scopul acestui studiu, satisfac toate condițiile următoare:

(a) screening-ul numărului de trombocite $< 150,000/\mu\text{l}$, în pofida faptului, că până la screening s-au realizat patru proceduri de terapie cu plasmă;

(b) confirmarea hemolizei microangiopatice (prezența schistocitelor, conținutul de lactatdehidrogenază (LDH) în ser depășind limita superioară a normei (ULN), haptoglobina $< \text{LLN}$); și

(c) conținutul de creatinină $> \text{ULN}$.

- pacienții cu aHUS, care au răspuns la terapia îndelungată cu plasmă (sensibili la terapia cu plasmă), care pot avea nevoie, cel puțin de o dată pe săptămână, de terapie cu plasmă timp de patru săptămâni înainte de administrarea primei doze de OMS646 în prezența unui conținut de creatinină serică $> \text{ULN}$.

2) TTP sunt definite ca având toate caracteristicile următoare:

- numărul de trombocite $< 150,000/\mu\text{l}$;

- confirmarea hemolizei microangiopatice (prezența schistocitelor, conținutul de lactatdehidrogenază (LDH) în ser depășind limita superioară a normei (ULN), haptoglobina $< \text{LLN}$);

- activitatea ADAMTS13 $\pm 10\%$ în timpul episodului actual de TTP sau permanent.

Notă: subiecții erau excluși din studiu dacă au administrat tratament cu eculizumab timp de trei luni înainte de screening. Criteriile pentru un pacient, clasificat ca rezistent la terapia cu plasma, au fost folosite în scopul determinării posibilității participării lui în acest studiu. În alte aspecte ale invenției, un pacient rezistent la terapia cu plasma, care urma să fie tratat cu un inhibitor al MASP-2, era tratat anterior cu terapie cu plasmă cel puțin de o dată și după un asemenea tratament cu terapie cu plasmă la el se detecta unul sau mai mulți markeri clinici ai aHUS, care nu s-au redus adecvat sau nu au fost eliminați în rezultatul unei astfel de terapii cu plasmă.

Anticorpus monoclonal, utilizat în acest studiu, OMS646, este un anticorp monoclonal complet uman IgG4 anti-MASP-2 umană. Așa cum s-a demonstrat în exemplul 40, OMS646 se leagă avid cu MASP-2 recombinantă (cu constanta de disociere aparentă de echilibru în intervalul de 100 μ M) și prezintă o selectivitate de 5000 de ori mai înaltă, comparative cu legarea cu proteinele omoloage C1s, C1r și MASP-1. În studiile funcționale, OMS646 inhibă calea lectinei la om cu o activitate în concentrații cu interval nanomolar (concentrație, care conduce la 50% inhibare [IC₅₀] de aproximativ 3 nM), dar nu are nici un efect semnificativ asupra căii clasice. Administrarea intravenoasă (IV) sau subcutanată (SC) a OMS646 la șoareci, la primat și la oameni a condus la concentrații plasmatice înalte, care au fost asociate cu suprimarea activării căii lectinei într-un test *ex vivo*. Așa cum se descrie suplimentar în exemplul 42, administrarea OMS646 a redus depunerea C5b-9 și formarea trombilor în modelele experimentale de TMA și de formare a trombilor *in vitro* pe șoareci, demonstrând astfel posibilitatea utilizării terapeutice a OMS646.

În acest studiu, substanța medicamentoasă OMS646 s-a preparat în concentrație de 100 mg / ml, care apoi a fost diluată în cazul administrării intravenoase. Volumul calculat corespunzător de soluție OMS646 100 mg / ml pentru injecții se extrăgea din flacon cu o seringă pentru prepararea dozei. Sacul de perfuzie se folosea timp de patru ore după preparare.

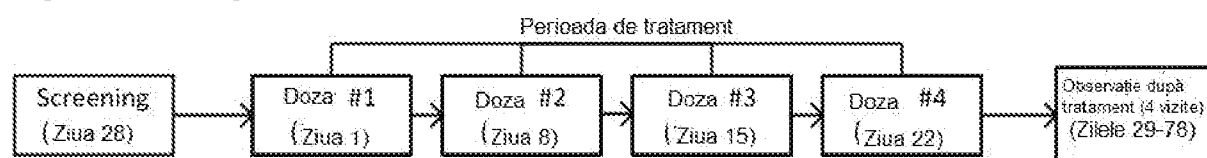
În etapa 1 a studiului, OMS646 s-a administrat în doze crescând în grupe, fiecare din care conținea trei pacienți. Fiecare subiect în Etapa 1 a primit patru doze de OMS646, câte o doză în fiecare săptămână, după cum se arată în Tabelul 26.

Schema de dozare în Etapa 1

Tabelul 26

Etapa 1, grupa	Numărul subiecților	Doza de OMS646 (mg/kg)
1, Grupa 1	3	0.675, o dată pe săptămână x 4
1, Grupa 2	3	2.0, o dată pe săptămână x 4
1, Grupa 3	3	4.0, o dată pe săptămână x 4

Etapa 1 Schema designului studiului



Substanța medicamentoasă diluată testată s-a administrat intravenos timp de 30 min.

Punctele finale inițiale.

Puncte finale primare adiționale au fost:

· inofensivitatea, care se apreciază după efectele adverse (AE), indicatorii principali ai stării organismului, ECG și rezultatele examenului clinic și de laborator

· activitatea clinică, determinate după modificarea numărului de trombocite

Punctele finale secundare

Punctele finale secundare au fost:

· activitatea clinică a TMA

- LDH serică

- haptoglobina serică

- hemoglobina

- creatinina serică

- simptomele asociate TMA

- necesitatea terapiei cu plasmă (de substituie a plasmei sau perfuzii de plasmă)

- necesitatea dializei.

Terapii concomitente permise

· aHUS rezistent la terapia cu plasmă – terapia cu plasma în cadrul terapiei cu OMS646 se permitea în cazul, în care investigatorul considera, că este indicată din punct de vedere medical.

· aHUS susceptibil la terapia îndelungată cu plasma – investigatorilor le-a fost recomandat de a continua terapia cu plasmă până când nu vor apărea semne de ameliorare a TMA, de exemplu, creșterea numărului de trombocite, reducerea LDH, creșterea haptoglobinei, creșterea hemoglobinei, reducerea creatininei, după care investigatorului i-a fost recomandat să examineze

5 posibilitatea sistării terapiei cu plasma și să monitorizeze permanent parametrii TMA pentru evaluarea posibilității suspendării terapiei cu plasmă.

·TTP – utilizarea terapiei cu plasma era permisă în cazul, în care investigatorul considera, că este indicată din punct de vedere medical,

10 · investigatorilor le-a fost recomandată utilizarea hemodializei în conformitate cu standardul tratamentului,

· ecilizumab în timpul studiului nu s-a administrat.

Rezultate

Prima grupă de subiecți a constat din trei pacienți cu aHUS, tratați cu cea mai mică doză de OMS646. S-au observat îmbunătățiri în marcherii TMA la toți pacienții din această grupă de

15 studiu. În calitate de marcheri ai activității bolii s-a determinat cantitatea de trombocite, conținutul de lactatdehidrogenază serică (LDH) și de haptoglobină serică. În comparație cu nivelurile inițiale, numărul de trombocite s-a îmbunătățit la toți pacienții. Nivelurile de LDH serică au rămas normale la un pacient, s-au redus semnificativ până la aproape de intervalul normal la un alt pacient și au rămas ridicate la al treilea pacient. Haptoglobina s-a îmbunătățit la doi pacienți, normalizându-se la

20 un singur pacient. Nivelurile de creatinină la un singur pacient cu funcție renală independent, de asemenea, s-au îmbunătățit.

Conform schemei studiului, trei pacienți din a doua grupă a acestui studiu clinic au fost tratați cu o doză medie. Doi pacienți cu aHUS și un pacient cu purpură trombocitopenică trombocică (TTP) prezentau rezistență la terapia cu plasmă. La ambii pacienți cu aHUS s-a aplicat dializă

25 renală până la și în cadrul studiului. În grupa a doua sau în grupa cu doză medie pacienții cu aHUS cu rezistență la terapia cu plasmă s-au caracterizat prin:

- creșterea cu 47% a numărului mediu de trombocite, ceea ce a condus la aceea, că ambii pacienți aveau un număr de trombocite în intervalul valorilor normale
- reducerea cu 86% a numărului mediu de schizocite, cu dispariția schistocitelor la un pacient

30

- creșterea cu 71% a nivelului mediu de haptoglobină, la doi pacienți atingând intervalul normal în timpul tratamentului, la un pacient o coborâre puțin sub nivelul normal la o săptămână după administrarea ultimei doze
- reducerea cu 5% a nivelurilor medii de LDH, nivelurile la doi pacienți rămânând ușor ridicate peste intervalul normal.

35 Pacientul cu TTP din grupa cu doză medie a necesitat repetarea perfuziei cu plasmă înainte de intrarea în studiu. Parametrii de laborator nu au prezentat o îmbunătățire consecventă, dar în timpul tratamentului cu OMS646, precum și la momentul finalizării tratamentului, pacientul nu a necesitat utilizarea terapiei cu plasmă.

Medicamentul a fost bine tolerat de toți pacienții pe toată perioada tratamentului. Pe baza datelor pozitive din grupa a doua sau grupa cu doză medie, a fost inițiat studiul în a treia grupă sau

40 grupa cu doză mare, iar examenul pacientului cu aHUS au fost deja finalizate. Datele, care se referă la toți pacienții, includ măsurări timp de o săptămână după administrarea ultimei doze.

S-a finalizat, de asemenea, tratamentul cu OMS646 al primului pacient din grupa a treia (în grupa cu doză mare), al pacientului cu aHUS rezistent la terapia cu plasmă, cu complicații suplimentare, incluzând hepatita C, crioglobulinemia și limfomul. Până la tratamentul cu OMS646

45 pacientul avea nevoie de dializă repetată. În timpul tratamentului și după finalizarea tratamentului cu OMS646 și până în prezent pacientul nu a necesitat dializă. Parametrii hematologici și renali au arătat:

- îmbunătățire cu 63% a numărului de trombocite, revenind la niveluri normale,

50

- reducerea cu 100% a schistocitelor,
- haptoglobina a crescut de la un nivel nedetectabil și s-a normalizat,
- reducerea cu 43% a LDH, rezultând cu un nivel puțin mai mare, decât cel normal,
- reducerea cu 24% a nivelului creatininei.

Atât în prima, cât și în a doua grupă medicamentul a fost bine tolerat.

55 Primul punct final în acest studiu clinic deschis al fazei 2 a fost modificarea numărului de trombocite. Numărul de trombocite la toți trei pacienți cu aHUS în grupele cu doză medie și mare (doi pacienți în grupa cu doză medie și un pacient în grupa cu doză mare) a revenit la normal, cu o

creștere medie statistic concludentă, față de valoarea inițială, de aproximativ 68000 trombocite/ml ($p = 0,0055$).

Astfel, datele obținute înainte de faza 2 a acestui studiu clinic, demonstrează eficiența OMS646 la pacienții cu aHUS primar aHUS, la pacienții cu aHUS rezistent la terapia cu plasma, și la pacienții cu TTP.

În conformitate cu cele de mai sus, într-o variantă de realizare, invenția propune o metodă de tratare a unui subiect, care suferă de aHUS rezistent la terapia cu plasma, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții, care conține o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependent de MASP-2. În unele variante de realizare, metoda cuprinde suplimentar în etapă identificarea subiectului, care suferă de aHUS rezistent la terapia cu plasmă, înainte de administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2.

În conformitate cu oricare dintre variantele de realizare prezentate aici, anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 uman cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC_{50} de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC_{50} de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', $F(ab)^2$ și $F(ab')^2$, în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și practic nu inhibă calea clasică (adică inhibă calea lectinei, lăsând intactă calea clasică a complementului).

Într-o variantă de realizare a invenției anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează într-o cantitate eficientă pentru ameliorarea, cel puțin de a unui sau mai multor parametri clinici, asociați cu aHUS, cum ar fi creșterea numărului de trombocite, reducerea nivelului de LDH, creșterea haptoglobinei, creșterea hemoglobinei și/sau reducerea creatininei.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect care suferă de aHUS, rezistent la terapia cu plasma, printr-un cateter (de exemplu, intravenos) pentru o primă perioadă de timp (de exemplu, în faza acută care durează cel puțin de o zi până la o săptămână sau două săptămâni), urmată de administrarea subcutanată a unui agent inhibitor al MASP-2 pentru a doua perioadă de timp (de exemplu, pentru o perioadă îndelungată de timp cel puțin de două săptămâni sau mai mult). În unele exemple de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp se realizează în absența plasmeferezei. În unele variante de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp se realizează în prezența plasmeferezei.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect care suferă de aHUS, rezistent la terapia cu plasmă, fie intravenos, intramuscular, fie, preponderant, subcutanat. Tratamentul poate fi de lungă durată și se poate administra de la o dată pe zi până la o dată pe lună, dar, preponderant, se administrează o dată la două săptămâni. Anticorpul anti-MASP-2 poate fi administrat în monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

Într-o variantă de realizare metoda include tratarea unui subiect care suferă de aHUS, rezistent la terapia cu plasmă, care cuprinde administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acestuia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin

de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SECV ID NR: 70.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 umană recunoscută de anticorpul de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

EXEMPLUL 45

Acest exemplu descrie rezultatele adiționale ale studiului clinic realizat în faza 2 în scopul evaluării inofensivității și eficienței clinice a anticorpului monoclonal uman complet inhibitor al MASP-2 la pacienții adulți cu microangiopatii trombotice (TMA), descrise în Exemplul 44.

Fundal

Cum se descrie în Exemplul 44, TMA sunt o familie de tulburări rare, extenuante și care pun viața în pericol, caracterizate prin formare excesivă de trombi (cheagurilor) – agregate plachetare - în microcirculația organelor corpului, de obicei în rinichi și în creier. Așa cum se descrie aici, TMA asociate transplantului (TA-TMA) reprezintă un sindrom foarte periculos, care poate să apară la pacienții cu transplant, cum ar fi transplantul de celule stem hematopoietice (HSCT).

Acest exemplu descrie rezultatele inițiale ale studiului clinic al fazei 2 pentru a evalua inofensivitatea și eficiența clinică a unui anticorp monoclonal uman complet inhibitor al MASP-2 la un pacient, care suferă de TMA asociate cu transplant de celule stem hematopoietice.

Metode

Cum se descrie în exemplul 44, studiul TMA în faza 2 constă din etapa de trei niveluri de dozare, urmată de o etapă de dozare fixă a anticorpului inhibitor al MASP-2 - OMS646. Așa cum se descrie adițional în exemplul 44, rezultate pozitive și stabile au fost obținute în cazul pacienților cu aHUS și la un pacient cu TTP. La fel, ca și în grupa cu doză mică, OMS646 a fost bine tolerat de toți pacienții din grupele cu doze medii și mari pe toată perioada de tratament. Studiile preclinice ale toxicității au fost finalizate și nu s-au demonstrat oarecare probleme privind inofensivitatea utilizării acestui anticorp, ceea ce a permis o administrare de lungă durată în cadrul studiilor clinice.

Cum se descrie în Exemplul 44, au fost obținute date unui studiu clinic al fazei 2 OMS646 în cazul TMA pentru pacienții cu aHUS și TTP. S-a finalizat dozarea pentru un pacient cu TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice în grupa cu doză mare, folosind metodele, descrise în exemplul 44. Acest pacient avea un istoric de limfom, pentru care a suferit un transplant de celule stem hematopoietice. Evoluția post-transplant a fost agravată de o serie de tulburări, care amenințau viața, inclusiv și TMA, care necesita transfuzie de trombocite. În pofida transfuziilor, persista TMA asociată cu transplantul de celule stem și pacientul a fost inclus în studiul în fază 2 a anticorpului OMS646.

Rezultate

După o perioadă de dozare de patru săptămâni (grupa cu doză mare), cum se descrie în Exemplul 44, pacientul cu TMA asociată cu transplant de celule stem se caracteriza prin:

- creșterea numărului de trombocite de patru ori, rezultând cu un număr de trombocite depășind 100.000;
- creșterea dublă a nivelului de haptoglobină și s-a normalizat;
- reducerea nivelului de lactatdehidrogenază plasmatică, un indicator al leziunilor în vasele sanguine, cu 35%, dar depășind încă nivelul normal;
- depistarea doar a unor șistocite solitare.

În toată perioada de dozare a OMS646 și după finalizarea tratamentului cu OMS646, pacientul nu a necesitat transfuzii de trombocite sau aplicarea plasmeferezei.

Astfel, datele, obținute în faza 2 a acestui studiu clinic (cum se descrie în Exemplul 44 și în acest exemplu), demonstrează eficiența OMS646 la pacienții cu aHUS primar, la pacienții cu aHUS, rezistenți la terapia cu plasmă, la pacienții cu TTP și la un pacient cu TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice.

În conformitate cu cele menționate, într-o variantă de realizare, invenția propune o metodă de tratare a unui subiect uman, care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem

hematopoietice, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții conținând o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependentă de MASP-2. Într-o variantă de realizare, subiectul suferă de TMA asociată transplantului de celule stem hematopoietice, rezistentă la tratamentul cu transfuzii de trombocite și/sau plasmefereză. Într-o variantă de realizare, metoda prevede în continuare identificarea unui subiect uman, care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, care este rezistentă la tratamentul cu transfuzii de trombocite și/sau plasmefereză până la etapa de administrare la subiect a unei compoziții conținând o cantitate de anticorp inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependentă de MASP-2.

- 10 In conformitate cu oricare dintre variantele de realizare prezentate aici, anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 uman cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC₅₀ de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC₅₀ de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab)² și F(ab')², în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și practic nu inhibă calea clasică (adică inhibă calea lectinei, lăsând intactă calea clasică a complementului).

- 20 Într-o variantă de realizare a invenției anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează într-o cantitate eficientă pentru ameliorarea, cel puțin de a unui sau mai multor parametri clinici în TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, cum ar fi creșterea numărului de trombocite (de exemplu, cel puțin de două ori, cel puțin de trei ori, cel puțin de patru ori, comparative cu numărul de trombocite până la tratament), creșterea haptoglobinei și/sau reducerea nivelului de LDH.

- 25 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice printr-un cateter (de exemplu, intravenos) pentru o primă perioadă de timp (de exemplu, în faza acută care durează cel puțin de o zi până la o săptămână sau două săptămâni), urmată de administrarea subcutanată a unui agent inhibitor al MASP-2 pentru a doua perioadă de timp (de exemplu, pentru o perioadă îndelungată de timp cel puțin de două săptămâni sau mai mult). În unele exemple de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp se realizează în absența plasmeferezei. În unele variante de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp se realizează în prezența plasmeferezei.

- 30 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect, care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, fie intravenos, intramuscular, fie, preponderant, subcutanat. Tratamentul poate fi de lungă durată și se poate administra de la o dată pe zi până la o dată pe lună, dar, preponderant, se administrează o dată la două săptămâni. Anticorpul anti-MASP-2 poate fi administrat în monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

- 45 Într-o variantă de realizare metoda include tratarea unui subiect, care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând (I) (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o variantă a acestuia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70).

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SECV ID NR: 70.

În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 umană recunoscută de anticorpul de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

EXEMPLUL 46

Acest exemplu descrie rezultatele adiționale ale studiului clinic realizat în faza 2 în scopul evaluării inofensivității și eficienței clinice a anticorpului monoclonal uman complet inhibitor al MASP-2 la pacienții adulți cu microangiopatii trombotice (TMA), descrise în Exemplul 44 și 45.

Fundal: Cum se descrie în Exemplul 45, TMA (TA-TMA) asociate transplantului reprezintă un sindrom foarte periculos, care poate să apară la pacienții cu transplant, cum ar fi recipienții transplantului de celule stem hematopoietice (HSCT). TMA asociată transplantului de celule stem hematopoietice (HSCT-TMA), reprezintă o complicație care pune viața în pericol și care este declanșată de leziunile endoteliale. Rinichiul este organul cel mai frecvent afectat, deși HSCT-TMA poate reprezenta o boală sistemică, în care se afectează, de asemenea, plămânii, intestinul, inima și creier. Apariția chiar a unei TMA ușoare se asociază cu insuficiență renală îndelungată. Dezvoltarea TMA asociate cu HSCT post-alogene diferă după frecvența apariției, în funcție de diferite criterii de diagnosticare și scheme de prevenire a respingerii transplantului în organismul gazdă, totodată inhibitorii de calcineurină fiind mai frecvent implicate în apariția TMA asociate cu HSCT (Ho VT et al., Biol Blood Marrow Transplant, 11 (8): 571-5, 2005). Modificarea regimului de dozare a inhibitorului imunosupresiv al calcineurinei poate avea ca rezultat îmbunătățirea TMA la unii pacienți în decurs de câteva săptămâni de la sistarea sau suspendarea administrării inhibitorului de calcineurină.

TMA este o complicație, care poate pune viața în pericol prin complicații în HSCT și în prezent tactica tratamentului se bazează, în mare măsură, pe reducerea acțiunii factorilor de inducere, incluzând excluderea administrării agenților imunosupresori (de exemplu, inhibitorilor calcineurinei) și tratamentul infecțiilor în curs de desfășurare, precum și tratamentul de susținere, cum ar fi hemodializa. Deși mulți pacienți cu HSCT-TMA răspund bine la reducerea sau întreruperea administrării agenților imunosupresori, există un subgrup de pacienți cu HSCT-TMA persistentă, în pofida metodelor conservative de tratament (adică TMA nu a răspuns la reducerea sau la întreruperea administrării imunosupresivelor). Pacienții, care nu răspund la aceste metode conservative de tratament au prognostic nefavorabil. Schimbul de plasmă nu a demonstrat eficacitate și nici o altă terapie nu a fost aprobată.

Exemplul 45 descrie rezultatele pozitive inițiale ale studiului clinic în fază 2 pentru a evalua inofensivitatea și eficiența clinică a unui anticorp monoclonal uman complet inhibitor al MASP-2 (OMS646) la un pacient, care suferă de TMA persistente asociate cu transplant de celule stem hematopoietice (HSCT-TMA). Acest exemplu descrie rezultatele suplimentare ale studiului clinic în faza 2 în curs de desfășurare pentru a evalua inofensivitatea și eficiența clinică a OMS646 la trei subiecți suplimentari, care suferă de HSCT-TMA persistentă, rezistenți la măsurile de tratament conservative.

Metode

Cum se descrie în exemplul 44, studiul TMA în faza 2 constă din etapa de trei niveluri de dozare, urmată de o etapă de dozare fixă a anticorpului inhibitor al MASP-2 - OMS646. OMS646 a fost bine tolerat de toți pacienții din grupele cu doze mici, medii și mari pe toată perioada de tratament. Studiile preclinice ale toxicității au fost finalizate și nu s-au demonstrat oarecare probleme privind inofensivitatea utilizării acestui anticorp, ceea ce a permis o administrare de lungă durată în cadrul studiilor clinice.

În studiul TMA în faza 2 au luat parte subiecții, care suferă de TMA persistentă asociată cu HSCT, rezistenți la măsurile de tratament conservative, care este definită în scopurile acestui studiu, ca având toți parametrii, prezentați în continuare, cel puțin de peste două săptămâni după sistarea sau întreruperea tratamentului cu agent imunosupresor (de exemplu, un inhibitor de calcineurină) sau cel puțin de peste 30 de zile după transplant:

- trombocitopenie (numărul trombocitelor $<150,000/\mu\text{l}$); și
- dovezi ale anemiei hemolitice microangiopatie (prezența schistocitelor, lactatdehidrogenază (LDH) serică $>$ limita superioară a normei (ULN) sau haptoglobina $<$ limita inferioară a normei (LLN).

10 Terapie concomitentă permisă în TMA asociate cu HSTC:

- terapia cu plasma în cadrul terapiei cu OMS646 se permitea în cazul, în care investigatorul considera, că este indicată din punct de vedere medical. La pacienții la care se aplica terapia cu plasma, se puteau administra jumătăți de doză suplimentare de OMS646;

15 · investigatorilor le-a fost recomandată utilizarea hemodializei în conformitate cu standardul tratamentului;

- eculizumab nu s-a administrat în timpul studiului.

În acest studiu al TMA au fost incluși subiecții, care suferă de HSCT-TMA persistentă, care este rezistent la metodele de tratament standard (adică, TMA persistentă, cel puțin de peste două săptămâni după sistarea sau întreruperea tratamentului cu inhibitor de calcineurină).

20 Cum se descrie în Exemplul 45, s-a finalizat dozarea pentru un pacient, care suferă de HSCT-TMA persistentă (pacientul # 1) în grupa cu doză mare (4 mg/kg de OMS646, administrat intravenos o dată pe săptămână timp de patru săptămâni) cu utilizarea metodei, descrise în Exemplul 44.

25 A fost finalizată dozarea pentru alți 4 pacienți suplimentari, care suferă de HSCT-TMA persistentă, cum se descrie în continuare.

Pacientul # 1 (descrie în exemplul 44) a administrat OMS646 timp de patru săptămâni (4 mg/kg intravenos o dată pe săptămână);

Pacienții # 2 și # 3 au fost tratați timp de opt săptămâni cu OMS646 (4 mg/kg intravenos o dată pe săptămână);

30 Pacienții 4 și 5 au fost tratați cu OMS646 (4 mg/kg intravenos o dată pe săptămână) timp de două și, respectiv, trei săptămâni. Pacienții # 4 și # 5, excluși din studiu peste două și trei săptămâni, respectiv, nu au răspuns la tratament și starea lor s-a agravat. Este necesar de remarcat, că la unul dintre acești pacienți s-a determinat nivel înalt de creatinină până la includerea în studiu.

Rezultate.

35 În acest studiu au participat cinci pacienți cu HSCT-TMA persistentă. Toți subiecții au fost adulți și au primit transplant de celule stem hematopoietice (HSCT) pentru prezența la ei a unor tumori maligne hematologice. Fig. 58, 59 și 60 prezintă modificarea de la linia de bază a variabilelor pentru TMA după tratamentul cu anticorp inhibitor al MASP-2 (OMS646. În aceste figuri sunt prezentate datele privind toți cei cinci pacienți, dintre care doi au întrerupt studiul peste 2-3 săptămâni, unul ulterior a recidivat, celălalt pacient a primit îngrijiri paliative. După cum se observă din fig. 58, 59 și 60, ultima administrare a anticorpului putea fi posibilă în săptămâna 7.

40 Fig. 58 reprezintă graficul modificării medii a numărului de trombocite, în funcție de momentul inițial de timp (săptămâni) la subiecții, care suferă de microangiopatie trombotică asociată cu transplant de celule stem hematopoietice (HSCT-TMA), după administrarea anticorpului (OMS646) inhibitor al MASP-2.

45 Fig. 59 reprezintă graficul modificării medii a lactatdehidrogenazei (LDH), în funcție de momentul inițial de timp (săptămâni) la subiecții, care suferă de HSCT-TMA persistentă după tratamentul cu anticorp (OMS646) inhibitor al MASP-2.

50 Fig. 60 reprezintă graficul modificării medii a haptoglobinei în funcție de momentul inițial de timp (săptămâni) la subiecții, care suferă de HSCT-TMA persistentă după administrarea anticorpului (OMS646) inhibitor al MASP-2.

55 După cum se arată în fig. 55 și fig. 60, în timpul tratamentului s-a observat o îmbunătățire statistic concludentă a indicatorilor LDH și a haptoglobinei. După cum se arată în fig. 58, numărul de trombocite s-a îmbunătățit, dar nu a atins semnificație statistică din cauza unui număr mic de pacienți. Dintre cei trei pacienți, care au terminat tratamentul, la unul nu s-a ameliorat indicatorul creatininei, dar el administra concomitent medicamente nefrotoxice. Indicatorul creatininei s-a îmbunătățit sau a rămas normal la ceilalți doi pacienți. La urmărirea ulterioară îndelungată, un pacient a prezentat o insuficiență de grefă și aștepta un al doilea transplant. Ceilalți doi pacienți rămăneau stabili.

În pofida posibilității suprapunerii efectelor medicamentelor asociate cu supresia măduvei osoase și nefrotoxicitate la doi dintre subiecți, s-au observat efecte terapeutice benefice cu OMS646 la trei dintre subiecți, care suferau de HSCT-TMA persistentă (unul dintre aceștia fiind descris în exemplul 45) și care suplimentar sunt descriși în continuare. Este necesar de remarcat, că primele rezultate pozitive ale tratamentului la fiecare dintre cei trei pacienți s-au observat peste

aproximativ trei săptămâni de tratament cu OMS646.

Pacientul # 1 (tratat timp de 4 săptămâni, cum se descrie în exemplul 45). Rezumând succint, numărul de trombocite a crescut de patru ori, rezultând un număr de trombocite mai mare de 100.000/ μ l; nivelul haptoglobinei s-a dublat și a fost normal; nivelul de lactatdehidrogenază plasmatică s-a redus cu 35%, dar totuși încă depășea nivelul normal; și se depista doar un singur sistocit.

Pacientul # 2 (tratat timp de 8 săptămâni). Tratamentul nu a influențat asupra numărului de trombocite, deși pacientul suferea, de asemenea, de supresia măduvei osoase pe fondul tratamentului concomitent cu valganciclovir și ulterior s-a produs respingerea grefei; nivelul de lactatdehidrogenază plasmatică s-a redus de la 712 U/l până la 256 U/l; nivelul de haptoglobină a crescut de la niveluri nedetectabile până la 250 mg/dl.

Pacientul # 3 (tratat timp de 8 săptămâni): numărul de trombocite a crescut de la 13.500/ μ l până la 133.000/ μ l; nivelul de lactatdehidrogenază plasmatică s-a redus de la 537 până la 225 U/l, nivelul de haptoglobină a crescut de la niveluri nedetectabile până la 181 mg/dl.

Expunerea succintă a rezultatelor.

