УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **127339** (13) **C2**

(51) МПК
C07K 16/40 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

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

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **a 2018 08433**

(22) Дата подання заявки: **05.01.2017**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **27.07.2023**

(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **62/275,025, 62/407,979**

(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **05.01.2016, 13.10.2016**

(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US**

(41) Публікація відомостей про заявку: **25.01.2019, Бюл.№ 2**

(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **26.07.2023, Бюл.№ 30**

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору PCT: **PCT/US2017/012345, 05.01.2017**

(72) Винахідник(и):
Бранскілл Найджел Джон (GB),
Демопулос Грегорі А. (US),
Дадлер Томас (US),
Швебле Ханс-Вільхельм (GB)

(73) Володілець (володільці):
ЮНІВЕРСІТІ ОФ ЛЕСТЕР,
University Road, Leicester, Leicestershire LE1 7RH, United Kingdom (GB),
ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН,
201 Elliott Avenue West, Seattle, WA 98119, United States of America (US)

(74) Представник:
Бреус Наталія Володимирівна, реєстр. №167

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
US 20150239985 A1, 27.08.2015
WO 2015058143 A1, 23.04.2015
US 2013266560 A1, 10.10.2013
WO 2012151481 A1, 08.11.2012
US 2018153988 A1, 07.06.2018
Ong A.C.M. Loss of glomerular function and tubulointerstitial fibrosis: Cause or effect? / A.C.M. Ong, L.G. Fine // Kidney International. – 1994. - Vol. 45. – P. 345—351

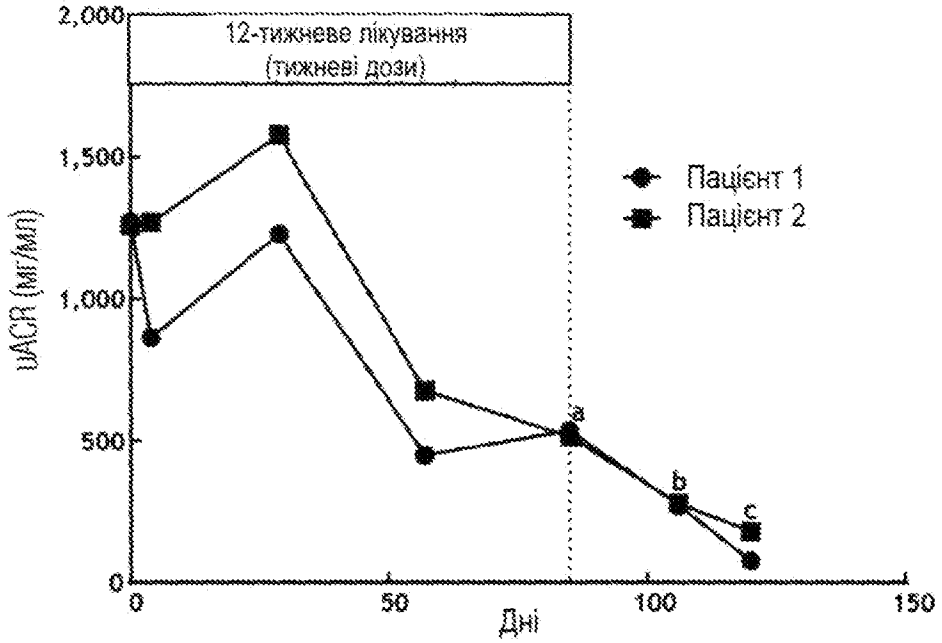
UA 127339 C2

(54) СПОСІБ ПРОФІЛАКТИКИ АБО ЗМЕНШЕННЯ УРАЖЕННЯ НИРОК У СУБ'ЄКТА, ЩО СТРАЖДАЄ НА СТЕРОЇДЗАЛЕЖНУ ІМУНОГЛОБУЛІН-А-НЕФРОПАТІЮ (IgAN)

(57) Реферат:

Винахід стосується способу профілактики або зменшення ураження нирок у суб'єкта, що страждає на стероїдзалежну імуноглобулін-А-нефропатію (IgAN), який включає введення моноклонального антитіла проти людської мананзв'язувальної лектинасоційованої серинової протеази-2 (MASP-2)

Альбумін/креатини відношення (uACR) у IgAN пацієнтів, що одержували OMS646



Зміна від вихідного рівня (log трансформований):	a: p=0.011; b: p=0.008; c: p=0.115
Зміна від вихідного рівня:	a: p=0.003; b: p=0.007; c: p=0.033

Фіг. 40

ПЕРЕХРЕСНІ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Дана заявка просить пріоритет попередньої заявки на патент 62/275,025, поданої 5 січня 2016 р., і попередньої заявки на патент 62/407,979, поданої 13 жовтня 2016 р., обидві з яких включені в даний опис у всій своїй повноті за допомогою посилання.

ЗАЯВА ВІДНОСНО СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТІ

Список послідовностей, пов'язаний з цією заявкою, представлений у текстовому форматі замість паперової копії і включений у дану заявку за допомогою посилання. Текстовий файл, що містить список послідовностей, названий MP_1_0250_PCT_Sequence_Listing_20170104_ST25. Текстовий файл має розмір 136 КБ, був створений 4 січня 2017 року і доступний через EFS-Web з моменту подачі опису.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

У людей і інших хребетних система комплементу забезпечує механізм ранньої дії по ініціації, ампліфікації і регуляції імунної відповіді на мікробну інфекцію і інші гострі інфекції (Liszewski M.K. and Atkinson J.P., 1993, in Fundamental Immunology, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York). Хоча активація комплементу забезпечує важливу першу лінію захисту від потенційних патогенів, активність комплементу, яка стимулює формування захисної імунної відповіді, може також бути потенційною загрозою для хазяїна (Kalli K.R. et al., Springer Semin. Immunopathol. 15:41-431, 1994; Morgan B.P., Eur. J. Clinical Investig. 24:219-228, 1994). Наприклад, протеолітичні продукти C3 і C5 стимулюють рекрутування і активацію нейтрофілів. Хоча нейтрофіли необхідні для захисту хазяїна, активовані нейтрофіли не виборні по вивільненню ними деструктивних ферментів і можуть викликати ушкодження органів. Крім того, активація комплементу може викликати відкладення літичних компонентів комплементу на сусідніх клітинах-хазяїнах, а також на мікробних мішенях, приводячи до лізису клітин-хазяїнів.

Система комплементу також бере участь у патогенезі численних гострих і хронічних захворювань, включаючи інфаркт міокарда, інсульт, РДСД, реперфузійне ушкодження, септичний шок, капілярний витік після термічних опіків, запалення після операції по кардіопульмонарному шунтуванню, відторгнення трансплантата, ревматоїдний артрит, множинний склероз, міастенію і хворобу Альцгеймера. Майже при всіх цих станах сам комплемент не викликає ці стани, але є одним з декількох факторів, що беруть участь у патогенезі. Проте, активація комплементу може бути основним патологічним механізмом і являє собою ефективну ланку для клінічного контролю при багатьох зазначених хворобливих станах. Усе зростаюче визнання важливого значення в розумінні механізмів опосередкованого комплементом ураження тканин при різних хворобливих станах ще раз указує на необхідність у розробці ефективних лікарських речовин, інгібуючих комплемент. На сьогоднішній день Екулізумаб (Solaris® (Соларіс)), тобто анти-C5 антитіло, є єдиним лікарським засобом, націленим на комплемент, схваленим для використання людиною. Проте, C5 є однією з декількох ефекторних молекул, що діють на "пізніх" етапах системи комплементу, і блокада C5 не приводить до пригнічення активації системи комплементу. Отже, інгібітор етапів ініціації активації комплементу мав би суттєву перевагу в порівнянні з інгібітором компонента комплементу, що діє на пізніх етапах.

На даний час загальновизнано, що система комплементу може бути активована трьома різними шляхами: класичним, лектиновим і альтернативним. Класичний шлях звичайно запускається комплексом, що складається з антитіл хазяїна, зв'язаних із чужорідною частинкою (тобто антигеном), і, отже, вимагає попереднього впливу антигену для генерації специфічної відповіді антитіла. Оскільки активація класичного шляху залежить від попередньої адаптивної імунної відповіді хазяїна, класичний шлях є частиною системи набутого імунітету. На противагу цьому, і лектиновий, і альтернативний шляхи не залежать від адаптивного імунітету і є частиною системи вродженого імунітету.

Активація системи комплементу приводить до послідовної активації зимогенів серинової протеази. Першим етапом активації класичного шляху є зв'язування молекули специфічного розпізнавання C1q з антигензв'язаними молекулами IgG і IgM. C1q асоційований з проферментами серинової протеази C1r і C1s у вигляді комплексу, називаного C1. При зв'язуванні C1q з імунним комплексом аутопротеолітичне розщеплення Arg-Ile сайта C1r супроводжується опосередкованим C1r розщепленням і активацією C1s, таким чином забезпечуючи здатність розщеплювати C4 і C2. C4 розщеплюється на два фрагменти, позначені C4a і C4b, і C2, аналогічно, розщеплюється на C2a і C2b. Фрагменти C4b можуть утворювати ковалентні зв'язки з сусідніми гідроксильними групами або аміногрупами і генерувати C3-конвертазу (C4b2a) за допомогою нековалентної взаємодії з фрагментом C2a активованого C2. C3-конвертаза (C4b2a) активує C3 за допомогою протеолітичного розщеплення на субкомпоненти C3a і C3b, приводячи до утворення C5-конвертази (C4b2a3b),

яка через розщеплення C5 приводить до утворення мембраноатакуючого комплексу (C5b разом з C6, C7, C8 і C9, також називаного MAC), який може руйнувати клітинні мембрани, приводячи до лізису клітин. Активовані форми C3 і C4 (C3b і C4b) у результаті ковалентного зв'язування осаджуються на поверхнях чужорідних мішеней, які розпізнаються рецепторами комплементу на багатьох фагоцитах.

Незалежно від цього, першим етапом активації системи комплементу по лектиновому шляху також є зв'язування молекул специфічного розпізнавання, після якого відбувається активація проферментів, асоційованих з сериновою протеазою. Однак, замість зв'язування імунних комплексів за допомогою C1q, молекули розпізнавання в лектиновому шляху містять групу вуглеводзв'язувальних білків (мананзв'язувальний лектин (MBL), H-фіколін, M-фіколін, L-фіколін і лектин C-типу CL-11), відомих під загальною назвою лектини. Див. Lu J. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1572:387-400, (2002); Holmskov et al., Annu. Rev. Immunol. 21:547-578 (2003); Teh et al., Immunology, 101:225-232 (2000). Див. також Luet J. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1572:387-400 (2002); Holmskov et al, Annu. Rev. Immunol. 21:547-578 (2003); Teh et al., Immunology, 101:225-232 (2000); Hansen et al, J. Immunol. 185(10):6096-6104 (2010).

Ikeda et al. уперше продемонстрували, що MBL, подібно C1q, може активувати систему комплементу після зв'язування з еритроцитами, покритими дріжджовим мананом, по C4-залежному механізму (Ikeda et al., J. Biol. Chem. 2(52):7451-7454, (1987)). MBL, член сімейства білків колектинів, являє собою кальційзалежний лектин, який зв'язується з вуглеводами по 3- і 4-гідроксигрупах, орієнтованих у горизонтальній площині піранозного кільця. Таким чином, основними лігандами для MBL є D-маноза і N-ацетил-D-глюкозамін, а вуглеводи, що не задовольняють цю стеричну вимогу, мають невиявлювану спорідненість до MBL (Weis et al., Nature, 360:127-134, (1992)). Взаємодія між MBL і моновалентними цукрами є дуже слабкою з константами дисоціації, що звичайно знаходяться в однорозрядному мілімолярному діапазоні. Сильне, специфічне зв'язування MBL з глікановими лігандами досягається за рахунок авідності, тобто взаємодії одночасно з множиною залишків моносахаридів, локалізованих у безпосередній близькості один від одного (Lee et al., Archiv. Biochem. Biophys. 299:129-136, (1992)). MBL розпізнає вуглеводні патерни, як правило, утворені мікроорганізмами, такими як бактерії, дріжджі, паразити і деякі віруси. На відміну від цього, MBL не розпізнає D-галактозу і сіалову кислоту, передостанні і останні цукри, які, як правило, містяться в "зрілих" складних глікокон'югатах, присутніх на клітинній поверхні і у плазмі ссавців. Вважається, що ця специфічність зв'язування сприяє розпізнаванню "чужорідних" поверхонь і допомагає захищати від "аутоактивації". Однак MBL не зв'язується з високою спорідненістю з кластерами "попередників" гліканів з високим вмістом манози на N-зв'язаних глікопротеїнах і гліколіпідах, секвестрованих в ендоплазматичній мережі і в апараті Гольджі клітин ссавців (Maynard et al., J. Biol. Chem. 257:3788-3794, (1982)). Таким чином, ушкоджені клітини є потенційними мішенями для активації лектинового шляху за допомогою зв'язування з MBL.

Фіколіни містять лектиновий домен, що відрізняється від лектинового домену MBL, який називають фібриногеноподібним доменом. Фіколіни зв'язуються з залишками цукрів Ca^{++}-незалежним способом. У людини були ідентифіковані фіколіни трьох видів (L-фіколін, M-фіколін і H-фіколін). Два сироваткові фіколіни, L-фіколін і H-фіколін, мають загальну специфічність до N-ацетил-D-глюкозаміну, однак H-фіколін також зв'язується і з N-ацетил-D-галактозаміном. Різниця в специфічності до цукрів L-фіколіну, H-фіколіну, CL-11 і MBL означає, що різні лектини можуть бути комплементарними і впливати на різні глікокон'югати, що нехай навіть перекриваються. Ця концепція підтверджується останніми повідомленнями в літературі про те, що з відомих лектинів у лектиновому шляху тільки L-фіколін специфічно зв'язується з ліпотейхоєвою кислотою, тобто глікокон'югатом клітинної стінки, що виявляється у всіх грампозитивних бактерій (Lynch N.J. et al., J. Immunol. 172:1198-1202, 2004). Колектини (тобто MBL) і фіколіни не мають значимої подібності по амінокислотних послідовностях. Однак ці дві групи білків мають однакову організацію доменів і, подібно C1q, збираються в олігомерні структури, що максимально збільшує можливість мультисайтового зв'язування.

Концентрації MBL у сироватці сильно варіюють у популяціях здорових індивідуумів і генетично контролюються поліморфізмами/мутаціями в промоторі і кодуючих областях гена MBL. Експресія MBL, як білка гострої фази, додатково підсилюється при запаленні. L-фіколін присутній у сироватці в концентраціях, аналогічних MBL. Отже, L-фіколінова гілка лектинового шляху потенційно порівняння по своїй силі з гілкою MBL. MBL і фіколіни також функціонують як опсоніни, які дозволяють фагоцитам впливати на MBL- і фіколін-декоровані поверхні (див. Jack et al., J. Leukoc. Biol., 77(3):328-36 (2004), Matsushita and Fujita, Immunobiology, 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., J. Immunol. 174(1):418-25(2005)). Така опсонізація вимагає взаємодії цих білків з рецепторами фагоцитів (Kuhlman et al., J. Exp. Med. 169:1733, (1989); Matsushita et al., J.

Biol. Chem. 277:2448-54, (1996)), ідентичність яких поки не встановлена.

Специфічна і високоафінна взаємодія людського MBL з унікальними C1r/C1s-подібними сериновими протеазами, називаними MBL-асоційованими сериновими протеазами (MASP), здійснюється через його колагеноподібний домен. На цей момент описано три MASP. Спочатку був ідентифікований один фермент "MASP", який був охарактеризований як фермент, відповідальний за ініціацію каскаду комплементу (тобто розщеплення C2 і C4) (Matsushita et al., J. Exp. Med. 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., J. Immunol. 750:571-578, (1993)). Потім було визначено, що активність MASP фактично представлена сумішшю двох протеаз: MASP-1 і MASP-2 (Thiel et al., Nature, 556:506-510, (1997)). Однак було показано, що для активації комплементу достатньо одного комплексу MBL-MASP-2 (Vorup-Jensen et al., J. Immunol. 165:2093-2100, (2000)). Крім того, тільки MASP-2 розщеплював C2 і C4 з високою швидкістю (Ambrus et al., J. Immunol. 770:1374-1382, (2003)). Таким чином, MASP-2 є протеазою, відповідальною за активацію C4 і C2 з утворенням C3-конвертази, C4b2a. Це є суттєвою відмінністю від комплексу C1 класичного шляху, де координована дія двох специфічних серинових протеаз (C1r і C1s) приводить до активації системи комплементу. Крім того, була виділена третя нова протеаза, MASP-3 (Dahl M.R. et al., Immunity, 15:127-35, 2001). MASP-1 і MASP-3 є продуктами альтернативного сплайсингу одного і того ж гена.

Організація доменів MASP ідентична такій в C1r і C1s, що є ферментативними компонентами комплексу C1 (Sim et al., Biochem. Soc. Trans. 28:545, (2000)). Ці домени включають N-кінцевий C1r/C1s/VEGF морського їжака/домен кісткового морфогенетичного білка (CUB), домен, подібний епідермальному фактору росту, другий домен CUB, тандем доменів регуляторних білків комплементу і домен серинової протеази. Як і в протеазах C1, активація MASP-2 здійснюється через розщеплення Arg-Ile-зв'язку, суміжного з доменом серинової протеази, приводячи до розділення ферменту на ланцюги A і B, з'єднані дисульфідним зв'язком, де останній складається з домену серинової протеази.

MBL також може бути асоційований з альтернативно сплайсованою формою MASP-2, відомою як MBL-асоційований білок розміром 19 кДа (MAp19) або малий MBL-асоційований білок (sMAP), у якого відсутня каталітична активність MASP-2 (Stover, J. Immunol. 162:3481-90 (1999); Takahashi et al., Int. Immunol. 11:859-863, (1999)). MAp19 містить перші два домени MASP-2, за якими іде додаткова послідовність з чотирьох унікальних амінокислот. Функція MAp19 залишається неясною (Degn et al., J. Immunol. Methods, 2011). Гени MASP-1 і MASP-2 локалізовані на хромосомах 3 і 1 людини, відповідно (Schwaeble et al., Immunobiology, 205:455-466 (2002)).

Існує ряд даних, які дозволяють припустити, що різні комплекси MBL-MASP і велика фракція MASP у сироватці не утворюють комплекси з MBL (Thiel S. et al., J. Immunol. 165:878-887, 2000). Як H-, так і L-фіколін зв'язуються з усіма MASP і, як і MBL, активують лектиновий шлях комплементу (Dahl M.R. et al., Immunity, 15:127-35, 2001; Matsushita M. et al., J. Immunol. 165:3502-3506, 2002). Лектиновий і класичні шляхи утворюють загальну C3-конвертазу (C4b2a), і на цьому етапі ці два шляхи сходяться.

Існує широко розповсюджена думка, що лектиновий шлях відіграє важливу роль у захисті неінфікованого хазяїна від інфекції. Переконливі докази участі MBL у захисті хазяїна були одержані з аналізу пацієнтів зі зниженими рівнями функціонального MBL у сироватці (Kilpatrick D.C., Biochim. Biophys. Acta, 1572:401-413, 2002). У цих пацієнтів спостерігається сприйнятливість до рецидивуючих бактеріальних і грибкових інфекцій. Такі симптоми звичайно з'являються в ранньому віці, у межах очевидного "вікна уразливості", коли відбувається зниження титрів материнських антитіл, доти, поки не сформується повний репертуар антитіл. Цей синдром часто є результатом мутацій у декількох сайтах у колагеновій частині MBL, які перешкоджають правильному утворенню олігомерів MBL. Однак, оскільки MBL може функціонувати як опсонін незалежно від комплементу, то невідомо, у якому ступені підвищення чутливості до інфекції обумовлене зниженням активації комплементу.

Вважається, що всі три шляхи (тобто класичний, лектиновий і альтернативний) сходяться в C5, який розщеплюється з утворенням продуктів із численними прозапальними ефектами. Шлях, у якому сходяться всі три шляхи, був визначений як термінальний шлях комплементу. C5a являє собою найбільш сильний анафілотоксин, індукуючий зміну тонусу гладких м'язів і судин, а також проникності судин. Він також є потужним хемотаксином і активатором нейтрофілів і моноцитів. C5a-опосередкована активація клітин може значно підсилювати запальні відповіді шляхом індукування вивільнення множини додаткових медіаторів запалення, включаючи цитокіни, гідролітичні ферменти, метаболіти арахідонової кислоти і частинки активного кисню. Розщеплення C5 приводить до утворення C5b-9, також відомого як мембраноатакуючий комплекс (MAC). На даний час існують переконливі докази того, що

сублітичне відкладення МАС, крім його ролі як літичного пороутворювального комплексу, може відігравати важливу роль у запальному процесі.

Додатково до своєї важливої ролі в імунному захисті система комплементу бере участь в ураженні тканин при багатьох клінічних станах. Незважаючи на наявність множини даних, що вказують на участь класичного і альтернативного шляхів комплементу в патогенезі неінфекційних захворювань у людини, роль лектинового шляху в такому патогенезі почали оцінювати тільки зараз. Нещодавні дослідження показали, що активація лектинового шляху може бути відповідальна за активацію комплементу і пов'язане з ним запалення при ішемічному/реперфузійному ушкодженні. Collard et al. (2000) показали, що культивовані ендотеліальні клітини, піддані окисному стресу, зв'язуються з MBL і демонструють відкладення C3 у відповідь на вплив людської сироватки (Collard et al., Am. J. Pathol. 156:1549-1556, (2000)). Крім того, обробка людської сироватки блокувальними моноклональними анти-MBL антитілами пригнічувала зв'язування MBL і активацію комплементу. Ці дані підтверджували на щурячій моделі ішемії/реперфузії міокарда, при якій у щурів, що одержали блокувальні антитіла до щурячого MBL, спостерігалося значиме зниження ушкодження міокарда на фоні оклюзії коронарної артерії, у порівнянні з щурами, що одержували контрольне антитіло (Jordan J.E. et al., Circulation, 104:1413-1418, 2001). Молекулярний механізм зв'язування MBL із судинним ендотелієм після окисного стресу залишається поки неясним, однак останні дослідження дозволяють припустити, що активація лектинового шляху після окисного стресу може бути опосередкована зв'язуванням MBL з судинними ендотеліальними цитокератинами, а не з глікокон'югатами (Collard C.D. et al., Am. J. Pathol. 159:1045-1054, 2001). Інші дослідження вказали на роль класичного і альтернативного шляхів у патогенезі ішемічного/реперфузійного ушкодження, а роль лектиновго шляху в патогенезі такого захворювання поки залишається предметом дискусії (Riedermann N.C. et al., Am. J. Pathol. 162:363-367, 2003).

Фіброз являє собою утворення надлишкової кількості сполучної тканини в органі або тканині, що утворюється як правило у відповідь на ушкодження або ураження. Відмітною ознакою фіброзу є продукування надлишкового позаклітинного матриксу після локальної травми. Нормальна фізіологічна відповідь на ураження приводить до утворення сполучної тканини, але цей початково цілющий процес відновлення може затягтися і стати патологічним, змінюючи архітектуру і функцію тканини. На клітинному рівні, епітеліальні клітини і фібробласти розмножуються і диференціюються в міофібробласти, приводячи до скорочення матриксу, збільшення ригідності, мікроваскулярної компресії і гіпоксії. Приплив запальних клітин, включаючи макрофаги і лімфоцити, приводить до вивільнення цитокінів і підсилює відкладення колагену, фібронектину і інших молекулярних маркерів фіброзу. Традиційні терапевтичні підходи в основному були спрямовані на запальний процес при фіброзі з використанням кортикостероїдів і імунодепресантів. На жаль, усі ці протизапальні агенти мають невеликий клінічний ефект. На даний час відсутнє ефективне лікування або терапія фіброзу, однак і звіти досліджень на тваринах, і епізодичні звіти про результати лікування людей говорять про те, що фіброзні ураження тканин можуть бути купірувані (Tampe and Zeisberg, Nat. Rev. Nephrol., Vol. 10:226-237, 2014).

Нирка має обмежену здатність до відновлення після травми. Різні патології нирок приводять до місцевого запалення, яке викликає рубцювання і фіброз нирок. Вплив запальних стимулів, що не припиняється, приводить до тубулоінтерстиціального запалення і фіброзу і прогресуючого функціонального порушення нирок при хронічному захворюванні нирок. Його прогресування до термінальної стадії ниркової недостатності пов'язане зі значним рівнем захворюваності і смертності. Оскільки тубулоінтерстиціальний фіброз є загальною термінальною точкою багатьох ниркових патологій, він являє собою важливу мішень для лікування, спрямованого на запобігання нирковій недостатності. Фактори ризику (наприклад, протеїнурія), незалежні від первинного захворювання нирок, сприяють розвитку фіброзу нирок і втраті екскреторної функції нирок, стимулюючи розвиток місцевого запалення, що, у свою чергу, підсилює прогресування захворювання.

Враховуючи роль фіброзу в багатьох захворюваннях і розладах, таких як, наприклад, тубулоінтерстиціальний фіброз, що приводить до хронічного захворювання нирок, існує нагальна потреба в розробці терапевтично ефективних засобів для лікування захворювань і станів, викликаних або ускладнених фіброзом. Також, враховуючи нестачу у нових і існуючих методах лікування, що впливають на запальні профіброзні фактори при ниркових захворюваннях, необхідно розробити терапевтично ефективні засоби для лікування, пригнічення, профілактики і/або купірування фіброзу нирок, тим самим запобігання прогресуванню хронічного захворювання нирок.

СУТЬ ВИНАХОДУ

Цей розділ опису призначений для введення набору понять, представлених у спрощеному вигляді, які більш докладно описані нижче. Цей розділ опису не призначений для визначення ключових ознак заявленого об'єкта винаходу і не призначений для визначення обсягу заявленого об'єкта винаходу.

В одному з аспектів винахід стосується способу лікування, пригнічення, полегшення або профілактики фіброзу у ссавця, що страждає або має ризик розвитку захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту кількості інгібуючого MASP-2 агента, ефективної для пригнічення фіброзу. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою MASP-2 антитіло або його фрагмент. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою моноклональне MASP-2 антитіло або його фрагмент, що специфічно зв'язується з частиною SEQ ID NO:6. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вибірково пригнічує активацію лектинового шляху комплементу без пригнічення по суті активації C1q-залежного комплементу. В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає захворюванням або розладом, викликаним або ускладненим щонайменше одним з наступного: (i) фіброзу і/або запалення, пов'язаного з ішемічним реперфузійним ушкодженням, (ii) фіброзу і/або запалення нирок (наприклад, тубулоінтерстиціального фіброзу, хронічного захворювання нирок, хронічної ниркової недостатності, гломерулярного захворювання (наприклад, фокального сегментарного гломерулосклерозу)), порушення імунного комплексу (наприклад, IgA-нефропатії, мембранозної нефропатії), вовчакового нефриту, нефротичного синдрому, діабетичної нефропатії, тубулоінтерстиціального ураження і гломерулонефриту (наприклад, C3-гломерулопатії), (iii) фіброзу і/або запалення легенів (наприклад, хронічної обструктивної хвороби легенів, кістозного фіброзу, фіброзу легенів, пов'язаного зі склеродермією, бронхоектазу і легеневої гіпертензії), (iv) фіброзу і/або запалення печінки (наприклад, цирозу, неалкогольної жирової хвороби печінки (стеатогепатиту)), фіброзу печінки, вторинного відносно зловживання алкоголем, фіброзу печінки, вторинного відносно гострого або хронічного гепатиту (індукованої ліками гепатотоксичності, викликаної ацетамінофеном або іншим лікарським засобом), (v) фіброзу і/або запалення серця (наприклад, серцевого фіброзу, інфаркту міокарда, фіброзу клапана, фіброзу передсердя, фіброзу ендоміокарда, аритмічної кардіоміопатії правого шлуночка (АКПШ), (vi) судинного фіброзу (наприклад, судинного захворювання, атеросклеротичного судинного захворювання, стенозу судин, рестенозу, васкуліту, флебіту, тромбозу глибоких вен і аневризми черевної аорти), (vii) фіброзу шкіри (наприклад, надмірного загоєння ран, склеродермії, системного склерозу, келоїдів, захворювання сполучної тканини, рубцювання і гіпертрофічних рубців), (viii) фіброзу суглобів (наприклад, артрофіброзу), (ix) фіброзу центральної нервової системи (наприклад, інсульту, травматичного ушкодження головного мозку і травми спинного мозку), (x) фіброзу травної системи (наприклад, хвороби Крона, фіброзу підшлункової залози і виразкового коліту), (xi) очного фіброзу (наприклад, передньої субкапсулярної катаракти, помутніння задньої капсули, дегенерації жовтої плями і ретинальної і вітреальної ретинопатії), (xii) фіброзу структур м'яких тканин скелетно-м'язової системи (наприклад, клітинного капсуліту, контрактури Дюпюїтрена і мієлофіброзу), (xiii) фіброзу репродуктивних органів (наприклад, ендометріозу і хвороби Пейроні), (xiv) хронічного інфекційного захворювання, яке викликає фіброз і/або запалення (наприклад, альфа-вірусу, гепатиту A, гепатиту B, гепатиту C, туберкульозу, ВІЛ і грипу), (xv) аутоімунного захворювання, яке викликає фіброз і/або запалення (наприклад, склеродермії і системного червоного вовчака (СЧВ), (xvi) рубцювання, пов'язаного із травмою (наприклад, де пов'язані з травмою рубці вибирають із групи, що складається з хірургічних ускладнень (наприклад, післяопераційних спайок, при яких може утворюватися рубцева тканина між внутрішніми органами, що викликає контрактуру, біль і може приводити до безплідності), індукованого хіміотерапевтичними засобами фіброзу, індукованого радіацією фіброзу і рубцювання, пов'язаного з опіками), або (xvii) трансплантації органів, фіброзу молочної залози, м'язового фіброзу, ретроперитонеального фіброзу, фіброзу щитовидної залози, фіброзу лімфатичних вузлів, фіброзу сечового міхура і плеврального фіброзу.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу лікування, пригнічення, полегшення або профілактики фіброзу нирок у ссавця, що страждає або має ризик розвитку захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом і/або запаленням нирок, який включає введення суб'єкту кількості інгібуючого MASP-2 агента, ефективної для пригнічення фіброзу нирок. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою MASP-2 антитіло або його фрагмент. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою моноклональне MASP-2 антитіло або його фрагмент, що специфічно зв'язується з частиною SEQ ID NO:6. В одному з варіантів здійснення MASP-2 антитіло або його фрагмент специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить SEQ ID NO:6, зі спорідненістю, яка щонайменше в 10

разів перевищує спорідненість зв'язування з іншим антигеном у системі комплементу. В одному з варіантів здійснення антитіло або його фрагмент вибирають із групи, що складається з рекомбінантного антитіла, антитіла зі зниженою ефекторною функцією, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вибірково пригнічує активацію лектинового шляху комплементу без пригнічення по суті активації C1q-залежного комплементу. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вводять підшкірно, інтраперитонеально, внутрішньом'язово, внутрішньоартеріально, внутрішньовенно або шляхом інгаляції. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вводять у кількості, ефективній для пригнічення тубулоінтерстиціального фіброзу. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вводять у кількості, ефективній для зменшення, затримання або усунення необхідності в діалізі у суб'єкта. В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає захворюванням нирок або захворюванням, вибраним із групи, що складається з хронічного захворювання нирок, хронічної ниркової недостатності, гломерулярного захворювання (наприклад, фокального сегментарного гломерулосклерозу), вовчакового нефриту, нефротичного синдрому, діабетичної нефропатії, тубулоінтерстиціального ураження і гломерулонефриту (наприклад, C3-гломерулопатії). В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає протеїнурією, і інгібуючий MASP-2 агент вводять у кількості, ефективній для зменшення тяжкості протеїнурії у суб'єкта. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вводять у кількості і протягом періоду часу, які ефективні для досягнення щонайменше 20 % зменшення (наприклад, щонайменше 30 % зменшення або щонайменше 40 % зменшення, або щонайменше 50 % зменшення) 24-годинної екскреції білка з сечею в порівнянні з вихідною 24-годинною екскрецією білка з сечею у суб'єкта до лікування. В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає захворюванням або розладом нирок, асоційованим з протеїнурією, вибраною із групи, що складається з нефротичного синдрому, прееклампсії, еклампсії, токсичного ураження нирок, амілоїдозу, судинно-колагенозних захворювань (наприклад, системного червоного вовчака), зневоднювання, гломерулярних захворювань (наприклад, мембранозного гломерулонефриту, фокального сегментарного гломерулонефриту, C3-гломерулопатії, хвороби мінімальних змін, ліпоїдного нефрозу), інтенсивного фізичного навантаження, стресу, доброякісної ортостатичної (постуральної) протеїнурії, фокального сегментарного гломерулосклерозу, IgA-нефропатії (наприклад, хвороби Бергера), IgM-нефропатії, мембранопроліферативного гломерулонефриту, мембранозної нефропатії, хвороби мінімальних змін, саркоїдозу, синдрому Альпорта, цукрового діабету (діабетичної нефропатії), індукованої ліками токсичності (наприклад, індукованої НПЗП, нікотином, пеніциламіном, карбонатом літію, золотом і іншими важкими металами, інгібіторами АПФ, антибіотиками (наприклад, адріаміцином) або опіатами (наприклад, героїном) або іншими нефротоксинами); хвороби Фабрі, інфекції (наприклад, ВІЛ, сифілісу, гепатиту A, B або C, постстрептококової інфекції, сечового шистосомозу); аміноацидурії, синдрому Фанконі, гіпертонічного нефросклерозу, інтерстиціального нефриту, серпоподібноклітинної хвороби, гемоглобінурії, множинної мієломи, міоглобінурії, відторгнення органів (наприклад, відторгнення трансплантата нирки), геморагічної пропасниці Ебола, синдрому нігтьової патели, сімейної пропасниці, синдрому HELLP, системного червоного вовчака, гранулематозу Вегенера, ревматоїдного артриту, хвороби накопичення глікогену типу 1 (хвороба Гірке), синдрому Гудпасчера, пурпури Шенлейна-Геноха, інфекції сечових шляхів, що поширилася на нирки, синдрому Шегрена і постінфекційного гломерулонефриту. В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає IgA-нефропатією. В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає мембранозною нефропатією.

В іншому аспекті даного винаходу надається спосіб профілактики або зменшення ураження нирок у суб'єкта, що страждає захворюванням або станом, асоційованим із протеїнурією, який включає введення кількості інгібуючого MASP-2 агента, ефективної для зменшення або профілактики протеїнурії у суб'єкта. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою MASP-2 антитіло або його фрагмент. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою моноклональне MASP-2 антитіло або його фрагмент, що специфічно зв'язується з частиною SEQ ID NO:6. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вибірково пригнічує активацію лектинового шляху комплементу без пригнічення по суті активації C1q-залежного комплементу. В одному з варіантів здійснення захворювання або стан, асоційований з протеїнурією, вибирають із групи, що складається з нефротичного синдрому, прееклампсії, еклампсії, токсичної ураження нирок, амілоїдозу, судинно-колагенозних захворювань (наприклад, системного червоного вовчака), зневоднювання, гломерулярних захворювань (наприклад, мембранозного гломерулонефриту, фокального сегментарного гломерулонефриту, C3-гломерулопатії, хвороби мінімальних змін, ліпоїдного нефрозу),

інтенсивного фізичного навантаження, стресу, доброякісної ортостатичної (постуральної) протеїнурії, фокального сегментарного гломерулосклерозу, IgA-нефропатії (наприклад, хвороби Бергера), IgM-нефропатії, мембранопроліферативного гломерулонефриту, мембранозної нефропатії, хвороби мінімальних змін, саркоїдозу, синдрому Альпорта, цукрового діабету (діабетичної нефропатії), індукованої ліками токсичності (наприклад, індукованої НПЗП, нікотином, пеніциламіном, карбонатом літію, золотом і іншими важкими металами, інгібіторами АПФ, антибіотиками (наприклад, адріаміцином) або опіатами (наприклад, героїном)); хвороби Фабрі, інфекції (наприклад, ВІЛ, сифілісу, гепатиту А, В або С, постстрептококової інфекції, сечового шистосомозу); аміноацидурії, синдрому Фанконі, гіпертонічного нефросклерозу, інтерстиціального нефриту, серпоподібноклітинної хвороби, гемоглобінурії, множинної мієломи, міоглобінурії, відторгнення органів (наприклад, відторгнення трансплантата нирки), геморагічної пропасниці Ебола, синдрому нігтьової патели, сімейної пропасниці, синдрому HELLP, системного червоного вовчака, гранулематозу Вегенера, ревматоїдного артриту, хвороби накопичення глікогену типу 1, синдрому Гудпасчера, пурпури Шенлейна-Геноха, інфекції сечових шляхів, що поширилася на нирки, синдрому Шегрена і постінфекційного гломерулонефриту. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вводять у кількості і протягом періоду часу, які ефективні для досягнення щонайменше 20 % зменшення (наприклад, щонайменше 30 % зменшення або щонайменше 40 % зменшення, або щонайменше 50 % зменшення) 24-годинної екскреції білка з сечею в порівнянні з вихідною 24-годинною екскрецією білка з сечею у суб'єкта до лікування.

В одному з аспектів даного винаходу надається спосіб пригнічення прогресування хронічного захворювання нирок, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, кількості інгібуючого MASP-2 агента, ефективної для зменшення або профілактики фіброзу нирок, наприклад тубулоінтерстиціального фіброзу. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою MASP-2 антитіло або його фрагмент. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою моноклональне MASP-2 антитіло або його фрагмент, що специфічно зв'язується з частиною SEQ ID NO:6. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вибірково пригнічує активацію лектинового шляху комплементу без пригнічення по суті активації C1q-залежного комплементу. В одному з варіантів здійснення суб'єкт, що цього потребує, страждав протеїнурією до введення інгібуючого MASP-2 агента, причому введення інгібуючого MASP-2 агента зменшує протеїнурію у суб'єкта. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вводять у кількості і протягом періоду часу, які ефективні для досягнення щонайменше 20 % зменшення (наприклад, щонайменше 30 % зменшення або щонайменше 40 % зменшення, або щонайменше 50 % зменшення) 24-годинної екскреції білка з сечею в порівнянні з вихідною 24-годинною екскрецією білка з сечею у суб'єкта до лікування. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вводять у кількості, ефективній для зменшення, затримання або усунення необхідності в діалізі у суб'єкта.

В іншому аспекті даного винаходу надається спосіб захисту нирок від ураження у суб'єкта, який одержував, одержує або буде одержувати лікування одним або більше нефротоксичними агентами, який включає введення кількості інгібуючого MASP-2 агента, ефективної для профілактики або полегшення індукованої ліками нефропатії. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою MASP-2 антитіло або його фрагмент. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою моноклональне MASP-2 антитіло або його фрагмент, що специфічно зв'язується з частиною SEQ ID NO:6. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент вибірково пригнічує активацію лектинового шляху комплементу без пригнічення по суті активації C1q-залежного комплементу.

В одному з аспектів винаходу надається спосіб лікування людини, що страждає імуноглобулін А-нефропатією (IgAN), який включає введення суб'єкту композиції, що містить кількість інгібуючого MASP-2 антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, ефективну для пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу. В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає стероїд-залежною IgAN. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою моноклональне антитіло або його фрагмент, що специфічно зв'язується з людським MASP-2. В одному з варіантів здійснення антитіло або його фрагмент вибирають із групи, що складається з рекомбінантного антитіла, антитіла зі зниженою ефекторною функцією, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло по суті не пригнічує активацію класичного шляху. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло пригнічує відкладення C3b в 90 % людській сироватці зі значенням IC_{50} 30 нМ або менше. В одному з варіантів здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта, що має стероїд-залежну IgAN, до етапу введення суб'єкту композиції, що містить кількість інгібуючого MASP-2 антитіла або його

антигензв'язувального фрагмента, ефективну для поліпшення функції нирок. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент вводять у кількості, ефективній для поліпшення функції нирок. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент вводять у ефективній кількості і протягом періоду часу, достатнього для досягнення щонайменше 20 % зменшення 24-годинної екскреції білка з сечею в порівнянні з вихідною 24-годинною екскрецією білка з сечею у суб'єкта до лікування. В одному з варіантів здійснення композицію вводять у кількості, достатній для поліпшення функції нирок і зменшення дози кортикостероїдів у зазначеного суб'єкта. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:67, варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:70.

В іншому аспекті винаходу надається спосіб лікування людини, що страждає мембранозною нефропатією (МН), який включає введення суб'єкту композиції, що містить кількість інгібуючого MASP-2 антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, ефективну для пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу. В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає стероїд-залежною МН. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло являє собою моноклональне антитіло або його фрагмент, що специфічно зв'язується з людським MASP-2. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент вводять у кількості, ефективній для поліпшення функції нирок. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент вводять у ефективній кількості і протягом періоду часу, достатнього для досягнення щонайменше 20 % зменшення 24-годинної екскреції білка з сечею в порівнянні з вихідною 24-годинною екскрецією білка з сечею у суб'єкта до лікування. В одному з варіантів здійснення композицію вводять у кількості, достатній для поліпшення функції нирок і зменшення дози кортикостероїдів у зазначеного суб'єкта. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:67, варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 амінокислотної послідовності, наведеної в SEQ ID NO:70.

ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Вищевикладені аспекти і багато які із супутніх переваг цього винаходу стануть більш зрозумілими з посиланням на наведений нижче докладний опис з посиланням на прикладені креслення, на яких:

фіг. 1 являє собою діаграму, що ілюструє геномну структуру людського MASP-2;

фіг. 2A являє собою схематичну діаграму, що ілюструє структуру доменів людського білка MASP-2;

фіг. 2B являє собою схематичну діаграму, що ілюструє структуру доменів людського білка MAp19;

фіг. 3 являє собою діаграму, що ілюструє стратегію нокауту мишачого MASP-2;

фіг. 4 являє собою діаграму, що ілюструє конструкцію міні-гена MASP-2;

на фіг. 5A представлені результати, які демонструють, що дефіцит MASP-2 приводить до втрати C4-опосередкованої активації лектинового шляху, визначеної по відсутності відкладень C4b на манані, як описано в прикладі 2;

на фіг. 5B представлені результати, які демонструють, що дефіцит MASP-2 приводить до втрати C4-опосередкованої активації лектинового шляху, визначеної по відсутності відкладень C4b на зимозані, як описано в прикладі 2;

на фіг. 5C представлені результати, які демонструють відносні рівні активації C4 у зразках сироватки, одержаних з MASP-2+/-, MASP-2-/- ліній і лінії дикого типу, визначені по відкладенню C4b на манані і на зимозані, як описано в прикладі 2;

на фіг. 6 представлені результати, які демонструють, що додавання мишачого рекомбінантного MASP-2 до зразків MASP-2-/- сироватки відновлює C4-опосередковану активацію лектинового шляху, яка залежить від концентрації білка, визначену по відкладенню C4b на манані, як описано в прикладі 2;

на фіг. 7 представлені результати, які демонструють, що класичний шлях є функціональним у MASP-2-/- лінії, як описано в прикладі 8;

на фіг. 8A представлені результати, які демонструють, що анти-MASP-2 антитіло Fab2 № 11 пригнічує утворення C3-конвертази, як описано в прикладі 10;

на фіг. 8B представлені результати, які демонструють, що анти-MASP-2 антитіло Fab2 № 11 зв'язується з нативним щурячим MASP-2, як описано в прикладі 10;

на фіг. 8C представлені результати, які демонструють, що анти-MASP-2 антитіло Fab2 № 41 пригнічує розщеплення C4, як описано в прикладі 10;

на фіг. 9 представлені результати, які демонструють, що всі протестовані анти-MASP-2 антитіла Fab2, які пригнічували утворення C3-конвертази, також пригнічують розщеплення C4, як описано в прикладі 10;

фіг. 10 являє собою діаграму, що ілюструє рекомбінантні поліпептиди, одержані із щурячого MASP-2, які були використані для картування епітопів блокуючих MASP-2 антитіл Fab2, як описано в прикладі 11;

на фіг. 11 представлені результати, що демонструють зв'язування анти-MASP-2 Fab2 №№ 40 і 60 з щурячими поліпептидами MASP-2, як описано в прикладі 11;

на фіг. 12A графічно показаний рівень відкладення MAC у присутності або за відсутності людського моноклонального анти-MASP-2 антитіла (OMS646) в умовах тестування, специфічних для лектинового шляху, що свідчить про те, що OMS646 пригнічує опосередковане лектином відкладення MAC з величиною IC_{50}, що дорівнює приблизно 1 нМ, як описано в прикладі 12;

на фіг. 12B графічно показаний рівень відкладення MAC у присутності або за відсутності людського моноклонального анти-MASP-2 антитіла (OMS646) в умовах тестування, специфічних для класичного шляху, що свідчить про те, що OMS646 не пригнічує опосередковане класичним шляхом відкладення MAC, як описано в прикладі 12;

на фіг. 12C графічно показаний рівень відкладення MAC у присутності або за відсутності людського моноклонального анти-MASP-2 антитіла (OMS646) в умовах тестування, специфічних для альтернативного шляху, що свідчить про те, що OMS646 не пригнічує опосередковане альтернативним шляхом відкладення MAC, як описано в прикладі 12;

на фіг. 13 графічно показаний фармакокінетичний (PK) профіль людського моноклонального анти-MASP-2 антитіла (OMS646) у мишей, що показує концентрацію OMS646 (середнє значення для n=3 тварин/групу) залежно від часу після введення зазначеної дози, як описано в прикладі 12;

на фіг. 14A графічно показана фармакодинамічна (PD) відповідь моноклонального анти-MASP-2 антитіла людини (OMS646), визначена по падінню активності лектинового шляху системи комплементу у мишей після внутрішньовенного введення, як описано в прикладі 12;

на фіг. 14B графічно показана фармакодинамічна (PD) відповідь моноклонального MASP-2 антитіла людини (OMS646), визначена по зниженню активності лектинового шляху системи комплементу у мишей після підшкірного введення, як описано в прикладі 12;

на фіг. 15 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених сіріусом червоним; зрізи тканин одержували у мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) і псевдооперованих мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей, як описано в прикладі 14;

на фіг. 16 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених антитілами до маркера макрофагів F4/80; зрізи тканин одержували у мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) і псевдооперованих мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей, як описано в прикладі 14;

на фіг. 17 графічно показані відносні рівні експресії мРНК колагену-4, виміряні кількісною ПЛР (кПЛР) у зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) і псевдооперованих мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей, як описано в прикладі 14;

на фіг. 18 графічно показані відносні рівні експресії мРНК трансформуючого фактора росту бета-1 (TGFβ-1), виміряні кПЛР у зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) і псевдооперованих мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей, як описано в прикладі 14;

на фіг. 19 графічно показані відносні рівні експресії мРНК інтерлейкіну-6 (IL-6), виміряні кПЛР у зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) і псевдооперованих мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей, як описано в прикладі 14;

на фіг. 20 графічно показані відносні рівні експресії мРНК інтерферону-γ, виміряні кПЛР, у зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей, через 7 днів після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) і псевдооперованих мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей, як описано в прикладі 14;

на фіг. 21 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених сіріусом червоним; зрізи тканин одержували через 7 днів після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) у мишей дикого типу, що одержували інгібуюче

MASP-2 антитіло і антитіло ізотипного контролю, як описано в прикладі 15;

на фіг. 22 графічно показаний вміст гідроксипроліну в нирках, одержаних через 7 днів після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) у мишей дикого типу, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло, у порівнянні з рівнем гідроксипроліну в тканині оклюдованих нирок, одержаних від мишей дикого типу, що одержували ізотипний контроль, IgG4, як описано в прикладі 15;

на фіг. 23 графічно показана загальна кількість сироваткових білків (мг/мл), виміряна на 15-й день вивчення впливу передозування білка у контрольних мишей дикого типу (n=2), що одержували тільки фізіологічний розчин, мишей дикого типу, що одержували BSA (n=6), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=6), як описано в прикладі 16;

на фіг. 24 графічно показана загальна кількість білка (мг), виділеного із сечею, зібраною протягом 24-х годин, на 15-й день вивчення впливу передозування білка у контрольних мишей дикого типу (n=2), що одержували тільки фізіологічний розчин, мишей дикого типу, що одержували BSA (n=6), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=6), як описано в прикладі 16;

на фіг. 25 показані репрезентативні зрізи тканин нирок, забарвлені гематоксиліном і еозином (H&E), на 15-й день вивчення рівня передозування білка у наступних груп мишей: (панель A) контрольні миші дикого типу; (панель B) MASP-2-/- контрольні миші, (панель C) миші дикого типу, що одержували BSA; і (панель D) MASP-2-/- миші, що одержували бичачий сироватковий альбумін (BSA), як описано в прикладі 16;

на фіг. 26 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених антитілом до маркера макрофагів F4/80, що показують середню забарвлену площу макрофагів (%), де зрізи тканин одержували на 15-й день вивчення впливу передозування білка у контрольних мишей дикого типу (n=2), мишей дикого типу, що одержували BSA (n=6), і мишей MASP-2-/-, що одержували BSA (n=5), як описано в прикладі 16;

на фіг. 27A графічно показаний аналіз наявності кореляції між рівнем макрофагів і протеїнурією у кожної миші дикого типу (n=6), що одержувала BSA, у вигляді графіка залежності загальної кількості виділеного білка, виміряної в 24-годинному зразку сечі, від інфільтрації макрофагів (середня забарвлена площа, %), як описано в прикладі 16;

на фіг. 27B графічно показаний аналіз наявності кореляції між рівнем макрофагів і протеїнурією у кожної MASP-2-/- миші (n=5), що одержувала BSA, у вигляді графіка залежності загальної кількості виділеного білка, виміряної в 24-годинному зразку сечі, від інфільтрації макрофагів (середня забарвлена площа, %), як описано в прикладі 16;

на фіг. 28 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-TGFβ антитілом (виміряно у вигляді площі забарвлених анти-TGFβ антитіл, вираженої у відсотках), у мишей дикого типу, що одержували BSA (n=4), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=5), як описано в прикладі 16;

на фіг. 29 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-TNFα антитілом (виміряно у вигляді площі забарвлених анти-TNFα антитіл), у мишей дикого типу, що одержували BSA (n=4), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=5), як описано в прикладі 16;

на фіг. 30 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень ділянок тканин, забарвлених анти-IL-6 антитілом (виміряно у вигляді площі забарвлених анти-IL-6 антитіл), у контрольних мишей дикого типу, контрольних MASP-2-/- мишей, мишей дикого типу, що одержували BSA (n=7), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=7), як описано в прикладі 16;

на фіг. 31 графічно показана частота TUNEL-позитивних апоптотичних клітин, підрахована у послідовно вибраних 20 полях зору під великим збільшенням (HPF) у зрізах тканин ниркової кіркової речовини, одержаних від контрольних мишей дикого типу (n=1), контрольних MASP-2-/- мишей (n=1), мишей дикого типу, що одержували BSA (n=6), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=7), як описано в прикладі 16;

на фіг. 32 показані репрезентативні зрізи тканин, забарвлені H&E, одержані на 15-й день після лікування BSA наступних груп мишей: (панель A) контрольні миші дикого типу, миші, що одержували фізіологічний розчин; (панель B) миші, що одержували антитіло ізотипного контролю, і (панель C) миші дикого типу, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло, як описано в прикладі 17;

на фіг. 33 графічно показана частота TUNEL-позитивних апоптотичних клітин, підрахована в послідовно вибраних 20 полях зору під великим збільшенням (HPF) у зрізах тканин ниркової кіркової речовини, одержаних від контрольних мишей дикого типу, що одержували контрольний фізіологічний розчин і BSA (n=8), мишей дикого типу, що одержували антитіло ізотипного контролю і BSA (n=8), і мишей дикого типу, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло і BSA (n=7), як описано в прикладі 17;

на фіг. 34 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень ділянок тканин, забарвлених анти-TGFβ антитілом (виміряних у вигляді площі забарвлених анти-TGFβ антитіл, %), у мишей дикого типу, що одержували BSA і фізіологічний розчин (n=8), мишей дикого типу, що одержували BSA і антитіло ізотипного контролю (n=7), і мишей дикого типу, що одержували BSA і інгібуюче MASP-2 антитіло (n=8), як описано в прикладі 17;

на фіг. 35 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-TNFα антитілом (виміряних у вигляді площі забарвлених анти-TNFα антитіл, %), у мишей дикого типу, що одержували BSA і фізіологічний розчин (n=8), мишей дикого типу, що одержували BSA і антитіло ізотипного контролю (n=7), і мишей дикого типу, що одержували BSA і інгібуюче MASP-2 антитіло (n=8), як описано у прикладі 17;

на фіг. 36 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-IL-6 антитілом (виміряних у вигляді площі забарвлених анти-IL-6 антитіл, %), у мишей дикого типу, що одержували BSA і фізіологічний розчин (n=8), мишей, що одержували BSA і антитіло ізотипного контролю (n=7), і мишей дикого типу, що одержували BSA і інгібуюче MASP-2 антитіло (n=8), як описано в прикладі 17;

на фіг. 37 показані репрезентативні зрізи тканин, забарвлені H&E, одержані на 14-й день після лікування тільки адріаміцином або фізіологічним розчином (контрольні), для наступних груп мишей: (панелі A-1, A-2, A-3) контрольні миші дикого типу, що одержували тільки фізіологічний розчин; (панелі B-1, B-2, B-3) миші дикого типу, що одержували адріаміцин; і (панелі C-1, C-2, C-3) MASP-2-/- миші, що одержували адріаміцин, як описано в прикладі 18;

на фіг. 38 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених антитілом до маркера макрофагів F4/80, що показують середню забарвлену площу макрофагів (%) на 14-й день після лікування тільки адріаміцином або фізіологічним розчином (контрольні миші дикого типу), для наступних груп мишей: контрольні миші дикого типу, що одержували тільки фізіологічний розчин; миші дикого типу, що одержували адріаміцин; MASP-2-/- миші, що одержували тільки фізіологічний розчин, і MASP-2-/- миші, що одержували адріаміцин, де **p=0,007, як описано в прикладі 18;

на фіг. 39 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених сіріусом червоним, що показують забарвлені області відкладення колагену (%) на 14-й день після лікування тільки адріаміцином або фізіологічним розчином (контрольні миші дикого типу), для наступних груп мишей: контрольні миші дикого типу, що одержували тільки фізіологічний розчин; миші дикого типу, що одержували адріаміцин; MASP-2-/- миші, що одержували тільки фізіологічний розчин, і MASP-2-/- миші, що одержували адріаміцин, де **p=0,005, як описано в прикладі 18; і

на фіг. 40 графічно показане співвідношення альбумін/креатинін в сечі (uACR) у двох IgA-пацієнтів протягом дванадцятитижневого дослідження з тижневим лікуванням інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646), як описано в прикладі 19.

ОПИС СПИСКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO:1 - кДНК людського MAp19;

SEQ ID NO:2 - людський білок MAp19 (з лідерною послідовністю);

SEQ ID NO:3 - людський білок MAp19 (зрілий);

SEQ ID NO:4 - кДНК людського MASP-2;

SEQ ID NO:5 - людський білок MASP-2 (з лідерною послідовністю);

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

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

АНТИГЕНИ (ВІДНОСНО ЗРІЛОГО БІЛКА MASP-2)

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

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

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

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

SEQ ID NO:12 - домен серинової протеази (aa 429-671);

SEQ ID NO:13 - неактивний домен серинової протеази (aa 610-625 із заміною Ser618 на Ala);

SEQ ID NO:14 - TPLGPKWPEPVFGRL (пептид CUBI);

SEQ ID NO:15 - TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (пептид CUBI);

SEQ ID NO:16 - TFRSDYSN (центральна частина зв'язувальної ділянки MBL);

SEQ ID NO:17 - FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (зв'язувальна ділянка MBL);

SEQ ID NO:18 - IDECQVAPG (пептид EGF);

SEQ ID NO:19 - ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALV (центральна частина, що зв'язує серинову протеазу).

ДОКЛАДНИЙ ОПИС

ПЕПТИДНІ ІНГІБІТОРИ

SEQ ID NO:20 - повнорозмірна кДНК MBL;

SEQ ID NO:21 - повнорозмірний білок MBL;

SEQ ID NO:22 - OGK-X-GP (консенсус зв'язування);

SEQ ID NO:23 – OGKLG;

SEQ ID NO:24 - GLR GLQ GPO GKL GPO G;

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

SEQ ID NO:26 – GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG;

SEQ ID NO:27 - GAOGSOGEKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (людський H-фіколін);

SEQ ID NO:28 - GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOG PNGAOGEO (людський фіколін p35);

SEQ ID NO:29 - LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (сайт розщеплення C4).

ІНГІБІТОРИ ЕКСПРЕСІЇ

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

SEQ ID NO:31 - 5'-CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC-3', 12-45 нуклеотиди в SEQ ID NO:4, що включає сайт початку ініціації трансляції MASP-2 (смислова);

SEQ ID NO:32 - 5'-GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG-3', 361-396 нуклеотиди в SEQ ID NO:4, кодуючій ділянку, що містить MBL-зв'язувальний сайт MASP-2 (смислова);

SEQ ID NO:33 - 5'-AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA-3', 610-642 нуклеотиди в SEQ ID NO:4, кодуючій ділянку, що містить домен CUBII.

ПРАЙМЕРИ КОДУВАННЯ

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

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

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

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

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

SEQ ID NO:48 - пептидний зв'язок з 9 амінокислот.

ВЕКТОР ЕКСПРЕСІЇ

SEQ ID NO:49 являє собою вставку міні-гена MASP-2;

SEQ ID NO:50 являє собою кДНК мишачого MASP-2;

SEQ ID NO:51 являє собою мишачий білок MASP-2 (з лідерною послідовністю);

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

SEQ ID NO:53 являє собою кДНК щурячого MASP-2;

SEQ ID NO:54 являє собою щурячий білок MASP-2 (з лідерною послідовністю);

SEQ ID NO:55 являє собою зрілий щурячий білок MASP-2;

SEQ ID NO:56-59 являють собою олігонуклеотиди для сайт-спрямованого мутагенезу людського MASP-2, які використовуються для одержання людського MASP-2A;

SEQ ID NO:60-63 являють собою олігонуклеотиди для сайт-спрямованого мутагенезу мишачого MASP-2, які використовуються для одержання мишачого MASP-2A;

SEQ ID NO:64-65 являють собою олігонуклеотиди для сайт-спрямованого мутагенезу щурячого MASP-2, які використовуються для одержання щурячого MASP-2A;

SEQ ID NO:66 являє собою ДНК, кодуючу варіабельну ділянку важкого ланцюга (VH) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) (без сигнального пептиду);

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

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

SEQ ID NO:69 являє собою ДНК, кодуючу варіабельну ділянку легкого ланцюга (VL) 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646);

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

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

SEQ ID NO:72 являє собою SGMI-2L (повнорозмірний);

SEQ ID NO:73 являє собою SGMI-2M (укорочений варіант середньої довжини);

SEQ ID NO:74 являє собою SGMI-2S (укорочений варіант, короткий);

SEQ ID NO:75 являє собою зрілий поліпептид, що містить VH-M2ab6-SGMI-2-N і константну область людського IgG4 з мутацією в шарнірній області;

SEQ ID NO:76 являє собою зрілий поліпептид, що містить VH-M2ab6-SGMI-2-C і константну область людського IgG4 з мутацією в шарнірній області;

SEQ ID NO:77 являє собою зрілий поліпептид, що містить VL-M2ab6-SGMI-2-N і константну область ланцюга лямбда людського Ig;

SEQ ID NO:78 являє собою зрілий поліпептид, що містить VL-M2ab6-SGMI-2-C і константну область ланцюга лямбда людського Ig;

SEQ ID NO:79 являє собою пептидний лінкер (10 аа);

SEQ ID NO:80 являє собою пептидний лінкер (6 аа);

SEQ ID NO:81 являє собою пептидний лінкер (4 аа);

SEQ ID NO:82 являє собою полінуклеотид, кодуючий поліпептид, що містить VH-M2ab6-SGMI-2-N і константну область людського IgG4 з мутацією в шарнірній області;

SEQ ID NO:83 являє собою полінуклеотид, кодуючий поліпептид, що містить VH-M2ab6-SGMI-2-C і константну область людського IgG4 з мутацією в шарнірній області;

SEQ ID NO:84 представляє полінуклеотид, кодуючий поліпептид, що містить VL-M2ab6-SGMI-2-N і константну область ланцюга лямбда людського Ig;

SEQ ID NO:85 представляє полінуклеотид, кодуючий поліпептид, що містить VL-M2ab6-SGMI-2-C і константну область ланцюга лямбда людського Ig.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Даний винахід оснований на несподіваному відкритті авторів даного винаходу, що інгібування мананзв'язувальної лектинасоційованої серинової протеази-2 (MASP-2), ключового регулятора лектинового шляху системи комплементу, значною мірою зменшує запалення і фіброз у різних моделях тварин фіброзного захворювання, включаючи модель односторонньої обструкції сечоводу (UUO), модель передозування білка і модель фіброзу нирок при індукованій адріаміцином нефропатії. Таким чином, автори винаходу продемонстрували, що пригнічення MASP-2-опосередкованої активації лектинового шляху забезпечує ефективний терапевтичний підхід для полегшення, лікування або профілактики фіброзу нирок, наприклад тубулоінтерстиціального запалення і фіброзу, незалежно від основної причини. У даному описі також показано, що застосування інгібуючого MASP-2 антитіла (OMS646) ефективно поліпшує функції нирок і зменшує необхідність в кортикостероїдах у людей, що страждають імуноглобулін А-нефропатією (IgAN) і мембранозною нефропатією (МН).

I. ВИЗНАЧЕННЯ

Якщо спеціально не зазначене інше, то всі використовувані в даному описі терміни мають таке ж значення, яке є зрозумілим фахівцю в галузі, до якої належить даний винахід. Наведені нижче визначення призначені для прояснення термінів, які використовуються в описі і у формулі даного винаходу.

Використовуваний у даному описі термін "MASP-2-залежна активація комплементу" стосується MASP-2-залежної активації лектинового шляху, яка відбувається у фізіологічних умовах (тобто в присутності Ca^{++}) і яка приводить до утворення С3-конвертази С4b2a лектинового шляху і накопичення продукту розщеплення С3, такого як С3b, а далі утворення С5-конвертази С4b2a(С3b)n, що, як було визначено, є основною причиною опсонізації.

Використовуваний у даному описі термін "альтернативний шлях" стосується активації комплементу, яка ініціюється, наприклад, зимозаном із клітинних стінок грибів і дріжджів, ліпополісахаридом (ЛПС) зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій і кролячими еритроцитами, а також множиною чистих полісахаридів, кролячих еритроцитів, вірусів, бактерій, пухлинних клітин тварин, паразитів і ушкоджених клітин, і яка, як прийнято вважати, виникає в результаті спонтанного протеолітичного розщеплення фактора комплементу С3 з утворенням С3b.

Використовуваний у даному описі термін "лектиновий шлях" стосується активації комплементу, яка відбувається за допомогою специфічного зв'язування сироваткових і несироваткових карбогідратзв'язувальних білків, включаючи мананзв'язувальний лектин (MBL), CL-11 і фіколіни (Н-фіколін, М-фіколін або L-фіколін).

Використовуваний у даному описі термін "класичний шлях" стосується активації комплементу, яка запускається антитілом, зв'язаним з чужорідною частинкою, і для здійснення якої необхідне зв'язування з молекулою розпізнавання С1q.