În cazul celor trei pacienți, suferinzi de TMA asociată cu HSCT persistentă, la care s-a finalizat dozarea cu OMS646, datele demonstrează un efect puternic și stabil. În timpul tratamentului s-au observat îmbunătățiri statistic concludente ale indicatorilor LDH și haptoglobinei. Numărul de trombocite a crescut, dar nu a atins nivel statistic concludent la acest număr mic de pacienți. Dintre trei pacienți, care au finalizat tratamentul, la unul nu s-a înregistrat ameliorarea indicatorului creatininei, dar el a administrat concomitent medicamente nefrotoxice. Indicatorul creatininei s-a îmbunătățit sau a rămas normal la ceilalți doi pacienți.

Concluzii

Anticorpul OMS646 a îmbunătățit marcherii TMA la pacienții suferinzi de HSCT-TMA persistentă, care nu au răspuns la măsurile de tratament conservative. Pacienții cu HSCT-TMA, tratați cu OMS646, erau unii din cei mai dificili de tratat, totodată anticorpul OMS646 a demonstrat efecte terapeutice pozitive la pacienții cu risc major de HSCT-TMA persistentă, în pofida măsurilor de tratament conservative.

În conformitate cu cele menționate, într-o variantă de realizare, invenția prevede o metodă de tratare a unui subiect uman, care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții conținând o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependentă de MASP-2. Într-o variantă de realizare, subiectul suferă de TMA persistentă asociată cu transplantul de celule stem hematopoietice, care este rezistentă la măsuri de tratament conservative. Într-o variantă de realizare, metoda cuprinde în continuare identificarea unui subiect uman, care suferă de TMA persistentă asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, care este rezistentă la măsuri de tratament conservative până la etapa de administrare la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependentă de MASP-2.

În conformitate cu oricare dintre variantele de realizare prezentate aici, anticorpul inhibitor al MASP-2 prezintă cel puțin de una sau mai multe dintre următoarele caracteristici: anticorpul menționat leagă MASP-2 uman cu KD de 10 nM sau mai mică, anticorpul menționat leagă un epitop în domeniul CCP1 al MASP-2, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b într-un test in vitro în 1% ser uman la IC_{50} de 10 nM sau mai puțin, anticorpul respectiv inhibă depunerea C3b în 90% ser uman la IC_{50} de 30 nM sau mai mică, în care anticorpul reprezintă un fragment de anticorp selectat din grupa constând din Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ și F(ab')₂, în care anticorpul este o moleculă cu un singur lanț, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG2, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG1, în care anticorpul respectiv este o moleculă IgG4, în care molecula IgG4 cuprinde o mutație S228P. Într-o variantă de realizare anticorpul se leagă cu MASP-2 și inhibă selectiv calea lectinei și practic nu inhibă calea clasică (adică inhibă calea lectinei, lăsând intactă calea clasică a complementului).

Într-o variantă de realizare a invenției anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează într-o cantitate eficientă pentru ameliorarea, cel puțin de a unui sau mai multor parametri clinici în TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, cum ar fi creșterea numărului de trombocite

(de exemplu, cel puțin de două ori, cel puțin de trei ori, cel puțin de patru ori, comparative cu numărul de trombocite până la tratament), creșterea haptoglobinei și/sau reducerea nivelului de LDH.

5 In unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice printr-un cateter (de exemplu, intravenos) pentru o primă perioadă de timp (de exemplu, în faza acută care durează cel puțin de o zi până la o săptămână sau două săptămâni), urmată de administrarea subcutanată a unui agent inhibitor al MASP-2 pentru a doua perioadă de timp (de exemplu, pentru 10 o perioadă îndelungată de timp cel puțin de două săptămâni sau mai mult). În unele exemple de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp se realizează în absența plasmeferezei. În unele variante de realizare administrarea în prima și/sau în a doua perioadă de timp se realizează în prezența plasmeferezei.

15 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea unui agent inhibitor al MASP-2 la un subiect, care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, fie intravenos, intramuscular, fie, preponderant, subcutanat. Tratamentul poate fi de lungă durată și se poate administra de la o dată pe zi până la o dată pe lună, dar, preponderant, se administrează o dată la două săptămâni. Anticorpul anti-MASP-2 poate fi administrat în monoterapie sau în asociere cu un inhibitor C5, cum ar fi eculizumab.

20 Într-o variantă de realizare metoda include tratarea unui subiect, care suferă de TMA asociată cu transplant de celule stem hematopoietice, cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții cu conținut de o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment de legare a acestuia la antigen, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu care conține CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 conținând secvența de aminoacizi, notată ca SEQ ID NO: 67, și o regiune variabilă a lanțului ușor care conține CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 conținând secvența de aminoacizi, notată ca SEQ ID 25 NO: 70. În unele variante de realizare, compoziția include anticorpul inhibitor al MASP-2, cuprinzând (a) o regiune variabilă a lanțului greu care conține: i) lanțul greu CDR-H1 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 31-35 din SECV ID NR: 67 și ii) lanțul greu CDR-H2 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 50-65 din SECV ID NR: 67 și iii) lanțul greu CDR-H3 cuprinzând secvența de aminoacizi de la 95-102 din SECV ID NR: 67 și b) o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând: i) lanțul ușor CDR-L1 cuprinzând secvența de aminoacizi 24-34 din SECV ID NR: 70 și ii) lanțul ușor CDR-L2 cuprinzând secvența de aminoacizi 50-56 din SECV ID NR: 70 și iii) lanțul ușor CDR-L3 cuprinzând secvența de aminoacizi 89-97 din SECV ID NR: 70 sau (II) o 30 variantă a acesteia cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu cu identitate cel puțin de 90% cu SECV ID NR : 67 (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 67) și o regiune variabilă a lanțului ușor cu o identitate cel puțin de 90% (de exemplu, cu identitate cel puțin de 91%, cel puțin de 92%, cel puțin de 93%, cel puțin de 94%, cel puțin de 95%, cel puțin de 96%, cel puțin de 97%, cel puțin de 98%, cel puțin de 99% cu SECV ID NR: 70.

40 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de un anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, conținând o regiune variabilă a lanțului greu cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SEQ ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor cuprinzând secvența de aminoacizi notată ca SECV ID NR: 70.

45 În unele variante de realizare metoda prevede administrarea la subiect a unei compoziții cuprinzând un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare la antigen, care recunoaște în mod specific cel puțin de o parte dintr-un epitop pe MASP-2 umană recunoscută de anticorpul de referință OMS646, conținând regiunea variabilă a lanțului greu, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, notată ca SECV ID NR: 70.

50 În unele variante de realizare, metoda cuprinde administrarea la un subiect care suferă sau prezintă risc de dezvoltare a TMA asociată cu HSCT, incluzând un subiect care suferă de TMA persistentă asociată cu transplantul de celule stem hematopoietice, care este rezistentă la măsuri de tratament conservative, a unei compoziții conținând un anticorp inhibitor al MASP -2 sau un fragment al acestuia de legare a antigenului, cuprinzând o regiune variabilă a lanțului greu, care 55 include secvența de aminoacizi, notată ca SEQ ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor, care include secvența de aminoacizi, notată ca SECV ID NR: 70 în doză de la 1 mg / kg până la 10 mg / kg (adică 1 mg / kg, 2 mg / kg, 3 mg / kg, 4 mg / kg, 5 mg / kg, 6 mg / kg, , 8 mg / kg, 9 mg / kg sau 10 mg / kg) cel puțin de o dată pe săptămână (de exemplu, cel puțin de două ori pe săptămână sau de cel puțin de trei ori pe săptămână) timp de cel puțin de 3 săptămâni sau timp de

cel puțin de 4 săptămâni, sau timp de cel puțin de 5 săptămâni sau cel puțin de 6 săptămâni sau cel puțin de 7 săptămâni sau timp de cel puțin de 8 săptămâni.

Deși în invenție au fost descrise și ilustrate variantele de realizare, care nu sunt restrictive, este evident, că în invenție pot fi introduse diferite modificări fără a devia de la esența și volumul invenției.

5

LISTA SECVENȚELOR

<110> Omeros Corporation
University of Leicester
Demopoulos, Gregory A.
Dudler, Thomas
Schwaebler, Hans-Wilhelm

<120> METODE DE TRATARE A STĂRILOR ASOCIATE CU ACTIVAREA COMPLEMENTULUI
DEPENDENTĂ DE MASP-2

<130> MP.1.0248.PCT

<140> 62/406,726

<141> 2016-10-11

<140> 62/252,814

<141> 2015-11-09

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 725

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (27)..(584)

<400> 1

ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt 53
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu
1 5

ctg tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct 101
Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro
10 15 20 25

gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat 149
Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn
30 35 40

gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg 197
Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu
45 50 55

cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag 245
Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu
60 65 70

tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg 293
Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu
75 80 85

tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act 341
Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr
90 95 100 105

ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac 389
Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
110 115 120

tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag 437

MD 4685 C1 2020.12.31

148

```

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu
      125                      130                      135

gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac      485
Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp
      140                      145                      150

cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca      533
His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala
      155                      160                      165

ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc ctc      581
Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
      170                      175                      180

tag cctccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc      634

tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggtgtgcc ccaactccca ttcaccacc      694

atggacccaa taataaacct ggccccacc c      725

<210> 2
<211> 185
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1      5      10      15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20      25      30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35      40      45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50      55      60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65      70      75      80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85      90      95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100     105     110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115     120     125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130     135     140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
145     150     155     160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
165     170     175

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
180     185

```

MD 4685 C1 2020.12.31

149

<210> 3
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
50 55 60

Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser
85 90 95

Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln
115 120 125

Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His
130 135 140

Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg
145 150 155 160

Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
165 170

<210> 4
<211> 2460
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> {22}..(2082)

<400> 4

ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg 51
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu
1 5 10

tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg 99
Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val
15 20 25

ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat gac 147
Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp
30 35 40

MD 4685 C1 2020.12.31

150

cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg cgc Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg 45 50 55	195
ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag tac Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr 60 65 70	243
gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys 75 80 85 90	291
ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe 95 100 105	339
tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser 110 115 120	387
aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp 125 130 135	435
att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His 140 145 150	483
cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly 155 160 165 170	531
tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly 175 180 185	579
cag gtc ttc acc cag agg tct ggg gag ctc agc agc cct gaa tac cca Gln Val Phe Thr Gln Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro 190 195 200	627
cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu 205 210 215	675
gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu 220 225 230	723
aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr 235 240 245 250	771
gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg 255 260 265	819
att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu 270 275 280	867
tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln 285 290 295	915
cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val 300 305 310	963
caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr 315 320 325 330	1011
ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala	1059

MD 4685 C1 2020.12.31

151

	335	340	345	
gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc				1107
Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser				
	350	355	360	
att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag				1155
Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu				
	365	370	375	
tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac				1203
Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr				
	380	385	390	
agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat				1251
Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr				
	395	400	405	410
gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca				1299
Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser				
	415	420	425	
ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga				1347
Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly				
	430	435	440	
ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg				1395
Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp				
	445	450	455	
caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat				1443
Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr				
	460	465	470	
gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat				1491
Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His				
	475	480	485	490
gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca				1539
Asp Ala Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser				
	495	500	505	
cct cat tat aca caa gcc tgg tct gaa gct gtt ttt ata cat gaa ggt				1587
Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly				
	510	515	520	
tat act cat gat gct ggc ttt gac aat gac ata gca ctg att aaa ttg				1635
Tyr Thr His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu				
	525	530	535	
aat aac aaa gtt gta atc aat agc aac atc acg cct att tgt ctg cca				1683
Asn Asn Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro				
	540	545	550	
aga aaa gaa gct gaa tcc ttt atg agg aca gat gac att gga act gca				1731
Arg Lys Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala				
	555	560	565	570
tct gga tgg gga tta acc caa agg ggt ttt ctt gct aga aat cta atg				1779
Ser Gly Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met				
	575	580	585	
tat gtc gac ata ccg att gtt gac cat caa aaa tgt act gct gca tat				1827
Tyr Val Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr				
	590	595	600	
gaa aag cca ccc tat cca agg gga agt gta act gct aac atg ctt tgt				1875
Glu Lys Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys				
	605	610	615	
gct ggc tta gaa agt ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga				1923
Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly				
	620	625	630	
ggg gca ctg gtg ttt cta gat agt gaa aca gag agg tgg ttt gtg gga				1971

MD 4685 C1 2020.12.31

152

Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ser	Glu	Thr	Glu	Arg	Trp	Phe	Val	Gly		
635					640					645					650		
gga ata gtg tcc tgg ggt tcc atg aat tgt ggg gaa gca ggt cag tat																	2019
Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Ser	Met	Asn	Cys	Gly	Glu	Ala	Gly	Gln	Tyr		
			655						660					665			
gga gtc tac aca aaa gtt att aac tat att ccc tgg atc gag aac ata																	2067
Gly	Val	Tyr	Thr	Lys	Val	Ile	Asn	Tyr	Ile	Pro	Trp	Ile	Glu	Asn	Ile		
			670					675					680				
att agt gat ttt taa cttgcgtgtc tgcagtcaag gattcttcat ttttagaaat																	2122
Ile	Ser	Asp	Phe														
			685														
gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg																	2182
gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact																	2242
tgccagttta attccagcct taccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca																	2302
gtcatctttg cccaccagc gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa																	2362
gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg																	2422
tttttaaaact tgttcttatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa																	2460
<210> 5																	
<211> 686																	
<212> PRT																	
<213> Homo sapiens																	
<400> 5																	
Met	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly	Ser	Val	Ala	Thr		
1				5						10				15			
Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser																	
			20					25					30				
Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr																	
		35					40					45					
Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe																	
		50				55					60						
Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser																	
65					70				75							80	
Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp																	
			85					90					95				
Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser																	
			100				105						110				
Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr																	
		115					120					125					
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val																	
		130				135					140						
Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu																	
145					150					155						160	

MD 4685 C1 2020.12.31

153

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg
180 185 190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu
195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly
245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn
260 265 270

Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly
275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro Met
290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu
305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln
325 330 335

Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro
355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly
370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
385 390 395 400

Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly
405 410 415

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu Pro
420 425 430

Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly
435 440 445

Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu Gly
450 455 460

MD 4685 C1 2020.12.31

154

Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu Thr
465 470 475 480

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu Asp
485 490 495

Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala
500 505 510

Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly
515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile
530 535 540

Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser
545 550 555 560

Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr
565 570 575

Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile
580 585 590

Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro
595 600 605

Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly
610 615 620

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
625 630 635 640

Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
645 650 655

Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
660 665 670

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
675 680 685

<210> 6
<211> 671
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

MD 4685 C1 2020.12.31

155

Phe	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	50	55	60	
Ser	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	65	70	75	80
Asp	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	85	90	95	
Ser	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	100	105	110	
Thr	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	115	120	125	
Val	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	Asp	His	His	Cys	His	Asn	His	130	135	140	
Leu	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	His	Arg	145	150	155	160
Asn	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gln	165	170	175	
Arg	Ser	Gly	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Arg	Pro	Tyr	Pro	Lys	180	185	190	
Leu	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Val	195	200	205	
Ile	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Thr	210	215	220	
Leu	Cys	Pro	Tyr	Asp	Phe	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Arg	Glu	Glu	His	225	230	235	240
Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	His	Arg	Ile	Glu	Thr	Lys	Ser	245	250	255	
Asn	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Val	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asp	His	Thr	260	265	270	
Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro	Cys	Pro	Tyr	Pro	275	280	285	
Met	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Val	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Lys	Tyr	Ile	290	295	300	
Leu	Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Ile	Phe	Cys	Glu	Thr	Gly	Tyr	Glu	Leu	Leu	305	310	315	320
Gln	Gly	His	Leu	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	325	330	335	
Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Met	Pro	Ala	Cys	Ser	Ile	Val	Asp	Cys	Gly	340	345	350	

MD 4685 C1 2020.12.31

156

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro
355 360 365

Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
370 375 380

Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp
385 390 395 400

Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu
405 410 415

Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly
420 425 430

Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu
435 440 445

Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu
450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu
465 470 475 480

Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln
485 490 495

Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala
500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val
515 520 525

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu
530 535 540

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu
545 550 555 560

Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro
565 570 575

Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr
580 585 590

Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser
595 600 605

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
610 615 620

Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
625 630 635 640

Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys

MD 4685 C1 2020.12.31

157

645

650

655

Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
660 665 670

<210> 7
<211> 4900
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
cctgtcctgc ctgectggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaate 60
ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaagggtgaga 120
ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtagggtg 180
gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggg gggagcacag gcctgggcct caccgcccct 240
gcctgcccc taggetgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccaccccct 300
taggcccga gttggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atcccccggc ttccagggg 360
agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga cctgactgc accccccggc taccgcctgc 420
gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct ctgcgagtac gacttcgtca 480
aggtgccgtc agacgggagg gctgggggtt ctacgggtcg ggggggtccc aaggagtagc 540
cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg 600
ggtcttgcc tcactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaagggtc 660
tgccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggccttggc aaggacactt 720
tctactcgct gggtccagc ctggacatta ccttcgctc cgactactcc aacgagaagc 780
cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgaggtga gccaaagagg gtctgcaac 840
atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900
tcagtttccc cacttttccc agggcagggg agaggcctct gccctgacat catccacaat 960
gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag 1020
ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgc gcagggactg gccgggagcg gcagctcacg 1080
cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcctga taatttgagg gtcaggagtt 1140
caaggccagc cagggaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200
gggctgggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactaggga ggtgaggca ggagaattgc 1260
ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtga cagagattgc accactacac tccacctggg 1320
cgacagacta gactccgtct caaaaaacaa aaaaacaaaa ccacgcaggg ccgaggggccc 1380
atttacaagc tgacaaagtg ggccctgcca gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440
gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500
tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc tgtagccccg cccctgggt ttgattgact 1560
cccctatta gctgggtgac ctgcggccga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620
gatgtttgca tctttctccc agcgtgctg ggagcttgca gcgacctag gcctgtaagg 1680
tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcctc tgagggtccac 1740
tctgaggtea tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga 1800
cggcctgcct ggccctgcct ctccccaga cattgacgag tgccagggtg ccccgggaga 1860

MD 4685 C1 2020.12.31

158

ggcgcccacc	tgcgaccacc	actgccacaa	ccacctgggc	ggtttctact	gctcctgccg	1920
cgcaggctac	gtcctgcacc	gtaacaagcg	cacctgctca	ggtgagggag	gctgcctggg	1980
ccccaacgca	ccctctcctg	ggatacccg	ggctcctcag	ggccattgct	gctctgccca	2040
ggggtgcgga	gggcctgggc	ctggacactg	ggtgcttcta	ggccctgctg	cctccagctc	2100
cccttctcag	cctgcttcc	cctctcagca	gccaggctca	tcagtgccac	cctgccctag	2160
cactgagact	aattctaaca	tcccactgtg	tacctgggtc	caacctgggt	ctgggaaccc	2220
ctcatgtagc	cacgggagag	tcggggatc	tacctcgtt	ccttggaactg	ggttctgtt	2280
ccctgcactg	ggggacgggc	cagtgtctctg	ggcggtgggc	agccccaccc	tgtggcgtg	2340
accctgtccc	cccgaactcg	tttctcctct	cgggtctct	ccttgccctc	ctgatctctc	2400
ttccagagca	gagcctctag	cctccccctg	agctccggct	gccagcagg	tcagaagcca	2460
gagccaggct	gctggcctca	gctccgggtt	gggtgagat	gctgtgcccc	aactccatt	2520
caccacccat	ggaccaata	ataaacctgg	ccccaccca	cctgtgccg	cgtgtctctg	2580
gggtgggagg	gtcgggaggc	ggtggggcgc	gctcctctct	gcctaccctc	ctcacagcct	2640
catgaacccc	aggtctgtgg	gagcctctc	catggggcca	cacggtcctt	ggcctacccc	2700
cctgttttga	agatggggca	ctgaggcccg	agaggggtaa	ggcctcgtc	gagtccaggt	2760
ccccagaggc	tgagcccaga	gtaatcttga	accaccccca	ttcagggctc	ggcctggagg	2820
agcctgaccc	acagaggaga	cacctggga	gatattcatt	gaggggtaat	ctggtccccc	2880
gcaaatccag	gggtgattcc	cactgcccc	taggcacagc	cacgtggaag	aaggcaggca	2940
atgttggggc	tctcacttc	ctagaggcct	cacaactcaa	atgccccca	ctgcagctgg	3000
gggtgggggtg	gtggtatggg	atggggacca	agccttcctt	gaaggataga	gccagccca	3060
acaccccgcc	ccgtggcagc	agcatcacgt	gttccagcga	ggaaggagag	caccagactc	3120
agtcatgatc	actgttgctt	tgaacttcca	agaacagccc	cagggcaagg	gtcaaaacag	3180
gggaaagggg	gtgatgagag	atccttcttc	cggatgttcc	tccaggaacc	agggggctgg	3240
ctggtcttgg	ctgggttcgg	gtaggagacc	catgatgaat	aaacttgga	atcactgggg	3300
tggtctgaag	ggaatttagg	ggagctccga	aggggccctt	aggctcgagg	agatgtcct	3360
ctcttttccc	gaattcccag	ggaccagga	gagtgtccct	tcttctctt	cctgtgtgtc	3420
catccacccc	cgcctcccg	cctggcagag	ctggtggaac	tcagtgtctc	agccctacc	3480
ctggggttgc	gactctggct	caggacacca	ccacgtccc	tgggggtgtg	agtgagggcc	3540
tgtgcgtccc	atcccagagt	ctgcctgttt	cagctaaagc	ctcaaagcaa	gagaaacccc	3600
ctctctaagc	ggccctcag	ccatcgggtg	ggtcgttttg	tttctgggta	ggcctcaggg	3660
gctggccacc	tgcagggcc	agcccaaccc	agggatgcag	atgtccagc	cacatccctg	3720
tcccagtttc	ctgtcccca	aggcatccac	cctgctgttg	gtgcgagggc	tgatagaggg	3780
cacgccaagt	cactccctg	cccttccctc	cttccagccc	tgtgtctcgg	ccaggctcttc	3840
accagaggt	ctggggagct	cagcagccct	gaatacccac	ggccgtatcc	caaactctcc	3900
agttgcactt	acagcatcag	cctggaggag	gggttcagt	tcattctgga	ctttgtggag	3960
tccttcgatg	tggagacaca	ccctgaaacc	ctgtgtccct	acgactttct	caaggctctg	4020
ctcctgggcc	cctcatcttg	tcccagatcc	tcccccttca	gccagctgc	acccctact	4080
tcctgcagca	tggcccccac	cacgttcccg	tcacctcgg	tgacccacc	tcttcagggtg	4140

MD 4685 C1 2020.12.31

159

```

ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg      4200
caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg      4260
gttacttccc tccgccagc ccagaccag gcagctgtc cccagcttcc atgagcttct      4320
ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggcccatc tgtgggaaga cattgcccc      4380
caggattgaa aaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga      4440
ccacacaggc tggaagatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg      4500
tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgtg gggctcttct      4560
gggcaggact aggaaggac accaggttta gtgtgtctga ggtctgagc agcagcttct      4620
aagggaagc acccgtgcc tctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa      4680
ccaccatc acccatcact catcttttac ccaccaccc tttgccact atccttctgt      4740
ccctcactc tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaacct      4800
ccaccatc ttctacctac ccatcctatc catccatcct tctatcagca tcttctacc      4860
acccatcctt cgttcgggtc tccatcatca tccatccatc      4900

```

<210> 8
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
 20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
 35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
 50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
 85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
 100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
 130 135

<210> 9
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

MD 4685 C1 2020.12.31

160

<400> 9

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser
180

<210> 10

<211> 293

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser

MD 4685 C1 2020.12.31

161

65		70		75		80
Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp						
	85			90		95
Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser						
	100		105		110	
Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr						
	115		120		125	
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val						
	130		135		140	
Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu						
	145		150		155	160
Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn						
	165		170		175	
Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg						
	180		185		190	
Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu						
	195		200		205	
Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile						
	210		215		220	
Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu						
	225		230		235	240
Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly						
	245		250		255	
Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn						
	260		265		270	
Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly						
	275		280		285	
Trp Lys Ile His Tyr						
	290					
<210> 11						
<211> 41						
<212> PRT						
<213> Homo sapiens						
<400> 11						
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys						
1	5		10		15	
Asp His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg						
	20		25		30	
Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys						

MD 4685 C1 2020.12.31

162

35

40

<210> 12
<211> 242
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn
20 25 30

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala
35 40 45

Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His
50 55 60

Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr
65 70 75 80

His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn
85 90 95

Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys
100 105 110

Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly
115 120 125

Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val
130 135 140

Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys
145 150 155 160

Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly
165 170 175

Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala
180 185 190

Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile
195 200 205

Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val
210 215 220

Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser
225 230 235 240

Asp Phe

<210> 13

MD 4685 C1 2020.12.31

163

<211> 16
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 13

Gly	Lys	Asp	Ser	Cys	Arg	Gly	Asp	Ala	Gly	Gly	Ala	Leu	Val	Phe	Leu
1				5					10					15	

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 14

Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu
1				5					10					15

<210> 15
<211> 43
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 15

Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe	Asp
1				5					10					15	

Leu	Glu	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser	Ser
				20				25					30		

Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln
		35					40			

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 16

Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn
1				5			

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 17

Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr
1				5					10					15	

MD 4685 C1 2020.12.31

164

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe
20 25

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 18

Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly
1 5

<210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 19

Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys
1 5 10 15

Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val
20 25

<210> 20
<211> 960
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (51)..(797)

<400> 20
attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56
Met Ser
1

ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct 104
Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser
5 10 15

tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca 152
Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala
20 25 30

gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat 200
Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp
35 40 45 50

ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc 248
Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu
55 60 65

aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca 296
Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro
70 75 80

ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga 344
Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly

MD 4685 C1 2020.12.31

165

85	90	95	
aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct			392
Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala			
100	105	110	
ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctc acc ttc tct ctg			440
Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu			
115	120	125	130
ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg			488
Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met			
	135	140	145
acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg			536
Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val			
	150	155	160
gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc			584
Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile			
	165	170	175
aag gag gaa gcc ttc ctg ggc atc act gat gag aag aca gaa ggg cag			632
Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln			
	180	185	190
ttt gtg gat ctg aca gga aat aga ctg acc tac aca aac tgg aac gag			680
Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu			
	195	200	205
ggg gaa ccc aac aat gct ggt tct gat gaa gat tgt gta ttg cta ctg			728
Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu			
	215	220	225
aaa aat ggc cag tgg aat gac gtc ccc tgc tcc acc tcc cat ctg gcc			776
Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His Leu Ala			
	230	235	240
gtc tgt gag ttc cct atc tga agggtcatat cactcaggcc ctccttgtct			827
Val Cys Glu Phe Pro Ile			
	245		
ttttactgca acccacaggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc			887
atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca			947
aagcaataat agt			960
<210> 21			
<211> 248			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 21			
Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala			
1	5	10	15
Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys			
	20	25	30
Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly			
	35	40	45
Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln			
	50	55	60
Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly			
	65	70	75
			80

MD 4685 C1 2020.12.31

166

Asn Pro Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp
85 90 95

Pro Gly Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg
100 105 110

Lys Ala Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe
115 120 125

Ser Leu Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu
130 135 140

Ile Met Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala
145 150 155 160

Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn
165 170 175

Leu Ile Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu
180 185 190

Gly Gln Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp
195 200 205

Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu
210 215 220

Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His
225 230 235 240

Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile
245

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> {1}..{1}
<223> In care X in poziția 1 reprezintă hidroxiprolină

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> {4}..{4}
<223> In care X in poziția 4 reprezintă reziduul hidrofob
<400> 22

Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>

MD 4685 C1 2020.12.31

167

<223> Sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> {1}..{1}

<223> In care X reprezintă hidroxiprolină

<400> 23

Xaa Gly Lys Leu Gly

1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> {9}..{15}

<223> In care X in poziția 1 și 15 reprezintă hidroxiprolină

<400> 24

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly

1 5 10 15

<210> 25

<211> 27

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> {3}..{27}

<223> In care X in poziția 3, 6, 15, 21, 24, 27 reprezintă hidroxiprolină

<400> 25

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly

1 5 10 15

Lys Leu Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa

20 25

<210> 26

<211> 53

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Sintetică

<220>

<221> misc_feature

<222> {26}..{26}

<223> Xaa poate fi orice aminoacid natural

<220>

<221> misc_feature

<222> {32}..{32}

MD 4685 C1 2020.12.31

168

<223> Xaa poate fi orice aminoacid natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa poate fi orice aminoacid natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> Xaa poate fi orice aminoacid natural

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(50)

<223> Xaa poate fi orice aminoacid natural

<400> 26

Gly Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
1 5 10 15

Gln Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa
20 25 30

Gly Asn Xaa Gly Pro Ser Gly Ser Xaa Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly
35 40 45

Asp Xaa Gly Lys Ser
50

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(33)

<223> In care X in poziția 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 reprezintă
hidroxiprolină

<400> 27

Gly Ala Xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly
1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Xaa Gly Asp
20 25 30

Xaa

<210> 28

<211> 45

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Sintetică

<220>

<221> MISC_FEATURE

MD 4685 C1 2020.12.31

169

<222> (3)..(45)
<223> In care X in poziția 3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 reprezintă
hidroxiprolină

<400> 28

Gly Cys Xaa Gly Leu Xaa Gly Ala Xaa Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys
20 25 30

Ala Gly Pro Xaa Gly Pro Asn Gly Ala Xaa Gly Glu Xaa
35 40 45

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 29

Leu Gln Arg Ala Leu Glu Ile Leu Pro Asn Arg Val Thr Ile Lys Ala
1 5 10 15

Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile
20

<210> 30
<211> 559
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 30
atgaggtgc tgacctcct ggcccttctg tgtggtcgg tggccacccc ctgggccc 60
aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120
aatgaccagg agcggcgtg gacctgact gcacccccg gctaccgcct gcgcctctac 180
ttcacccact tcgacctgga gctctccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240
tcgggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc 300
cctggcaagg acactttcta ctgcgtgggc tccagcctgg acattacctt ccgtccgac 360
tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420
gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgccca caaccacctg 480
ggcggtttct actgtcctct cgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540
tcagccctgt gctccggcc 559

<210> 31
<211> 34
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 31
cgggcacacc atgaggtgc tgacctcct ggcc 34

MD 4685 C1 2020.12.31

170

<210>	32	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Secvență artificială	
<220>		
<223>	Sintetică	
<400>	32	
gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag		33
<210>	33	
<211>	33	
<212>	ADN	
<213>	Secvență artificială	
<220>		
<223>	Sintetică	
<400>	33	
agcagccctg aatacccacg gccgtatccc aaa		33
<210>	34	
<211>	26	
<212>	ADN	
<213>	Secvență artificială	
<220>		
<223>	Sintetică	
<400>	34	
cgggatccat gaggctgctg accctc		26
<210>	35	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Secvență artificială	
<220>		
<223>	Sintetică	
<400>	35	
ggaattccta ggctgcata		19
<210>	36	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Secvență artificială	
<220>		
<223>	Sintetică	
<400>	36	
ggaattccta caggcgct		19
<210>	37	
<211>	19	
<212>	ADN	
<213>	Secvență artificială	
<220>		
<223>	Sintetică	
<400>	37	
ggaattccta gtagtggat		19
<210>	38	
<211>	25	
<212>	ADN	

MD 4685 C1 2020.12.31

171

<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 38
tgcggccgct gtaggtgctg tcttt 25

<210> 39
<211> 23
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 39
ggaattcact cgttattctc gga 23

<210> 40
<211> 17
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 40
tccgagaata acgagtg 17

<210> 41
<211> 29
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 41
cattgaaagc tttggggtag aagttgttc 29

<210> 42
<211> 27
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 42
cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga 27

<210> 43
<211> 28
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 43
cggtaaagctt cactggctca gggaaata 28

<210> 44
<211> 37
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>

MD 4685 C1 2020.12.31

172

```
<223> Sintetică

<400> 44
aagaagcttg ccgccaccat ggattggctg tggaact 37

<210> 45
<211> 31
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 45
cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 46
<211> 36
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 46
aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

<210> 47
<211> 26
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 47
cgggatcctt ctccctctaa cactct 26

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
1 5

<210> 49
<211> 4960
<212> ADN
<213> Homo Sapiens

<400> 49
ccggacgtgg tggcgcatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggetgagg caggagaatt 60
gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccage actttgcgag 120
gctgaggcag gtgcacgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacagggg 180
gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac 240
aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga 300
agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt 360
tttttttttt tttgaggtgg agtctcactc tgctgtccag gctggagtgc agtgggtgcga 420
```

MD 4685 C1 2020.12.31

173

tctcggatca ctgcaacctc cgctccag gctcaagcaa ttctectgcc tcagcctccc	480
gagtagctgg gattataagt gcgcgtgcc acacctggat gatttttgta tttttagtag	540
agatgggatt tcaccatggt ggtcaggctg gtctcaaaact cccaacctcg tgatccaccc	600
accttgacct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg	660
acttctaagc ctgcaaggga atcggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta	720
agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcacttttg	780
gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttaa gaccagcctg accaactg	840
agaaacccca tccctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgctgtaa	900
tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc	960
agttagctat gattgcagca ctgactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa	1020
agggagggtt gaggggcaga gccaggattt gtttccaggc tgtgtttacc taggtccgac	1080
tcctggtcc cagagcagcc tgtctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcag	1140
gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggtggggg caggggcagg tcaactggaca	1200
aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc	1260
acaccatgag gtaggtgggc gccacagcc tccctgcagg gtgtgggggt ggagcacagg	1320
cctgggacct caccgacct gcctgacca taggtgctg accctcctgg gccttctgtg	1380
tggctcgggt gccacccct tgggcccga gtggcctgaa cctgtgttcg gcgcctggc	1440
atccccggc tttccagggt agtatgcaa tgaccaggag cggcgtgga ccctgactgc	1500
acccccggc taccgctgc gcctctactt caccacttc gacctggagc tctcccacct	1560
ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgc aggacgggag ggtgggggt tctcagggtc	1620
gggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttg	1680
ccaggaggga gatcaggcct gggctctgcc ttcactccct gtgacacctg accccacagc	1740
tgagctcggg ggccaagggt ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc	1800
gggcccctgg caaggacact ttctactgc tgggctccag cctggacatt accttccgt	1860
ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgaggggt	1920
agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc	1980
ttaggcagg cagccctgcc ttcagtttcc ccaccttcc cagggcaggg gagaggcctc	2040
tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc	2100
tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact	2160
ggccgggccc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga	2220
tcatttgagg tcaggagtgc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact	2280
aaaactacaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag	2340
gctgaggcag gagaattgct tgaacctgag aggtggaggc tgagtgaa agagattgca	2400
ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa	2460
acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaaag tggggccctg ccagcgggag	2520
cgtgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct	2580
ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgtgtagc	2640

MD 4685 C1 2020.12.31

174

ccccccct	gggtttgatt	gactcccctc	attagctggg	tgacctcggg	ccggacactg	2700
aaactcccac	tggtttaaca	gaggtgatgt	ttgcatcttt	ctcccagcgc	tgctgggagc	2760
ttgcagcgac	cctaggcctg	taaggtgatt	ggcccggcac	cagtcccgca	ccctagacag	2820
gacgaggcct	cctctgaggt	ccactctgag	gtcatggatc	tcctgggagg	agtcaggct	2880
ggatcccgc	tctttccctc	ctgacggcct	gcctggccct	gcctctcccc	cagacattga	2940
cgagtgccag	gtggccccgg	gagaggcgcc	cacctgcgac	caccactgcc	acaaccacct	3000
gggcggtttc	tactgtctct	gccgcgcagg	ctacgtcctg	caccgtaaca	agcgcacctg	3060
ctcagccctg	tgctccggcc	aggtcttcac	ccagaggctc	ggggagctca	gcagccctga	3120
ataccacagg	ccgtatocca	aactctccag	ttgcacttac	agcatcagcc	tggaggaggg	3180
gttcagtgtc	attctggact	ttgtggagtc	cttcgatgtg	gagacacacc	ctgaaacct	3240
gtgtccctac	gactttctca	agattcaaac	agacagagaa	gaacatggcc	cattctgtgg	3300
gaagacattg	ccccacagga	ttgaaacaaa	aagcaacacg	gtgacatca	cctttgtcac	3360
agatgaatca	ggagaccaca	caggctggaa	gatccactac	acgagcacag	cgcacgcttg	3420
cccttatccg	atggcgccac	ctaattggcca	cgtttcacct	gtgcaagcca	aatacatcct	3480
gaaagacagc	ttctccatct	tttgcgagac	tggtctatgag	cttctgcaag	gtcacttgcc	3540
cctgaaatcc	tttactgcag	tttgtcagaa	agatggatct	tgggaccggc	caatgccgc	3600
gtgcagcatt	gttgactgtg	gccctcctga	tgatctaccc	agtggccgag	tggagtacat	3660
cacaggctct	ggagtgaacca	cctacaaagc	tgtgattcag	tacagctgtg	aagagacctt	3720
ctacacaatg	aaagtgaatg	atggtaaata	tgtgtgtgag	gctgatggat	tctggacgag	3780
ctccaaagga	gaaaaatcac	tcccagtctg	tgagcctgtt	tgtggactat	cagcccgcac	3840
aacaggaggg	cgtatatatg	gagggcaaaa	ggcaaacct	ggtgattttc	cctggcaagt	3900
cctgatatta	ggtggaacca	cagcagcagg	tgacttttta	tatgacaact	gggtcctaac	3960
agetgtctcat	gccgtctatg	agcaaaaaca	tgatgcaccc	gccctggaca	ttcgaatggg	4020
caccctgaaa	agactatcac	ctcattatac	acaagcctgg	tctgaagctg	tttttataca	4080
tgaaggttat	actcatgatg	ctggctttga	caatgacata	gcactgatta	aattgaataa	4140
caaagttgta	atcaatagca	acatcacgcc	tatttgtctg	ccaagaaaag	aagctgaatc	4200
ctttatgagg	acagatgaca	ttggaactgc	atctggatgg	ggattaaccc	aaaggggttt	4260
tcttgctaga	aatctaattgt	atgtcgacat	accgattgtt	gaccatcaaa	aatgtactgc	4320
tgcatatgaa	aagccaccct	atccaagggg	aagtgttaact	gctaacatgc	tttgtgctgg	4380
cttagaaagt	gggggcaagg	acagctgcag	aggtgacagc	ggagggggcac	tggtgtttct	4440
agatagttaa	acagagaggt	ggtttgtggg	aggaatagtg	tcctgggggtt	ccatgaattg	4500
tggggaagca	ggtcagtatg	gagtctacac	aaaagttatt	aactatatte	cctggatcga	4560
gaacataatt	agtgtttttt	aacttgctgt	tctgcagtca	aggattcttc	attttttagaa	4620
atgcctgtga	agaccttggc	agcgacgtgg	ctcgagaagc	attcatcatt	actgtggaca	4680
tggcagttgt	tgctccaccc	aaaaaaacag	actccagggt	aggctgctgt	catttctcca	4740
cttgccagtt	taattccagc	cttaccatt	gactcaaggg	gacataaacc	acgagagtga	4800
cagtcactct	tgcccacca	gtgtaatgtc	actgctcaaa	ttacatttca	ttaccttaaa	4860
aagccagtct	cttttcatac	tggctgttgg	catttctgta	aactgcctgt	ccatgctctt	4920

MD 4685 C1 2020.12.31

175

```

tgttttttaaa cttgtttctta ttgaaaaaaaa aaaaaaaaaa          4960

<210> 50
<211> 2090
<212> ADN
<213> Murină

<220>
<221> CDS
<222> (33)..(2090)

<400> 50
ggcgctggac tgcagagcta tgggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg          53
                                   Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu
                                   1                               5

ggg ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct          101
Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro
10                               15                               20

gaa cct gta ttc ggg cgc ctg gtg tcc cct ggc ttc cca gag aag tat          149
Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr
25                               30                               35

gct gac cat caa gat cga tcc tgg aca ctg act gca ccc cct ggc tac          197
Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr
40                               45                               50                               55

cgc ctg cgc ctc tac ttc acc cac ttt gac ctg gaa ctc tct tac cgc          245
Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg
60                               65                               70

tgc gag tat gac ttt gtc aag ttg agc tca ggg acc aag gtg ctg gcc          293
Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala
75                               80                               85

aca ctg tgt ggg cag gag agt aca gac act gag cag gca cct ggc aat          341
Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn
90                               95                               100

gac acc ttc tac tca ctg ggt ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc          389
Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser
105                               110                               115

gac tac tcc aat gag aag ccg ttc aca ggg ttt gag gcc ttc tat gca          437
Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala
120                               125                               130                               135

gcg gag gat gtg gat gaa tgc aga gtg tct ctg gga gac tca gtc cct          485
Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro
140                               145                               150

tgt gac cat tat tgc cac aac tac ttg ggc ggc tac tat tgc tcc tgc          533
Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys
155                               160                               165

aga gcg ggc tac att ctc cac cag aac aag cac acg tgc tca gcc ctt          581
Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu
170                               175                               180

tgt tca ggc cag gtg ttc aca gga aga tct ggg tat ctc agt agc cct          629
Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro
185                               190                               195

gag tac ccg cag cca tac ccc aag ctc tcc agc tgc acc tac agc atc          677
Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile
200                               205                               210                               215

cgc ctg gag gac ggc ttc agt gtc atc ctg gac ttc gtg gag tcc ttc          725
Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe
220                               225                               230

```

MD 4685 C1 2020.12.31

176

gat	gtg	gag	acg	cac	cct	gaa	gcc	cag	tgc	ccc	tat	gac	tcc	ctc	aag	773
Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	
			235					240					245			
att	caa	aca	gac	aag	ggg	gaa	cac	ggc	cca	ttt	tgt	ggg	aag	acg	ctg	821
Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Gly	Glu	His	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	
		250					255					260				
cct	ccc	agg	att	gaa	act	gac	agc	cac	aag	gtg	acc	atc	acc	ttt	gcc	869
Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	His	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Ala	
	265					270					275					
act	gac	gag	tcg	ggg	aac	cac	aca	ggc	tgg	aag	ata	cac	tac	aca	agc	917
Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	Thr	Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	
280					285				290						295	
aca	gca	cgg	ccc	tgc	cct	gat	cca	acg	gcg	cca	cct	aat	ggc	agc	att	965
Thr	Ala	Arg	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	
			300					305					310			
tca	cct	gtg	caa	gcc	acg	tat	gtc	ctg	aag	gac	agg	ttt	tct	gtc	ttc	1013
Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Arg	Phe	Ser	Val	Phe	
			315					320					325			
tgc	aag	aca	ggc	ttc	gag	ctt	ctg	caa	ggt	tct	gtc	ccc	ctg	aaa	tca	1061
Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	
		330				335						340				
ttc	act	gct	gtc	tgt	cag	aaa	gat	gga	tct	tgg	gac	cgg	ccg	atg	cca	1109
Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Met	Pro	
	345					350					355					
gag	tgc	agc	att	att	gat	tgt	ggc	cct	ccc	gat	gac	cta	ccc	aat	ggc	1157
Glu	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	Gly	Pro	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	
360					365					370					375	
cat	gtg	gac	tat	atc	aca	ggc	cct	caa	gtg	act	acc	tac	aaa	gct	gtg	1205
His	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Pro	Gln	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	
				380					385					390		
att	cag	tac	agc	tgt	gaa	gag	act	ttc	tac	aca	atg	agc	agc	aat	ggt	1253
Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	Phe	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	
			395					400					405			
aaa	tat	gtg	tgt	gag	gct	gat	gga	ttc	tgg	acg	agc	tcc	aaa	gga	gaa	1301
Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	
		410				415						420				
aaa	ctc	ccc	ccg	ggt	tgt	gag	cct	ggt	tgt	ggg	ctg	tcc	aca	cac	act	1349
Lys	Leu	Pro	Pro	Val	Cys	Glu	Pro	Val	Cys	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Thr	
	425					430					435					
ata	gga	gga	cgc	ata	ggt	gga	ggg	cag	cct	gca	aag	cct	ggt	gac	ttt	1397
Ile	Gly	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	
440					445					450					455	
cct	tgg	caa	gtc	ttg	ttg	ctg	ggt	caa	act	aca	gca	gca	gca	ggt	gca	1445
Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	Gln	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	
				460					465					470		
ctt	ata	cat	gac	aat	tgg	gtc	cta	aca	gcc	gct	cat	gct	gta	tat	gag	1493
Leu	Ile	His	Asp	Asn	Trp	Val	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	
			475					480					485			
aaa	aga	atg	gca	gcg	tcc	tcc	ctg	aac	atc	cga	atg	ggc	atc	ctc	aaa	1541
Lys	Arg	Met	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Arg	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	
		490					495					500				
agg	ctc	tca	cct	cat	tac	act	caa	gcc	tgg	ccc	gag	gaa	atc	ttt	ata	1589
Arg	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Thr	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Glu	Ile	Phe	Ile	
		505				510					515					
cat	gaa	ggc	tac	act	cac	ggt	gct	ggt	ttt	gac	aat	gat	ata	gca	ttg	1637
His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Gly	Ala	Gly	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	
520					525					530					535	

MD 4685 C1 2020.12.31

177

```

att aaa ctc aag aac aaa gtc aca atc aac gga agc atc atg cct gtt      1685
Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val
      540                      545                      550

tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act      1733
Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr
      555                      560                      565

gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga      1781
Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg
      570                      575                      580

aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc      1829
Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr
      585                      590                      595

acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg      1877
Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met
      600                      605                      610

ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac      1925
Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp
      620                      625                      630

agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt      1973
Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe
      635                      640                      645

gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc      2021
Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly
      650                      655                      660

cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag      2069
Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu
      665                      670                      675

aac ata ata agt aat ttc taa      2090
Asn Ile Ile Ser Asn Phe
      680                      685

<210> 51
<211> 685
<212> PRT
<213> Murină

<400> 51

Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr
1                      5                      10                      15

Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser
20                      25                      30

Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
35                      40                      45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50                      55                      60

Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65                      70                      75                      80

Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85                      90                      95

Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser
100                      105                      110

```

MD 4685 C1 2020.12.31

178

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val
130 135 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu
145 150 155 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn
165 170 175

Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg
180 185 190

Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu
195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly
245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His
260 265 270

Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly
275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr
290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu
305 310 315 320

Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln
325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro
355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln
370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe

MD 4685 C1 2020.12.31

179

[illegible]

MD 4685 C1 2020.12.31

180

<400> 52

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
85 90 95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
115 120 125

Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
130 135 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln
145 150 155 160

Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly
165 170 175

Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys
180 185 190

Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val
195 200 205

Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala
210 215 220

Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His
225 230 235 240

Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser
245 250 255

His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr
260 265 270

Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro
275 280 285

MD 4685 C1 2020.12.31

181

Thr	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val	290	295	300
Leu	Lys	Asp	Arg	Phe	Ser	Val	Phe	Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	305	310	315
Gln	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	325	330	335
Gly	Ser	Trp	Asp	Arg	Pro	Met	Pro	Glu	Cys	Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	Gly	340	345	350
Pro	Pro	Asp	Asp	Leu	Pro	Asn	Gly	His	Val	Asp	Tyr	Ile	Thr	Gly	Pro	355	360	365
Gln	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Ala	Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Cys	Glu	Glu	Thr	370	375	380
Phe	Tyr	Thr	Met	Ser	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	Asp	Gly	385	390	395
Phe	Trp	Thr	Ser	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Leu	Pro	Pro	Val	Cys	Glu	Pro	405	410	415
Val	Cys	Gly	Leu	Ser	Thr	His	Thr	Ile	Gly	Gly	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	420	425	430
Gln	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Asp	Phe	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Gly	435	440	445
Gln	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	His	Asp	Asn	Trp	Val	Leu	450	455	460
Thr	Ala	Ala	His	Ala	Val	Tyr	Glu	Lys	Arg	Met	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	465	470	475
Asn	Ile	Arg	Met	Gly	Ile	Leu	Lys	Arg	Leu	Ser	Pro	His	Tyr	Thr	Gln	485	490	495
Ala	Trp	Pro	Glu	Glu	Ile	Phe	Ile	His	Glu	Gly	Tyr	Thr	His	Gly	Ala	500	505	510
Gly	Phe	Asp	Asn	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Lys	Leu	Lys	Asn	Lys	Val	Thr	515	520	525
Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	Met	Pro	Val	Cys	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ala	Ala	530	535	540
Ser	Leu	Met	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr	Val	Ala	Gly	Trp	Gly	Leu	545	550	555
Thr	Gln	Lys	Gly	Leu	Leu	Ala	Arg	Asn	Leu	Met	Phe	Val	Asp	Ile	Pro	565	570	575
Ile	Ala	Asp	His	Gln	Lys	Cys	Thr	Thr	Val	Tyr	Glu	Lys	Leu	Tyr	Pro	580	585	590

MD 4685 C1 2020.12.31

182

Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly
595 600 605

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
610 615 620

Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
625 630 635 640

Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
645 650 655

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe
660 665 670

<210> 53
<211> 2091
<212> ADN
<213> Rat

<220>
<221> CDS
<222> (10)..(2067)

<400> 53
tggcacaca atg agg cta ctg atc gtc ctg ggt ctg ctt tgg agt ttg gtg 51
Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val
1 5 10

gcc aca ctt ttg ggc tcc aag tgg cct gag cct gta ttc ggg cgc ctg 99
Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
15 20 25 30

gtg tcc ctg gcc ttc cca gag aag tat ggc aac cat cag gat cga tcc 147
Val Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser
35 40 45

tgg acg ctg act gca ccc cct ggc ttc cgc ctg cgc ctc tac ttc acc 195
Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr
50 55 60

cac ttc aac ctg gaa ctc tct tac cgc tgc gag tat gac ttt gtc aag 243
His Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys
65 70 75

ttg acc tca ggg acc aag gtg cta gcc acg ctg tgt ggg cag gag agt 291
Leu Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser
80 85 90

aca gat act gag cgg gca cct ggc aat gac acc ttc tac tca ctg ggt 339
Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly
95 100 105 110

ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc gac tac tcc aat gag aag cca 387
Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro
115 120 125

ttc aca gga ttt gag gcc ttc tat gca gcg gag gat gtg gat gaa tgc 435
Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys
130 135 140

aga aca tcc ctg gga gac tca gtc cct tgt gac cat tat tgc cac aac 483
Arg Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn
145 150 155

tac ctg ggc ggc tac tac tgc tcc tgc cga gtg ggc tac att ctg cac 531
Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His
160 165 170

MD 4685 C1 2020.12.31

183

cag aac aag cat acc tgc tca gcc ctt tgt tca ggc cag gtg ttc act	579
Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr	
175 180 185 190	
ggg agg tct ggc ttt ctc agt agc cct gag tac cca cag cca tac ccc	627
Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro	
195 200 205	
aaa ctc tcc agc tgc gcc tac aac atc cgc ctg gag gaa ggc ttc agt	675
Lys Leu Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser	
210 215 220	
atc acc ctg gac ttc gtg gag tcc ttt gat gtg gag atg cac cct gaa	723
Ile Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu	
225 230 235	
gcc cag tgc ccc tac gac tcc ctc aag att caa aca gac aag agg gaa	771
Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu	
240 245 250	
tac ggc ccg ttt tgt ggg aag acg ctg ccc ccc agg att gaa act gac	819
Tyr Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Arg Ile Glu Thr Asp	
255 260 265 270	
agc aac aag gtg acc att acc ttt acc acc gac gag tca ggg aac cac	867
Ser Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Asp Glu Ser Gly Asn His	
275 280 285	
aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc aca gca cag ccc tgc cct gat	915
Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp	
290 295 300	
cca acg gcg cca cct aat ggt cac att tca cct gtg caa gcc acg tat	963
Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr	
305 310 315	
gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt	1011
Val Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu	
320 325 330	
ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aag tca ttc act gct gtc tgt cag aaa	1059
Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys	
335 340 345 350	
gat gga tct tgg gac cgg ccg ata cca gag tgc agc att att gac tgt	1107
Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys	
355 360 365	
ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc cac gtg gac tat atc aca ggc	1155
Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly	
370 375 380	
cct gaa gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac agc tgt gaa gag	1203
Pro Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu	
385 390 395	
act ttc tac aca atg agc agc aat ggt aaa tat gtg tgt gag gct gat	1251
Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp	
400 405 410	
gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tcc ctc ccg gtt tgc aag	1299
Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys	
415 420 425 430	
cct gtc tgt gga ctg tcc aca cac act tca gga ggc cgt ata att gga	1347
Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly	
435 440 445	
gga cag cct gca aag cct ggt gac ttt cct tgg caa gtc ttg tta ctg	1395
Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu	
450 455 460	
ggt gaa act aca gca gca ggt gct ctt ata cat gac gac tgg gtc cta	1443
Gly Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu	

MD 4685 C1 2020.12.31

184

465	470	475	
aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu 480 485 490			1491
gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln 495 500 505 510			1539
gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala 515 520 525			1587
ggg ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr 530 535 540			1635
atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala 545 550 555			1683
tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu 560 565 570			1731
acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro 575 580 585 590			1779
att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr 595 600 605			1827
cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg 610 615 620			1875
ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe 625 630 635			1923
cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp 640 645 650			1971
ggg tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys 655 660 665 670			2019
gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe 675 680 685			2067
tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa			2091

<210> 54
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> de şobolan

<400> 54

Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr 1 5 10 15
Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser 20 25 30
Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr 35 40 45

MD 4685 C1 2020.12.31

185

Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Phe	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe	50	55	60	
Asn	Leu	Glu	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Thr	65	70	75	80
Ser	Gly	Thr	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	Asp	85	90	95	
Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Asn	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Pro	Ser	100	105	110	
Leu	Lys	Val	Thr	Phe	His	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr	115	120	125	
Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Val	Asp	Glu	Cys	Arg	Thr	130	135	140	
Ser	Leu	Gly	Asp	Ser	Val	Pro	Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr	Leu	145	150	155	160
Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Val	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	Gln	Asn	165	170	175	
Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu	Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gly	Arg	180	185	190	
Ser	Gly	Phe	Leu	Ser	Ser	Pro	Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu	195	200	205	
Ser	Ser	Cys	Ala	Tyr	Asn	Ile	Arg	Leu	Glu	Glu	Gly	Phe	Ser	Ile	Thr	210	215	220	
Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe	Asp	Val	Glu	Met	His	Pro	Glu	Ala	Gln	225	230	235	240
Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys	Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Arg	Glu	Tyr	Gly	245	250	255	
Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	Asn	260	265	270	
Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Thr	Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	Thr	Gly	275	280	285	
Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser	Thr	Ala	Gln	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Thr	290	295	300	
Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	His	Ile	Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val	Leu	305	310	315	320
Lys	Asp	Ser	Phe	Ser	Val	Phe	Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	Gln	325	330	335	
Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	Gln	Lys	Asp	Gly	340	345	350	

MD 4685 C1 2020.12.31

186

```

Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro
   355                               360                   365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu
   370                               375                   380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
   385                               390                   395                   400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe
                               405                   410                   415

Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro Val
                               420                   425                   430

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln
   435                               440                   445

Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Glu
   450                               455                   460

Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala
   465                               470                   475                   480

Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile
                               485                   490                   495

Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala Trp
   500                               505                   510

Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe
   515                               520                   525

Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn
   530                               535                   540

Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu
   545                               550                   555                   560

Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln
                               565                   570                   575

Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Val
   580                               585                   590

Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro Gly
   595                               600                   605

Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly
   610                               615                   620

Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp
   625                               630                   635                   640

Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser

```

MD 4685 C1 2020.12.31

187

645

650

655

Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr
660 665 670

Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
675 680 685

<210> 55
<211> 670
<212> PRT
<213> de şobolan

<400> 55

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val
1 5 10 15

Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
85 90 95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
115 120 125

Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
130 135 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln
145 150 155 160

Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly
165 170 175

Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys
180 185 190

Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile
195 200 205

Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala
210 215 220

Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr

MD 4685 C1 2020.12.31

188

225		230		235		240
Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser						
		245		250		255
Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr						
		260		265		270
Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro						
		275		280		285
Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val						
		290		295		300
Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu						
		305		310		315
Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp						
		325		330		335
Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly						
		340		345		350
Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro						
		355		360		365
Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr						
		370		375		380
Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly						
		385		390		395
Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro						
		405		410		415
Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly						
		420		425		430
Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly						
		435		440		445
Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr						
		450		455		460
Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp						
		465		470		475
Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala						
		485		490		495
Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly						
		500		505		510
Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile						
		515		520		525

MD 4685 C1 2020.12.31

189

Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser
530 535 540

Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
545 550 555 560

Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile
565 570 575

Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro
580 585 590

Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly
595 600 605

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
610 615 620

Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
625 630 635 640

Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
645 650 655

Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
660 665 670

<210> 56
<211> 28
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Homo Sapiens

<400> 56
atgaggctgc tgaccctcct gggccttc 28

<210> 57
<211> 23
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Homo Sapiens

<400> 57
gtgcccctcc tgcgtcacct ctg 23

<210> 58
<211> 23
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Homo Sapiens

<400> 58
cagaggtgac gcaggagggg cac 23

<210> 59
<211> 27
<212> ADN

MD 4685 C1 2020.12.31

190

<213> Secvență artificială

<220>
<223> Homo Sapiens

<400> 59
ttaaaatcac taattatggt ctcgac 27

<210> 60
<211> 22
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Murine

<400> 60
atgaggctac tcattcttcct gg 22

<210> 61
<211> 23
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Murină

<400> 61
ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23

<210> 62
<211> 23
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Murină

<400> 62
ccccccctgc gtcacctctg cag 23

<210> 63
<211> 29
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Murină

<400> 63
ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29

<210> 64
<211> 29
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> de șobolan

<400> 64
gaggtgacgc aggaggggca ttagtggtt 29

<210> 65
<211> 37
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>

MD 4685 C1 2020.12.31

191

<223> de șobolan

<400> 65
ctagaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca

37

<210> 66
<211> 354
<212> ADN
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 66
caggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg 60
acctgcaccg tctctgggtt ctactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt 120
cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgagtga cgaaaaatcc 180
tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240
gtccttacaa tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300
cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 67
<211> 118
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 67

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly
20 25 30

Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 121
<212> PRT
<213> Secvență artificială

MD 4685 C1 2020.12.31

192

<220>

<223> Sintetică

<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69

<211> 318

<212> ADN

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Sintetică

<220>

<221> misc_feature

<222> (246)..(246)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 69

cagccagtg cagccagcc cccctcactg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60

acctgctctg gagagaaatt gggggataaa tatgcttact ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcccttg tggttggtcat gtatcaagat aaacagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctgggt ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240

gatgangctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggeggaggg 300

accaagctga ccgtccta 318

<210> 70

<211> 106

<212> PRT

<213> Secvență artificială

<220>

<223> Sintetică

<400> 70

MD 4685 C1 2020.12.31

193

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 71
<211> 120
<212> PRT
<213> Secvență artificială

<220>
<223> Sintetică

<400> 71

Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Arg Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Gly Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ile Ala Thr Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly
100 105 110

Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
115 120

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Thiel et al. Nature, no. 386, 1997, p. 506-510
2. Vorup Jensen et al. J. Immunol., no 165, 2000, p. 2093-2100
3. Ambrus et al. J. Immunol., no 170, 2003, p. 1374-1382
4. Kilpatrick. Biochim., Biophys. Acta, no 1572, 2002, p. 401-413
5. Takahashi M. et al. J. Exp. Med., no 207 (1), 2010, p. 29-37

(57) Revendicări:

1. Metodă de tratament al unui subiect uman, care suferă de microangiopatie trombotică persistentă (TMA) asociată cu transplant de celule stem hematopoietice (HSCT-TMA), cuprinzând administrarea la subiect a unei compoziții, care conține o cantitate dintr-un anticorp inhibitor al MASP-2 sau fragment al acestuia de legare a antigenului, eficientă pentru a inhiba activarea complementului dependentă de MASP-2.

2. Metodă, conform revendicării 1, în care anticorpul inhibitor al MASP-2 reprezintă un anticorp monoclonal sau fragment al acestuia care se leagă în mod specific la MASP-2 umană.