Використовуваний у даному описі термін "інгібуючий MASP-2 агент" означає будь-який агент, який зв'язується або безпосередньо взаємодіє з MASP-2 і ефективно пригнічує MASP-2-залежну активацію комплементу, включаючи анти-MASP-2 антитіла і їх MASP-2-зв'язувальні фрагменти, натуральні і синтетичні пептиди, малі молекули, розчинні MASP-2 рецептори, інгібітори експресії і виділені натуральні інгібітори; а також пептиди, які в лектиновому шляху активації конкурують із MASP-2 за зв'язування з іншими молекулами розпізнавання (наприклад, MBL, Н-фіколіном, М-фіколіном або L-фіколіном), при цьому цей термін не охоплює антитіла, які зв'язуються з іншими молекулами розпізнавання. Інгібуючі MASP-2 агенти, використовувані в

даному винаході, можуть знижувати рівень MASP-2-опосередкованої активації комплементу більше ніж на 20 %, наприклад більше ніж на 50 %, наприклад більше ніж на 90 %. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент знижує рівень MASP-2-опосередкованої активації комплементу більше ніж на 90 % (тобто рівень MASP-2-опосередкованої активації комплементу буде в результаті становити тільки 10 % або менше).

Використовуваний у даному описі термін "фіброз" означає утворення або присутність надлишкової сполучної тканини на органі або тканині. Фіброз може виникнути як реакція відповіді у вигляді відновлення або заміщення на стимул, такий як ушкодження тканини або запалення. Відмітною ознакою фіброзу є продукування надлишкового позаклітинного матриксу. Нормальна фізіологічна відповідь на ушкодження приводить до утворення сполучної тканини, як складової процесу загоєння, але це утворення сполучної тканини може затягтися і стати патологічним, змінюючи архітектуру і функцію тканини. На клітинному рівні, епітеліальні клітини і фібробласти розмножуються і диференціюються в міофібробласти, приводячи до скорочення матриксу, збільшення ригідності, мікроваскулярної компресії і гіпоксії.

Використовуваний у даному описі термін "лікування фіброзу у ссавця, що страждає або має ризик розвитку захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом і/або запаленням" означає купірування, ослаблення, полегшення або пригнічення фіброзу у зазначеного ссавця.

Використовуваний у даному описі термін "протеїнурія" означає наявність білка в сечі людини в аномальній кількості, наприклад у кількості, що перевищує 0,3 г білка в сечі людини, зібраній за 24 години, або в концентрації, що перевищує 1 г/л.

Використовуваний у даному описі термін "поліпшення при протеїнурії" або "зменшення протеїнурії" означає зменшення у суб'єкта, що страждає протеїнурією, 24-годинної екскреції білка з сечею щонайменше на 20 %, наприклад щонайменше на 30 %, наприклад щонайменше на 40 %, наприклад щонайменше на 50 %, або більше у порівнянні з вихідною 24-годинною екскрецією білка з сечею у суб'єкта до його лікування інгібуючим MASP-2 агентом. В одному з варіантів здійснення лікування інгібуючим MASP-2 агентом згідно зі способом за винаходом є ефективним відносно зменшення протеїнурії у людини настільки, що досягається більше ніж 20 % зменшення 24-годинної екскреції білка з сечею або, наприклад, більше ніж 30 % зменшення 24-годинної екскреції білка з сечею, або, наприклад, більше ніж 40 % зменшення 24-годинної екскреції білка з сечею, або, наприклад, більше ніж 50 % зменшення 24-годинної екскреції білка з сечею.

Використовуваний у даному описі термін "антитіло" охоплює антитіла і їх фрагменти, одержані від будь-якого виробляючого антитіла ссавця (наприклад, миші, щура, кролика і примата, включаючи людину) або одержані за допомогою гібридоми, відбору фагів, рекомбінантної експресії або трансгенних тварин (або іншими способами одержання антитіл або фрагментів антитіл), де зазначені антитіла або їх фрагменти специфічно зв'язуються з цільовим поліпептидом, таким як, наприклад, MASP-2, його поліпептидами або ділянками. Це не означає, що термін "антитіло" обмежений зазначеними в даному описі джерелами походження антитіл або способами їх одержання (наприклад, за допомогою гібридоми, відбору фагів, рекомбінантної експресії, трансгенних тварин, синтезу пептидів і т. п.). Антитіла, що наводяться як приклад, включають поліклональні, моноклональні і рекомбінантні антитіла; мультивалентні, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла, триспецифічні антитіла); гуманізовані антитіла; мишачі антитіла; химерні антитіла; моноклональні антитіла "миша-людина", "миша-примат", "примат-людина"; і антиідіотипічні антитіла, які можуть бути інтактними антитілами, або їх фрагменти. Використовуваний у даному описі термін "антитіло" охоплює не тільки інтактні поліклональні або моноклональні антитіла, але також їх фрагменти (такі як dAb, Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), одноланцюжкові фрагменти (ScFv), їх синтетичні варіанти, природні варіанти, гібридні білки, що включають частину антитіла разом з антигензв'язувальним фрагментом з потрібною специфічністю, гуманізовані антитіла, химерні антитіла і будь-які модифіковані конфігурації імуноглобулінових молекул, що містять антигензв'язувальну ділянку або фрагмент (ділянку, що розпізнає епітоп) з потрібною специфічністю.

"Моноклональне антитіло" означає гомогенну популяцію антитіл, у якій моноклональне антитіло складається з амінокислот (що зустрічаються в природі і не зустрічаються в природі), які беруть участь у селективному зв'язуванні епітопа. Моноклональні антитіла є високоспецифічними відносно цільового антигену. Термін "моноклональне антитіло" охоплює не тільки інтактні моноклональні антитіла і повнорозмірні моноклональні антитіла, але також їх фрагменти (такі як Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv), одноланцюжкові фрагменти (ScFv), їх варіанти, рекомбінантні білки, що містять антигензв'язувальну частину, гуманізовані моноклональні антитіла, химерні моноклональні антитіла і будь-яку модифіковану конфігурацію

імуноглобулінової молекули, що містить антигензв'язувальний фрагмент (ділянку, що розпізнає епітоп) з потрібною специфічністю і здатністю зв'язуватися з епітопом. Це не означає, що цей термін обмежений зазначеними в даному описі джерелами походження антитіл або способами їх одержання (наприклад, за допомогою гібридоми, відбору фагів, рекомбінантної експресії, трансгенних тварин і т. п.). Цей термін включає цілі імуноглобуліни, а також фрагменти і т. д., описані вище під визначенням "антитіло".

Використовуваний у даному описі термін "фрагмент антитіла" стосується частини, яка одержана або належить до повнорозмірного антитіла, такого як, наприклад, анти-MASP-2 антитіло, що звичайно включає антигензв'язувальну або варіабельну ділянку цього антитіла. Репрезентативні приклади фрагментів антитіл включають Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ і Fv-фрагменти, scFv-фрагменти, діатіла, лінійні антитіла, молекули одноланцюжкових антитіл і мультиспецифічні антитіла, утворені із фрагментів антитіл.

Використовуваний у даному описі "одноланцюжковий Fv" або "scFv"-фрагмент антитіла містить VH- і VL-домени антитіла, причому ці домени присутні в одному поліпептидному ланцюзі. Як правило, Fv-поліпептид додатково містить поліпептидний лінкер між VH- і VL-доменами, який дозволяє scFv формувати потрібну структуру для зв'язування антигену.

Використовуваний у даному описі термін "химерне антитіло" являє собою рекомбінантний білок, який містить варіабельні домени і області, що визначають комплементарність, одержані з нелюдського (наприклад, гризуна) антитіла, тоді як інша частина молекули антитіла одержана з людського антитіла.

Використовуваний у даному описі термін "гуманізоване антитіло" являє собою химерне антитіло, що містить мінімальну послідовність, яка відповідає специфічним областям, що визначають комплементарність, одержаним з нелюдського імуноглобуліну, трансплантованого в каркас антитіла людини. Гуманізовані антитіла, як правило, являють собою рекомбінантні білки, у яких тільки області, що визначають комплементарність, антитіла мають нелюдське походження.

Використовуваний у даному описі термін "мананзв'язувальний лектин" (MBL) є еквівалентним мананзв'язувальному білку (MBP).

Використовуваний у даному описі термін "мембраноатакуючий комплекс" (MAC) означає комплекс із п'яти кінцевих компонентів комплементу (C5b, об'єднаний з C6, C7, C8 і C9), який вбудовується в мембрани і руйнує їх (також називаний C5b-9).

Використовуваний у даному описі термін "суб'єкт" включає всіх ссавців, включаючи, без обмеження, людей, приматів, що не належать до людини, собак, кішок, коней, овець, кіз, корів, кроликів, свиней і гризунів.

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

У більш широкому розумінні, природні амінокислоти можуть бути розділені на групи, виходячи з хімічних властивостей бічних ланцюгів відповідних амінокислот. "Гідрофобними" амінокислотами є Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys або Pro. "Гідрофільними" амінокислотами є Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg або His. Ця група амінокислот може бути також розділена на підкласи. "Незарядженими гідрофільними" амінокислотами є Ser, Thr, Asn або Gln. "Кислотними" амінокислотами є Glu або Asp. "Основними" амінокислотами є Lys, Arg або His.

Використовуваний у даному описі термін "консервативна амінокислотна заміна" представлений амінокислотними замінами усередині однієї з наступних груп: (1) гліцин, аланін, валін, лейцин і ізолейцин, (2) фенілаланін, тирозин і триптофан, (3) серин і треонін, (4) аспартат і глутамат, (5) глутамін і аспарагін, і (6) лізин, аргінін і гістидин.

Використовуваний у даному описі термін "олігонуклеотид" означає олігомер або полімер рибонуклеїнової кислоти (РНК) або дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) або їх міметики. Цей термін також охоплює такі олігонуклеобази, які складаються із природних нуклеотидів, цукрів і ковалентних міжнуклеозидних (остов) зв'язків, а також олігонуклеотидів, які мають модифікації, що не зустрічаються в природі.

Використовуваний у даному описі термін "епітоп" означає ділянку на білку (наприклад, білку MASP-2), з якою зв'язується антитіло. "Епітопи, що перекриваються" включають щонайменше один (наприклад, два, три, чотири, п'ять або шість) загальний амінокислотний залишок (залишки), включаючи лінійні і нелінійні епітопи.

Використовувані в даному описі терміни "поліпептид", "пептид" і "білок" є взаємозамінними і

означають будь-який зв'язаний з пептидом ланцюг амінокислот, незалежно від довжини або посттрансляційної модифікації. Білок MASP-2, розкритий у даному описі, може містити або являти собою білок дикого типу або може являти собою варіант, який має не більше 50 (наприклад, не більше 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40 або 50) консервативних амінокислотних замін. Консервативні заміни звичайно включають заміни в межах однієї з наступних групах: гліцин і аланін; валін, ізолейцин і лейцин; аспарагінова кислота і глутамінова кислота; аспарагін, глутамін, серин і треонін; лізин, гістидин і аргінін; і фенілаланін і тирозин.

У деяких варіантах здійснення людський білок MASP-2 може мати амінокислотну послідовність, яка є ідентичною на 70 % або більше (наприклад, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 або 100 %) людському білку MASP-2, що має амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:5.

У деяких варіантах здійснення пептидні фрагменти можуть мати в довжину щонайменше 6 (наприклад, щонайменше 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 400, 450, 500 або 600 або більше) амінокислотних залишків (наприклад, щонайменше 6 суміжних амінокислотних залишків з SEQ ID NO:5). У деяких варіантах здійснення антигенний пептидний фрагмент білка MASP-2 людини має в довжину менше 500 (наприклад, менше 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 або 6) амінокислотних залишків (наприклад, менше 500 суміжних амінокислотних залишків у будь-якому місці послідовності SEQ ID NO:5).

Відсоток (%) ідентичності амінокислотної послідовності визначається як відсотковий вміст амінокислот у послідовності-кандидаті, які ідентичні амінокислотам у контрольній послідовності після вирівнювання послідовностей і введення зазорів (гепів), при необхідності, для досягнення максимального відсотка ідентичності послідовностей. Вирівнювання з метою визначення відсотка ідентичності послідовностей може бути досягнуте різними способами, які знаходяться у межах компетенції фахівця в даній галузі, наприклад, за допомогою загальнодоступного програмного забезпечення, такого як BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 або Megalign (DNASTAR). Відповідні параметри для вимірювання вирівнювання, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання по всій довжині порівнюваних послідовностей, можуть бути визначені відомими методами.

II. КОРОТКИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Як розкрито в даному описі, автори винаходу визначили центральну роль лектинового шляху в ініціації і прогресуванні захворювання тубулярної патології нирок, що має на увазі ключову роль активації лектинового шляху в патофізіології широкого спектра ниркових захворювань, включаючи IgA-нефропатію, C3-гломерулопатію і інші гломерулонефрити. У даному описі також зазначено, що автори даного винаходу відкрили, що інгібування мананзв'язувальної лектинасоційованої серинової протеази-2 (MASP-2), ключового регулятора лектинового шляху системи комплементу, значно зменшує запалення і фіброз у різних моделях тварин фіброзного захворювання, включаючи модель односторонньої обструкції сечоводу (UUO), модель передозування білка і модель фіброзу нирок при індукованій адріаміцином нефропатії. Таким чином, автори винаходу показали, що пригнічення MASP-2-опосередкованої активації лектинового шляху забезпечує ефективний терапевтичний підхід для полегшення, лікування або профілактики фіброзу нирок, наприклад тубулоінтерстиціального фіброзу, незалежно від основної причини.

Лектини (MBL, M-фіколін, H-фіколін, L-фіколін і CL-11) є специфічними молекулами розпізнавання, які запускають систему комплементу по механізму реалізації вродженого імунітету, і така система включає лектиновий шлях ініціації і зв'язану з ним петлю посилення термінального шляху, яка підсилює ініційовану лектином активацію термінальних ефекторних молекул комплементу. C1q являє собою специфічну молекулу розпізнавання, яка запускає систему комплементу по механізму реалізації набутого імунітету, і така система включає класичний шлях ініціації і асоційовану з ним петлю посилення термінального шляху, яка підсилює C1q-ініційовану активацію термінальних ефекторних молекул комплементу. Автори посилаються на ці дві основні системи активації комплементу, такі як лектинзалежна система комплементу і C1q-залежна система комплементу, відповідно.

Додатково до своєї важливої ролі в імунному захисті система комплементу додає внесок в ураження тканин при багатьох клінічних станах. Таким чином, існує дуже нагальна потреба в розробці терапевтично ефективних інгібіторів комплементу для попередження розвитку цих побічних ефектів. Установлення факту можливості пригнічення MASP-2-опосередковуваного

лектиного шляху, при цьому не зачіпаючи класичний шлях, забезпечує можливість для дуже бажаного специфічного пригнічення активації тільки системи комплементу, що викликає конкретну патологію, не пригнічуючи повністю здатність комплементу до імунного захисту. Так, наприклад, при патологічних станах, при яких активація комплементу опосередковується переважно лектинзалежною системою комплементу, переважним є специфічне пригнічення тільки цієї системи. Для регуляції процесингу імунного комплексу і для забезпечення захисту хазяїна від інфекції, система C1q-залежної активації комплементу повинна залишатися незмінною.

Переважним білковим компонентом для мішені при розробці терапевтичних агентів для специфічного пригнічення лектинзалежної системи комплементу є MASP-2. Із усіх відомих білкових компонентів лектинзалежної системи комплементу (MBL, H-фіколіну, M-фіколіну, L-фіколіну, MASP-2, C2-C9, фактора B, фактора D і пропердину), тільки MASP-2 є унікальним і необхідним для функціонування цієї лектинзалежної системи комплементу. Лектини (MBL, H-фіколін, M-фіколін, L-фіколін і CL-11) також є унікальними компонентами лектинзалежної системи комплементу. Однак втрата будь-якого одного із цих лектинових компонентів необов'язково буде пригнічувати активацію цієї системи, що обумовлено надлишковою кількістю лектину. Для гарантії пригнічення активації лектинзалежної системи комплементу необхідно інгібувати всі п'ять лектинів. Крім того, оскільки відомо, що MBL і фіколіни також мають опсонінову активність, що не залежить від комплементу, то пригнічення функції лектину буде приводити до втрати цього цінного механізму захисту хазяїна від інфекції. На противагу цьому, така опсонінова активність лектину, що не залежить від комплементу, залишиться незачепленою, якщо мішенню для інгібування є MASP-2. Інша перевага MASP-2 як терапевтичної мішені для пригнічення активації лектинзалежної системи комплементу полягає в тому, що концентрація MASP-2 у плазмі, у порівнянні з будь-якими іншими білками комплементу, є найбільш низькою (~500 нг/мл), і тому для повного пригнічення будуть достатніми низькі концентрації високоафінних інгібіторів MASP-2 (Moller-Kristensen M. et al., J. Immunol. Methods, 282:159-167, 2003).

Як описано в прикладі 14 даного опису, на тваринній моделі фіброзної хвороби нирок (одностороння обструкція сечоводу UUO) було визначено, що захворювання нирок у мишей, позбавлених гена MASP-2 (MASP-2-/-), виявилося в значно меншому ступені в порівнянні з контрольними тваринами дикого типу, про що свідчили запальні клітинні інфільтрати (зниження на 75 %) і гістологічні маркери фіброзу, такі як відкладення колагену (зменшення на одну третину). У прикладі 15 додатково показано, що миші дикого типу, яким системно вводили моноклональне анти-MASP-2 антитіло, що вибірково блокує лектиновий шлях, залишаючи незачепленим класичний шлях, були захищені від фіброзу нирок у порівнянні з мишами дикого типу, яким вводили антитіло ізотипного контролю. Ці результати свідчать про те, що лектиновий шлях є ключовим фактором, що викликає захворювання нирок, і ще раз демонструють, що блокуючий лектиновий шлях інгібітор MASP-2, такий як анти-MASP-2 антитіло, є ефективним як антифіброзний агент. У прикладі 16 на моделі передозування білка додатково показано, що у мишей дикого типу, які одержували бичачий сироватковий альбумін (BSA), розвилася протеїнурична нефропатія, тоді як у MASP-2-/- мишей, що одержували таку ж дозу BSA, ушкодження нирок виявилося в меншому ступені. У прикладі 17 показано, що миші дикого типу, яким системно вводили моноклональне анти-MASP-2 антитіло, що вибірково блокує лектиновий шлях, залишаючи незачепленим класичний шлях, були захищені від ушкодження нирок у моделі передозування білка. У прикладі 18 показано, що у MASP-2-/- мишей спостерігалося запалення нирок і тубулоінтерстиціальне ушкодження в індукованій адріаміцином нефрологічній моделі фіброзу нирок у меншому ступені в порівнянні з мишами дикого типу. У прикладі 19 показано, що у фазі 2 відкритого клінічного дослідження ниркових захворювань, що проводиться на даний момент, пацієнти з IgA-нефропатією, яким вводили анти-MASP-2 антитіло, до кінця лікування мали клінічно значиме і статистично достовірне зменшення співвідношення альбумін/креатинін у сечі (uACR) протягом усього дослідження, а також зменшення рівня білка в сечі, що збирається протягом 24-годин, у порівнянні з вихідним рівнем. У прикладі 19 також показано, що в тому ж дослідженні фази 2 у пацієнтів з мембранозною нефропатією, яким вводили анти-MASP-2 антитіло, також спостерігалося зниження uACR під час лікування.

Відповідно до вищесказаного, даний винахід стосується застосування інгібуючих MASP-2 агентів, таких як інгібуючі MASP-2 антитіла, як антифіброзних агентів, застосування інгібуючих MASP-2 агентів для виготовлення лікарського засобу для лікування фіброзного стану і способів профілактики, лікування, полегшення або купірування фіброзного стану у людини, що цього потребує, де зазначений спосіб включає введення зазначеному пацієнту ефективної кількості інгібуючого MASP-2 агента (наприклад, анти-MASP-2 антитіла).

Способи за винаходом можуть бути використані для профілактики, лікування, полегшення або купірування фіброзного стану у людини, що страждає будь-яким захворюванням або розладом, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, включаючи захворювання нирок (наприклад, хронічне захворювання нирок, IgA-нефропатія, C3-гломерулопатія і інші гломерулонефрити), легенів (наприклад, ідіопатичний фіброз легенів, кістозний фіброз, бронхоектаз), печінки (наприклад, цироз, неалкогольна жирова хвороба печінки), серця (наприклад, інфаркт міокарда, фіброз передсердь, фіброз клапанів, фіброз ендоміокарда), мозку (наприклад, інсульт), шкіри (наприклад, надмірне загоєння ран, склеродермія, системний склероз, келоїди), судинної системи (наприклад, атеросклеротичне судинне захворювання), кишечнику (наприклад, хвороба Крона), очей (наприклад, передня субкапсулярна катаракта, помутніння задньої капсули), структур м'яких тканин скелетно-м'язової системи (наприклад, клітинний капсуліт, контрактура Дюпюїтрена, мієлофіброз), репродуктивних органів (наприклад, ендометріоз, хвороба Пейроні) і деяких інфекційних захворювань (наприклад, альфа-вірус, гепатит C і гепатит B).

III. РОЛЬ MASP-2 ПРИ ЗАХВОРЮВАННЯХ І СТАНАХ, ВИКЛИКАНИХ АБО УСКЛАДНЕНИХ ФІБРОЗОМ

Фіброз являє собою утворення або наявність надлишкової кількості сполучної тканини в органі або тканині, що утворюється як правило у відповідь на ушкодження або ураження. Відмітною ознакою фіброзу є продукування надлишкового позаклітинного матриксу після ураження. У нирках фіброз характеризується як прогресуюче згубне відкладення сполучної тканини на паренхімі нирки, що неминуче приводить до зниження функції нирок незалежно від первинного захворювання нирок, яке викликає їх початкове ушкодження. Так званий епітеліально-мезенхімний перехід (EMT), зміна клітинних характеристик, при якій канальцеві епітеліальні клітини трансформуються в мезенхімальні фібробласти, є основним механізмом фіброзу нирок. Фіброз уражує майже всі тканини і системи органів і може виникати як реакція відповіді у вигляді відновлення або заміщення на стимул, такий як ушкодження тканини або запалення. Нормальна фізіологічна відповідь на ушкодження приводить до накопичення сполучної тканини, але, якщо цей процес стає патологічним, заміна високодиференційованих клітин шляхом рубцювання сполучної тканини змінює структуру і функцію тканини. На клітинному рівні, епітеліальні клітини і фібробласти розмножуються і диференціюються в міофібробласти, приводячи до скорочення матриксу, збільшення ригідності, мікроваскулярної компресії і гіпоксії. На даний час відсутнє ефективне лікування або терапія фіброзу, але і звіти досліджень на тваринах, і епізодичні звіти по лікуванню людей говорять про те, що фіброзні ураження тканин можуть бути купірувані (Tampe and Zeisberg, Nat. Rev. Nephrol., Vol. 10:226-237, 2014).

Багато які захворювання є результатом фіброзу, який викликає прогресування органної недостатності, включаючи захворювання нирок (наприклад, хронічне захворювання нирок, IgA-нефропатія, C3-гломерулопатія і інші гломерулонефрити), легенів (наприклад, ідіопатичний фіброз легенів, кістозний фіброз, бронхоектаз), печінки (наприклад, цироз, неалкогольна жирова хвороба печінки), серця (наприклад, інфаркт міокарда, фіброз передсердь, фіброз клапанів, фіброз ендоміокарда), мозку (наприклад, інсульт), шкіри (наприклад, надмірне загоєння ран, склеродермія, системний склероз, келоїди), судинної системи (наприклад, атеросклеротичне судинне захворювання), кишечнику (наприклад, хвороба Крона), очей (наприклад, передня субкапсулярна катаракта, помутніння задньої капсули), структур м'яких тканин скелетно-м'язової системи (наприклад, клітинний капсуліт, контрактура Дюпюїтрена, мієлофіброз), репродуктивних органів (наприклад, ендометріоз, хвороба Пейроні) і деяких інфекційних захворювань (наприклад, альфа-вірус, гепатит C і гепатит B і т. д.).

Хоча фіброз виникає в багатьох тканинах і при багатьох захворюваннях, у його патології існують загальні молекулярні і клітинні механізми. Відкладення позаклітинного матриксу фібробластами супроводжується інфільтратами імунних клітин, переважно мононуклеарних клітин (див. Wynn T., Nat. Rev. Immunol. 4(8):583-594, 2004, включений у даний опис у вигляді посилання). Активна запальна відповідь приводить до експресії факторів росту (TGFβ, VEGF, фактора росту гепатоцитів, фактора росту сполучної тканини), цитокінів і гормонів (ендотеліну, IL-4, IL-6, IL-13, хемокінів), ферментів деструкції (еластази, матриксних металопротеїназ, катепсинів) і білків позаклітинного матриксу (колагенів, фібронектину, інтегринів).

Крім того, система комплементу стає активною при численних фіброзних захворюваннях. Компоненти комплементу, включаючи мембраноатакуючий комплекс, були ідентифіковані в численних зразках фіброзної тканини. Наприклад, компоненти лектинового шляху були виявлені при фіброзних ураженнях нирок (Satomura et al., Nephron., 92(3):702-4 (2002), Sato et al., Lupus, 20(13):1378-86 (2011), Liu et al., Clin. Exp. Immunol., 174(1):152-60 (2013)); захворюваннях

печінки (Rensen et al., Hepatology, 50(6):1809-17 (2009)); і хворобі легенів (Olesen et al., Clin. Immunol. 121(3):324-31 (2006)).

Було встановлено, що надмірна активація системи комплементу є одним із ключових факторів розвитку опосередкованого імунним комплексом, а також антитілонезалежного, гломерулонефриту. Проте існують переконливі свідчення того, що неконтрольована активація комплементу in situ пов'язана з патофізіологічним прогресуванням TI фіброзу при негломерулярному захворюванні (Quigg R.J., J. Immunol. 171:3319-3324, 2003, Naik A. et al., Semin Nephrol. 33:575-585, 2013, Mathern D.R. et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 10:P1636-1650, 2015). Сильні прозапальні сигнали, викликані локальною активацією комплементу, можуть бути ініційовані компонентами комплементу, що потрапляють шляхом фільтрації в проксимальні канальці і надалі в інтерстиціальний простір, або аномальним синтезом компонентів комплементу канальцевими або іншими резидентними і інфільтруючими клітинами, або зміненою експресією регуляторних білків комплементу в клітинах нирок, або відсутністю або втратою, або збільшенням функціональних мутацій у регуляторних компонентах комплементу (Mathern D.R. et al., Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 10:P1636-1650, 2015, Sheerin N.S. et al., FASEB J. 22:1065-1072, 2008). Наприклад, у мишей дефіцит регуляторного білка/гена (Crry), пов'язаного з регуляторним білком комплементу CR1, приводить до активації комплементу по типу тубулоінтерстиціального (TI) ушкодження з наступним запаленням і фіброзом, характерним для ушкодження, спостережуваного при TI захворюваннях людини (Naik A. et al., Semin Nephrol. 33:575-585, 2013, Bao L. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 18:811-822, 2007). Вплив канальцевих епітеліальних клітин на анафілатоксин C3a приводить до епітеліально-мезенхімного переходу (Tsang Z. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 20:593-603, 2009). Нещодавно було показано, що блокування передачі сигналу C3a тільки через C3a-рецептор зменшує TI фіброз нирок у тварин із протеїнуричними і непротеїнуричними захворюваннями (Tsang Z. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 20:593-603, 2009, Bao L. et al., Kidney Int. 80:524-534, 2011).

Як розкрито в даному описі, автори винаходу визначили центральну роль лектинового шляху в ініціації і прогресуванні тубулярної патології нирок, що має на увазі ключову роль активації лектинового шляху в патофізіології широкого спектра захворювань нирок, включаючи IgA-нефропатію, C3-гломерулопатію і інші гломерулонефрити (Endo M. et al., Nephrol. Dialysis Transplant, 13:1984-1990, 1998; Hisano S. et al., Am. J. Kidney Dis. 45:295-302, 2005; Roos A. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 17:1724-1734, 2006; Liu L.L. et al., Clin. Exp. Immunol. 174:152-160, 2013; Lhotta K. et al., Transplant Nephrol. Disysis, 14:881-886, 1999; Pickering et al., Kidney International, 84:1079-1089, 2013), діабетичну нефропатію (Hovind P. et al., Diabetes, 54:1523-1527, 2005), ішемічне реперфузійне ураження (Asgari E. et al., FASEB J. 28:3996-4003, 2014) і відторгнення трансплантата (Berger S.P. et al., Am. J. Transplant. 5:1361-1366, 2005).

Як додатково показано в даному описі, автори винаходу продемонстрували, що пригнічення MASP-2 зменшує запалення і фіброз у мишачих моделях тубулоінтерстиціального захворювання. Тому передбачається, що інгібуючі MASP-2 агенти будуть корисні при лікуванні фіброзу нирок, включаючи тубулоінтерстиціальне запалення і фіброз, протеїнурію, IgA-нефропатію, C3-гломерулопатію і інші гломерулонефрити і ішемічні реперфузійні ураження нирок.

Ниркові захворювання і розлади

За даними Національного ниркового фонду 26 мільйонів дорослих американців страждають хронічним захворюванням нирок (ХЗН). Більшість пацієнтів мають прогресуюче захворювання, що приводить до ниркової недостатності, яка вимагає лікування препаратами, що стимулюють еритропоез, діалізу або трансплантації нирки для виживання. Існує декілька препаратів, які можуть лікувати основний симптом ХЗН, гіпертонію, але на даний час немає ліків, які усувають його першопричину.

Дослідження показали, що прогресуюче ушкодження нирок викликане капілярною гіпертензією в підструктурах нирки, відомих як нефрони (Whitworth J.A., Annals. Acad. of Med., vol. 34(1):2005). Оскільки нефрони (фільтруючі одиниці нирок) ушкоджуються або руйнуються в цьому процесі, виникає запалення і відбувається рубцювання тканини, що приводить до заміни нефронів нефункціональною рубцевою тканиною. У результаті здатність нирки фільтрувати кров знижується з перебігом часу. Це називається фіброзом нирок, який є загальним процесом прогресуючого захворювання нирок. Незалежно від характеру початкового ураження, фіброз нирок вважається загальним кінцевим процесом, по якому захворювання нирок прогресує до термінальної стадії ниркової недостатності. Ослаблення фіброзу нирок можна визначити за одним або більше з наступних параметрів: оцінка інтерстиціального об'єму, відкладення колагену IV і/або рівні мРНК, що містить гени, які контролюють ріст сполучної тканини. Сполуки і способи, описані в даній заявці, корисні в лікуванні фіброзу нирок.

Фіброз і запалення нирок є характерними ознаками пізньої стадії захворювання нирок практично будь-якої етіології (див. Boor et al., Boor P. et al., J. of Am. Soc. Nephrology, 18:1508-1515, 2007; і Chevalier et al., Kidney International, 75:1145-1152, 2009). Ниркова недостатність може бути викликана гетерогенною групою розладів. Прогресивна дисфункція нирок приводить до протеїнурії і ниркової недостатності. Оскільки стан здоров'я пацієнта погіршується, може знадобитися діаліз просто для запобігання ушкодженню нирок і попередження багатосистемної недостатності. З часом ураження нирок і ниркова недостатність можуть прогресувати до термінальної стадії ниркової недостатності (ТСНН), яка є повною або майже повною, безповоротною втратою функції нирок. Залежно від форми захворювання нирок функція нирок може бути втрачена протягом декількох днів або тижнів або може повільно і поступово погіршуватися протягом десятиліть. Після того, як захворювання пацієнта прогресувало до ТСНН, для запобігання смерті пацієнта потрібен діаліз (гемодіаліз або перитонеальний діаліз). Пацієнтів необхідно підтримувати в деякій формі діалізного режиму або надати нирковий трансплантат.

Компоненти лектинового шляху були виявлені при фіброзних ураженнях при ниркових захворюваннях (Satomura et al., Nephron., 92(3):702-4 (2002), Sato et al., Lupus, 20(13):1378-86 (2011), Liu et al., Clin. Exp. Immunol., 174(1):152-60 (2013)). При IgA-нефропатії у пацієнтів з гломерулярним відкладенням MBL спостерігалася більш виражена протеїнурія, знижена функція нирок, більш низькі рівні сироваткового альбуміну, більш важка гістологія і підвищений артеріальний тиск у порівнянні з пацієнтами без відкладення MBL (Liu et al., Clin Exp Immunol. (1):152-60). У пацієнтів з вовчаковим нефритом (Sato et al., Lupus, 20(13):1378-86, 2011) і хронічною нирковою недостатністю (Satomura et al., Nephron 92(3):702-4, 2002) також спостерігали підвищені рівні MBL і активність лектинового шляху.

Було також продемонстровано, що дефіцит C5 приводить до значного ослаблення основних компонентів фіброзу нирок у непротеїнуричній моделі первинного тубулоінтерстиціального ураження, а саме односторонньої обструкції сечоводу (UUO) (Boor P. et al., J. of Am. Soc. of Nephrology, 18:1508-1515, 2007). Також є повідомлення про збільшену експресію гена C3 у мишей дикого типу після UUO і значне зменшення відкладень колагену у C3-/- мишей після UUO у порівнянні з мишами дикого типу, що вказує на роль активації комплементу при фіброзі нирок (Fearn et al., Mol. Immunol. 48:1666-1733, 2011: Abstract). Однак до описаного в даній заявці відкриття авторами даного винаходу, компоненти комплементу, що беруть участь у фіброзі нирок, не були чітко визначені. Як описано в прикладах 14-17 даної заявки, автори даного винаходу несподівано визначили, що дефіцит MASP-2 або блокада інгібуючим MASP-2 антитілом, яке вибірково блокує лектиновий шлях, не зачіпаючи класичний шлях, явно забезпечує захист мишей від фіброзу нирок на різних тваринних моделях захворювання нирок.

Відповідно, у деяких варіантах здійснення надається спосіб пригнічення фіброзу нирок у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом нирок, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення інгібуючого MASP-2 агента, такого як анти-MASP-2 антитіло, суб'єкту, що потребує цього. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу нирок у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом нирок, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом локального нанесення композиції під час операції або шляхом місцевої ін'єкції або безпосередньо в область фіброзу, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, інгаляційно, назально, підшкірно або іншим способом парентерального введення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю над цим станом.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, що придатні для першопричинного захворювання або стану нирок. У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з режимом діалізу або плазмаферезу. У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) використовуються для зменшення частоти необхідного діалізу або плазмаферезу. У деяких інших варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) використовуються в комбінації з трансплантацією нирки. У деяких інших варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) використовуються для здійснення контролю над нирковою недостатністю і запобігання подальшому погіршенню функції нирок у

пацієнтів, що очікують трансплантації нирок.

Як приклад, у деяких варіантах здійснення анти-MASP-2 антитіла використовуються для пригнічення фіброзу нирок і, таким чином, лікування або полегшення (включаючи лікування або полегшення симптомів захворювання) гломерулярних захворювань, таких як фокальний сегментарний гломерулосклероз і нефротичний синдром. Прикладами симптомів, які можна лікувати, є, крім іншого, гіпертензія, протеїнурія, гіперліпідемія, гематурія і гіперхолестеринемія. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 агент пригнічує тубулоінтерстиціальний фіброз. У деяких варіантах здійснення лікування включає поліпшення функції нирок, зменшення протеїнурії, поліпшення стану при гіпертонії і/або зменшення фіброзу нирок. У деяких варіантах здійснення лікування включає (i) затримання або профілактику прогресування ниркової недостатності, згасання функції нирок або розвитку ТСНН; (ii) затримання, зменшення частоти або усунення необхідності в діалізі; або (iii) затримання або усунення необхідності в трансплантації нирок.

Нижче описані деякі специфічні захворювання і розлади нирок, викликані або ускладнені фіброзом і/або запаленням.

У деяких варіантах здійснення захворювання нирок, викликане або ускладнене фіброзом і/або запаленням, являє собою гломерулярне захворювання, таке як фокальний сегментарний гломерулосклероз (FSGS). Гломерулярні захворювання уражують клубочки, дозволяючи білкам, а іноді і червоним кров'яним клітинам, проникати в сечу. Іноді гломерулярне захворювання також перешкоджає ниркам здійснювати очищення від продуктів життєдіяльності, тому вони починають накопичуватися в крові. Симптоми гломерулярного захворювання включають протеїнурію, гематурію, зниження швидкості клубочкової фільтрації, гіпопротеїнемію і набряки. Декілька різних захворювань можуть привести до розвитку гломерулярного захворювання. Це може бути прямим результатом інфекції або приймання ліків, токсичних для нирок, або результатом захворювання, яке уражує весь організм, такого як гіпертонія, діабет або вовчак. ТСНН є одним із гломерулярних захворювань, але навіть цей особливий стан, що характеризується рубцюванням у нирках, може мати множину причин. У пацієнтів з ТСНН, як правило, термінальна стадія ниркової недостатності досягається протягом 5-20 років, хоча пацієнти з агресивними формами захворювання досягають ТСНН через 2-3 роки.

У деяких варіантах здійснення захворювання нирок, викликане або ускладнене фіброзом і/або запаленням, являє собою діабетичну нефропатію (ДН), яка належить до сфери медицини, що вимагає негайних рішень. Діабетична нефропатія - це захворювання нирок або порушення функції нирок, яке ускладнене діабетом. Стан погіршується високим кров'яним тиском, високим рівнем цукру в крові і високим рівнем холестерину і ліпідів. Точна причина діабетичної нефропатії невідома. Однак, не обмежуючись конкретною теорією, передбачається, що неконтрольований високий рівень цукру в крові призводить до ураження нирок, такого як фіброз і рубцювання тканини. У людей ДН проявляється у вигляді клінічного синдрому, який складається з альбумінурії, поступово знижуваної швидкості клубочкової фільтрації (ШКФ) і підвищеного ризику серцево-судинних захворювань. Діабетична альбумінурія пов'язана з розвитком характерних гістопатологічних ознак, включаючи стовщення клубочкової базальної мембрани (КБМ) і експансію мезангіального матриксу. У міру розвитку альбумінурії і ниркової недостатності розвиваються гломерулосклероз, артеріоральний гіаліноз і тубулоінтерстиціальний фіброз.

Відповідно, в одному з варіантів здійснення в даному розкритті надаються способи лікування діабетичної нефропатії, які включають введення ефективної кількості інгібуючого MASP-2 агента (наприклад, інгібуючого MASP-2 антитіла) суб'єкту, що потребує цього. У деяких варіантах здійснення лікування включає зменшення одного або більше симптомів діабетичної нефропатії. У деяких варіантах здійснення лікування включає зменшення, уповільнення або усунення необхідності в діалізі. У деяких варіантах здійснення лікування включає зменшення, уповільнення або усунення необхідності в трансплантації нирок. У деяких варіантах здійснення лікування включає затримання, профілактику або купірування прогресування діабетичної нефропатії до згасання функції нирок або термінальної стадії ниркової недостатності.

У деяких варіантах здійснення захворювання нирок, викликане або ускладнене фіброзом і/або запаленням, являє собою вовчаковий нефрит. Згідно з докладним описом, наведеним нижче, вовчаковий нефрит, який є серйозним ускладненням системного червоного вовчака (СЧВ), є ще одним прикладом фіброзу нирок, який можна лікувати інгібуючими MASP-2 агентами (наприклад, анти-MASP-2 антитілами).

Відповідно, в одному з варіантів здійснення дане розкриття включає способи пригнічення фіброзу нирок у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом нирок, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, які включають введення ефективної кількості

інгібуючого MASP-2 агента (наприклад, інгібуючого MASP-2 антитіла). У деяких варіантах здійснення захворювання або розлад нирок, ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з хронічного захворювання нирок, хронічної ниркової недостатності, гломерулярного захворювання (наприклад, фокального сегментарного гломерулосклерозу), імунного комплексного розладу (наприклад, IgA-нефропатії, мембранозної нефропатії), вовчакового нефриту, нефротичного синдрому, діабетичної нефропатії, тубулоінтерстиціального ураження і C3-гломерулопатії або інших типів гломерулонефриту.

Способи профілактики або лікування ушкодження нирок, викликаного індукованою ліками токсичністю

Інша причина ушкодження нирок включає індуковану ліками токсичність. Наприклад, нефротоксини можуть виявляти безпосередню токсичну дію на канальцеві епітеліальні клітини. Як розкрито в даному описі, автори винаходу продемонстрували, що миші з дефіцитом MASP-2 захищені від індукованої адріаміцином нефропатії.

Нефротоксини включають, без обмеження, терапевтичні лікарські речовини (наприклад, цисплатин, гентаміцин, цефалоридин, циклоспорин, амфотерицин, адріаміцин), радіоконтрастний барвник, пестициди (наприклад, паракват) і речовини, що забруднюють навколишнє середовище (наприклад, трихлоретилен і дихлорацетилен). Інші приклади включають пуроміцин-амінонуклеозид (PAN); аміноглікозиди, такі як гентаміцин; цефалоспорини, такі як цефалоридин; інгібітори кальциневрину, такі як такролімус або сиролімус. Індукована ліками нефротоксичність також може бути викликана нестероїдними протизапальними засобами, антиретровірусними препаратами, антицитокінами, імунодепресантами, онкологічними препаратами або інгібіторами АПФ. Крім того, індукована ліками нефротоксичність може бути викликана зловживанням нальгезином, ципрофлоксацином, клопідогрелем, кокаїном, інгібіторами cox-2, діуретиками, фоскаметом, золотом, іфосфамідом, імуноглобіном, китайськими травами, інтерфероном, літієм, манітолом, мезаламіном, мітоміцином, нітрозосечовиною, пеніциламіном, пеніциліном, пентамідином, хініном, рифампіном, стрептозоцином, сульфонамідами, тиклопідином, триамтереном, вальпроєвою кислотою, доксорубіцином, гліцерином, цидофовіром, тобраміцином, неоміцинсульфатом, колістиметатом, ванкоміцином, амікацином, цефотаксимом, цисплатином, ацикловіром, літієм, інтерлейкіном-2, циклоспорином або індинавіром.

Відповідно, в одному з варіантів здійснення суб'єкт, що має ризику розвитку або страждає ушкодженням нирок, може одержувати один або більше терапевтичних препаратів, які виявляють нефротоксичну дію. Цим суб'єктам можна вводити інгібітори MASP-2 за винаходом до або одночасно з такими терапевтичними агентами. Аналогічно, інгібітори MASP-2 можна вводити після введення терапевтичного агента для лікування або зниження ймовірності розвитку нефротоксичності.

Захворювання і стани, асоційовані з протеїнурією

Установлено, що порушення клубочкової фільтрації білка приводить до протеїнурії і прискорює прогресуючу втрату нефронів, яка відбувається при всіх хронічних ниркових захворюваннях (Remuzzi and Bertani, New Eng. J. Med., vol. 339(20):1448-1456, 1998). Наприклад, у дослідженні, описаному Eddy et al., Am. J. Pathol. 135:719-33, 1989, гломерулярна фільтрація альбуміну незмінно супроводжувалася розвитком інтерстиціальних уражень і рубцюванням. Eddy et al., 1989, також відзначили, що відкладення комплементу C3 на люмінальній поверхні проксимальних канальців спостерігалося у щурів з нефропатією, викликаною передозуванням білка, що вказує на те, що компоненти системи комплементу, фільтровані в гломерулах, можуть викликати інтерстиціальні ушкодження. Було продемонстровано, що виснаження комплементу або відсутність C6 полегшувало тубулоінтерстиціальне ушкодження в протеїнуричних моделях тварин, таких як мезангіопроліферативний гломерулонефрит, адріаміцинова нефропатія, 5/6 нефректомія і пуроміцин-амінонуклеозидний нефроз (Boor et al., Et al., J. of Am. Soc. of Nephrology: JASN, 18:1508-1515, 2007). Дослідження на людях показали, що протеїнурія є незалежним прогностичним фактором прогресування хронічного захворювання нирок, і що зниження протеїнурії є нирково-захисним (Ruggenenti P. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 23:1917-1928, 2012).

Відповідно, в одному з варіантів здійснення даний винахід стосується способів профілактики або зменшення протеїнурії і/або профілактики або зменшення ураження нирок у суб'єкта, що страждає захворюванням або станом, асоційованим із протеїнурією, які включають введення кількості інгібуючого MASP-2 агента (наприклад, інгібуючого MASP-2 антитіла), ефективної для зменшення або профілактики протеїнурії у суб'єкта. В одному з варіантів здійснення захворювання або стан, асоційований з протеїнурією, вибирають із групи, що складається з нефротичного синдрому, прееклампсії, еклампсії, токсичного ураження нирок, амілоїдозу,

судинно-колагенозних захворювань (наприклад, системного червоного вовчака), зневоднювання, гломерулярних захворювань (наприклад, мембранозного гломерулонефриту, фокального сегментарного гломерулонефриту, С3-гломерулопатії, хвороби мінімальних змін, ліпоїдного нефрозу), інтенсивного фізичного навантаження, стресу, доброякісної ортостатичної (постуральної) протеїнурії, фокального сегментарного гломерулосклерозу, IgA-нефропатії (наприклад, хвороби Бергера), IgM-нефропатії, мембранопроліферативного гломерулонефриту, мембранозної нефропатії, хвороби мінімальних змін, саркоїдозу, синдрому Альпорта, цукрового діабету (діабетичної нефропатії), індукованої ліками токсичності (наприклад, індукованої НПЗП, нікотином, пеніциламіном, карбонатом літію, золотом і іншими важкими металами, інгібіторами АПФ, антибіотиками (наприклад, адріаміцином) або опіатами (наприклад, героїном)); хвороби Фабрі, інфекції (наприклад, ВІЛ, сифілісу, гепатиту А, В або С, постстрептококової інфекції, сечового шистосомозу); аміноацидурії, синдрому Фанконі, гіпертонічного нефросклерозу, інтерстиціального нефриту, серпоподібноклітинної хвороби, гемоглобінурії, множинної мієломи, міоглобінурії, відторгнення органів (наприклад, відторгнення трансплантата нирки), геморагічної пропасниці Ебола, синдрому нігтьової патели, сімейної пропасниці, синдрому HELLP, системного червоного вовчака, гранулематозу Вегенера, ревматоїдного артриту, хвороби накопичення глікогену типу 1, синдрому Гудпасчера, пурпури Шенлейна-Геноха, інфекції сечових шляхів, що поширилася на нирки, синдрому Шегрена і постінфекційного гломерулонефриту.

Захворювання печінки

Фіброз печінки, також називаний печінковим фіброзом, обумовлений накопиченням рубцевої тканини в печінці і є характерним для більшості видів захворювань печінки. Заміна здорової тканини печінки рубцевою тканиною знижує здатність печінки функціонувати належним чином. Якщо стан, що викликає рубцювання, не лікується, фіброз печінки може прогресувати до цирозу печінки і повної печінкової недостатності, небезпечного для життя стану. Основними причинами фіброзу печінки є зловживання алкоголем, хронічна інфекція вірусу гепатиту С, неалкогольний стеатогепатит і гепатотоксичність (наприклад, індуковане ліками ушкодження печінки, викликане ацетамінофеном або іншим лікарським засобом).

Компоненти лектинового шляху були виявлені при фіброзних ураженнях печінки (Rensen et al., Hepatology, 50(6):1809-17 (2009)). Наприклад, при неалкогольному стеатогепатиті (також відомому як жирове захворювання печінки) широко розповсюджена активація білків системи комплементу, і їх експресія пов'язана з тяжкістю захворювання (Rensen et al., Hepatology, 50(6):1809-17 (2009), причому, крім відкладень С3 і С9, було виявлене накопичення MBL, що підтверджує активацію лектинового шляху.

Відповідно, у деяких варіантах здійснення надається спосіб пригнічення печінкового фіброзу у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом печінки, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення печінкового фіброзу у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом печінки, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом місцевої ін'єкції або безпосередньо в область фіброзу, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим способом парентерального введення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного захворювання або стану печінки.

У деяких варіантах здійснення захворювання або розлад печінки, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з: цирозу, неалкогольної жирової хвороби печінки (стеатогепатиту), фіброзу печінки, вторинного відносно зловживання алкоголем, фіброзу печінки, вторинного відносно гострого або хронічного гепатиту, біліарного захворювання і токсичного ураження печінки (наприклад, гепатотоксичності в результаті індукованого ліками ушкодження печінки, викликаного ацетамінофеном або іншим лікарським засобом).

Захворювання легенів

Легеневий фіброз - це утворення або розвиток надлишкової волокнистої сполучної тканини в легенях, при цьому нормальна легенева тканина замінюється фіброзною тканиною. Це рубцювання приводить до ригідності легенів і порушення структури і функції легенів. Вважається, що у людей фіброз легенів є результатом багаторазового ушкодження тканини усередині крихітних повітряних мішечків (альвеол) у легенях і між ними. В експериментальних дослідженнях аспекти захворювання людини були відтворені на різних моделях тварин. Наприклад, чужорідний агент, такий як блеоміцин, ізотіоціанат флуоресцеїну, оксид кремнію або азбест, може бути введений у трахею тварини (Gharaee-Kermani et al., Animal Models of Pulmonary Fibrosis. Methods Mol. Med., 2005, 117:251-259).

Відповідно, у деяких варіантах здійснення надається спосіб пригнічення легеневого фіброзу у суб'єкта, що страждає легеневим захворюванням або розладом, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення легеневого фіброзу, зменшення фіброзу в легенях і/або поліпшення функції легенів. Поліпшення симптомів функції легенів включає поліпшення функції і/або ємності легенів, зниження утоми і поліпшення насичення киснем.

У деяких варіантах здійснення даний винахід стосується способу лікування, пригнічення, профілактики або полегшення легеневого фіброзу у суб'єкта, що страждає кістозним фіброзом, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом місцевої ін'єкції або безпосередньо в область фіброзу, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим способом парентерального введення або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного захворювання або стану легенів.

Нижче описані деякі специфічні легеневі захворювання і розлади, викликані або ускладнені фіброзом і/або запаленням.

У деяких варіантах здійснення захворювання легенів, викликане або ускладнене фіброзом і/або запаленням, являє собою хронічну обструктивну хворобу легенів (ХОХЛ). ХОХЛ - це захворювання, при якому стінки дихальних шляхів є фіброзними з накопиченням міофібробластів і колагену, і воно є основною причиною інвалідності і четвертою основною причиною смертності в Сполучених Штатах. При ХОХЛ блокується повітряний потік і ускладнюється дихання хворого. ХОХЛ викликається ушкодженням дихальних шляхів, яке в остаточному підсумку перешкоджає обміну кисню і вуглекислого газу в легенях. ХОХЛ включає хронічний обструктивний бронхіт і емфізему і часто і те, і інше. Пацієнти з ХОХЛ, легені яких вже ушкоджені, і функція легенів уже порушена, мають підвищений ризик ускладнень, пов'язаних з бактеріальними і вірусними інфекціями.

Відповідно, в одному з варіантів здійснення даний винахід стосується способів лікування хронічної обструктивної хвороби легенів (ХОХЛ), які включають введення суб'єкту, що цього потребує, кількості інгібуючого MASP-2 агента (наприклад, анти-MASP-2 антитіла), ефективної для пригнічення і/або зменшення фіброзу легені. У деяких варіантах здійснення лікування включає зменшення одного або декількох симптомів ХОХЛ. Симптоми ХОХЛ і/або фіброзу легенів включають, без обмеження, кашель зі слизом, задишку (диспное), яка може погіршуватися при помірній активності, утому, часті респіраторні інфекції, хрип, здавленість у грудях, нерегулярні серцеві скорочення (аритмію), потребу в дихальному апараті і кисневій терапії, правосторонню серцеву недостатність або пульмонію (набряк серця і серцеву недостатність через хронічне захворювання легенів), пневмонію, пневмоторакс, серйозну втрату у вазі і неналежне харчування. Симптоми також включають зниження функції легенів, згідно з оцінками, одержаними в результаті тестування з використанням одного або більше стандартних тестів функції легенів.

У деяких варіантах здійснення хвороба легенів, викликана або ускладнена фіброзом і/або запаленням, являє собою фіброз легенів, асоційований зі склеродермією. Як більш докладно описано нижче, легеневий фіброз, асоційований зі склеродермією, є ще одним прикладом

фіброзу легенів, який можна лікувати інгібіторами MASP-2 (наприклад, інгібуючими MASP-2 антитілами).

У деяких варіантах здійснення захворювання легенів або порушення функції легенів, викликане або ускладнене фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з хронічної обструктивної хвороби легенів, кістозного фіброзу, фіброзу легенів, асоційованого зі склеродермією, бронхоектазу і легеневої гіпертензії.

Серцево-судинні захворювання

Причиною ряду різних серцево-судинних патологій є загальний фіброзний процес. Надмірне відкладення фіброзної тканини в серці приводить до серцевої патології, при якій продукування білків позаклітинного матриксу змінює структуру, архітектуру, форму серця і впливає на його скорочувальну функцію (Khan and Sheppard, Immunology, 118:10-24, 2006).

Дослідження показують, що фіброз може значною мірою сприяти серцевій дисфункції при ішемічній, дилатаційній і гіпертрофічній кардіоміопатії. Наприклад, було показано, що у пацієнтів з хронічною фібриляцією передсердь були виявлені більш високі рівні інтерстиціального фіброзу міокарда в порівнянні з контролем (Khan and Sheppard, Immunology, 118:10-24, 2006). Як інший приклад було встановлено, що в більшості випадків аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка (АКПШ) у США спостерігається інфільтрація жиру і рубцювання (фіброжирова АКПШ) (Burke et al., Circulation, 97:1571-1580, 1998). У дослідженні, у якому вивчали гістопатологічні характеристики міокарда шлуночків у людей з АКПШ, було встановлено, що великий фіброз був присутній у зразках біопсії у пацієнтів дитячого віку з АКПШ (Nishikawa T. et al., Cardiovascular Pathology, vol. 8(4):185-189, 1999).

Відповідно, у деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає серцевим або судинним захворюванням або розладом, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення серцевого і/або судинного фіброзу і/або поліпшення серцевої і/або судинної функції.

У деяких варіантах здійснення даний винахід стосується способу лікування, пригнічення, профілактики або ослаблення фіброзу у суб'єкта, що страждає фіброзом клапана, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом місцевої ін'єкції або безпосередньо в область фіброзу, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим способом парентерального введення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного серцевого або судинного захворювання або стану.

У деяких варіантах здійснення серцеве або судинне захворювання або розлад, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з: серцевого фіброзу, інфаркту міокарда, фіброзу передсердь, фіброзу ендоміокарда, аритмогенної кардіоміопатії правого шлуночка (АКПШ), судинного захворювання, атеросклеротичного судинного захворювання, судинного стенозу, рестенозу, васкуліту, флебіту, тромбозу глибоких вен і аневризми черевної аорти.

Хронічні інфекційні захворювання

Хронічні інфекційні захворювання, такі як гепатит С і гепатит В, викликають запалення тканин і фіброз, а висока активність лектинового шляху може бути шкідливою. При таких захворюваннях інгібітори MASP-2 можуть бути корисними. Наприклад, було виявлено, що рівні MBL і MASP-1 є важливими прогностичними параметрами тяжкості фіброзу печінки при інфекції вірусу гепатиту С (Brown et al., Clin. Exp. Immunol., 147(1):90-8, 2007, Saadanay et al., Arab. J. Gastroenterol. 12(2):68-73, 2011; Saeed et al., Clin. Exp. Immunol. 174(2):265-73, 2013). Раніше було показано, що MASP-1 є потужним активатором MASP-2 і лектинового шляху (Megyeri et al., J. Biol. Chem., 29:288(13):8922-34, 2013). Альфавіруси, такі як вірус чикунгунья і вірус Росс-Рівер, викликають сильну запальну відповідь у хазяїна, що приводить до артриту і міозиту, і ця патологія опосередковується MBL і активацією лектинового шляху (Gunn et al., Plos. Pathog.

8(3):e1002586, 2012).

Відповідно, у деяких варіант здійснення розкриття надає спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає або раніше переніс хронічне інфекційне захворювання, яке викликає запалення і/або фіброз, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом місцевої ін'єкції або безпосередньо в область фіброзу, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим способом парентерального введення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного хронічного інфекційного захворювання.

У деяких варіантах здійснення хронічне інфекційне захворювання, яке викликає запалення і/або фіброз, вибирають з групи, що складається з: альфа-вірусу, гепатиту А, гепатиту В, гепатиту С, туберкульозу, ВІЛ і грипу.

Аутоімунні захворювання

Склеродермія - хронічне аутоімунне захворювання, що характеризується фіброзом, судинними змінами і аутоантитілами. Існують дві основні форми: обмежена системна склеродермія і дифузійна системна склеродермія. Шкірні симптоми обмеженої системної склеродермії уражують руки, плечі і обличчя. Пацієнти з цією формою склеродермії часто мають одне або декілька з наступних ускладнень: кальциноз, феномен Рейно, дисфункцію стравоходу, склеродактилія і телеангіектазії. Дифузійна системна склеродермія швидко прогресує і зачіпає велику область шкіри і один або більше внутрішніх органів, часто нирки, стравохід, серце і/або легені.

Склеродермія уражує невеликі кровоносні судини, відомі як артеріоли, у всіх органах. Спочатку, ендотеліальні клітини артеріол гинуть у результаті апоптозу разом із гладком'язовими клітинами. Ці клітини заміняються колагеном і іншим волокнистим матеріалом. Запальні клітини, зокрема CD4+ хелперні Т-клітини, проникають в артеріолу і викликають подальше ушкодження.

Шкірні прояви склеродермії можуть бути болісними, приводити до уникнення використання ураженої ділянки (наприклад, рук, пальців рук, пальців ніг, ніг і т. д.) і можуть приводити до спотворювання таких ділянок. На шкірі можуть з'явитися виразки, і такі виразки можуть бути схильні до інфікування або навіть гангрени. Укрита виразками шкіра може бути важковиліковною або повільно піддаватися лікуванню. Тяжкість при загоєнні виразок шкіри може бути особливо ускладнена у пацієнтів з порушенням кровообігу, наприклад з феноменом Рейно. У деяких варіантах здійснення способи за даним винаходом використовуються для лікування склеродермії, наприклад шкірних симптомів склеродермії. У деяких варіантах здійснення лікування склеродермії включає лікування шкірних виразок, таких як дигітальні виразки. Введення інгібуючого MASP-2 агента, такого як анти-MASP-2 антитіло, можна використовувати для зменшення фіброзних і/або запальних симптомів склеродермії в уражених тканинах і/або органах.

Крім шкірних симптомів/проявів, склеродермія може також впливати на серце, нирки, легені, суглоби і травний тракт. У деяких варіантах здійснення лікування склеродермії включає лікування симптомів захворювання в будь-якій одній або більше з цих тканин, наприклад шляхом зменшення фіброзних і/або запальних симптомів. Проблеми, пов'язані з легенями, є одними з найбільш серйозних ускладнень склеродермії і відповідальні за більшу частину смертельних кінців, пов'язаних із цим захворюванням. Двома переважними станами легенів, пов'язаними зі склеродермією, є фіброз легенів і легенева гіпертензія. Пацієнт з ураженими легенями може мати або один, або обидва ці стани. Фіброз легенів, асоційований зі склеродермією, є одним з прикладів легеневого фіброзу, який можна лікувати інгібіторами MASP-2. Склеродермія, що зачепила легеню, викликає рубцювання (фіброз легенів). Такий легеневий фіброз зустрічається в приблизно 70 % пацієнтів зі склеродермією, хоча його прогресування, як правило, є повільним, і симптоми сильно відрізняються у пацієнтів по ступеню тяжкості. У пацієнтів, які мають симптоми, асоційовані з легеневим фіброзом, такі симптоми включають сухий кашель, задишку і зниження здатності до фізичного навантаження. У приблизно 16 % пацієнтів з деяким рівнем фіброзу легенів розвивається важкий фіброз

легенів. У пацієнтів з важким легеневим фіброзом спостерігається значне зниження функції легенів і альвеоліт.

У деяких варіантах здійснення способи за даним винаходом використовуються для лікування склеродермії, наприклад фіброзу легенів, асоційованого зі склеродермією. Введення інгібуючих MASP-2 агентів, таких як інгібуючі MASP-2 антитіла, можна використовувати для зменшення фіброзних симптомів склеродермії в легенях. Наприклад, ці способи можна використовувати для поліпшення функції легенів і/або зниження ризику смерті через склеродермію.

У пацієнтів зі склеродермією також часто можуть бути уражені нирки. Фіброз нирок, асоційований зі склеродермією, є прикладом фіброзу нирок, який можна лікувати шляхом введення інгібуючих MASP-2 агентів, таких як анти-MASP-2 антитіла. У деяких варіантах здійснення способи за даним винаходом використовуються для лікування склеродермії, наприклад фіброзу нирок, асоційованого зі склеродермією. В одному з варіантів здійснення введення інгібуючих MASP-2 антитіл можна використовувати для зменшення фіброзних симптомів склеродермії в нирках. Наприклад, ці способи можна використовувати для поліпшення функції нирок, зменшення білка в сечі, зменшення тяжкості артеріальної гіпертонії і/або зниження ризику розвитку ниркового кризу, який може привести до фатальної ниркової недостатності.

Системний червона вовчак (СЧВ) є хронічним запальним аутоімунним розладом, що характеризуються спонтанною аутореактивністю В- і Т-клітин і мультиорганним імунним ушкодженням і може впливати на шкіру, суглоби, нирки і інші органи. Майже у всіх людей з СЧВ є біль у суглобах і у більшості розвивається артрит. Часто ураженими суглобами є суглоби пальців, рук, зап'ястя і колін. Загальні симптоми СЧВ включають: артрит; утому; загальний дискомфорт, занепокоєння або погане почуття (нездужання); біль у суглобах і припухлість; біль у м'язах; нудоту і блювання; і шкірний висип. Крім того, симптоми також можуть включати: біль у животі; кров у сечі; зміну кольору пальців при здавлюванні або на холоді; оніміння і поколювання; і червоні плями на шкірі. У деяких пацієнтів з СЧВ є ураження легенів або нирок. Не обмежуючись теорією, запалення і/або фіброз у легенях і нирках призводить до ураження цих органів і розвитку симптомів, асоційованих з ушкодженням легенів і/або нирок. У деяких випадках у пацієнтів з СЧВ розвивається певний стан нирок, називаний вовчаковим нефритом. У деяких варіантах здійснення даний винахід стосується способів лікування СЧВ, які включають введення ефективної кількості інгібуючого MASP-2 агента, такого як анти-MASP-2 антитіло. Введення інгібуючих MASP-2 антитіл можна використовувати для зменшення одного або більше симптомів СЧВ. У деяких варіантах здійснення введення анти-MASP-2 антитіл використовується для лікування СЧВ у пацієнта з вовчаковим нефритом. У таких випадках лікування СЧВ включає лікування вовчакового нефриту, наприклад шляхом зменшення симптомів вовчакового нефриту. У деяких варіантах здійснення лікування включає лікування шкірних симптомів СЧВ. У деяких варіантах здійснення лікування включає зменшення одного або більше симптомів вовчакового нефриту. У деяких варіантах здійснення лікування включає зменшення, уповільнення або усунення необхідності в діалізі. У деяких варіантах здійснення лікування включає зменшення, уповільнення або усунення необхідності в трансплантації нирок. У деяких варіантах здійснення лікування включає затримання або запобігання прогресуванню вовчакового нефриту до ниркової недостатності або термінальної стадії ниркової недостатності.