3. Metodă, conform revendicării 1, în care anticorpul sau fragmentul acestuia se selectează din grupul constând dintr-un anticorp recombinant, un anticorp având funcție efectoare redusă, un anticorp himeric, un anticorp umanizat și un anticorp uman.

4. Metodă, conform revendicării 1, în care anticorpul inhibitor al MASP-2 practic nu inhibă calea clasică.

5. Metodă, conform revendicării 1, în care anticorpul inhibitor al MASP-2 inhibă depunerea C3b în 90% ser uman cu valoarea IC_{50} de 30 nM sau mai mică.

6. Metodă, conform revendicării 1, în care anticorpul inhibitor al MASP-2 se administrează sistemic unui subiect.

7. Metodă, conform revendicării 1, în care metoda prevede suplimentar identificarea unui subiect uman cu TMA persistentă asociată cu transplant de celule stem hematopoietice (HSCT-TMA) până la etapa de administrare la subiect a unei compoziții cuprinzând o cantitate de anticorp inhibitor al MASP-2 sau de fragment al acestuia de legare la antigen, eficientă pentru inhibarea activării complementului dependentă de MASP-2.

8. Metodă, conform revendicării 1, în care subiectul a fost anterior supus sau este supus la momentul dat tratamentului cu un anticorp anti-C5 umanizat sau cu un fragment al acestuia de legare la antigen.

9. Metodă, conform revendicării 1, în care anticorpul inhibitor al MASP-2 sau fragmentul acestuia de legare la antigen se administrează într-o cantitate eficientă pentru a îmbunătăți cel puțin de unul sau mai mulți dintre următorii parametri clinici asociați cu TMA persistentă asociată cu transplant de celule stem hematopoietice: (i) o creștere a numărului de trombocite (de exemplu, cel puțin de două, cel puțin de trei, cel puțin de patru ori), comparativ cu numărul de trombocite până la tratament; (ii) o creștere a haptoglobinei; (iii) o reducere a lactatdehidrogenazei (LDH) și/sau (iv) o reducere a creatininei.

10. Metodă, conform revendicării 1, în care anticorpul inhibitor al MASP-2 sau fragmentul acestuia de legare la antigen cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu conținând CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 ale secvenței de aminoacizi, notată ca SECV ID NR: 67 și o regiune variabilă a lanțului ușor conținând CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 ale secvenței de aminoacizi, notată ca SECV ID NR: 70.

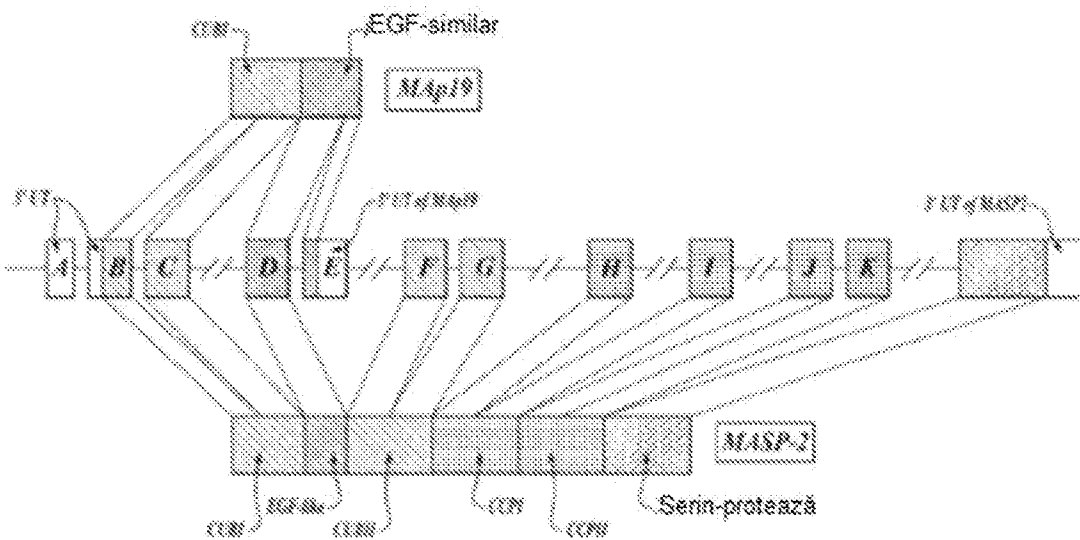


Fig. 1

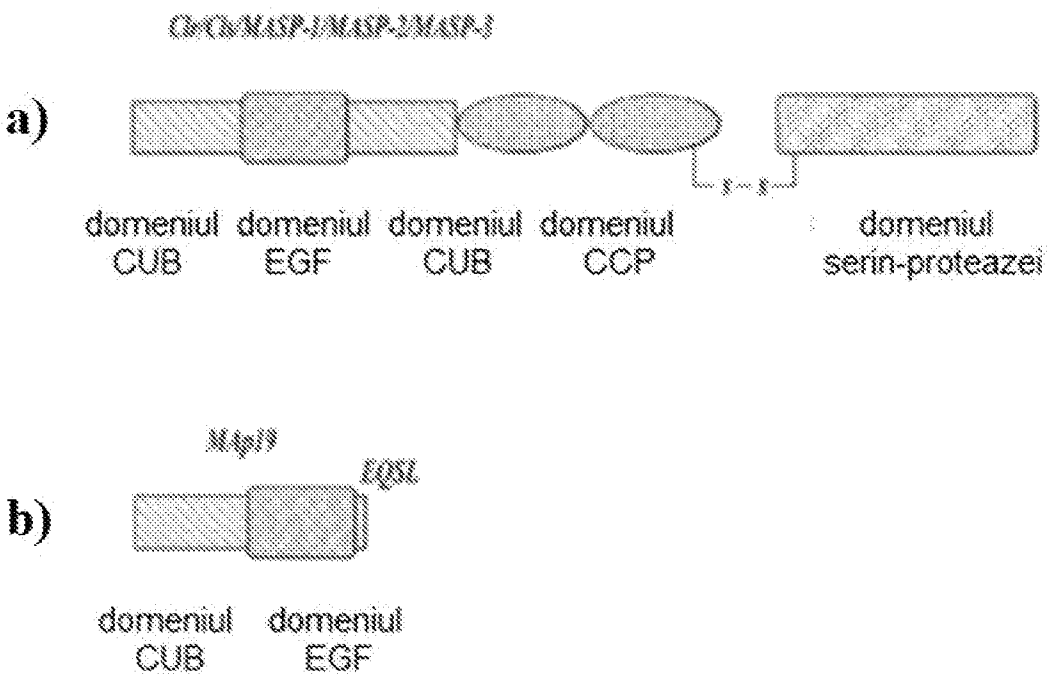


Fig. 2

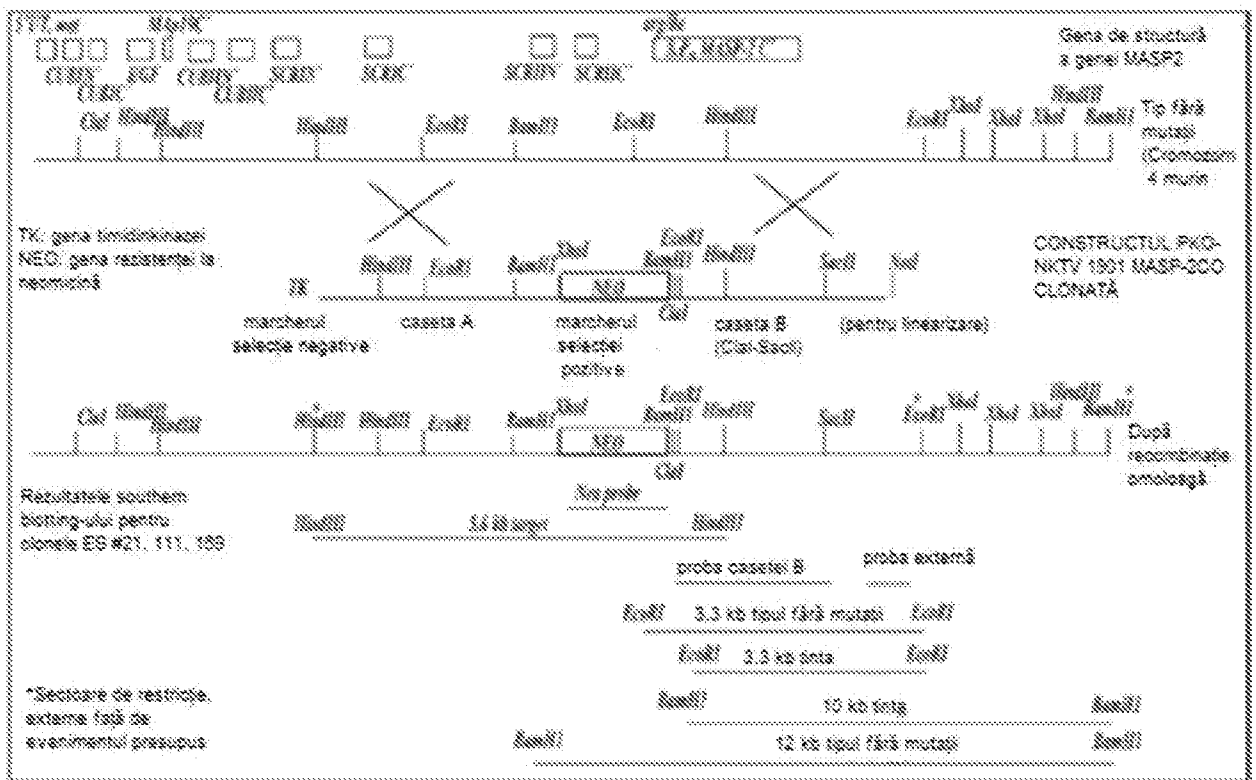


Fig. 3

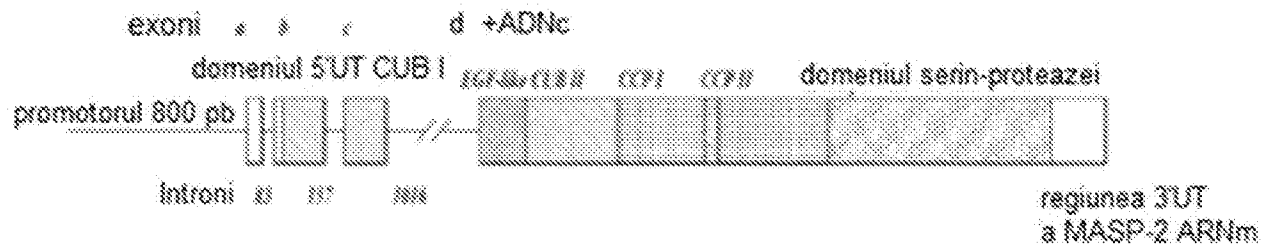


Fig. 4

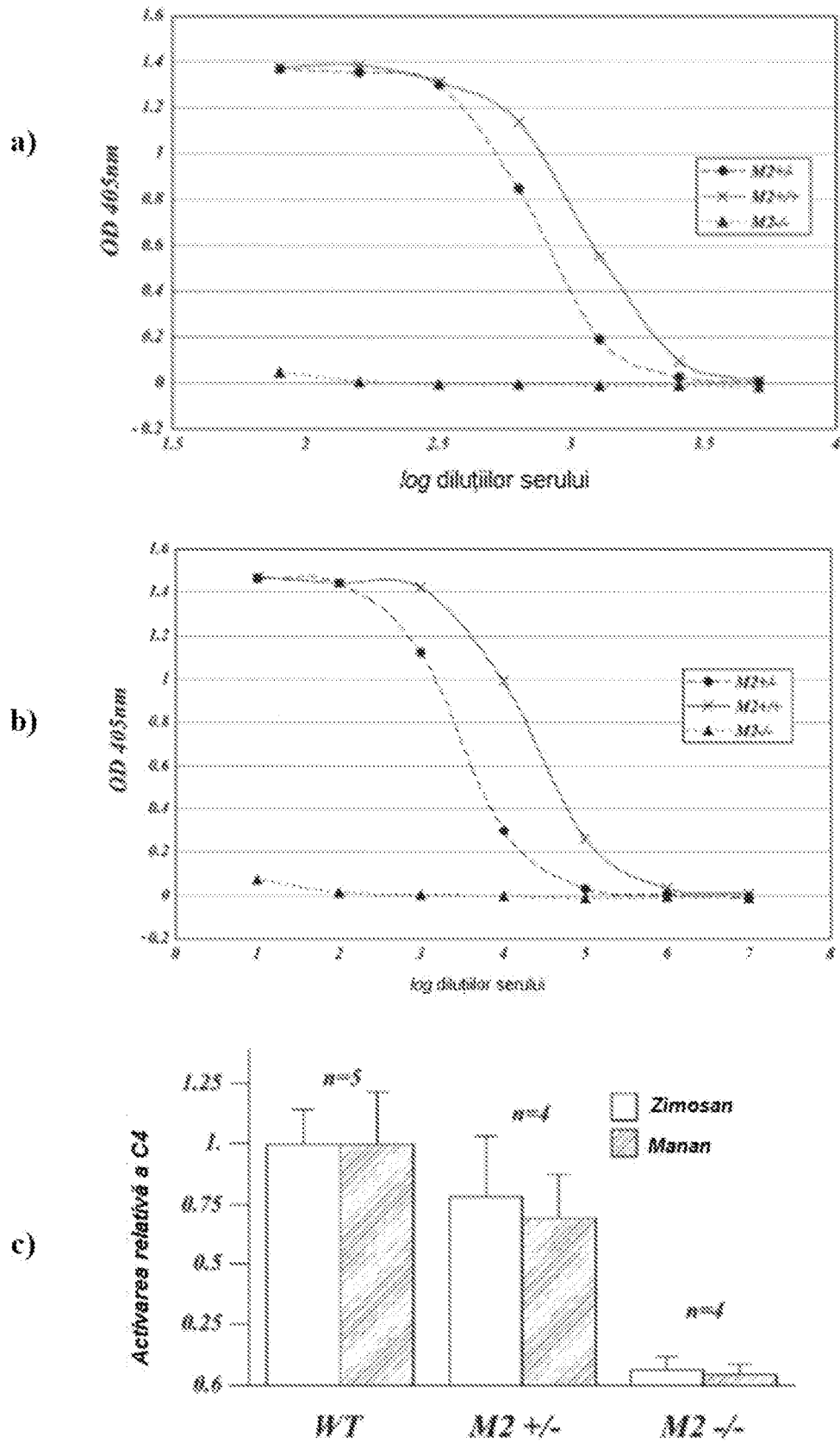


Fig. 5

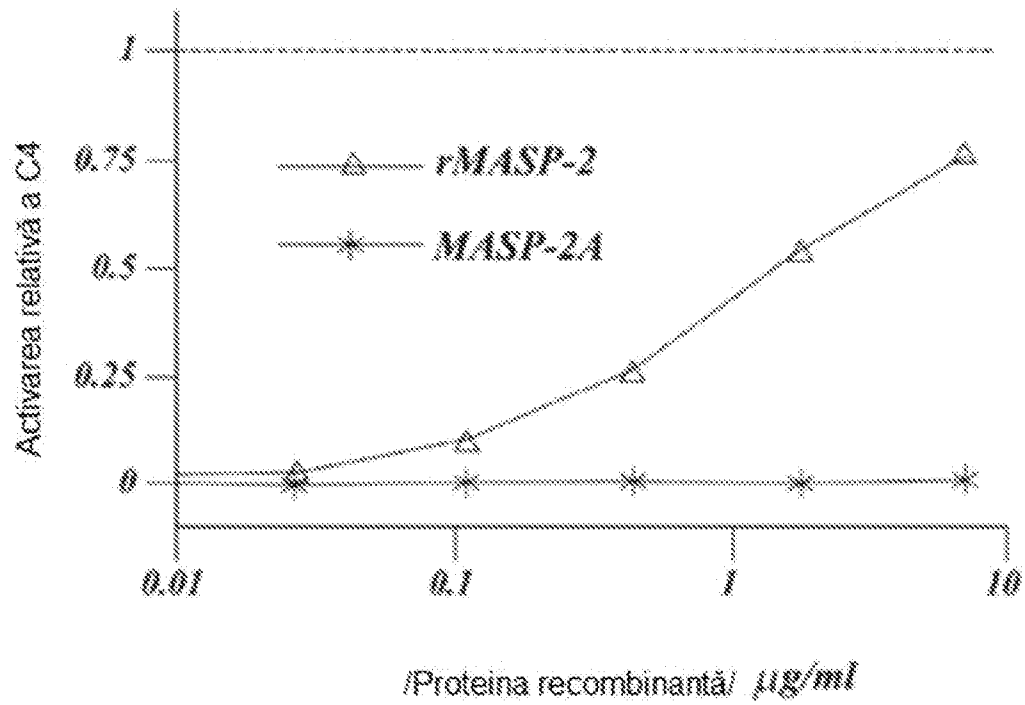


Fig. 6

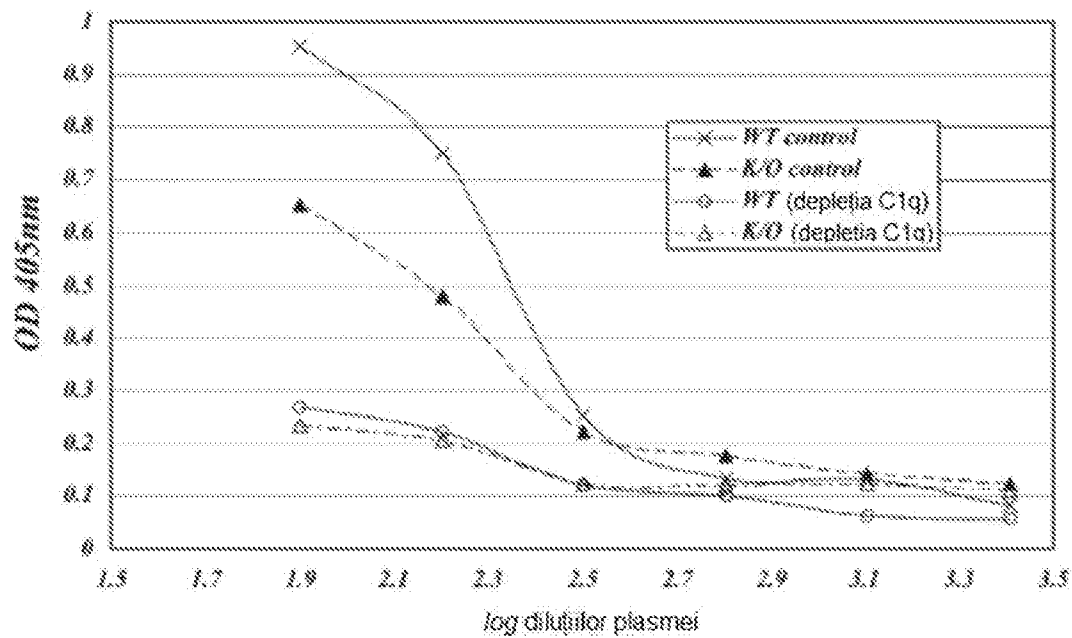


Fig. 7

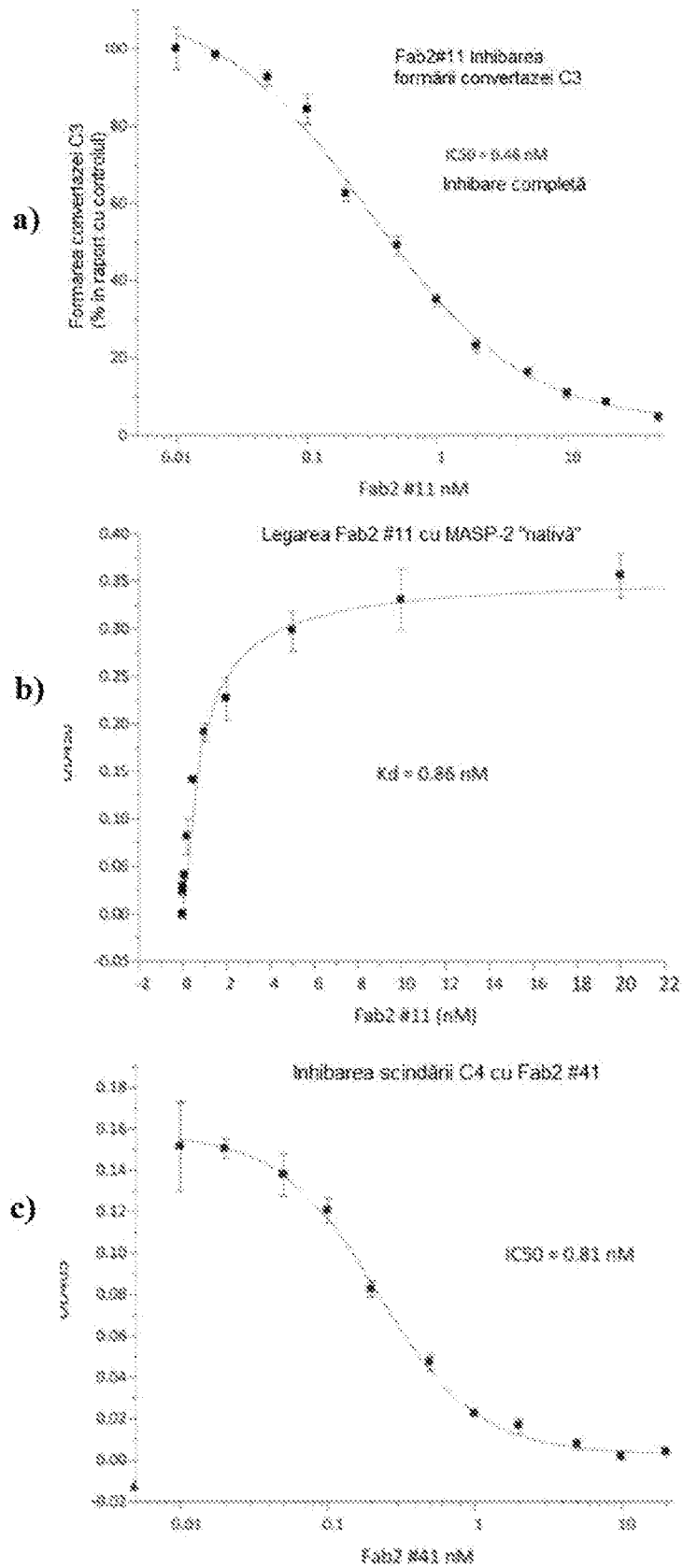


Fig. 8

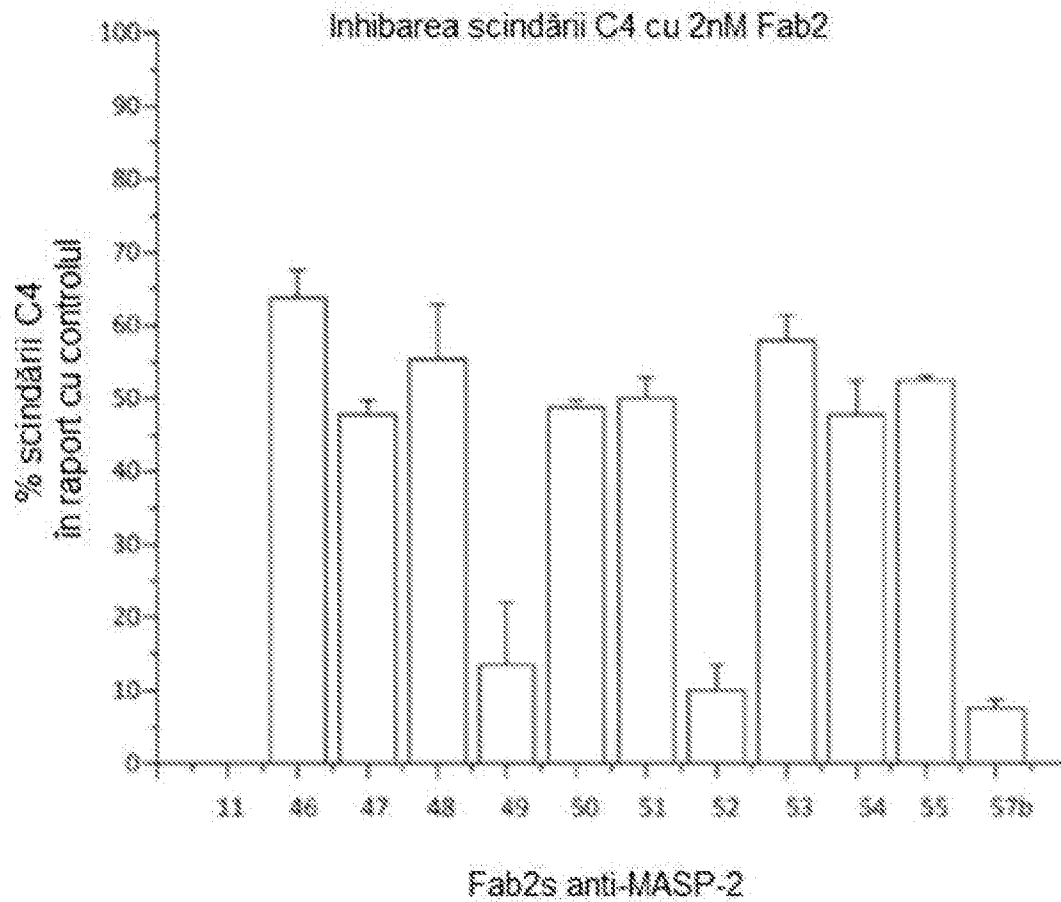


Fig. 9

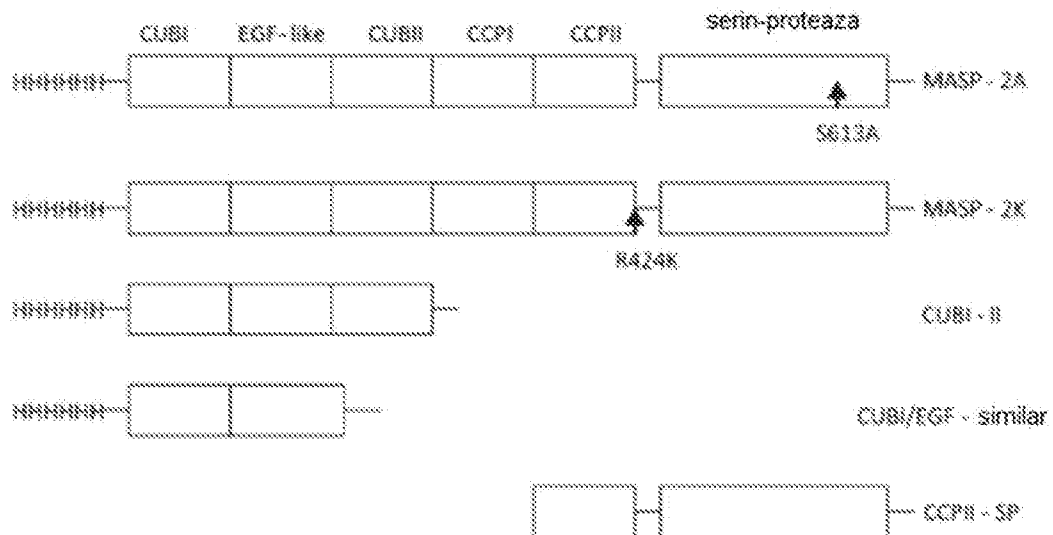


Fig. 10

Legarea AbD Ab #40 și #60 cu
polipeptidele MASP-2 de șobolan

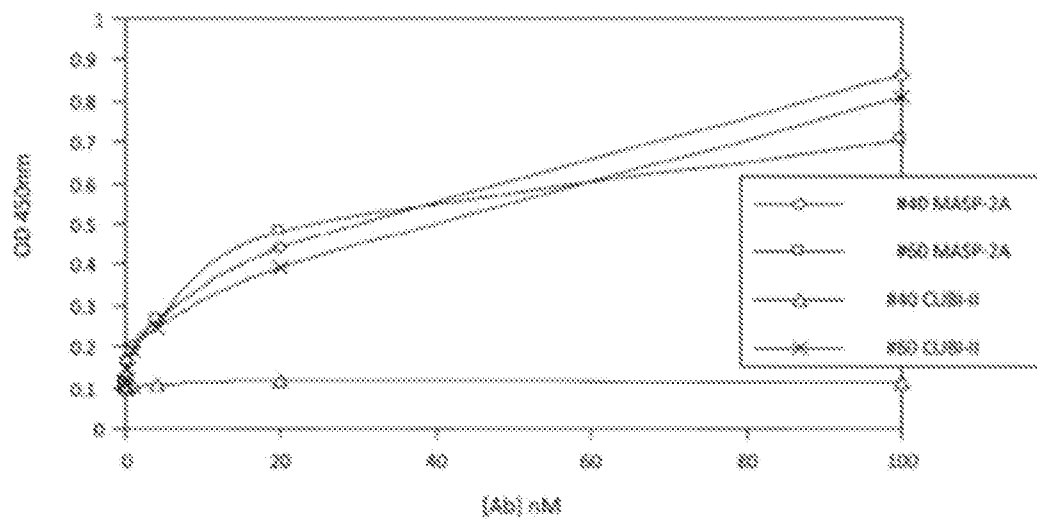


Fig. 11

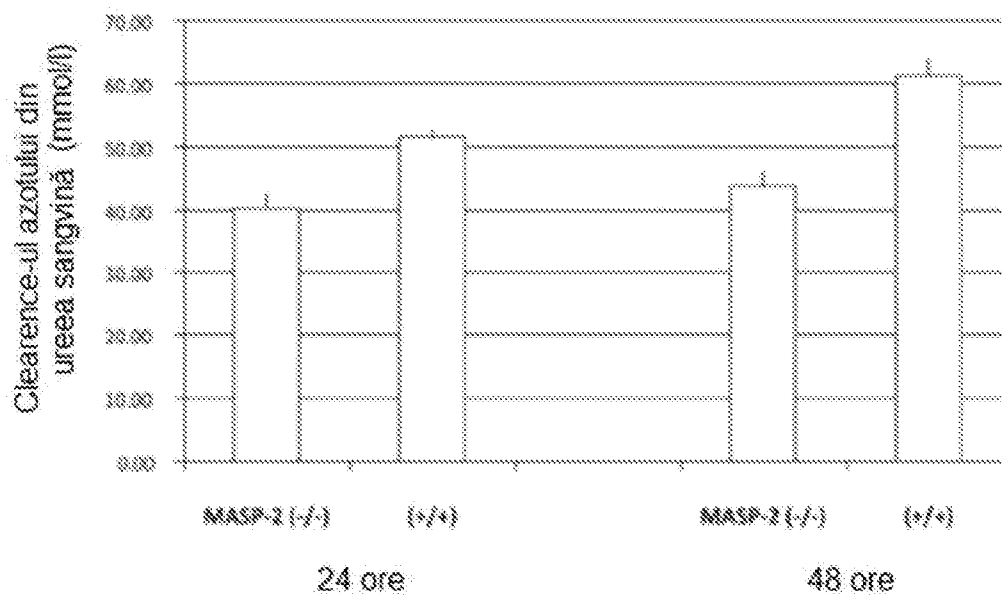


Fig. 12

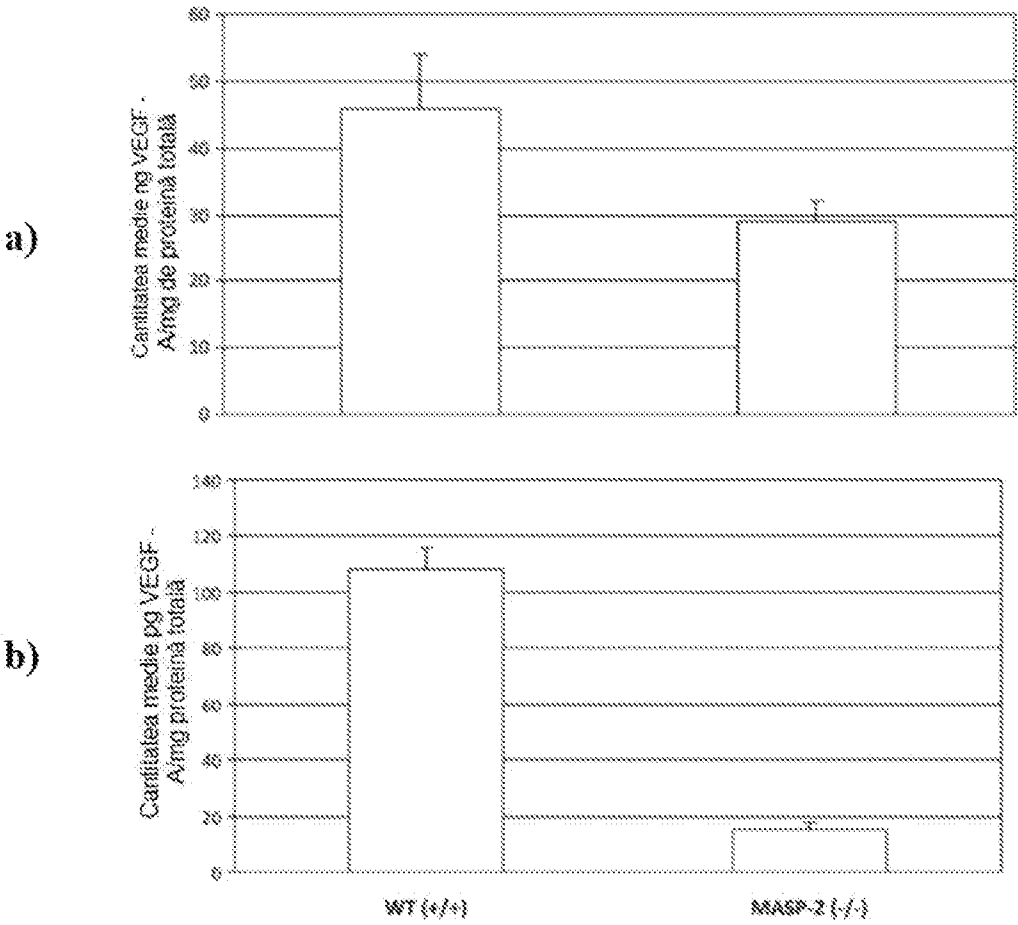


Fig. 13

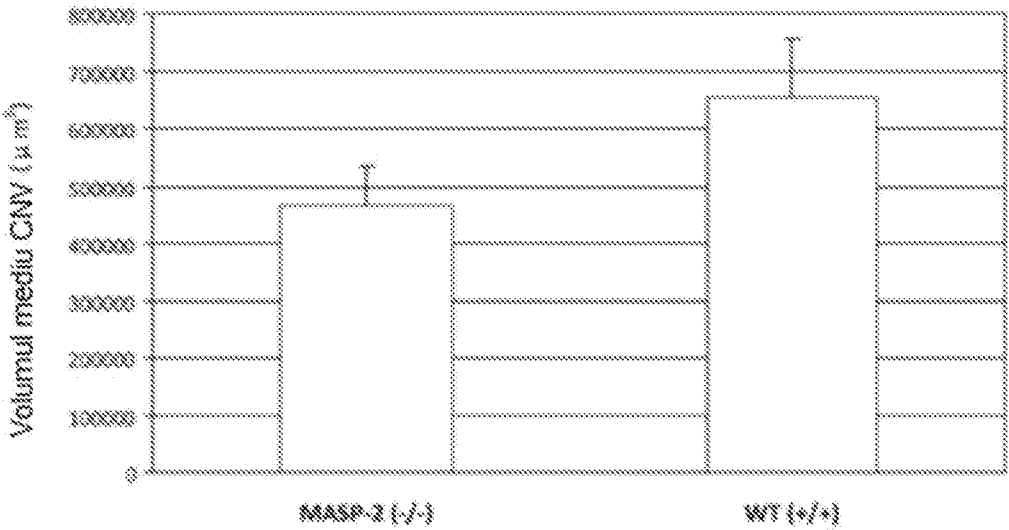


Fig. 14

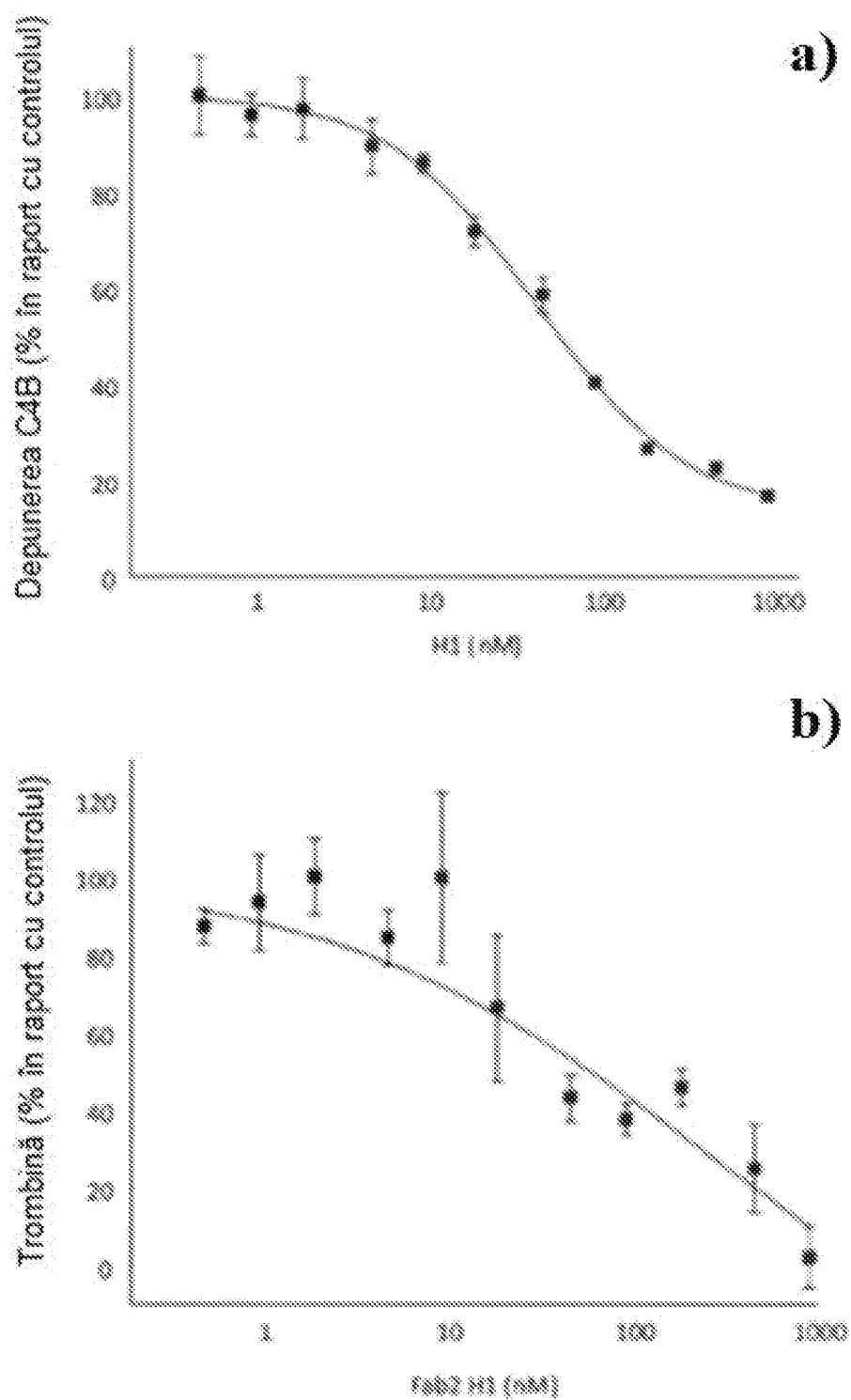


Fig. 15

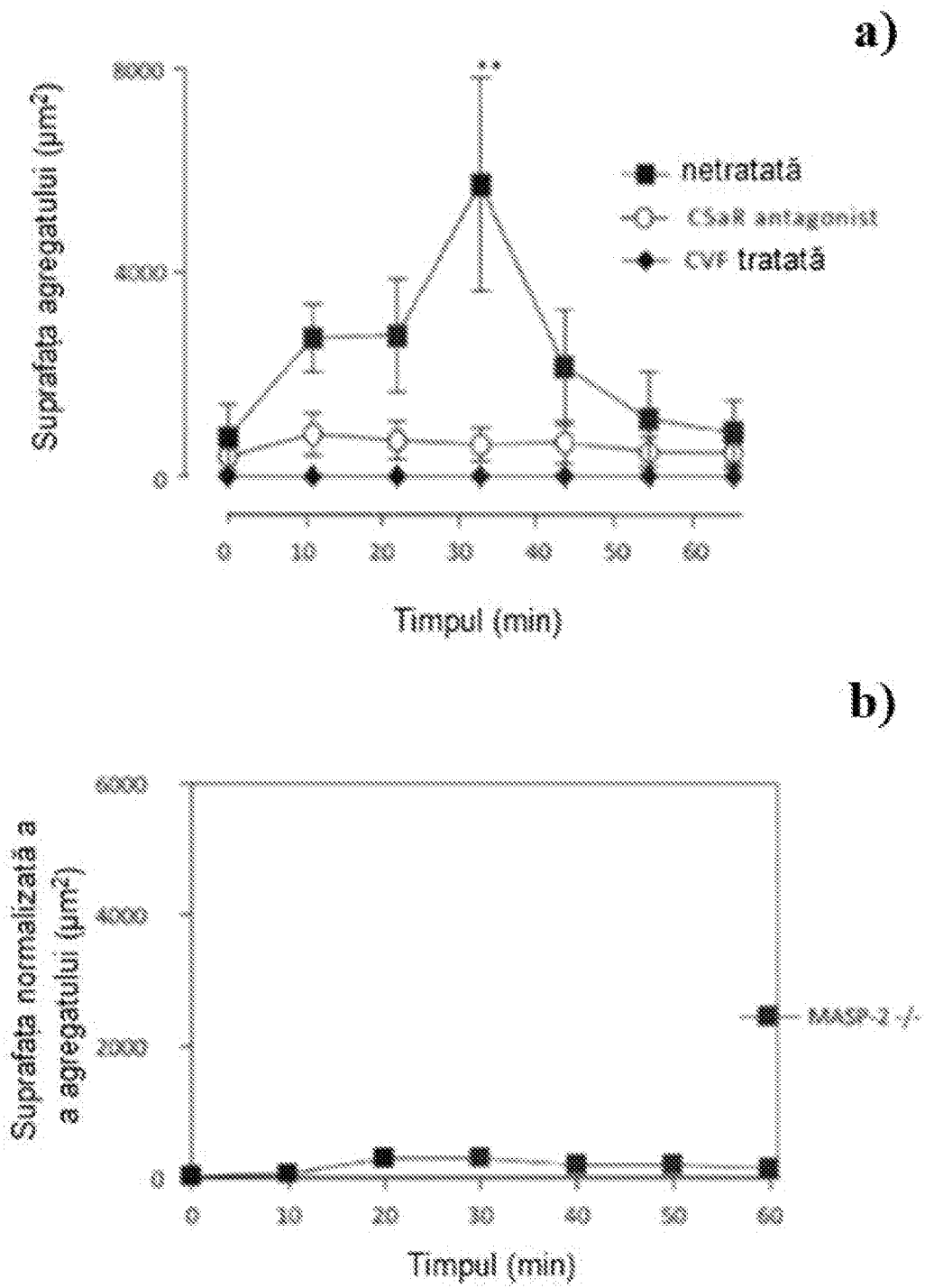


Fig. 16

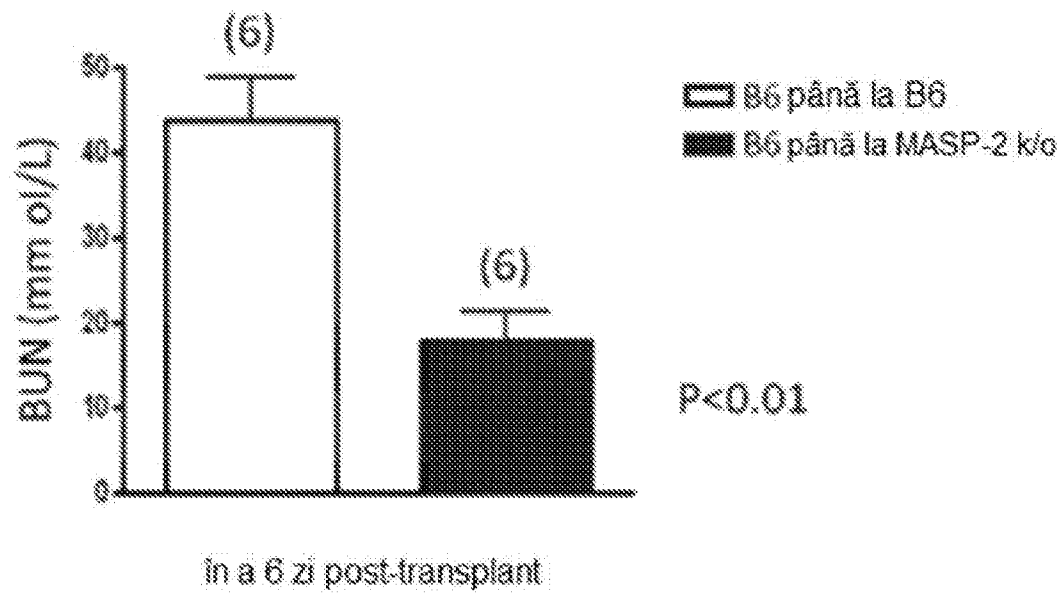


Fig. 17

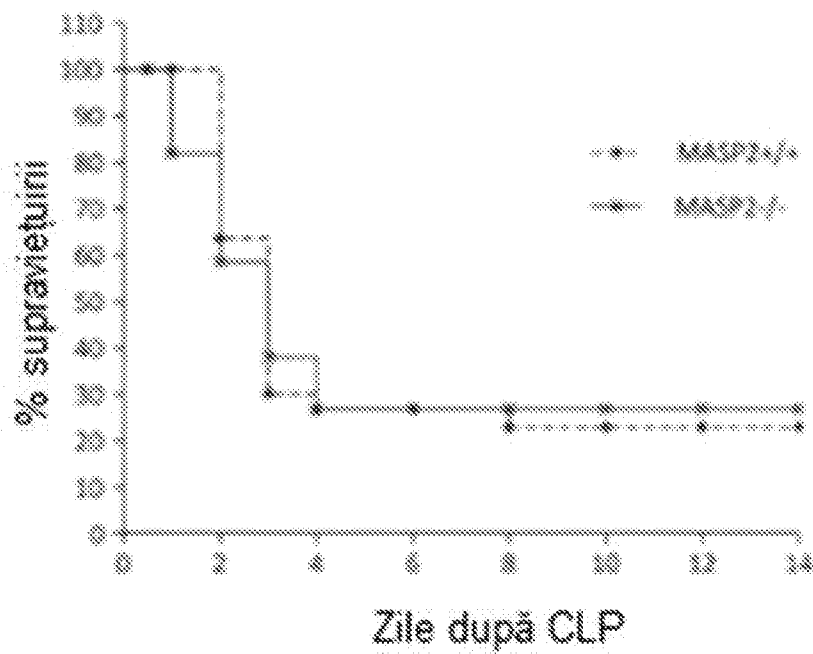