Вовчаковий нефрит є запаленням нирок і серйозним ускладненням системного червоного вовчака (СЧВ). Що стосується нирок, вовчаковий нефрит може привести до інвалідизуючої втрати їх функції. У пацієнтів з вовчаковим нефритом в остаточному підсумку може розвитися ниркова недостатність, і їм може знадобитися діаліз або трансплантація нирок. Пов'язані із цим ускладнення, які також можна лікувати способами за винаходом, включають інтерстиціальний нефрит і нефротичний синдром. Симптоми вовчакового нефриту включають: кров у сечі, пінистий вигляд сечі, високий кров'яний тиск, білок у сечі, затримання рідини і набряки. Інші симптоми включають ознаки і симптоми фіброзу нирок і/або ниркової недостатності. Якщо хворобу не лікувати, вовчаковий нефрит може привести до ниркової недостатності і навіть термінальної стадії ниркової недостатності.

Відповідно, у деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає аутоімунним захворюванням, яке викликане або ускладнюється фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад

шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом місцевої ін'єкції або безпосередньо в область фіброзу, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим способом парентерального введення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного аутоімунного захворювання.

У деяких варіантах здійснення аутоімунне захворювання, яке викликане або ускладнюється фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається зі склеродермії і системного червоного вовчака (СЧВ).

Захворювання і стани центральної нервової системи

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом центральної нервової системи, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як анти-MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом місцевої ін'єкції або безпосередньо в область фіброзу, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим способом парентерального введення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного захворювання або розладу центральної нервової системи.

У деяких варіантах здійснення захворювання або розлад центральної нервової системи, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з: інсульту, травматичного ушкодження головного мозку і ушкодження спинного мозку.

Шкірні захворювання або стани

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає хворобою або розладом шкіри, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу композицію MASP-2 можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції на шкіру або місцевого застосування під час операції або локальної ін'єкції або напряму, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим парентеральним способом введення, шляхом топічного нанесення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного шкірного захворювання або розладу.

У деяких варіантах здійснення шкірне захворювання або розлад, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з фіброзу шкіри, загоєння ран, склеродермії, системного склерозу, келоїдів, захворювань сполучної тканини, рубцювання і гіпертрофічних рубців.

Захворювання і стани кісток і м'яких тканин скелетно-м'язової системи

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом кісток або м'яких тканин, викликаним або ускладненим фіброзом і/або

запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції на структуру кістки або м'якої тканини або місцевого нанесення під час операції або локальної ін'єкції або напряму, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим парентеральним способом введення, шляхом топічного нанесення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного захворювання або розладу кісток або м'яких тканин.

У деяких варіантах здійснення захворювання або розлад кісток або м'яких тканин, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з остеопорозу і/або остеопенії, пов'язаної, наприклад, з кістозним фіброзом, мієлодиспластичними станами зі збільшенням кісткового фіброзу, адгезивного капсуліту, контрактури Дюпюїтрена і мієлофіброзу.

Суглобові захворювання або стани

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає суглобовим захворюванням або розладом, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції на суглоб, або місцевого нанесення під час операції або локальної ін'єкції або напряму, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим парентеральним способом введення, шляхом топічного нанесення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного суглобового захворювання або розладу.

У деяких варіантах здійснення суглобове захворювання або розлад, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, являє собою артрофіброз.

Захворювання або стани травної системи

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом травної системи, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом локальної ін'єкції або напряму, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим парентеральним способом введення, шляхом топічного нанесення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, анти-MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного захворювання або розладу травної системи.

У деяких варіантах здійснення захворювання або розлад травної системи, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з хвороби Крона, виразкового коліту і фіброзу підшлункової залози.

Очні захворювання або стани

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає очним захворюванням або розладом, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом локальної ін'єкції або напряму, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим парентеральним способом введення, шляхом топічного нанесення в око (наприклад, очні краплі), або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного очного захворювання або розладу.

У деяких варіантах здійснення очне захворювання або розлад, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з передньої субкапсулярної катаракти, помутніння задньої капсули, дегенерації жовтої плями і ретинальної і вітреальної ретинопатії.

Захворювання або стани репродуктивних органів

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом репродуктивних органів, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом локальної ін'єкції або напряму, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим парентеральним способом введення, шляхом топічного нанесення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного захворювання або розладу репродуктивних органів.

У деяких варіантах здійснення захворювання або розлад репродуктивних органів, викликаний або ускладнений фіброзом і/або запаленням, вибирають із групи, що складається з: ендометріозу і хвороби Пейроні.

Рубцювання, пов'язане з травмою

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає захворюванням або станом, що є результатом рубцювання, пов'язаного з травмою, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом локальної ін'єкції або напряму, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим парентеральним способом введення, шляхом топічного нанесення, або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які

придатні для першопричинного захворювання або розладу.

У деяких варіантах здійснення рубцювання, пов'язане з травмою, вибирають із групи, що складається з: хірургічних ускладнень (наприклад, хірургічних спайок, у яких рубцева тканина може утворюватися між внутрішніми органами, викликаючи контрактуру, біль, і може приводити до безплідності), хіміотерапевтичного індукованого ліками фіброзу, індукованого радіацією фіброзу і рубцювання, пов'язаного з опіками.

Додаткові захворювання і розлади, викликані або ускладнені фіброзом і/або запаленням

У деяких варіантах здійснення надається спосіб профілактики, лікування, купірування, пригнічення і/або зменшення фіброзу і/або запалення у суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом, викликаним і/або ускладненим фіброзом і/або запаленням, вибраним із групи, що складається з трансплантації органів, фіброзу молочної залози, м'язового фіброзу, ретроперитонеального фіброзу, фіброзу щитовидної залози, фіброзу лімфатичних вузлів, фіброзу сечового міхура і плеврального фіброзу, який включає введення суб'єкту, що цього потребує, інгібуючого MASP-2 агента, такого як інгібуюче MASP-2 антитіло. Цей спосіб включає введення композиції, яка містить кількість інгібітору MASP-2, ефективну для пригнічення фіброзу і/або запалення.

Інгібуючу MASP-2 композицію можна вводити локально в область фіброзу, наприклад шляхом місцевого нанесення композиції під час операції або шляхом локальної ін'єкції або напряму, або віддалено, наприклад за допомогою катетера. Альтернативно, інгібуючий MASP-2 агент можна вводити суб'єкту системно, наприклад внутрішньоартеріально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово, шляхом інгаляції, назально, підшкірно або іншим парентеральним способом введення, шляхом топічного нанесення в око (наприклад, очні краплі), або, у випадку непептидергічних засобів, можливе пероральне введення. Введення можна повторювати, по визначенню лікаря, до полегшення стану або до досягнення контролю.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) вводять у комбінації з одним або більше агентами або способами лікування, які придатні для першопричинного захворювання або розладу.

У деяких варіантах здійснення будь-якого з описаних у даній заявці різних способів і фармацевтичних композицій, інгібуюче MASP-2 антитіло вибірково пригнічує лектиновий шлях, не зачіпаючи при цьому класичний шлях.

У різних аспектах даний винахід стосується способів пригнічення несприятливих ефектів фіброзу і/або запалення, які включають введення інгібуючого MASP-2 агента суб'єкту, що цього потребує. Інгібуючі MASP-2 агенти вводять у кількості, ефективній для пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу у живого суб'єкта. При практичному здійсненні цього аспекту винаходу типові інгібуючі MASP-2 агенти включають: молекули, що пригнічують біологічну активність MASP-2 (такі як низькомолекулярні інгібітори, анти-MASP-2 антитіла (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) або блокувальні пептиди, які взаємодіють з MASP-2 або порушують білок-білкову взаємодію) і молекули, які зменшують експресію MASP-2 (такі як молекули антисмислової нуклеїнової кислоти MASP-2, MASP-2-специфічні молекули РНКі і MASP-2 рибозими), тим самим не допускаючи MASP-2-активацію лектинового шляху комплементу. Інгібуючі MASP-2 агенти можна використовувати окремо як первинну терапію або в комбінації з іншими терапевтичними засобами як ад'ювантну терапію для підвищення терапевтичного ефекту інших медичних препаратів.

Пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу характеризується щонайменше однією з наступних змін у компоненті системи комплементу, які відбуваються в результаті введення інгібуючого MASP-2 агента згідно зі способами за винаходом: пригнічення генерації або продукування продуктів MASP-2-залежної активації комплементу C4b, C3a, C5a і/або C5b-9 (MAC) (виміряні, наприклад, як описано в прикладі 2), зменшення рівня розщеплення C4 і відкладення C4b (виміряне, наприклад, як описано в прикладі 2) або зменшення рівня розщеплення C3 і відкладення C3b (виміряне, наприклад, як описано в прикладі 2).

Відповідно до даного винаходу використовуються інгібуючі MASP-2 агенти, які ефективні в пригніченні фіброзу і/або запалення і проявляють виявлювану антифіброзну активність і/або індукують зменшення фіброзу. У контексті винаходу антифіброзна активність може включати щонайменше одне або більше з наступного: (1) зменшення запалення, наприклад, яке оцінюється по активації і рекрутуванню макрофагів і ендотеліальних клітин; рекрутування і активація лімфоцитів і/або еозинофілів шляхом секреції ряду цитокінів/хемокінів; вивільнення цитотоксичних медіаторів і фіброгенних цитокінів; (2) зниження проліферації клітин, синтез ВКМ (ECM) або ангіогенез; і/або (3) зменшення рівня відкладення колагену в порівнянні з фіброзною активністю за відсутності інгібуючого MASP-2 агента.

Оцінка антифіброзного агента, такого як інгібуючий MASP-2 агент, може здійснюватися

шляхом виявлення будь-яким відомим фахівцю в даній галузі методом. Наприклад, оцінка антифіброзного агента може здійснюватися за допомогою моделі UUO (як описано в даній заявці в прикладах 12 і 14). Якщо оцінювану антифіброзну активність і/або зменшення або зниження фіброзу оцінюють за допомогою інгібуючого MASP-2 агента, вважається, що інгібуючий MASP-2 агент використовується як лікарський засіб для профілактики, лікування, купірування і/або пригнічення фіброзу.

Оцінку фіброзу можна здійснювати періодично, наприклад щотижня або щомісяця. Таким чином, збільшення/зменшення фіброзу і/або наявність антифіброзної активності можна оцінювати періодично, наприклад щотижня або щомісяця. Ця оцінка переважно здійснюється в декількох часових точках для даного суб'єкта або в одній або більше часових точках для даного суб'єкта і здорового контролю. Оцінка може проводитися через регулярні інтервали часу, наприклад щотижня або щомісяця. Тому оцінку можна здійснювати регулярно, наприклад щотижня або щомісяця. Якщо в результаті оцінки виявлене зменшення фіброзу або наявність антифіброзної активності, вважається, що інгібуючий MASP-2 агент, такий як інгібуюче MASP-2 антитіло, проявляє виявлювану антифіброзну активність і/або індукує зменшення або зниження фіброзу.

Інгібуючі MASP-2 агенти, у випадку практичного застосування цього аспекту винаходу, включають, наприклад, MASP-2 антитіла і їх фрагменти, інгібуючі MASP-2 пептиди, малі молекули, розчинні MASP-2 рецептори і інгібітори експресії. Інгібуючі MASP-2 агенти можуть пригнічувати систему MASP-2-залежної активації комплементу, блокуючи біологічну функцію MASP-2. Наприклад, інгібуючий агент може ефективно блокувати взаємодію білка MASP-2 з білком, перешкоджати димеризації або збиранню MASP-2, блокувати зв'язування з Ca^{2+}, інтерферувати з активною ділянкою серинової протеази MASP-2 або знижувати рівень експресії білка MASP-2.

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти вибірково пригнічують MASP-2-залежну активацію комплементу, не зачіпаючи функціональну активність системи C1q-залежної активації комплементу.

В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент, використовуваний у способах за винаходом, являє собою специфічний інгібуючий MASP-2 агент, який специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить SEQ ID NO:6, зі спорідненістю зв'язування, що щонайменше в 10 разів перевищує спорідненість зв'язування з іншими антигенами в системі комплементу. В іншому варіанті здійснення інгібуючий MASP-2 агент специфічно зв'язується з поліпептидом, що містить SEQ ID NO:6, зі спорідненістю зв'язування, що щонайменше в 100 разів перевищує спорідненість зв'язування з іншими антигенами в системі комплементу. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент специфічно зв'язується щонайменше з одним з домену CCP1-CCP2 (аа 300-431 в SEQ ID NO:6) або домену серинової протеази MASP-2 (аа 445-682 в SEQ ID NO:6) і пригнічує активацію MASP-2-залежного комплементу. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою моноклональне антитіло MASP-2 або його фрагмент, що специфічно зв'язується з MASP-2. Спорідненість зв'язування інгібуючого MASP-2 агента може бути визначена за допомогою придатного аналізу зв'язування.

Поліпептид MASP-2 має молекулярну структуру, аналогічну структурі MASP-1, MASP-3 і C1r і C1s, протеаз системи комплементу C1. Молекула кДНК, представлена в SEQ ID NO:4, кодує типовий приклад MASP-2 (що складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:5) і забезпечує людський поліпептид MASP-2 з лідерною послідовністю (аа 1-15), який розщеплюється після секреції, утворюючи зрілу форму людського MASP-2 (SEQ ID NO:6). Як показано на фіг. 2, ген людського MASP-2 містить дванадцять екзонів. кДНК людського MASP-2 кодується екзонами B, C, D, F, G, H, I, J, K і L. У результаті альтернативного сплайсингу утворюється білок розміром 20 кДа, називаний MBL-асоційованим білком 19 (MAp19, також називаний sMAP) (SEQ ID NO:2), кодований (SEQ ID NO:1), одержуваний з екзонів B, C, D і E, як показано на фіг. 2. Молекула кДНК, представлена в SEQ ID NO:50, кодує мишачий MASP-2 (що складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:51) і забезпечує поліпептид мишачого MASP-2 з лідерною послідовністю, у результаті розщеплення якої після секреції утворюється зріла форма мишачого MASP-2 (SEQ ID NO:52). Молекула кДНК, представлена в SEQ ID NO:53, кодує щурячий MASP-2 (що складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:54) і забезпечує поліпептид щурячого MASP-2 з лідерною послідовністю, у результаті розщеплення якої після секреції утворюється зріла форма щурячого MASP-2 (SEQ ID NO:55).

Фахівці в даній галузі техніки зрозуміють, що послідовності, розкриті в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:50 і SEQ ID NO:53, являють собою одиночні алелі людського, мишачого і щурячого MASP-2, відповідно, і що можливі алельні варіанти і альтернативний сплайсинг. Алельні варіанти

нуклеотидних послідовностей, наведені в SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:50 і SEQ ID NO:53, включаючи ті, які містять сайленс-мутації, і ті, у яких мутації приводять до змін амінокислотної послідовності, знаходяться у межах даного винаходу. Алельні варіанти послідовності MASP-2 можуть бути клоновані шляхом зондування кДНК або геномних бібліотек від різних індивідуумів згідно зі стандартними процедурами.

Домени людського білка MASP-2 (SEQ ID NO:6) показані на фіг. 1 і 2A і включають домени N-кінцевий C1r/C1s/VEGF морського їжака/домен кісткового морфогенетичного білка (CUBI) (аа 1-121 в SEQ ID NO:6), домен, подібний епідермальному фактору росту (аа 122-166), другий домен CUBI (аа 167-293), а також тандем доменів регуляторних білків комплементу. Альтернативний сплайсинг гена MASP-2 приводить до утворення MAp19, показаного на фіг. 1. MAp19 являє собою неферментний білок, що містить N-термінальну CUBI-EGF ділянку MASP-2 з чотирма додатковими залишками (EQSL), одержаними з екзона E, показаного на фіг. 1.

Було показано, що деякі білки здатні зв'язуватися або взаємодіяти з MASP-2 за допомогою білок-білкових взаємодій. Наприклад, відомо, що MASP-2 здатний зв'язуватися і формувати Ca^{2+}-залежні комплекси з лектиновими білками MBL, H-фіколіном і L-фіколіном. Було показано, що кожний комплекс MASP-2/лектиновий білок здатний активувати комплемент за допомогою MASP-2-залежного розщеплення білків C4 і C2 (Ikeda K. et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita M. et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita M. et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Дослідження показали, що домени CUBI-EGF MASP-2 є важливими для зв'язування MASP-2 з MBL (Thielens N.M. et al., J. Immunol. 166:5068, 2001). Також було показано, що домени CUBIEGFCUBII опосередковують димеризацію MASP-2, необхідну для формування активного комплексу MBL (Wallis R. et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000). Звідси випливає, що інгібуючі MASP-2 агенти характеризуються своєю здатністю зв'язуватися або взаємодіяти з MASP-2 ділянками-мішенями, що відіграють важливу роль у процесі MASP-2-залежної активації комплементу.

АНТИ-MASP-2 АНТИТІЛА

У деяких варіантах здійснення цього аспекту даного винаходу інгібуючий MASP-2 агент включає анти-MASP-2 антитіло, яке пригнічує систему MASP-2-залежної активації комплементу. Анти-MASP-2 антитіла, придатні для здійснення цього аспекту даного винаходу, включають поліклональні, моноклональні або рекомбінантні антитіла, одержані від будь-якого продукуючого антитіла ссавця, і дані антитіла можуть бути мультиспецифічними, химерними, гуманізованими, антиідіотипічними антитілами і фрагментами антитіл. Фрагменти антитіл включають Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$, Fv-фрагменти, scFv-фрагменти і одноланцюжкові антитіла, описані нижче.

Анти-MASP-2 антитіла можуть бути піддані скринінгу на здатність пригнічення системи MASP-2-залежної активації комплементу і на антифіброзну активність і/або пригнічення ниркового ураження, асоційованого з протеїнурією або індукованою адріаміцином нефропатією, за допомогою описаного в даній заявці аналізу. Деякі анти-MASP-2 антитіла були описані в науковій літературі, декілька з них перераховані в таблиці 1. Наприклад, як показано в даній заявці в прикладах 10 і 11, було знайдено, що анти-MASP-2 антитіла Fab2 блокують MASP-2-залежну активацію комплементу. Як показано в прикладі 12 і описано в WO 2012/151481, включеній в даний опис у вигляді посилання, було визначено, що повністю людські анти-MASP-2 антитіла scFv (наприклад, OMS646) блокують MASP-2-залежну активацію комплементу. Як описано в прикладі 13, а також в WO 024141442, включеній в даний опис у вигляді посилання, анти-MASP-2 антитіла, що несуть пептид SGMI-2, і їх фрагменти, що проявляють інгібуючу MASP-2 активність, були одержані шляхом злиття з амінокислотною послідовністю пептиду SGMI-2 (SEQ ID NO:72, 73 або 74) на аміно- або карбоксильному кінці важкого і/або легкого ланцюга людського анти-MASP-2 антитіла (наприклад, OMS646-SGMI-2).

Відповідно, в одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент для використання в способах за винаходом містить людське антитіло, таке як, наприклад, OMS646. Відповідно, в одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент для використання в композиціях і способах за заявленим винаходом містить людське антитіло, яке зв'язує поліпептид, що складається з людського MASP-2 (SEQ ID NO:6), причому антитіло містить: (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 31-35 в SEQ ID NO:67; і ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 50-65 в SEQ ID NO:67; і iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 95-107 в SEQ ID NO:67; і (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 24-34 в SEQ ID NO:70; і ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 50-56 в SEQ ID NO:70; і iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить

амінокислотну послідовність з аа 89-97 в SEQ ID NO:70; або (II) його варіант, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга з щонайменше 90 % ідентичністю з SEQ ID NO:67 (наприклад, з щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичністю) з SEQ ID NO:67; і варіабельну ділянку легкого ланцюга з щонайменше 90 % ідентичністю (наприклад, з щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичністю) з SEQ ID NO:70.

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

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент, що специфічно розпізнає щонайменше частину епітопа на людському MASP-2, розпізнаваному референсним антитілом OMS646, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, як зазначено в SEQ ID NO:67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, як зазначено в SEQ ID NO:70. В одному з варіантів здійснення інгібуючий MASP-2 агент, використовуваний у способах за винаходом, містить людське антитіло OMS646.

ТАБЛИЦЯ 1

НАВЕДЕНІ ЯК ПРИКЛАД MASP-2-СПЕЦИФІЧНІ АНТИТІЛА

Антиген	Тип антитіла	Посилання
Рекомбінантний MASP-2	Щуряче поліклональне	Peterson S.V. et al., Mol. Immunol. 37:803-811, 2000
Фрагмент рекомбінантного людського CCP1/2-SP (MoAb 8B5)	Щуряче MoAb (підклас IgG1)	Moller-Kristensen M. et al., J. of Immunol. Methods, 282:159-167, 2003
Рекомбінантний людський MAp19 (MoAb 6G12) (перехресна реакція з MASP-2)	Щуряче MoAb (підклас IgG1)	Moller-Kristensen M. et al., J. of Immunol. Methods, 282:159-167, 2003
hMASP-2	Мишаче MoAb (S/P) Мишаче MoAb (N-терм.)	Peterson S.V. et al., Mol. Immunol. 35:409, April 1998
hMASP-2 (домен CCP1-CCP2-SP)	Щуряче MoAb: Nimoab101, продуковане гібридомною клітинною лінією 03050904 (ECACC)	WO 2004/106384
hMASP-2 (повнорозмірний, his-мічений)	Мишачі MoAbs: Nimoab104, продуковане гібридомною клітинною лінією M0545YM035 (DSMZ) Nimoab108, продуковане гібридомною клітинною лінією M0545YM029 (DSMZ) Nimoab109 продуковане гібридомною клітинною лінією M0545YM046 (DSMZ) Nimoab110 продуковане гібридомною клітинною лінією M0545YM048 (DSMZ)	WO 2004/106384
Щурячий MASP-2 (повнорозмірний)	Фрагменти анти-MASP-2 антитіла Fab2	Приклад 10
hMASP-2 (повнорозмірний)	Повністю людські клони scFv	Приклад 12 і WO 2012/151481
hMASP-2 (повнорозмірний)	Анти-MASP-2 антитіла, що несуть пептид SGMI-2	Приклад 13 і WO 2014/144542

АНТИ-MASP-2 АНТИТІЛА ЗІ ЗНИЖЕНОЮ ЕФЕКТОРНОЮ ФУНКЦІЄЮ

У деяких варіантах здійснення цього аспекту даного винаходу анти-MASP-2 антитіла мають знижену ефекторну функцію для зменшення запалення, яке може виникати при активації класичного шляху комплементу. Було виявлено, що здатність молекул IgG запускати класичний шлях активації комплементу пов'язана з Fc-ділянкою молекули (Duncan A.R. et al., Nature, 332:738-740 1988). Молекули IgG, у яких Fc-ділянка була видалена за допомогою ферментного розщеплення, позбавлені даної ефекторної функції (див. Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Відповідно до цього, антитіла зі зниженою ефекторною функцією можуть бути одержані в результаті видалення Fc-ділянки молекули, що містить генно-інженерну Fc-послідовність, яка має мінімальну ефекторну функцію, ця молекула може належати як до людського ізотипу IgG2, так і до ізотипу IgG4.

Антитіла зі зниженою ефекторною функцією можуть бути одержані за допомогою стандартних молекулярних біологічних маніпуляцій з Fc-ділянкою важких ланцюгів IgG, як описано в даній заявці і показано в Jolliffe et al., Int'l Rev. Immunol. 10:241-250, 11993, і Rodrigues et al., J. Immunol. 151:6954-6961, 1998. Антитіла зі зниженою ефекторною функцією також включають людські ізотипи IgG2 і IgG4, які мають знижену здатність активувати комплемент і/або вступати у взаємодію з Fc-рецепторами (Ravetch J.V. et al., Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991; Isaacs J.D. et al., J. Immunol. 148:3062-3071, 1992; van de Winkel J.G. et al., Immunol. Today, 14:215-221, 1993). Гуманізовані або повноцінні людські антитіла, специфічні до людського MASP-2, що включають ізотипи IgG2 або IgG4, можуть бути одержані одним з декількох способів, відомих фахівцю в даній галузі техніки, як описано в Vaughan T.J. et al., Nature Biotechnical, 16:535-539, 1998.

ОДЕРЖАННЯ АНТИ-MASP-2 АНТИТІЛ

Анти-MASP-2 антитіла можуть бути одержані за допомогою поліпептидів MASP-2 (наприклад, повнорозмірного MASP-2) або антигенних пептидів, що несуть епітоп MASP-2 (наприклад, частина поліпептиду MASP-2). Імунногенні пептиди можуть складатися всього з п'яти амінокислотних залишків. Наприклад, поліпептид MASP-2, що містить повну амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6, може бути використаний для індукції анти-MASP-2 антитіл, які можуть бути використані в способі за даним винаходом. Відомо, що конкретні домени MASP-2, залучені в білок-білкові взаємодії, такі як домени CUBI і CUBIEGF, а також область, що містить активну ділянку серинової протеази, можна експресувати у вигляді рекомбінантних поліпептидів, як описано в прикладі 3, і використовувати як антигени. Крім того, пептиди, які містять ділянку, що складається з щонайменше 6 амінокислот поліпептиду MASP-2 (SEQ ID NO:6), також можна використовувати для індукції MASP-2 антитіл. Додаткові приклади одержаних антигенів MASP-2, що мають здатність індукувати MASP-2 антитіла, наведені нижче в таблиці 2. Пептиди і поліпептиди MASP-2, використовувані для генерації антитіл, можуть бути виділені у вигляді природних поліпептидів або рекомбінантних або синтетичних пептидів і каталітично неактивних рекомбінантних поліпептидів, таких як MASP-2A, як описано далі в даній заявці. У деяких варіантах здійснення цього аспекту даного винаходу анти-MASP-2 антитіла одержані з використанням трансгенної лінії мишей, як описано нижче в даній заявці.

Антигени, здатні продукуватися анти-MASP-2 антитіла, також включають злиті поліпептиди, наприклад поліпептиди, одержані в результаті злиття MASP-2 або його частини з поліпептидом імуноглобуліну або білком, що зв'язує мальтозу. Поліпептидний імуноген може бути представлений повнорозмірною молекулою або її частиною. Якщо частина поліпептиду представлена гаптеном, така частина може бути переважно приєднана або зв'язана для імунізації з макромолекулярним носієм (таким як гемоціанін фісурели (KLH), бичачий сироватковий альбумін (BSA) або правцевий анатоксин).

ТАБЛИЦЯ 2

АНТИГЕНИ MASP-2

SEQ ID NO:	Амінокислотна послідовність
SEQ ID NO:6	Людський білок MASP-2
SEQ ID NO:51	Мишачий білок MASP-2
SEQ ID NO:8	Домен CUBI людського MASP-2 (aa 1-121 в SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	Домени CUBIEGF людського MASP-2 (aa 1-166 в SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	Домени CUBIEGFCUBII людського MASP-2 (aa 1-293 в SEQ ID NO:6)

ТАБЛИЦЯ 2

АНТИГЕНИ MASP-2

SEQ ID NO:11	Домен EGF людського MASP-2 (aa 122-166 в SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:12	Домен серинової протеази людського MASP-2 (aa 429-671 в SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	Мутантна форма з інактивованим доменом серинової протеази (aa 610-625 в SEQ ID NO:6 з мутантним Ser618)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	Людський пептид CUBI
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ	Людський пептид CUBI
SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	MBL-зв'язувальна ділянка в людському домені CUBI
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF	MBL-зв'язувальна ділянка в людському домені CUBI
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	Пептид EGF
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALV	Пептид з активної ділянки серинової протеази

ПОЛІКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА

Поліклональні анти-MASP-2 антитіла можуть бути одержані шляхом імунізації тварин поліпептидом MASP-2 або його імуногенною ділянкою способами, добре відомими фахівцю в даній галузі техніки. Див., наприклад, Green et al., Production of Polyclonal Antisera, в Immunochemical Protocols (Manson, ed.), стор. 105. Імуногенність поліпептиду MASP-2 можна підвищити за допомогою ад'юванту, включаючи мінеральні гелі, такі як гідроксид алюмінію або ад'ювант Фрейнда (повний або неповний), поверхнево-активних речовин, таких як лізолецитин, високомолекулярних спиртів - плюроніків, поліаніонів, масляних емульсій, гемоціаніну фісурели і динітрофенолу. Для одержання поліклональних антитіл звичайно використовують тварин, таких як коні, корови, собаки, кури, щури, миші, кролики, морські свинки, кози або вівці. Як альтернатива, анти-MASP-2 антитіло, використовуване в даному винаході, може також бути одержане від людиноподібної мавпи. Загальний метод одержання діагностично і терапевтично корисних антитіл у бабуїнів можна знайти, наприклад, в Goldenberg et al., публікація міжнародної заявки на патент WO 91/11465, і в Losman M.J. et al., Int. J. Cancer, 46:310, 1990. Потім за допомогою стандартних загальновідомих процедур із крові таких імунізованих тварин одержують сироватку, що містить імунологічно активні антитіла.

МОНОКЛОНАЛЬНІ АНТИТІЛА

У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою моноклональне анти-MASP-2 антитіло. Моноклональні анти-MASP-2 антитіла є високоспецифічним епітопом, спрямованим проти одного епітопа MASP-2. Як використовується в даному описі, модифікатор "моноклональне" указує на характер антитіла, одержаного з по суті гомогенної популяції антитіл, і не має на увазі одержання антитіл яким-небудь конкретним способом. Моноклональні антитіла можуть бути одержані будь-яким методом, що передбачає одержання молекул антитіл у культурі стабільної клітинної лінії, таким як, наприклад, метод гібридом, описаний в Kohler G. et al., Nature, 256:495, 1975, або вони можуть бути одержані методами рекомбінантних ДНК (див., наприклад, патент США № 4,816,567, Cabilly). Моноклональні антитіла можуть бути також виділені з фагової бібліотеки антитіл методами, описаними в Clackson T. et al., Nature, 352:624-628, 1991, і Marks J.D. et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991. Подібні антитіла можуть належати до будь-якого класу імуноглобулінів, включаючи IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, і будь-якого їх підкласу.

Наприклад, моноклональні антитіла можуть бути одержані шляхом ін'єкцій придатному ссавцю (наприклад, миші лінії BALB/c) композиції, яка містить поліпептид MASP-2 або його частину. Після попередньо визначеного періоду часу, у миші виділяють спленоцити і ресуспендують їх у культуральному середовищі. Потім здійснюють злиття спленоцитів з імморталізованою клітинною лінією для утворення гібридоми. Утворені гібридоми вирощують у культурі клітин і піддають їх скринінгу на здатність до продукування моноклональних антитіл до

MASP-2. Далі в даному описі наведені приклади одержання моноклональних анти-MASP-2 антитіл (див. також Current Protocols in Immunology, Vol. 1, John Wiley & Sons, pages 2.5.1-2.6.7, 1991.)

Людські моноклональні антитіла можуть бути одержані від трансгенних мишей, створених методами генної інженерії для продукування людських антитіл у відповідь на антигенний стимул. У цьому методі елементи локусу важких і легких ланцюгів людського імуноглобуліну вводять у лінії мишей, одержані із клітинних ліній ембріональних стовбурних клітин, які містять спрямовані руйнування локусів важких і легких ланцюгів ендогенного імуноглобуліну. Трансгенні миші можуть синтезувати людські антитіла, специфічні до людських антигенів, таких як антигени MASP-2, описані в даному винаході, і цих мишей можна використовувати для одержання гібридом, секретуючих антитіла до людського MASP-2, шляхом злиття В-клітин, одержаних від таких тварин, з придатними клітинними лініями мієломи звичайним методом Келера-Мільштейна, як описано нижче в даній заявці. Трансгенні миші з геномом людського імуноглобуліну є комерційно доступними (наприклад, від Abgenix, Inc., Fremont, CA, і Medarex, Inc., Annandale, N.J.). Способи одержання людських антитіл від трансгенної миші описані в науковій літературі, наприклад Green L.L. et al., Nature Genet, 7:13, 1994; Lonberg N. et al., Nature, 368:856, 1994; і Taylor L.D. et al., Int. Immun. 6:579, 1994.

Моноклональні антитіла можуть бути виділені і очищені від гібридомної культури різними добре відомих методами. Такі методи виділення включають афінну хроматографію на сефарозі з білком А, ексклюзійну хроматографію і іонообмінну хроматографію (див., наприклад, Coligan стор. 2.7.1-2.7.12 і стор. 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", в Methods in Molecular Biology, The Humana Press, Inc., Vol. 10, стор. 79-104, 1992).

Після одержання поліклональні, моноклональні антитіла або антитіла, вироблені фагами, спочатку тестують на специфічне зв'язування з MASP-2. Для визначення антитіл, що специфічно зв'язуються з MASP-2, можна використовувати множину різних способів, відомих фахівцю в даній галузі техніки. Ілюстративні приклади аналізу, що проводяться стандартними способами, включають вестерн-блот або аналіз імунопреципітації (наприклад, як описано в Ausubel et al.), імуноелектрофорез, імуноферментний аналіз (ІФА), дот-блотинг, аналіз пригнічення або конкурентний аналіз (як описано в Harlow і Land, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Після визначення антитіл, здатних специфічно зв'язуватися з MASP-2, анти-MASP-2 антитіла тестують на можливість функціонувати як інгібуючий MASP-2 агент одним з декількох методів оцінки, таким як, наприклад, аналіз лектин-специфічного розщеплення С4 (описаний у прикладі 2), аналіз відкладення С3b (описаний у прикладі 2) або аналіз відкладення С4b (описаний у прикладі 2).

Спорідненість зв'язування анти-MASP-2 моноклональних антитіл може бути легко визначена фахівцем у даній галузі техніки (див., наприклад, Scatchard A., NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949). В одному з варіантів здійснення моноклональні анти-MASP-2 антитіла, використовувані в способах за даним винаходом, зв'язуються з MASP-2 зі спорідненістю зв'язування <100 нмоль, переважно <10 нмоль і більш переважно <2 нмоль.

ХИМЕРНІ/ГУМАНІЗОВАНІ АНТИТІЛА

Моноклональні антитіла, використовувані в способі за даним винаходом, включають химерні антитіла, у яких частина важкого і/або легкого ланцюга є ідентичною або гомологічною відповідним послідовностям в антитілах, які одержані з конкретного виду або належать до конкретного класу або підкласу антитіл, у той час як інша частина ланцюга (ланцюгів) є ідентичною або гомологічною відповідним послідовностям антитіл, які виділені з іншого виду або належать до іншому класу або підкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл (патент США № 4,816,567, Cabilly; і Morrison S.L. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81:6851-6855, 1984).

Одна з форм химерного антитіла, використовуваного в даному винаході, представлена гуманізованим моноклональним анти-MASP-2 антитілом. Гуманізовані форми нелюдських (наприклад, мишачих) антитіл представлені химерними антитілами, які містять мінімальну послідовність, виділену з нелюдського імуноглобуліну. Гуманізовані моноклональні антитіла одержують шляхом перенесення нелюдських (наприклад, мишачих) областей, що визначають комплементарність (CDR), з варіабельних ділянок важких і легких ланцюгів імуноглобуліну миші в людський варіабельний домен. Як правило, залишки людських антитіл потім заміщають у каркасних областях нелюдських прототипів. Більше того, гуманізовані антитіла можуть містити залишки, які не виявляються в антитілах реципієнта або в антитілах донора. Дані модифікації проводяться з метою подальшого поліпшення ефективності антитіл. У загальному випадку, гуманізоване антитіло може містити по суті всі з щонайменше одного й, як правило, двох варіабельні доменів, у яких усі або по суті усі гіперваріабельні петлі відповідають петлям нелюдського імуноглобуліну і всі або по суті всі Fv-каркасні області є областями з послідовності

людського імуноглобуліну. Гуманізоване антитіло може також містити щонайменше частину константної області імуноглобуліну (Fc), як правило людського імуноглобуліну. Докладний опис можна знайти в Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986; Reichmann et al., Nature, 332:323-329, 1988; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596, 1992.

Гуманізовані антитіла, використовувані в даному винаході, включають людські моноклональні антитіла, що включають щонайменше MASP-2-зв'язувальну ділянку CDRH3. Крім того, Fc-ділянки можуть бути замінені таким чином, щоб продукувалися IgA або IgM, а також людські IgG антитіла. Таким чином, гуманізовані антитіла знайдуть, зокрема, клінічне застосування, оскільки вони будуть специфічно розпізнавати людський MASP-2, не викликаючи у людини імунної відповіді проти самого антитіла. Як наслідок, вони краще придатні для введення людині in vivo, особливо, коли потрібне повторне або тривале введення.

Приклад одержання гуманізованого анти-MASP-2 антитіла з мишачого моноклонального анти-MASP-2 антитіла наведений в прикладі 6. Методи одержання гуманізованих моноклональних антитіл також описані, наприклад, в Jones P.T. et al., Nature, 321:522, 1986; Carter P. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 89:4285, 1992; Sandhu J.S., Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992; Singer I.I. et al., J. Immun. 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pages 399-434, 1996; і в патенті США № 5,693,762, Queen, 1997. Крім того, існують комерційні організації, які синтезують гуманізовані антитіла зі специфічних ділянок антитіла, наприклад Protein Design Labs (Mountain View, CA).

РЕКОМБІНАНТНІ АНТИТІЛА

Анти-MASP-2 антитіла також можуть бути одержані за допомогою рекомбінантних методів. Наприклад, людські антитіла можуть бути одержані з використанням експресійної бібліотеки людського імуноглобуліну (доступні, наприклад, в Stratagene, Corp., La Jolla, CA) для одержання фрагментів людських антитіл (VH, VL, Fv, Fd, Fab або $F(ab')_2$). Ці фрагмента потім використовуються для конструювання повноцінних людських антитіл методами, аналогічними методам, використовуваним для одержання химерних антитіл.

АНТИІДІОТИПІЧНІ АНТИТІЛА

Після визначення анти-MASP-2 антитіл з потрібною інгібуючою активністю, ці антитіла можна використовувати для одержання антиідіотипічних антитіл, які схожі з частиною MASP-2, методами, добре відомими в даній галузі. Див., наприклад, Greenspan M.S. et al., FASEB J. 7:437, 1993. Наприклад, антитіла, які зв'язуються з MASP-2 і конкурентно пригнічують MASP-2-білкові взаємодії, необхідні для активації комплементу, можуть бути використані для одержання антиідіотипічних антитіл, які мають подібність з MBL-зв'язувальною ділянкою білка MASP-2 і, отже, зв'язуються і нейтралізують зв'язування лігандів MASP-2, таких як, наприклад, MBL.

ФРАГМЕНТИ ІМУНОГЛОБУЛІНУ

Інгібуючі MASP-2 агенти, використовувані в способі за винаходом, охоплюють не тільки інтактні молекули імуноглобулінів, але і добре відомі фрагменти, включаючи Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ і Fv-фрагменти, scFv-фрагменти, димери, лінійні антитіла, одноланцюжкові молекули антитіл і мультиспецифічні антитіла, сформовані із фрагментів антитіл.

Добре відомо, що тільки невелика частина молекули антитіла, паратоп, бере участь у зв'язуванні антитіла з його епітопом (див., наприклад, Clark W.R., The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Ділянки pFc' і Fc антитіла є ефекторами класичного шляху активації комплементу, але не беруть участь у зв'язування антигенів. Антитіло, від якого ферментативно відщеплена ділянка pFc' або яке було продуковане без ділянки pFc', позначене $F(ab')_2$-фрагментом і містить обидві антигензв'язувальні ділянки інтактного антитіла. Виділений фрагмент $F(ab')_2$ належить до бівалентного моноклонального фрагмента через наявність двох антигензв'язувальних ділянок. Аналогічно, антитіло, від якого ферментативно відщеплена ділянка Fc або яке було продуковане без ділянки Fc, позначене Fab-фрагментом і містить одну з антигензв'язувальних ділянок молекули інтактного антитіла.

Фрагменти антитіл можуть бути одержані шляхом протеолітичного гідролізу, такого як пепсиновий або папаїновий гідроліз цільних антитіл, стандартними способами. Наприклад, фрагменти антитіла можуть бути одержані ферментним розщепленням антитіл пепсином з одержанням фрагмента 5S, позначеного $F(ab')_2$. Цей фрагмент може бути далі розщеплений за допомогою агента, що відновлює тіол, з одержанням 3,5S Fab' моновалентних фрагментів. Необов'язково, реакцію розщеплення можна здійснювати з використанням групи, блокуючої сульфгідрильні групи, одержані в результаті розщеплення дисульфідних зв'язків. Як альтернатива, ферментне розщеплення за допомогою пепсину дає два моновалентних фрагменти Fab і фрагмент Fc. Ці способи описані, наприклад, у патенті США № 4,331,647,

Goldenberg; Nisonoff A. et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., в Methods in Enzymology 1:422, Academic Press, 1967; і в Coligan, стор. 2.8.1-2.8.10 і 2.10.-2.10.4.

У деяких варіантах здійснення використання фрагментів антитіл з відсутньою Fc-ділянкою є переважним, оскільки дозволяє уникнути активації класичного шляху комплементу, яка ініціюється шляхом зв'язування Fc з рецептором Fcγ. Існує декілька способів продукування MoAb, яке не впливає на взаємодії рецептора Fcγ. Наприклад, Fc-ділянка моноклонального антитіла може бути видалена хімічним способом шляхом часткового розщеплення за участі протеолітичних ферментів (наприклад, розщеплення фіцином), з одержанням, наприклад, антигензв'язувальних фрагментів антитіл, таких як фрагменти Fab або $F(ab)_2$ (Mariani M. et al., Mol. Immunol. 28:69-71, 1991). Альтернативно, ізотип γ4 людського IgG, який не зв'язується з рецепторами Fcγ, може бути використаний для створення гуманізованого антитіла, як описано в даній заявці. Антитіла, одноланцюжкові антитіла і антигензв'язувальні домени, у яких відсутній Fc-домен, також можуть бути створені рекомбінантними методами, описаними в даній заявці.

ФРАГМЕНТИ ОДНОЛАНЦЮЖКОВИХ АНТИТІЛ

Альтернативно, можна створити MASP-2-специфічні молекули, що зв'язують один поліпептидний ланцюг, у яких Fv-ділянки важкого і легкого ланцюгів зв'язані між собою. Fv-фрагменти можуть бути зв'язані за допомогою пептидного лінкера з утворенням одноланцюжкового антигензв'язувального білка (scFv). Такі одноланцюжкові антигензв'язувальні білки одержують шляхом створення структурного гена, що містить послідовності ДНК, кодуючі домени VH і VL, зв'язані з олігонуклеотидом. Структурний ген вбудовують у вектор експресії, який потім вводять у клітину-хазяїна, таку як, E. coli. Рекомбінантні клітини-хазяїни синтезують одиничний поліпептидний ланцюг з пептидним лінкером, що зв'язує два V-домени. Способи одержання scFv описані, наприклад, в Whitlow et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology", 2:97, 1991; Bird et al., Science, 242:423, 1988; патент США № 4,946,778, Ladner; Pack P. et al., Bio/Technology, 11:1271, 1993.

Як ілюстративний приклад, MASP-2-специфічний scFv можна одержувати, піддаючи лімфоцити впливу поліпептиду MASP-2 in vitro і селекції бібліотек антитіл методом фагового дисплея у фагах або аналогічних векторах (наприклад, шляхом використання іммобілізованих або мічених білків або пептидів MASP-2). Гени, кодуючі поліпептиди, що містять потенційні домени, які зв'язують поліпептиди MASP-2, можуть бути одержані шляхом скринінгу будь-яких пептидних бібліотек, відображених на фагу або бактеріях, таких як E. coli. Ці випадкові пептидні фагові бібліотеки можуть бути використані для скринінгу пептидів, які взаємодіють з MASP-2. Методи створення і скринінгу таких випадкових пептидних дисплейних бібліотек добре відомі (див. патент США № 5,223,409, Lardner; патент США № 4,946,778, Ladner; патент США № 5,403,484, Lardner; патент США № 5,571,698, Lardner; і Kay et al., Phage Display ofpeptides and Proteins Academic Press, Inc., 1996), а випадкові пептидні дисплейні бібліотеки і набори для скринінгу таких бібліотек є комерційно доступними, наприклад від CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Ipswich, Mass.) і Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

Іншою формою фрагмента анти-MASP-2 антитіла, використовуваного в цьому аспекті даного винаходу, є пептид, кодуючий одну область, що визначає комплементарність (CDR), яка зв'язується з епітопом на антигені MASP-2 і пригнічує MASP-2-залежну активацію комплементу. CDR пептиди ("мінімальні одиниці розпізнавання") можуть бути одержані шляхом конструювання генів, кодуючих CDR антитіла, що представляє інтерес. Такі гени одержують, наприклад, методом полімеразної ланцюгової реакції для синтезу варіабельної ділянки із РНК клітини, продукуючої антитіла (див., наприклад, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies", в Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press, 1995; і Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies", в Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

Анти-MASP-2 антитіла, описані в даній заявці, вводять суб'єкту, що цього потребує, для пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу. У деяких варіантах здійснення інгібуючий MASP-2 агент являє собою людське або гуманізоване моноклональне анти-MASP-2 антитіло зі зниженою ефекторною функцією.

ПЕПТИДНІ ІНГІБІТОРИ

У деяких варіантах здійснення цього аспекту даного винаходу інгібуючий MASP-2 агент містить виділені пептидні інгібітори MASP-2, у тому числі виділені природні пептидні інгібітори і синтетичні пептидні інгібітори, які пригнічують систему MASP-2-залежної активації комплементу.

Як зазначено в даному описі, термін "виділені пептидні інгібітори MASP-2" стосується пептидів, які інгібують MASP-2-залежну активацію комплементу шляхом зв'язування з MASP-2, конкуренції з MASP-2 за зв'язування з іншою молекулою розпізнавання (наприклад, MBL, H-фіколіном, M-фіколіном або L-фіколіном) у лектиновому шляху активації і/або шляхом прямої взаємодії з MASP-2, таким чином пригнічуючи MASP-2-залежну активацію комплементу, при цьому ці інгібітори є по суті чистими і практично не містять інші речовини, з якими вони можуть знаходитися в природних умовах, настільки, що є придатними для застосування за цільовим призначенням.

Пептидні інгібітори успішно використовуються in vivo з метою пригнічення білок-білкових взаємодій і каталітичної ділянки. Наприклад, пептидні інгібітори молекул адгезії, структурно споріднені LFA-1, нещодавно були схвалені для клінічного застосування при коагулопатії (Ohman E.M. et al., European Heart J. 16:50-55, 1995). Було показано, що короткі лінійні пептиди (<30 амінокислот) мають здатність попереджати або перешкоджати інтегринзалежній адгезії (Murayama O. et al., J. Biochem. 120:445-51, 1996). Більш довгі пептиди, від 25 до 200 амінокислотних залишків, також успішно використовувалися для блокування інтегринзалежної адгезії (Zhang L. et al., J. Biol. Chem. 271(47):29953-57, 1996). Як правило, більш довгі пептидні інгібітори мають більш високу спорідненість і/або більш низькі швидкості дисоціації, ніж короткі пептиди, й, отже, можуть бути більш ефективними інгібіторами. Також було показано, що циклічні пептидні інгібітори є ефективними інгібіторами інтегринів in vivo при лікуванні запальних захворювань людини (Jackson D.Y. et al., J. Med. Chem. 40:3359-68, 1997). Один зі способів одержання циклічних пептидів включає синтез пептидів, у якому термінальні амінокислоти пептиду є цистеїнами, що дозволяє пептиду існувати в циклічній формі за рахунок утворення дисульфідних зв'язків між термінальними амінокислотами, що, як було показано, поліпшує спорідненість зв'язування і період напіввиведення in vivo при лікуванні гемопоетичних неоплазій (наприклад, патент США № 6,649,592, Larson).

СИНТЕТИЧНІ ПЕПТИДНІ ІНГІБІТОРИ MASP-2

Пептиди, інгібуючі MASP-2, використовувані в способах цього аспекту даного винаходу, являють собою амінокислотні послідовності, які імітують ділянки-мішені, важливі для функції MASP-2. Розміри інгібуючих пептидів, використовуваних на практиці в способах за даним винаходом, знаходяться у межах від приблизно 5 амінокислот до приблизно 300 амінокислот. У таблиці 3 представлений список наведених як приклад інгібуючих пептидів, які можуть бути використані при практичному застосуванні цього аспекту даного винаходу. Інгібуючий MASP-2 пептид-кандидат може бути протестований на здатність функціонувати як інгібуючий MASP-2 агент в одному або більше аналізах, включаючи, наприклад, аналіз лектин-специфічного розщеплення C4 (описаний в прикладі 2) і аналіз відкладення C3b (описаний в прикладі 2).

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 пептиди одержують із поліпептидів MASP-2 і вибирають із повнорозмірного зрілого білка MASP-2 (SEQ ID NO:6) або з конкретного домену білка MASP-2, такого як, наприклад, домен CUBI (SEQ ID NO:8), домен CUBIEGF (SEQ ID NO:9), домен EGF (SEQ ID NO:11) і домен серинової протеази (SEQ ID NO:12). Як описувалося раніше, було показано, що ділянки CUBEGFCUBII необхідні для димеризації і зв'язування з MBL (Thielens et al., supra). Зокрема, у дослідженні з ідентифікації людини, що несе гомозиготну заміну Asp105 на Gly105, яка приводить до втрати MASP-2 з комплексу MBL, було показано, що пептидна послідовність TFRSDYN (SEQ ID NO:16) у домені CUBI MASP-2 бере участь у зв'язуванні з MBL (Stengaard-Pedersen K. et al., New England J. Med. 349:554-560, 2003).

У деяких варіантах здійснення пептиди, інгібуючі MASP-2, одержували з лектинових пептидів, які зв'язуються з MASP-2 і беруть участь у лектиновому шляху активації комплементу. Були визначені декілька різних лектинів, які беруть участь у цьому шляху, включаючи мананзв'язувальний лектин ((MBL), L-фіколін, M-фіколін і H-фіколін (Ikeda K. et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita M. et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita M. et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). Ці лектини присутні в сироватці у вигляді олігомерів або гомотримерних субодиниць, кожна з яких має N-термінальні колагеноподібні волокна, з доменами упізнавання вуглеводнів. Було показано, що ці різні лектини зв'язуються з MASP-2, і комплекс лектин/MASP-2 активує комплемент через розщеплення білків C4 і C2. H-фіколін має амінокислотну термінальну ділянку з 24 амінокислот, колагеноподібний домен з 11 повторами Gly-Xaa-Yaa, шийковий домен з 12 амінокислот і фібриногеноподібний домен з 207 амінокислот (Matsushita M. et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). H-фіколін зв'язується з GlcNAc і аглютинує людські еритроцити, покриті ЛПС, одержані з S. typhimurium, S. minnesota і E. coli. Було показано, що H-фіколін зв'язується з MASP-2 і MAp 19 і активує лектиновий шлях комплементу. Id. L-фіколін/P35 також зв'язується з GlcNAc і, як було показано, утворює зв'язки з MASP-2 і MAp19 у людській сироватці, і цей комплекс активує лектиновий шлях комплементу

(Matsushita M. et al., J. Immunol. 164:2281, 2000). Відповідно, інгібуючі MASP-2 пептиди, використовувані в даному винаході, можуть містити ділянку, що складається з щонайменше 5 амінокислот, вибраних з білка MBL (SEQ ID NO:21), білка H-фіколін (номер доступу в Genbank NM_173452), білка M-фіколін (номер доступу в Genbank 000602) і білка L-фіколін (номер доступу Genbank NM_015838).

Більш конкретно, учені ідентифікували зв'язуючу MASP-2 ділянку в MBL, що складається з 12 триплетів Gly-X-Y "GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS" (SEQ ID NO:26), які розташовані між шарнірною і шийковою ділянками в C-термінальній частині колагеноподібного домену MBP (Wallis R. et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004). Ця зв'язуюча MASP-2 ділянка є також дуже консервативною у людського H-фіколіну і людського L-фіколіну. Описана консенсусна ділянка зв'язування, яка представлена у всіх трьох лектинових білках, що містить амінокислотну послідовність "OGK-X-GP" (SEQ ID NO:22), де буква "O" означає гідроксипролін, а буква "X" являє собою гідрофобний залишок (Wallis et al., 2004, supra). Відповідно, у деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 пептиди, використовувані в цьому аспекті даного винаходу, мають у довжину щонайменше 6 амінокислот і містять SEQ ID NO:22. Було показано, що пептиди, одержані з MBL, які включають амінокислотну послідовність "GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SEQ ID NO:24), зв'язуються з MASP-2 in vitro (Wallis, et al., 2004, supra). Для посилення зв'язування з MASP-2 можуть бути синтезовані пептиди, фланковані двома триплетами GPO на кожному кінці ("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O", SEQ ID NO:25) для підвищення ймовірності утворення потрійних спіралей, виявлених у нативного білка MBL (як описано в Wallis R. et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004).

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

Інгібуючі MASP-2 пептиди також можуть бути одержані із сайта розщеплення C4, такого як "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEQ ID NO:29), який є сайтом розщеплення C4, зв'язаним з C-термінальною частиною антитромбіну III (Glover G.I. et al., Mol. Immunol. 25:1261 (1988)).

ТАБЛИЦЯ 3

НАВЕДЕНІ ЯК ПРИКЛАД ІНГІБУЮЧІ MASP-2 ПЕПТИДИ

SEQ ID NO	Джерело
SEQ ID NO:6	Людський білок MASP-2
SEQ ID NO:8	Домен CUBI MASP-2 (aa 1-121 в SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	Домен CUBIEGF MASP-2 (aa 1-166 в SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:10	Домени CUBIEGFCUBII MASP-2 (aa 1-293 в SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:11	Домен EGF MASP-2 (aa 122-166)
SEQ ID NO:12	Домен серинової протеази MASP-2 (aa 429-671)
SEQ ID NO:16	MBL-зв'язувальна ділянка в MASP-2
SEQ ID NO:3	Людський MAp19
SEQ ID NO:21	Людський білок MBL
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, де "O" є гідроксипроліном, і "X" є гідрофобним аміноксилотним залишком	Синтетичний пептид, консенсусна ділянка зв'язування з людського MBL і людських фіколінів
SEQ ID NO:23 OGKLG	Основна частина сайта зв'язування людського MBL
SEQ ID NO:24 GLR-GLQ-GPO-GKL-GPO-G	Людські MBP триплети 6-10, демонструючі зв'язування з MASP-2
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPOGGP OGPO	Людські MBP триплети з GPO, додані для посилення утворення потрійних спіралей
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQG	Людські MBP триплети 1-17

ТАБЛИЦЯ 3

НАВЕДЕНІ ЯК ПРИКЛАД ІНГІБУЮЧІ MASP-2 ПЕПТИДИ

POGKLGPOGNOGPSGSOGPKGQKG DOGKS	
SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQGPOGPOG KMGPKGEOGDO	Людський H-фіколін (Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRG ERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO	Людський L-фіколін P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI	Людський сайт розщеплення C4
SEQ ID NO:72 LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDG KSAVCTKLWCNQ	SGMI-2L (повнорозмірний)
SEQ ID NO:73 TCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSA VCTKLWCNQ	SGMI-2M (укорочений варіант, середня довжина)
SEQ ID NO:74 TCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ	SGMI-2S (укорочений варіант, короткий)

Примітка: буква "O" означає гідроксипролін, буква "X" означає гідрофобний залишок.

Пептиди, одержані з сайта розщеплення C4, а також інші пептиди, інгібуючі ділянку серинової протеази MASP-2, можуть бути хімічно модифіковані таким чином, щоб вони стали необоротно діючими інгібіторами протеази. Наприклад, придатні модифікації можуть включати, без обмеження, галогенметилкетони (Br, Cl, I, F) на C-термінальному кінці, Asp або Glu, або можуть бути приєднані до функціональних бічних ланцюгів; галогенацетилові (або інші α-галогенацетилові) групи на аміногрупах або інших функціональних бічних ланцюгах; епоксид- або імінвмісні групи на аміно- або карбокситермінальних кінцях або функціональних бічних ланцюгах; або складні ефіри, імідати на аміно- або карбокситермінальних кінцях або функціональних бічних ланцюгах. Такі модифікації можуть забезпечувати перевагу при необоротному пригніченні ферменту за рахунок ковалентного приєднання пептиду. Це може привести до зменшення ефективної дози і/або зниження частоти введення пептидного інгібітору.

Додатково до описаних вище інгібуючих пептидів, інгібуючі MASP-2 пептиди, використовувані в способі за даним винаходом, включають пептиди, що містять MASP-2-зв'язувальну ділянку CDR3 в анти-MASP-2 MoAb, одержаному описаним у даній заявці способом. Послідовність ділянок CDR для застосування в синтезі пептидів може бути визначена відомими в даній галузі способами. Варіабельна ділянка важкого ланцюга являє собою пептид, довжина якого звичайно знаходиться в межах від 100 до 150 амінокислот. Варіабельна ділянка легкого ланцюга являє собою пептид, довжина якого звичайно знаходиться в межах від 80 до 130 амінокислот. Послідовності CDR усередині варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів включають послідовності, що складаються тільки з приблизно 3-25 амінокислот, які можуть бути легко секвеновані фахівцем у даній галузі техніки.

Фахівцям у даній галузі техніки відомо, що по суті гомологічні варіанти описаних вище інгібуючих MASP-2 пептидів також будуть проявляти MASP-2-інгібуючу активність. Ілюстративні варіанти включають, без обмеження, пептиди, що містять вставки, делеції, заміни і/або додаткові амінокислоти на карбокситермінальних або амінотермінальних ділянках заявлених пептидів, і їх суміші. Відповідно, такі гомологічні пептиди, що мають MASP-2-інгібуючу активність, також передбачаються для використання в способах за даним винаходом. Описані пептиди також можуть включати повторювані мотиви і інші модифікації з консервативними замінами. Консервативні варіанти описані в даній заявці і включають заміну однієї амінокислоти іншою амінокислотою з аналогічним зарядом, аналогічного розміру, з аналогічною гідрофобністю і т. д.

Інгібуючі MASP-2 пептиди можуть бути модифіковані для збільшення розчинності і/або одержання максимального позитивного або негативного заряду для посилення подібності з сегментом в інтактному білку. Похідне може мати або не мати точну первинну амінокислотну

структуру пептиду, розкритого в даній заявці, за умови, що це похідне залишається функціонально активним відносно інгібування MASP-2. Модифікації можуть включати заміну амінокислоти однією з добре відомих двадцяти амінокислот або будь-якою іншою амінокислотою, дериватизованою або заміщеною амінокислотою з додатковими необхідними характеристиками, такими як стійкість до ферментного розщеплення, або D-амінокислотою, або заміну іншою молекулою або сполукою, такою як вуглевод, що імітує природну конформацію і функцію амінокислоти, амінокислот або пептиду; делецію амінокислоти; вставку однієї із двадцяти добре відомих амінокислот або будь-якої іншої амінокислоти, дериватизованої або заміщеної амінокислоти з додатковими необхідними характеристиками, такими як стійкість до ферментного розщеплення, або D-амінокислоти, або заміну іншою молекулою або сполукою, такою як вуглевод, що імітує природну конформацію і функцію амінокислоти, амінокислот або пептиду; або заміну іншою молекулою або сполукою, такою як вуглевод або мономер нуклеїнової кислоти, що імітує природну конформацію, розподіл зарядів і функцію батьківського пептиду. Пептиди також можуть бути модифіковані шляхом ацетилювання або амідування.

Синтез похідних інгібуючих пептидів може бути оснований на відомих методах біосинтезу пептидів, біосинтезу вуглеводів і т. п. Як відправну точку, фахівець може використовувати придатну комп'ютерну програму для визначення конформації пептиду, що представляє інтерес. Після визначення конформації розкритого в даному описі пептиду, фахівець, використовуючи методи моделювання, може визначити тип замін, який необхідний на тій або іншій ділянці для одержання похідного, у якого збережена базова конформація і розподіл заряду, характерні для батьківського пептиду, але яке може мати характеристики, відсутні у батьківського пептиду або поліпшені в порівнянні з характеристиками батьківського пептиду. Після ідентифікації похідних молекул-кандидатів, ці похідні можуть бути протестовані за допомогою описаних у даному винаході аналізів для визначення їх здатності функціонувати як інгібуючі MASP-2 агенти.

СКРИНІНГ ІНГІБУЮЧИХ MASP-2 ПЕПТИДІВ

Для одержання і скринінгу пептидів, які імітують молекулярну структуру ключових ділянок зв'язування MASP-2 і пригнічують MASP-2-залежну активацію комплементу, можна використовувати методи молекулярного моделювання і раціонального молекулярного проектування. Молекулярні структури, використовувані для моделювання, включають ділянки CDR анти-MASP-2 моноклональних антитіл, а також цільові області, відомі своєю важливістю для функціонування MASP-2, включаючи ділянку, необхідну для димеризації, ділянку, залучену у зв'язування MBL, і активну ділянку серинової протеази, як описано вище. Способи ідентифікації пептидів, які зв'язуються з конкретною мішенню, добре відомі в даній галузі. Наприклад, для de novo конструювання макромолекулярних структур, таких як пептиди, що зв'язуються з конкретною молекулою, можна використовувати молекулярний імпринтинг. Див., наприклад, Shea K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites", TRIP, 2:(5), 1994.

Як ілюстрація нижче наведений приклад одного зі способів одержання міметиків MASP-2-зв'язуючих пептидів. Функціональні мономери відомого MASP-2-зв'язуючого пептиду або зв'язувальної ділянки анти-MASP-2 антитіла, які пригнічують активність MASP-2 (матриця) піддають полімеризації. Потім матрицю видаляють, після чого іде полімеризація другого класу мономерів у тому місці, звідки була видалена матриця, для створення нової молекули, що демонструє одну і більше необхідних властивостей, аналогічних властивостям матриці. Крім одержання пептидів, таким способом можуть бути одержані інші MASP-2-зв'язуючі молекули, які є інгібуючими MASP-2 агентами, такі як полісахариди, нуклеозиди, лікарські речовини, нуклеопротеїни, ліпопротеїни, вуглеводи, глікопротеїни, стероїди, ліпіди і інші біологічно активні речовини. Даний спосіб можна використовувати для створення великого різноманіття біологічних міметиків, які є більш стабільними, ніж їх природні прототипи, оскільки вони одержані методом вільнорадикальної полімеризації функціональних мономерів, утворюючи в результаті сполуку з каркасом, не схильним до біохімічного розкладання.

СИНТЕЗ ПЕПТИДІВ

Інгібуючі MASP-2 пептиди можуть бути одержані методами, добре відомими в даній галузі, такими як метод твердофазного синтезу, вперше описаний Merrifield, в J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963. За допомогою апарата 431A Peptide Synthesizer від Applied Biosystems (Foster City, Calif.) можна виконувати автоматизований синтез відповідно до інструкцій виробника. Інші методи описані, наприклад, в Bodanszky M. et al., Peptide Synthesis, second edition, John Wiley & Sons, 1976, а також в інших роботах, відомих фахівцям у даній галузі техніки.

Пептиди також можуть бути одержані стандартними методами генної інженерії, відомими фахівцям у даній галузі техніки. Наприклад, пептид може бути одержаний у результаті

ферментативного синтезу шляхом введення нуклеїнової кислоти, кодуючої пептид, у вектор експресії, що здійснює експресію ДНК і трансляцію цієї ДНК у пептид у присутності необхідних амінокислот. Потім пептид очищають за допомогою хроматографії або електрофорезу, або білка-носія, який може бути злитий, а надалі відщеплений від пептиду, шляхом вбудовування у вектор експресії послідовності нуклеїнової кислоти, кодуючої білок-носій, разом з кодуючою пептид послідовністю. Злитий білок-пептид може бути виділений за допомогою методів хроматографії, електрофорезу або імунологічних методів (наприклад, зв'язування білка-носія зі смолою за допомогою антитіла). Пептид може бути відщеплений хімічним методом або ферментативно, наприклад за допомогою гідролази.