Fig. 18

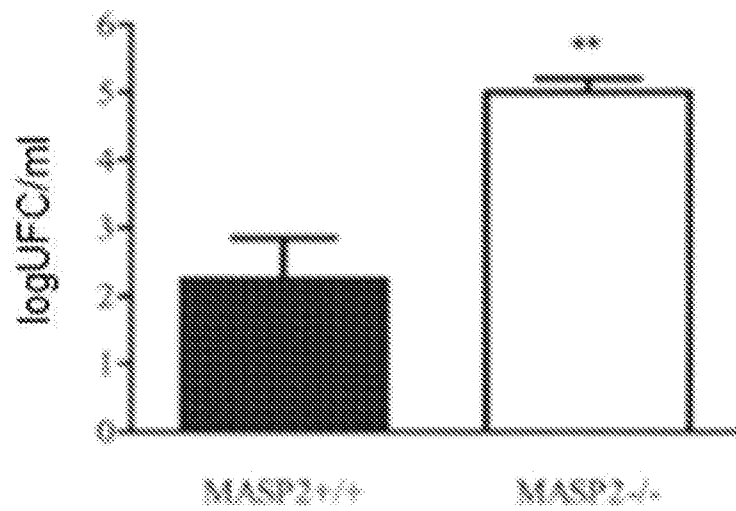


Fig. 19

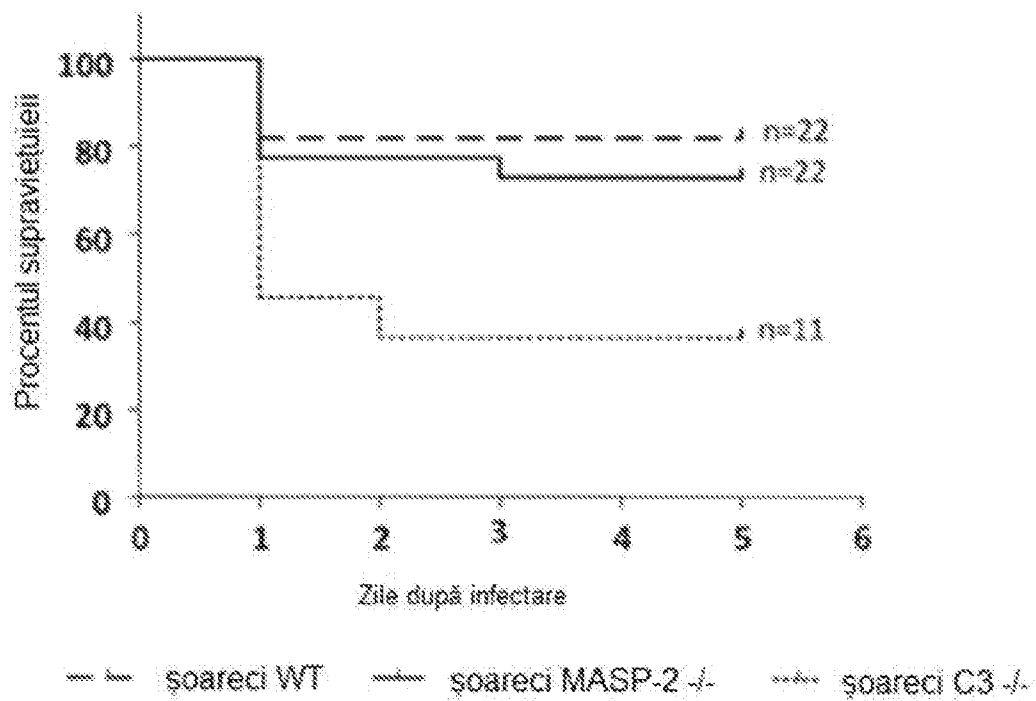


Fig. 20

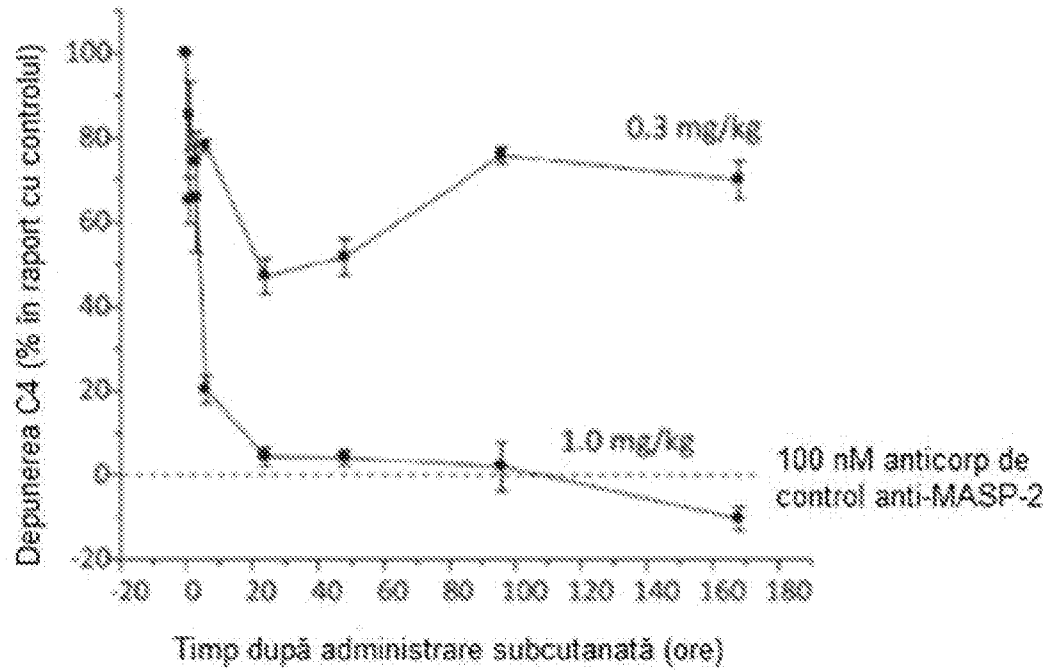


Fig. 21

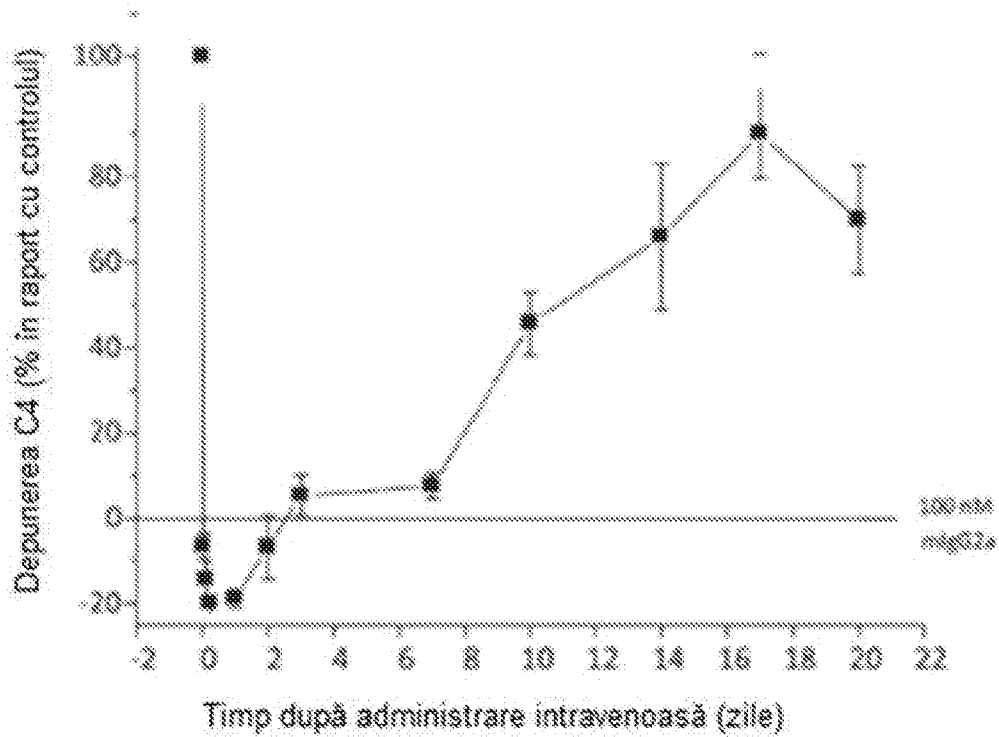


Fig. 22

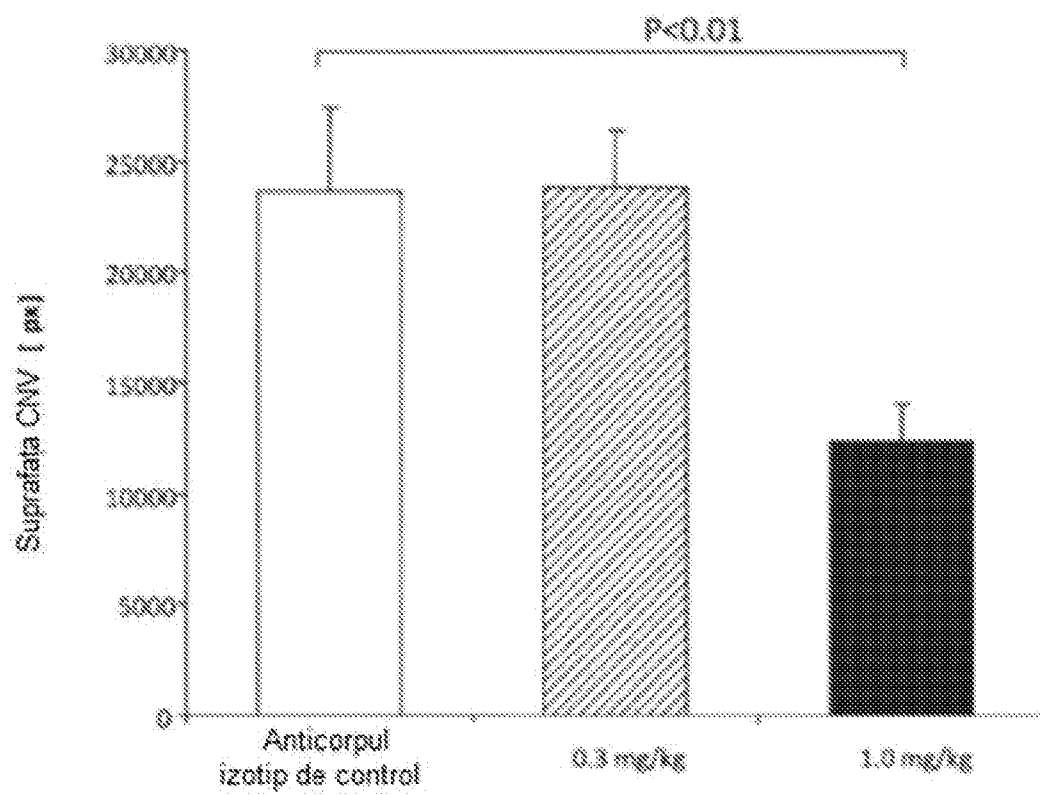


Fig. 23

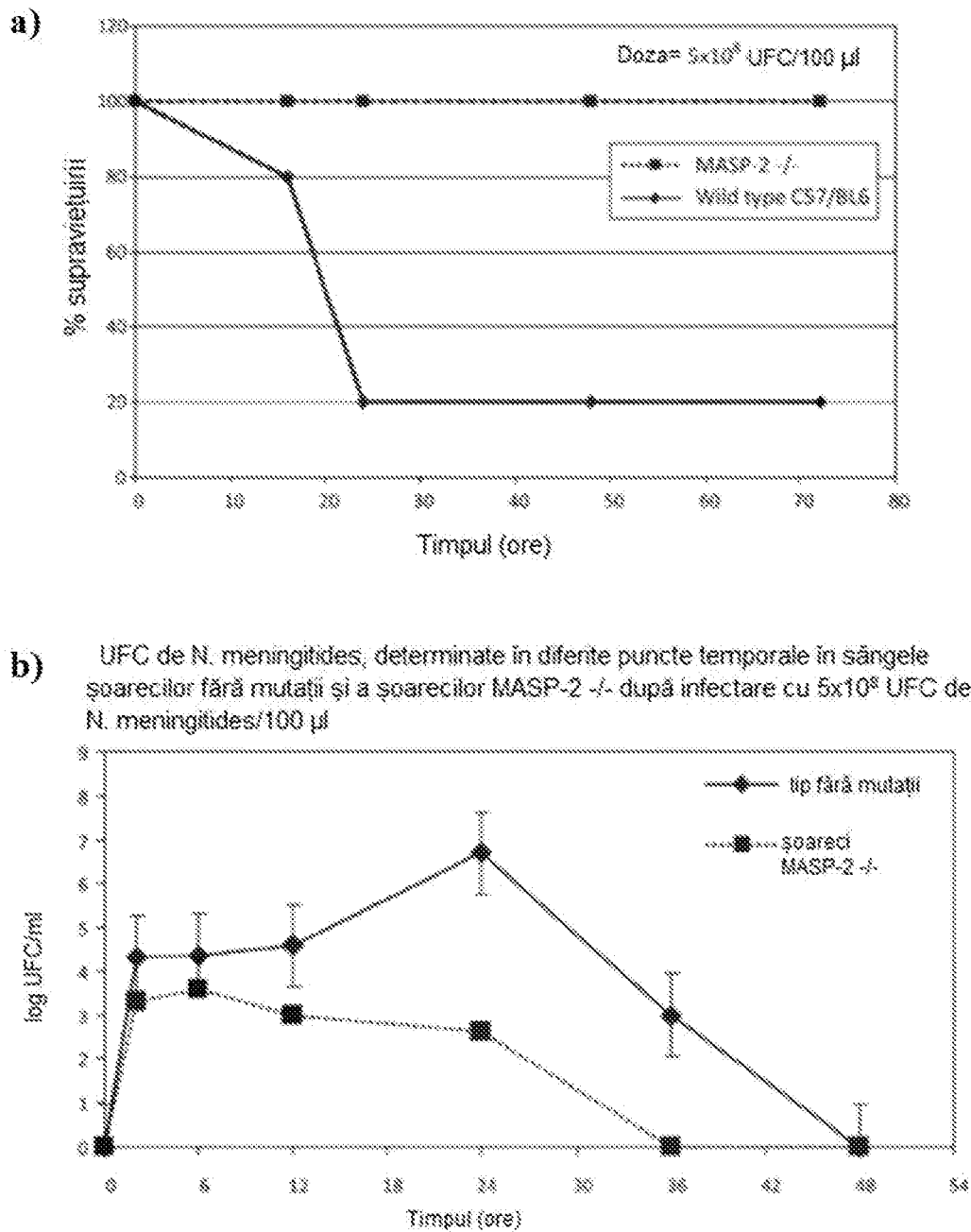


Fig. 24

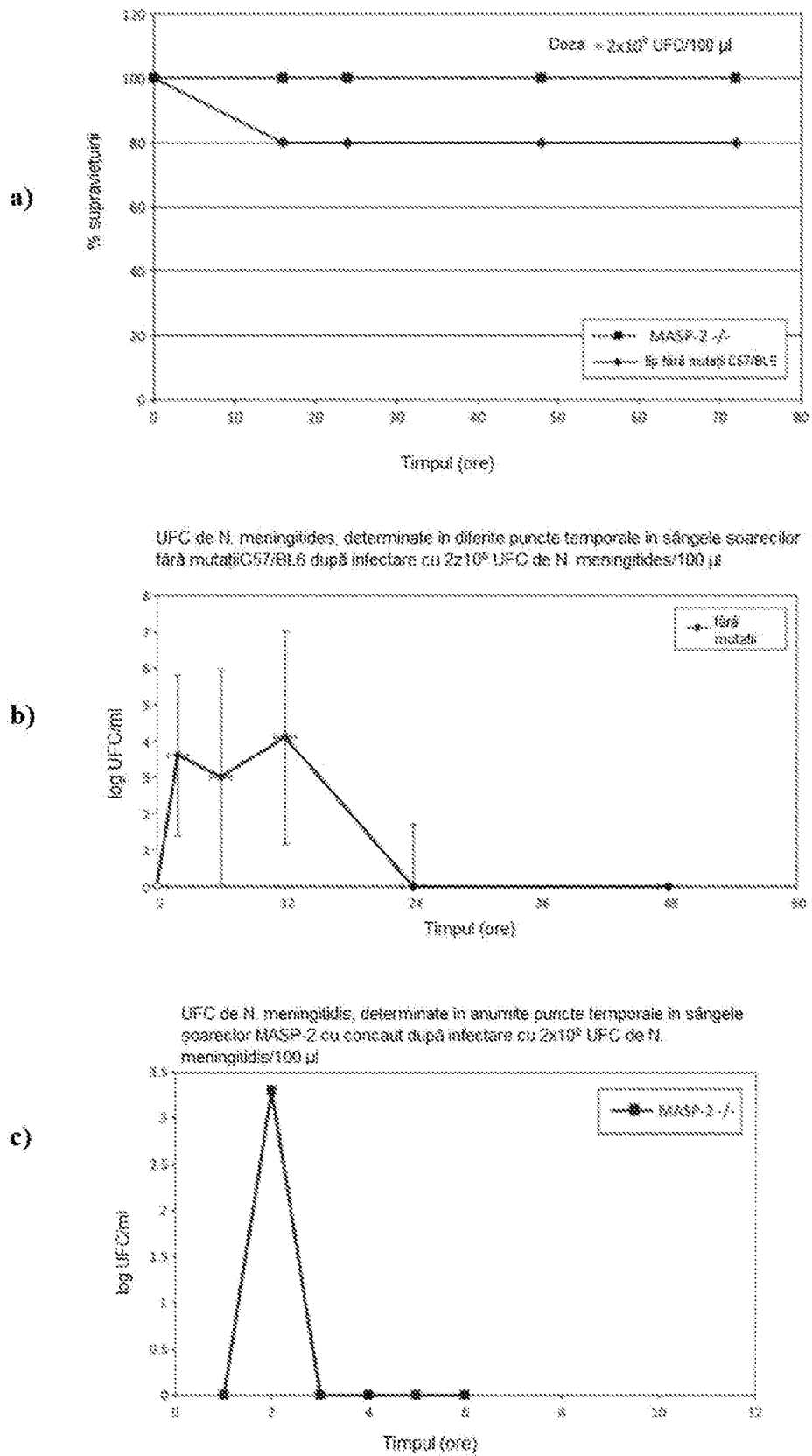


Fig. 25

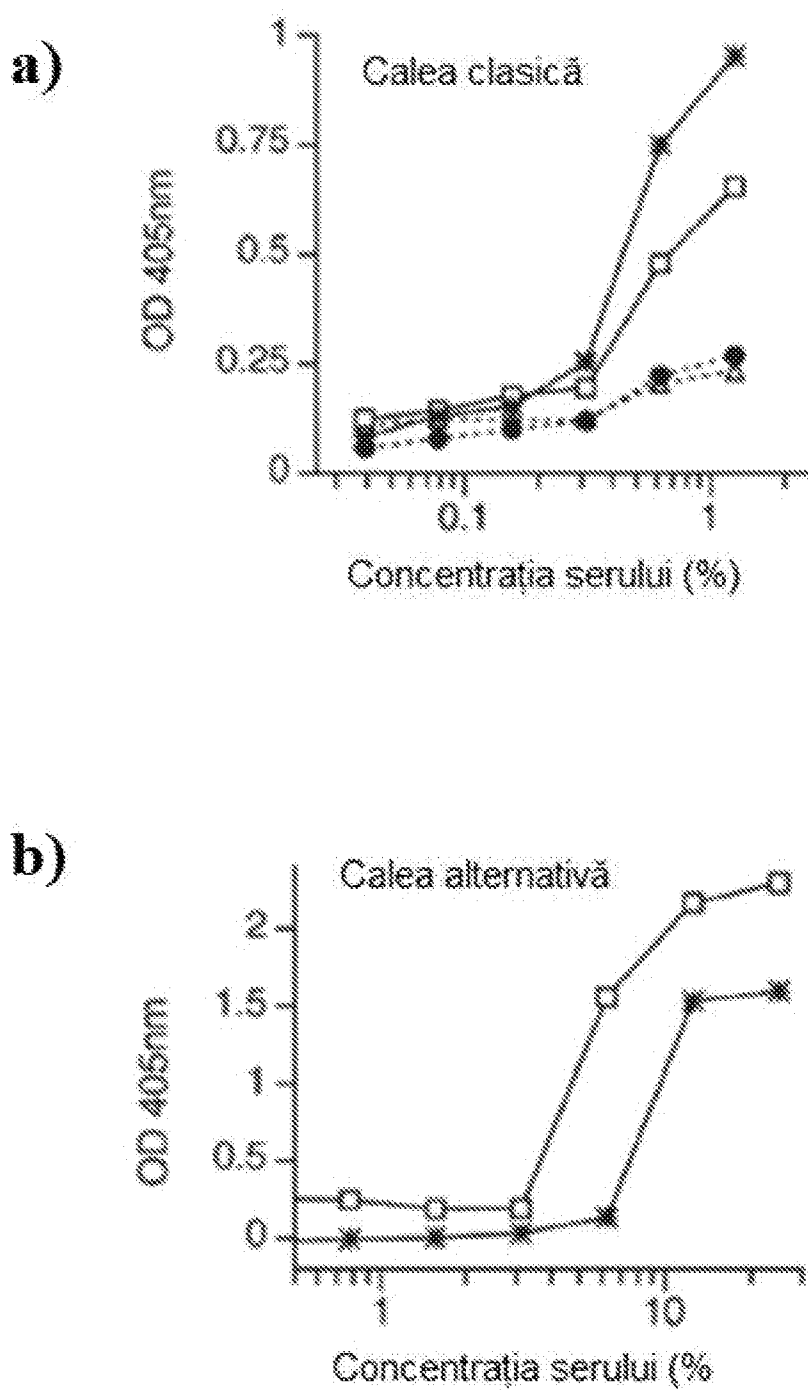


Fig. 26

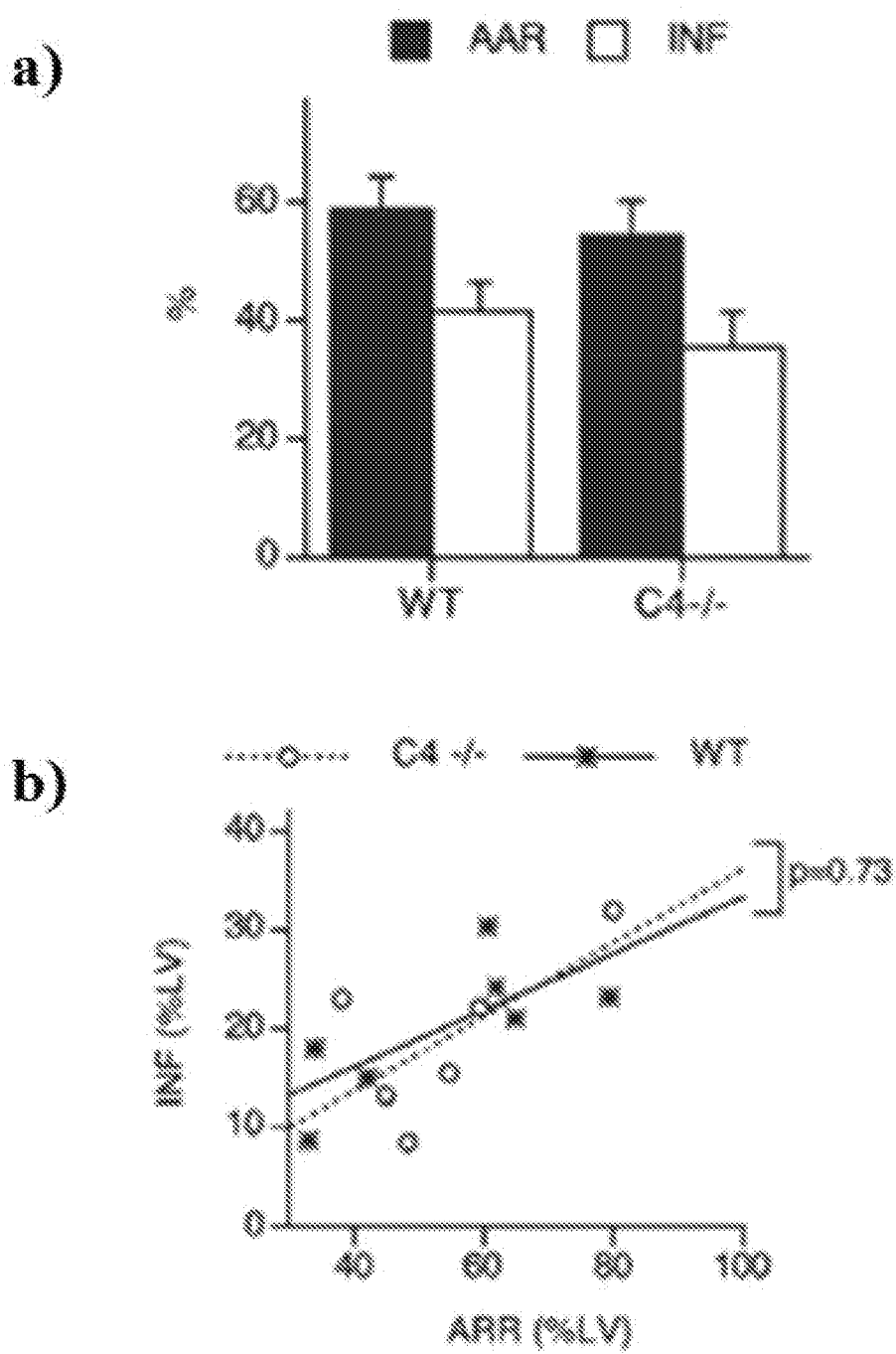


Fig. 27

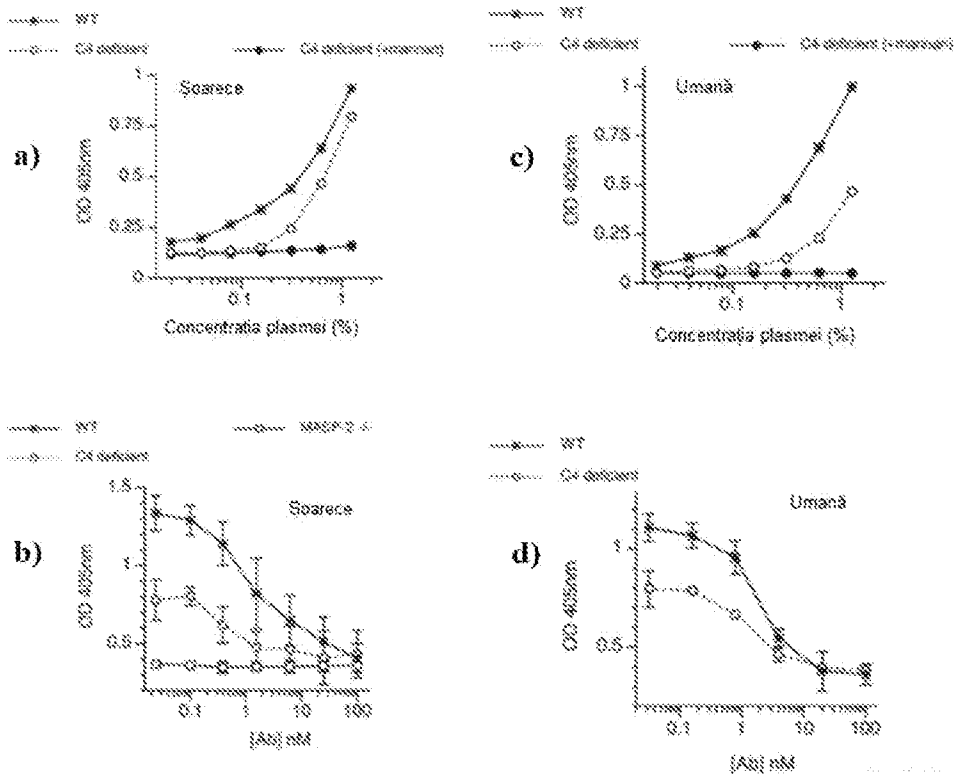


Fig. 28

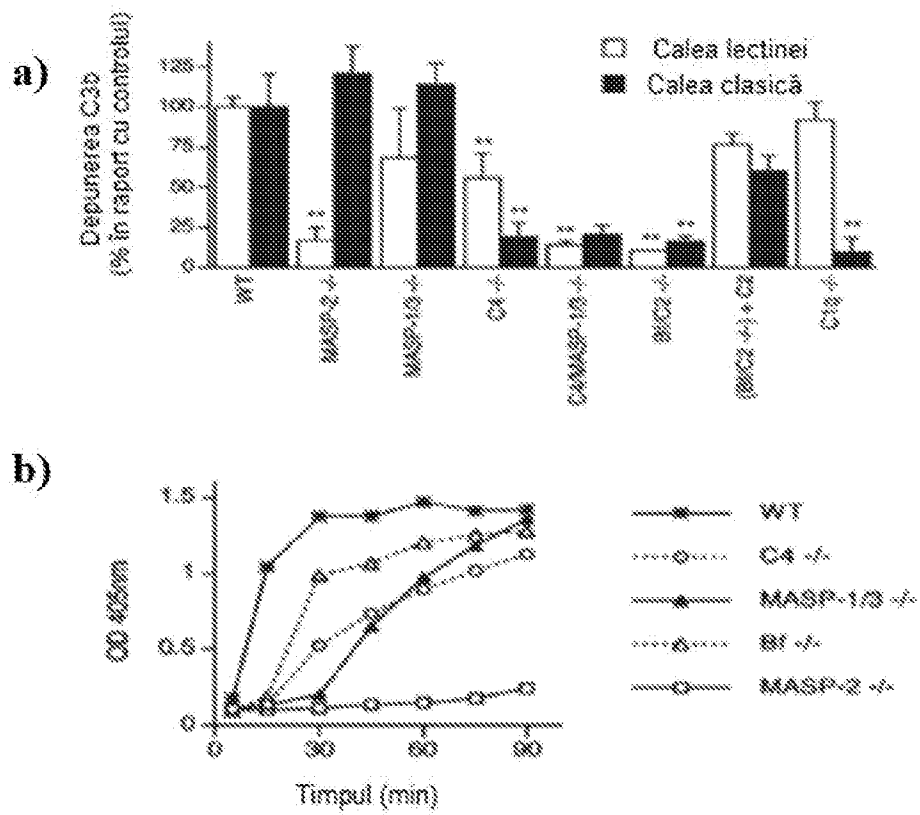


Fig. 29

Activarea C3 cu substratul de trombină

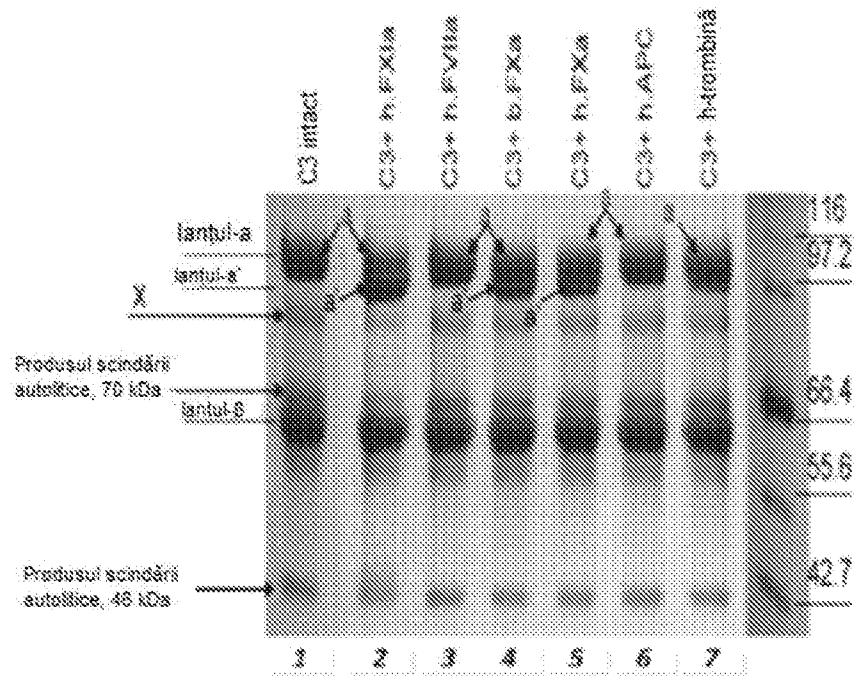


Fig. 30

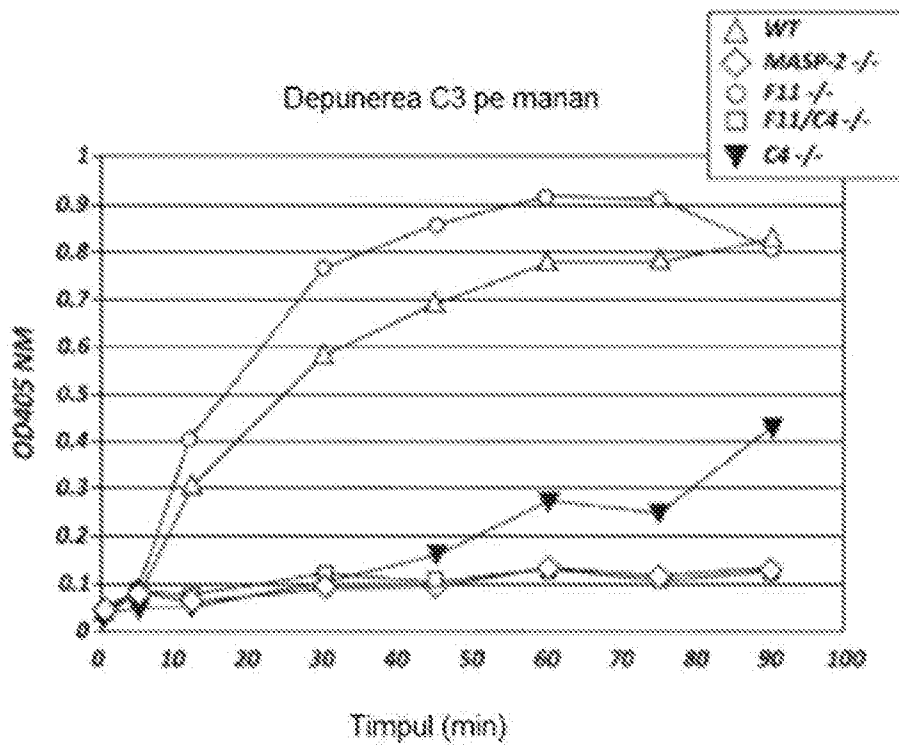


Fig. 31

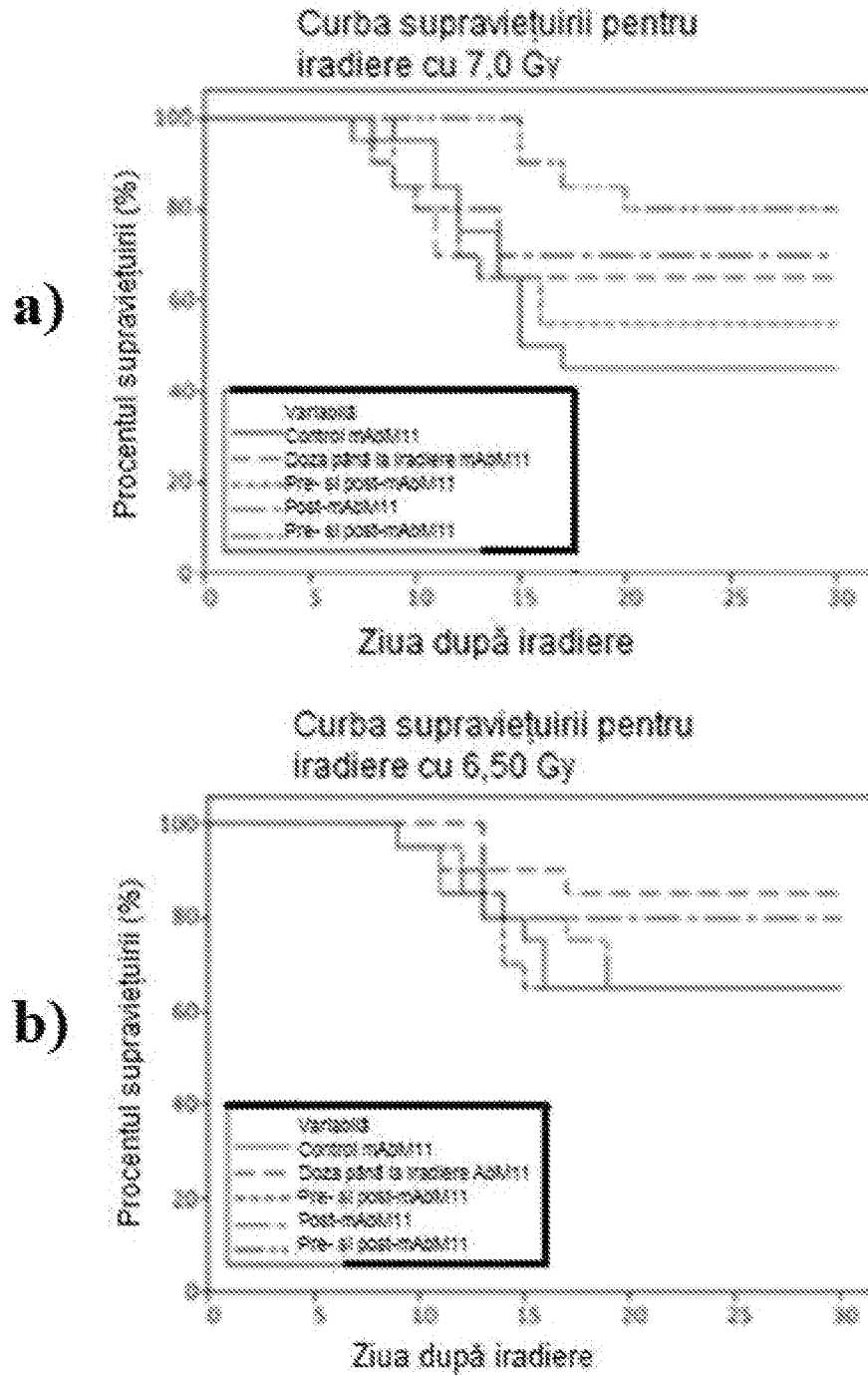


Fig. 32

Supraviețuirea după infectarea cu *N. meningitidis* serogrupa A Z2491

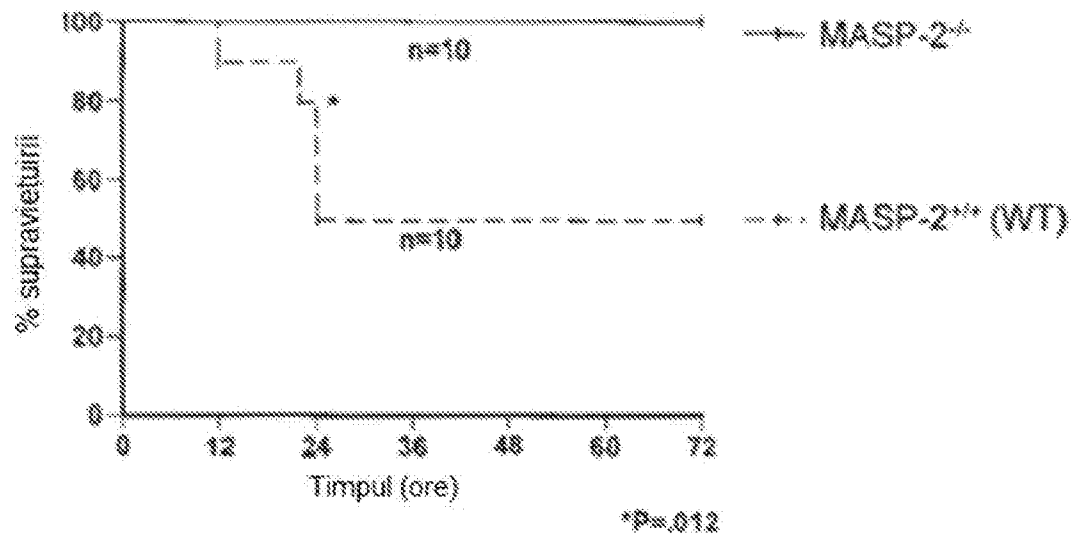


Fig. 33

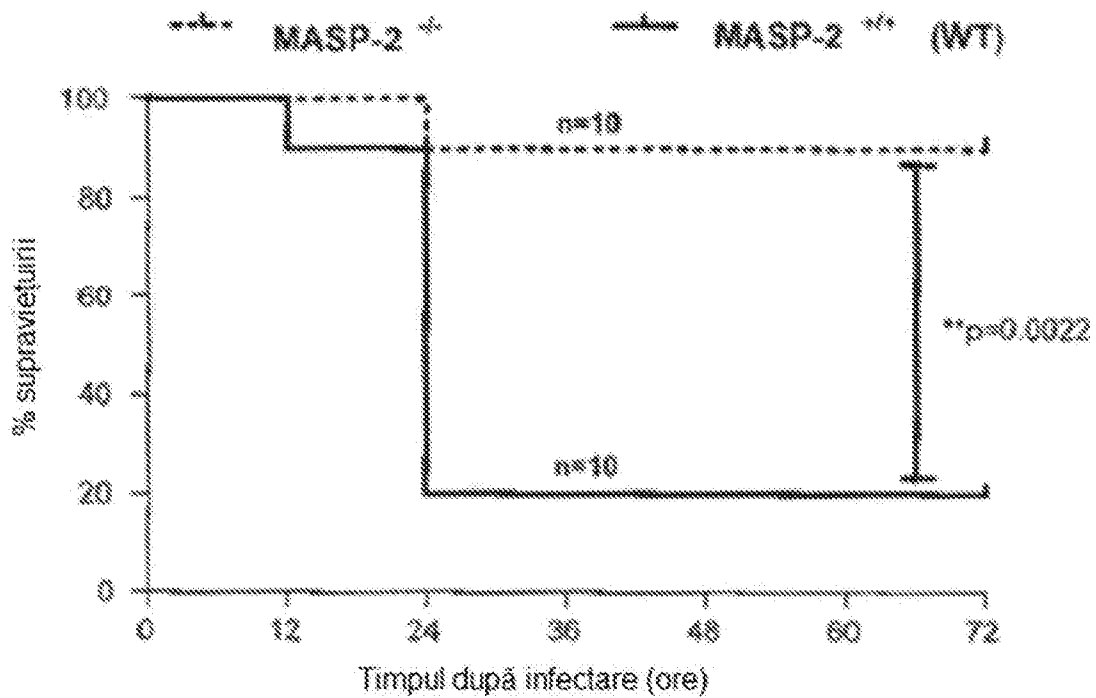


Fig. 34