Інгібуючі MASP-2 пептиди, використовувані в способі за винаходом, також можуть бути одержані в рекомбінантних клітинах-хазяїнах за допомогою звичайних методів. Для експресії послідовності, кодуючої інгібуючі MASP-2 пептиди, молекула нуклеїнової кислоти, кодуюча пептид, повинна бути функціонально зв'язана з регуляторними послідовностями, що контролюють транскрипційну експресію у векторі експресії, а потім впроваджена в клітину-хазяїна. Додатково до транскрипційних регулюючих послідовностей, таких як промотори і енхансери, вектори експресії можуть включати трансляційні регуляторні послідовності і маркерний ген, які є придатними для відбору клітин, що несуть вектор експресії.

Молекули нуклеїнових кислот, кодуючі інгібуючий MASP-2 пептид, можуть бути синтезовані за допомогою "генних машин" по протоколах, таких як фосфорамідний метод. Якщо для додатка, такого як синтез гена або фрагмент гена, необхідний хімічний синтез двониткової ДНК, то кожну комплементарну нитку синтезують окремо. Одержання коротких генів (від 60 до 80 пар основ) не викличе складностей і може бути виконане шляхом синтезування комплементарних ниток з наступним відпалом. Для одержання більш довгих генів синтетичні гени (двониткові) збирають у модульну форму з одноланцюжкових фрагментів довжиною від 20 до 100 нуклеотидів. Огляд синтезу полінуклеотидів можна знайти, наприклад, в Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, 1994; Itakura K. et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; і Climie S. et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 87:633, 1990.

НИЗЬКОМОЛЕКУЛЯРНІ ІНГІБІТОРИ

У деяких варіантах здійснення інгібуючі MASP-2 агенти являють собою низькомолекулярні інгібітори, включаючи природні і синтетичні речовини, що мають низьку молекулярну масу, такі як пептиди, пептидоміметики і непептидні інгібітори (включаючи олігонуклеотиди і органічні речовини). Низькомолекулярні інгібітори MASP-2 можуть бути одержані на основі молекулярної структури варіабельних ділянок анти-MASP-2 антитіл.

Низькомолекулярні інгібітори також можуть бути сконструйовані і створені на основі кристалічної структури MASP-2 за допомогою програм для комп'ютерного моделювання лікарських речовин (Kuntz I.D. et al., Science, 257:1078, 1992). Описана кристалічна структура щурячого MASP-2 (Feinberg H. et al., EMBO J. 22:2348-2359, 2003). Використовуючи метод, описаний Kuntz et al., координати кристалічної структури MASP-2 вводять у комп'ютерну програму, таку як DOCK, яка на виході видає список низькомолекулярних структур, які, як передбачається, зв'язуються з MASP-2. Використання таких комп'ютерних програм добре відоме фахівцю в даній галузі техніки. Наприклад, кристалічна структура інгібітору протеази HIV-1 була використана для ідентифікації унікальних непептидних лігандів, які є інгібіторами протеази HIV-1, шляхом оцінки сумісності речовин з бази даних Cambridge Crystallographic зі зв'язувальним сайтом ферменту за допомогою програми DOCK (Kuntz L.D. et al., J. Mol. Biol. W:269-288, 1982; Desjarlais R.L. et al., PNAS, 87:6644-6648, 1990).

Список низькомолекулярних структур, ідентифікованих за допомогою комп'ютерних програм як потенційні інгібітори MASP-2, піддають скринінгу в аналізі зв'язування MASP-2, такому, як описано в прикладі 10. Ті малі молекули, які, як було визначено, зв'язуються з MASP-2, потім оцінюють у функціональному аналізі, такому, як описано в прикладі 2, для визначення їх здатності пригнічувати MASP-2-залежну активацію комплементу.

РОЗЧИННІ РЕЦЕПТОРИ MASP-2

Вважається, що інші придатні інгібуючі MASP-2 агенти включають розчинні рецептори MASP-2, які можуть бути одержані методами, добре відомими фахівцю в даній галузі техніки.

ІНГІБІТОРИ ЕКСПРЕСІЇ MASP-2

В іншому варіанті здійснення цього аспекту винаходу, інгібуючий MASP-2 агент являє собою інгібітор експресії MASP-2, здатний пригнічувати MASP-2-залежну активацію комплементу. При практичному застосуванні цього аспекту здійснення даного аспекту винаходу характерні інгібітори експресії MASP-2 включають молекули антисмислової нуклеїнової кислоти MASP-2 (такі як антисмислова мРНК, антисмислова ДНК або антисмислові олігонуклеотиди), рибозими

MASP-2 і молекули РНКі MASP-2.

Антисмислові молекули РНК і ДНК прямо блокують трансляцію мРНК MASP-2 шляхом гібридизації з мРНК MASP-2, запобігаючи трансляції білка MASP-2. Молекула антисмислової нуклеїнової кислоти може бути сконструйована різними способами, і вона здатна перешкоджати експресії MASP-2. Наприклад, молекула антисмислової нуклеїнової кислоти може бути сконструйована шляхом інвертування кодуючої ділянки (або її частини) кДНК MASP-2 (SEQ ID NO:4) відносно її нормальної орієнтації при транскрипції, що забезпечує транскрипцію її комплементу.

Звичайно молекула антисмислової нуклеїнової кислоти є ідентичною щонайменше частині цільового гена або генів. Однак для пригнічення експресії цільового гена нуклеїнова кислота не обов'язково повинна бути абсолютно ідентичною його нуклеотидній послідовності. Як правило, чим коротше послідовність антисмислової нуклеїнової кислоти, тим більш високу гомологію вона повинна мати. Мінімальний відсоток ідентичності звичайно становить не менше приблизно 65 %, але більш високий відсоток дозволяє досягати більш ефективного пригнічення експресії ендогенної послідовності. Відсоток ідентичності, що суттєво перевищує приблизно 80 %, звичайно є переважним, хоча значення в інтервалі від приблизно 95 % до повної ідентичності є найбільш переважними.

Молекула антисмислової нуклеїнової кислоти не обов'язково повинна мати інтрон або екзон такої ж структури, як у цільового гена; некодуючі сегменти цільового гена можуть бути так само ефективні в досягненні антисмислового пригнічення експресії цільового гена, як і кодуючі сегменти. Як молекула антисмислової нуклеїнової кислоти може бути використана послідовність ДНК з 8 або більше нуклеотидів, хоча переважною є більш довга послідовність. У даному винаході типовим прикладом інгібуючого MASP-2 агента є молекула антисмислової нуклеїнової кислоти MASP-2, яка щонайменше на 90 % ідентична комплементарній кДНК MASP-2, що складається з послідовності нуклеїнової кислоти, представленої в SEQ ID NO:4. Послідовність нуклеїнової кислоти, представлена в SEQ ID NO:4, кодує білок MASP-2, що складається з амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:5.

Націлювання антисмислових олігонуклеотидів на зв'язування з мРНК MASP-2 являє собою інший механізм, який може бути використаний для зниження рівня синтезу білка MASP-2. Наприклад, синтез полігалактуронази і ацетилхолінового мускаринового рецептора типу 2 пригнічується антисмисловими олігонуклеотидами, спрямованими на відповідні послідовності мРНК (патент США № 5,739,119, Cheng, і патент США № 5,759,829, Shewmaker). Крім того, приклад антисмислового пригнічення був продемонстрований для ядерного білка цикліну, гена множинної лікарської стійкості (MDG1), ICAM-1, E-селектину, STK-1, стріарного рецептора ГАМК$_A$ і людського EGF (див., наприклад, патент США № 5,801,154, Baracchini; патент США № 5,789,573, Baker; патент США № 5,718,709, Considine; і патент США № 5,610,288, Reubenstein).

Була описана система, яка дозволяє фахівцю в даній галузі техніки визначати, які олігонуклеотиди можуть бути використані для цілей даного винаходу, яка включає зондування придатних сайтів у цільовій мРНК шляхом розщеплення РНКазою Н як індикатор доступності послідовностей у транскриптах. Scherr M. et al., Nucleic Acids Res. 26:5079-5085, 1998; Lloyd et al., Nucleic Acids Res. 29:3665-3673, 2001. Суміш антисмислових олігонуклеотидів, що є комплементарними відносно певних ділянок транскрипту MASP-2, додають у клітинні екстракти, експресуючі MASP-2, такі як гепатоцити, і здійснюють гібридизацію для створення сайтів, чутливих до дії РНКази Н. Цей спосіб може бути об'єднаний з вибором послідовностей за допомогою комп'ютерної програми, яка може передбачити вибір оптимальних послідовностей для антисмислових композицій на основі їх відносної здатності формувати димери, шпильки або інші вторинні структури, які могли б знизити або запобігти специфічному зв'язуванню з цільовою мРНК у клітині-хазяїні. Аналіз цих вторинних структур і вибір цільових сайтів можуть бути виконані за допомогою комп'ютерної програми OLIGO для аналізу праймерів (Rychlik I., 1997) і комп'ютерної програми BLASTN 2.0.5 (Altschul S.F. et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1997). Антисмислові сполуки, спрямовані на цільову послідовність, переважно містять від приблизно 8 до приблизно 50 нуклеотидів. Антисмислові олігонуклеотиди, що містять від приблизно 9 до приблизно 35 нуклеотидів, є особливо переважними. Автори винаходу розглядають усі олігонуклеотидні композиції в межах від 9 до 35 нуклеотидів (тобто, що мають у довжину 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 або 35 нуклеотидів) як найбільш переважні для способів за винаходом, основаних на застосуванні антисмислових олігонуклеотидів. Найбільш переважними цільовими ділянками мРНК MASP-2 є ті, які розташовані в безпосередній близькості від кодону ініціації трансляції AUG, і послідовності, які по суті комплементарні 5'-ділянкам мРНК, наприклад між -10 і +10 ділянками нуклеотидної послідовності гена MASP-2 (SEQ ID NO:4). Приклади інгібіторів експресії MASP-2

представлені в ТАБЛИЦІ 4.

ТАБЛИЦЯ 4

ПРИКЛАДИ ІНГІБІТОРІВ ЕКСПРЕСІЇ MASP-2

SEQ ID NO:30 (нуклеотиди 22-680 в SEQ ID NO:4)	Послідовність нуклеїнової кислоти кДНК MASP-2 (SEQ ID NO:4), кодуюча CUBIEGF
SEQ ID NO:31 5'-CGGGCACACCATGAGGCTGCTGA CCCTCCTGGGC-3'	Нуклеотиди 12-45 послідовності SEQ ID NO:4, включаючи сайт ініціації трансляції MASP-2 (смисловий)
SEQ ID NO:32 5'-GACATTACCTTCCGCTCCGACTC CAACGAGAAG-3'	Нуклеотиди 361-396 послідовності SEQ ID NO:4, кодуючої ділянку, що містить MBL-зв'язувальний сайт MASP-2 (смисловий)
SEQ ID NO:33 5'-AGCAGCCCTGAATACCCACGGCC GTATCCCAAA-3'	Нуклеотиди 610-642 послідовності SEQ ID NO:4, кодуючої ділянку, що містить домен CUBII

Як вказувалося вище, використовуваний у даному описі термін "олігонуклеотид" означає олігомер або полімер рибонуклеїнової кислоти (РНК) або дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) або їх міметики. Цей термін також охоплює такі олігонуклеобази, які складаються з природних нуклеотидів, цукрів і ковалентних міжнуклеозидних (остов) зв'язків, а також олігонуклеотидів, які мають модифікації, що не зустрічаються в природі. Такі модифікації дозволяють вводити певні потрібні властивості, яких не мають природні олігонуклеотиди, такі як зменшення токсичних властивостей, поліпшення стійкості до розщеплення нуклеазою і підвищення клітинного захоплення. В ілюстративних варіантах здійснення антисмислові сполуки за винаходом відрізняються від нативної ДНК модифікаціями фосфодіефірного остова, призначеними для продовження життєвого циклу антисмислового олігонуклеотиду, в якому фосфатні замісники замінені фосфоротіоатами. Подібним чином, один або обидва кінці олігонуклеотиду можуть бути заміщені одним або більше акридиновими похідними, які інтеркалюють між сусідніми парами нуклеотидів у ланцюзі нуклеїнової кислоти.

Іншою альтернативою використання антисмислових елементів є використання "РНК інтерференції" (РНКі). Дволанцюжкові РНК (длРНК) можуть провокувати сайленсинг генів у ссавців in vivo. Природна функція РНКі і косупресія, очевидно, є захистом геному від інвазії мобільних генетичних елементів, таких як ретротранспозони і віруси, продукуючі аберантні РНК або длРНК у клітині-хазяїні при їх активації (див., наприклад, Jensen J. et al., Nat. Genet. 21:209-12, 1999). Молекула дволанцюжкової РНК може бути одержана в процесі синтезу двох ланцюгів РНК, здатних формувати молекули дволанцюжкової РНК, кожний з яких має довжину від приблизно 19 до 25 (наприклад, 19-23 нуклеотидів). Наприклад, молекула длРНК, використовувана в способах за винаходом, може містити РНК, відповідну послідовності і її комплементу, наведеним у таблиці 4. Переважно, щонайменше один ланцюг РНК має 3' "липкий" кінець із 1-5 нуклеотидів. Синтезовані ланцюги РНК комбінують в умовах, при яких утворюється дволанцюжкова молекула. Послідовність РНК може містити щонайменше частини з 8 нуклеотидів послідовності SEQ ID NO:4 з загальною довжиною 25 нуклеотидів або менше. Конструювання послідовностей міРНК для заданої мішені добре відоме фахівцю в даній галузі техніки. Існують комерційні організації, що займаються конструюванням послідовностей міРНК, які гарантують щонайменше 70 % нокдаун експресії (Qiagen, Valencia, Calif).

длРНК може бути введена у формі фармацевтичної композиції відомими способами, за допомогою яких нуклеїнову кислоту вводять у необхідну клітину-мішень. Загальновідомі способи перенесення генів включають фосфат-кальцієвий спосіб, DEAE-декстрановий спосіб, електропорацію, мікроін'єкцію і способи з використанням вірусів. Такі способи описані в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

Для зменшення кількості і/або біологічної активності MASP-2 також можуть бути використані рибозими, такі як рибозими, націлені на мРНК MASP-2. Рибозими являють собою каталітичні молекули РНК, здатні розщеплювати молекули нуклеїнової кислоти з послідовністю, повністю або частково гомологічною послідовності рибозиму. Існує можливість конструювання рибозимних трансгенів, кодуючих рибозими РНК, які утворюють специфічні пари з цільовою РНК і розщеплюють фосфодіефірний остов у специфічній ділянці, внаслідок чого відбувається функціональна інактивація цільової РНК. При здійсненні такого розщеплення сам рибозим не міняється й, таким чином, здатний до рециклінгу і розщеплення інших молекул. Включення

рибозимних послідовностей в антисмислові РНК обумовлює активність розщеплення РНК, таким чином збільшуючи активність антисмислових конструкцій.

Рибозими, використовувані у винаході, звичайно містять ділянку, що гібридизується, із щонайменше дев'яти нуклеотидів, яка є комплементарною нуклеотидній послідовності щонайменше частини цільової мРНК MASP-2, і каталітичну область, яка здатна до розщеплення цільової мРНК (див. ЕРА № 0 321 201; WO 88/04300; Haseloff J. et al., Nature, 334:585-591, 1988; Fedor M.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1668-1672, 1990; Cech T.R. et al., Ann. Rev. Biochem. 55:599-629, 1986).

Рибозими можуть або бути націлені безпосередньо на клітини у формі олігонуклеотидів РНК, що включають рибозимні послідовності, або бути введені в клітину як вектор експресії, кодуючий необхідну рибозимну РНК. Рибозими можна використовувати і застосовувати практично так само, як описано для антисмислових полінуклеотидів.

Антисмислові РНК і ДНК, рибозими і молекули РНКі, використовувані в способах за винаходом, можуть бути одержані будь-яким методом, відомим у даній галузі, для синтезу молекул ДНК і РНК. Вони включають методи хімічного синтезу олігодезоксирибонуклеотидів і олігорибонуклеотидів, широко відомі в галузі техніки, такі як твердофазний фосфорамідний хімічний синтез. Альтернативно, молекули РНК можуть бути одержані за допомогою in vitro і in vivo транскрипції послідовностей ДНК, кодуючих молекулу антисмислової РНК. Такі послідовності ДНК можуть бути введені в широкий спектр векторів, які включають придатні промотори РНК полімерази, такі як промотори полімерази Т7 або SP6. Альтернативно, конструкції антисмислової кДНК, синтезуючі антисмислову РНК конститутивно або індуцибельно, залежно від використовуваного промотору, можуть стабільно вводитися в клітинні лінії.

Різні добре відомі модифікації молекул ДНК можуть бути введені для підвищення стабільності і періоду напіввиведення. Придатні модифікації включають, без обмеження, додавання фланкуючих послідовностей рибонуклеотидів або дезоксирибонуклеотидів до 5'- і/або 3'-кінців молекули або використання фосфоротіоату або 2'-О-метилу замість фосфодіефірних зв'язків усередині олігодезоксирибонуклеотидного каркаса.

V. ФАРМАЦЕВТИЧНІ КОМПОЗИЦІЇ і СПОСОБИ ДОСТАВКИ ДОЗУВАННЯ

В іншому аспекті даного винаходу надаються композиції для пригнічення побічних ефектів MASP-2-залежної активації комплементу у суб'єкта, що страждає захворюванням або станом, як розкрито в даному описі, які містять терапевтично ефективну кількість інгібуючого MASP-2 агента і фармацевтично прийнятний носій. Інгібуючі MASP-2 агенти можуть вводитися суб'єкту, що цього потребує, в терапевтично ефективних дозах для лікування або поліпшення станів, асоційованих з MASP-2-залежною активацією комплементу. Під терапевтично ефективною дозою мається на увазі кількість інгібуючого MASP-2 агента, достатня для полегшення симптомів, асоційованих із захворюванням або станом.

Токсичність і терапевтична ефективність інгібуючих MASP-2 агентів може бути визначена стандартними фармацевтичними процедурами з використанням експериментальних тваринних моделей, таких як MASP-2-/- мишача модель, експресуюча людський трансген MASP-2, описаний у прикладі 1. Використовуючи такі тваринні моделі, значення NOAEL (рівень відсутності спостережуваних побічних ефектів) і MED (мінімальна ефективна доза) можуть бути визначені стандартними способами. Відношення дози між ефектами NOAEL і MED є терапевтичним відношенням, яке виражається як відношення NOAEL/MED. Інгібуючі MASP-2 агенти, що демонструють високі терапевтичні відношення або показники, є найбільш переважними. Дані, одержані в результаті вивчення клітинних культур і тварин, можуть бути використані для визначення діапазону доз для людини. Дози інгібуючого MASP-2 агента переважно знаходяться у діапазоні концентрацій, спостережуваних у кровотоку, які включають MED з мінімальною токсичністю або без неї. Доза може варіювати усередині цього діапазону залежно від лікарської форми або використовуваного способу введення.

У деяких варіантах здійснення, терапевтична ефективність інгібуючих MASP-2 агентів для лікування, пригнічення, полегшення або профілактики фіброзу у ссавця, що страждає або має ризик розвитку захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом і/або запаленням, визначають за допомогою одного або більше із наступного: зменшення в нирковій тканині одного або більше маркерів запалення або рубцювання (наприклад, TGFβ-1, CTFF, IL-6, апоптозу, фібронектину, ламініну, колагенів, EMT, інфільтруючих макрофагів); зменшення рівня вивільнення в сечу або плазму розчинних маркерів запалення і фіброзного ниркового захворювання (наприклад шляхом вимірювання ниркової екскреторної функції).

Для складу будь-якої сполуки, терапевтично ефективну дозу можна оцінити за допомогою

тваринних моделей. Наприклад, доза може бути підібрана на тваринній моделі таким чином, щоб досягався діапазон концентрацій, циркулюючих у плазмі, який включає MED. Кількісні рівні інгібуючого MASP-2 агента в плазмі також можуть бути виміряні, наприклад, за допомогою високоефективної рідинної хроматографії.

Крім вивчення токсичності, ефективну дозу також можна оцінити по кількості MASP-2 білка у живого суб'єкта і спорідненості зв'язування інгібуючого MASP-2 агента. Було показано, що рівні MASP-2 у здорових людей у сироватці є низькими, у межах 500 нг/мл, при цьому рівні MASP-2 у конкретного суб'єкта можуть бути визначені методами кількісного аналізу MASP-2, як описано в Moller-Kristensen M. et al., J. Immunol. Methods, 282:159-167, 2003.

Звичайно, доза композицій, що вводяться, які містять інгібуючі MASP-2 агенти, варіює залежно від таких факторів як вік суб'єкта, його вага, ріст, стать, загальний стан здоров'я і історія хвороби. Як ілюстрація, інгібуючі MASP-2 агенти, такі як анти-MASP-2 антитіла, можуть вводитися в межах дози від приблизно 0,010 до 10,0 мг/кг, переважно від 0,010 до 1,0 мг/кг, більш переважно від 0,010 до 0,1 мг/кг ваги тіла суб'єкта. У деяких варіантах здійснення композиція містить комбінацію анти-MASP-2 антитіл і інгібуючих MASP-2 пептидів.

Терапевтична ефективність інгібуючих MASP-2 композицій і способів за винаходом для даного суб'єкта, а також придатні дози можуть бути визначені за допомогою аналізу реакцій комплементу, добре відомих фахівцю в даній галузі техніки. Комплемент генерує численні специфічні продукти. За останні десять років були розроблені точні і специфічні аналізи, які є комерційно доступними для більшості з таких продуктів активації, включаючи малі фрагменти активації C3a, C4a і C5a і великі фрагменти активації iC3b, C4d, Bb і sC5b-9. У більшості цих аналізів використовуються моноклональні антитіла, які реагують на нові антигени (неоантигени), розташовані на цих фрагментах, але не на нативні білки, з яких вони утворилися, що робить ці аналізи досить доступними і специфічними. У більшості випадків використовують метод ІФА, хоча для C3a і C5a дотепер усе ще іноді використовується радіоімунологічний аналіз. Останній аналіз використовується для вимірювання рівня як непроцесованих фрагментів, так і їх 'desArg' фрагментів, які є основними формами, що виявляються в кров'яному руслі. Непроцесовані фрагменти і $C5a_{desArg}$ швидко виводяться через зв'язування з рецепторами клітинної поверхні й, отже, присутні в дуже низьких концентраціях, тоді як $C3a_{desArg}$ не зв'язується з клітинами і накопичується в плазмі. Вимірювання C3a є чутливим, незалежним індикатором активації комплементу. Альтернативний шлях активації комплементу може бути визначений шляхом вимірювання фрагмента Bb. Виявлення розчинних продуктів активації мембраноатакуючого шляху, sC5b-9, є свідченням того, що комплемент повністю активований. Оскільки обидва, лектиновий і класичний, шляхи активації генерують одні і ті ж продукти активації, C4a і C4d, вимірювання цих двох фрагментів не дає ніякої інформації про те, який із цих двох шляхів активації комплементу згенерував продукти активації.

Пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу характеризується щонайменше однією з наступних змін у компоненті системи комплементу, які виникають у результаті введення інгібуючого MASP-2 агента згідно зі способами за винаходом: пригнічення генерації або продукування продуктів системи MASP-2-залежної активації комплементу: C4b, C3a, C5a і/або C5b-9 (виміряні, наприклад, як описано в прикладі 2), зменшення рівня розщеплення C4 і відкладення C4b (виміряне, наприклад, як описано в прикладі 10) або зменшення рівня розщеплення C3 і відкладення C3b (виміряне, наприклад, як описано в прикладі 10).

ДОДАТКОВІ АГЕНТИ

У деяких варіантах здійснення способи профілактики, лікування, купірування і/або пригнічення фіброзу і або запалення включають введення пригнічуючого MASP-2 агента (наприклад, інгібуючого MASP-2 антитіла) у рамках терапевтичного режиму з однією або більше іншими лікарськими речовинами, біологічними речовинами або терапевтичними методами лікування, що придатні для пригнічення фіброзу і/або запалення. У деяких варіантах здійснення додаткові лікарська, біологічна речовина або терапевтичний метод лікування є придатними для конкретних симптомів, асоційованих з захворюванням або розладом, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням. Як приклад, інгібуючі MASP-2 антитіла можна вводити як частину терапевтичного режиму разом з одним або більше імунодепресантами, такими як метотрексат, циклофосфамід, азатіоприн і мікофеноляту мофетил. Як інший приклад, інгібуючі MASP-2 антитіла можна вводити як частину терапевтичного режиму разом з одним або більше агентами, призначеними для посилення кровотоку (наприклад, ніфедипін, амлодипін, дилтіазем, фелодипін або нікардипін). Як інший приклад, інгібуючі MASP-2 антитіла можна вводити як частину терапевтичного режиму разом з одним або більше агентами, призначеними для зменшення фіброзу, такими як d-пеніциламін, колхіцин, PUVA, релаксин, циклоспорин, TGFβ-блокатори і/або p38 MAPK-блокатори. Як додатковий приклад, інгібуючі MASP-2 антитіла можна

вводити як частину терапевтичного режиму разом зі стероїдами або бронхорозширювачами.

Композиції і способи, що використовують інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла), необов'язково можуть включати один або більше додаткових терапевтичних агентів, які здатні підсилювати активність інгібуючого MASP-2 агента або які забезпечують споріднені терапевтичні функції, забезпечуючи додатковий або синергетичний ефект. Наприклад, у контексті лікування суб'єкта, що страждає захворюванням або розладом, викликаним або ускладненим фіброзом і/або запаленням, один або більше інгібуючих агентів MASP-2 можна вводити в комбінації (включаючи спільне введення) з одним або більше додатковими антифіброзними агентами і/або одним або більше протизапальними агентами і/або імунодепресантами.

Інгібуючі MASP-2 агенти (наприклад, інгібуючі MASP-2 антитіла) можна застосовувати в комбінації з іншими терапевтичними агентами, такими як імунодепресанти загальної дії, такі як кортикостероїди, імунодепресанти або цитотоксичні агенти і/або антифіброзні агенти.

ФАРМАЦЕВТИЧНІ НОСІЇ і ЗАСОБИ ДОСТАВКИ

Як правило, композиції інгібуючих MASP-2 агентів за даним винаходом, об'єднані з будь-яким іншим вибраним терапевтичним агентом, містяться в придатному фармацевтично прийнятному носії. Носій є нетоксичним, біосумісним і вибирається так, щоб можна було уникнути шкідливого впливу біологічної активності інгібуючого MASP-2 агента (і будь-якого іншого терапевтичного агента, включеного в комбінацію). Типові фармацевтично прийнятні носії для пептидів описані в патенті США № 5,211,657, Yamada. Анти-MASP-2 антитіла і інгібуючі пептиди, використовувані в даному винаході, можуть бути складені у тверду, напівтверду, гелеподібну, рідку і газоподібну лікарську форму, таку як таблетки, капсули, порошки, гранули, мазі, розчини, супозиторії, інгаляції і ін'єкції для перорального, парентерального або хірургічного введення. Даний винахід також передбачає місцеве введення композицій шляхом нанесення покриття на медичні інструменти і т. п.

Придатними носіями для парентерального введення шляхом ін'єкції, інфузії або зрошення і місцевої доставки є дистильована вода, забуферений фосфатом фізіологічний розчин, розчин Рінгера, нормальний або з лактатом, розчин D-глюкози, розчин Хенка або пропандіол. Крім того, стерильні нелеткі масла можуть застосовуватися як розчинник або суспендуюче середовище. Для цієї мети можна використовувати будь-яке біосумісне масло, включаючи синтетичні моно- або дигліцериди. Крім того, жирні кислоти, такі як олеїнова кислота, можуть застосовуватися для приготування придатних для ін'єкції препаратів. Носій і агент можуть бути змішані у вигляді рідких розчинів, суспензій, здатних або не здатних до полімеризації гелів, паст або бальзамів.

Носії також можуть містити засіб доставки для уповільнення (тобто пролонгування, затримання або контролю) доставки агента (агентів) або для посилення доставки, поглинання, стабілізації або фармакокінетичних параметрів терапевтичного агента (агентів). Такий засіб доставки може включати, без обмеження, мікрочастинки, мікросфери, наносфери або наночастинки, що складаються з білків, ліпосом, вуглеводів, синтетичних органічних речовин, неорганічних сполук, полімерних або співполімерних гідрогелів і полімерних міцел. Придатні системи доставки на основі гідрогелів і міцел включають співполімери PEO:PHB:PEO і співполімерні/циклодекстринові комплекси, описані в WO 2004/009664 A2, і PEO і PEO/циклодекстринові комплекси, описані в публікації заявки на патент США № 2002/0019369 A1. Такі гідрогелі можуть бути введені шляхом місцевих ін'єкцій в область передбачуваного впливу або підшкірно, або внутрішньом'язово для забезпечення уповільненого вивільнення агента.

У випадку внутрішньосуглобової доставки інгібуючий MASP-2 агент може бути доставлений у вищеописаних призначених для ін'єкцій рідких або гелевих носіях, вищеописаних призначених для ін'єкцій засобах доставки, що забезпечують уповільнене вивільнення, або носіях на основі гіалуронової кислоти або її похідних.

У випадку перорального введення непептидергічних агентів інгібуючий MASP-2 агент може бути доставлений в інертних наповнювачах або розчинниках, таких як сахароза, кукурудзяний крохмаль або целюлоза.

У випадку місцевого введення інгібуючий MASP-2 агент може бути доставлений у складі мазі, лосьйону, крему, гелю, крапель, супозиторія, спрею, рідини або порошку, або в гелевих або мікрокапсульних системах доставки за допомогою трансдермального пластиру.

Різні назальні і легеневі системи доставки, включаючи аерозолі, дозуючі інгалятори, інгалятори сухого порошку і розпилювачі, знаходяться у стадії розробки і можуть відповідним чином бути адаптовані для доставки препарату за даним винаходом за допомогою аерозолю, інгалятора або засобу доставки у вигляді розпилювача, відповідно.

У випадку інтратекальної (IT) або інтрацеребровентрикулярної (ICV) доставки можуть бути

використані відповідні стерильні системи доставки (наприклад, рідини, гелі, суспензії і т. д.).

Композиції за даним винаходом також можуть включати біосумісні наповнювачі, такі як диспергуючі або зволожуючі агенти, суспендуючі агенти, розчинники, буфери, агенти, що підсилюють проникнення, емульгатори, зв'язуючі засоби, загусники, ароматизуючі речовини (для перорального введення).

ФАРМАЦЕВТИЧНІ НОСІЇ ДЛЯ АНТИТІЛ І ПЕПТИДІВ

Більш конкретно, відносно анти-MASP-2 антитіл і інгібуючих пептидів, наведені як приклад склади можуть вводитися парентерально у вигляді дозованих ін'єкцій розчину або суспензії сполуки у фізіологічно прийнятному розчиннику з фармацевтичним носієм, який може являти собою стерильну рідину, таку як вода, масло, фізіологічний розчин, гліцерин або етанол. У композиціях, що містять анти-MASP-2 антитіла і інгібуючі пептиди, додатково можуть бути присутні допоміжні речовини, такі як зволожуючі або емульгуючі агенти, поверхнево-активні речовини, регулюючі pH речовини і т. п. Додаткові компоненти фармацевтичних композицій включають вуглеводневу суміш (таку як тваринного, рослинного або синтетичного походження), наприклад соєву олію і мінеральне масло. Для розчинів, що вводяться шляхом ін'єкцій, переважними рідкими носіями, як правило, є гліколі, такі як пропіленгліколь і поліетиленгліколь.

Анти-MASP-2 антитіла і інгібуючі пептиди також можуть вводитися у формі ін'єкцій речовин уповільненого всмоктування або імплантованого препарату, який може бути складений з можливістю уповільненого або пульсуючого вивільнення активних агентів.

ФАРМАЦЕВТИЧНО ПРИЙНЯТНІ НОСІЇ ДЛЯ ІНГІБІТОРІВ ЕКСПРЕСІЇ

Що стосується інгібіторів експресії, використовуваних у способах за винаходом, надаються композиції, які містять інгібітор експресії, як описано вище, і фармацевтично прийнятний носій або розчинник. Композиції можуть додатково містити колоїдну дисперсійну систему.

Фармацевтичні композиції, які містять інгібітори експресії, можуть включати, без винятку, склади, що містять розчини, емульсії і ліпосоми. Такі композиції можуть бути одержані з різних компонентів, що включають, без обмеження, попередньо приготовлені рідини, самоемульговані тверді речовини і самоемульговані напівтверді речовини. Приготування таких композицій звичайно включає комбінування інгібітору експресії з одним або більше з наступного: буфери, антиоксиданти, низькомолекулярні поліпептиди, білки, амінокислоти, вуглеводи, включаючи глюкозу, сахарозу або декстрин, хелатуючі агенти, такі як EDTA, глютатіон і інші стабілізатори і наповнювачі. Нейтральні забуферені фізіологічні розчини або фізіологічні розчини, змішані з неспецифічним сироватковим альбуміном, є прикладами відповідних розчинників.

У деяких варіантах здійснення композиції можуть бути приготовлені і складені у вигляді емульсій, які звичайно є гетерогенними системами однієї рідкої речовини, диспергованої в іншій у вигляді мікрокрапель (див., Idson, в Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). Прикладами природних емульгуючих агентів, використовуваних для складів у вигляді емульсій, є гуміарабік, бджолиний віск, ланолін, лецитин і фосфатиди.

В одному з варіантів здійснення композиції, які містять нуклеїнові кислоти, можуть бути складені у вигляді мікроемульсій. Мікроемульсія, як зазначено в даному описі, являє собою систему з води, масла і амфіфільної речовини, яка являє собою єдиний оптично однорідний і термодинамічно стабільний рідкий склад (див. Rosoff, в Pharmaceutical Dosage Forms, Vol.1). Спосіб за винаходом також може включати використання ліпосом для перенесення і доставки антисмислових олігонуклеотидів у потрібну ділянку.

Фармацевтичні композиції і склади інгібіторів експресії для топічного нанесення можуть включати трансдермальні пластири, мазі, лосьйони, креми, гелі, краплі, супозиторії, спреї, рідини і порошки. Також можуть бути використані традиційні фармацевтичні носії, наприклад на основі води, порошків або масел, загусники і т. п.

СПОСОБИ ВВЕДЕННЯ

Фармацевтичні композиції, які містять інгібуючі MASP-2 агенти, можуть бути введені різними способами, залежно від того, який зі способів введення, місцевий або системний, є більш придатним для захворювання, що підлягає лікуванню. Далі, композиції за даним винаходом можуть бути доставлені шляхом покривання або включення композицій у поверхню імплантованого медичного пристрою або в сам цей пристрій.

СИСТЕМНА ДОСТАВКА

Відповідно до даного опису, термін "системна доставка" або "системне введення" включає, без обмеження, пероральний і парентеральний способи введення, включаючи внутрішньом'язовий (IM), підшкірний, внутрішньовенний (IV), внутрішньоартеріальний, інгаляційний, під'язиковий, букальний, топічне нанесення, трансдермальний, назальний, ректальний, вагінальний і інші способи введення, які забезпечують ефективне диспергування

доставленого агента в одній або численних ділянках передбачуваного терапевтичного впливу. Переважні способи системної доставки цих композицій включають внутрішньовенний, внутрішньом'язовий, підшкірний і інгаляційний. Буде зрозуміло, що точний спосіб системного введення вибраних агентів, використовуваних у конкретних композиціях за даним винаходом, може бути визначений з урахуванням схильності цього агента до метаболічної трансформації способом, асоційованим з даним способом введення. Наприклад, найбільш придатним способом введення пептидергічних агентів є будь-який, крім перорального.

Антитіла і поліпептиди, інгібуючі MASP-2, можуть бути доставлені суб'єкту, що цього потребує, будь-яким придатним способом. Способи доставки антитіл і поліпептидів MASP-2 включають пероральне, пульмональне, парентеральне введення (наприклад, внутрішньом'язові, інтраперитонеальні, внутрішньовенні (IV) або підшкірні ін'єкції), інгаляцію (наприклад, тонкоподрібненого порошку), трансдермальне, назальне, вагінальне, ректальне або підшкірне введення, і можуть бути приготовлені в лікарських формах, придатних для кожного зі способів введення.

Як ілюстративний приклад, антитіла і пептиди, інгібуючі MASP-2, можуть бути введені в живий організм шляхом нанесення на слизову оболонку, що має здатність абсорбувати поліпептиди, наприклад слизову носа, шлунково-кишкового тракту і прямої кишки. Поліпептиди звичайно наносять на абсорбуючу слизову оболонку в комбінації з агентом, що підсилює проникність (див., наприклад, Lee V.H.L., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 5:69, 1988; Lee V.H.L., J. Controlled Release, 13:213, 1990; Lee V.H.L., Ed., Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York (1991); Deboer A.G. et al., J. Controlled Release, 13:241, 1990). Наприклад, STDHF являє собою синтетичне похідне фусидової кислоти, стероїдної поверхнево-активної речовини, яка по своїй структурі аналогічна солям жовчних кислот і яка використовується як агент, що підсилює проникність при назальній доставці (Lee W.A., Biopharm. 22, Nov./Dec. 1990).

Антитіла і поліпептиди, інгібуючі MASP-2, можуть бути введені в комбінації з іншою молекулою, наприклад ліпідом, для захисту поліпептидів від ферментної деградації. Наприклад, ковалентне прикріплення полімерів, зокрема поліетиленгліколю (PEG), використовували для захисту деяких білків від ферментного гідролізу в організмі і, таким чином, продовжували період їх напіввиведення (Fuertges F. et al., J. Controlled Release, 11:139, 1990). Описано багато полімерних систем для доставки білків (Bae Y.H. et al., J. Controlled Release, 9:271, 1989; Hori R. et al., Pharm. Res. 6:813, 1989; Yamakawa I. et al., J. Pharm. Sci. 79:505, 1990; Yoshihiro I. et al., J. Controlled Release, 10:195, 1989; Asano M. et al., J. Controlled Release, 9:111, 1989; Rosenblatt J. et al., J. Controlled Release, 9:195, 1989; Makino K., J. Controlled Release 12:235, 1990; Takakura Y. et al., J. Pharm. Sci. 78:117, 1989; Takakura Y. et al., J. Pharm. Sci. 78:219, 1989).

Нещодавно були розроблені ліпосоми з підвищеною стабільністю в сироватці і збільшеним періодом напіввиведення (див., наприклад, патент США № 5,741,516, Webb). Крім того, були розглянуті різні способи виробництва ліпосом і ліпосомоподібних препаратів як потенційних носіїв лікарських речовин (див., наприклад, патент США № 5,567,434, Szoka; патент США № 5,552,157, Yagi; патент США № 5,565,213, Nakamori; патент США № 5,738,868, Shinkarenko; і патент США № 5,795,587, Gao).

Для трансдермального нанесення антитіла і поліпептиди, інгібуючі MASP-2, можуть бути об'єднані з іншими придатними інгредієнтами, такими як носії і/або ад'юванти. Такі інгредієнти використовуються незалежно від їх природи, за винятком того, що вони повинні бути фармацевтично прийнятними для передбачуваного введення і не повинні зменшувати вплив активних інгредієнтів композиції. Приклади придатних основ включають креми, мазі, гелі або суспензії, що містять або не містять очищений колаген. Антитіла і поліпептиди, інгібуючі MASP-2, також можуть бути імпрегновані в трансдермальні пластири, пов'язки і бандажі, переважно в рідкій або напіврідкій формі.

Композиції за даним винаходом можуть вводитися системно через визначені проміжки часу, необхідні для підтримання необхідного рівня терапевтичного ефекту. Наприклад, склади можуть вводитися шляхом підшкірних ін'єкцій кожні два-чотири тижні або через менш часті проміжки часу. Режим дозування визначається лікарем з урахуванням різних факторів, які можуть впливати на дію комбінації агентів. Ці фактори включають ступінь прогресування захворювання, що підлягає лікуванню, вік пацієнта, його стать і вагу і інші клінічні фактори. Доза кожного окремого агента буде мінятися залежно від функції інгібуючого MASP-2 агента, включеного в композицію, а також від наявності і природи будь-якого засобу для доставки лікарської речовини (наприклад, засобу для доставки з уповільненим вивільненням). Крім того, дозування можна коректувати з урахуванням частоти введення і фармакокінетичної поведінки агента (агентів), що доставляється.

МІСЦЕВА ДОСТАВКА

Використовуваний у даному описі термін "місцеве" охоплює нанесення препарату на або навколо області передбачуваного місцевого впливу і може включати, наприклад, топічну доставку на шкіру або іншу уражену тканину, офтальмологічну доставку, інтратекальне (IT), інтрацеребровентрикулярне (ICV), внутрішньосуглобове, внутрішньопорожнинне, внутрішньочерепне або внутрішньоміхурове введення, розміщення або зрошення. Місцеве введення може бути більш переважним з точки зору введення більш низьких доз, запобігання виникненню системних побічних ефектів і для більш точного контролю часу доставки і концентрації активних агентів у ділянці місцевої доставки. Місцеве введення передбачає відомі концентрації в цільовій області, незалежно від індивідуальних відмінностей між пацієнтами з точки зору метаболізму, кровообігу і т. д. Поліпшений контроль дозування також забезпечується прямою доставкою.

Місцева доставка інгібуючого MASP-2 агента може бути досягнута в контексті хірургічних методів лікування захворювань або розладів, викликаних або ускладнених фіброзом і/або запаленням, наприклад під час процедур, таких як операція.

РЕЖИМИ ЛІКУВАННЯ

У профілактичних цілях фармацевтичні композиції, які містять інгібуючий MASP-2 агент (наприклад, інгібуюче MASP-2 антитіло), вводять суб'єкту, що схильний до або має ризик розвитку захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом і/або запаленням, у кількості, достатній для пригнічення фіброзу і/або запалення, таким чином усуваючи або зменшуючи ризик розвитку симптомів цього стану. У деяких варіантах здійснення, фармацевтичні композиції вводять суб'єкту з підозрою на наявність захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом і/або запаленням, або який вже страждає таким захворюванням або розладом, у терапевтично ефективній кількості, достатній для полегшення або щонайменше часткового зменшення симптоматики цього стану. Як у профілактичних, так і в терапевтичних цілях, композиції, які містять інгібуючий MASP-2 агент, можуть вводитися декількома дозами до досягнення достатнього терапевтичного результату. Застосування інгібуючих MASP-2 композицій за даним винаходом може здійснюватися шляхом однократного введення композиції або обмеженої серії введень для лікування гострого стану, асоційованого з фіброзом і/або запаленням. Альтернативно, композиція може вводитися через визначені проміжки часу протягом тривалого часу для лікування хронічного стану, асоційованого з фіброзом і/або запаленням.

Як у профілактичних, так і в терапевтичних цілях, композиції, які містять інгібуючий MASP-2 агент, можуть вводитися декількома дозами до досягнення достатнього терапевтичного результату. В одному з варіантів здійснення, інгібуючий MASP-2 агент містить інгібуюче MASP-2 антитіло, яке переважно може бути введене дорослому пацієнту (наприклад, дорослому пацієнту з середньою вагою 70 кг) у дозі в межах від 0,1 до 10000 мг, більш переважно від 1,0 до 5000 мг, більш переважно від 10,0 до 2000 мг, більш переважно від 10,0 до 1000 мг і ще більш переважно від 50,0 до 500 мг. Для пацієнтів дитячого віку дозу можна коректувати пропорційно вазі пацієнта. Застосування інгібуючих MASP-2 композицій за даним винаходом може здійснюватися шляхом однократного введення композиції або обмеженої серії введень для лікування суб'єкта, що страждає або має ризик розвитку захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом і/або запаленням. Альтернативно, композицію можна вводити через визначені проміжки часу, наприклад щодня, два рази на тиждень, раз на тиждень, через тиждень, раз на місяць, два рази на місяць, протягом тривалого часу для лікування суб'єкта, що страждає або має ризик розвитку захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом і/або запаленням.

Як у профілактичних, так і в терапевтичних цілях, композиції, які містять інгібуючий MASP-2 агент, можуть вводитися декількома дозами до досягнення достатнього терапевтичного результату.

У деяких варіантах здійснення суб'єкта ідентифікують як такого, що має ризик розвитку захворювання або розладу, викликаного або ускладненого фіброзом або запаленням, шляхом визначення наявності у суб'єкта одного або більше симптомів порушення функції нирок, оцінених, наприклад, шляхом вимірювання рівня креатиніну в сироватці, швидкості виведення креатиніну з сироватки, рівня азоту в сечі, білка в сечі і/або шляхом вимірювання одного або більше біомаркерів, асоційованих з захворюванням або ураженням нирок.

Способи оцінки функції нирок добре відомі в даній галузі і включають, без обмеження, вимірювання системного кров'яного тиску і гломерулярного капілярного тиску, протеїнурії (наприклад, альбумінурії), мікроскопічної і макроскопічної гематурії, рівня креатиніну в сироватці (наприклад, відповідно одній з формул оцінки функції нирок у людей, рівень креатиніну, що дорівнює 2,0 мг/дл, відповідає 50 % нормальній функції нирок, а 4,0 мг/дл - 25 %), зниження

швидкості клубочкової фільтрації (наприклад, швидкості кліренсу креатиніну) і ступінь канальцевого ушкодження. Наприклад, оцінка функції нирок може включати оцінку щонайменше однієї функції нирок з використанням біологічних і/або фізіологічних параметрів, таких як рівень креатиніну в сироватці крові, швидкість кліренсу креатиніну, секреція білка за 24 години, швидкість клубочкової фільтрації, співвідношення креатиніну і альбуміну в сечі, швидкість виведення альбуміну (наприклад, визначення ступеня фіброзу нирок шляхом вимірювання відкладення колагену і/або фібронектину).

VI. ПРИКЛАДИ

Наведені нижче приклади є тільки ілюстрацією найкращого способу практичної реалізації даного винаходу і не повинні розглядатися як обмежуючі даний винахід. Усі згадані в даній заявці літературні джерела включені в даний опис у вигляді посилання.

ПРИКЛАД 1

У цьому прикладі описане одержання мишачої лінії, дефіцитної по MASP-2 (MASP-2-/-), але повноцінної по MAp19 (MAp19+/+).

Матеріали і методи

Цільовий вектор pKO-NTKV-1901 створювали для руйнування трьох екзонів, кодуючих С-термінальний кінець мишачого MASP-2, включаючи екзон, який кодує домен серинової протеази, як показано на фіг. 3. PKO-NTKV-1901 використовували для трансфекції мишачої ES клітинної лінії E14.1a (SV129 Ola). Відбирали клони, стійкі до неоміцину і чутливі до тимідинкінази. 600 ES-клонів піддавали скринінгу, і з них за допомогою саузерн-блот-аналізу ідентифікували і верифікували чотири різні клони, що містять необхідні селективні цільові і рекомбінантні події, як показано на фіг. 3. Шляхом перенесення ембріона із цих чотирьох позитивних клонів одержували химери. Потім химери піддали зворотному схрещуванню з фоновим фенотипом C57/BL6 з одержанням трансгенних особин чоловічої статі. Потім трансгенних особин чоловічої статі схрещували з жіночими з одержанням F1 з 50 % потомства, що проявляє гетерозиготність по порушеному гену MASP-2. Гетерозиготних мишей схрещували між собою з одержанням гомозиготного потомства, дефіцитного по MASP-2, з одержаним співвідношенням між гетерозиготними мишами і мишами дикого типу 1:2:1, відповідно.

Результати і фенотип

Одержаних у результаті гомозиготних MASP-2-/- дефіцитних мишей, які виявилися життєздатними і фертильними, перевіряли на дефіцит по MASP-2 за допомогою саузерн-блот-аналізу для підтвердження коректної цільової події, за допомогою нозерн-блот-аналізу для підтвердження відсутності мРНК MASP-2 і за допомогою вестерн-блот-аналізу для підтвердження відсутності білка MASP-2 (дані не показані). Наявність мРНК Map19 і відсутність мРНК MASP-2 далі підтверджували методом ПЛР-РЧ з розрізненням за часом на пристрої LightCycler. Як і очікувалося, у MASP-2-/- мишей тривала експресія мРНК і білків Map19, MASP-1 і MASP-3 (дані не показані). MASP-2-/- мишей аналізували на наявність і надмірну кількість мРНК пропердину, фактора B, фактора D, C4, C2 і C3 за допомогою LightCycler аналізу, і було знайдено, що вони ідентичні рівням, наявним у контрольних одноприплідних тварин дикого типу (дані не показані). Плазма гомозиготних MASP-2-/- мишей була повністю дефіцитною відносно активації комплементу, опосередкованої лектиновим шляхом, як описано нижче в прикладі 2.

Генерація MASP-2-/- лінії на чистому фоновому генотипі C57BL6

MASP-2-/- мишей піддавали зворотному схрещуванню з чистою лінією C57BL6 протягом дев'яти генерацій до використання MASP-2-/- лінії як експериментальної тваринної моделі.

Трансгенну мишачу лінію, яка являє собою мишачу MASP-2-/-, MAp19+/+ лінію і яка експресує людський MASP-2 трансген (мишачий MASP-2 нокаут і людський MASP-2 нокін), одержували наступним чином.

Матеріали і методи

Створювали міні-ген, кодуючий людський MASP-2, названий "міні-hMASP-2" (SEQ ID NO:49), як показано на фіг. 4, який включає промоторну область гена людського MASP-2, включаючи три перші екзони (екзон 1 - екзон 3), за якою іде послідовність кДНК, яка є кодуючою послідовністю з 8 послідовно розташованих екзонів, забезпечуючи кодування повнорозмірного білка MASP-2, що запускається ендогенним промотором. Конструкцію міні-hMASP-2 вводили в запліднені яйця MASP-2-/-, щоб замінити дефіцитний мишачий MASP-2 ген трансгенно експресованим людським MASP-2.

ПРИКЛАД 2

У цьому прикладі показано, що MASP-2 потрібний для активації комплементу через лектиновий шлях.

Матеріали і методи

Аналіз розщеплення C4, специфічного для лектинового шляху

Аналіз розщеплення C4 описаний в Petersen et al., J. Immunol. Methods, 257:107 (2001), у якому вимірювали активацію лектинового шляху, ініційовану ліпотейхоєвою кислотою (LTA) від S. aureus, яка зв'язується з L-фіколіном. Аналіз, описаний Petersen et al. (2001), адаптували для вимірювання активації лектинового шляху за допомогою MBL шляхом нанесення на планшет ЛПС і манану або зимозану перед додаванням сироватки, одержаної від MASP-2-/- мишей, як описано нижче. Аналіз також модифікували для виключення можливості розщеплення C4 по класичному шляху. Це досягалося шляхом використання буфера для розведення зразка, що містить 1M NaCl, який забезпечував високу спорідненість зв'язування компонентів упізнавання лектинового шляху зі своїми лігандами, але запобігав активації ендогенного C4, таким чином виключаючи участь класичного шляху в результаті дисоціації комплексу C1. Коротко, у модифікованому аналізі зразки сироватки (розведені буфером з високим вмістом солі (1M NaCl)) додавали в планшети, покриті лігандом, з наступним додаванням постійної кількості очищеного C4 у буфері з фізіологічною концентрацією солі. Зв'язані комплекси упізнавання, що містять MASP-2, розщеплюють C4, приводячи до відкладення C4b.

Способи аналізу

1) Титраційні мікропланшети Nunc MaxiSorb (MaxiSorb®, Nunc, кат. № 442404, Fisher Scientific) покривали 1 мкг/мл мананом (M7504 Sigma) або будь-яким іншим лігандом (таким, як перераховані нижче), розведеним у буфері для нанесення покриття (15 мМ Na_2CO_3, 35 мМ $NaHCO_3$, pH 9,6).

В аналізі використовували наступні реагенти:

a) манан (1 мкг на ямку манану (M7504 Sigma) в 100 мкл буфера для нанесення покриття);

b) зимозан (1 мкг на ямку зимозану (Sigma) в 100 мкл буфера для нанесення покриття);

c) LTA (1 мкг на ямку в 100 мкл буфера для нанесення покриття або 2 мкг на ямку в 20 мкл метанолу);

d) 1 мкг H-фіколін-специфічного Mab 4H5 у буфері для нанесення покриття;

e) PSA від Aerococcus viridans (2 мкг на ямку в 100 мкл буфера для нанесення покриття);

f) 100 мкл на ямку S. aureus DSM20233, фіксованого у формаліні (OD_{550}=0,5), у буфері для нанесення покриття.

2) Планшет інкубували протягом ночі при 4 °C.

3) Після нічної інкубації ділянки зв'язування білка, що залишилися, насичували шляхом інкубації планшетів з 0,1 % HSA-TBS блокувальним буфером (0,1 % (в/о) HSA в 10 мМ Tris-Cl, 140 мМ NaCl, 1,5 мМ NaN_3, pH 7,4) протягом 1-3 годин, і потім планшети промивали три рази сумішшю TBS/Твін/Ca^{2+} (TBS з 0,05 % Твін 20 і 5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4).

4) Зразки сироватки, що підлягають тестуванню, розбавляли в MBL-зв'язувальному буфері (1M NaCl), і розведені зразки додавали в планшети і інкубували протягом ночі при 4 °C. Ямки, у які додавали тільки буфер, використовували як негативний контроль.

5) Після нічної інкубації при 4 °C, планшети тричі промивали сумішшю TBS/Твін/Ca^{2+}. Потім у планшет додавали людський C4 (1 мкг/мл розведеного в BBS (4 мМ барбіталу, 145 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4) по 100 мкл на ямку) і інкубували протягом 90 хвилин при 37 °C. Потім планшети знову тричі промивали сумішшю TBS/Твін/Ca^{2+}.

6) Відкладення C4b визначали за допомогою кон'югованого з лужною фосфатазою курячого антилюдського C4c (розведеного у співвідношенні 1:1000 в TBS/Твін/Ca^{2+}), яке додавали в планшети і інкубували протягом 90 хв. при кімнатній температурі. Потім планшети знову тричі промивали сумішшю TBS/Твін/Ca^{2+}.

7) Лужну фосфатазу детектували шляхом додавання 100 мкл розчину п-нітрофенілфосфатного субстрату, інкубації при кімнатній температурі протягом 20 хвилин і зчитування оптичної густини OD_{405} на пристрої зчитування титраційних мікропланшетів.

Результати

На фіг. 5A-B показане відкладення C4b на манані (фіг. 5A) і зимозані (фіг. 5B) у розведених сироватках, одержаних від MASP-2+/+ (хрести), MASP-2+/- (замкнені кільця) і MASP-2-/- (замкнені трикутники) мишей. На фіг. 5C показана відносна активність C4-конвертази на планшетах, покритих зимозаном (білі стовпці) або мананом (темні стовпці) для MASP-2-/+ мишей (n=5) і MASP-2-/- мишей (n=4) відносно мишей дикого типу (n=5), виміряна по відкладенню C4b, нормалізованого відносно сироватки мишей дикого типу. Планки погрішностей представляють стандартне відхилення. Як показано на фіг. 5A-C, у покритих мананом і зимозаном планшетах плазма, одержана від MASP-2-/- мишей, є повністю дефіцитною по активації комплементу, опосередкованій лектиновим шляхом. Ці результати з очевидністю демонструють, що MASP-2, а не MASP-1 або MASP-3, є ефекторним компонентом лектинового шляху.

Рекомбінантний MASP-2 відновлює активацію C4, опосередковану лектиновим шляхом, у

сироватці, одержаній від MASP-2-/- мишей

Для встановлення факту, що відсутність у MASP-2-/- мишей MASP-2 є безпосередньою причиною втрати активації C4, залежної від лектинового шляху, за допомогою описаного вище аналізу розщеплення C4 оцінювали вплив додавання рекомбінантного білка MASP-2 у зразки сироватки. Рекомбінантні білки, функціонально активний мишачий MASP-2 і каталітично неактивний мишачий MASP-2A (у якому сериновий залишок в активній ділянці домену серинової протеази заміщений залишком аланіну), одержували і очищали, як описано нижче в прикладі 3. Об'єднану сироватку, одержану від чотирьох MASP-2-/- мишей, попередньо інкубували з підвищенням концентрації рекомбінантного мишачого MASP-2 або неактивного рекомбінантного мишачого MASP-2A, і активність C4-конвертази оцінювали, як описано вище.

Результати

Як показано на фіг. 6, додавання функціонально активного мишачого рекомбінантного білка MASP-2 (показаного білими трикутниками) у сироватку, одержану від MASP-2-/- мишей, відновлювало активацію C4, залежну від лектинового шляху, залежно від концентрації білка, при цьому каталітично неактивний мишачий білок MASP-2A (показаний зірочками) не відновлював активацію C4. Результати, показані на фіг. 6, нормалізували відносно активації C4, спостережуваної в об'єднаній сироватці мишей дикого типу (позначено пунктирною лінією).

ПРИКЛАД 3

У цьому прикладі показана рекомбінантна експресія і продукування рекомбінантних повнорозмірних людських, щурячих і мишачих білків MASP-2, поліпептидів, похідних від MASP-2, і каталітично неактивних мутантних форм MASP-2.

Експресія повнорозмірного людського, щурячого і мишачого MASP-2

Повнорозмірну послідовність кДНК людського MASP-2 (SEQ ID NO:4) також субклонували у вектор експресії pCI-Neo ссавців (Promega), який керує еукаріотичною експресією під контролем CMV енхансерної/промоторної області (описано в Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research, 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:531-66 (1991)). Повнорозмірні мишачу кДНК (SEQ ID NO:50) і щурячу кДНК MASP-2 (SEQ ID NO:53) субклонували у вектор експресії pED. Вектори експресії MASP-2 потім трансфікували в адгезивні лінії клітин яєчників китайського хом'ячка DXB1 по стандартній процедурі трансфекції з використанням фосфату кальцію, описаної в Maniatis et al., 1989. Клітини, трансфіковані такими конструкціями, розвивалися дуже повільно, що можна пояснити цитотоксичністю кодованої протеази.

В іншому підході, конструкцію міні-гена (SEQ ID NO:49), що містить людську кДНК MASP-2, керовану ендогенним промотором, піддавали тимчасовій трансфекції в клітинах яєчників китайського хом'ячка (CHO). Людський білок MASP-2, секретований у культуральне середовище, виділяли за схемою, описаною нижче.

Експресія повнорозмірного каталітично неактивного MASP-2

Обґрунтування

MASP-2 активували шляхом аутокаталітичного розщеплення після зв'язування субкомпонентів розпізнавання MBL або фіколінів (або L-фіколіну, H-фіколіну, або M-фіколіну) з відповідними їм вуглеводними молекулами. Аутокаталітичне розщеплення, що приводить до активації MASP-2, часто відбувається під час процедури виділення MASP-2 із сироватки або під час очищення після рекомбінантної експресії. Для одержання більш стабільного препарату білка для застосування як антигену каталітично неактивну форму MASP-2, позначену як MASP-2A, створювали шляхом заміщення залишку серину, який присутній у каталітичній тріаді домену протеази, залишком аланіну у щурів (SEQ ID NO:55 Ser617 на Ala617); у мишей (SEQ ID NO:52 Ser617 на Ala617) або у людини (SEQ ID NO:6 Ser618 на Ala618).

Для одержання каталітично неактивних людських і мишачих білків MASP-2A, здійснювали сайт-спрямований мутагенез, використовуючи олігонуклеотиди, представлені в таблиці 5. Олігонуклеотиди, наведені в таблиці 5, створювали шляхом відпалу з ділянкою людської і мишачої кДНК, кодуючої ферментативно активний серин, а олігонуклеотид містив невідповідність для заміни кодону серину на кодон аланіну. Наприклад, ПЛР-олігонуклеотиди SEQ ID NOS:56-59 використовували в комбінації з людською кДНК MASP-2 (SEQ ID NO:4) для ампліфікації ділянки від старт-кодону до ферментативно активного серину і від серину до стоп-кодону для одержання повного відкритого зчитування з мутованого MASP-2A, що містить мутацію Ser618/Ala618. Продукти ПЛР очищали після електрофорезу в агарозному гелі і одержання смуг, і одержували одиночні аденозинові перекриття, використовуючи стандартну процедуру нарощування. Потім MASP-2A з доданим аденозином клонували у вектор pGEM-T Easy і трансформували в E. coli.

Каталітично неактивний щурячий білок MASP-2A одержували, піддаючи SEQ ID NO:64 і SEQ ID NO:65 дії кінази і відпалу шляхом об'єднання цих двох олігонуклеотидів у рівних молярних

об'ємах, нагрівання при температурі 100 °С протягом 2 хвилин і повільного охолодження при кімнатній температурі. Одержаний у результаті відпалу фрагмент містив Pst1 і Xba1 сумісні кінці і був вставлений замість фрагмента Pst1-Xba1 кДНК щурячого MASP-2 дикого типу (SEQ ID NO:53) з одержанням щурячого MASP-2A.

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

5'-CTAGAAACACTAATGCCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA-3' (SEQ ID NO:65).

Потім кожний з людського, мишачого і щурячого MASP-2A субклонували у вектори експресії ссавців pED або pCI-Neo і трансфікували в лінії клітин DXB1 яєчників китайського хом'ячка, як описано нижче.

В іншому підході каталітично неактивну форму MASP-2 одержували способом, описаним в Chen et al., J. Biol. Chem., 276(28); 25894-25902, 2001. Коротко, плазміду, що містить повнорозмірну кДНК людського MASP-2 (описано в Thiel et al. Nature, 386:506, 1997), розрізали рестриктазами Xho1 і EcoR1, і кДНК MASP-2 (наведену в даному описі в SEQ ID NO:4) клонували по відповідних сайтах рестрикції в бакуловірусний вектор перенесення pFastBad (Life Technologies, NY). Потім Ser618 в активній ділянці серинової протеази MASP-2 заміняли Ala618 шляхом заміщення двониткових олігонуклеотидів, кодуючих ділянку пептиду з 610 по 625 амінокислоту (SEQ ID NO:13), природною ділянкою з 610 по 625 амінокислоту для одержання повнорозмірного поліпептиду MASP-2 з неактивним протеазним доменом.

Конструювання експресійних плазмід, що містять поліпептидні ділянки, одержані від людського MASP-2

Для забезпечення секреції різних доменів MASP-2 одержували наступні конструкції з використанням сигнального пептиду MASP-2 (залишки 1-15 в SEQ ID NO:5). Конструкцію, експресуючу домен CUBI людського MASP-2 (SEQ ID NO:8), одержували ПЛР-ампліфікацією ділянки, кодуючої залишки 1-121 MASP-2 (SEQ ID NO:6) (відповідає N-термінальному домену CUBI). Конструкцію, експресуючу домен CUBIEGF людського MASP-2 (SEQ ID NO:9), одержували ПЛР-ампліфікацією ділянки, кодуючої залишки 1-166 MASP-2 (SEQ ID NO:6) (відповідає N-термінальному домену CUBIEGF). Конструкцію, експресуючу домен CUBIEGFCUBII людського MASP-2 (SEQ ID NO:10), одержували ПЛР-ампліфікацією ділянки, кодуючої залишки 1-293 MASP-2 (SEQ ID NO:6) (відповідає N-термінальному домену CUBIEGFCUBII). Вищевказані домени ампліфікували методом ПЛР, використовуючи $Vent_R$ полімеразу і pBS-MASP-2 як матрицю, відповідно до встановлених способів ПЛР. У послідовність 5'-праймера смислового праймера (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO:34) вводили сайт рестрикції BamHI (підкреслений) на 5'-кінці ПЛР-продукту. Антисмислові праймери для кожного домену MASP-2, показані нижче в таблиці 5, одержували шляхом введення стоп-кодону (напівжирний шрифт), за яким додавали сайт EcoRI (підкреслений) на кінці кожного ПЛР-продукту. Після ампліфікації фрагменти ДНК обробляли рестриктазами BamHI і EcoRI і клонували у відповідні ділянки вектора pFastBac1. Одержані в результаті конструкції були охарактеризовані за допомогою рестрикційного картування і підтверджені секвенуванням длДНК.

ТАБЛИЦЯ 5

ПЛР-ПРАЙМЕРИ ДЛЯ MASP-2

Домен MASP-2	5'-ПЛР-праймер	3'-ПЛР-праймер
SEQ ID NO:8 CUBI (aa 1-121 в SEQ ID NO:6)	5'-CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'-GGAATTCCTAGGCTGCA TA-3' (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (aa 1-166 в SEQ ID NO:6)	5'-CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'-GGAATTCCTACAGGGCG CT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (aa 1-293 в SEQ ID NO:6)	5'-CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'-GGAATTCCTAGTAGTGG AT-3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 Людський MASP-2	5'-ATGAGGCTGCTGA CCCTCCTGGGCCTTC-3' (SEQ ID NO:56) hMASP-2_прямий	5'-TTAAAATCACTAATTAT GTTCTCGATC-3' (SEQ ID NO:59) hMASP-2_зворотний
SEQ ID NO:4 кДНК людського MASP-2	5'-CAGAGGTGACGCA GGAGGGGCAC-3' (SEQ ID NO:58) hMASP-2_Ala_прямий	5'-GTGCCCCTCCTGCGTCA CCTCTG-3' (SEQ ID NO:57) hMASP-2_Ala_зворотний

ТАБЛИЦЯ 5

ПЛР-ПРАЙМЕРИ ДЛЯ MASP-2

Домен MASP-2	5'-ПЛР-праймер	3'-ПЛР-праймер
SEQ ID NO:50 кДНК мишачого MASP-2	5'-ATGAGGCTACTCA TCTTCCTGG-3' (SEQ ID NO:60) mMASP-2_прямий	5'-TTAGAAATTACTTATTAT GTTCTCAATCC3-' (SEQ ID NO:63) mMASP-2_зворотний
SEQ ID NO:50 кДНК мишачого MASP-2	5'-CCCCCCCTGCGTC ACCTCTGCAG-3' (SEQ ID NO:62) mMASP-2_Ala_прямий	5'-CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGGG-3' (SEQ ID NO:61) mMASP-2_Ala_зворотний

Еукаріотична експресія рекомбінантного MASP-2 і одержання ферментативно неактивних мишачого, щурячого і людського білків MASP-2A

Вищеописані експресійні конструкції MASP-2 і MASP-2A трансфікували в DXB1-клітини за допомогою стандартної процедури кальцій-фосфатної трансфекції (Maniatis et al., 1989). MASP-2A одержували в безсироватковому живильному середовищі, щоб виключити контамінацію препаратів іншими сироватковими білками. Через день збирали конфлюентні клітини з живильних середовищ (у загальній складності процес проводили чотири рази). Середній рівень рекомбінантного MASP-2A для кожного із трьох видів склав приблизно 1,5 мг/літр культурального середовища.

Очищення білка MASP-2A

MASP-2A (мутантну форму Ser-Ala, описану вище) очищали афінною хроматографією на колонках із MBP-A-агарозою. Ця стратегія дозволяє проводити швидке очищення без використання зовнішніх маркерів. MASP-2A (100-200 мл живильного середовища, розведеного рівним об'ємом завантажувального буфера (50 мМ Tris-Cl, pH 7,5, що містить 150 мМ NaCl і 25 мМ $CaCl_2$) завантажували в колонку з MBP-агарозою (4 мл) для афінної хроматографії, попередньо зрівноважену 10 мл завантажувального буфера. Після промивання додатковими 10 мл завантажувального буфера білок елюювали в 1 мл фракціях з 50 мМ Tris-Cl, pH 7,5, що містить 1,25M NaCl і 10 мМ EDTA. Фракції, що містять MASP-2A, ідентифікували за допомогою SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі. При необхідності, MASP-2A додатково очищали за допомогою іонообмінної хроматографії на колонці MonoQ (MR 5/5). Білок діалізували з 50 мМ Tris-Cl, pH 7,5, що містить 50 мМ NaCl, і завантажували в колонку, зрівноважену тим же буфером. Після промивання зв'язаний MASP-2A елюювали 10 мл 0,05-1M градієнтним розчином NaCl.

Результати

Вихід білка MASP-2A склав 0,25-0,5 мг на 200 мл середовища. Молекулярна маса, визначена методом MALDI-MS, склала 77,5 кДа, що перевищило розрахункову величину для немодифікованого поліпептиду (73,5 кДа) у зв'язку з глікозилуванням. Приєднання гліканів до кожного з сайтів N-глікозилування пояснює спостережувану масу. MASP-2A мігрував у вигляді однієї смуги в SDS-поліакриламідних гелях, свідчачи про те, що в процесі біосинтезу він не піддався протеолітичному розкладанню. Середньозважена молекулярна маса, визначена шляхом рівноважного ультрацентрифугування, узгоджується з розрахунковою величиною для гомодимерів глікозилованого поліпептиду.

ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ПОЛІПЕПТИДІВ ЛЮДСЬКОГО MASP-2

Інший спосіб одержання рекомбінантних похідних поліпептидів MASP-2 і MASP-2A описаний в Thielens N.M. et al., J. Immunol. 166:5068-5077, 2001. Коротко, клітини комахи Spodoptera frugiperda (клітини Ready-Plaque Sf9, одержані від компанії Novagen, Madison, WI) вирощують і підтримують у безсироватковому живильному середовищі Sf900II (Life Technologies), що містить 50 МЕ/мл пеніциліну і 50 мг/мл стрептоміцину (Life Technologies). Клітини комахи Trichoplusia ni (High Five) (одержані від Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France), підтримують у середовищі TC100 (Life Technologies), що містить 10 % FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France), доповненому 50 МЕ/мл пеніциліну і 50 мг/мл стрептоміцину. Рекомбінантні бакуловіруси одержують за допомогою системи Bac-to-Bac (Life Technologies). Бакмідну ДНК очищають за допомогою системи очищення Qiagen midiprep (Qiagen) і використовують для трансфекції клітин комах Sf9, використовуючи селфектин у середовищі Sf900 II SFM (Life Technologies), згідно з протоколом виробника. Рекомбінантні вірусні частинки збирають через 4 дні, титрують методом вірусних бляшок і ампліфікують, як описано в King and Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman and Hall Ltd., London, pp.111-114, 1992.

Клітини High Five ($1,75\times10^7$ клітин/175-см^2 тканинної культури в колбі) інфікували рекомбінантними вірусами, що містять поліпептиди MASP-2, шляхом множинного інфікування, 2 рази, у середовищі Sf900 II SFM при 28 °C протягом 96 годин. Супернатанти збирали центрифугуванням і додавали діізопропілфосфорофлуоридат до одержання кінцевої концентрації 1 мМ.

Поліпептиди MASP-2 секретувалися у клітинній культурі в живильне середовище. Культуральні супернатанти піддавали діалізу проти 50 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$, 50 мМ триетаноламіну гідрохлориду, pH 8,1, і завантажували зі швидкістю 1,5 мл/хв. у колонку Q-Sepharose Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) ($2,8\times12$ см), зрівноважену тим же буфером. Елюювання проводили, використовуючи 1,2 літра лінійного градієнта в 350 мМ NaCl у цьому ж буфері. Фракції, що містять рекомбінантні поліпептиди MASP-2, ідентифікували вестерн-блот-аналізом, осаджували шляхом додавання $(NH_4)_2SO_4$ до 60 % (по вазі) і залишали на ніч при 4 °C. Осади ресуспендували в 145 мМ NaCl, 1 мМ $CaCl_2$, 50 мМ триетаноламіну гідрохлориду, pH 7,4, і вносили в колонку TSK G3000 SWG ($7,5\times600$ мм) (Tosohaas, Montgomeryville, PA), зрівноважену тим же буфером. Потім очищені поліпептиди концентрували до 0,3 мг/мл методом ультрафільтрації в мікроконцентраторах Microsep (порогове значення MW=10000) (Fiitron, Karlstein, Germany).

ПРИКЛАД 4

У цьому прикладі описане одержання поліклональних антитіл до MASP-2 поліпептидів.

Матеріали і методи

MASP-2 антигени

Поліклональну антисироватку проти людського MASP-2 одержували імунізацією кроликів наступними виділеними поліпептидами MASP-2: людський MASP-2 (SEQ ID NO:6), виділений із сироватки; рекомбінантний людський MASP-2 (SEQ ID NO:6), MASP-2A, що містить неактивний домен протеази (SEQ ID NO:13), описаний у прикладі 3; і рекомбінантні CUBI (SEQ ID NO:8), CUBEGFI (SEQ ID NO:9) і CUBEGFCUBII (SEQ ID NO:10), експресовані, як описано в прикладі 3.

Поліклональні антитіла

Шеститижневих кроликів, примованих BCG (вакциною проти бацили Кальметта-Герена), імунізували шляхом введення у вигляді ін'єкції 100 мкг поліпептиду MASP-2 у концентрації 100 мкг/мл у фізіологічному розчині. Ін'єкції здійснювали кожні 4 тижні титром антитіл, який відслідковували методом ІФА, як описано в прикладі 5. Культуральні супернатанти збирали для очищення антитіл за допомогою афінної хроматографії з білком А.

ПРИКЛАД 5

У цьому прикладі описаний спосіб одержання мишачих моноклональних антитіл проти щурячих або людських поліпептидів MASP-2.

Матеріали і методи

Самцям мишей лінії A/J (Harlan, Houston, Tex.) у віці 8-12 тижнів підшкірно вводили 100 мкг людських або щурячих поліпептидів rMASP-2 або rMASP-2A (одержаних, як описано в прикладі 3) у повному ад'юванті Фрейнда (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) в 200 мкл забуференого фосфатом фізіологічного розчину (PBS), pH 7,4. Миші двічі одержували підшкірні ін'єкції 50 мкг людського або щурячого поліпептиду rMASP-2 або rMASP-2A у неповному ад'ювантні Фрейнда із двотижневими інтервалами. На четвертому тижні миші одержували ін'єкцію 50 мкг людського або щурячого поліпептиду rMASP-2 або rMASP-2A в PBS, і через 4 дні миші були використані для злиття.

Для кожного злиття приготовляли одноклітинні суспензії із селезінки імунізованої миші і використовували для злиття з Sp2/0 клітинами мієломи. Злиття 5×10^8 клітин Sp2/0 і 5×10^8 клітин селезінки здійснювали в середовищі, що містить 50 % поліетиленгліколю (M.W. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) і 5 % диметилсульфоксиду (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). Потім концентрацію клітин доводили до $1,5\times10^5$ клітин селезінки в 200 мкл суспензії в середовищі Iscove (Gibco, Grand Island, N.Y.), доповненому 10 % фетальної сироватки, 100 Од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину, 0,1 мМ гіпоксантину, 0,4 мкМ аміноптерину і 16 мкМ тимідину. Двісті мікролітрів клітинної суспензії додавали в кожну ямку із приблизно двадцяти 96-ямкових мікропланшетів. Через десять днів методом ІФА виконували скринінг культуральних супернатантів на їх здатність вступати в реакцію з очищеним фактором MASP-2.

Аналіз ІФА

Ямки мікропланшетів Immunol® 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) покривали шляхом додавання 50 мкл очищеного hMASP-2 або щурячого rMASP-2 (або rMASP-2A) з концентрацією 50 нг/мл протягом ночі при кімнатній температурі. Низька концентрація MASP-2 для покриття забезпечує можливість для відбору високоафінних антитіл. Після видалення розчину для покриття шляхом струшування планшета, у кожну ямку на одну годину для блокування

неспецифічних сайтів додавали 200 мкл BLOTTO (знежирене сухе молоко) в PBS. Через годину ямки промивали буфером PBST (PBS з вмістом 0,05 % Твін 20). П'ятдесят мікролітрів культуральних супернатантів від кожного злиття збирали і змішували з 50 мкл BLOTTO і потім додавали в окремі ямки мікропланшетів. Через годину інкубації ямки промивали PBST. Потім зв'язані мишачі антитіла детектували за допомогою реакції з козячими антимишачими IgG (Fc-специфічними), кон'югованими з пероксидазою хрону (HRP) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.), і розбавляли у співвідношенні 1:2000 в BLOTTO. Розчин субстрату пероксидази, що містить 0,1 % 3,3,5,5-тетраметилбензидину (Sigma, Louis, Mo.) і 0,0003 % перекису водню (Sigma), додавали в ямки і залишали на 30 хвилин для проявлення забарвлення. Реакцію завершували додаванням у кожну ямку 50 мкл 2M H_2SO_4. Оптичну густину реакційної суміші при 450 нм визначали за допомогою приладу BioTek ELISA Reader (BioTek® Instruments, Winooski, Vt.).

Аналіз зв'язування MASP-2

Культуральні супернатанти, що дали позитивний результат в аналізі MASP-2 методом ІФА, як описано вище, можуть бути протестовані в аналізі зв'язування для визначення спорідненості зв'язування інгібуючих MASP-2 агентів з MASP-2. Аналогічний аналіз може бути використаний для визначення здатності інгібуючого агента зв'язуватися з іншими антигенами в системі комплементу.

Ямки полістирольного мікропланшета (96-ямкові планшети для зв'язування середовища, Corning Costar, Cambridge, MA) покривали MASP-2 (20 нг/100 мкл на ямку, Advanced Research Technology, San Diego, CA) у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS), pH 7,4, протягом ночі при 4 °C. Після видалення розчину MASP-2 ямки блокували PBS, що містить 1 % бичачого сироваткового альбуміну (BSA; Sigma Chemical), протягом 2 годин при кімнатній температурі. Ямки без покриття MASP-2 використовували як контроль. У ямки додавали аліквоти гібридомних супернатантів або очищених анти-MASP-2 MoAb зі змінною концентрацією в блокувальному розчині. Після двогодинної інкубації при кімнатній температурі ямки рясно промивали PBS. MASP-2-зв'язане анти-MASP-2 MoAb детектували шляхом додавання кон'югованих з пероксидазою козячих антимишачих IgG (Sigma Chemical) у блокувальний розчин, який інкубували 1 годину при кімнатній температурі. Планшет знову обполіскували PBS, після чого додавали 100 мкл субстрату 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (TMB) (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). Реакцію TMB зупиняли шляхом додавання 100 мкл 1M фосфорної кислоти, і планшет зчитували при 450 нм за допомогою пристрою зчитування мікропланшетів (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Потім культуральні супернатанти з позитивних ямок тестували на здатність пригнічувати активацію комплементу у функціональному аналізі, такому як аналіз розщеплення C4, як описано в прикладі 2. Після цього, клітини з позитивних ямок клонували методом серійних розведень. MoAb знову тестували методом ІФА на їх здатність вступати в реакцію з hMASP-2, як описано вище. Відібрані гібридоми вирощували в обертових колбах, і виснажений культуральний супернатант збирали для очищення антитіл за допомогою афінною хроматографії з білком A.

ПРИКЛАД 6

У цьому прикладі описане одержання і продукування гуманізованих мишачих анти-MASP-2 антитіл і фрагментів антитіл.

Мишаче анти-MASP-2 моноклональне антитіло одержували у самців мишей лінії A/J, як описано в прикладі 5. Потім мишаче антитіло піддавали процесу гуманізації, як описано нижче, для зменшення його імуногенності шляхом заміни мишачих константних областей людськими аналогами з одержанням химерного IgG і Fab-фрагмента антитіла, який може бути використаний для пригнічення побічних ефектів MASP-2-залежної активації комплементу у людей, відповідно до даного винаходу.

1. Клонування генів варіабельних областей анти-MASP-2 із клітин мишачої гібридоми

Загальну РНК виділяли із клітин гібридоми, секретуючих анти-MASP-2 MoAb (одержаної, як описано в прикладі 7), використовуючи RNAzol, відповідно до протоколу виробника (Biotech, Houston, Tex). Перший ланцюг кДНК синтезували на основі загальної РНК, використовуючи оліго-dT як праймер. ПЛР виконували, використовуючи 3'-праймери, одержані з константної C-області імуноглобуліну, і набори вироджених праймерів, одержаних з лідерного пептиду або першої каркасної області генів мишачих V_H або V_K, як 5'-праймерів. Заякорену ПЛР виконували, як описано в Chen і Platsucas (Chen P.F, Scand. J. Immunol. 35:539-549, 1992). Для клонування гена V_K одержували дволанцюжкову кДНК за допомогою праймера Not1-MAK1 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO:38). Піддані відпалу адаптери AD1 (5'-GGAATTCACTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO:39) і AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID

NO:40) лігували з обома 5'- і 3'-кінцями дволанцюжкової кДНК. Адаптери на 3'-кінцях видаляли шляхом розщеплення Not1. Потім продукт розщеплення використовували як матрицю в ПЛР з олігонуклеотидом AD1 як 5'-праймером і MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO:41) як 3'-праймером. Фрагменти ДНК довжиною приблизно 500 пара основ клонували у вектор pUC19. Декілька клонів відбирали для аналізу послідовності для підтвердження того, що клонована послідовність охоплює необхідну константну область мишачого імуноглобуліну. Олігонуклеотиди Not1-MAK1 і MAK2 одержували з області V_K і розташовували на ділянках 182 і 84 п.о., відповідно, нижче від першої пари основ гена C-kappa. Відбирали клони, які містили повнорозмірний V_K і лідерний пептид.

Для клонування гена V_H одержували дволанцюжкову кДНК за допомогою праймера Not1-MAG1 (1'-CGCGGCCGCAGCTGCTCAGAGTGTAGA-5' SEQ ID NO:42). Піддані відпалу адаптери AD1 і AD2 лігували з обома 5'- і 3'-кінцями дволанцюжкової кДНК. Адаптери на 3'-кінцях видаляли шляхом розщеплення Not1. Потім продукт розщеплення використовували як матрицю в ПЛР з олігонуклеотидом AD1 і MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO:43) як праймерами. Фрагменти ДНК розміром від 500 до 600 п.о. клонували в pUC19. Олігонуклеотиди Not1-MAG1 і MAG2 одержували з мишачої області Cγ.7.1 і розташовували на ділянках 180 і 93 п.о., відповідно, нижче від першої пари основ у гені мишачого Cγ.7.1. Відбирали клони, які містили повнорозмірний V_H і лідерний пептид.

2. Конструювання векторів експресії для химерного MASP-2 IgG і Fab

Клоновані гени V_H і V_K, описані вище, використовували як матрицю в реакції ПЛР для додавання консенсусної послідовності Козака до 5'-кінця і донора сплайсингу до 3'-кінця нуклеотидної послідовності. Після аналізу послідовностей на відсутність ПЛР-помилок гени V_H і V_K вбудовували в касети векторів експресії, що містять людський C.γ1 і C.kappa, відповідно, з одержанням pSV2neoVH-huCγ1 і pSV2neoV-huCγ. Очищені в градієнті CsCl плазмідні ДНК векторів важкого і легкого ланцюгів використовували для трансфекції клітин COS методом електропорації. Через 48 годин інкубації культуральний супернатант тестували методом ІФА для підтвердження наявності приблизно 200 нг/мл химерного IgG. Із зібраних клітин виділяли тотальну РНК. Перший ланцюг кДНК синтезували на основі тотальної РНК, використовуючи оліго-dT як праймер. Цю кДНК використовували як матрицю в ПЛР для одержання ДНК-фрагментів для Fd і kappa. Для гена Fd виконували ПЛР, використовуючи 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAACT-3' (SEQ ID NO:44) як 5'-праймер і 3'-праймер, виділений з CH1 (5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO:45). Підтверджували, що послідовність ДНК містить повноцінний V_H і домен CH1 людського IgG1. Після проведення розщеплення відповідними ферментами фрагменти ДНК для Fd вбудовували в сайти рестрикції HindIII і BamHI у касеті вектора експресії pSV2dhfr-TUS для одержання pSV2dhfrFd. Плазміда pSV2 є комерційно доступною і складається із сегментів ДНК, одержаних з різних джерел: ДНК pBR322 (тонка лінія) містить сайт початку реплікації ДНК pBR322 (pBR ori) і ген стійкості лактамази до ампіциліну (Amp); ДНК SV40, показана широкими штрихами і маркуванням, містить сайт початку реплікації ДНК SV40 (SV40 ori), ранній промотор (5' до генів dhfr і neo) і сигнал поліаденілювання (3' до генів dhfr і neo). Сигнал поліаденілювання, одержаний з SV40 (pA), також поміщали на 3'-кінець гена Fd.

Для гена kappa проводили ПЛР, використовуючи 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO:46) як 5'-праймер і 3'-праймер, одержаний з C_K (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO:47). Підтверджували, що послідовність ДНК містить ділянки повнорозмірного V_K і людського C_K. Після розщеплення відповідними ферментами рестрикції ДНК фрагменти для kappa вбудовували в сайти рестрикції HindIII і BamHI у касеті вектора експресії pSV2neo-TUS з одержанням pSV2neoK. Експресію обох генів Fd і kappa ініціювали за допомогою енхансера і промотору, одержаних з HCMV. Оскільки ген Fd не включає залишок цистеїнової амінокислоти, що бере участь в утворенні дисульфідного зв'язку між ланцюгами, цей рекомбінантний химерний Fab містить нековалентним чином зв'язані важкі і легкі ланцюги. Цей химерний Fab позначений як cFab.

Для одержання рекомбінантного Fab з дисульфідним зв'язком між важким і легким ланцюгами, вищевказаний ген Fd може бути подовжений шляхом включення послідовності, кодуючої дев'ять додаткових амінокислот (EPKSCDKTH SEQ ID NO:48) із шарнірної області людського IgG1. Сегмент ДНК BstEII-BamHI, кодуючий 30 амінокислот на 3'-кінці гена Fd, може бути заміщений сегментами ДНК, кодуючими подовжений Fd, що в результаті дає pSV2dhfrFd/9aa.

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

Для одержання клітинних ліній, секретуючих химерний анти-MASP-2 IgG, клітини NSO

трансфікували очищеними ДНК-плазмідами pSV2neoVH-huC.γ1 і pSV2neoV-huC-kappa методом електропорації. Трансфіковані клітини відбирали в присутності 0,7 мг/мл G418. Клітини вирощували в 250 мл обертовій колбі з середовищем, що містить сироватку.

Культуральний супернатант, одержаний після центрифугування 100 мл культури, завантажували в 10 мл колонку PROSEP-A (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.). Колонку промивали 10 об'ємами шару PBS. Зв'язане антитіло елюювали 50 мМ цитратним буфером, pH 3,0. Рівний об'єм 1М Hepes, pH 8,0, додавали до фракції, що містить очищене антитіло, для доведення pH до 7,0. Залишкові солі видаляли шляхом заміни буфера на PBS методом ультрафільтрації через мембрану Millipore (порогове значення MW: 3000). Концентрацію білка очищеного антитіла визначали методом BCA (Pierce).

4. Експресія і очищення химерного анти-MASP-2 Fab

Для одержання клітинних ліній, секретуючих химерні анти-MASP-2 Fab, клітини CHO трансфікували очищеними ДНК-плазмідами pSV2dhfrFd (або pSV2dhfrFd/9aa) і pSV2neokappa методом електропорації. Трансфіковані клітини відбирали в присутності G418 і метотрексату. Відібрані клітинні лінії розмножували при підвищених концентраціях метотрексату. Клітини були представлені одиночними клітинами, субклонованими методом серійних розведень. Потім високопродуктивні клітинні лінії, одержані від субклонованих одиночних клітин, вирощували в 100 мл культури в безсироватковому середовищі при постійному перемішуванні.

Химерне анти-MASP-2 Fab очищали методом афінної хромотографії з використанням мишачого антиідіотипічного MoAb до MASP-2 MoAb. Антиідіотипічне MASP-2 MoAb може бути одержане шляхом імунізації мишей мишачим анти-MASP-2 MoAb, кон'югованим з гемоціаніном фісурели (KLH), а потім піддане скринінгу на специфічне зв'язування з MoAb, яке може конкурувати з людським MASP-2. Для очищення, 100 мл супернатанту з культури клітин CHO, продукуючих cFab або cFab/9aa, завантажували в афінну колонку зі зв'язаним антиідіотипічним MASP-2 MoAb. Потім колонку ретельно промивали PBS до елюції зв'язаного Fab 50 мМ діетиламіном, pH 11,5. Залишкові солі видаляли шляхом заміни буфера, як описано вище. Концентрацію білка очищеного Fab визначали методом BCA (Pierce).

Здатність химерних MASP-2 IgG, cFab і cFab/9aa пригнічувати MASP-2-залежний шлях активації комплементу може бути визначена шляхом аналізу пригнічення, описаного в прикладі 2.

ПРИКЛАД 7

У цьому прикладі описаний аналіз розщеплення C4 in vitro, використовуваний як функціональний скринінг для ідентифікації інгібуючих MASP-2 агентів, здатних пригнічувати MASP-2-залежну активацію, за допомогою L-фіколіну/P35, H-фіколіну, M-фіколіну або манану.

Аналіз розщеплення C4

Аналіз розщеплення C4 описаний в Petersen, et al., J. Immunol. Methods, 257:107 (2001), у якому вимірювали активацію лектинового шляху, ініційовану ліпотейхоєвою кислотою (LTA) з S. aureus, яка зв'язується з L-фіколіном.

Реагенти

Фіксований у формаліні препарат S. aureous (DSM20233) приготовляли наступним чином: бактерії вирощували протягом ночі при 37 °C у середовищі на основі триптон-соєвого агару з додаванням крові, тричі промивали PBS, потім фіксували протягом 1 години при кімнатній температурі в PBS/0,5 % формалін і тричі відмивали PBS перед ресуспендуванням у буфері для іммобілізації (15 мМ Na_2CO_3, 35 мМ $NaHCO_3$, pH 9,6).

Аналіз

Ямки мікропланшета Nunc MaxiSorb (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) покривали 100 мкл препарату фіксованого у формаліні S. aureus DSM20233 (00550=0,5) у буфері для іммобілізації з 1 мкг L-фіколіну. Після інкубації протягом ночі ямки блокували 0,1 % розчином сироваткового альбуміну людини (HSA) в TBS (10 мМ Tris-HCl, 140 мМ NaCl, pH 7,4), потім промивали TBS, що містить 0,05 % Твін 20 і 5 мМ $CaCl_2$ (промивальний буфер). Зразки людської сироватки розчиняли в 20 мМ Tris-HCl, 1М NaCl, 10 мМ $CaCl_2$, 0,05 % Triton X-100, 0,1 % HSA, pH 7,4, який попереджав активацію ендогенного C4 і приводив до дисоціації комплексу C1 (що складається з C1q, C1r і C1s). Інгібуючі MASP-2 агенти, включаючи анти-MASP-2 MoAb і інгібуючі пептиди, додавали до зразків сироватки в різних концентраціях. Розведені зразки наносили на планшет і інкубували протягом ночі при 4 °C. Через 24 години планшети ретельно промивали промивальним буфером, потім у кожну ямку додавали 0,1 мкг очищеного людського C4 (одержаного, як описано в Dodds A.W., Methods Enzymol. 223:46, 1993) в 100 мкл 4 мМ барбіталу, 145 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, pH 7,4. Через 1,5 години інкубації при 37 °C планшети знову промивали, і визначали відкладення C4b, використовуючи кон'югований з лужною фосфатазою курячий антилюдський C4c (Immunsystem, Uppsala, Sweden), і вимірювали

колориметричним методом за допомогою субстрату п-нітрофенілфосфат.

Аналіз С4 на манані

Вищеописаний аналіз адаптували для вимірювання активації лектинового шляху за допомогою MBL шляхом покривання планшета ЛПС і мананом перед додаванням сироватки, змішаної з різними інгібуючими MASP-2 агентами.

Аналіз С4 по Н-фіколіну (Hakata Ag)

Вищеописаний аналіз адаптували для вимірювання активації лектинового шляху за допомогою Н-фіколіну шляхом покривання планшета ЛПС і Н-фіколіном перед додаванням сироватки, змішаної з різними інгібуючими MASP-2 агентами.

ПРИКЛАД 8

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

Методи

Імунні комплекси одержували in situ шляхом покривання мікропланшетів (MaxiSorb, Nunc, кат. № 442404, Fisher Scientific) 0,1 % розчином людського сироваткового альбуміну в 10 мМ Tris, 140 мМ NaCl, pH 7,4, протягом 1 години при кімнатній температурі з наступною інкубацією протягом ночі при 4 °С з овечою антицільною антисироваткою (Scottish Antibody Production Unit, Carluke, Scotland), розведеною у співвідношенні 1:1000 сумішшю TBS/Твін/Ca^{2+}. Зразки сироватки одержували від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей і додавали в покриті планшети. Приготовляли контрольні зразки, у яких С1q витягали зі зразків сироватки мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей. Мишачу сироватку, збіднену по С1q, приготовляли за допомогою зв'язаних з білком А мікросфер Dynabeads® (Dynal Biotech, Oslo, Norway), покритих кролячими антилюдськими IgG С1q (Dako, Glostrup, Denmark), відповідно до інструкцій виробника. Планшети інкубували протягом 90 хвилин при 37 °С. Зв'язаний С3b детектували за допомогою поліклональних антилюдських С3с антитіл (Dako A 062), розведених в TBS/Твін/Ca^{++} у співвідношенні 1:1000. Вторинне антитіло являло собою козячі антикролячі IgG.

Результати

На фіг. 9 показані відносні рівні відкладення С3b на покритих IgG планшетах у сироватці дикого типу, сироватці MASP-2-/-, збідненій по С1q сироватці дикого типу і збідненій по С1q сироватці MASP-2-/-. Ці результати свідчать про те, що у мишей лінії MASP-2-/- класичний шлях залишається незачепленим.

ПРИКЛАД 9

Наступний аналіз використовували для перевірки здатності інгібуючого MASP-2 агента блокувати класичний шлях активації шляхом вивчення дії інгібуючого MASP-2 агента в умовах ініціації класичного шляху імунними комплексами.

Методи

Для оцінки дії інгібуючого MASP-2 агента в умовах активації комплементу, при яких ініціація класичного шляху здійснюється імунними комплексами, три зразки сироватки, по 50 мкл кожний, що містили 90 % NHS, інкубували при 37 °С у присутності 10 мкг/мл імунного комплексу (IC) або PBS, і паралельно інкубували ще три зразки (+/-IC), що містять 200 нМ анти-пропердин моноклональних антитіл, при 37 °С. Після двогодинної інкубації при 37 °С в усі зразки додавали 13 мМ ЕДТО для зупинення подальшої активації комплементу, після чого всі зразки негайно охолоджували до 5 °С. Потім зразки зберігали при -70 °С до моменту їх використання в аналізі на продукти активації комплементу (С3а і sC5b-9) за допомогою набору ІФА (Quidel, кат. №№ А015 і А009), відповідно до інструкцій виробника.

ПРИКЛАД 10

У цьому прикладі описана ідентифікація високоафінних фрагментів Fab2 анти-MASP-2 антитіл, блокуючих активність MASP-2.

Передумови і обґрунтування

MASP-2 являє собою білковий комплекс з множиною окремих функціональних доменів, включаючи: ділянку (ділянки) зв'язування для MBL і фіколінів, каталітичну ділянку серинової протеази, ділянку зв'язування для протеолітичного субстрату С2, ділянку зв'язування для протеолітичного субстрату С4, ділянку розщеплення MASP-2 для самоактивації зимогену MASP-2 і дві Ca^{++}-зв'язувальні ділянки. Ідентифіковані фрагменти Fab2 антитіл, які є високоафінними відносно MASP-2, і ці ідентифіковані Fab2-фрагменти були протестовані у функціональному аналізі для визначення їх здатності блокувати функціональну активність MASP-2.

Для блокування функціональної активності MASP-2 антитіло або Fab2-фрагмент антитіла має зв'язуватися або інтерферувати зі структурним епітопом на MASP-2, який необхідний для функціональної активності MASP-2. Отже, багато які або всі високоафінні зв'язуючі анти-MASP-

2 Fab2 не мають здатності пригнічувати функціональну активність MASP-2, якщо вони не зв'язуються зі структурними епітопами на MASP-2, які беруть безпосередню участь у функціональній активності MASP-2.

Функціональний аналіз по вимірюванню пригнічення утворення С3-конвертази лектинового шляху використовували для оцінки "блокувальної активності" анти-MASP-2 Fab2. Відомо, що первинна фізіологічна роль MASP-2 в активації комплементу по лектиновому шляху полягає в утворенні наступного функціонального компонента лектинзалежної активації комплементу, відомого як С3-конвертаза лектинового шляху. С3-конвертаза лектинового шляху являє собою критичний ферментний комплекс (C4bC2a), який здійснює протеолітичне розщеплення С3 на С3а і С3b. MASP-2 не є структурним компонентом С3-конвертази лектинового шляху (C4bC2a); однак функціональна активність MASP-2 необхідна для утворення двох білкових компонентів (C4b, C2a), які містять С3-конвертазу лектинового шляху. Крім того, усі окремі види функціональної активності MASP-2, перераховані вище, є необхідними для утворення за участі MASP-2 С3-конвертази лектинового шляху. Із цієї причини переважним способом аналізу для оцінки "блокувальної активності" анти-MASP-2 Fab2 вважається функціональний аналіз, який дозволяє виконувати вимірювання пригнічення утворення С3-конвертази лектинового шляху.

Утворення високоафінних Fab2

Для створення високоафінних Fab2 до щурячого білка MASP-2 (SEQ ID NO:55) використовували бібліотеку фагового дисплея послідовностей легкого і важкого ланцюгів людського антитіла і автоматизовану технологію відбору антитіл для ідентифікації Fab2, які реагують з вибраними лігандами, що представляють інтерес. Відому кількість щурячого білка MASP-2 (~1 мг, >85 % чистоти) використовували для скринінгу антитіл. Для відбору антитіл з найкращою спорідненістю використовували три цикли ампліфікації. Для скринінгу методом ІФА відбирали приблизно 250 різних варіантів, експресуючих фрагменти антитіл. Високоафінні варіанти надалі секвенували для визначення унікальності різних антитіл.

П'ятдесят унікальних анти-MASP-2 антитіл очищали, і 250 мкг кожного очищеного антитіла Fab2 використовували для характеристики спорідненості зв'язування MASP-2 і функціонального тестування шляху комплементу, як описано більш докладно нижче.

Аналізи, використовувані для оцінки пригнічувальної (блокувальної) активності анти-MASP-2 Fab2

1. Аналіз для вимірювання пригнічення утворення С3-конвертази лектинового шляху

Передумови

С3-конвертаза лектинового шляху являє собою ферментативний комплекс (C4bC2a), який здійснює протеолітичне розщеплення С3 на два потенційні прозапальні фрагменти, анафілатоксин С3а і опсонін С3b. Утворення С3-конвертази є ключовим етапом у лектиновому шляху з точки зору опосередкування запалення. MASP-2 не є структурним компонентом С3-конвертази (C4bC2a) лектинового шляху, тому анти-MASP-2 антитіла (або Fab2) не будуть прямо пригнічувати активність раніше існуючої С3-конвертази. Однак для одержання двох білкових компонентів (C4b, C2a), які містять С3-конвертазу лектинового шляху, потрібна активність серинової протеази MASP-2. Отже, анти-MASP-2 Fab2, які пригнічують функціональну активність MASP-2 (тобто блокують анти-MASP-2 Fab2), будуть пригнічувати de novo утворення С3-конвертази лектинового шляху. С3 містить незвичайну і високореактивну тіоефірну групу у своїй структурі. При розщепленні С3 С3-конвертазою у цьому аналізі тіоефірна група на С3b може утворювати ковалентний зв'язок з гідроксильними групами або аміногрупами на макромолекулах, іммобілізованих на дні пластикових ямок, за допомогою складноефірних або амідних зв'язків, що полегшує виявлення С3b методом ІФА.

Дріжджовий манан відомий як активатор лектинового шляху. У наступному методі вимірювання утворення С3-конвертази пластикові ямки, покриті мананом, інкубували протягом 30 хв. при 37 °С з розведеною щурячою сироваткою для активації лектинового шляху. Потім ямки промивали і аналізували на наявність С3b, іммобілізованого в ямках, стандартними методами ІФА. Кількість С3b, утвореного в цьому аналізі, є прямим відображенням de novo утворення С3-конвертази лектинового шляху. Анти-MASP-2 Fab2 в вибраних концентраціях тестували в цьому аналізі на їх здатність пригнічувати утворення С3-конвертази і наступного утворення С3b.

Методи

96-ямкові планшети Costar Medium Binding інкубували протягом ночі при 5 °С з мананом, розведеним в 50 мМ карбонатному буфері (pH 9,5) у кількості 1,0 мкг/50 мкл/ямку. Після нічної інкубації кожну ямку тричі промивали 200 мкл PBS. Потім ямки блокували 100 мкл/ямку 1 %-ним бичачим сироватковим альбуміном в PBS і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі при легкому помішуванні. Кожну ямку тричі промивали 200 мкл PBS. Зразки анти-

MASP-2 Fab2 розбавляли до вибраних концентрацій буфером GVB, що містить Ca^{++} і Mg^{++} (4,0 мМ барбіталу, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1 % желатин, pH 7,4) при 5 °C. У зазначені вище зразки додавали 0,5 % щурячу сироватку при 5 °C, і по 100 мкл вносили в кожну ямку. Планшети закривали кришкою і інкубували протягом 30 хвилин на водяній бані при 37 °C для активації комплементу. Реакцію зупиняли шляхом перенесення планшетів з водяної бані з температурою 37 °C у контейнер, що містить суміш льоду і води. Кожну ямку промивали п'ять разів 200 мкл PBS-Твін 20 (0,05 % Твін 20 в PBS), потім двічі промивали 200 мкл PBS. Первинне антитіло (кроляче антилюдське C3c, DAKO A0062) з розведенням 1:10000 у кількості 100 мкл/ямку додавали в PBS, що містить 2,0 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі при слабкому перемішуванні. Кожну ямку промивали п'ять разів 200 мкл PBS. Вторинне антитіло (кон'юговане з перксидазою козячого антикролячого IgG, American Qualex A102PU) з розведенням 1:10000 у кількості 100 мкл/ямку додавали в PBS, що містить 2,0 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну, і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі на шейкері при слабкому перемішуванні. Кожну ямку промивали п'ять разів 200 мкл PBS. Пероксидазний субстрат TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) додавали в кількості 100 мкл/ямку і інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Пероксидазну реакцію зупиняли шляхом додавання 1,0М H_3PO_4 у кількості 100 мкл/ямку і вимірювали OD_{450}.

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

Передумови

Активність серинової протеази MASP-2 має високу специфічність, і тільки два білкові субстрати ідентифіковані для MASP-2, C2 і C4. При розщепленні C4 утворюються C4a і C4b. Анти-MASP-2 Fab2 може зв'язуватися зі структурними епітопами на MASP-2, які беруть безпосередню участь у розщеплення C4 (наприклад, MASP-2-зв'язувальна ділянка для C4; MASP-2-каталітична ділянка серинової протеази) і таким чином пригнічують функціональну активність MASP-2, що приводить до розщеплення C4.

Дріжджовий манан відомий як активатор лектинового шляху. В описаному нижче способі вимірювання активності MASP-2 по розщепленню C4, пластикові ямки, покриті мананом, інкубували протягом 30 хвилин при 37 °C з розведеною щурячою сироваткою для активації лектинового шляху. Оскільки первинні антитіла, використані в цьому методі ІФА, розпізнають тільки C4, розведену щурячу сироватку також доповнювали людським C4 (1,0 мкг/мл). Потім ямки промивали і аналізували на наявність людського C4b, іммобілізованого на ямках, стандартними способами ІФА. Кількість утвореного в цьому аналізі C4b є мірою MASP-2-залежної активності розщеплення C4. Анти-MASP-2 Fab2 в вибраних концентраціях тестували в цьому аналізі на їх здатність пригнічувати розщеплення C4.

Методи

96-ямкові планшети Costar Medium Binding інкубували протягом ночі при 5 °C з мананом, розведеним в 50 мМ карбонатному буфері (pH 9,5) у кількості 1,0 мкг/50 мкл/ямку. Кожну ямку промивали три рази 200 мкл PBS. Потім ямки блокували 100 мкл/ямку 1 %-ним бичачим сироватковим альбуміном в PBS і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі при легкому помішуванні. Кожну ямку промивали три рази 200 мкл PBS. Зразки анти-MASP-2 Fab2 розбавляли до вибраних концентрацій буфером GVB, що містить Ca^{++} і Mg^{++} (4,0 мМ барбіталу, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1 % желатин, pH 7,4) при 5 °C. У ці зразки також вводили 1,0 мкг/мл людського C4 (Quidel). У зазначені вище зразки додавали 0,5 % щурячої сироватки при 5 °C, і по 100 мкл вносили в кожну ямку. Планшети закривали кришкою і інкубували протягом 30 хвилин на водяній бані при 37 °C для активації комплементу. Реакцію зупиняли шляхом перенесення планшетів з водяної бані з температурою 37 °C у контейнер, що містить суміш льоду і води. Кожну ямку промивали п'ять разів 200 мкл PBS-Твін 20 (0,05 % Твін 20 в PBS), потім кожну ямку двічі промивали 200 мкл PBS. Кон'югований з біотином курячий антилюдський C4 (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden) з розведенням 1:700 у кількості 100 мкл/ямку додавали в PBS, що містить 2,0 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA), і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі при слабкому перемішуванні. Кожну ямку промивали п'ять разів 200 мкл PBS. 0,1 мкг/мл кон'югованого з пероксидазою стрептавідину (Pierce Chemical #21126) у кількості 100 мкл/ямку додавали в PBS, що містить 2,0 мг/мл BSA, і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі на шейкері при слабкому перемішуванні. Кожну ямку промивали п'ять разів 200 мкл PBS. Пероксидазний субстрат TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) додавали в кількості 100 мкл/ямку і інкубували при кімнатній температурі протягом 16 хвилин. Пероксидазну реакцію зупиняли шляхом додавання 1,0М H_3PO_4 у кількості 100 мкл/ямку і вимірювали OD_{450}.

3. Аналіз зв'язування антищурячого MASP-2 Fab2 з нативним щурячим MASP-2

Передумови

MASP-2 звичайно присутній у плазмі у формі димерних комплексів MASP-2, які також включають специфічні лектинові молекули (манозозв'язувальний білок (MBL) і фіколіни). Як наслідок, при наявності інтересу до вивчення зв'язування анти-MASP-2 Fab2 з фізіологічно релевантною формою MASP-2, важливо розробити аналіз зв'язування, у якому використовується взаємодія Fab2 не з очищеним рекомбінантним MASP-2, а з нативним MASP-2 у плазмі. У такому аналізі зв'язування нативний комплекс MASP-2-MBL з 10 %-ної щурячої сироватки спочатку іммобілізують у ямках, покритих мананом. Потім вивчають спорідненість зв'язування різних анти-MASP-2 Fab2 відносно іммобілізованого нативного MASP-2 стандартним методом ІФА.

Методи

96-ямкові планшети Costar High Binding інкубували протягом ночі при 5 °C з мананом, розведеним в 50 мМ карбонатному буфері (pH 9,5) у кількості 1 мкг/50 мкл/ямку. Кожну ямку промивали три рази 200 мкл PBS. Ямки блокували 0,5 % знежиреним сухим молоком в PBST (PBS з 0,05 % Твін 20) у кількості 100 мкл/ямку і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі при легкому помішуванні. Кожну ямку промивали три рази 200 мкл промивального буфера TBS/Твін/Ca^{++} (фізіологічний розчин, забуферений Tріс, 0,05 % Твін 20, що містить 5,0 мМ $CaCl_2$, pH 7.4). На льоду приготовляли 10 % щурячу сироватку в буфері іммобілізації з високим вмістом солі (20 мМ Tris, 1,0М NaCl, 10 мМ $CaCl_2$, 0,05 % Triton X100, 0,1 % (в/о) бичачий сироватковий альбумін, pH 7,4). 100 мкл/ямку додавали і інкубували протягом ночі при 5 °C. Ямки промивали три рази 200 мкл промивального буфера TBS/Твін/Ca^{++}. Потім ямки промивали два рази 200 мкл PBS. 100 мкл/ямку вибраної концентрації анти-MASP-2 Fab2, розведених у буфері GVB, що містить Ca^{++} і Mg^{++} (4,0 мМ барбітал, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1 % желатин, pH 7,4), додавали і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі при слабкому перемішуванні. Кожну ямку промивали п'ять разів 200 мкл PBS. Кон'юговані з HRP козячі анти-Fab2 (Biogenesis кат. № 0500-0099), розведені у співвідношенні 1:5000 в 2,0 мг/мл бичачого сироваткового альбуміну в PBS, додавали в кількості 100 мкг/ямку і інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі при слабкому перемішуванні. Кожну ямку промивали п'ять разів 200 мкл PBS. Пероксидазний субстрат TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories) додавали в кількості 100 мкл/ямку і інкубували при кімнатній температурі протягом 70 хвилин. Пероксидазну реакцію зупиняли шляхом додавання 1,0М H_3PO_4 у кількості 100 мкл/ямку і вимірювали OD_{450}.

Результати

Приблизно 250 різних Fab2, які реагували з високою спорідненістю з щурячим білком MASP-2, відбирали для скринінгу методом ІФА. Ці високоафінні Fab2 секвенували для визначення унікальності різних антитіл, і 50 унікальних анти-MASP-2 антитіл очищали для подальшого аналізу. 200 мкг кожного очищеного антитіла Fab2 використовували для характеристики спорідненості зв'язування MASP-2 і функціонального тестування шляху комплементу. Результати цього аналізу представлені нижче в Таблиці 6.

ТАБЛИЦЯ 6

АНТИ-MASP-2 FAB2, БЛОКУЮЧІ АКТИВАЦІЮ КОМПЛЕМЕНТУ ПО ЛЕКТИНОВОМУ ШЛЯХУ

№ антитіла Fab2	C3-конвертаза IC_{50} (нМ)	K_d	Розщеплення C4 IC_{50} (нМ)
88	0,32	4,1	ND
41	0,35	0,30	0,81
11	0,46	0,86	<2 нМ
86	0,53	1,4	ND
81	0,54	2,0	ND
66	0,92	4,5	ND
57	0,95	3,6	<2 нМ
40	1,1	7,2	0,86
58	1,3	2,6	ND
60	1,6	3,1	ND
52	1,6	5,8	<2 нМ
63	2,0	6,6	ND
49	2,8	8,5	<2 нМ

ТАБЛИЦЯ 6

АНТИ-MASP-2 FAB2, БЛОКУЮЧІ АКТИВАЦІЮ КОМПЛЕМЕНТУ ПО ЛЕКТИНОВОМУ ШЛЯХУ

№ антитіла Fab2	C3-конвертаза IC_{50} (нМ)	K_d	Розщеплення C4 IC_{50} (нМ)
89	3,0	2,5	ND
71	3,0	10,5	ND
87	6,0	2,5	ND
67	10,0	7,7	ND

Як показано вище в таблиці 6, з 50 протестованих анти-MASP-2 Fab2 сімнадцять Fab2 були ідентифіковані як Fab2, блокуючі MASP-2, які потенційно можуть пригнічувати утворення C3-конвертази з IC_{50}, що дорівнює або менше 10 нмоль Fab2 (34 %-ний позитивний коефіцієнт успіху). Вісім із сімнадцяти ідентифікованих Fab2 мають значення IC_{50} у субнаномолярній області. Крім цього, усі сімнадцять Fab2, що блокують MASP-2, показані в таблиці 6, по суті демонструють повне пригнічення утворення C3-конвертази в аналізі C3-конвертази лектинового шляху. На фіг. 8A графічно показані результати аналізу утворення C3-конвертази для антитіла Fab2 № 11, яке є типовим представником протестованих антитіл Fab2, результати яких наведені в таблиці 6. Цей факт є важливим, оскільки він передбачає теоретичну можливість того, що "блокуюче" Fab2 може тільки частково пригнічувати функцію MASP-2, навіть коли кожна молекула MASP-2 зв'язується з Fab2.

Хоча манан є відомим активатором лектинового шляху, існує теоретична можливість того, що наявність анти-мананових антитіл у щурячій сироватці також може активувати класичний шлях і генерувати C3b за допомогою C3-конвертази класичного шляху. Однак кожне із сімнадцяти блокуючих анти-MASP-2 Fab2, перерахованих у цьому прикладі, потенційно може пригнічувати утворення C3b (>95 %), таким чином демонструючи специфічність даного аналізу відносно C3-конвертази лектинового шляху.

Аналіз зв'язування також виконували для всіх сімнадцяти блокуючих Fab2 з метою підрахунку уявного K_d для кожного з них. Результати аналізу зв'язування анти-щурячих MASP-2 Fab2 з нативними щурячими MASP-2 для шести блокуючих Fab2 також представлені в таблиці 6. На фіг. 8B графічно показані результати аналізу зв'язування антитіла Fab2 № 11. Подібний аналіз зв'язування також виконували для інших Fab2, результати яких представлені в таблиці 6. В основному, уявні K_d, одержані для зв'язування кожного із шести Fab2 з нативним MASP-2, повністю відповідають IC_{50} для Fab2 у функціональному аналізі C3-конвертази. Існують докази того, що MASP-2 піддається конформаційним змінам з неактивної в активну форму при активації його протеазної активності (Feinberg et al., EMBO J. 22:2348-59 (2003); Gal et al., J. Biol. Chem. 280:33435-44 (2005)). У нормальній щурячій плазмі, використовуваній в аналізі утворення C3-конвертази, MASP-2 присутній в основному в "неактивній" конформації зимогену. На противагу цьому, в аналізі зв'язування MASP-2 присутній у вигляді частини комплексу з MBL, зв'язаного з іммобілізованим мананом; тому MASP-2 скоріше представлений "активною" конформацією (Petersen et al., J. Immunol. Methods, 257:107-16, 2001). Отже, не слід очікувати чіткого зв'язку між IC_{50} і K_d для кожного із сімнадцяти блокуючих Fab2, протестованих у цих двох функціональних аналізах, оскільки в кожному аналізі Fab2 буде зв'язуватися з різними конформаційними формами MASP-2. Проте, за винятком Fab2 № 88, очевидно існує досить близька відповідність між IC_{50} і уявним K_d для кожного з інших шістнадцяти Fab2, протестованих у двох тестах (див. таблицю 6).

Деякі блокуючі Fab2 оцінювали на здатність пригнічувати MASP-2-залежне розщеплення C4. На фіг. 8C графічно показані результати аналізу розщеплення C4, що демонструють пригнічення у випадку Fab2 № 41, з IC_{50}=0,81 нМ (див. таблицю 6). Як показано на фіг. 9, усі з протестованих Fab2 пригнічували розщеплення C4 зі значеннями IC_{50}, аналогічними тим, які були одержані в аналізі C3-конвертази (див. таблицю 6).

Хоча манан є відомим активатором лектинового шляху, існує теоретична можливість того, що наявність анти-мананових антитіл у щурячій сироватці також може активувати класичний шлях і, таким чином, генерувати C4b за допомогою розщеплення C4, опосередкованого C1s. Однак було ідентифіковано декілька анти-MASP-2 Fab2, які ефективно пригнічували утворення C4b (>95 %), тим самим демонструючи специфічність цього аналізу відносно MASP-2-опосередкованого розщеплення C4. C4, подібно C3, містить у своїй структурі незвичайну і високореактивну тіоефірну групу. У цьому аналізі при розщепленні C4 за участі MASP-2

тіоефірна група на C4b може утворювати ковалентний зв'язок з гідроксильними групами або аміногрупами на макромолекулах, іммобілізованих на дні пластикових ямок, за допомогою складноефірних або амідних зв'язків, що полегшує виявлення C4b методом ІФА.

Ці дослідження наочно демонструють створення високоафінних Fab2 для щурячого білка MASP-2, які функціонально блокують активність як C4-, так і C3-конвертази, тим самим попереджаючи активацію лектинового шляху.

ПРИКЛАД 11

У цьому прикладі описане картування епітопів декількох блокувальних антищурячих MASP-2 антитіл Fab2, одержаних описаним у прикладі 10 способом.

Методи

Як показано на фіг. 10, наступні білки, усі з N-термінальними 6×His-мітками, експресувалися у клітинах CHO за допомогою вектора pED4:

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

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

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

CUBI/EGF-подібний, N-термінальні фрагменти щурячого MASP-2, які містять тільки домени CUBI і EGF-подібний.

Ці білки очищали з культуральних супернатантів нікель-афіною хроматографією, як було описано раніше (Chen et al., J. Biol. Chem. 276:25894-02 (2001)).

C-термінальний поліпептид (CCPII-SP), що містить CCPII і домен серинової протеази щурячого MASP-2, експресували в E. coli у вигляді злитого з тіоредоксином білка за допомогою pTrxFus (Invitrogen). Білок очищали від клітинних лізатів за допомогою афінної смоли Thiobond. Злитий з тіоредоксином білок експресували в порожньому pTrxFus як негативний контроль.

Усі рекомбінантні білки піддавали діалізу в буфері TBS, і їх концентрації визначили шляхом вимірювання OD при 280 нм.

Дот-блот-аналіз

Серійне розведення п'яти рекомбінантних поліпептидів MASP-2, описаних вище і показаних на фіг. 10 (і поліпептид тіоредоксину як негативний контроль для поліпептиду CCPII-серинової протеази), наносили на нітроцелюлозну мембрану. Кількість білка, що наноситься, знаходилася в діапазоні від 100 нг до 6,4 пг, у п'ятикратних розведеннях. У наступних експериментах, кількість білка, що наноситься, знаходилася в діапазоні від 50 нг до 16 пг, також у п'ятикратних розведеннях. Мембрани блокували 5 % знежиреним сухим молоком в TBS (блокувальний буфер), потім інкубували з 1,0 мкг/мл анти-MASP-2 Fab2 у блокувальному буфері (що містить 5,0 мМ Ca^{2+}). Зв'язані Fab2 визначали, використовуючи HRP-кон'юговане антилюдське Fab (AbD/Serotec; розведене в співвідношенні 1/10000) і набір для виявлення ECL (Amersham). Одну мембрану інкубували з поліклональним кролячим антилюдським MASP-2 Ab (описаним в Stover et al., J. Immunol. 163:6848-59 (1999)) як позитивний контроль. У цьому випадку, зв'язане Ab детектували за допомогою HRP-кон'югованого козячого антикролячого IgG (Dako; розведеного у співвідношенні 1/2000).

Аналіз зв'язування MASP-2

Планшети ІФА покривали рекомбінантним MASP-2A або поліпептидом CUBI-II у карбонатному буфері (pH 9,0) у кількості 1,0 мкг на ямку протягом ночі при 4 °C. Ямки блокували 1 % BSA в TBS, потім додавали серійні розведення анти-MASP-2 Fab2 в TBS, що містить 5,0 мМ Ca^{2+}. Планшети інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі. Після потрійного промивання TBS/Твін/Ca^{2+}, додавали HRP-кон'юговане антилюдське Fab (AbD/Serotec), розведене у співвідношенні 1/10000 в TBS/Ca^{2+}, і планшети знову інкубували протягом однієї години при кімнатній температурі. Зв'язане антитіло детектували за допомогою набору TMB, субстрату пероксидази (Biorad).

Результати

Результати дот-блот-аналізу, що демонструють реакційну здатність Fab2 відносно різних поліпептидів MASP-2, представлені нижче в таблиці 7. Числові значення, наведені в таблиці 7, позначають кількість білка, що наноситься, необхідну для одержання сигналу з інтенсивністю приблизно 1/2 від максимального значення. Як можна бачити, позитивне контрольне Ab (сироватка поліклонального антилюдського MASP-2, одержана від кроликів) розпізнавало всі поліпептиди (виключення становить тільки химерний білок тіоредоксину).

ТАБЛИЦЯ 7

РЕАКЦІЙНА ЗДАТНІСТЬ ВІДНОСНО РІЗНИХ РЕКОМБІНАНТНИХ ПОЛІПЕПТИДІВ ЩУРЯЧОГО MASP-2 У ДОТ-БЛОТ-АНАЛІЗІ

№ антитіла Fab2	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/ EGF-подібний	CCPII-SP	Тіреодоксин
40	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
41	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
11	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
49	0,16 нг	NR	NR	>20 нг	NR
52	0,16 нг	NR	NR	0,8 нг	NR
57	0,032 нг	NR	NR	NR	NR
58	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
60	0,4 нг	0,4 нг	NR	NR	NR
63	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
66	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
67	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
71	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
81	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
86	0,4 нг	NR	NR	10 нг	NR
87	0,4 нг	NR	NR	2,0 нг	NR
Позитивний контроль	<0,032 нг	0,16 нг	0,16 нг	<0,032 нг	NR

NR=немає реакції. Позитивне контрольне антитіло являє собою сироватку поліклонального антилюдського MASP-2, одержану від кроликів.

Усі Fab2 вступали в реакцію з MASP-2A, а також з MASP-2K (дані не показані). Більшість Fab2 розпізнавали поліпептид CCPII-SP, але не N-термінальні фрагменти. Виключення представляють Fab2 № 60 і Fab2 № 57. Fab2 № 60 розпізнає MASP-2A і фрагмент CUBI-II, але не розпізнає CUBI/EGF-подібний поліпептид або CCPII-SP поліпептид, що передбачає його зв'язування з епітопом на CUBII, або перекривання CUBII і EGF-подібного домену. Fab2 № 57 розпізнає MASP-2A, при цьому не розпізнає жоден із протестованих фрагментів MASP-2, що вказує на те, що це антитіло Fab2 розпізнає епітоп на CCPI. Fab2 № 40 і № 49 зв'язуються тільки з повним MASP-2A. В аналізі зв'язування ІФА, показаному на фіг. 11, Fab2 № 60 також зв'язувався з поліпептидом CUBI-II, хоча із трохи більш низькою уявною спорідненістю.

Ці результати демонструють унікальну здатність Fab2 блокувати численні ділянки білка MASP-2.

ПРИКЛАД 12

У цьому прикладі описана ідентифікація за допомогою фагового дисплея повністю людських scFv-антитіл, які зв'язуються з MASP-2 і пригнічують опосередковувану лектином активацію комплементу, при цьому не зачіпаючи класичний (C1q-залежний) шлях компонента імунної системи.

Короткий огляд

Повністю людські, високоафінні антитіла MASP-2 ідентифікували шляхом скринінгу бібліотеки фагового дисплея. Фрагменти варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів антитіл виділяли як у форматі scFv, так і у форматі повнорозмірного IgG. Людські антитіла до MASP-2 є корисними для пригнічення клітинного ушкодження, асоційованого з опосередкованою лектином активацією шляху комплементу, при цьому не зачіпаючи класичний (C1q-залежний) шлях компонента імунної системи. У деяких варіантах здійснення представлені інгібуючі MASP-2 антитіла мають наступні характеристики: (a) висока спорідненість до людського MASP-2 (наприклад, K_D=10 нМ або менше) і (b) пригнічують MASP-2-залежну активність комплементу в 90 % людській сироватці з IC_{50}, що дорівнює 30 нМ або менше.

Методи

Експресія повнорозмірного каталітично неактивного MASP-2

Повнорозмірну послідовність кДНК людського MASP-2 (SEQ ID NO:4), кодуючу людський поліпептид MASP-2 з лідерною послідовністю (SEQ ID NO:5), субклонували у вектор експресії pCI-Neo ссавців (Promega), який запускає експресію у еукаріот під керуванням CMV енхансерної/промоторної області (описано в Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research,

19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:531-66 (1991)).

Для одержання каталітично неактивного людського білка MASP-2A здійснювали сайт-спрямований мутагенез, як описано в US 2007/0172483, включеному в даний опис у вигляді посилання. Продукти ПЛР очищали після електрофорезу в агарозному гелі і одержання смуг, і одержували одиночні аденозинові перекриття за допомогою стандартної процедури нарощування. Потім MASP-2A з доданим аденозином клонували у вектор pGEM-T Easy і трансформували в E. coli. Людський MASP-2A додатково субклонували у вектор експресії ссавців pED або pCI-Neo.

Вищеописану експресійну конструкцію MASP-2 і MASP-2A трансфікували в клітини DXB1, використовуючи стандартну процедуру кальцій-фосфатної трансфекції (Maniatis et al., 1989). MASP-2A одержували в безсироватковому живильному середовищі, щоб виключити контамінацію препаратів іншими сироватковими білками. Через день збирали конфлюентні клітини з живильних середовищ (загалом процес проводили чотири рази). Середній рівень рекомбінантного MASP-2A склав приблизно 1,5 мг/літр культурального середовища. MASP-2A (мутантну форму Ser-Ala, описану вище) очищали афінною хроматографією на колонках з MBP-A-агарозою.

Метод ІФА для MASP-2A на клонах-кандидатах ScFv, ідентифікованих шляхом пенінг/scFv-перетворення і скринінгу за допомогою фільтра

Бібліотеку фагового дисплея послідовностей варіабельних ділянок легкого і важкого ланцюгів людського імуноглобуліну піддавали антигенному пенінгу з наступним автоматизованим скринінгом і відбором для виявлення високоафінних scFv-антитіл до людського білка MASP-2. Виконували три цикли пенінгу scFv-фагової бібліотеки відносно HIS-мітки або міченого біотином MASP-2A. У третьому циклі пенінгу виконували елюцію спочатку з MBL, а потім з TEA (лужний). Для відстеження специфічного збагачення фагів, що демонструють фрагменти scFv відносно цільового MASP-2A, виконували ІФА для поліклональних фагів проти іммобілізованого MASP-2A. Гени scFv із циклу 3 пенінгу клонували у вектор експресії pHOG і виконували скринінг через дрібний фільтр для пошуку конкретних клонів, націлених на MASP-2A.

Бактеріальні колонії, що містять плазміди, кодуючі scFv-фрагменти із циклу 3 пенінгу, збирали, поміщали на нітроцелюлозні мембрани і вирощували протягом ночі на неіндукуючому середовищі для одержання майстер-планшетів. Загалом було відібрано і проаналізовано 18000 колоній із циклу 3 пенінгу, половина в результаті конкурентної елюції і половина в результаті наступної елюції TEA. Пенінг бібліотеки фагмідних scFv проти MASP-2A з наступним scFv-перетворенням і скринінгом з використанням фільтра дав 137 позитивних клонів. 108/137 клонів виявилися позитивними в аналізі ІФА відносно зв'язування MASP-2 (дані не показані), з яких 45 клонів були додатково проаналізовані на здатність блокувати активність MASP-2 у нормальній людській сироватці.

Аналіз для вимірювання пригнічення утворення C3-конвертази лектинового шляху

Функціональний аналіз по вимірюванню пригнічення утворення C3-конвертази лектинового шляху використовували для оцінки "блокувальної активності" scFv-клонів-кандидатів MASP-2. Для одержання двох білкових компонентів (C4b, C2a), які містять C3-конвертазу лектинового шляху, потрібна активність серинової протеази MASP-2. Отже, scFv MASP-2, які пригнічують функціональну активність MASP-2 (тобто блокують scFv MASP-2), будуть пригнічувати de novo утворення C3-конвертази лектинового шляху. C3 містить у своїй структурі незвичайну і високореактивну тіоефірну групу. При розщепленні C3 C3-конвертазою у цьому аналізі тіоефірна група на C3b може утворювати ковалентний зв'язок з гідроксильними групами або аміногрупами на макромолекулах, іммобілізованих на дні пластикових ямок, за допомогою складноефірних або амідних зв'язків, що полегшує виявлення C3b методом ІФА.