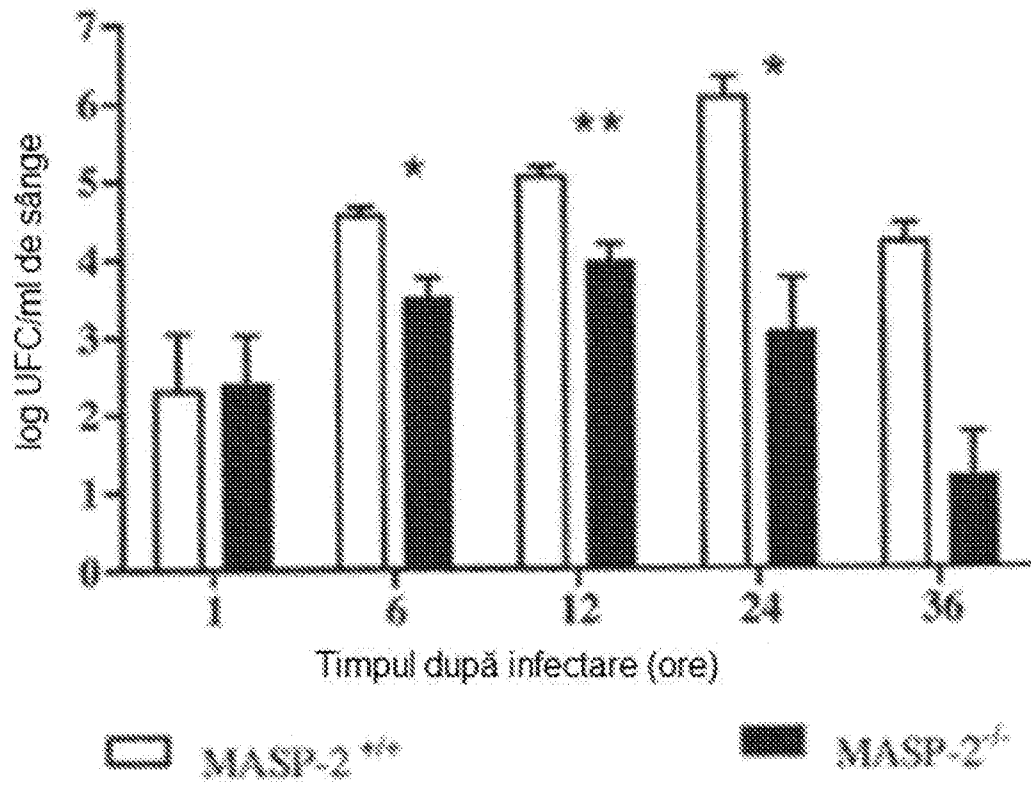


Fig. 35

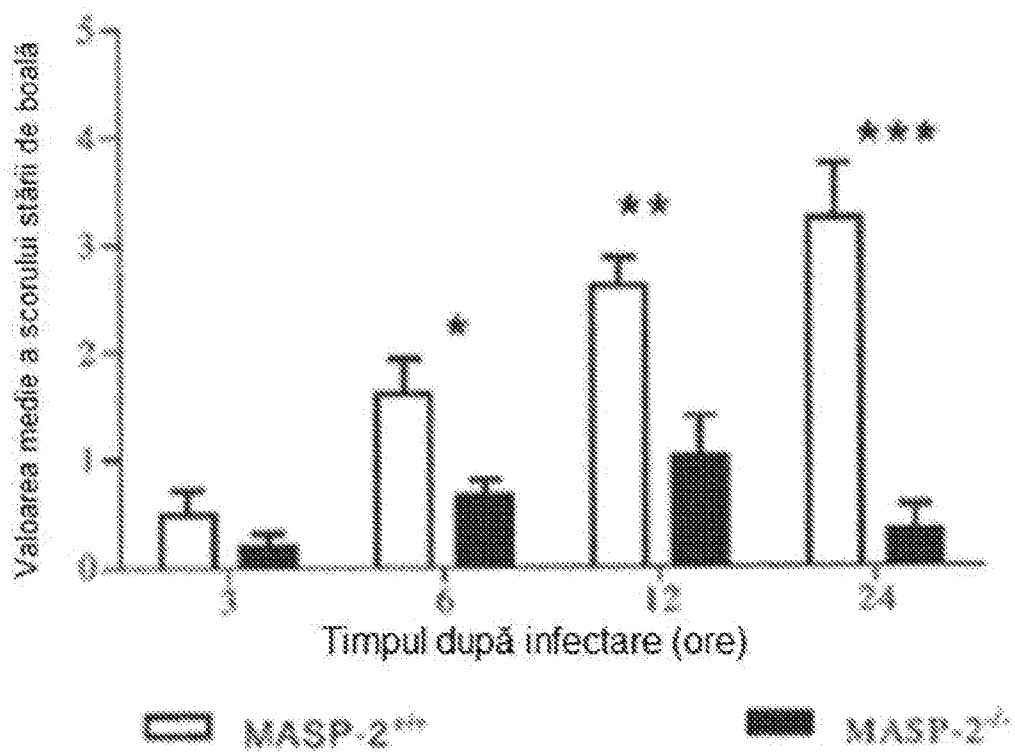


Fig. 36

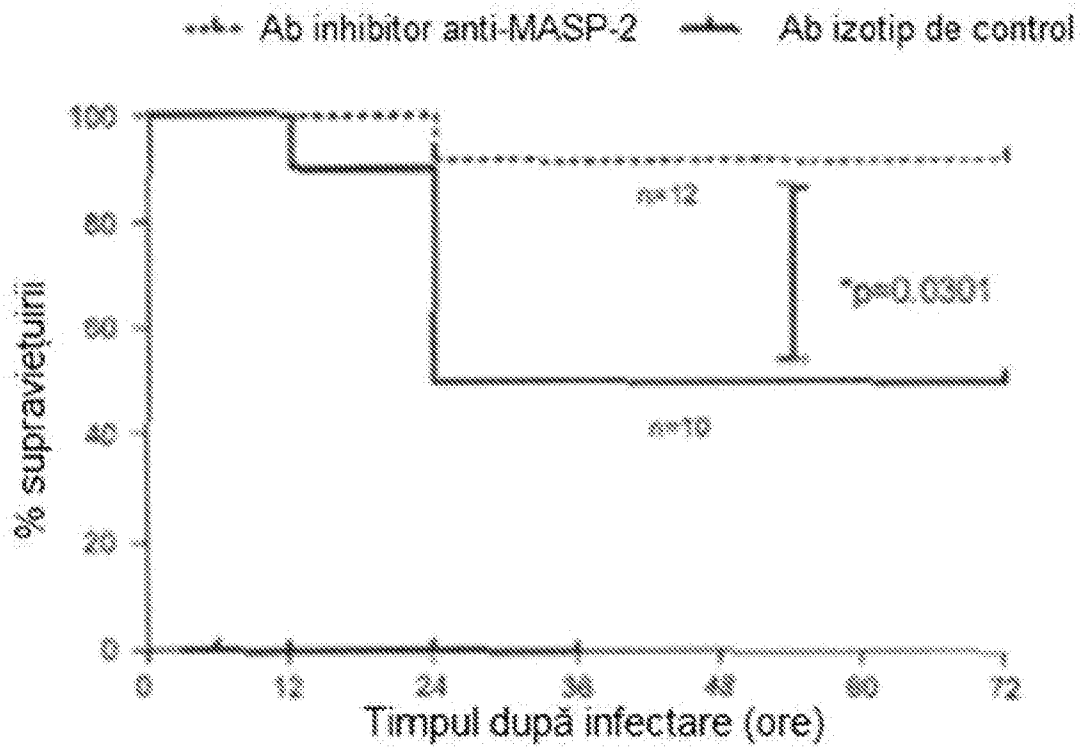


Fig. 37

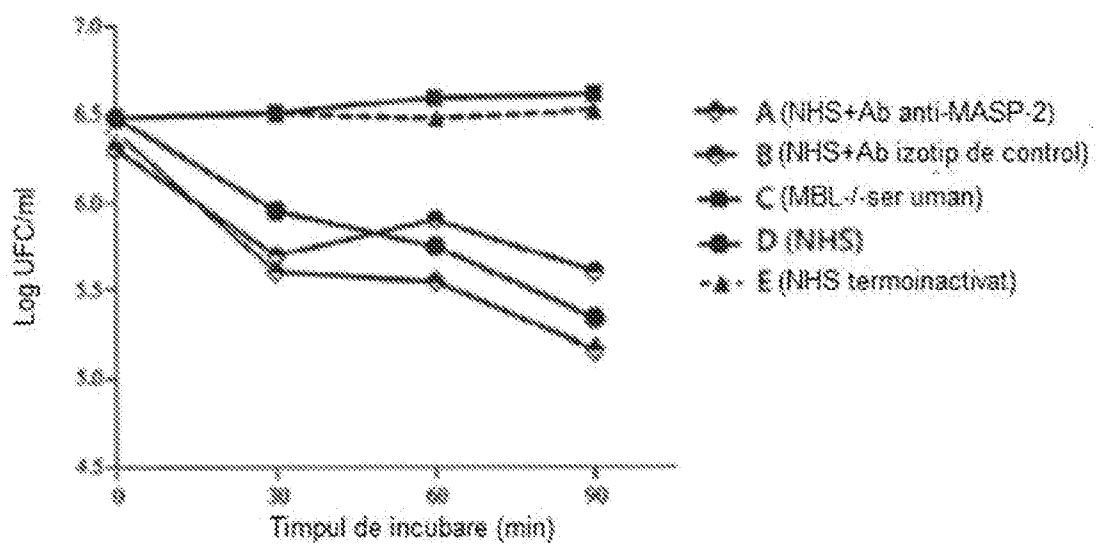


Fig. 38

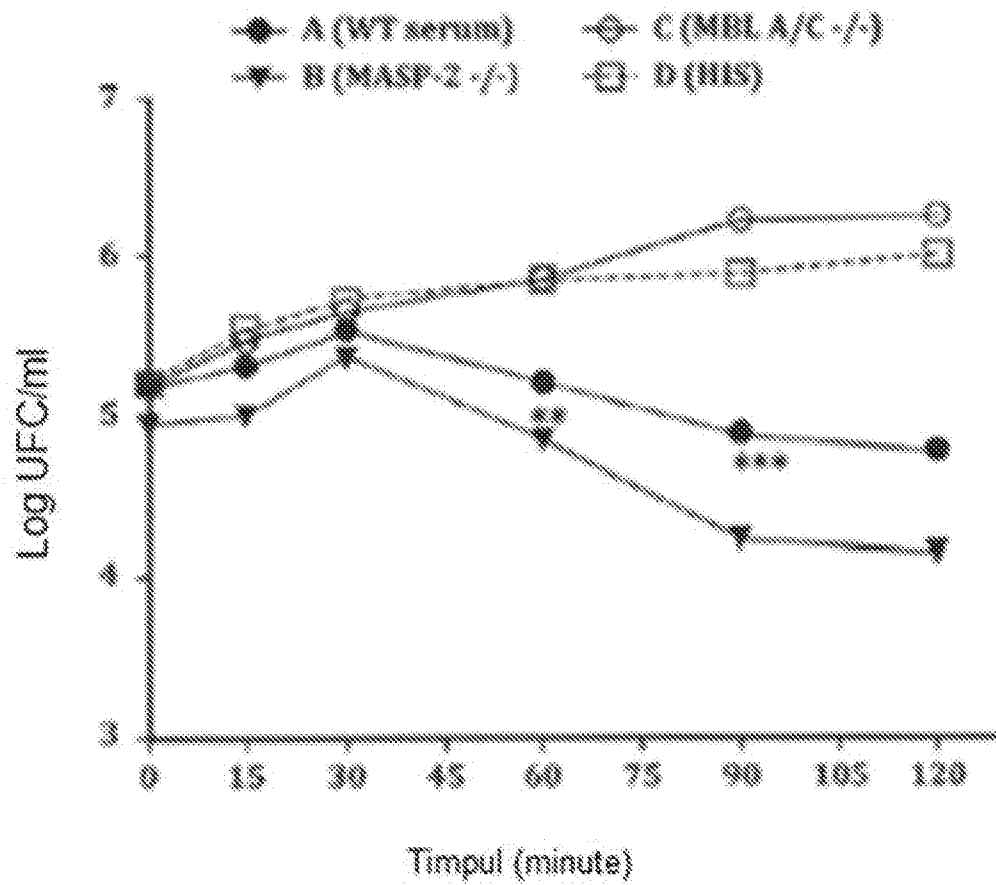


Fig. 39

Hemoliza hematiilor murine, acoperite cu manan, la acțiunea serului uman

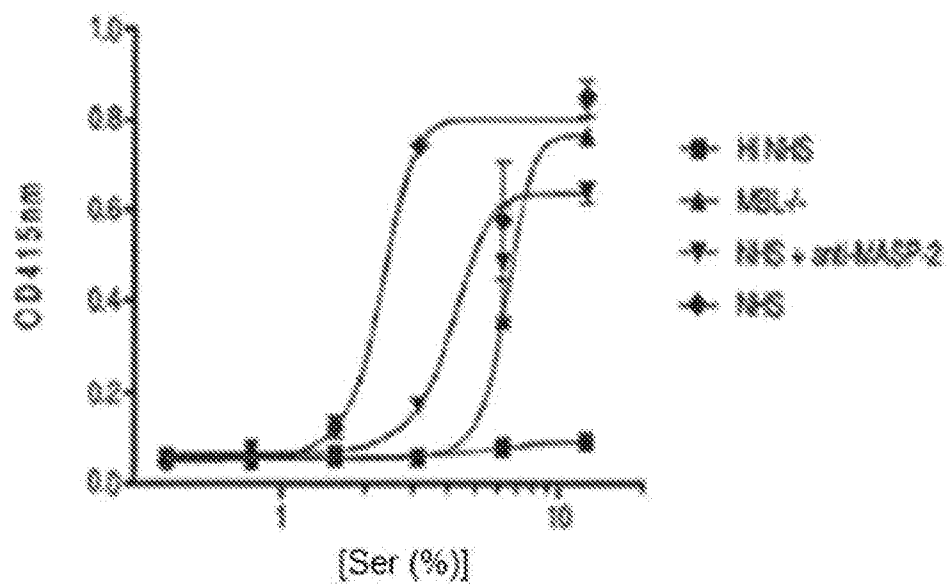


Fig. 40

Hemoliza hematiilor șoarecilor WT
la acțiunea serului uman

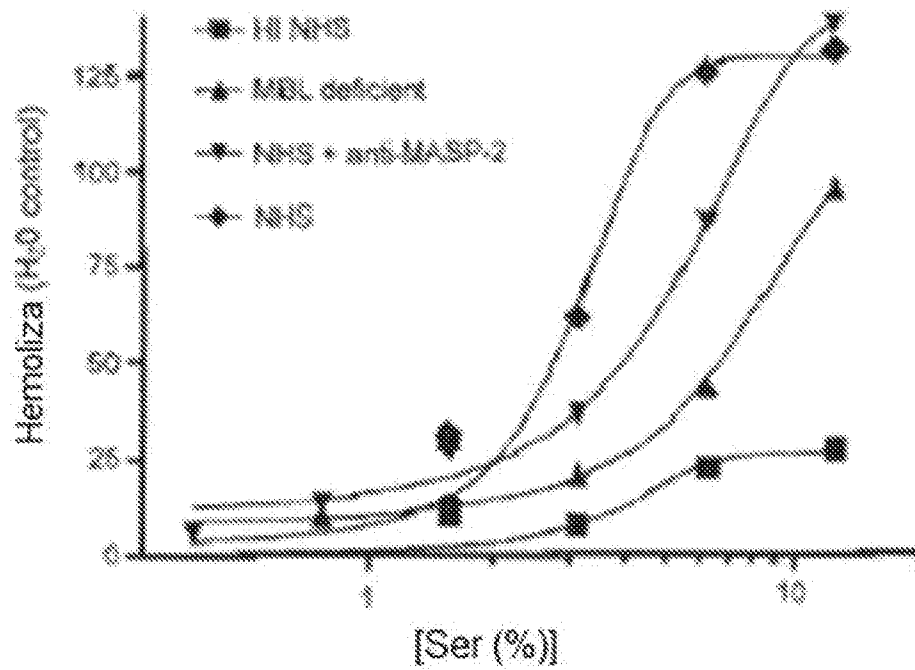


Fig. 41

Hemoliza hematiilor șoarecilor CD55/59-/-
la acțiunea serului uman

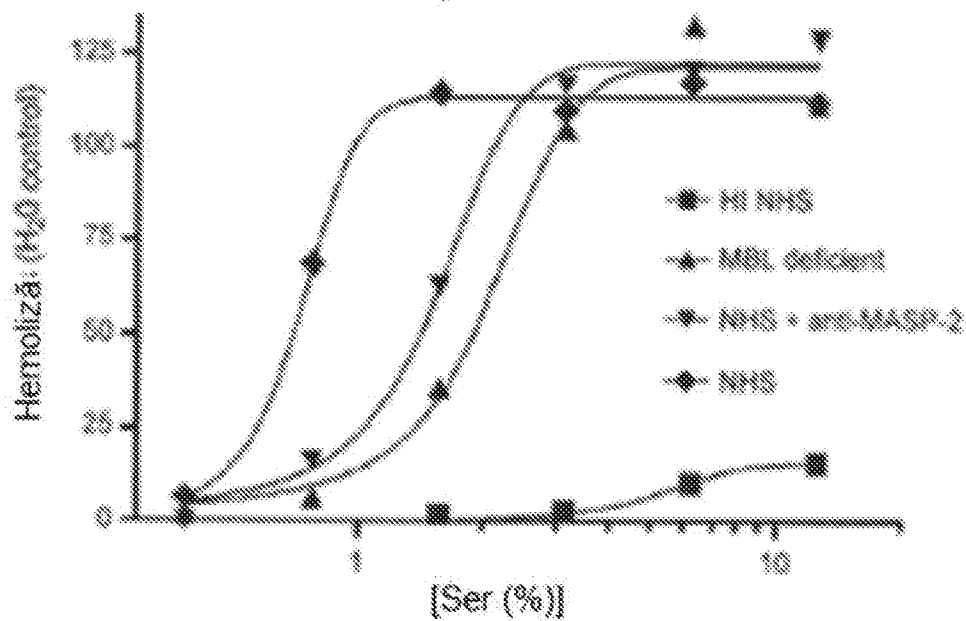


Fig. 42

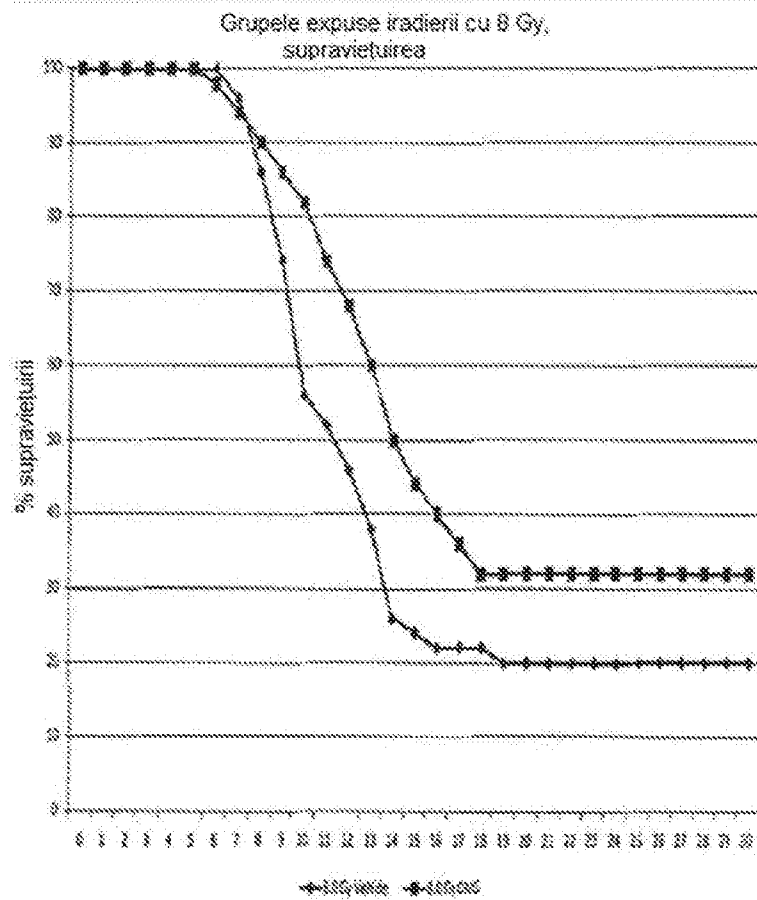


Fig. 43

Timpu până la apariția ocluziei microvasculare
după injecția LPS (modelul Schwarzman)

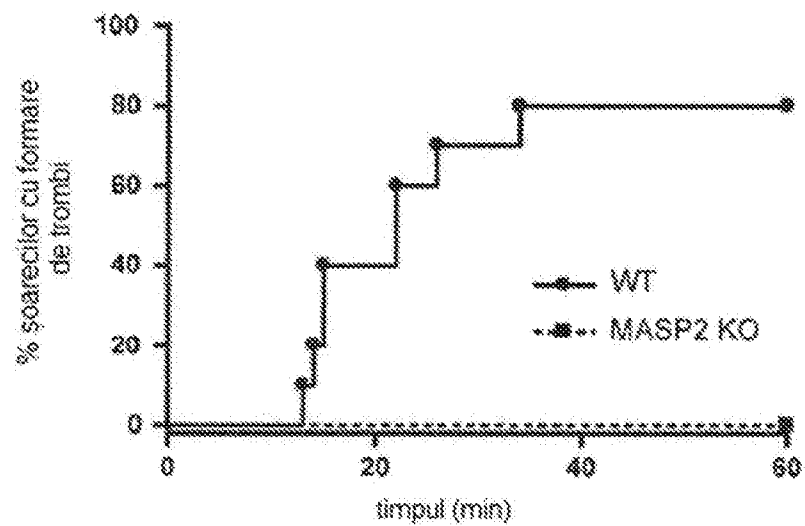


Fig. 44

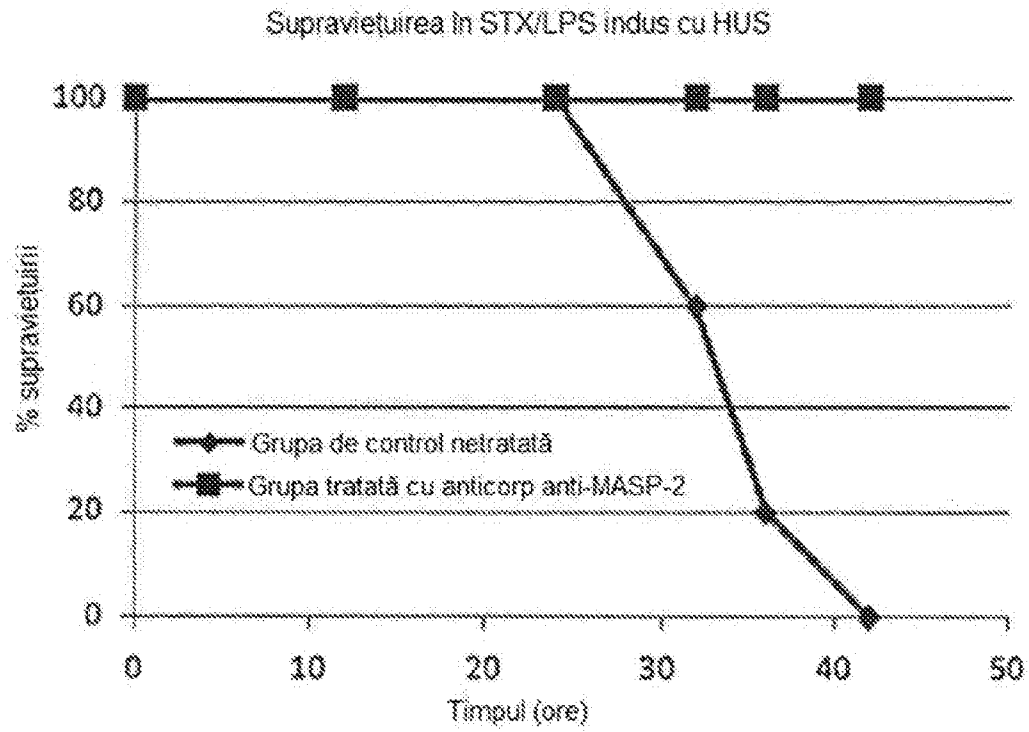


Fig. 45

MABH6 inhibă formarea trombilor într-un model experimental pe șoareci de microangiopatie trombotică, indusă cu FITC-dextran