Дріжджовий манан відомий як активатор лектинового шляху. У наступному методі вимірювання утворення C3-конвертази пластикові ямки, покриті мананом, інкубували з розведеною людською сироваткою для активації лектинового шляху. Потім ямки промивали і аналізували на наявність C3b, іммобілізованого в ямках, стандартними методами ІФА. Кількість C3b, утвореного в цьому аналізі, є прямим відображенням de novo утворення C3-конвертази лектинового шляху. scFv-клони MASP-2 в вибраних концентраціях тестували в цьому аналізі на здатність пригнічувати утворення C3-конвертази і наступного утворення C3b.

Методи

45 клонів-кандидатів, ідентифікованих, як описано вище, експресували, очищали і розбавляли до однієї і тієї ж маточної концентрації, яку знову розбавляли буфером GVB, що містить Ca^{++} і Mg^{++} (4,0 мМ барбіталу, 141 мМ NaCl, 1,0 мМ $MgCl_2$, 2,0 мМ $CaCl_2$, 0,1 % желатин, pH 7,4), для гарантії того, що всі клони мають однакову кількість буфера. scFv-клони тестували

в трьох повторах у концентрації 2 мкг/мл. Позитивним контролем служив OMS100 Fab2, який тестували при концентрації 0,4 мкг/мл. Утворення C3c відслідковували в присутності і за відсутності клонів scFv/IgG.

Маннан розбавляли до концентрації 20 мкг/мл (1 мкг/ямку) в 50 мМ карбонатному буфері (15 мМ Na_2CO_3+35 мМ $NaHCO_3$+1,5 мМ NaN_3), pH 9,5, і покривали ним планшети ІФА, залишаючи на ніч при 4 °C. Наступного дня покриті мананом планшети промивали 3 рази 200 мкл PBS. Потім у ямки додавали по 100 мкл 1 % блокуючого HSA розчину і інкубували протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшети тричі промивали 200 мкл PBS і зберігали на льоду з 200 мкл PBS до додавання зразків.

Звичайну людську сироватку розбавляли до 0,5 % концентрації в буфер CaMgGVB, і в цей буфер додавали scFv-клони або позитивний контроль OMS100 Fab2 трьома повторами в концентраціях 0,01 мкг/мл, 1 мкг/мл (тільки контроль OMS100) і 10 мкг/мл і попередньо інкубували протягом 45 хвилин на льоду перед додаванням у заблокований планшет ІФА. Реакцію ініціювали інкубацією протягом однієї години при 37 °C, яку зупиняли шляхом перенесення планшетів на льодяну баню. Відкладення C3b детектували за допомогою кролячого антитіла до α-мишачого C3c, після якого використовували HRP-кон'юговане козяче анти-α-кроляче антитіло. Негативним контролем служив буфер без антитіл (без антитіл=максимальний рівень відкладень C3b), а позитивним контролем служив буфер з ЕДТО (без відкладення C3b). Фон визначали, використовуючи той же аналіз, за винятком того, що ямки не містили манан. Фоновий сигнал відносно планшетів без манану віднімали із сигналів у мананвмісних ямках. Критерій порогового значення встановлювали рівним половині активності нерелевантного scFv-клону (VZV) і чистого буфера.

Результати

Ґрунтуючись на критерії порогового значення, загалом було виявлено 13 клонів, блокуючих активність MASP-2. Усі 13 клонів, що забезпечують >50 % пригнічення шляху, відбирали і секвенували, одержавши 10 унікальних клонів. Було знайдено, що всі десять клонів мають легкий ланцюг одного і того ж підкласу, λ3, але важкий ланцюг трьох різних підкласів: VH2, VH3 і VH6. У функціональному аналізі у п'яти з десяти scFv-клонів-кандидатів значення IC_{50} у нМ були менше цільового критерію, 25 нМ, із застосуванням 0,5 % людської сироватки.

Для виявлення антитіл з поліпшеною ефективністю, три материнські scFv-клони, визначені, як описано вище, піддавали методу перетасування легкого ланцюга. Цей процес включав створення комбінаторної бібліотеки, що складається з V_H кожного материнського клону, спареного з бібліотекою нативних людських легких лямбда-ланцюгів (V_L), одержаних від шести здорових донорів. Потім цю бібліотеку піддавали скринінгу на виявлення scFv-клонів з поліпшеною спорідненістю зв'язування і/або функціональністю.

ТАБЛИЦЯ 8

Порівняння функціональної ефективності по IC_{50} (нМ) основних дочірніх клонів і відповідних їм материнських клонів (усі у форматі scFv)

scFv-клон	1 % людська сироватка, аналіз C3 (IC_{50} нМ)	90 % людська сироватка, аналіз C3 (IC_{50} нМ)	90 % людська сироватка, аналіз C4 (IC_{50} нМ)
17D20mc	38	Nd	Nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	Nd	Nd
17N16m_d17N9	48	15	230

Нижче представлені послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга (VH) для материнських клонів і дочірніх клонів, показаних вище в таблиці 8.

CDR (31-35 (H1), 50-65 (H2) і 95-107 (H3)) по Kabat виділені напівжирним шрифтом; і CDR (26-32 (H1), 52-56 (H2) і 95-101 (H3)) по Chothia підкреслені.

Варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH) 17D20_35VH-21N11VL (SEQ ID NO:67, кодованої SEQ ID NO:66)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRTSL KSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARIRRGGIDYWGQGTLVTVSS,

варіабельна ділянка важкого ланцюга (VH) d17N9 (SEQ ID NO:68)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSTSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDY

AVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPFGVPFDIWGQGTMVTVSS.

Нижче представлені послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга (VL) для материнських клонів і дочірніх клонів, показаних вище в таблиці 8.

CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2) і 89-97 (L3)) по Kabat виділені напівжирним шрифтом; і CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2) і 89-97 (L3)) Chothia підкреслені. Ці ділянки є однаковими, незалежно від системи нумерації, по Kabat або Chothia.

Варіабельна ділянка легкого ланцюга (VL) 17D20m_d3521N11 I(SEQ ID NO:70, кодованої SEQ ID NO:69)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQRPSGIPERFSG SNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVL,

варіабельна ділянка легкого ланцюга (VL) 17N16m_d17N9 (SEQ ID NO:71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCAGDNLGKKRVHWYQQRPGQAPVLVIYDDSDRPSGIPDRFSASN SGNTATLTITRGEAGDEADYYCQVWDIATDHVVFGGGTKLTVLAAAGSEQKLISE.

Анти-MASP-2 антитіла OMS100 і MoAb_d3521N11VL (що містять варіабельну ділянку важкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, представлену в SEQ ID NO:70, також називані "OMS646" і "mAb6"), які обидва продемонстрували зв'язування людського MASP-2 з високою спорідненістю і мають здатність блокувати функціональну активність комплементу, проаналізували відносно зв'язування епітопа за допомогою дот-блот-аналізу. Результати показують, що антитіла OMS646 і OMS100 є високоспецифічними відносно MASP-2 і не зв'язуються з MASP-1/3. Жодне антитіло, зв'язане з MAp19 або фрагментами MASP-2, не містило домен CCP1 MASP-2, що дозволило зробити висновок, що ділянки зв'язування включають CCP1.

Було визначено, що анти-MASP-2 антитіло OMS646 активно зв'язується з рекомбінантним MASP-2 (K_d від 60 до 250 мкМ) з селективністю, що перевищує в 5000 разів таку для зв'язування C1s, C1r або MASP-1 (див. таблицю 9 нижче).

ТАБЛИЦЯ 9

Спорідненість зв'язування і специфічність взаємодії анти-MASP-2 антитіла OMS646 з MASP-2, за результатами твердофазного ІФА

Антиген	K_D (пМ)
MASP-1	>500,000
MASP-2	62±23*
MASP-3	>500,000
Очищений людський C1r	>500,000
Очищений людський C1s	~500,000

*середнє значення±SD; n=12.

OMS646 специфічно блокує компоненти лектинзалежної активації

Методи

Вплив OMS646 на відкладення мембраноатакуючого комплексу (MAC) проаналізували, використовуючи специфічні умови для лектинового шляху, класичного шляху і альтернативного шляху. Із цією метою використовували набір для скринінгу комплементу Wieslab Comp300 (Wieslab, Lund, Sweden), відповідно до інструкцій виготовлювача.

Результати

На фіг. 12A графічно показаний рівень відкладення MAC у присутності або за відсутності анти-MASP-2 антитіла (OMS646) у специфічних для лектинового шляху умовах. На фіг. 12B графічно показаний рівень відкладення MAC у присутності або за відсутності анти-MASP-2 антитіла (OMS646) у специфічних для класичного шляху умовах. На фіг. 12C графічно показаний рівень відкладення MAC у присутності або за відсутності анти-MASP-2 антитіла (OMS646) у специфічних для альтернативного шляху умовах.

Як показано на фіг. 12A, OMS646 блокує опосередковану лектином активацію відкладення MAC зі значенням IC_{50}, що дорівнює приблизно 1 нМ. Однак OMS646 не впливав на відкладення MAC, що відбувається в результаті активації, опосередкованої класичним шляхом (фіг. 12B) або альтернативним шляхом (фіг. 12C).

Фармакокінетика і фармакодинаміка OMS646 після внутрішньовенного (IV) або підшкірного (SC) введення мишам

Фармакокінетику (PK) і фармакодинаміку (PD) OMS646 оцінювали в 28-денному дослідженні PK/PD у мишей при однократному введенні дози. У дослідженні тестували рівні доз 5 мг/кг і 15 мг/кг OMS646, що вводяться підшкірно (SC), а також рівень дози 5 мг/кг OMS646, що вводиться внутрішньовенно (IV).

Що стосується PK-профілю OMS646, на фіг. 13 графічно показана концентрація OMS646 (середня кількість тварин n=3 на групу) залежно від часу після введення OMS646 у зазначеній дозі. Як показано на фіг. 13, при 5 мг/кг SC максимальна концентрація OMS646 у плазмі, що дорівнює 5-6 мкг/мл, була досягнута приблизно через 1-2 дні після дозування. Біодоступність OMS646 при 5 мг/кг SC становила приблизно 60 %. На фіг. 13 також показано, що при 15 мг/кг SC максимальна концентрація в плазмі OMS646, що дорівнює 10-12 мкг/мл, була досягнута приблизно через 1-2 дні після дозування. У всіх групах OMS646 повільно виводився із системного кровотоку з кінцевим періодом напіврозпаду приблизно 8-10 днів. Профіль OMS646 виявився типовим для людських антитіл у мишей.

PD-активність OMS646 графічно показана на фіг. 14A і 14B. На фіг. 14A і 14B показана відповідь PD (зниження системної активності лектинового шляху) для кожної миші в групах, що одержали 5 мг/кг IV (фіг. 14A) і 5 мг/кг SC (фіг. 14B). Пунктирна лінія вказує вихідний рівень в аналізі (максимальне пригнічення, інтактна мишача сироватка, ін'єктована in vitro з надлишком OMS646 перед аналізом). Як показано на фіг. 14A, після IV введення 5 мг/кг OMS646 активність лектинового шляху системи комплементу відразу знизилася майже до невиявлюваних рівнів, а відновлення активності лектинового шляху протягом 28-денного періоду спостереження було помірним. Як показано на фіг. 14B, у мишей, що одержали дозу 5 мг/кг OMS646 SC, спостерігалося залежне від часу пригнічення активності лектинового шляху. Активність лектинового шляху знижувалася до майже невиявлюваних рівнів протягом 24 годин після введення лікарської речовини і залишалася на низькому рівні протягом щонайменше 7 днів. Активність лектинового шляху поступово збільшувалася з перебігом часу, але не верталася до рівнів, спостережуваних до введення дози, протягом 28-денного періоду спостереження. Профіль активності лектинового шляху залежно від часу, спостережуваний після введення 15 мг/кг SC, був аналогічним профілю для дози 5 мг/кг SC (дані не показані), що вказує на насичення кінцевої точки PD. Дані також указують на те, що дози 5 мг/кг OMS646, що вводяться раз на тиждень або IV, або SC, є достатніми для досягнення безперервного пригнічення активності лектинового шляху системи комплементу у мишей.

ПРИКЛАД 13

У цьому прикладі описане одержання рекомбінантних антитіл, які інгібують MASP-2, що містять варіабельну ділянку важкого ланцюга і/або легкого ланцюга, яка містить одну або більше CDR, які специфічно зв'язуються з MASP-2, і щонайменше одну ядерну пептидну послідовність SGMI (також називаних анти-MASP-2 антитіло, що несе SGMI-пептид, або його антигензв'язувальний фрагмент).

Передумови/обґрунтування

Створення специфічних інгібіторів MASP-2, називаних SGMI-2, описане в Heja et al., J. Biol. Chem. 287:20290 (2012); і Heja et al., PNAS, 109:10498 (2012), які включені у даний опис у вигляді посилання. SGMI-2 являє собою пептид з 36 амінокислот, який був вибраний з фагової бібліотеки варіантів інгібітору 2 протеази Schistocerca gregaria, у якому шість із восьми положень зв'язуючої протеазу петлі були повністю рандомізовані. Наступна еволюція in vitro давала в результаті моноспецифічні інгібітори з однорозрядними значеннями K_I у нМ діапазоні (Heja et al., J. Biol., Chem., 287:20290, 2012). Структурні дослідження показали, що оптимізована зв'язуюча протеазу петля утворює первинну ділянку зв'язування, яка визначає специфічність двох інгібіторів. Амінокислотні послідовності подовжених вторинних і внутрішніх зв'язувальних ділянок є загальними для обох інгібіторів і додають внесок у ділянку контакту (Heja et al., 2012. J. Biol. Chem., 287:20290). Механічно SGMI-2 блокує активацію лектинового шляху комплементу, не впливаючи на класичний шлях (Heja et al., 2012. Proc. Natl. Acad. Sci. 109:10498).

Амінокислотні послідовності інгібіторів SGMI-2 наведені нижче:

SGMI-2L, повнорозмірний:

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO:72),

SGMI-2L, середньої довжини:

TCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO:73),

SGMI-2L, короткий:

TCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO:74).

Як описано в цьому прикладі, а також в WO 2014/144542, анти-MASP-2 антитіла, що несуть пептид SGMI-2, і їх фрагменти одержували шляхом злиття з амінокислотною послідовністю пептиду SGMI-2 (SEQ ID NO:72, 73 або 74) на аміно- або карбоксильному кінці важкого і/або

легкого ланцюга людського анти-MASP-2 антитіла. Анти-MASP-2 антитіла, що несуть пептид SGMI-2, і їх фрагменти мають підвищену інгібуючу активність у порівнянні з анти-MASP-2 антитілом з оголеним остовом, яке не містить пептидну послідовність SGMI-2, згідно з результатами аналізу відкладення C3b або C4b з використанням людської сироватки, як описано в WO 2014/144542, а також мають підвищену інгібуючу активність у порівнянні з анти-MASP-2 антитілом з оголеним остовом, виміряну в мишачій моделі in vivo. Способи одержання анти-MASP-2 антитіла, що несе пептид SGMI-2, описані нижче.

Методи

Одержували експресійні конструкції для кодування чотирьох ілюстративних анти-MASP-2 антитіл, що несуть пептид SGMI-2, де пептид SGMI-2 був злитий або з N-, або з C-кінцем важкого або легкого ланцюга репрезентативного інгібуючого MASP-2 антитіла OMS646 (як описано в прикладі 12).

ТАБЛИЦЯ 10

ЗЛИТТЯ MASP-2 АНТИТІЛО/SGMI-2

Антитіло порівняння	Розташування пептиду на антитілі				SEQ ID NO:
	H-N	H-C	L-N	L-C	
HL-M2 (голе MASP-2 OMS646)	-	-	-	-	67+70
H-M2-SGMI-2-N	SGMI-2	-	-	-	75+70
H-M2-SGMI-2-C	-	SGMI-2	-	-	76+70
L-M2-SGMI-2-N	-	-	SGMI-2	-	67+77
L-M2-SGMI-2-C	-	-	-	SGMI-2	67+78

Позначення в таблиці 10:

"H-N"=амінокінець важкого ланцюга;

"H-C"=карбоксильний кінець важкого ланцюга;

"L-N"=амінокінець легкого ланцюга;

"L-C"=карбоксильний кінець легкого ланцюга;

"M2"=остов MASP-2 ab (OMS646).

Для N-кінцевих злиттів, показаних у таблиці 10, додавали пептидний лінкер ('GTGGGGGGSS' SEQ ID NO:79) між пептидом SGMI-2 і варіабельною ділянкою.

Для C-кінцевих злиттів, показаних у таблиці 10, додавали пептидний лінкер ('AAGGSG' SEQ ID NO:80) між константною областю і пептидом SGMI-2, а другий пептид 'GSGA' (SEQ ID NO:81) додавали на C-кінці злитого поліпептиду для захисту C-кінцевих пептидів SGMI-2 від деградації.

Амінокислотні послідовності наведені нижче для наступних репрезентативних злиттів MASP-2 антитіло/SGMI-2:

H-M2ab6-SGMI-2-N (SEQ ID NO:75, кодована SEQ ID NO:82):

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQVTLKESGPVLVKPTET
LTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMT
NMDPVDTATYYCARIRRGGIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[491 aa білок, aa 1-36=SGMI-2 (підкреслено), aa 37-46=лінкер (виділено курсивом); aa 47-164=варіабельна ділянка важкого ланцюга MASP-2 ab № 6 (підкреслено); aa 165-491=IgG4 константна ділянка з мутацією в шарнірній області].

H-M2ab6-SGMI-2-C (SEQ ID NO:76, кодована SEQ ID NO:83):

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRTSL
KSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARIRRGGIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPC
SRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYT
CNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQE
DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKAAGGSGLEVTCEPGTTFKDKC
NTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

[491 аа білок, аа 1-118=варіабельна ділянка важкого ланцюга MASP-2 ab № 6 (підкреслено); аа 119-445=IgG4 константна ділянка з мутацією в шарнірній області; аа 446-451=перший лінкер (виділено курсивом); аа 452-487=SGMI-2; аа 488-491=другий лінкер (виділено курсивом)].

L-M2ab6-SGMI-2-N (SEQ ID NO:77, кодована SEQ ID NO:84):

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQPVLTQPPSLSVSPGQT ASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEA DYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA DSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[258 аа білок, аа 1-36=SGMI-2 (підкреслено); аа 37-46=лінкер (виділено курсивом); аа 47-152=варіабельна ділянка легкого ланцюга MASP-2 ab № 6 (підкреслено); аа 153-258=константна ділянка людського Ig лямбда].

L-M2ab6-SGMI-2-C (SEQ ID NO:78, кодована SEQ ID NO:85):

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQRPSGIPERFSG SNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTH EGSTVEKTVAPTECSAAGGSGLEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

[258 аа білок, аа 1-106=варіабельна ділянка легкого ланцюга MASP-2 ab № 6 (підкреслено); аа 107-212=константна ділянка людського Ig лямбда; аа 213-218=перший лінкер; аа 219-254=SGMI-2; аа 255-258=другий лінкер].

Функціональний аналіз

Чотири конструкції анти-MASP-2-SGMI-2 злитого антитіла транзієнтно експресували в клітинах Expi293F (Invitrogen), очищали за допомогою афінної хроматографії з білком A і тестували в 10 % нормальній людській сироватці для пригнічення відкладення C3b в аналізі з мікросферами, покритими мананом, як описано нижче.

Тестування MASP-2-SGMI-2 злиттів в аналізі відкладення C3b з використанням мікросфер, покритих мананом

MASP-2-SGMI-2 злиті антитіла оцінювали на здатність пригнічувати лектиновий шлях в аналізі відкладення C3b на покритих мананом мікросферах. Цей аналіз, який дозволяє визначити ступінь активності методом проточної цитометрії, має більш високе розрізнення, ніж аналіз Wieslab®. Аналіз лектинового шляху з використанням мікросфер виконували наступним чином: манан адсорбували на полістирольних мікросферах діаметром 7 мкМ (Bangs Laboratories, Fishers, IN, USA) протягом ночі при 4 °C у карбонатно-бікарбонатному буфері (pH 9,6). Мікросфери промивали PBS і піддавали впливу 10 % людської сироватки або 10 % сироватку попередньо інкубували з антитілами або інгібіторами. Суміш сироватка-мікросфери інкубували при кімнатній температурі протягом однієї години при перемішуванні. Після інкубації в сироватці мікросфери промивали, і відкладення C3b на мікросферах вимірювали шляхом виявлення за допомогою анти-C3c поліклонального кролячого антитіла (Dako North America, Carpinteria, CA, USA) і PE-Cy5-кон'югованого козячого анти-кролячого вторинного антитіла (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA). Після процедури забарвлення мікросфери аналізували за допомогою проточного цитометра Facscalibur. Мікросфери аналізували у вигляді однорідної популяції, використовуючи пряме і бічне розсіювання, і відкладення C3b проявлялося у вигляді FL3-позитивних частинок (FL-3 або "FL-3-канал" указують на третій або червоний канал на цитометрі). Середню геометричну інтенсивність флуоресценції (MFI) для популяції для кожного експериментального стану виводили на графіку залежності від концентрації антитіло/інгібітор для оцінки пригнічення лектинового шляху.

Значення IC_{50} розраховували за допомогою програмного забезпечення GraphPad PRISM. Зокрема, значення IC_{50} одержували шляхом застосування нелінійної (чотирипараметричної), зі змінюваним кутом нахилу підгонки кривих залежності log (антитіло) від середньої інтенсивності флуоресценції, одержаних у результаті цитометричного аналізу.

Результати показані в таблиці 11.

ТАБЛИЦЯ 11

Відкладення C3b (аналіз з використанням покритих мананом мікросфер) в 10 % людській сироватці

Конструкція	IC_{50} (нМ)
ab з голим N2 (mAb#6)	≥ 3,63 нМ
H-M2-SGMI-2-N	2,11 нМ
L-M2-SGMI-2-C	1,99 нМ

ТАБЛИЦЯ 11

Відкладення C3b (аналіз з використанням покритих мананом мікросфер) в 10 % людській сироватці

Конструкція	IC_{50} (нМ)
H-M2-SGMI-2-N	2,24 нМ
L-M2-SGMI-2-N	3,71 нМ

Результати

Контрольне анти-MASP-2 антитіло з "голим" остовом, що не містить SGMI (mAb № 6), виявилося інгібуючим у цьому аналізі з величиною $IC_{50} \geq 3,63$ нМ, що узгоджується з результатами інгібування, спостережуваними в прикладі 12. Примітно те, що, як показано в таблиці 11, усі злиття SGMI-2-MASP-2 антитіло, які були протестовані, поліпшували ефективність антитіла MASP-2-остов у цьому аналізі, що вказує на те, що підвищена валентність також може бути корисною при пригніченні відкладення C3b.

Тестування злиттів MASP-2-SGMI-2 в аналізі з покритими мананом мікросферами для вивчення відкладення C4b з 10 % людською сироваткою

Аналіз відкладення C4b проводили з використанням 10 % людської сироватки, у тих же умовах аналізу, які описані вище для аналізу відкладення C3b, з наступними модифікаціями. Аналіз для виявлення C4b і аналіз проточної цитометрії проводили шляхом забарвлення реакції відкладення анти-C4b мишачим моноклональним антитілом (1:500, Quidel) і шляхом забарвлення вторинним козячим антимишачим $F(ab')_2$, кон'югованим з PE-Cy5 (1:200, Southern Biotech), перед аналізом проточної цитометрії.

Результати

Обидва злиття SGMS-2-несуче анти-MASP-2-N-термінальне антитіло (H-M2-SGMI-2-N: IC_{50}=0,34 нМ, L-M2-SGMI-2-N: IC_{50}=0,41 нМ) мали підвищену ефективність у порівнянні з антитілом анти-MASP-2-остов (HL-M2: IC_{50}=0,78 нМ).

Аналогічним чином, злиття одиночне SGM-2-несуче C-термінальне анти-MMS-2-антитіло (H-M2-SGMI-2-C: IC_{50}=0,45 нМ і L-M2-SGMI-2C: IC_{50}=0,47 нМ) мали підвищену активність у порівнянні з антитілом анти-MASP-2-остов (HL-M2: IC_{50}=1,2 нМ).

Тестування злиттів MASP-2-SGMI-2 в аналізі відкладення C3b з покритими мананом мікросферами з 10 % мишачою сироваткою

Аналіз відкладення C3b з покритими мананом мікросферами здійснювали, як описано вище, з 10 % мишачою сироваткою. Аналогічно результатам, спостережуваним у випадку використання людської сироватки, було встановлено, що в мишачій сироватці злиття SGMI-2-несучі анти-MASP-2 мають підвищену ефективність у порівнянні з антитілом анти-MASP-2-остов.

Короткий огляд результатів. Результати в цьому прикладі демонструють, що всі злиття SGMI-2-MASP-2 антитіло, які були протестовані, поліпшували ефективність антитіла анти-MASP-2-остов.

ПРИКЛАД 14

У цьому прикладі представлені результати, одержані з використанням моделі фіброзу нирок на фоні односторонньої обструкції сечоводу (UUO) у MASP-2-/- дефіцитних і MASP-2+/+ достатніх мишей для оцінки ролі лектинового шляху при фіброзі нирок.

Передумови/обґрунтування

Фіброз нирок і запалення є характерними ознаками пізньої стадії захворювання нирок. Тубулоінтерстиціальний фіброз нирок являє собою прогресуючий процес, що включає стійке ушкодження клітин, аберантне загоєння, активацію резидентних і інфільтруючих клітин нирок, вивільнення цитокінів, запалення і фенотипічну активацію клітин нирок для продукування позаклітинного матриксу. Тубулоінтерстиціальний (TI) фіброз нирок є загальною термінальною точкою множинних патологій нирок і являє собою ключову ціль для потенційних методів лікування, спрямованих на запобігання прогресуючому функціональному порушенню нирок при хронічному захворюванні нирок (ХЗН). Ниркова TI недостатність тісно пов'язана зі зниженням функції нирок при гломерулярних захворюваннях (Risdon R.A. et al., Lancet. 1:363-366, 1968; Schainuck L.I. et al., Hum. Pathol. 1:631-640, 1970; Nath K.A., Am. J. Kid. Dis. 20:1-17, 1992) і характерна для ХЗН, при якому відбувається накопичення міофібробластів, а потенційний простір між канальцями і перитубулярними капілярами забивається матриксом, що складається з колагенів і інших протеогліканів. Питання походження TI міофібробластів залишається досить суперечливим, але фіброзу звичайно передує запалення, яке спочатку характеризується TI-

накопиченням Т-лімфоцитів, а потім макрофагів (Liu Y. et al., Nat. Rev. Nephrol. 7:684-696, 2011; Duffield J.S., J. Clin. Invest. 124:2299-2306, 2014).

Модель UUO гризунів генерує прогресуючий фіброз нирок, відмітна ознака прогресуючого захворювання нирок практично будь-якої етіології (Chevalier et al., Kidney International, 75:1145-1152, 2009). Є повідомлення про збільшену експресію гена С3 у мишей дикого типу після UUO і значне зменшення відкладень колагену у С3-/- нокаутних мишей після UUO у порівнянні з мишами дикого типу, що вказує на роль активації комплементу при фіброзі нирок (Fearn et al., Mol. Immunol. 48:1666-1733, 2011). Є також повідомлення, що дефіцит С5 приводив до значного ослаблення основних компонентів фіброзу нирок у моделі тубулоінтерстиціального ураження (Boor P. et al., J. of Am. Soc. of Nephrology, 18:1508-1515, 2007). Однак до описаного в даній заявці дослідження, виконаного авторами винаходу, конкретні компоненти комплементу, що беруть участь у фіброзі нирок, не були чітко визначені. Таким чином, було проведене наступне дослідження для оцінки MASP-2 (-/-) і MASP-2 (+/+) мишей у моделі односторонньої обструкції сечоводу (UUO).

Методи

Одержували MASP-2-/- мишу, як описано в прикладі 1, і піддавали зворотному схрещуванню протягом 10 поколінь з C57BL/6. Мишей дикого типу (WT) C57BL/6 і гомозиготних MASP-2-дефіцитних (MASP-2-/-) мишей на фоні C57BL/6 тримали в стандартизованих умовах із циклом день/ніч - 12/12, при цьому мишей годували стандартними харчовими гранулами, вода і їжа були у вільному доступі. Десятитижневих мишей, по 6 на групу, анестезували 2,5 % ізофлураном в 1,5 л/хв. кисню. Праві сечоводи у двох групах десятитижневих самців мишей C56/BL6, дикого типу і MASP-2-/- лігували хірургічним шляхом. Праву нирку оголювали через бічний розріз довжиною 1 см. Правий сечовід повністю блокували у двох точках, використовуючи поліглактинову нитку 6/0. Анестезію здійснювали бупренорфіном інтраопераційно кожні 12 годин до 5 доз залежно від ступеня болю. Місцеву анестезію бупівакаїном проводили один раз під час операції.

Мишей умертвляли через 7 днів після операції, а тканини нирок збирали, фіксували і заливали в парафінові блоки. Кров збирали у мишей шляхом серцевої пункції під анестезією, і після нефректомії мишей знекровлювали. Кров залишали на льоду для коагуляції на 2 години, і сироватку відокремлювали центрифугуванням і зберігали в замороженому вигляді у вигляді аліквот при -80 °С.

Імуногістохімія тканини нирок

Для вимірювання ступеня фіброзу в нирках по відкладенню колагену 5-мікронні парафінові зрізи нирок забарвлювали пікросіріусом червоним, колаген-специфічні плями, як описано в Whittaker P. et al., Basic Res. Cardiol. 89:397-410, 1994. Коротко, зрізи нирок депарафінували, регідратували і колаген забарвлювали протягом 1 години водним розчином червоного пікросіріусу (0,5 г сіріусу червоного, Sigma, Dorset UK) в 500 мл насиченого водного розчину пікринової кислоти. Слайди двічі промивали підкисленою водою (0,5 % льодяна оцтова кислота в дистильованій воді) протягом 5 хвилин кожного разу, потім зневоднювали і приготовляли препарат для дослідження.

Для вимірювання ступеня запалення, про що свідчить інфільтрація макрофагів, зрізи нирок забарвлювали специфічним до макрофагів антитілом F4/80 наступним чином. Фіксовані у формаліні, залиті парафіном 5-мікронні зрізи нирок депарафінізували і регідратували. Демаскування антигену проводили в цитратному буфері при 95 °С протягом 20 хвилин з наступним блокуванням ендогенної активності пероксидази шляхом інкубації в 3 % H_2O_2 протягом 10 хвилин. Зрізи тканин інкубували в блокувальному буфері (10 % інактивована теплом нормальна козяча сироватка з 1 % бичачим сироватковим альбуміном у забуференому фосфатом фізіологічному розчині (PBS)) протягом 1 години при кімнатній температурі з наступним блокуванням авідином/біотином. Зрізи тканини промивали PBS після кожної стадії по три рази протягом 5 хвилин. Первинне антитіло до макрофага F4/80 (Santa Cruz, Dallas, TX, USA), розведене 1:100 у блокувальному буфері, наносили протягом 1 години. Потім біотинільоване козяче антищуряче вторинне антитіло, розведене 1:200, наносили протягом 30 хвилин з наступним нанесенням кон'югованого з пероксидази хрону (HRP) ферменту протягом 30 хвилин. Колір забарвлення проявлявся під впливом субстрату діамінобензидину (DAB) (Vector Labs, Peterborough UK) протягом 10 хвилин, і слайди промивали у воді, зневоднювали і приготовляли для дослідження без контрастного забарвлення для спрощення комп'ютерного аналізу.

Аналіз зображень

Відсоток забарвлення кортикального шару нирок визначали, як описано в Furness P.N. et al., J. Clin. Pathol. 50:118-122, 1997. Коротко, 24-бітові кольорові зображення брали з послідовних

полів, що не перекриваються, ниркової кіркової речовини безпосередньо під нирковою капсулою навколо всієї периферії зрізу нирки. Після кожного захоплення зображення використовували NIH-зображення для витягання з нього червоного каналу у вигляді 8-бітового монохромного зображення. Нерівномірність фонового освітлення віднімали, використовуючи попередньо записане зображення освітленого поля мікроскопа без розміщеного на ньому зрізу. Для зображення задавали фіксований поріг для визначення області зображення, відповідної позитивному забарвленню. Потім обчислювали відсоток чорних пікселів, і після того, як усі зображення навколо нирки були виміряні таким чином, реєстрували середній відсоток, що забезпечує значення, відповідне відсотку забарвленої області в зрізі нирки.

Аналіз експресії генів

Експресію декількох генів, що мають відношення до запалення нирок і фіброзу в нирках миші, вимірювали кількісною ПЛР (кПЛР) наступним чином. Загальну РНК виділяли з ниркової кіркової речовини за допомогою Trizol® (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK), згідно з інструкціями виробника. Екстраговану РНК обробляли за допомогою набору Turbo без ДНК (ThermoFisher Scientific) для усунення забруднення ДНК, а потім синтезували першу нитку кДНК за допомогою AMV-системи зворотної транскрипції (Promega, Madison, WI, USA). Цілісність кДНК підтверджували однією реакцією кПЛР за допомогою набору TaqMan GAPDH Assay (Applied Biosystems, Paisley UK) з наступною реакцією кПЛР з використанням 96-ямкових планшетів Custom TaqMan Array (Life Technologies, Paisley, UK).

У цьому аналізі вивчали дванадцять генів:

Колаген типу IV альфа-1 (col4α–1; ІД аналізу: Mm01210125_m1);

Трансформуючий фактор росту бета-1 (TGFβ-1; ІД аналізу: Mm01178820_m1);

Кадгерин-1 (Cdh-1; ІД аналізу: Mm01247357_m1);

Фібронектин 1 (Fn1; ІД аналізу: Mm01256744_m1);

Інтерлейкін-6 (IL-6; ІД аналізу Mm00446191_m1);

Інтерлейкін-10 (IL-10; ІД аналізу Mm00439614_m1);

Інтерлейкін-12a (IL-12a; ІД аналізу Mm00434165_m1);

Віментин (Vim; ІД аналізу Mm01333430_m1);

Актинін альфа-1 (Actn-1; ІД аналізу Mm01304398_m1);

Фактор некрозу пухлини α (TNFα, ІД аналізу Mm00443260_g1);

Компонент комплементу 3 (C3; ІД аналізу Mm00437838_m1);

Інтерферон-гамма (Ifn-γ; ІД аналізу Mm01168134).

Використовували наступні конститутивні контрольні гени:

Гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH, ІД аналізу Mm99999915_g1);

Глюкуронідази бета (Gusβ; ІД аналізу Mm00446953_m1);

Еукаріотичної 18S рРНК (18S; ІД аналізу Hs99999901_s1);

Гіпоксантингуанінфосфорибозилтрансферази (HPRT; ІД аналізу Mm00446968_m1).

20 мкл реакційних агентів ампліфікували, використовуючи суміш TaqMan Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems), протягом 40 циклів. Дані ампліфікації ПЛР у реальному часі аналізували з використанням програмного забезпечення Applied Biosystems 7000 SDS v1.4.

Результати

Після односторонньої обструкції сечоводу (UUO) в оклюдованих нирках спостерігається приплив запальних клітин, зокрема макрофагів, з наступним швидким розвитком фіброзу, про що свідчить накопичення колагену поряд з дилатацією трубочок і стоншенням проксимального трубчастого епітелію (див. Chevalier R.L. et al., Kidney Int. 75:1145-1152, 2009).

На фіг. 15 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених сіріусом червоним, де ділянки тканини одержували від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після обструкції сечоводу (UUO) і від псевдооперованих контрольних мишей. Як показано на фіг. 15, ділянки нирок мишей дикого типу через 7 днів після обструкції сечоводу показали значно більшу кількість відкладень колагену в порівнянні з MASP-2-/- мишами (значення p=0,0096). Середні значення$\pm$стандартна помилка середнього для UUO-оперованих мишей у групах дикого типу і MASP-2 -/- становили 24,79$\pm$1,908 (n=6) і 16,58$\pm$1,3 (n=6), відповідно. Як додатково показано на фіг. 15, зрізи тканини від псевдооперованих контрольних мишей дикого типу і псевдооперованих контрольних MASP-2 -/- мишей показали дуже низькі рівні забарвлення колагену, як і очікувалося.

На фіг. 16 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених антитілами, специфічними до маркера макрофагів F4/80, де зрізи тканин одержували від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після обструкції сечоводу або від псевдооперованих контрольних мишей. Як показано на фіг. 16, у порівнянні з мишами дикого типу, тканини, одержані з UUO-нирок MASP-2-/- мишей, показали значно меншу

інфільтрацію макрофагів через 7 днів після обструкції сечоводу (% площі макрофагів, забарвленої в WT: 2,23±0,4, проти MASP-2-/-: 0,53±0,06, p=0,0035). Як додатково показано на фіг. 16, зрізи тканин від псевдооперованих мишей дикого типу і псевдооперованих MASP-2-/- мишей не показали виявлюваного забарвлення макрофагів.

Аналіз експресії множини різних генів, пов'язаних з запаленням нирок і фіброзом, здійснювали на зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після обструкції сечоводу і від псевдооперованих мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей. Дані, показані на фіг. 17-20, являють собою Log_{10} відносної кількості в зразку псевдооперованих мишей дикого типу, а планки являють собою стандартну помилку середнього. Що стосується результатів аналізу експресії генів, пов'язаних з фіброзом, на фіг. 17 графічно показані відносні рівні експресії мРНК колагену IV типу альфа-1 (колаген-4), виміряні методом кПЛР у зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після обструкції сечоводу і від псевдооперованих контрольних мишей. На фіг. 18 графічно показані відносні рівні експресії мРНК трансформуючого фактора росту бета-1 (TGFβ-1), виміряні кПЛР, у зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після обструкції сечоводу і від псевдооперованих контрольних мишей. Як показано на фіг. 17 і 18, оклюдовані нирки мишей дикого типу показали значимо збільшену експресію пов'язаних з фіброзом генів колагену типу IV (фіг. 17) і TGFβ-1 (фіг. 18) у порівнянні з псевдооперованими нирками у мишей дикого типу, що свідчить про те, що ці пов'язані з фіброзом гени були індуковані після UUO-ушкодження у мишей дикого типу, як і очікувалося. Навпаки, як додатково показано на фіг. 17 і 18, оклюдовані нирки MASP-2-/- мишей, підданих UUO-ушкодженню, продемонстрували значиме зниження експресії колагену типу IV (фіг. 17, p=0,0388) і значиме зниження експресії TGFβ-1 (фіг. 18, p=0,0174) у порівнянні з мишами дикого типу, підданими UUO-ушкодженню.

Що стосується результатів аналізу експресії генів, пов'язаних із запаленням, то на фіг. 19 графічно показані відносні рівні експресії мРНК інтерлейкіну-6 (IL-6), виміряні кПЛР у зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після обструкції сечоводу і від псевдооперованих контрольних мишей. На фіг. 20 графічно показані відносні рівні експресії мРНК інтерферону-γ, виміряні кПЛР, у зрізах тканин нирок, одержаних від мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей через 7 днів після обструкції сечоводу і від псевдооперованих контрольних мишей. Як показано на фіг. 19 і 20, оклюдовані нирки у мишей дикого типу продемонстрували значимо підвищену експресію пов'язаних із запаленням генів інтерлейкіну-6 (фіг. 19) і інтерферону-γ (фіг. 20) у порівнянні з псевдооперованими нирками мишей дикого типу, що свідчить про те, що ці пов'язані із запаленням гени індукуються після UUO-ушкодження у мишей дикого типу. Навпаки, як додатково показано на фіг. 19 і 20, оклюдовані нирки MASP-2-/- мишей, підданих UUO-ураженню, продемонстрували значиме зниження експресії інтерлейкіну-6 (фіг. 19, p=0,0109) і інтерферону-γ (фіг. 20, p=0,0182) у порівнянні з мишами дикого типу, підданими UUO-ураженню.

Слід зазначити, що експресія генів Vim, Actn-1, TNFα, C3 і IL-10 значно підсилюється в UUO-нирках, одержаних як від мишей дикого типу, так і MASP-2-/- мишей, без суттєвої різниці в рівнях експресії цих конкретних генів між мишами дикого типу і MASP-2-/- мишами (дані не показані). Рівні експресії генів Cdh-1 і IL-12a не змінилися в оклюдованих нирках тварин у жодній з груп (дані не показані).

Обговорення

Визнано, що UUO-модель у гризунів викликає раннє, активне і глибоке ушкодження в оклюдованій нирці зі зменшеним нирковим кровотоком, інтерстиціальним запаленням і швидким фіброзом протягом одного-двох тижнів після обструкції і широко використовується для розуміння загальних механізмів і медіаторів запалення і фіброзу в нирках (див., наприклад, Chevalier R.L., Kidney Int. 75:1145-1152, 2009; Yang H. et al., Drug Discov. Today Dis. Models, 7:13-19, 2010).

Результати, описані в цьому прикладі, демонструють значиме зниження відкладення колагену і рівня інфільтрації макрофагів в UUO-оперованих нирках у MASP-2 (-/-) мишей у порівнянні з контрольними (+/+) мишами дикого типу. Несподівані результати, що свідчать про значиме скорочення ушкодження нирок як на гістологічному рівні, так і на рівні експресії генів у MASP-2-/- тварин, показують, що лектиновий шлях активації комплементу впливає на розвиток запалення і фіброз в оклюдованій нирці. Не обмежуючись конкретною теорією, вважається, що лектиновий шлях впливає на патофізіологію фіброзного захворювання шляхом запуску і підтримання прозапальних стимулів, які закріплюють порочне коло, у якому ушкодження клітин викликає запалення, що, у свою чергу, викликає подальше ураження клітин, рубцювання і втрату тканини. Виходячи із цих результатів, очікується, що пригнічення або блокада MASP-2 інгібітором буде мати профілактичний і/або терапевтичний ефект, що проявляється в

пригніченні або профілактиці фіброзу нирок, а також у пригніченні або профілактиці фіброзу взагалі (тобто незалежно від тканини або органа).

ПРИКЛАД 15

У цьому прикладі описаний аналіз ефективності моноклонального інгібуючого антитіла MASP-2 у моделі односторонньої обструкції сечоводу (UUO), мишачій моделі фіброзу нирок.

Передумови/обґрунтування

Полегшення тубулоінтерстиціального фіброзу, загальної кінцевої точки багатьох ниркових патологій, являє собою важливу мішень для методів лікування, спрямованих на профілактику прогресування ниркових захворювань. Враховуючи нестачу нових і існуючих методів лікування, спрямованих на запальні профіброзні шляхи при захворюванні нирок, існує гостра потреба в розробці нових методів лікування. Багато які пацієнти з протеїнуричним захворюванням нирок мають тубулоінтерстиціальне запалення і прогресуючий фіброз, які тісно пов'язані зі зниженням функції нирок. Протеїнурія сама по собі викликає тубулоінтерстиціальне запалення і приводить до розвитку протеїнуричної нефропатії (Brunskill N.J. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 15:504-505, 2004). Незалежно від первинної хвороби нирок тубулоінтерстиціальне запалення і фіброз незмінно спостерігаються у пацієнтів з прогресуючою нирковою недостатністю і тісно корелюють зі зниженням екскреторної функції (Risdon R.A. et al., Lancet. 1:363-366, 1968; Schainuck L.I. et al., Hum. Pathol. 1:631-640, 1970). Методи терапії, здатні перервати загальні ключові клітинні шляхи, що ведуть до фіброзу, знайдуть широке застосування при ниркових розладах.

Як описано в прикладі 14, в UUO-моделі непротеїнуричного фіброзу нирок було встановлено, що у MASP-2-/- мишей спостерігається значно більш низький ступінь фіброзу і запалення нирок у порівнянні з контрольними тваринами дикого типу, про що свідчать запальні клітинні інфільтрати (75 %) і гістологічні маркери фіброзу, такі як колаген (зменшення на одну третину), тим самим доводячи ключову роль лектинового шляху при фіброзі нирок.

Як описано в прикладі 13, також було показано, що синтезоване моноклональне анти-MASP-2 антитіло (OMS646-SGMI-2 злитий білок, що містить пептид SGMI-2, злитий з С-кінцем важкого ланцюга OMS646), яке специфічно блокує функцію лектинового шляху у людини, блокує лектиновий шлях у мишей. У цьому прикладі OMS646-SGMI-2 аналізували в мишачій UUO-моделі фіброзу нирок у мишей дикого типу для визначення здатності специфічного інгібітору MASP-2 пригнічувати фіброз нирок.

Методи

У цьому дослідженні оцінювали вплив інгібуючого MASP-2 антитіла (10 мг/кг OMS646-SGMI-2) у порівнянні з контрольним антитілом до людського ізотипу IgG4 (10 мг/кг ET904) і контролем у вигляді середовища доставки у самців WT мишей C57BL/6. Антитіла (10 мг/кг) вводили групам з 9 мишей шляхом внутрішньоочеревинної (i.p.) ін'єкції на 7-й день, 4-й день і 1-й день до операції UUO і потім на 2-й день після операції. Зразки крові брали перед введенням антитіл, і наприкінці експерименту оцінювали функціональну активність лектинового шляху.

Операцію UUO, збирання тканин і забарвлення сіріусом червоним і специфічним до макрофагів антитілом F4/80 проводили способами, описаними в прикладі 14.

Вміст гідроксипроліну в нирках мишей вимірювали за допомогою специфічного тестового набору для колориметричного аналізу (Sigma), відповідно до інструкцій виробника.

Для оцінки фармакодинамічного ефекту інгібуючого mAb-MASP-2 у мишей оцінювали активність лектинового шляху системи комплементу шляхом кількісного визначення індукованої лектином активації C3 у мінімально розведених зразках сироватки, зібраних у зазначений час після i.p. введення мишам mAb MASP-2 або контрольного mAb. Коротко, полістирольні мікросфери діаметром 7 мкМ (Bangs Laboratories, Fisher IN, USA) покривали мананом шляхом інкубації протягом ночі з 30 мкг/мл манану (Sigma) у натрій-бікарбонатному буфері (pH 9,6), потім промивали, блокували 1 % фетальної бичачої сироватки в PBS і ресуспендували в PBS до кінцевої концентрації 1×10^8 міросфер/мл. Реакції відкладення комплементу ініціювали додаванням 2,5 мкл мікросфер, покритих мананом (~250000 мікросфер), в 50 мкл мінімально розведених зразків мишачої сироватки (кінцева концентрація сироватки 90 %) з наступною інкубацією протягом 40 хвилин при 4 °C. Після припинення реакції відкладення шляхом додавання 250 мкл льодяного буфера для проточної цитометрії (FB:PBS, що містить 0,1 % фетальної бичачої сироватки), мікросфери збирали центрифугуванням і промивали ще два рази 300 мкл льодяного FB.

Для кількісної оцінки індукованої лектином активації C3 мікросфери інкубували протягом 1 години при 4 °C з 50 мкл кролячого анти-людського C3c антитіла (Dako, Carpenteria, CA, USA), розведеного в FB. Після двох промивань FB для видалення незв'язаного матеріалу мікросфери інкубували протягом 30 хвилин при 4 °C з 50 мкл козячого антикролячого антитіла, кон'югованого з PE-Cy5 (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), розведеного в FB. Після двох

промивань FB для видалення незв'язаного матеріалу мікросфери ресуспендували в FB і аналізували за допомогою цитометра FACS Calibur. Мікросфери аналізували у вигляді однорідної популяції, використовуючи пряме і бічне розсіювання, і виконували кількісне визначення відкладення C3b у кожному зразку у вигляді середньої інтенсивності флуоресценції.

Результати

Оцінка відкладення колагену

На фіг. 21 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених сіріусом червоним, де зрізи тканин були одержані через 7 днів після обструкції сечоводу у мишей дикого типу, що одержували або інгібуюче MASP-2 антитіло, або антитіло ізотипного контролю. Як показано на фіг. 21, зрізи тканини із нирок, зібраних через 7 днів після обструкції (UUO), одержані від мишей дикого типу, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло, показали значиме зниження (p=0,0477) відкладення колагену в порівнянні з кількістю відкладень колагену в зрізах тканин з оклюдованих нирок, одержаних від мишей дикого типу, що одержували IgG4 ізотипний контроль.

Оцінка вмісту гідроксипроліну

Гідроксипролін вимірювали в тканинах нирок як індикатор вмісту колагену. Гідроксипролін є параметром, який є дуже показовим індикатором патофізіологічного прогресування захворювання, індукованого в цій моделі.

На фіг. 22 графічно показаний вміст гідроксипроліну в нирках, зібраних через 7 днів після обструкції (UUO), одержаних від мишей дикого типу, що одержували або інгібуюче MASP-2 антитіло, або антитіло ізотипного контролю. Як показано на фіг. 22, тканини оклюдованих нирок мишей, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло, показали значиме зменшення гідроксипроліну, індикатору вмісту колагену, у порівнянні з нирками мишей, що одержували mAb ізотипного контролю, IgG4 (p=0,0439).

Оцінка запалення

В оклюдованих нирках від тварин дикого типу, що одержували антитіло ізотипного контролю, і тварин дикого типу, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло, спостерігали рясний інфільтрат макрофагів. Ретельна кількісна оцінка не виявила суттєвої різниці в відсотковому вмісті забарвлених макрофагів між цими двома групами (дані не показані). Однак, незважаючи на еквівалентну кількість інфільтруючих макрофагів, в оклюдованих нирках від тварин, ін'єктованих інгібуючими MASP-2 антитілами, фіброз розвився в значно меншому ступені, судячи з забарвлення сіріусом червоним, у порівнянні з оклюдованими нирками від тварин, яким вводили ізотипний контроль, цей результат узгоджується з результатами, згідно з якими тканини оклюдованих нирок від мишей, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло, мали значимо меншу кількість гідроксипроліну, ніж в нирках мишей, що одержували mAb ізотипного контролю, IgG4.

Обговорення

Результати, описані в цьому прикладі, показали, що використання інгібуючого MASP-2 антитіла забезпечує захист від фіброзу нирок в UUO-моделі, що узгоджується з результатами, описаними в прикладі 14, які демонструють, що фіброз і запалення нирок у MASP-2-/- миші в UUO-моделі виявилися значимо меншого ступеня в порівнянні з мишами дикого типу. Результати в цьому прикладі демонструють зменшений фіброз у мишей, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло. Виявлення того, що фіброз в UUO-нирках зменшується у тварин зі зменшенням або блокадою MASP-2-залежної активності лектинового шляху, є дуже значимим новим відкриттям. У сукупності результати, представлені в прикладі 14 і в цьому прикладі, демонструють сприятливий ефект інгібування MASP-2 на тубулоінтерстиціальне запалення нирок, ушкодження канальцевих клітин, вивільнення профіброзних цитокінів і рубцювання. Зменшення фіброзу нирок залишається ключовою ціллю лікування нирок. UUO-модель є моделлю важкого стану з прискореним фіброзом нирок, і втручання, яке зменшує фіброз у цій моделі, наприклад використання інгібуючих MASP-2 антитіл, імовірно, буде використовуватися для пригнічення або запобігання фіброзу нирок. Результати UUO-моделі, імовірно, також можна віднести до захворювань нирок, що характеризуються гломерулярним і/або протеїнуричним ушкодженням канальців.

ПРИКЛАД 16

У цьому прикладі представлені результати, які були одержані з використанням моделі фіброзу, запалення і тубулоінтерстиціального ушкодження нирок на фоні викликаної передозуванням білка протеїнурії у MASP-2-/- мишей і мишей дикого типу для оцінки ролі лектинового шляху при протеїнуричній нефропатії.

Передумови/обґрунтування

Протеїнурія є фактором ризику розвитку фіброзу нирок і втрати екскреторної функції

незалежно від первинної хвороби нирок (Tryggvason K. et al., J. Intern. Med. 254:216-224, 2003, Williams M., Am. J. Nephrol. 25:77-94, 2005). Поняття протеїнуричної нефропатії описує токсичні ефекти надлишкового білка, що надходить у проксимальні канальці в результаті порушення гломерулярної вибірної селективності (Brunskill N.J., J. Am. Soc. Nephrol. 15:504-505, 2004, Baines R.J., Nature Rev. Nephrol. 7:177-180, 2011). Це явище, звичайне для багатьох захворювань клубочків, приводить до прозапального середовища рубцювання в нирках і характеризується змінами в проксимальному рості канальцевих клітин, апоптозом, транскрипцією генів і продукуванням запальних цитокінів як наслідок сигнальних шляхів з порушеною регуляцією, стимульованих протеїнуричною канальцевою рідиною. Протеїнурична нефропатія звичайно визнається ключовим фактором, що сприяє прогресуючому ураженню нирок, характерному для різних первинних патологій нирок.

Хронічна хвороба нирок уражує більше 15 % дорослого населення в Сполучених Штатах і щорічно є причиною приблизно 750 000 смертей в усьому світі (Lozano R. et al., Lancet. vol. 380, Issue 9859:2095-2128, 2012). Протеїнурія є показником хронічного захворювання нирок, а також фактором, що сприяє прогресуванню захворювання. Багато пацієнтів із протеїнуричним захворюванням нирок мають тубулоінтерстиціальне запалення і прогресуючий фіброз, які тісно пов'язані зі зниженням функції нирок. Протеїнурія сама по собі викликає тубулоінтерстиціальне запалення і приводить до розвитку протеїнуричної нефропатії (Brunskill N.J. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 15:504-505, 2004). При протеїнуричних захворюваннях нирок надмірна кількість альбуміну і інших макромолекул фільтрується через клубочки і повторно поглинається проксимальними трубчастими епітеліальними клітинами. Це викликає порочне запальне коло, опосередковане активацією комплементу, що приводить до інфільтратів цитокінів і лейкоцитів, які викликають інтерстиціальне ушкодження канальців і фіброз, тим самим збільшуючи протеїнурію і приводячи до втрати функції нирок і, в остаточному підсумку, до прогресування аж до термінальної стадії ниркової недостатності (див., наприклад, Clark et al., Canadian Medical Association Journal, 178:173-175, 2008). Очікується, що методи лікування, які модулюють цей шкідливий цикл запалення і протеїнурії, поліпшать результат при хронічному захворюванні нирок.

Враховуючи позитивний ефект інгібування MASP-2 в UUO-моделі тубулоінтерстиціального ушкодження, був виконаний наступний експеримент для визначення, чи може інгібування MASP-2 зменшити ушкодження нирок у моделі передозування білка. У цьому дослідженні використовували передозування білка для індукування протеїнуричного захворювання нирок, як описано в Ishola et al., European Renal Association, 21:591-597, 2006.

Методи

Одержували MASP-2-/- мишу, як описано в прикладі 1, і піддавали зворотному схрещуванню протягом 10 поколінь з BALB/c. У даному дослідженні порівнювали результати, одержані для мишей дикого типу і MASP-2-/- BALB/c мишей у моделі індукованої передозуванням білка протеїнурії.

За тиждень до початку експерименту мишам видаляли одну нирку перед передозуванням білка для одержання оптимальної відповіді. Індукуючий протеїнурію агент являв собою бичачий сироватковий альбумін з низьким рівнем ендотоксину (BSA, Sigma), який вводили в нормальному фізіологічному розчині WT (n=7) і MASP-2-/- мишам (n=7) у наступних дозах: одну дозу по 2 мг BSA/г, 4 мг BSA/г, 6 мг BSA/г, 8 мг BSA/г, 10 мг BSA/г і 12 мг BSA/г ваги тіла і 9 доз по 15 мг BSA/г ваги тіла, загалом протягом 15 днів було введено і.р. 15 доз. Контрольні миші WT (n=4) і MASP-2-/- (n=4) миші одержували фізіологічний розчин, що вводиться тільки внутрішньоочеревинно. Після введення останньої дози тварин розміщали по одній в метаболічні клітки на 24 години для збирання сечі. Кров збирали за допомогою серцевої пункції під наркозом, кров залишали для коагуляції на льоду на 2 години, і сироватку відокремлювали центрифугуванням. Зразки сироватки і сечі збирали наприкінці експерименту на 15-й день, зберігали і заморожували для аналізу.

Мишей умертвляли через 24 години після останнього введення BSA на 15-й день, і для аналізу збирали різні тканини. Нирки збирали і обробляли для забарвлення H&E і імунозабарвлення. Імуногістохімічне забарвлення проводили наступним чином. Фіксовані у формаліні, залиті парафіном 5-мікронні зрізи тканин нирок від кожної миші депарафінізували і регідратували. Демаскування антигену проводили в цитратному буфері при 95 °C протягом 20 хвилин з наступною інкубацією тканин в 3 % H_2O_2 протягом 10 хвилин. Потім тканини інкубували в блокувальному буфері (10 % сироватки з виду, у якому було вирощене вторинне антитіло, і 1 % BSA в PBS) з 10 % розчином авідину протягом 1 години при кімнатній температурі. Зрізи тканин промивали PBS після кожної стадії по три рази протягом 5 хвилин. Потім використовували первинне антитіло в блокувальному буфері з 10 % розчином біотину протягом

1 години при концентрації 1:100 для антитіл F4/80 (Santa Cruz, кат. № sc-25830), TGFβ (Santa Cruz, кат. № sc-7892), IL-6 (Santa Cruz, кат. № sc-1265) і концентрації 1:50 для антитіла TNFα (Santa Cruz, кат. № sc-1348). Потім застосовували біотинільоване вторинне антитіло протягом 30 хвилин при концентрації 1:200 для зрізів з F4/80, TGFβ і IL-6 і 1:100 для зрізів з TNFα з наступним застосуванням кон'югата ферменту HRP протягом ще 30 хвилин. Забарвлення проводили за допомогою набору із субстратом діамінобензидину (DAB) (Vector Labs) протягом 10 хвилин, і слайди промивали у воді, зневоднювали і приготовляли для дослідження без контрастного забарвлення для спрощення комп'ютерного аналізу. Забарвлені зрізи тканин з ниркової кіркової речовини аналізували за допомогою захоплення цифрового зображення з наступною кількісною оцінкою з використанням програмного забезпечення для автоматичного аналізу зображень.

Апоптоз оцінювали в зрізах тканин шляхом забарвлення кінцевої мітки dUTP з використанням термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази (TUNEL) наступним чином. Апоптотичні клітини в зрізах нирок забарвлювали, використовуючи набір з пероксидазою ApopTag® Peroxidase (Millipore) наступним чином. Залиті парафіном, фіксовані формаліном зрізи нирок від кожної миші депарафінізували, регідратували, а потім білок пермеабілізували за допомогою протеїнази K (20 мкг/мл), яку наносили на кожний зразок протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Між стадіями зразки промивали PBS. Активність ендогенної пероксидази гасили шляхом інкубації тканин в 3 % H_2O_2 протягом 10 хвилин. Потім тканини інкубували в зрівноважувальному буфері з наступною інкубацією з ферментом TdT протягом 1 години при 37 °C. Після промивання в зупинному/промивальному буфері протягом 10 хвилин кон'югат анти-дигоксигеніну наносили на 30 хвилин при кімнатній температурі з наступним промиванням. Забарвлення здійснювали за допомогою набору з DAB-субстратом протягом 4 хвилин з наступним промиванням у воді. Тканини піддавали контрастному забарвленню в гематоксиліні і установлювали в DBX. Частоту TUNEL-забарвлених (коричневого кольору) апоптотичних клітин підраховували вручну в послідовно вибраних 20 полях зору кіркової речовини під великим збільшенням за допомогою світлового мікроскопа Leica DBXM.

Результати

Оцінка протеїнурії

Для підтвердження наявності протеїнурії у мишей загальний білок у сироватці аналізували на 15-й день, а загальну кількість виділеного білка вимірювали в зразках сечі, зібраних протягом 24 годин на 15-й день дослідження.

На фіг. 23 графічно показана загальна кількість сироваткових білків (мг/мл), виміряна на 15-й день у контрольних мишей дикого типу (n=2), що одержували тільки фізіологічний розчин, мишей дикого типу, що одержували BSA (n=6), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=6). Як показано на фіг. 23, введення BSA збільшувало загальний рівень білка в сироватці як у групах дикого типу, так і в MASP-2-/- групі більше ніж у два рази в порівнянні з концентрацією в контрольній групі, що одержувала тільки фізіологічний розчин, при цьому між групами, що одержали лікування, суттєвої різниці не спостерігалося.

На фіг. 24 графічно показана загальна кількість білка (мг), виділеного із сечею, зібраною протягом 24 годин на 15-й день вивчення у контрольних мишей дикого типу (n=2), що одержували тільки фізіологічний розчин, мишей дикого типу, що одержували BSA (n=6), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=6). Як показано на фіг. 24, на 15-й день цього дослідження спостерігали приблизно шестикратне збільшення загальної кількості виділеного з сечею білка в групах, що одержували BSA, у порівнянні з контрольною групою з імітованим лікуванням, яка одержувала тільки фізіологічний розчин. Результати, наведені на фіг. 23 і 24, свідчать про те, що модель протеїнурії працює, як очікувалося.

Оцінка гістологічних змін у нирках

На фіг. 25 показані репрезентативні забарвлені H&E зрізи тканин нирок, які збирали на 15-й день дослідження передозування білка від мишей наступних груп: (панель A) контрольні миші дикого типу; (панель B) MASP-2-/- контрольні миші; (панель C) миші дикого типу, що одержували BSA; і (панель D) MASP-2-/- миші, що одержували BSA. Як показано на фіг. 25, у групі MASP-2-/- передозування (панель D) спостерігали значно більш високий ступінь збереження тканини в порівнянні з групою передозування дикого типу (панель C) при однаковому рівні провокації передозуванням білка. Наприклад, капсули Боумена у мишей дикого типу, що одержували BSA (передозування) (панель C), були значимо розширені в порівнянні з капсулами Боумена в контрольній групі дикого типу (панель A). Навпаки, у капсул Боумена мишей MASP-2-/- (передозування), що одержували таку ж кількість BSA (панель D), зберігалася морфологія, аналогічна тій, яка спостерігалася у контрольних MASP-2-/- мишей (панель B) і контрольних мишей дикого типу (панель A). Як додатково показано на фіг. 25,

великі литі структури білків накопичуються в проксимальних і дистальних канальцях ниркових ділянок у дикого типу (панель C), які є більш крупними і більш численними в порівнянні з такими у MASP-2-/- мишей (панель D).

Слід також зазначити, що аналіз зрізів нирок у цьому дослідженні за допомогою просвічувального електронного мікроскопа показав, що миші, які одержували BSA, мали загальне ураження на циліарних краях у дистальних і проксимальних клітинах ниркового канальця з вмістом клітин і ядрами, що впровадилися в просвіт канальця. Навпаки, тканина у MASP-2-/- мишей, що одержували BSA, зберігалася.

Оцінка інфільтрації макрофагів у нирках

Щоб виміряти ступінь запалення, про що свідчить інфільтрація макрофагів, зрізи тканин зібраних нирок забарвлювали також антитілом до маркера макрофагів F4/80 способами, описаними в Boor et al., J. of Am. Soc. Nephrology, 18:1508-1515, 2007.

На фіг. 26 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених антитілом до маркера макрофагів F4/80, що показують середню забарвлену площу макрофагів (%), де зрізи тканин одержували на 15-й день вивчення передозування білка у контрольних мишей дикого типу (n=2), мишей дикого типу, що одержували BSA (n=6), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=5). Як показано на фіг. 26, зрізи тканин нирок, забарвлені антитілом до маркерів макрофагів F4/80, свідчать про те, що, хоча обидві групи, що одержували BSA, показали значиме збільшення інфільтрації макрофагів у нирках (виміряне у вигляді % області забарвлених F4/80 антитіл) у порівнянні з контрольними мишами дикого типу з імітованим лікуванням, значиме зниження інфільтрації макрофагів спостерігали в зрізах тканин у MASP-2-/- мишей, що одержували BSA, у порівнянні з інфільтрацією макрофагів у зрізах тканин у мишей дикого типу, що одержували BSA (значення p=0,0345).

На фіг. 27A графічно показаний аналіз наявності кореляції між рівнем макрофагів і протеїнурією у кожної миші дикого типу (n=6), що одержувала BSA, у вигляді графіка залежності загальної кількості виділеного білка, виміряної в сечі з 24-годинного зразка, від ступеня інфільтрації макрофагів (% середньої забарвленої площі). Як показано на фіг. 27A, більшість зразків із нирок дикого типу дали позитивну кореляцію між рівнем протеїнурії і ступенем інфільтрації макрофагів.

На фіг. 27B графічно показаний аналіз наявності кореляції між рівнем макрофагів і протеїнурією у кожної MASP-2-/- миші (n=5), що одержувала BSA, у вигляді графіка залежності загальної кількості виділеного білка, виміряної в сечі з 24-годинного зразка, від ступеня інфільтрації макрофагів (% середньої забарвленої площі). Як показано на фіг. 27B, позитивна кореляція, спостережувана у мишей дикого типу, між рівнем протеїнурії і ступенем інфільтрації макрофагів (показана на фіг. 27A) не спостерігалася у MASP-2-/- мишей. Не обмежуючись конкретною теорією, ці результати можуть указувати на наявність механізму очищення від запалення при високих рівнях протеїнурії у MASP-2-/- мишей.

Оцінка інфільтрації цитокінів

Інтерлейкін-6 (IL-6), трансформуючий фактор росту бета (TGFβ) і фактор некрозу пухлини альфа (TNFα) є прозапальними цитокінами, які, як відомо, активуються в проксимальних канальцях мишей дикого типу в моделі протеїнурії (Abbate M et al., Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 17:2974-2984, 2006; David S. et al., Nephrology, Didalysis, Transplantation, Official Publication of the European Dialysisand Transplant Association - European Renal Association, 12:51-56, 1997). Зрізи тканин нирок забарвлювали цитокін-специфічними антитілами, як описано вище.

На фіг. 28 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-TGFβ антитілом (виміряно у вигляді % площі забарвлених анти-TGFβ антитіл), у мишей дикого типу, що одержували BSA (n=4), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=5). Як показано на фіг. 28, значиме збільшення забарвлення TGFβ спостерігалося в групі мишей дикого типу, що одержувала BSA (передозування), у порівнянні з групою, MASP-2-/- мишей, що одержувала BSA (передозування) (p=0,026).

На фіг. 29 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-TNFα антитілом (виміряно у вигляді % площі забарвлених анти-TNFα антитіл), у мишей дикого типу, що одержували BSA, і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=5). Як показано на фіг. 29, значиме збільшення забарвлення TNFα спостерігалося в групі дикого типу, що одержувала BSA (передозування), у порівнянні з MASP-2-/- групою, що одержувала BSA (передозування) (p=0,0303).

На фіг. 30 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-IL-6 антитілом (виміряно у вигляді % площі забарвлених анти-IL-6 антитіл), у контрольних мишей дикого типу, контрольних MASP-2-/- мишей, мишей дикого типу, що

одержували BSA (n=7), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=7). Як показано на фіг. 30, у групі дикого типу, що одержувала BSA, спостерігалося дуже значне збільшення забарвлення IL-6 у порівнянні з MASP-2-/- групою, що одержувала BSA (p=0,0016).

Оцінка апоптозу

Апоптоз оцінювали в тканинних зрізах шляхом забарвлення кінцевої мітки dUTP з використанням термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази (TUNEL), а частоту забарвлених TUNEL-апоптотичних клітин підраховували в послідовно вибраних 20 полях зору кіркової речовини під великим збільшенням (HPF).

На фіг. 31 графічно показана частота TUNEL-позитивних апоптотичних клітин, підрахована у послідовно вибраних 20 полях зору під великим збільшенням (HPF), у зрізах тканин ниркової кіркової речовини у контрольних мишей дикого типу (n=1), контрольних MASP-2-/- мишей (n=1), мишей дикого типу, що одержували BSA (n=6), і MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (n=7). Як показано на фіг. 31, значно більш високий рівень апоптозу в кірковій речовині спостерігався в нирках, одержаних від мишей дикого типу, що одержували BSA, у порівнянні з нирками, одержаними від MASP-2-/- мишей, що одержували BSA (p=0,0001).

Загальний огляд результатів і висновки

Результати цього прикладу свідчать про те, що у MASP-2-/- миші зменшене ушкодження нирок у моделі передозування білка. Отже, інгібуючі MASP-2 агенти, такі як інгібуючі MASP-2 антитіла, як очікувалося, пригнічують або запобігають шкідливому циклу запалення і протеїнурії і поліпшують результати при хронічному захворюванні нирок.

ПРИКЛАД 17

У цьому прикладі описаний аналіз моноклонального інгібуючого антитіла MASP-2 на ефективність у зниженні і/або запобіганні запаленню нирок і тубулоінтерстиціальному ушкодженню в моделі викликаної передозуванням білка протеїнурії у мишей дикого типу.

Передумови/обґрунтування

Як описано в прикладі 16, у моделі викликаної передозуванням білка протеїнурії було встановлено, що MASP-2-/- миші демонструють значно кращі результати (наприклад, менший ступінь тубулоінтерстиціального ушкодження і менший ступінь запалення нирок), ніж миші дикого типу, що має на увазі патогенну роль лектинового шляху в протеїнуричному захворюванні нирок.

Як описано в прикладі 13, було створено моноклональне інгібуюче MASP-2 антитіло (OMS646-SGMI-2), яке специфічно блокує функцію лектинового шляху у людини, а також було показано, що воно блокує лектиновий шлях у мишей. У цьому прикладі оцінювали ефективність інгібуючого MASP-2 антитіла OMS646-SGMI-2 у мишачій моделі викликаної передозуванням білка протеїнурії відносно зменшення і/або профілактики запалення нирок і тубулоінтерстиціального ушкодження у мишей дикого типу.

Методи

У цьому дослідженні оцінювали вплив інгібуючого MASP-2 антитіла (10 мг/кг OMS646-SGMI-2) у порівнянні з антитілом до людського IgG4 ізотипного контролю (10 мг/кг ET904) і контролем з фізіологічним розчином.

Подібно дослідженню, описаному в прикладі 16, у цьому дослідженні використовували передозування білка для індукування протеїнуричного захворювання нирок (Ishola et al., European Renal Association, 21:591-597, 2006). Протеїнурію індукували у Balb/c мишей з однією видаленою ниркою щоденною і.р. ін'єкцією ескалаційних доз (від 2 до 15 г/кг) бичачого сироваткового альбуміну з низьким вмістом ендотоксину (BSA) протягом 15 днів, як описано в прикладі 16.

Лікування антитілами здійснювали шляхом і.р. ін'єкції два рази на тиждень, починаючи за 7 днів до індукції протеїнурії протягом усього дослідження. Ця схема дозування була вибрана на основі попередніх досліджень PK/PD і фармакологічних досліджень, що демонструють стійке пригнічення лектинового шляху (дані не показані). Мишей умертвляли на 15-й день, і нирки збирали і обробляли для забарвлення H&E і імунозабарвлення. Забарвлені зрізи тканин з ниркової кіркової речовини аналізували за допомогою захоплення цифрового зображення з наступною кількісною оцінкою з використанням програмного забезпечення для автоматичного аналізу зображень.

Оцінку імуногістохімічного забарвлення і апоптозу проводили, як описано в прикладі 16.

Результати

Оцінка протеїнурії

Для підтвердження наявності протеїнурії у мишей загальну кількість виділеного з сечею білка аналізували в зразках сечі, зібраних протягом 24-х годин, на 15-й день (кінець експерименту). Було встановлено, що в зразках сечі загальний рівень білка в середньому був

збільшений майже в шість разів у групах, що одержували BSA, у порівнянні з контрольними групами, що не одержували BSA (дані не показані), що підтверджує наявність протеїнурії у мишей, які одержували BSA. У рівнях білка між групами, що одержували BSA, ніяких суттєвих відмінностей не спостерігалося.

Оцінка гістологічних змін

На фіг. 32 показані типові зрізи забарвлених H&E тканин для наступних груп мишей на 15-й день після лікування BSA: (панель A) контрольні миші дикого типу, що одержували фізіологічний розчин; (панель B) контрольні миші, що одержували ізотип антитіла; і (панель C) миші дикого типу, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло.

Як показано на фіг. 32, у групі, що одержувала інгібуюче MASP-2 антитіло (панель C), спостерігався значно більш високий ступінь збереження тканини в порівнянні з групою дикого типу, що одержувала фізіологічний розчин (панель A) або ізотипний контроль (панель B), при тому ж рівні провокації передозуванням білка.

Оцінка апоптозу

Апоптоз оцінювали в тканинних зрізах шляхом забарвлення кінцевої мітки dUTP з використанням термінальної дезоксинуклеотидилтрансферази (TUNEL), а частоту забарвлених TUNEL-апоптотичних клітин підраховували в послідовно вибраних 20 полях зору кіркової речовини під великим збільшенням (HPF). На фіг. 33 графічно показана частота TUNEL-позитивних апоптотичних клітин, підрахована в послідовно вибраних 20 полях зору під великим збільшенням (HPF) у зрізах тканин ниркової кіркової речовини у контрольних мишей дикого типу, що одержували фізіологічний розчин і BSA (n=8), мишей дикого типу, що одержували антитіло ізотипного контролю і BSA (n=8), і мишей дикого типу, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло і BSA (n=7). Як показано на фіг. 33, дуже значне зниження рівня апоптозу в кірковій речовині спостерігалося в нирках, одержаних з групи, що одержувала інгібуюче MASP-2 антитіло, у порівнянні з групою, що одержувала фізіологічний розчин і ізотипний контроль (p=0,0002 для контролю з фізіологічним розчином проти інгібуючого MASP-2 антитіла; p=0,0052 для ізотипного контролю проти інгібуючого MASP-2 антитіла).

Оцінка інфільтрації цитокінів

У зрізах тканин нирок, одержаних у цьому дослідженні, оцінювали інтерлейкін-6 (IL-6), трансформуючий фактор росту бета (TGFβ) і фактор некрозу пухлини альфа (TNFα), які є прозапальними цитокінами й, як відомо, активуються в проксимальних канальцях у мишей дикого типу в моделі протеїнурії.

На фіг. 34 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-TGFβ антитілом (виміряно у вигляді % площі забарвлених анти-TGFβ антитіл), у мишей дикого типу, що одержували BSA і фізіологічний розчин (n=8), мишей дикого типу, що одержували BSA і антитіло ізотипного контролю (n=7), і мишей дикого типу, що одержували BSA і інгібуюче MASP-2 антитіло (n=8). Як показано на фіг. 34, кількісне визначення забарвлених TGFβ областей показало значиме зниження рівнів TGFβ у мишей, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло, у порівнянні із групами, що одержували фізіологічний розчин і антитіла ізотипного контролю (значення p=0,0324 і 0,0349, відповідно).

На фіг. 35 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-TNFα антитілом (виміряно у вигляді % площі забарвлених анти-TNFα антитіл), у мишей дикого типу, що одержували BSA і фізіологічний розчин (n=8), мишей дикого типу, що одержували BSA і антитіло ізотипного контролю (n=7), і мишей дикого типу, що одержували BSA і інгібуюче MASP-2 антитіло (n=8). Як показано на фіг. 35, аналіз забарвлених зрізів показав значиме зниження рівня TNFα у групі, що одержувала інгібуюче MASP-2 антитіло, у порівнянні з контрольною групою, що одержувала фізіологічний розчин (p=0,011), а також групою, що одержувала ізотипний контроль (p=0,0285).

На фіг. 36 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин, забарвлених анти-IL-6 антитілом (виміряно у вигляді % площі забарвлених анти-IL-6 антитіл), у мишей дикого типу, що одержували BSA і фізіологічний розчин (n=8), мишей, що одержували BSA і антитіло ізотипного контролю (n=7), і мишей дикого типу, що одержували BSA і інгібуюче MASP-2 антитіло (n=8). Як показано на фіг. 36, аналіз забарвлених ділянок показав значиме зниження рівня IL-6 у групі, що одержувала інгібуюче MASP-2 антитіло, у порівнянні з контрольною групою, що одержувала фізіологічний розчин (p=0,0269), а також групою, що одержувала ізотипний контроль (p=0,0455).

Загальний огляд результатів і висновки

Результати в цьому прикладі демонструють, що використання інгібуючого MASP-2 антитіла забезпечує захист від ниркового ушкодження в моделі передозування білка, що узгоджується з результатами, описаними в прикладі 16, який демонструє, що у MASP-2-/- мишей зменшене

ушкодження нирок у моделі протеїнурії.

ПРИКЛАД 18

У цьому прикладі представлені результати, які були одержані з використанням моделі фіброзу нирок, запалення і тубулоінтерстиціального ушкодження на фоні індукованої адріаміцином нефрології у MASP-2-/- мишей і мишей дикого типу для оцінки ролі лектинового шляху при протеїнуричній нефропатії.

Передумови/обґрунтування

Адріаміцин є антацикліновим протипухлинним антибіотиком, використовуваним для лікування широкого спектра онкологічних захворювань, включаючи гематологічні злоякісні пухлини, саркоми м'яких тканин і багато які види карцином. Індукована адріаміцином нефропатія - добре відома модель хронічної хвороби нирок у гризунів, яка дозволила краще зрозуміти прогресування хронічної протеїнурії (Lee and Harris, Nephrology, 16:30-38, 2011). Тип структурного і функціонального ушкодження при індукованій адріаміцином нефропатії дуже схожий на тип хронічного протеїнуричного захворювання нирок у людей (Pippin et al., American Journal of Renal Physiology, 296:F213-29, 2009).

Індукована адріаміцином нефропатія характеризується ушкодженням подоцитів з наступним гломерулосклерозом, тубулоінтерстиціальним запаленням і фіброзом. У багатьох дослідженнях показано, що індукована адріаміцином нефропатія модулюється як імунними, так і неімунними механізмами (Lee and Harris, Nephrology, 16:30-38, 2011). Індукована адріаміцином нефропатія має декілька переваг як модель захворювання нирок. По-перше, це дуже добре відтворена і передбачувана модель ушкодження нирок, оскільки вона характеризується індукцією ушкодження нирок протягом декількох днів після введення лікарського засобу, що дозволяє полегшити розробку експерименту, оскільки ушкодження розвивається послідовно з перебігом часу. Це також модель, у якій ступінь ушкодження тканини є серйозним, незважаючи на прийнятний рівень смертності (<5 %) і захворюваності (втрата ваги). Тому через тяжкість і розвиток з перебігом часу ушкодження нирок при індукованій адріаміцином нефропатії ця модель є придатною для тестування терапевтичних методів, що захищають від ушкодження нирок.

Як описано в прикладах 16 і 17, у моделі індукованої передозуванням білка протеїнурії було встановлено, що MASP-2-/- миші і миші, що одержували інгібуюче MASP-2 антитіло, показали значно поліпшені результати (наприклад, менший ступінь тубулоінтерстиціального ушкодження і менший ступінь запалення нирок), у порівнянні з мишами дикого типу, що свідчить про патогенну роль лектинового шляху при протеїнуричній хворобі нирок.

У цьому прикладі MASP-2-/- мишей аналізували в порівнянні з мишами дикого типу в індукованій адріаміцином (AN) нефрологічній моделі для визначення того, чи може дефіцит MASP-2 зменшити і/або запобігти розвитку запалення нирок і тубулоінтерстиціального ушкодження, викликаного адріаміцином.

Методи

1. Оптимізація дози і часової точки

Спочатку проводили експеримент для визначення дози адріаміцину і часової точки, при якій у мишей BALB/c розвивається рівень запалення нирок, придатний для тестування терапевтичного втручання.

Трьом групам мишей BALB/c дикого типу (n=8) вводили IV одну дозу адріаміцину (10,5 мг/кг). Мишей умертвляли в трьох точках: через один тиждень, два тижні і чотири тижні після введення адріаміцину. Контрольним мишам вводили тільки фізіологічний розчин.

Результати

У всіх мишей у трьох групах спостерігали ознаки гломерулосклерозу і протеїнурії, обумовлені забарвленням H&E, з поступовим збільшенням ступеня запалення тканин, як виміряно по ступеню інфільтрації макрофагів у нирках (дані не показані). Ступінь ушкодження тканини був помірним в однотижневій групі, помірним у двотижневій групі і важким в чотиритижневій групі (дані не показані). Для частини дослідження, що залишилася, була вибрана двотижнева точка.

2. Аналіз індукованої адріаміцином нефропатії у мишей дикого типу і MASP-2-/- мишей

Щоб з'ясувати роль лектинового шляху комплементу в індукованій адріаміцином нефропатії, групу MASP-2-/- (BALB/c) мишей порівнювали з мишами дикого типу (BALB/c) при однаковій дозі адріаміцину. MASP-2-/- мишей схрещували з BALB/c мишами протягом 10 поколінь.

Мишам дикого типу (n=8) і MASP-2-/- мишам (n=8) вводили IV адріаміцин (10,5 мг/кг) і трьом мишам кожної лінії вводили тільки фізіологічний розчин як контроль. Усіх мишей умертвляли через два тижні після лікування, і тканини збирали. Ступінь гістопатологічного ушкодження оцінювали шляхом забарвлення H&E.

Результати

На фіг. 37 показані типові зрізи забарвлених H&E тканин для наступних груп мишей на 14-й день після лікування тільки адріаміцином або фізіологічним розчином (контроль): (панелі A-1, A-2, A-3) контрольні миші дикого типу, що одержували тільки фізіологічний розчин; (панелі B-1, B-2, B-3) миші дикого типу, що одержували адріаміцин; і (панелі C-1, C-2, C-3) MASP-2-/- миші, що одержували адріаміцин. Кожна фотографія (наприклад, панель A-1, A-2, A-3) являє собою окрему мишу.

Як показано на фіг. 37, в MASP-2-/- групі, що одержувала адріаміцин, спостерігається набагато більш високий ступінь збереження тканини в порівнянні з групою дикого типу, що одержувала таку ж дозу адріаміцину.

На фіг. 38 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених антитілом до маркера макрофагів F4/80, що показують середню забарвлену площу макрофагів (%) для наступних груп мишей на 14 день після лікування тільки адріаміцином або фізіологічним розчином (контроль дикого типу): контрольні миші дикого типу, що одержували тільки фізіологічний розчин; миші дикого типу, що одержували адріаміцин; MASP-2-/- миші, що одержували тільки фізіологічний розчин, і MASP-2-/- миші, що одержували адріаміцин. Як показано на фіг. 38, у MASP-2-/- мишей, що одержували адріаміцин, ступінь інфільтрації макрофагів знижений (**p=0,007) у порівнянні з мишами дикого типу, що одержували адріаміцин.

На фіг. 39 графічно показані результати комп'ютерного аналізу зображень зрізів тканин нирок, забарвлених сіріусом червоним, що показують область забарвленого відкладення колагену (%) для наступних груп мишей на 14 день після лікування тільки адріаміцином або фізіологічним розчином (дикого типу контроль): контрольні миші дикого типу, що одержували тільки фізіологічний розчин; миші дикого типу, що одержували адріаміцин; MASP-2-/- миші, що одержували тільки фізіологічний розчин, і MASP-2-/- миші, що одержували адріаміцин. Як показано на фіг. 39, у MASP-2-/- мишей, що одержували адріаміцин, ступінь відкладення колагену знижений (** p=0,005) у порівнянні з мишами дикого типу, що одержували адріаміцин.

Результати і висновки

Полегшення ниркового тубулоінтерстиціального запалення є ключовою ціллю лікування захворювань нирок. Представлені в даному описі результати показують, що лектиновий шлях активації комплементу додає суттєвий внесок у розвиток ниркового тубулоінтерстиціального запалення. Як додатково показано в даному описі, інгібуючий MASP-2 агент, такий як інгібуюче MASP-2 антитіло, може бути використаний як новий терапевтичний підхід для лікування протеїнуричної нефропатії, індукованої адріаміцином нефропатії і для зменшення ниркового тубулоінтерстиціального запалення.

ПРИКЛАД 19

У цьому прикладі описані початкові результати поточного клінічного випробування фази 2 для оцінки безпеки і клінічної ефективності повністю людського моноклонального інгібуючого MASP-2 антитіла у дорослих зі стероїд-залежною імуноглобулін-A нефропатією (IgAN) і у дорослих зі стероїд-залежною мембранозною нефропатією (MH).

Передумови

Хронічні захворювання нирок уражують більше 20 мільйонів людей у Сполучених Штатах (Drawz P. et al., Ann. Intern. Med. 162(11), ITC1-16, 2015). Гломерулонефропатії (GN), включаючи IgAN і MH, є захворюваннями нирок, при яких ушкоджені клубочки і які часто приводять до термінальної стадії ниркової недостатності і діалізу. Існує декілька типів первинних GN, найпоширенішою з яких є IgAN. У багатьох із цих пацієнтів спостерігається персистуюче запалення нирок і прогресуюче погіршення стану. Часто ці пацієнти лікуються кортикостероїдами або імунодепресантами, для яких характерні численні серйозні віддалені несприятливі наслідки. У багатьох пацієнтів стан продовжує погіршуватися навіть при цих методах лікування. Спосіб лікування IgAN або MH відсутній.

IgA-нефропатія

Імуноглобулін A-нефропатія (IgAN) - це аутоімунне захворювання нирок, яке приводить до запалення усередині нирок і ушкодження нирок. IgAN є найпоширенішим первинним гломерулярним захворюванням в усьому світі. Судячи з оцінок, при щорічному рівні захворюваності приблизно 2,5 на 100000 людей у 1 з 1400 людей у США розвивається IgAN. У 40 % пацієнтів з IgAN хвороба буде прогресувати до термінальної стадії ниркової недостатності (ТСНН). У пацієнтів, як правило, спостерігається мікроскопічна гематурія з легкою і помірною протеїнурією і різними рівнями ниркової недостатності (Wyatt R.J. et al., N. Engl. J. Med. 368(25):2402-14, 2013). Клінічні маркери, такі як порушення функції нирок, тривала гіпертензія і важка протеїнурія (більше 1 г на день), пов'язані з поганим прогнозом (Goto M. et al., Transplant.

Nephrol. Dial. 24(10):3068-74, 2009; Berthoux F. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 22(4):752-61, 2011). Протеїнурія є найбільш сильним прогностичним фактором, що не залежить від інших факторів ризику за результатами декількох великих неекспериментальних і проспективних досліджень (Coppo R. et al., J. Nephrol. 18(5):503-12, 2005; Reich H.N. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 18(12):3177-83, 2007). По оцінках, 15-20 % пацієнтів досягають ТСНН протягом 10 років після початку захворювання, якщо вони не одержують лікування (D'Amico G., Am. J. Kidney Dis. 36(2):227-37, 2000).

Діагностичною ознакою IgAN є переважання відкладення або тільки IgA, або в комбінації з IgG, IgM або обох у гломерулярному мезангіумі. При IgAN біопсія нирок виявляє гломерулярне відкладення мананзв'язувального лектину (MBL), ключової молекули розпізнавання для активації MASP-2, ефекторного ферменту лектинового шляху системи комплементу. Гломерулярні відкладення MBL, які звичайно локалізовані спільно з IgA і указують на активацію комплементу, і високий рівень MBL у сечі пов'язані з несприятливим прогнозом при IgAN, при цьому у цих пацієнтів проявляються більш серйозні гістологічні зміни і мезангіальна проліферація, ніж у пацієнтів без відкладення MBL або з високими рівнями MBL у сечі (Matsuda M. et al., Nephron, 80(4):408-13, 1998; Liu L.L. et al., Clin. Exp. Immunol. 169(2):148-155, 2012; Roos A. et al., J. Am. Soc. Nephrol. 17(6):1724-34, 2006; Liu L.L. et al., Clin. Exp. Immunol. 174(1):152-60, 2013). Частота ремісії також значно нижче у пацієнтів з відкладенням MBL (Liu L.L. et al., Clin. Exp. Immunol. 174(1):152-60, 2013).

Поточна терапія IgAN включає контроль артеріального тиску і часто приймання кортикостероїдів і/або інших імунодепресантів, таких як циклофосфамід, азатіоприн або мікофеноляту мофетил, у випадках важкого стану захворювання (наприклад, серпоподібні IgAN). Згідно з керівництвом Хвороби нирок по поліпшенню глобальних результатів лікування при гломерулонефриті (KDIGO) (Int. Soc. of Nephrol. 2(2):139-274, 2012) рекомендується вводити кортикостероїди пацієнтам з протеїнурією дозою, яка вище або дорівнює 1 г/день, зі звичайною тривалістю лікування 6 місяців. Однак навіть при агресивному імуносупресивному лікуванні, яке пов'язане з серйозними віддаленими наслідками, у деяких пацієнтів спостерігається прогресуюче погіршення функції нирок. Схвалене лікування IgAN відсутнє, навіть у випадку застосування інгібіторів ангіотензинперетворювального ферменту (ACE) або блокаторів рецепторів ангіотензину (ARB) для контролю артеріального тиску у деяких пацієнтів зберігається підвищена протеїнурія. Було показано, що жоден із цих методів не зупиняє або навіть не уповільнює прогресування IgAN у пацієнтів з ризиком швидкого прогресування захворювання.

Мембранозна нефропатія

Щорічний рівень захворюваності мембранозною нефропатією (МН) становить приблизно 10-12 на 1000000 людей. Пацієнти з МН можуть мати змінний перебіг захворювання, але приблизно у 25 % буде розвиватися термінальна стадія ниркової недостатності.

Мембранозна нефропатія - це імуномодульоване клубочкове захворювання і одна з найпоширеніших причин нефротичного синдрому у дорослих. Хвороба характеризується утворенням імунних відкладень, у першу чергу IgG4, на зовнішньому шарі гломерулярної базальної мембрани, які містять антигени подоцитів і антитіла, специфічні до цих антигенів, що приводить до активації комплементу. Початкові прояви МН пов'язані з нефротичним синдромом: протеїнурією, гіпоальбумінемією, гіперліпідемією і набряком.

Хоча МН може слабшати спонтанно, без лікування, у однієї третини пацієнтів спостерігається прогресуюча втрата функції нирок і прогресування захворювання до ТСНН у середньому через 5 років після встановлення діагнозу. Часто для лікування МН застосовуються кортикостероїди, і існує необхідність у розробці альтернативних методів лікування. Крім того, пацієнти, які, як вважається, мають помірний ризик прогресування, залежно від тяжкості протеїнурії, одержують преднізон у комбінації з циклофосфамідом або інгібітором кальциневрину, і ці два методи лікування, застосовувані спільно, часто пов'язані з серйозними системними побічними ефектами.

Методи

Два клінічні дослідження Фази 1, проведені на здорових добровольцях, продемонстрували, що як внутрішньовенне, так і підшкірне введення інгібуючого MASP-2 антитіла, OMS646, приводило до стійкого пригнічення лектинового шляху.

У цьому прикладі описані проміжні результати Фази 2, що проводиться на даний час, неконтрольованого, багатоцентрового дослідження інгібуючого MASP-2 антитіла, OMS646, у суб'єктів з IgAN і МН. Згідно з критеріями включення необхідно, щоб стан усіх пацієнтів у цьому дослідженні, незалежно від підтипу захворювання нирок, підтримувався прийманням стабільної дози кортикостероїдів протягом щонайменше 12 тижнів до їх включення в дослідження (тобто

пацієнти були залежними від стероїдів). Дослідження являє собою непорівняльне пілотне дослідження з 12-тижневим лікуванням і 6-тижневим періодом спостереження.

Згідно з планом дослідження необхідно набрати приблизно по чотири пацієнти на одне захворювання. Дослідження призначене для оцінки можливості OMS646 поліпшувати функцію нирок (наприклад, зменшувати тяжкість протеїнурії) і знижувати потреби в кортикостероїдах у пацієнтів з IgAN і МН. На сьогоднішній день 2 пацієнти з IgA-нефропатією і 2 пацієнти з мембранозною нефропатією завершили лікування в цьому дослідженні.

Для входження в дослідження кожний суб'єкт повинен мати високий рівень білка в сечі, незважаючи на постійне лікування стабільною дозою кортикостероїдів. Ці критерії вибрані для пацієнтів, у яких навряд чи відбудеться спонтанне поліпшення під час дослідження.

Вік суб'єктів під час відбору становив ≥18, і суб'єктів включали в дослідження тільки в тому випадку, якщо в них діагностували одне з наступного: IgAN при біопсії нирок або первинну МН при біопсії нирок. Зараховані пацієнти також повинні були відповідати всім наведеним нижче критеріям включення:

(1) середнє співвідношення альбумін/креатинін у сечі >0,6 у трьох зразках, що збираються послідовно і щодня перед кожним з двох відвідувань у період відбору;

(2) приймання преднізону дозою ≥10 мг або еквівалентною дозою протягом щонайменше 12 тижнів до відвідування 1 у період відбору;

(3) при фоновому імуносупресивному лікуванні (наприклад, циклофосфамідом, мікофеноляту мофетилом) прийом стабільної дози протягом як мінімум 2 місяців до візиту 1 у період відбору без очікуваної зміни дози під час дослідження;

(4) оцінена швидкість клубочкової фільтрації (eGFR) ≥30 мл/хв./1,73 м^2, обчислена по рівнянню MDRD[1];

(5) проходження призначеної лікарем стабільної, оптимізованої терапії інгібіторами ангіотензинперетворювального ферменту (ACEI) і/або блокаторами рецепторів ангіотензину (ARB), систолічний артеріальний тиск <150 мм рт. ст. і діастолічний артеріальний тиск <90 мм рт. ст. у розслабленому стані;

(6) невикористання белімумабу, ецулізумабу або ритуксимабу протягом 6 місяців до відвідування 1 у період відбору; а також

(7) відсутність трансплантації нирки.

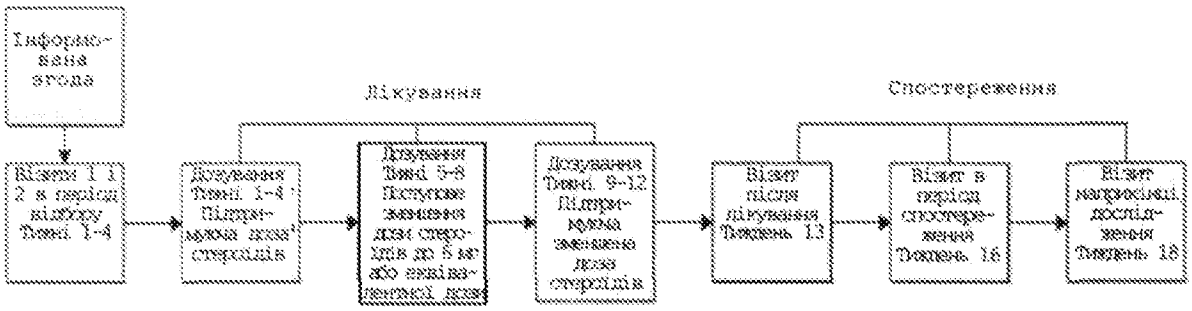
[1]Рівняння MDRD: eGFR (мл/хв./1,73 м^2)=175 × (Scr) - 1,154 × (Вік) - 0,203 × (0,742, якщо жінка) × (1,122, якщо афроамериканець). Примітка: Scr = вимірювання креатиніну в сироватці крові повинно бути виражене в мг/дл.

Моноклональне антитіло, використовуване в цьому дослідженні, OMS646, являє собою повністю людське IgG4 моноклональне антитіло, яке зв'язує і інгібує людський MASP-2. MASP-2 є ефекторним ферментом лектинового шляху. Як показано в прикладі 12, OMS646 ефективно зв'язується з рекомбінантним MASP-2 (уявна рівноважна константа дисоціації в діапазоні 100 пМ) і проявляє більше ніж 5000-кратну селективність до гомологічних білків C1s, C1r і MASP-1. У функціональних аналізах OMS646 пригнічує активність лектинового шляху людини з ефективністю в межах наномолів (концентрація, що забезпечує 50 % інгібування (IC_{50}), становить приблизно 3 нМ), але не виявляє суттєвого впливу на класичний шлях. OMS646, що вводиться або внутрішньовенною (IV), або підшкірною (SC) ін'єкцією мишам, приматам, що не належать до людини, і людям, приводив до високих концентрацій у плазмі, які були пов'язані з пригніченням активації лектинового шляху в аналізі ex vivo.

У цьому дослідженні лікарська речовина OMS646 надавалася в концентрації 100 мг/мл, яку додатково розбавляли для IV введення. Відповідний розрахований об'єм 100 мг/мл розчину OMS646 для ін'єкцій витягали з флакона за допомогою шприца для приготування дози. Мішок для інфузії вводили протягом чотирьох годин після приготування.

Дослідження включало періоди скринінгу (28 днів), лікування (12 тижнів) і наступного спостереження (6 тижнів), як показано на схемі дослідження, наведеній нижче.

Схема дослідження



Під час відбору до введення першої дози OMS646 пацієнти, що пройшли відбір, надавали по три зразки сечі (які збирали раз на добу) у кожному із двох триденних періодів для встановлення вихідних значень відношення альбуміну до креатиніну в сечі. Після закінчення періоду відбору відібраним суб'єктам вводили IV OMS646 по 4 мг/кг один раз на тиждень протягом 12 тижнів (період лікування). Після останньої дози OMS646 йшов 6-тижневий період спостереження.

Протягом перших 4 тижнів лікування за допомогою OMS646 випробувані продовжували приймати стабільну дозу кортикостероїдів, яку приймали до початку лікування. Наприкінці перших 4-х тижнів 12-тижневого періоду приймання суб'єктами кортикостероїду поступово скорочували (тобто дозу кортикостероїдів зменшували), якщо це було можливо, протягом 4 тижнів, а потім йшли 4 тижні, протягом яких продовжувалося приймання одержаної в результаті зменшеної дози кортикостероїдів. Метою було зниження дози преднізону до ≤6 мг (або еквівалентної дози) щодня. У цей період поступове зниження дози припиняли у пацієнтів, у яких спостерігалося погіршення функції нирок, по оцінці дослідника. Суб'єктів лікували OMS646 на фоні поступового зниження дози кортикостероїду і протягом повних 12 тижнів. Потім пацієнтів спостерігали протягом додаткових 6 тижнів після останнього приймання OMS646. Поступове зниження дози кортикостероїдів і лікування OMS646 дозволили оцінити, чи дозволяє приймання OMS646 знижувати дози кортикостероїдів, необхідних для підтримання стабільної функції нирок.

Ключовими заходами ефективності в цьому дослідженні є зміна співвідношення альбумін/креатинін у сечі (uACR) і 24-годинний рівень білка відносно вихідного рівня, одержаного до початку 12 тижнів. Вимірювання білка або альбуміну в сечі звичайно використовується для оцінки ураження нирок, а стійкі високі рівні білка в сечі корелюють з прогресуванням захворювання нирок. uACR використовується в клінічних дослідженнях для оцінки протеїнурії.

Оцінка ефективності

Аналізоване значення uACR визначають як середнє від усіх значень, одержаних у деякій часовій точці. Планована кількість uACR дорівнює трьом для кожного запланованого моменту часу. Вихідне значення uACR визначали як середнє значення аналізованих значень при двох відвідуваннях.

Результати

На фіг. 40 графічно показані uACR для двох пацієнтів з IgAN протягом 12-тижневого дослідження із щотижневим лікуванням інгібуючим MASP-2 антитілом (OMS646) у кількості 4 мг/кг. Як показано на фіг. 40, зміна від вихідного рівня статистично значима в часовій точці "a" (p=0,003); часовій точці "b" (p=0,007) і часовій точці "c" (p=0,033), згідно з нетрансформованим аналізом. У таблиці 12 представлені дані для білка в 24-годинній сечі пацієнтів з IgAN, що одержували OMS646.

ТАБЛИЦЯ 12

Білок в 24-годинній сечі (мг/добу) у IgAN-пацієнтів, що одержували OMS646

Час одержання зразка	Пацієнт 1 (мг/24 години)	Пацієнт 2 (мг/24 години)	Середнє значення
Вихідний рівень	3876	2437	3156
День 85	1783	455	1119
P=0,017			

Як показано на фіг. 40 і в таблиці 12, у ході дослідження у пацієнтів з IgAN спостерігали

клінічно і статистично значиме поліпшення функції нирок. Статистично значиме зниження як величини uACR (див. фіг. 40), так і концентрації білка в 24-годинній сечі (див. таблицю 12). Як показують дані uACR на фіг. 40, середній вихідний рівень uACR становив 1264 мг/г і наприкінці лікування досяг 525 мг/г (p=0,011), знизившись до 128 мг/г наприкінці періоду спостереження. На фіг. 40 додатково показано, що лікувальний ефект підтримувався протягом усього періоду спостереження. Вимірювання 24-годинної екскреції білка з сечею відслідковували по uACR, з середнім зниженням від 3156 мг/24 години до 1119 мг/24 години (p=0,017). Ефекти лікування у двох пацієнтів були у високому ступені узгодженими. У обох пацієнтів спостерігалося зниження приблизно на 2000 мг/добу, і обидва пацієнти досягали часткової ремісії (визначеної як більше 50-відсоткове зниження екскреції білка в 24-годинній сечі і/або кінцевої екскреції білка менше 1000 мг/добу; повну ремісію визначали як екскрецію білка менше 300 мг/добу). Величина 24-годинного зниження протеїнурії у обох пацієнтів з IgA-нефропатією пов'язана зі значним поліпшенням виживаності нирок. Обидва пацієнти з IgA-нефропатією також виявилися толерантними до суттєвого зменшення прийнятих ними доз стероїдів, зі зниженням добової дози до ≤5 мг (від 60 до 0 мг, від 30 до 5 мг).

У двох пацієнтів з МН також спостерігали зниження uACR під час лікування OMS646. У одного пацієнта з МН рівень uACR знизився з 1003 до 69 мг/г, і цей низький рівень зберігався протягом періоду спостереження. У іншого пацієнта з МН спостерігалося зниження uACR з 1323 до 673 мг/г зі змінним курсом після лікування. У першого пацієнта з МН спостерігали виражене зниження рівня білка в 24-годинній сечі (10771 мг/24 години на початку лікування до 325 мг/24 години на день 85), що забезпечувало часткову і майже повну ремісію, тоді як у іншого він залишався практично незмінним (4272 мг/24 години на початку лікування до 4502 мг/24 на день 85). Рівні стероїдів у двох пацієнтів з МН поступово знижувалися від 30 до 15 мг і від 10 до 5 мг.

Таким чином, узгоджені поліпшення функції нирок спостерігали у пацієнтів з IgAN і МН, що одержували лікування інгібуючим MASP-2 антитілом, OMS646. Ефекти лікування OMS646 у пацієнтів з IgAN є надійними і узгодженими, що свідчить про сильний сигнал ефективності. Ці ефекти підтверджені результатами у пацієнтів з МН. Часовий профіль і величина змін uACR під час лікування були узгодженими у всіх чотирьох пацієнтів з IgAN і МН. Ніяких суттєвих проблем з безпекою не спостерігалося. Пацієнти в цьому дослідженні належали до групи, важкодоступної для лікування, і терапевтичний ефект у цих пацієнтів свідчить про ефективність інгібуючого MASP-2 антитіла, такого як OMS646, у пацієнтів з IgAN і МН, таких як пацієнти, що страждають стероїд-залежними IgAN і МН (тобто пацієнтів, що одержували лікування стабільною дозою кортикостероїдів до лікування інгібуючим MASP-2 антитілом), у тому числі пацієнтів з підвищеним ризиком швидкого прогресування до термінальної стадії ниркової недостатності.

Відповідно до вищевикладеного, в одному з варіантів здійснення винаходу надається спосіб лікування людини, що страждає IgAN або МН, який включає введення суб'єкту композиції, що містить кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, ефективну для пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу. В одному з варіантів здійснення спосіб включає введення людині, що страждає IgAN або МН, кількості інгібуючого MASP-2 антитіла, достатньої для поліпшення функції нирок (наприклад, зменшення протеїнурії). В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає стероїд-залежною IgAN. В одному з варіантів здійснення суб'єкт страждає стероїд-залежною МН. В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводиться суб'єкту, що страждає стероїд-залежною IgAN або стероїд-залежною МН, у кількості, достатній для поліпшення функції нирок і/або зниження дози кортикостероїдів у зазначеного суб'єкта.

В одному з варіантів здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта, що страждає стероїд-залежною IgAN, до етапу введення суб'єкту композиції, яка містить кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, ефективну для пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу.

В одному з варіантів здійснення спосіб додатково включає ідентифікацію суб'єкта, що має стероїд-залежну МН, до етапу введення суб'єкту композиції, яка містить кількість інгібуючого MASP-2 антитіла, ефективну для пригнічення MASP-2-залежної активації комплементу.

Відповідно до будь-якого з розкритих тут варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло проявляє щонайменше одну або декілька з наступних характеристик: зазначене антитіло зв'язує людський MASP-2 з K_D 10 нМ або менше, зазначене антитіло зв'язує епітоп у домені CCP1 MASP-2, зазначене антитіло пригнічує відкладення C3b в аналізі in vitro в 1 % людській сироватці з IC_{50} 10 нМ або менше, зазначене антитіло пригнічує відкладення C3b в 90 % людської сироватці з IC_{50} 30 нМ або менше, де антитіло являє собою фрагмент антитіла, вибраний із групи, що складається з Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ і $F(ab')_2$, де антитіло являє собою одноланцюжкову молекулу, де зазначене антитіло являє собою молекулу IgG2, де зазначене

антитіло являє собою молекулу IgG1, де зазначене антитіло являє собою молекулу IgG4, де молекула IgG4 містить мутацію S228P. В одному з варіантів здійснення антитіло зв'язується з MASP-2 і вибірково пригнічує лектиновий шлях без пригнічення по суті класичного шляху (тобто пригнічує лектиновий шлях, залишаючи неушкодженим класичний шлях комплементу).

В одному з варіантів здійснення інгібуюче MASP-2 антитіло вводять у кількості, ефективній для поліпшення щонайменше одного або більше клінічних параметрів, пов'язаних з функцією нирок, таких як зменшення протеїнурії (наприклад, зменшення uACR і/або зменшення концентрації білка в 24-годинній сечі, таке як більше ніж 20 % зменшення екскреції білка в 24-годинній сечі, або таке як більше ніж 30 % зменшення екскреції білка в 24-годинній сечі, або таке як більше ніж 40 % зменшення екскреції білка в 24-годинній сечі, або таке як більше 50 % зменшення екскреції білка в 24-годинній сечі).

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, що страждає IgAN (такою як стероїд-залежна IgAN), через катетер (наприклад, внутрішньовенно) протягом першого періоду часу (наприклад, щонайменше від одного дня до тижня або двох тижнів, або трьох тижнів, або чотирьох тижнів або більше) з наступним введенням інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту підшкірно протягом другого періоду часу (наприклад, хронічної фази протягом щонайменше двох тижнів або більше).

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 агента суб'єкту, що страждає MH (такою як стероїд-залежна MH), через катетер (наприклад, внутрішньовенно) протягом першого періоду часу (наприклад, щонайменше від одного дня до тижня або двох тижнів, або трьох тижнів, або чотирьох тижнів, або більше) з наступним введенням інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту підшкірно протягом другого періоду часу (наприклад, хронічної фази протягом щонайменше двох тижнів або більше).

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення інгібуючого MASP-2 антитіла суб'єкту, що страждає IgAN (такою як стероїд-залежна IgAN) або MH (такою як стероїд-залежна MH) внутрішньовенно, внутрішньом'язово або підшкірно. Лікування може бути хронічним і вводитися щодня щомісяця, але переважно щонайменше кожні два тижні або щонайменше раз на тиждень, наприклад два рази на тиждень або три рази на тиждень.

В одному з варіантів здійснення спосіб включає лікування суб'єкта, що страждає IgAN (такою як стероїд-залежна IgAN) або MH (такою як стероїд-залежна MH), яке включає введення суб'єкту композиції, що містить кількість інгібуючого MASP-2 антитіла або антигензв'язувального фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 амінокислотної послідовності, представленої в SEQ ID NO:70. У деяких варіантах здійснення композиція містить інгібуюче MASP-2 антитіло, що містить (I) (a) варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить: i) CDR-H1 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 31-35 в SEQ ID NO:67; і ii) CDR-H2 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 50-65 в SEQ ID NO:67; і iii) CDR-H3 важкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 95-107 в SEQ ID NO:67; і (b) варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить: i) CDR-L1 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 24-34 в SEQ ID NO:70; і ii) CDR-L2 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 50-56 в SEQ ID NO:70; і iii) CDR-L3 легкого ланцюга, що містить амінокислотну послідовність з аа 89-97 в SEQ ID NO:70; або (II) його варіант, що включає варіабельну ділянку важкого ланцюга з щонайменше 90 % ідентичністю з SEQ ID NO:67 (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичністю) з SEQ ID NO:67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга з ідентичністю щонайменше 90 % (наприклад, щонайменше 91 %, щонайменше 92 %, щонайменше 93 %, щонайменше 94 %, щонайменше 95 %, щонайменше 96 %, щонайменше 97 %, щонайменше 98 %, щонайменше 99 % ідентичністю) з SEQ ID NO:70.

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

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

У деяких варіантах здійснення спосіб включає введення суб'єкту, що страждає або має ризик розвитку IgAN (такої як стероїд-залежна IgAN) або МН (такої як стероїд-залежна МН), композиції, яка містить інгібуюче MASP-2 антитіло або антигензв'язувальний фрагмент, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, яка містить амінокислотну послідовність, представлену в SEQ ID NO:70, у дозі від 1 до 10 мг/кг (тобто 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10 мг/кг) не рідше одного разу на тиждень (наприклад, щонайменше два рази на тиждень або щонайменше три рази на тиждень) протягом щонайменше 3 тижнів або протягом щонайменше 4 тижнів, або протягом щонайменше 5 тижнів, або протягом щонайменше 6 тижнів, або протягом щонайменше 7 тижнів, або протягом щонайменше 8 тижнів, або протягом щонайменше 9 тижнів, або протягом щонайменше 10 тижнів, або протягом щонайменше 11 тижнів, або протягом щонайменше 12 тижнів.

Інші варіанти здійснення

Усі публікації, патентні заявки і патенти, згадані в цьому описі, включені в даний опис у вигляді посилання.

Різні модифікації і варіанти описаних способів і композицій за винаходом будуть очевидні фахівцям у даній галузі техніки без відхилення від обсягу і суті винаходу. Хоча винахід був описаний відносно конкретних переважних варіантів здійснення, слід розуміти, що заявлений винахід жодним чином не повинен бути обмежений такими конкретними варіантами здійснення.

Хоча продемонстровані і описані ілюстративні варіанти здійснення, буде зрозуміло, що можуть бути внесені різні зміни без відхилення від суті і обсягу винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Omeros Corporation
University of Leicester
Brunskill, Nigel
Demopulos, Gregory A.
Dudler, Tom
Schwaeble, Hans-Wilhelm
<120> СПОСІБ ПРИГНІЧЕННЯ ФІБРОЗУ У СУБ'ЄКТА, ЩО ЦЬОГО ПОТРЕБУЄ
<130> MP.1.0250.PCT
<150> 62/275,025
<151> 2016-01-05
<150> 62/407,979
<151> 2016-10-13
<160> 85
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 725
<212> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Кодуюча послідовність
<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
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
170 175 180 185
tag cctcccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc
634
tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcacccacc
694
atggacccaa taataaacct ggccccaccc c
725
<210> 2
<211> 185
<212> Протеїн
<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

<210> 3
<211> 170
<212> Протеїн
<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> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Кодуюча послідовність
<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
cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg cgc
195
Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg
45 50 55
ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag tac
243
Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr
60 65 70

gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc
291
Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys
75 80 85 90
ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc
339
Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe
95 100 105
tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc
387
Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser
110 115 120
aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac
435
Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp
125 130 135
att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac
483
Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His
140 145 150
cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc
531
His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly
155 160 165 170
tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc
579
Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly
175 180 185
cag gtc ttc acc cag agg tct ggg gag ctc agc agc cct gaa tac cca
627
Gln Val Phe Thr Gln Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro
190 195 200
cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag
675
Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu
205 210 215
gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag
723
Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu
220 225 230
aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca
771
Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr
235 240 245 250
gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg
819
Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg
255 260 265
att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa
867
Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu
270 275 280
tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag
915
Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln
285 290 295
cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg
963
Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val
300 305 310
caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act

1011
Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr
315 320 325 330
ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca
1059
Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala
335 340 345
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
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 tacccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca
2302
gtcatctttg cccacccagt gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa
2362
gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg
2422
tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaaa aaaaaaaa
2460
<210> 5
<211> 686
<212> Протеїн
<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
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
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> Протеїн
<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
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
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
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> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 7
cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc
60
ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga
120
ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg
180
gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggt gggagcacag gcctgggcct caccgccccct
240
gccctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccacccccct
300
taggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atcccccggc tttccagggg
360
agtatgccaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc acccccccggc taccgcctgc

420
gcctctactt cacccacttc gacctggagc tctcccacct ctgcgagtac gacttcgtca
480
aggtgccgtc agacgggagg gctggggttt ctcagggtcg gggggtcccc aaggagtagc
540
cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg
600
ggtcttgcct tcactccctg tgacacctga ccccacagct gagctcgggg gccaaggtgc
660
tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt
720
tctactcgct gggctccagc ctggacatta ccttccgctc cgactactcc aacgagaagc
780
cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgagggtga gccaagaggg gtcctgcaac
840
atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct
900
tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggcctgacat catccacaat
960
gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag
1020
ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgac gcagggactg gccgggcgcg gcagctcacg
1080
cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt
1140
caaggccagc cagggcaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct
1200
gggcgtggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactaggga ggctgaggca ggagaattgc
1260
ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtgaa cagagattgc accactacac tccacctggg
1320
cgacagacta gactccgtct caaaaaacaa aaaacaaaaa ccacgcaggg ccgagggccc
1380
atttacaagc tgacaaagtg ggccctgcca gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca
1440
gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc
1500
tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc tgtagccccg ccccctgggt ttgattgact
1560
cccctcatta gctgggtgac ctcggccgga cactgaaact cccactggtt taacagaggt
1620
gatgtttgca tctttctccc agcgctgctg ggagcttgca gcgaccctag gcctgtaagg
1680
tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcctc tgaggtccac
1740
tctgaggtca tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga
1800
cggcctgcct ggccctgcct ctcccccaga cattgacgag tgccaggtgg ccccgggaga
1860
ggcgcccacc tgcgaccacc actgccacaa ccacctgggc ggtttctact gctcctgccg
1920
cgcaggctac gtcctgcacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgagggag gctgcctggg
1980
ccccaacgca ccctctcctg ggatacccgg ggctcctcag ggccattgct gctctgccca
2040
ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc
2100
cccttctcag ccctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtgccac cctgccctag
2160
cactgagact aattctaaca tcccactgtg tacctggttc cacctgggct ctgggaaccc
2220

ctcatgtagc cacgggagag tcggggtatc taccctcgtt ccttggactg ggttcctgtt
2280
ccctgcactg ggggacgggc cagtgctctg gggcgtgggc agccccaccc tgtggcgctg
2340
accctgctcc cccgactcgg tttctcctct cggggtctct ccttgcctct ctgatctctc
2400
ttccagagca gagcctctag cctcccctgg agctccggct gcccagcagg tcagaagcca
2460
gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactcccatt
2520
cacccaccat ggacccaata ataaacctgg ccccacccca cctgctgccg cgtgtctctg
2580
gggtgggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctct gcctaccctc ctcacagcct
2640
catgaacccc aggtctgtgg gagcctcctc catggggcca cacggtcctt ggcctcaccc
2700
cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgctc gagtccaggt
2760
ccccagaggc tgagcccaga gtaatcttga accacccccа ttcagggtct ggcctggagg
2820
agcctgaccc acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtccccc
2880
gcaaatccag gggtgattcc cactgcccca taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca
2940
atgttggggc tcctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgcccccca ctgcagctgg
3000
gggtggggtg gtggtatggg atggggacca agccttcctt gaaggataga gcccagccca
3060
acaccccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc
3120
agtcatgatc actgttgcct tgaacttcca agaacagccc cagggcaagg gtcaaaacag
3180
gggaaagggg gtgatgagag atccttcttc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg
3240
ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg
3300
tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggcccttt aggctcgagg agatgctcct
3360
ctcttttccc gaattcccag ggacccagga gagtgtccct tcttcctctt cctgtgtgtc
3420
catccacccc cgccccccgc cctggcagag ctggtggaac tcagtgctct agcccctacc
3480
ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgctccc tgggggtgtg agtgagggcc
3540
tgtgcgctcc atcccgagtg ctgcctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc
3600
ctctctaagc ggcccctcag ccatcgggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggcctcaggg
3660
gctggccacc tgcagggccc agcccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg
3720
tcccagtttc ctgctcccca aggcatccac cctgctgttg gtgcgagggc tgatagaggg
3780
cacgccaagt cactcccctg cccttccctc cttccagccc tgtgctccgg ccaggtcttc
3840
acccagaggt ctggggagct cagcagccct gaatacccac ggccgtatcc caaactctcc
3900
agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag
3960
tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg
4020
ctcctgggcc cctcatcttg tcccagatcc tccccccttca gcccagctgc acccccctact

4080
tcctgcagca tggcccccac cacgttcccg tcaccctcgg tgaccccacc tcttcaggtg
4140
ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg
4200
caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg
4260
gttacttccc tccgcccagg ccagacccag gcagctgctc cccagctttc atgagcttct
4320
ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggcccattc tgtgggaaga cattgcccca
4380
caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga
4440
ccacacaggc tggaagatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg
4500
tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgta gggctcttct
4560
gggcaggact aggaagggac accaggttta gtggtgctga ggtctgaggc agcagcttct
4620
aaggggaagc acccgtgccc tcctcagcag cacccagcat cttcaccact cattcttcaa
4680
ccacccattc acccatcact catcttttac ccacccaccc tttgccactc atccttctgt
4740
ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccacccatcc atcctttgcc acacaaccat
4800
ccacccattc ttctacctac ccatcctatc catccatcct tctatcagca tccttctacc
4860
acccatcctt cgttcggtca tccatcatca tccatccatc
4900
<210> 8
<211> 136
<212> Протеїн
<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> Протеїн
<213> Homo sapiens
<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> Протеїн
<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
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> Протеїн
<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
35 40
<210> 12
<211> 242
<212> Протеїн
<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
<211> 16
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<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> Протеїн

<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 16
Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn
1. 5
<210> 17
<211> 25
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 17
Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
1. 5 10 15
Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe
20 25
<210> 18
<211> 9
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 18
Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly
1. 5
<210> 19
<211> 25
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<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> ДНК
<213> Homo sapiens
<220>
<221> Кодуюча послідовність
<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
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

195 200 205 210
ggt 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> Протеїн
<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
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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>

<223> Синтетична
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> де X в положенні 1 являє собою гідроксипролін
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> де X в положенні 4 являє собою гідрофобний залишок
<400> 22
Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro
1. 5
<210> 23
<211> 5
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> де X являє собою гідроксипролін
<400> 23
Xaa Gly Lys Leu Gly
1. 5
<210> 24
<211> 16
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(15)
<223> де X в положеннях 9 і 15 являє собою гідроксипролін
<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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(27)
<223> де X в положеннях 3, 6, 15, 21, 24, 27 являє собою гідроксипролін
<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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<220>

<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa може бути будь-якою амінокислотою, що зустрічається в природі
<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa може бути будь-якою амінокислотою, що зустрічається в природі
<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa може бути будь-якою амінокислотою, що зустрічається в природі
<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> Xaa може бути будь-якою амінокислотою, що зустрічається в природі
<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> Xaa може бути будь-якою амінокислотою, що зустрічається в природі
<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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(33)
<223> де X в положеннях 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 являє собою гідроксипролін
<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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(45)
<223> де X в положеннях 3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 являє собою гідроксипролін

<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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<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> ДНК
<213> Homo sapiens
<400> 30
atgaggctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggcccg
60
aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc
120
aatgaccagg agcggcgctg gaccctgact gcacccccgg gctaccgcct gcgcctctac
180
ttcacccact tcgacctgga gctctcccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc
240
tcgggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc
300
cctggcaagg acactttcta ctcgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac
360
tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac
420
gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg
480
ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc
540
tcagccctgt gctccggcc
559
<210> 31
<211> 34
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 31
cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc
34
<210> 32
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 32
gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag
33

<210> 33
<211> 33
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 33
agcagccctg aatacccacg gccgtatccc aaa
33
<210> 34
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 34
cgggatccat gaggctgctg accctc
26
<210> 35
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 35
ggaattccta ggctgcata
19
<210> 36
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 36
ggaattccta cagggcgct
19
<210> 37
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 37
ggaattccta gtagtggat
19
<210> 38
<211> 25
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 38
tgcggccgct gtaggtgctg tcttt
25
<210> 39
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 39

ggaattcact cgttattctc gga
23
<210> 40
<211> 17
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 40
tccgagaata acgagtg
17
<210> 41
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 41
cattgaaagc tttggggtag aagttgttc
29
<210> 42
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 42
cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga
27
<210> 43
<211> 28
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 43
cggtaagctt cactggctca gggaaata
28
<210> 44
<211> 37
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 44
aagaagcttg ccgccaccat ggattggctg tggaact
37
<210> 45
<211> 31
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 45
cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g
31
<210> 46
<211> 36
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>

<223> Синтетична
<400> 46
aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct
36
<210> 47
<211> 26
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 47
cgggatcctt ctccctctaa cactct
26
<210> 48
<211> 9
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 48
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
1. 5
<210> 49
<211> 4960
<212> ДНК
<213> Homo Sapiens
<400> 49
ccggacgtgg tggcgcatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt
60
gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag
120
gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacaggga
180
gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac
240
aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga
300
agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt
360
ttttttttt tttgaggtgg agtctcactc tgtcgtccag gctggagtgc agtggtgcga
420
tctcggatca ctgcaacctc cgcctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc
480
gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttgta tttttagtag
540
agatgggatt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccaccc
600
accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg
660
acttctaagc ctgcaaggga atcgggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta
720
agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg
780
gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttcaa gaccagcctg accaacatgg
840
agaaacccca tccctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa
900
tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc
960
agtgagctat gattgcagca ctgcactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa
1020

agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gtttccaggc tgttgttacc taggtccgac
1080
tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcatg
1140
gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tcactggaca
1200
aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc
1260
acaccatgag gtaggtgggc gcccacagcc tccctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg
1320
cctgggccct caccgccccc gccctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg
1380
tggctcggtg gccacccccc tgggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc
1440
atccccccggc tttccagggg agtatgccaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc
1500
acccccccggc taccgcctgc gcctctactt cacccacttc gacctggagc tctcccacct
1560
ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctggggtt tctcagggtc
1620
ggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg
1680
ccaggaggga gatcaggcct gggtcttgcc ttcactccct gtgacacctg accccacagc
1740
tgagctcggg ggccaaggtg ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc
1800
gggcccctgg caaggacact ttctactcgc tgggctccag cctggacatt accttccgct
1860
ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggtg
1920
agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc
1980
ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccacctttcc cagggcaggg gagaggcctc
2040
tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc
2100
tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact
2160
ggccgggcgc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga
2220
tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact
2280
aaaactacaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag
2340
gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca
2400
ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa
2460
acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag
2520
cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct
2580
ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc
2640
cccgcccccct 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 agtccaggct

2880
ggatcccgcc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctcccc cagacattga
2940
cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct
3000
gggcggtttc tactgctcct gccgcgcagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg
3060
ctcagccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga
3120
atacccacgg ccgtatccca aactctccag ttgcacttac agcatcagcc tggaggaggg
3180
gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaaccct
3240
gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg
3300
gaagacattg ccccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg gtgaccatca cctttgtcac
3360
agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg
3420
cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct
3480
gaaagacagc ttctccatct tttgcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc
3540
cctgaaatcc tttactgcag tttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc
3600
gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc agtggccgag tggagtacat
3660
cacaggtcct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt
3720
ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag
3780
ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctgtt tgtggactat cagcccgcac
3840
aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaaacct ggtgattttc cttggcaagt
3900
cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac
3960
agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc 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 aatctaatgt atgtcgacat accgattgtt gaccatcaaa aatgtactgc
4320
tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgtaact gctaacatgc tttgtgctgg
4380
cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tggtgtttct
4440
agatagtgaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctggggtt ccatgaattg
4500
tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga
4560
gaacataatt agtgattttt aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc atttttagaa
4620
atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca
4680

tggcagttgt tgctccaccc aaaaaaacag actccaggtg aggctgctgt catttctcca
4740
cttgccagtt taattccagc cttacccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga
4800
cagtcatctt tgcccaccca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttaccttaaa
4860
aagccagtct cttttcatac tggctgttgg catttctgta aactgcctgt ccatgctctt
4920
tgtttttaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa
4960
<210> 50
<211> 2090
<212> ДНК
<213> Мишача
<220>
<221> Кодуюча послідовність
<222> (33)..(2090)
<400> 50
ggcgctggac tgcagagcta tggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg
53
Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu
1. 5
ggt 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
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 gtt tgt gag cct gtt tgt ggg ctg tcc aca cac act
1349
Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr
425 430 435
ata gga gga cgc ata gtt 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
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
600 605 610 615
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> Протеїн
<213> Мишачий
<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
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
405 410 415
Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val
420 425 430
Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln
435 440 445
Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln
450 455 460
Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr
465 470 475 480
Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn
485 490 495
Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala
500 505 510
Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly
515 520 525
Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile
530 535 540
Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser
545 550 555 560
Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
565 570 575
Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile
580 585 590
Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly
595 600 605
Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr 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
645 650 655
Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile
660 665 670
Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe
675 680 685