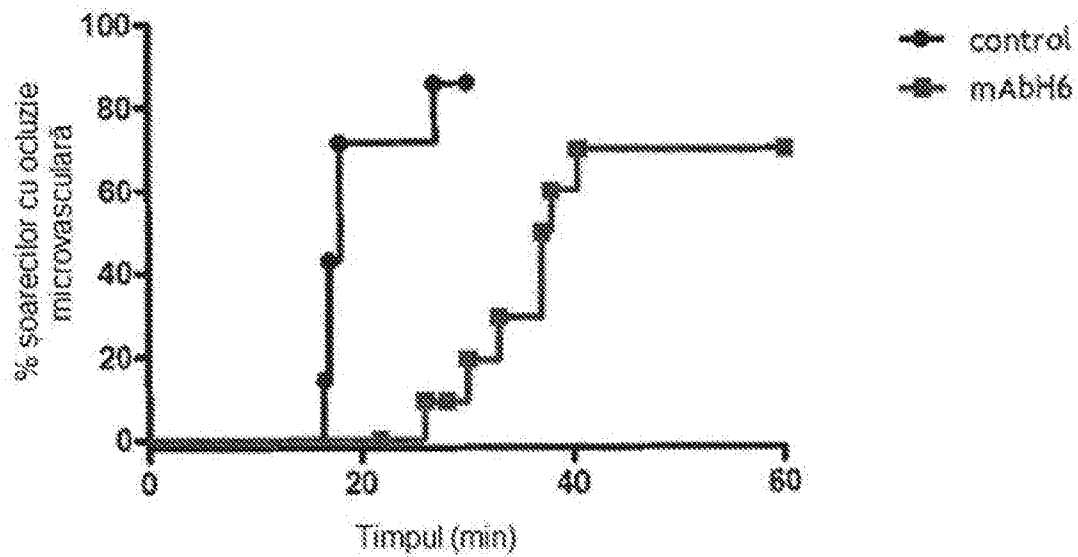


Fig. 46

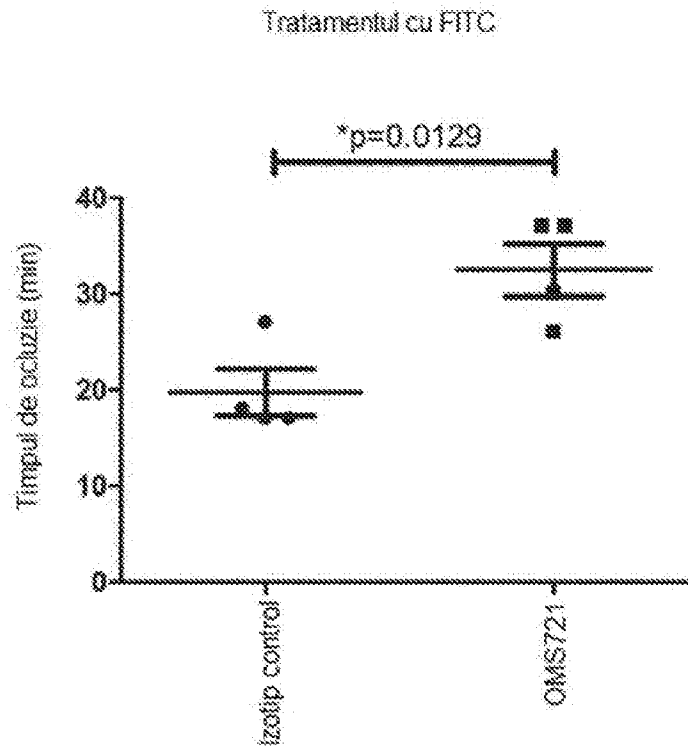


Fig. 47

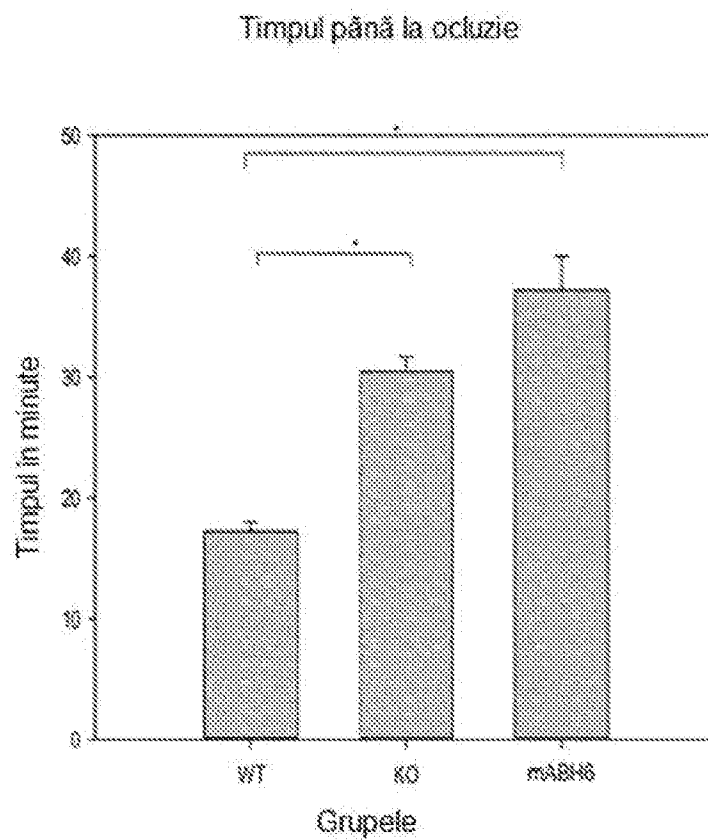


Fig. 48

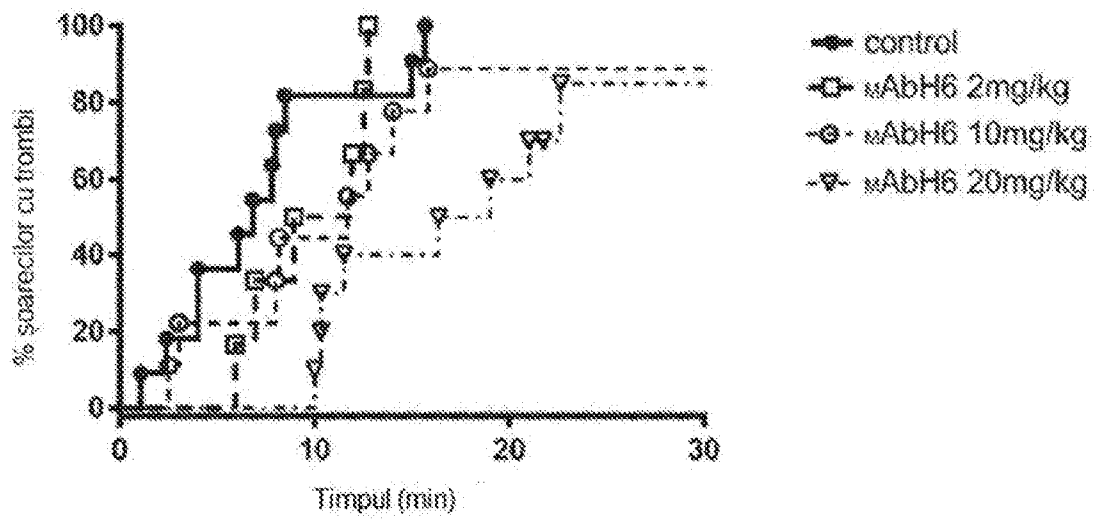


Fig. 49

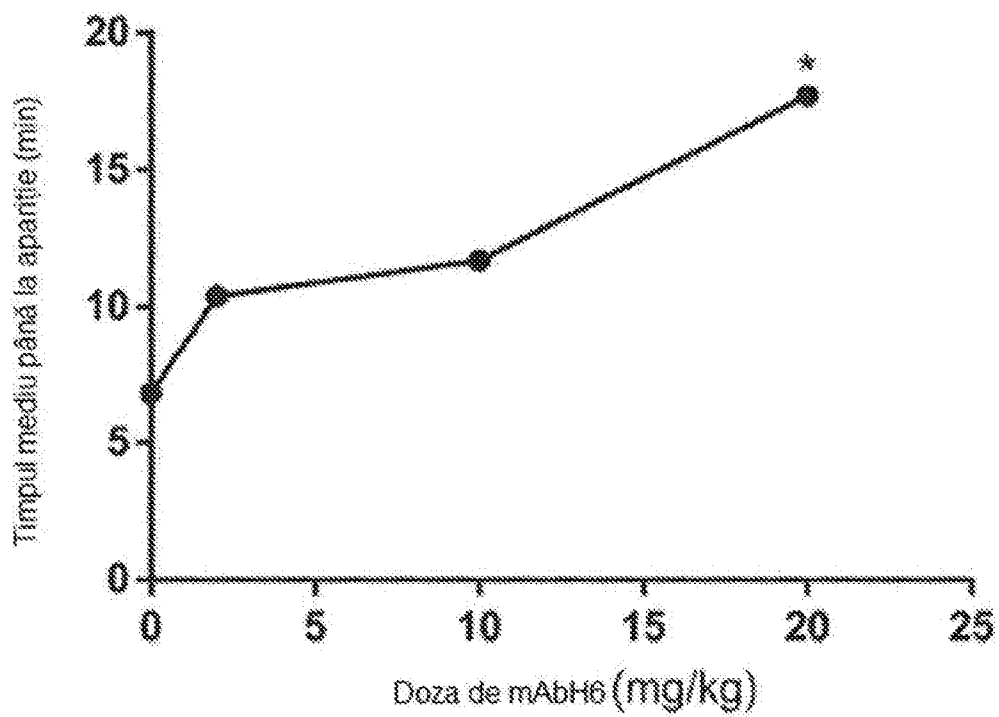


Fig. 50

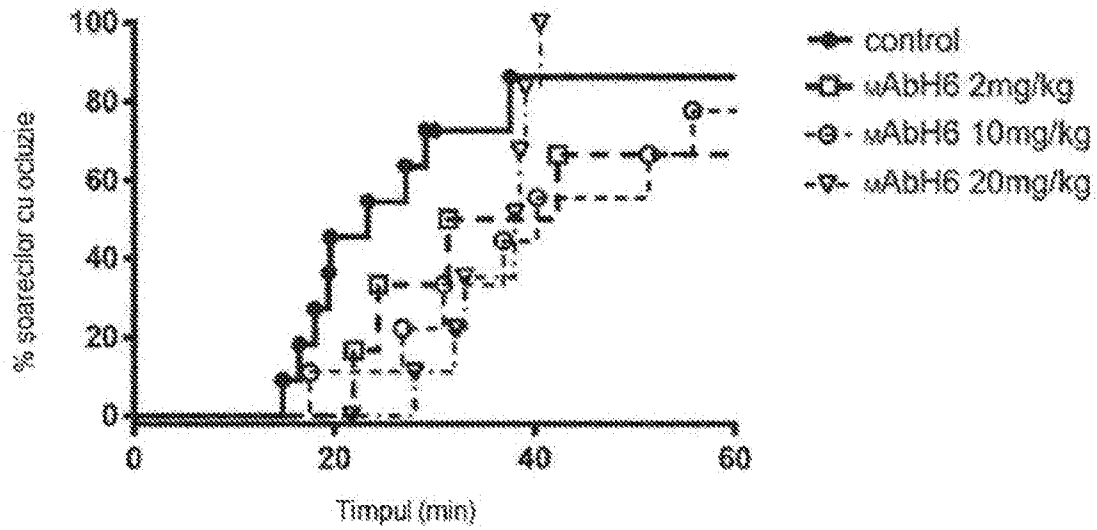


Fig. 51

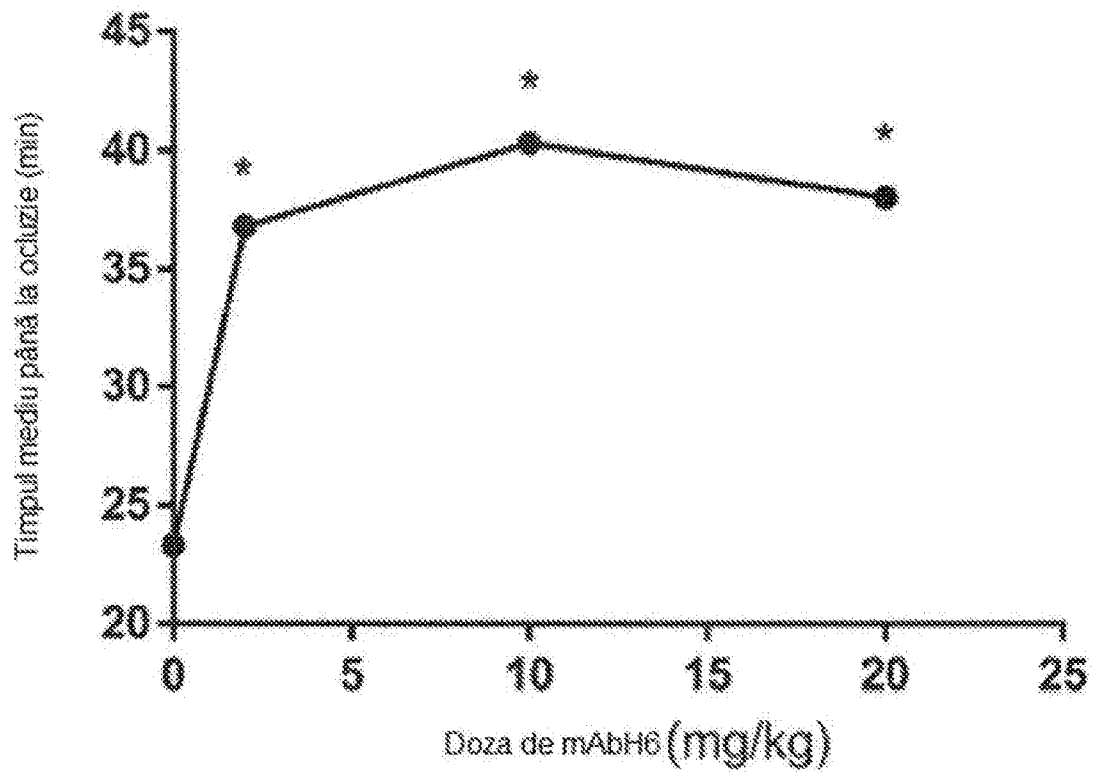


Fig. 52

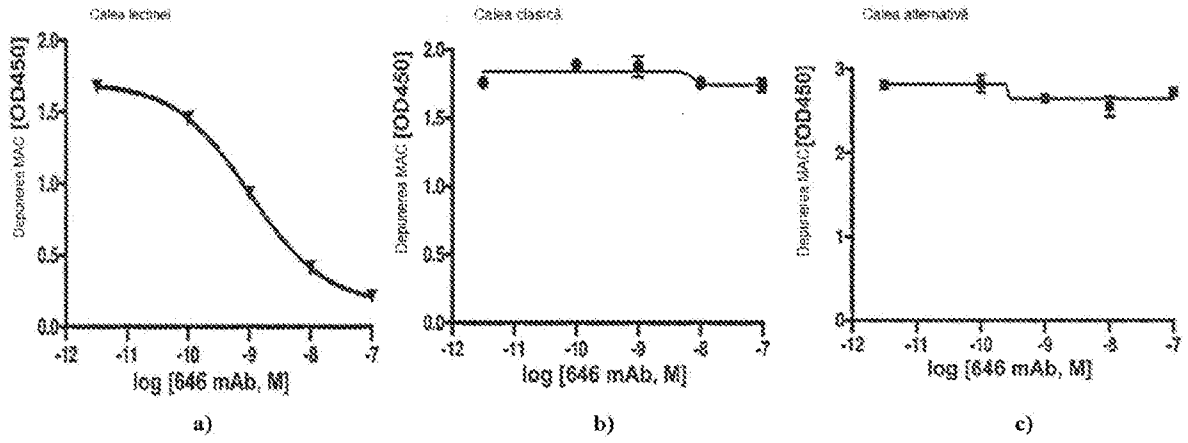


Fig. 53

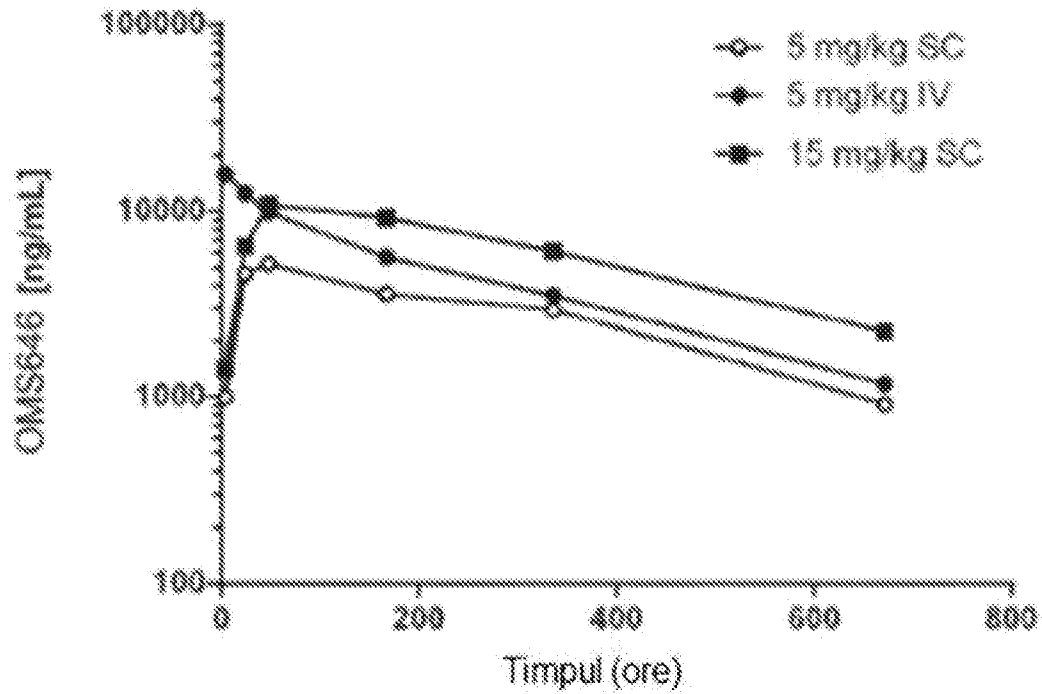


Fig. 54

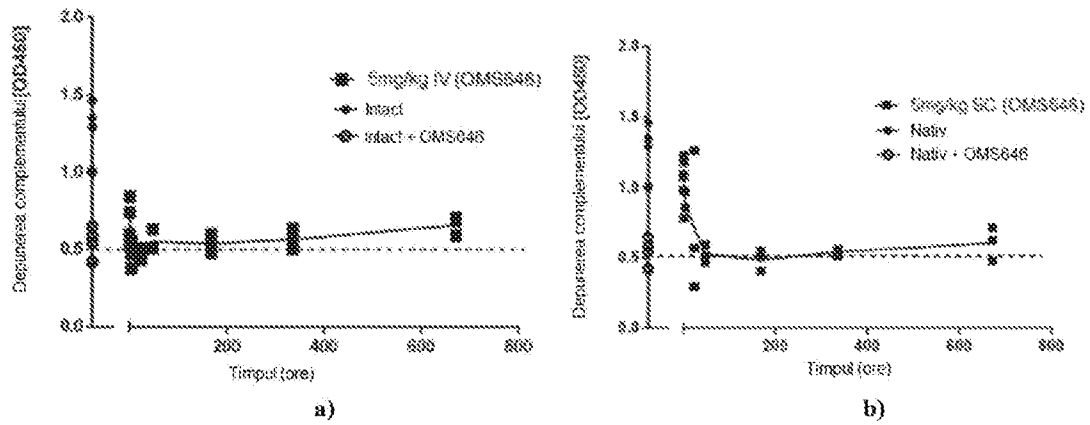


Fig. 55

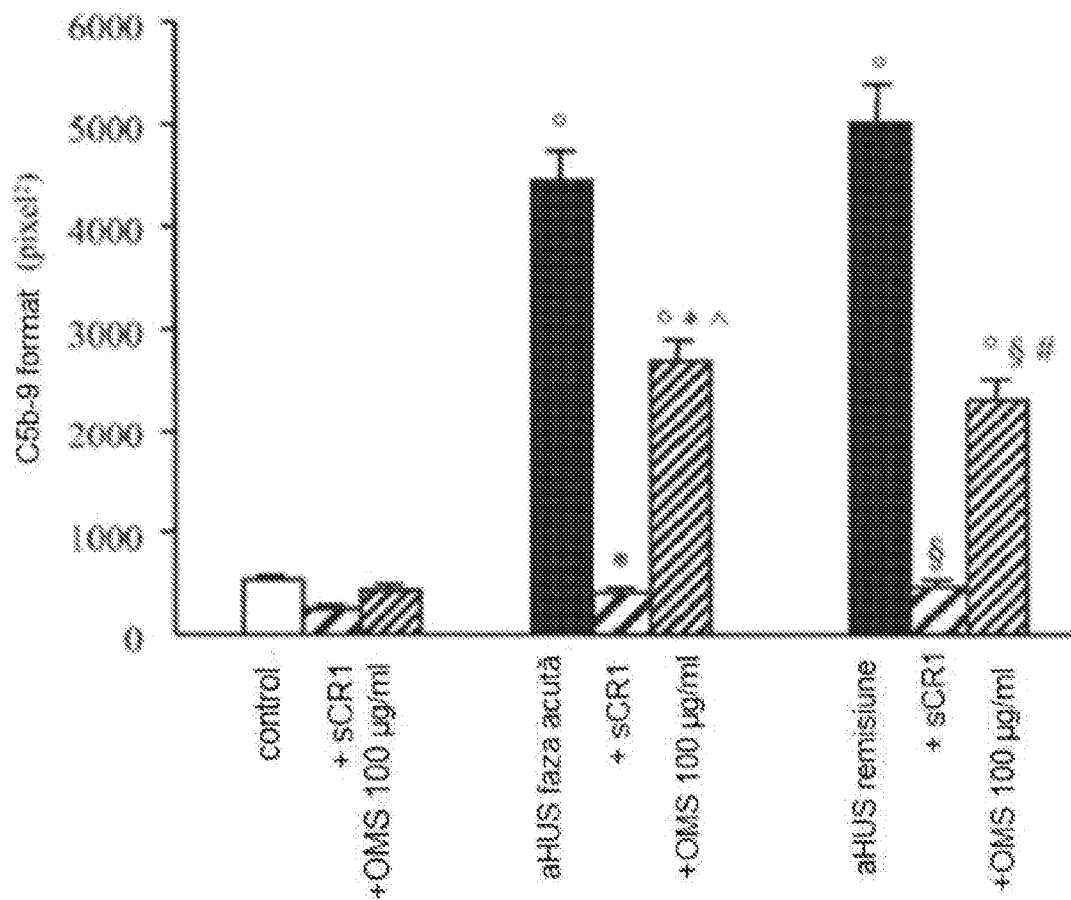


Fig. 56

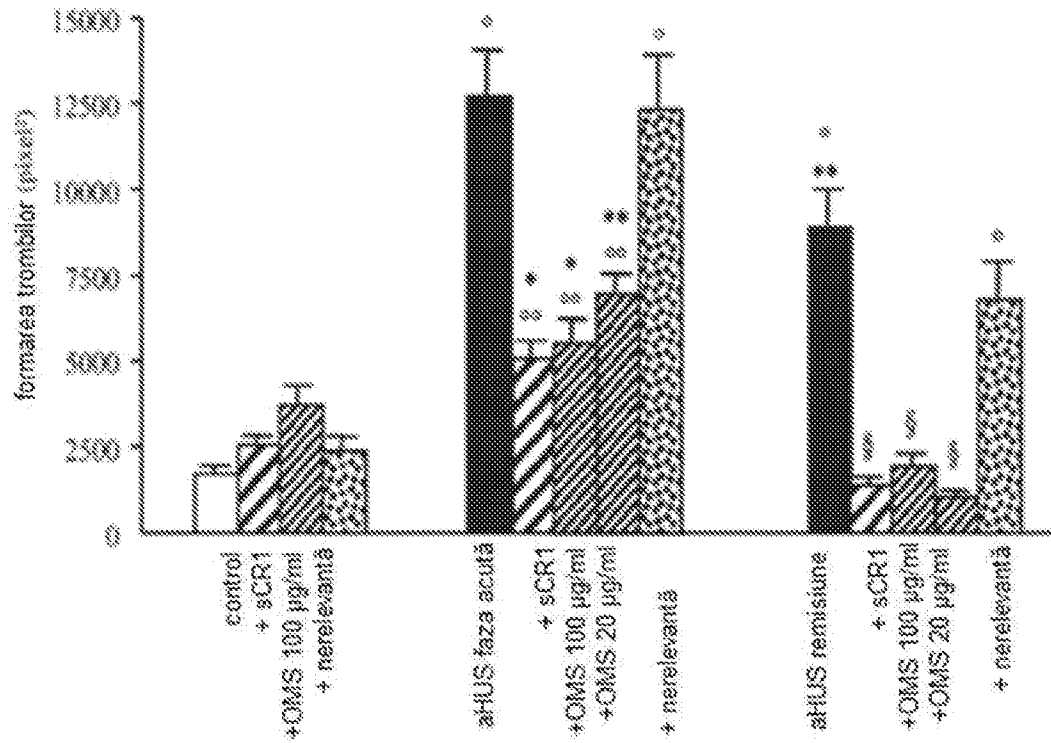


Fig. 57

Modificarea numărului de trombocite în raport cu numărul inițial în funcție de timp

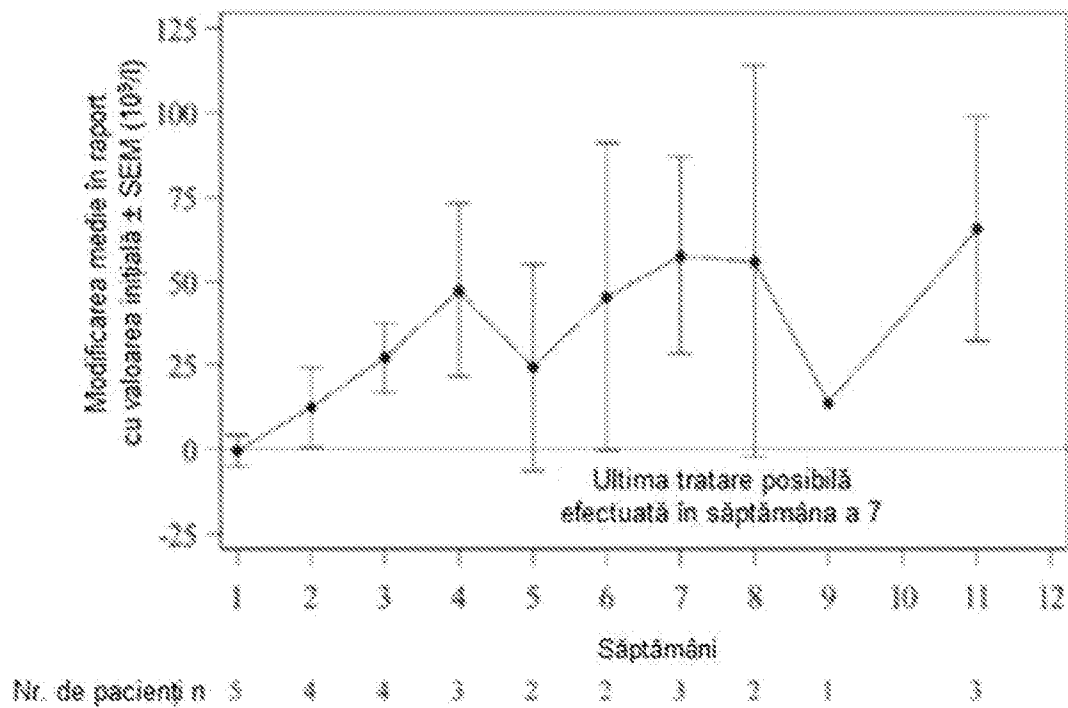


Fig. 58

Modificarea indicatorului LDH
în raport cu valoarea inițială în funcție de timp

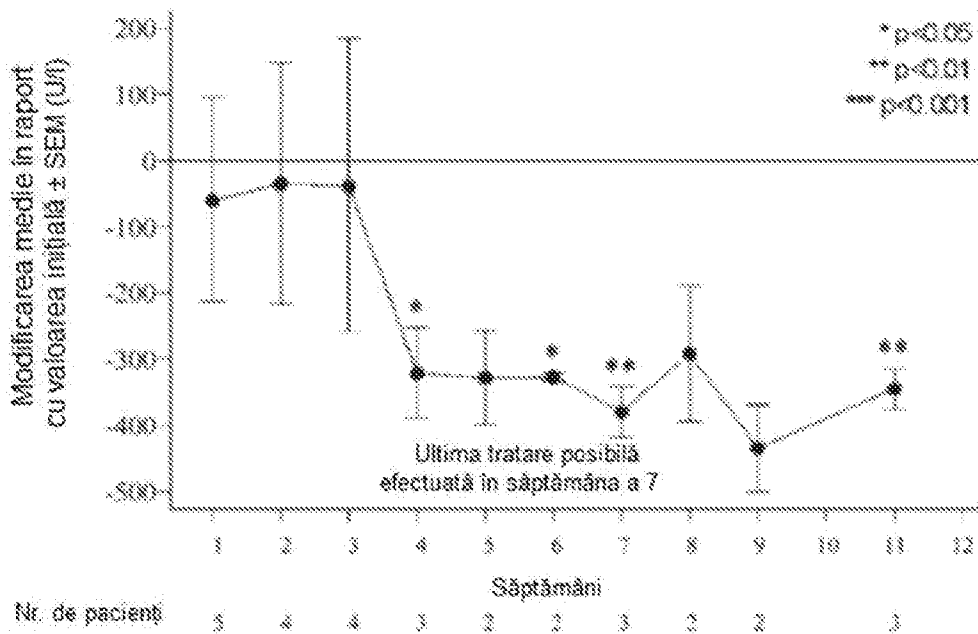


Fig. 59

Modificarea haptoglobinei în funcție de timp

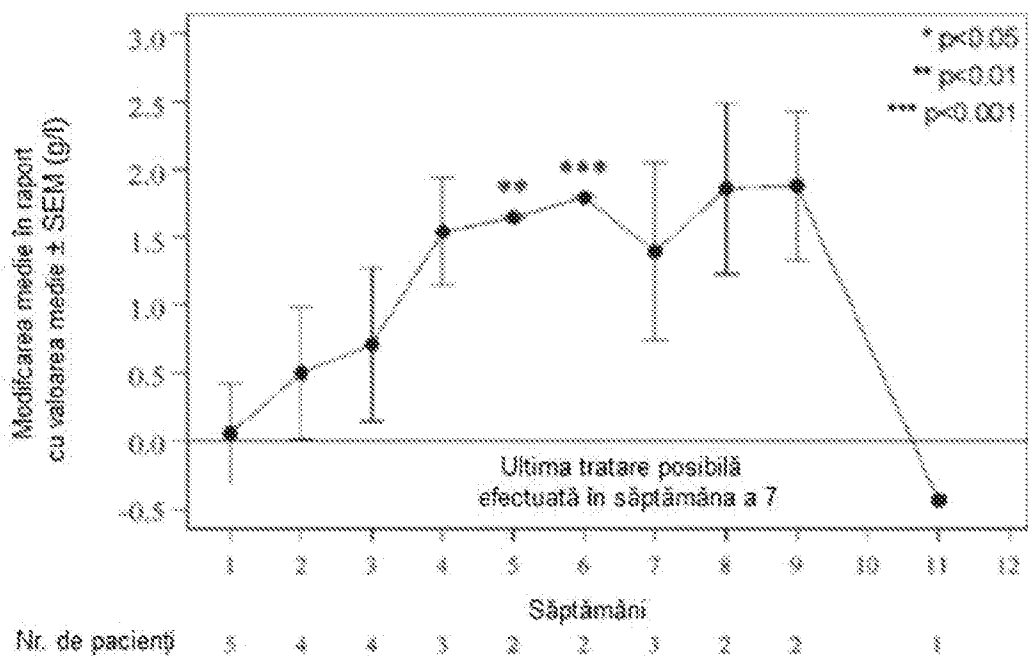


Fig. 60

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: a 2018 0042 (32) Data de prioritate recunoscută:
 2015.11.09; 2016.10.11
 (22) Data depozit: 2016.11.09 Raport de documentare internațională: ☒ da
 (85) Data deschiderii fazei naționale: 2018.06.06
 (86) Cerere internațională: PCT/US2016/061113, 2016.11.09
 (87) Publicarea cererii internaționale: WO 2017/083371 A1, 2017.05.18
 (71) Solicitant: **OMEROS CORPORATION, US; UNIVERSITY OF LEICESTER, GB**
 (54) **Titlul: Metodă de tratament a stărilor asociate cu activarea complementului dependentă de MASP-2**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** *A61K 39/00* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/40* (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): **Int.Cl:** *A61K 39/00* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/40* (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

MASP-2, microangiopatie trombotică, transplant celule stem,

"Worldwide" (Espacenet): **Int.Cl:** *A61K 39/00* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/40* (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

MASP-2, thrombotic microangiopathy, stem cell transplant

EA, CIS (Eapatis): **Int.Cl:** *A61K 39/00* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/40* (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

MASP-2, тромботическая ангиопатия, трансплантат стволовых клеток

SU (certificate de autor): **Int.Cl:** *A61K 39/00* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/40* (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)

MASP-2, тромботическая ангиопатия, трансплантат стволовых клеток

Patsearch

MASP-2, thrombotic microangiopathy, stem cell transplant

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

V. Documente considerate a fi relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	Thiel et al. Nature, no. 386, 1997, p. 506-510	1-10
A, D	Vorup Jensen et al. J. Immunol., no 165, 2000, p. 2093-2100	1-10
A, D	Ambrus et al. J. Immunol., no 170, 2003, p. 1374-1382	1-10
A, D	Kilpatrick. Biochim., Biophys. Acta, no 1572, 2002, p. 401-413	1-10
A, D, C	Takahashi M. et al. J. Exp. Med., no 207 (1), 2010, p. 29-37	1-10
A	US 2015166675 A 2015.06.18	1-10
A	FDA Grants Orphan Drug Designation To Omeros OMS721 For Complement-Mediated Thrombotic Microangiopathies. Outsourced Pharma, 2013.12.18, p. 1-2	1-10
A	US 20130344073 A1 2013.12.26	1-10
A	Barbour et al. Thrombotic Microangiopathy and associated renal disorders. Hephrol. Dial. Transplant, vol. 27, 2012.07.01, p. 2673-2685, entire document	1-10
A	Fremaux-Bacchi et al. The emerging role of complement inhibitors in transplantation. Kidney International, vol. 88, 2015.09.16, p. 967-973, entire document	1-10
A	US 2015 166676 A1 2015.06.18	1-10
A	WO 2015 039126 A1 2015.03.19	1-10
A	Sara S. Kim et al. Hematopoietic stem cell transplant-associated thrombotic microangiopathy: review of pharmacology treatment options: Treatment Review of Thrombotic Microangiopathy, Transfusion, vol. 55, no 2, 2014.09.11, p. 452-458, XP055592753, US	1-10

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2019.12.19		
Examinator	GROSU Petru	