<210> 52
<211> 670
<212> Протеїн
<213> Мишачий
<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
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                 320
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                 400
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                 480
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                 560
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
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> ДНК
<213> Щуряча
<220>
<221> Кодуюча послідовність
<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
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 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 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 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
        465                 470                 475
aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg
1491
Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu
    480                 485                 490
gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa
1539
Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln
495                 500                 505                 510
gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct
1587
Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala
                515                 520                 525
ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca
1635
Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr
            530                 535                 540
atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca
1683
Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala
        545                 550                 555
tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta
1731
Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu
    560                 565                 570
acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca
1779
Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro
575                 580                 585                 590
att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac
1827
Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr
                595                 600                 605
cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc
1875
Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg
            610                 615                 620
ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt
1923
Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
        625                 630                 635
cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg
1971
Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
    640                 645                 650
ggt tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa
2019
Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
```

655 660 665 670
gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa
2067
Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
675 680 685
tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa
2091
<210> 54
<211> 685
<212> Протеїн
<213> Щурячий
<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
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
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
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> Протеїн
<213> Щурячий
<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
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                 320
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                 400
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                 480
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
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> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Homo Sapiens
<400> 56
atgaggctgc tgaccctcct gggccttc
28
<210> 57
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Homo Sapiens
<400> 57
gtgcccctcc tgcgtcacct ctg
23
<210> 58
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Homo Sapiens
<400> 58
cagaggtgac gcaggagggg cac
23
<210> 59
<211> 27
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Homo Sapiens
<400> 59
ttaaaatcac taattatgtt ctcgatc
27
<210> 60
<211> 22
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Мишача
<400> 60
atgaggctac tcatcttcct gg
22
<210> 61
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Мишача
<400> 61
ctgcagaggt gacgcagggg ggg
23
<210> 62
<211> 23
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Мишача
<400> 62
ccccccctgc gtcacctctg cag
23
<210> 63
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Мишача
<400> 63
ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc
29
<210> 64
<211> 29
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Щуряча
<400> 64
gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt
29
<210> 65
<211> 37
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Щуряча
<400> 65
ctagaaacac taatgcccct cctgcgtcac ctctgca
37
<210> 66
<211> 354
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 66
caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg
60
acctgcaccg tctctgggtt ctcactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt
120
cagcccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgagtga cgaaaaatcc
180
tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctccaa aaaccaggtg
240
gtccttacaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata
300
cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca
354
<210> 67
<211> 118
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<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> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<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> 106
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 69
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> 70
<211> 324
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 70
tcctatgagc tgatacagcc accctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccaccatt
60
acctgtgcgg gagacaacct tgggaagaaa cgtgtgcact ggtaccagca gaggccaggc
120
caggcccctg tgttggtcat ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgaccga
180
ttctctgcct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcactagggg cgaagccggg
240
gatgaggccg actattattg tcaggtgtgg gacattgcta ctgatcatgt ggtcttcggc
300
ggagggacca agctcaccgt ccta
324
<210> 71
<211> 120
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<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
<210> 72
<211> 36
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 72
Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn
1. 5 10 15
Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu
20 25 30
Trp Cys Asn Gln
35
<210> 73
<211> 33
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 73
Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn Thr Cys Arg
1. 5 10 15

Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu Trp Cys Asn
20 25 30
Gln
<210> 74
<211> 20
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 74
Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu
1. 5 10 15
Trp Cys Asn Gln
20
<210> 75
<211> 491
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 75
Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn
1. 5 10 15
Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu
20 25 30
Trp Cys Asn Gln Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gln Val
35 40 45
Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu Thr Leu
50 55 60
Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly Lys Met
65 70 75 80
Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
85 90 95
Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser Leu Lys
100 105 110
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
115 120 125
Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
130 135 140
Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
145 150 155 160
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
165 170 175
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
180 185 190
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
195 200 205
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
210 215 220
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
225 230 235 240
Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
245 250 255
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
260 265 270
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
275 280 285
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
290 295 300
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
305 310 315 320

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
325 330 335
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
340 345 350
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
355 360 365
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
370 375 380
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
385 390 395 400
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
405 410 415
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
420 425 430
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
435 440 445
Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
450 455 460
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
465 470 475 480
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
485 490

<210> 76
<211> 491
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 76

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 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala Ala Gly
435 440 445
Gly Ser Gly Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp
450 455 460
Lys Cys Asn Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys
465 470 475 480
Thr Lys Leu Trp Cys Asn Gln Gly Ser Gly Ala
485 490

<210> 77
<211> 258
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 77
Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn
1. 5 10 15
Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu
20 25 30
Trp Cys Asn Gln Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gln Pro
35 40 45
Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala
50 55 60
Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Tyr Trp
65 70 75 80
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr Gln Asp
85 90 95
Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
100 105 110
Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu
115 120 125
Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val Phe Gly
130 135 140
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
145 150 155 160
Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala
165 170 175
Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val
180 185 190

Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
195 200 205
Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
210 215 220
Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
225 230 235 240
Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
245 250 255
Cys Ser

<210> 78
<211> 258
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 78

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 Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125
Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140
Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160
Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175
Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190
Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195 200 205
Thr Glu Cys Ser Ala Ala Gly Gly Ser Gly Leu Glu Val Thr Cys Glu
210 215 220
Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn Thr Cys Arg Cys Gly Ser
225 230 235 240
Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu Trp Cys Asn Gln Gly Ser
245 250 255
Gly Ala

<210> 79
<211> 10
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 79

Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser
1. 5 10

<210> 80
<211> 6
<212> Протеїн

<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 80
Ala Ala Gly Gly Ser Gly
1. 5
<210> 81
<211> 4
<212> Протеїн
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 81
Gly Ser Gly Ala
1
<210> 82
<211> 1533
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 82
atgatgtcct ttgtctctct gctcctggtt ggcatcctat tccatgccac ccaggccttg
60
gaagtgacgt gtgagcccgg aacgacattc aaagacaagt gcaatacttg tcggtgcggt
120
tcagatggga aatcggcggt ctgcacaaag ctctggtgta accagggcac cggtggaggg
180
tcgggatcca gctcacaggt caccttgaag gagtctggtc ctgtgctggt gaaacccaca
240
gagaccctca cgctgacctg caccgtctct gggttctcac tcagcagggg taaaatgggt
300
gtgagctgga tccgtcagcc cccagggaag gccctggagt ggcttgcaca catttttcg
360
agtgacgaaa aatcctacag gacatcgctg aagagcaggc tcaccatctc caaggacacc
420
tccaaaaacc aggtggtcct tacaatgacc aacatggacc ctgtggacac agccacgtat
480
tactgtgcac ggatacgacg tggaggaatt gactactggg gccagggaac cctggtcact
540
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcc gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc
600
acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg
660
acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta
720
cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc
780
acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga
840
gttgagtcca aatatggtcc cccatgccca ccatgcccag cacctgagtt cctgggggga
900
ccatcagtct tcctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggacccct
960
gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg
1020
tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac
1080
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag
1140
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc

1200
aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag
1260
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc
1320
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
1380
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg
1440
caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca
1500
cagaagagcc tctccctgtc tctcgggaaa tga
1533
<210> 83
<211> 1533
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 83
atgatgtcct ttgtctctct gctcctggtt ggcatcctat tccatgccac ccaggcccag
60
gtcaccttga aggagtctgg tcctgtgctg gtgaaaccca cagagaccct cacgctgacc
120
tgcaccgtct ctgggttctc actcagcagg ggtaaaatgg gtgtgagctg gatccgtcag
180
cccccaggga aggccctgga gtggcttgca cacatttttt cgagtgacga aaaatcctac
240
aggacatcgc tgaagagcag gctcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc
300
cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc acggatacga
360
cgtggaggaa ttgactactg gggccaggga accctggtca ctgtctcctc agcctccacc
420
aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc
480
gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca
540
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac
600
tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc
660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt
720
cccccatgcc caccatgccc agcacctgag ttcctggggg gaccatcagt cttcctgttc
780
cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg
840
gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc agttcaact ggtacgtgga tggcgtggag
900
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc
960
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc
1020
tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc
1080
cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc
1140
agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc
1200
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc

1260
ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc
1320
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg
1380
tctctcggga aagccgctgg tggtagtggt ttggaagtga cgtgtgagcc cggaacgaca
1440
ttcaaagaca agtgcaatac ttgtcggtgc ggttcagatg ggaaatcggc ggtctgcaca
1500
aagctctggt gtaaccaggg tagtggtgct tga
1533
<210> 84
<211> 834
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 84
atgatgtcct ttgtctctct gctcctggtt ggcatcctat tccatgccac ccaggccttg
60
gaagtgacgt gtgagcccgg aacgacattc aaagacaagt gcaatacttg tcggtgcggt
120
tcagatggga aatcggcggt ctgcacaaag ctctggtgta accagggcac cggtggaggg
180
tcgggatcca gctcacagcc agtgctgact cagcccccct cactgtccgt gtccccagga
240
cagacagcca gcatcacctg ctctggagag aaattggggg ataaatatgc ttactggtat
300
cagcagaagc caggccagtc ccctgtgttg gtcatgtatc aagataaaca gcggccctca
360
gggatccctg agcgattctc tggctccaac tctgggaaca cagccactct gaccatcagc
420
gggacccagg ctatggatga ggctgactat tactgtcagg cgtgggacag cagcactgcg
480
gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggccagc ctaaggcggc gccctcggtc
540
accctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc
600
ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc
660
aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc
720
agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc
780
acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc atag
834
<210> 85
<211> 834
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність
<220>
<223> Синтетична
<400> 85
atgatgtcct ttgtctctct gctcctggtt ggcatcctat tccatgccac ccaggcccag
60
ccagtgctga ctcagccccc ctcactgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcatcacc
120
tgctctggag agaaattggg ggataaatat gcttactggt atcagcagaa gccaggccag
180
tcccctgtgt tggtcatgta tcaagataaa cagcggccct cagggatccc tgagcgattc
240

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat
300
gaggctgact attactgtca ggcgtgggac agcagcactg cggtattcgg cggagggacc
360
aagctgaccg tcctaggcca gcctaaggcg gcgccctcgg tcaccctgtt cccgccctcc
420
tctgaggagc ttcaagccaa caaggccaca ctggtgtgtc tcataagtga cttctacccg
480
ggagccgtga cagtggcctg gaaggcagat agcagccccg tcaaggcggg agtggagacc
540
accacaccct ccaaacaaag caacaacaag tacgcggcca gcagctatct gagcctgacg
600
cctgagcagt ggaagtccca cagaagctac agctgccagg tcacgcatga agggagcacc
660
gtggagaaga cagtggcccc tacagaatgt tcagccgctg gtggtagtgg tttggaagtg
720
acgtgtgagc ccggaacgac attcaaagac aagtgcaata cttgtcggtg cggttcagat
780
gggaaatcgg cggtctgcac aaagctctgg tgtaaccagg gtagtggtgc ttag
834

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб профілактики або зменшення ураження нирок у суб'єкта, що страждає на стероїдзалежну імуноглобулін-А-нефропатію (IgAN), який включає введення моноклонального антитіла проти людської мананзв'язувальної лектинасоційованої серинової протеази-2 (MASP-2) або його фрагмента, що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 67, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить SEQ ID NO: 69, в кількості, ефективній для зменшення протеїнурії у даного суб'єкта, який страждає на стероїдзалежну імуноглобулін-А-нефропатію (IgAN).

2. Спосіб за п. 1, де інгібуюче MASP-2 антитіло або його антигензв'язувальний фрагмент вводять у кількості і протягом періоду часу, ефективних для досягнення щонайменше 20-відсоткового зменшення 24-годинної екскреції білка з сечею, порівнюючи з вихідною 24-годинною екскрецією білка з сечею у суб'єкта до лікування.

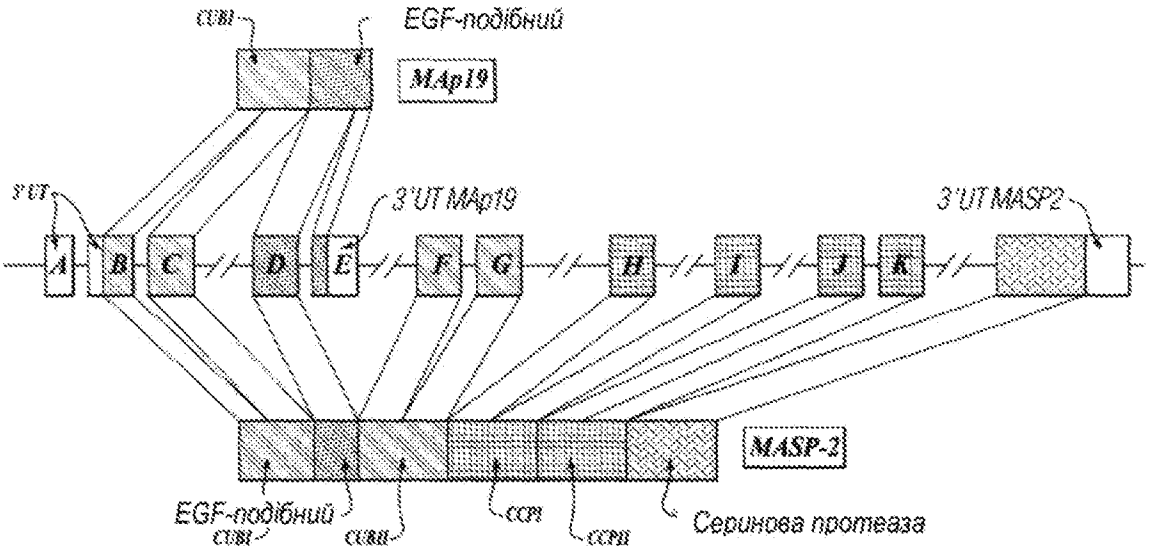
3. Спосіб за п. 1, де антитіло або його фрагмент вибирають із групи, що складається з рекомбінантного антитіла, антитіла зі зниженою ефекторною функцією, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і людського антитіла.

4. Спосіб за п. 1, де інгібуюче MASP-2 антитіло пригнічує осадження C3b в 90 % людській сироватці з IC_{50} 30 нМ або менше.

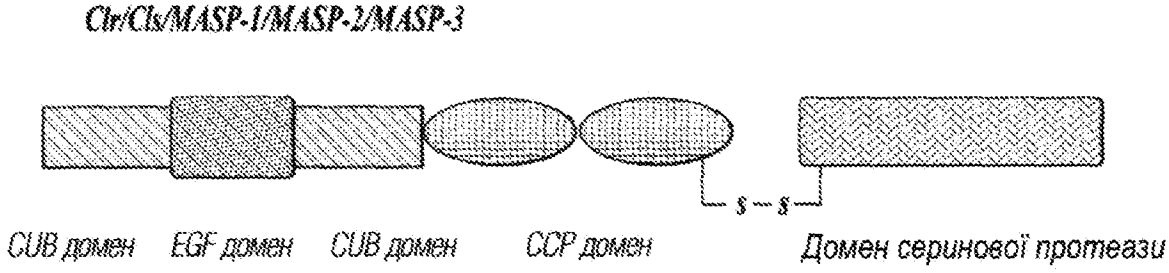
5. Спосіб за п. 1, де застосування додатково включає ідентифікацію людини, що має стероїдзалежну імуноглобулін-А-нефропатію (IgAN), до етапу введення суб'єкту композиції, яка містить кількість інгібуючого MASP-2 антитіла або його антигензв'язувального фрагмента, ефективну для зменшення протеїнурії.

6. Спосіб за п. 1, де композицію вводять у кількості, достатній для поліпшення функції нирок і зменшення дози кортикостероїдів у зазначеного суб'єкта.

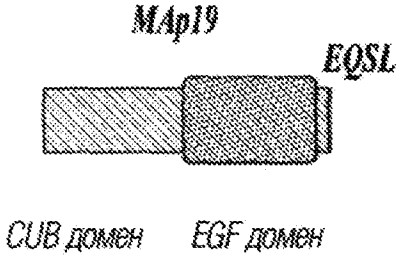
7. Спосіб за п. 1, де інгібуюче MASP-2 антитіло вводять підшкірно, інтраперитонеально, внутрішньом'язово, внутрішньоартеріально або внутрішньовенно.



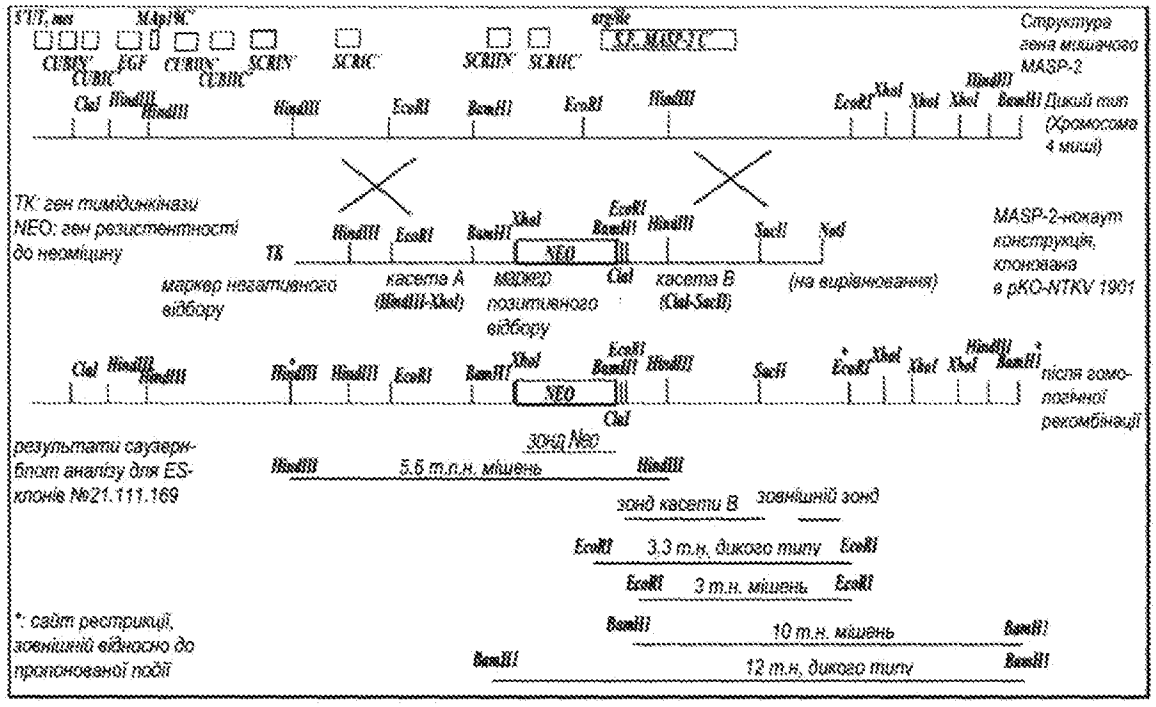
Фіг. 1



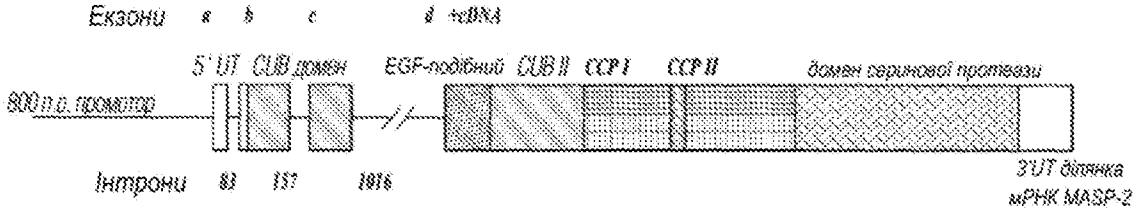
Фіг. 2A



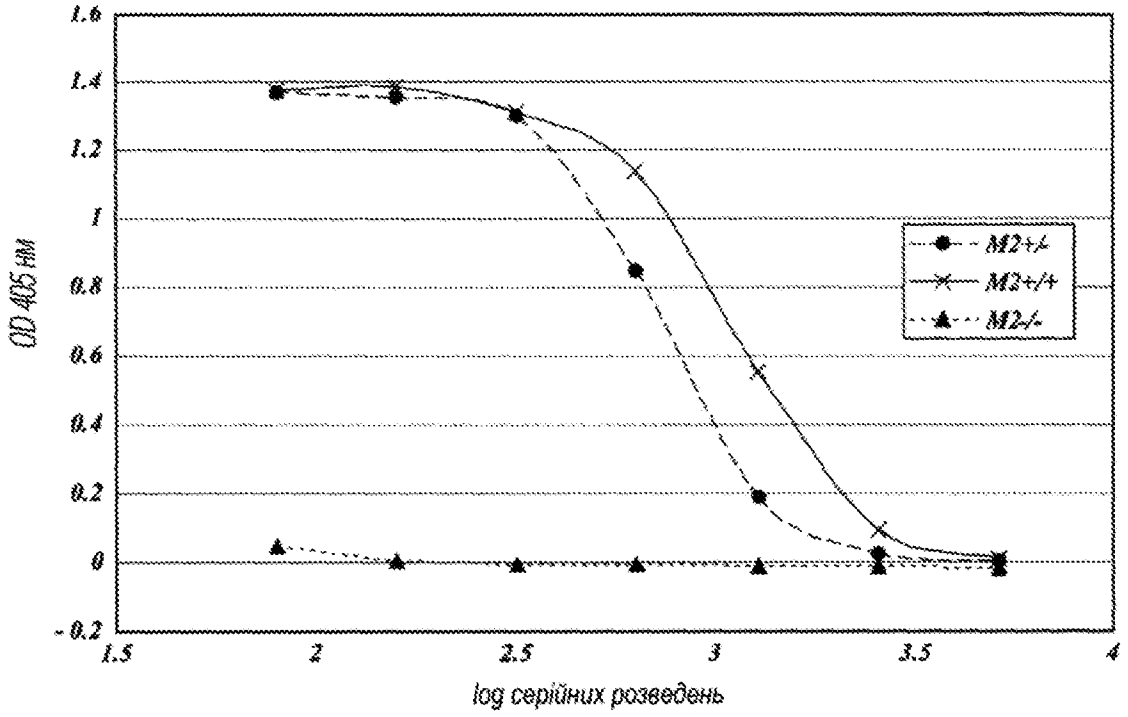
Фіг. 2B



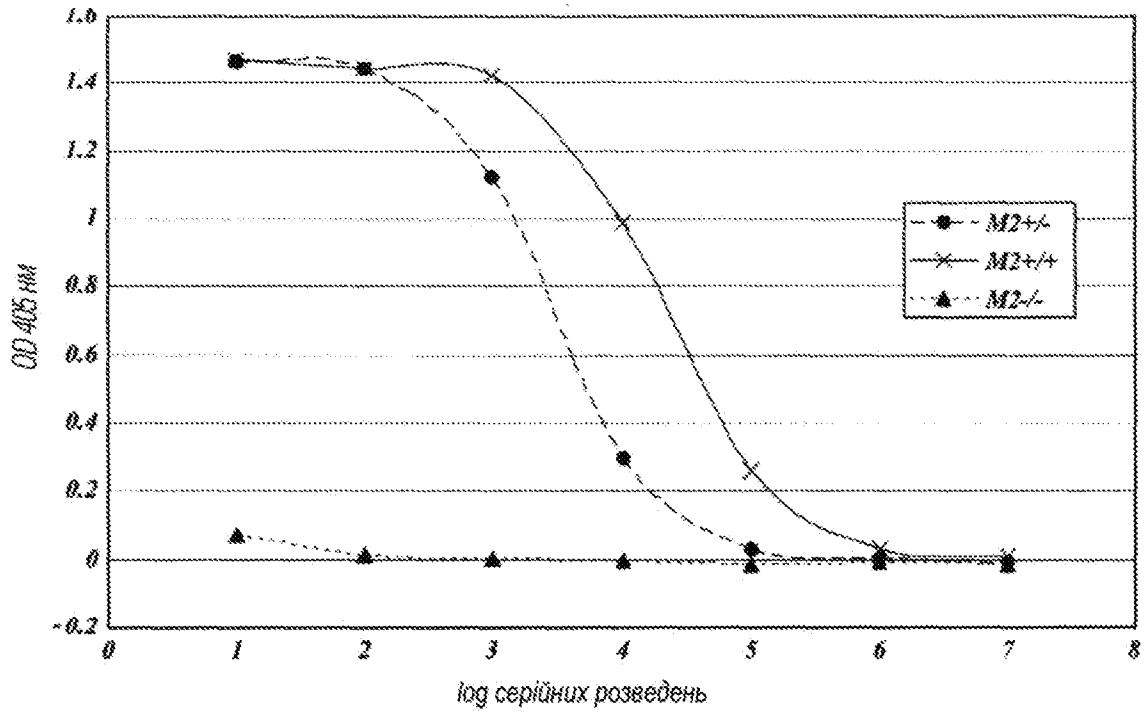
Фіг. 3



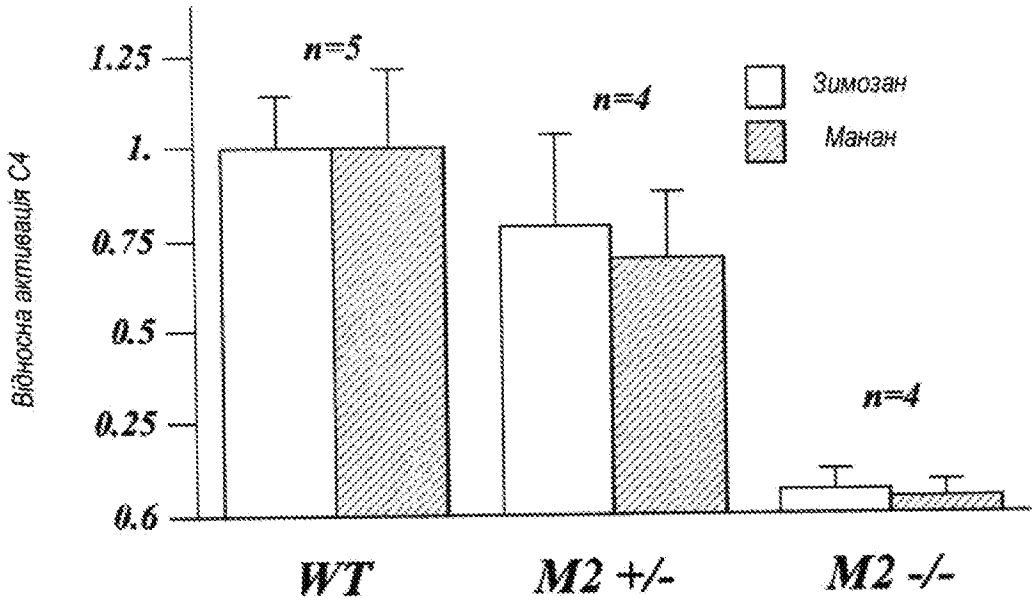
Фіг. 4



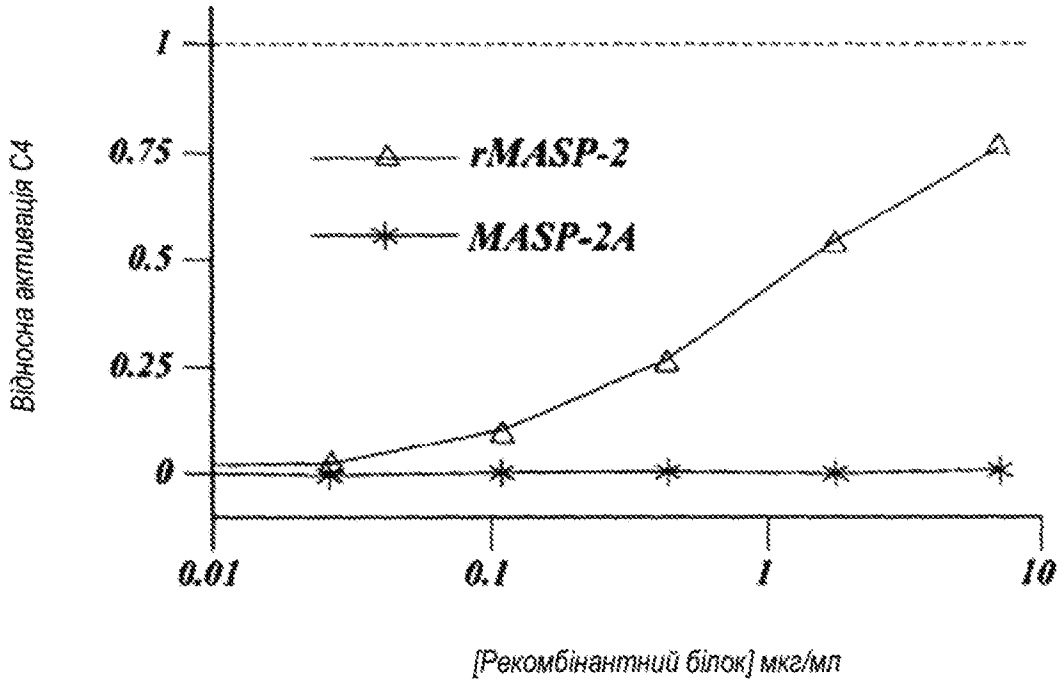
Фіг. 5А


OD 405 нм
log серійних розведень
M2+/-
M2+/+
M2-/-

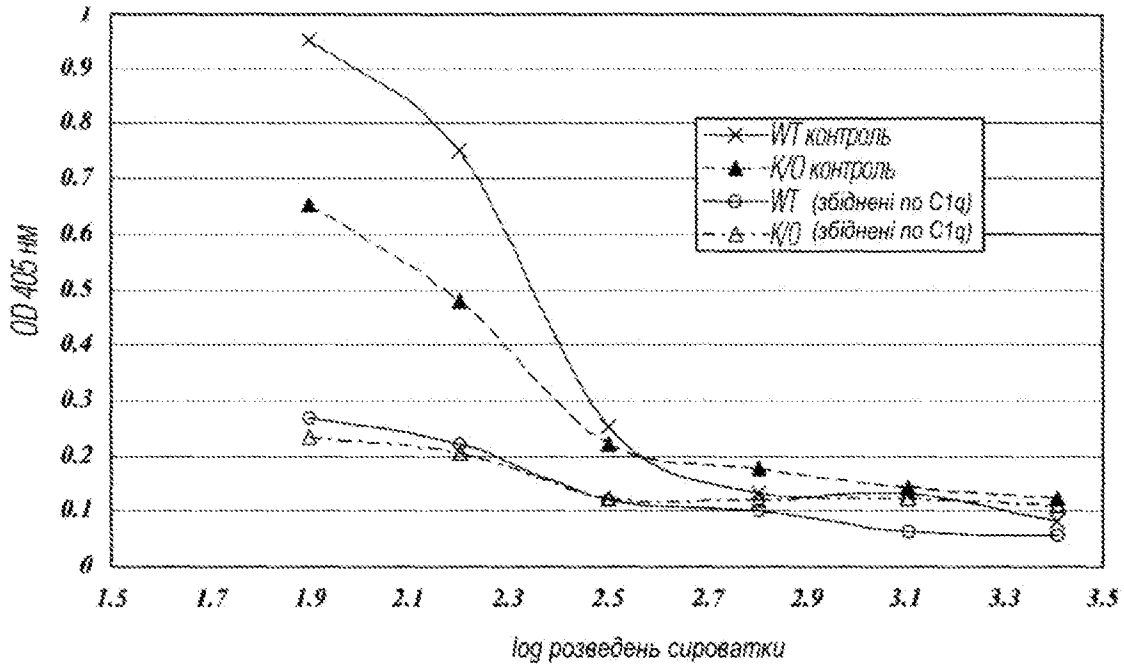
Фіг. 5B


Відносна активація C4
n=5
n=4
n=4
Зимозан
Манан
WT
M2 +/-
M2 -/-

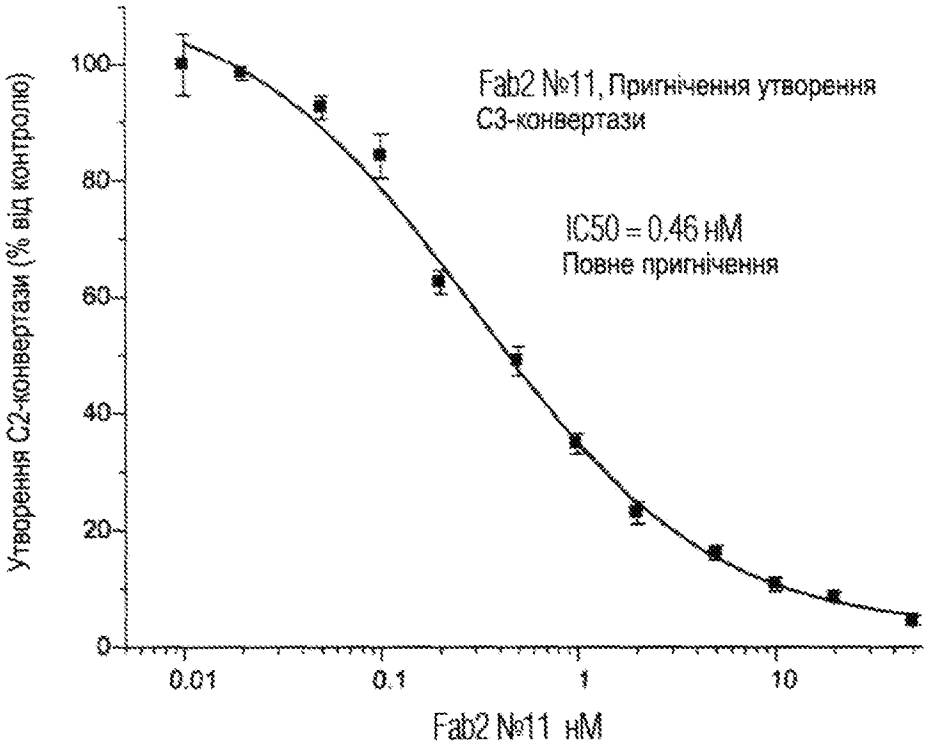
Фіг. 5C


1
0.75
0.5
0.25
0
0.01
0.1
1
10
rMASP-2
MASP-2A
Відносна активація C4
[Рекомбінантний білок] мкг/мл

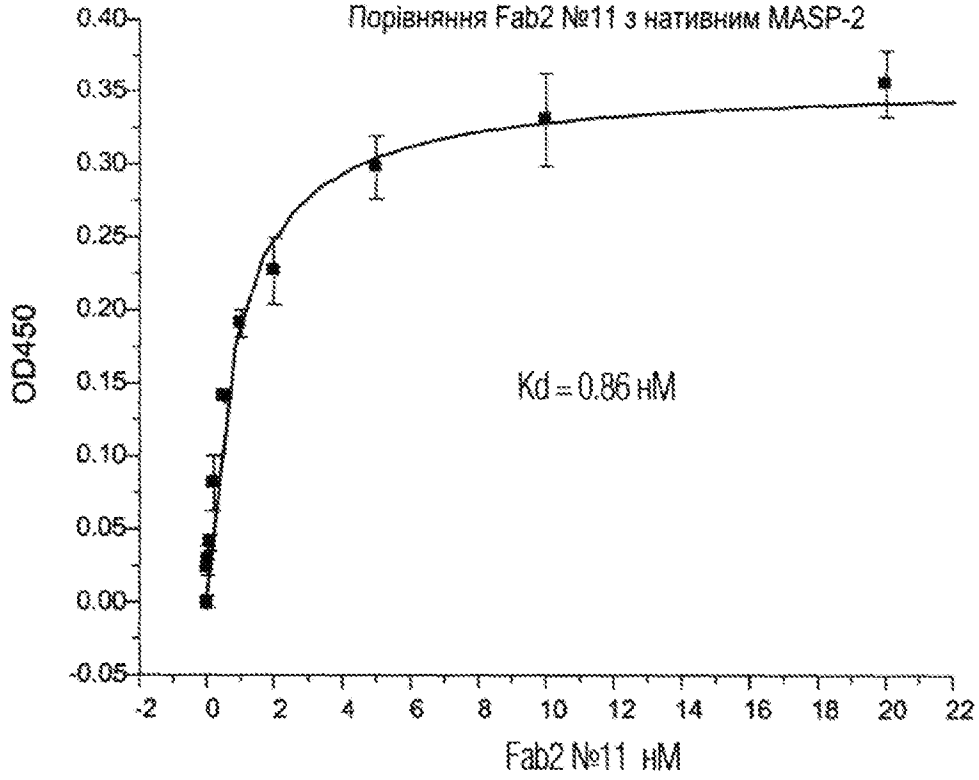
Фіг. 6


1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1.5
1.7
1.9
2.1
2.3
2.5
2.7
2.9
3.1
3.3
3.5
WT контроль
K/O контроль
WT (збіднені по C1q)
K/O (збіднені по C1q)
OD 405 нм
log розведень сироватки

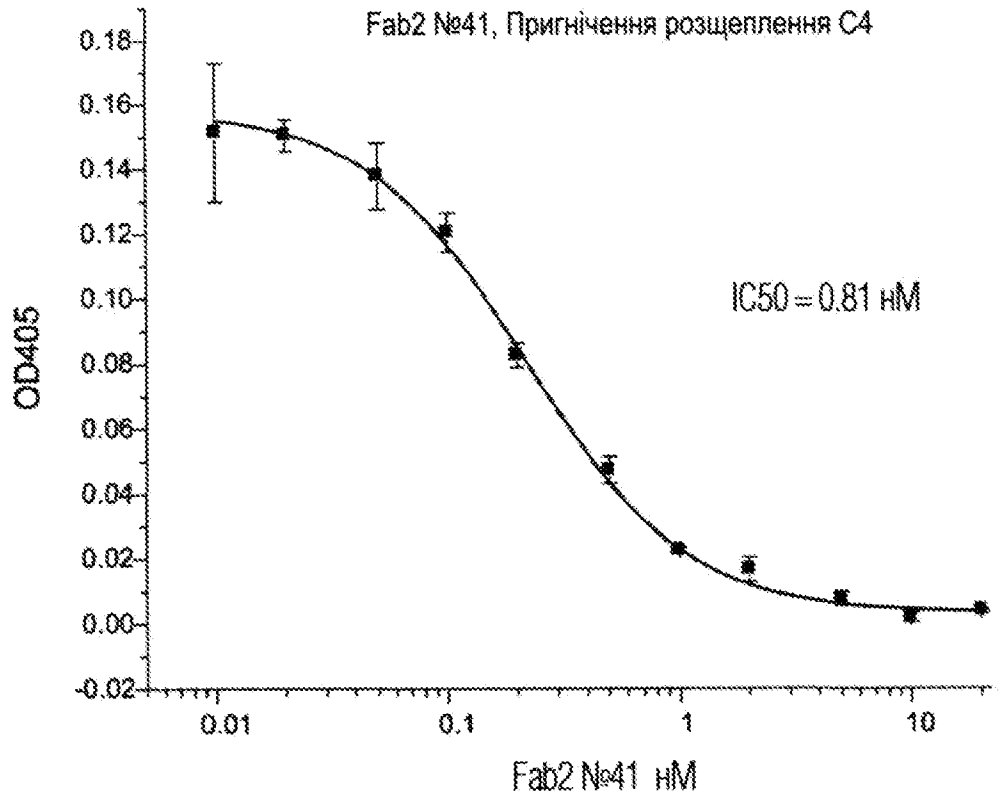
Фіг. 7


Fab2 №11, Пригнічення утворення
C3-конвертази
IC50 = 0.46 нМ
Повне пригнічення
Утворення C2-конвертази (% від контролю)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
Fab2 №11 нМ

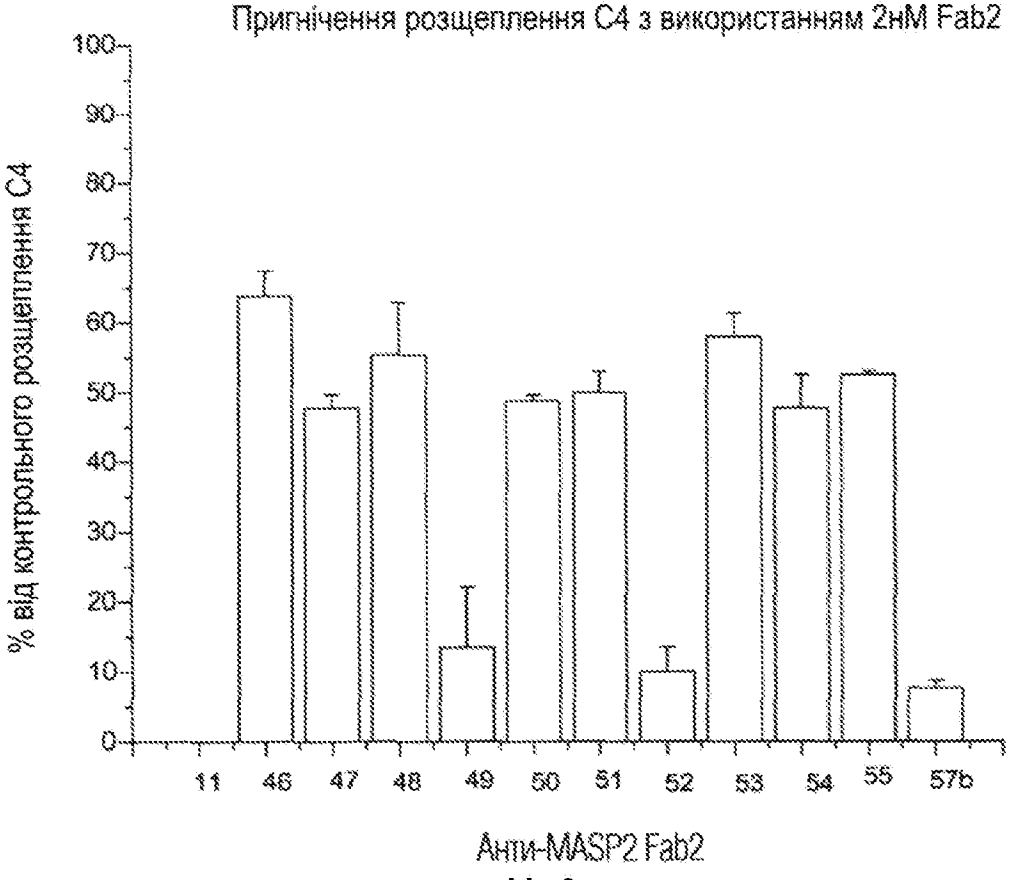
Фіг. 8A


Порівняння Fab2 №11 з нативним MASP-2
Kd = 0.86 нМ
OD450
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Fab2 №11 нМ

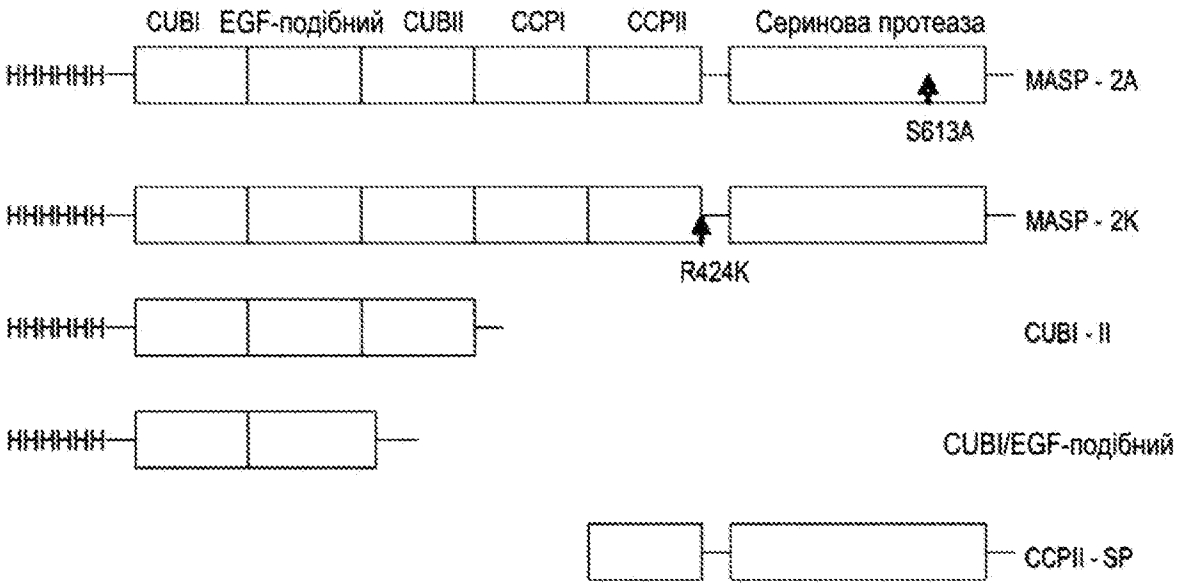
Фіг. 8B


Fab2 №41, Пригнічення розщеплення С4
OD405
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
-0.02
IC50 = 0.81 нМ
0.01
0.1
1
10
Fab2 №41 нМ

Фіг. 8С

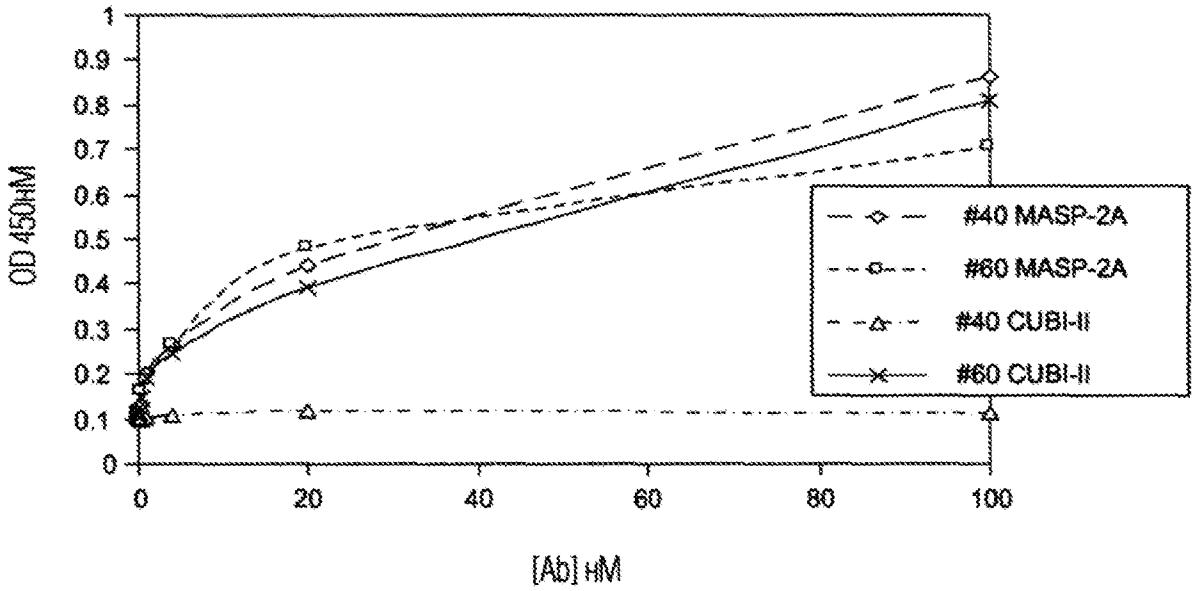

Пригнічення розщеплення С4 з використанням 2нМ Fab2
% від контрольного розщеплення С4
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
11
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
57b
Анти-MASP2 Fab2

Фіг. 9

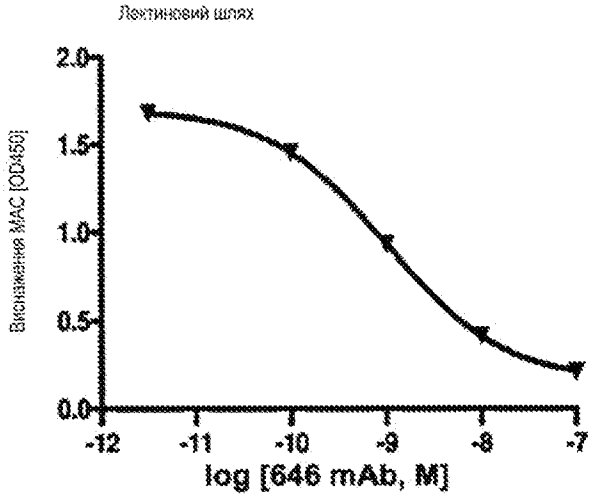


Фіг. 10

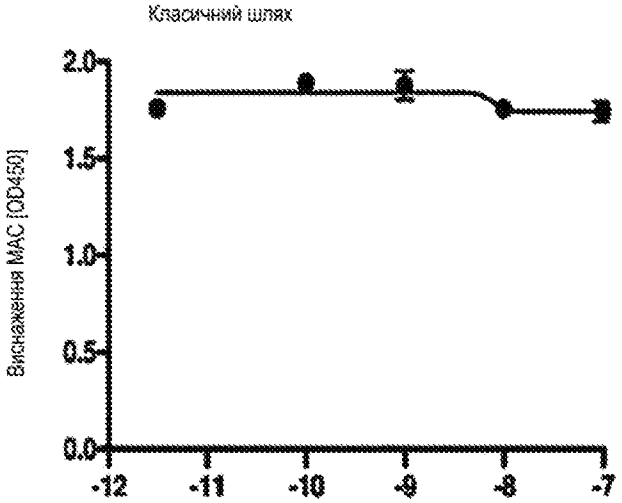
Зв'язування AbD Ab №40 та №60 з поліпептидами щурячого MASP2



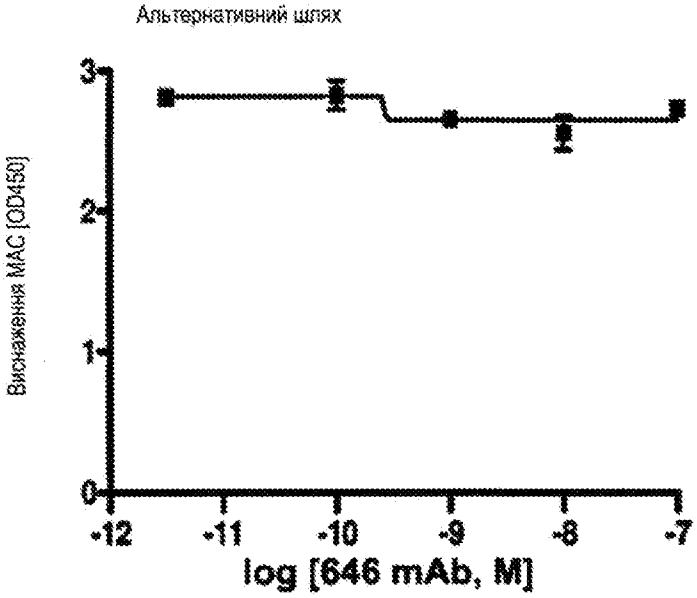
Фіг. 11



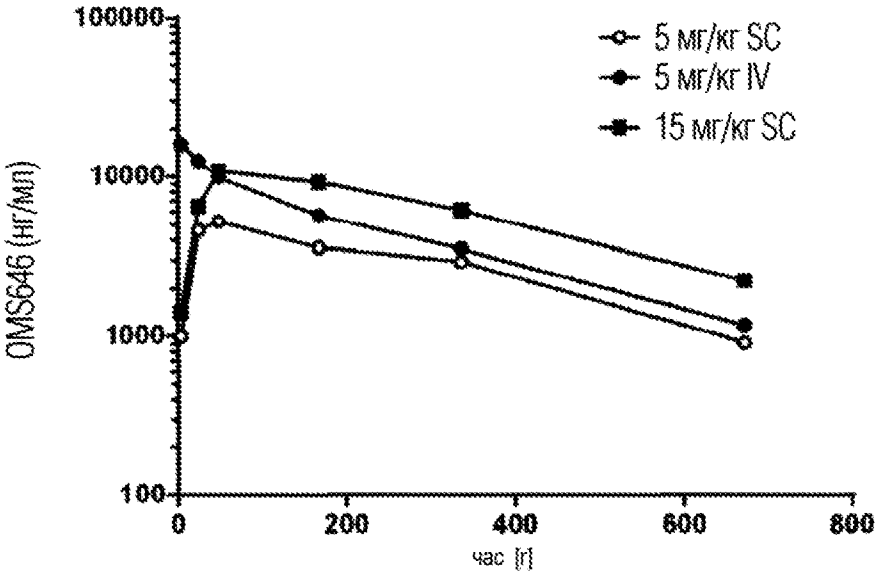
Фіг. 12A



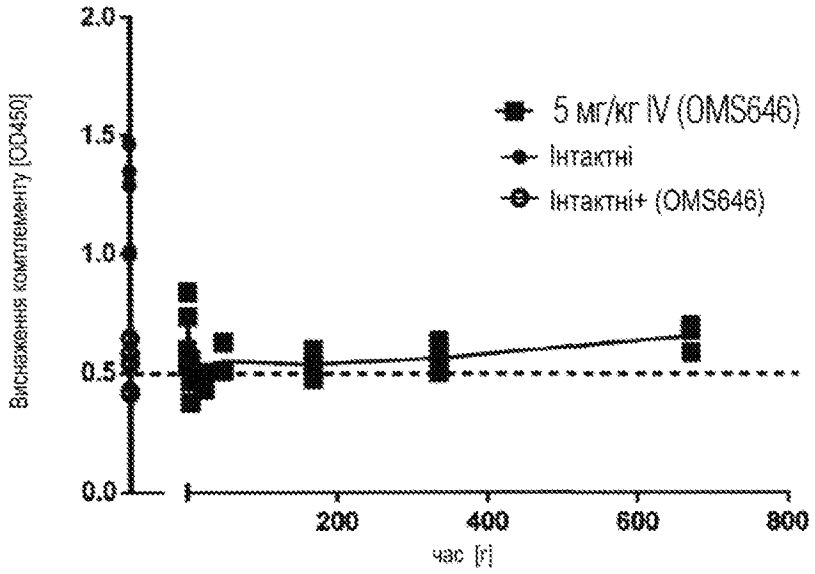
Фіг. 12B



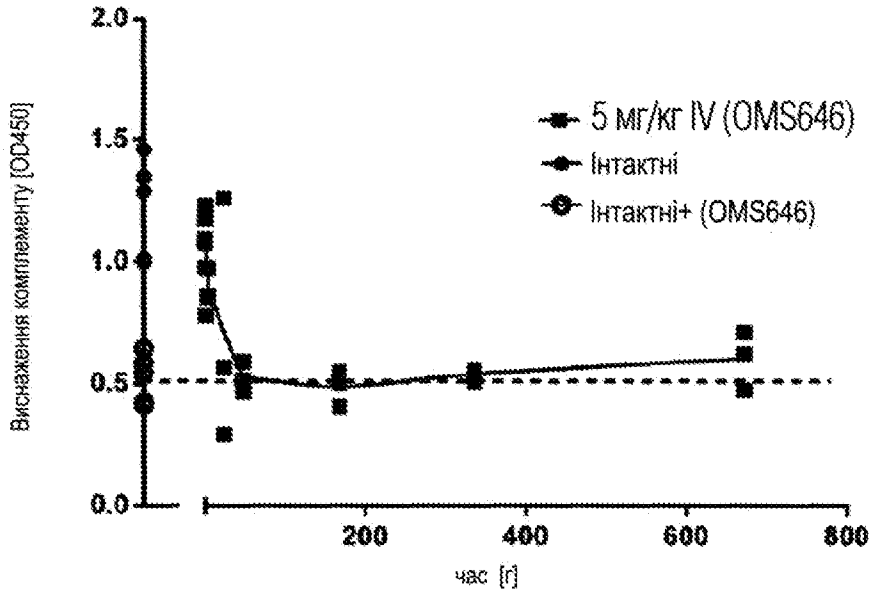
Фіг. 12C



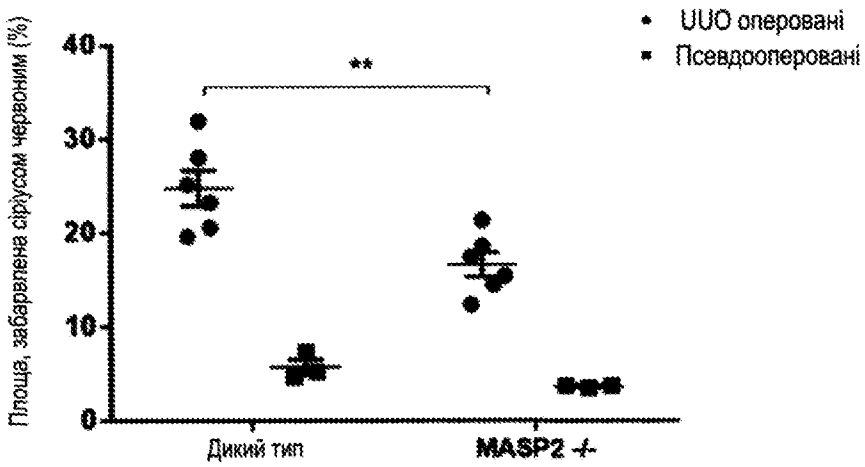
Фіг. 13



Фіг. 14А

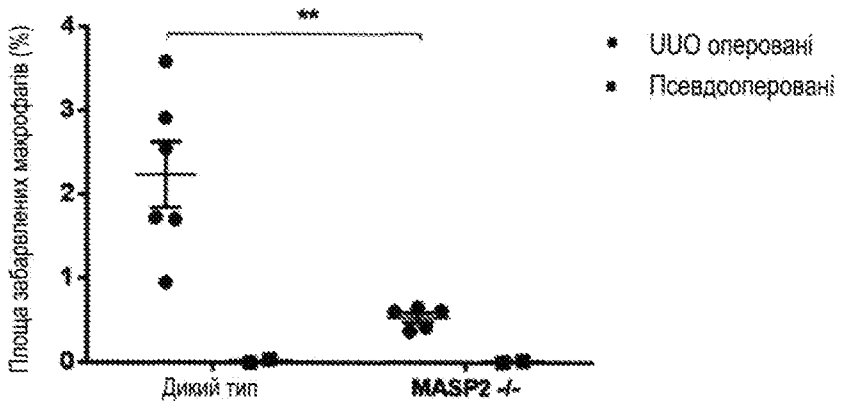


Фіг. 14B



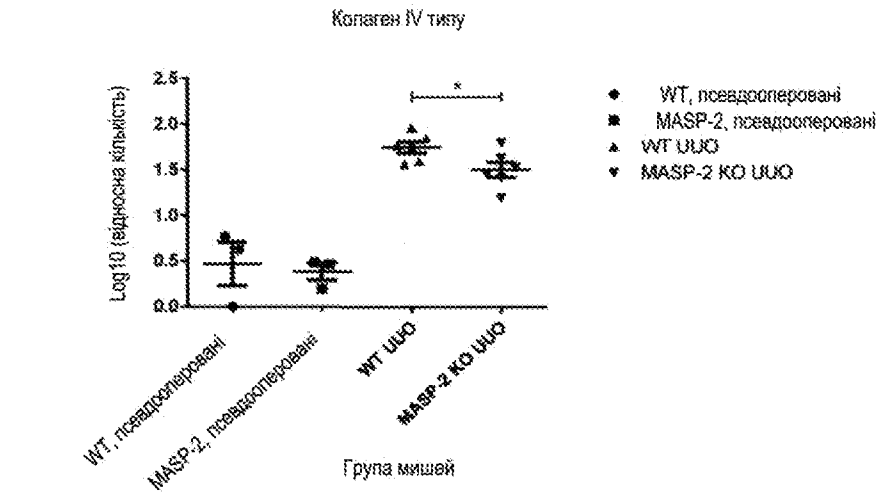
**p< 0.0096

Фіг. 15



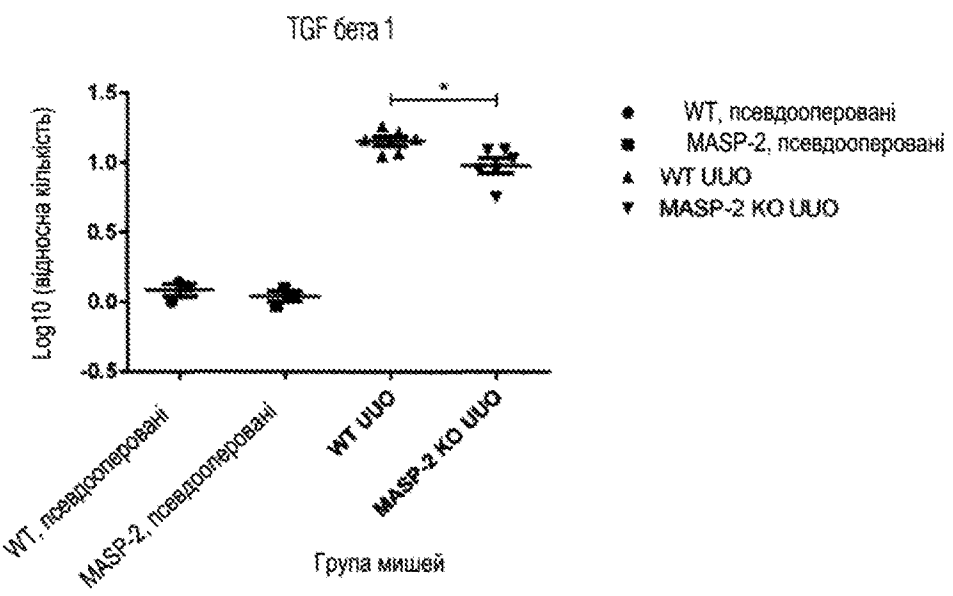
**p=0.0035

Фіг. 16



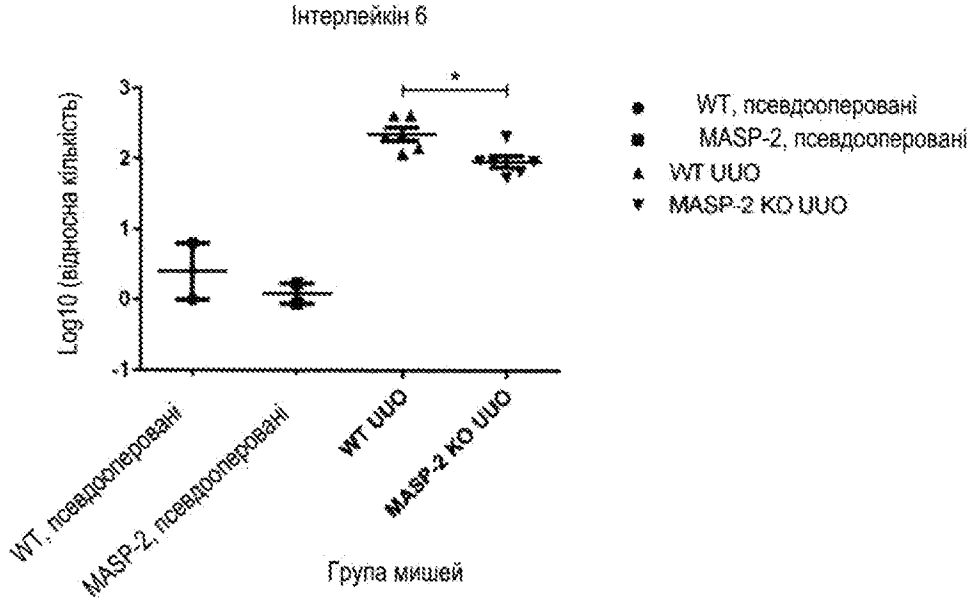
*p=0.0388

Фіг. 17



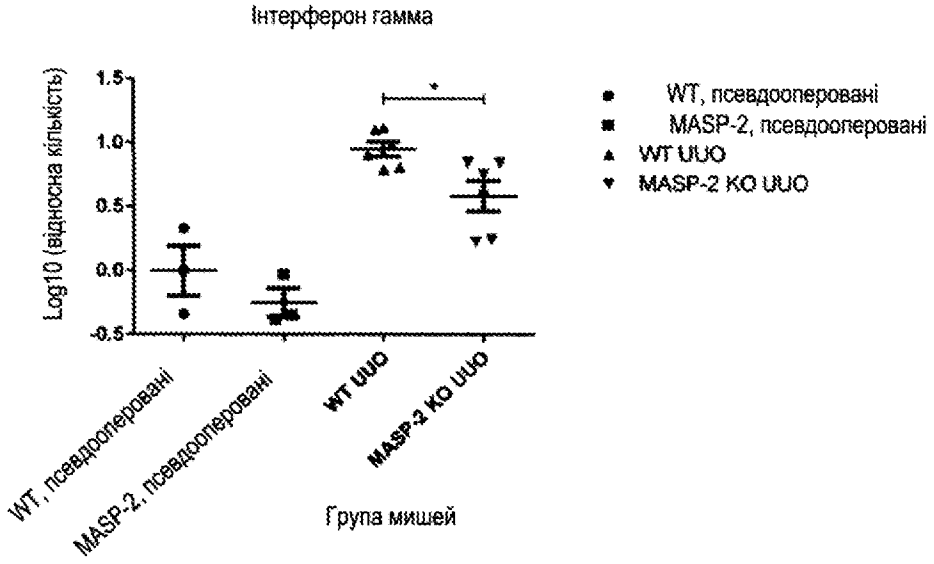
*p=0.0174

Фіг. 18



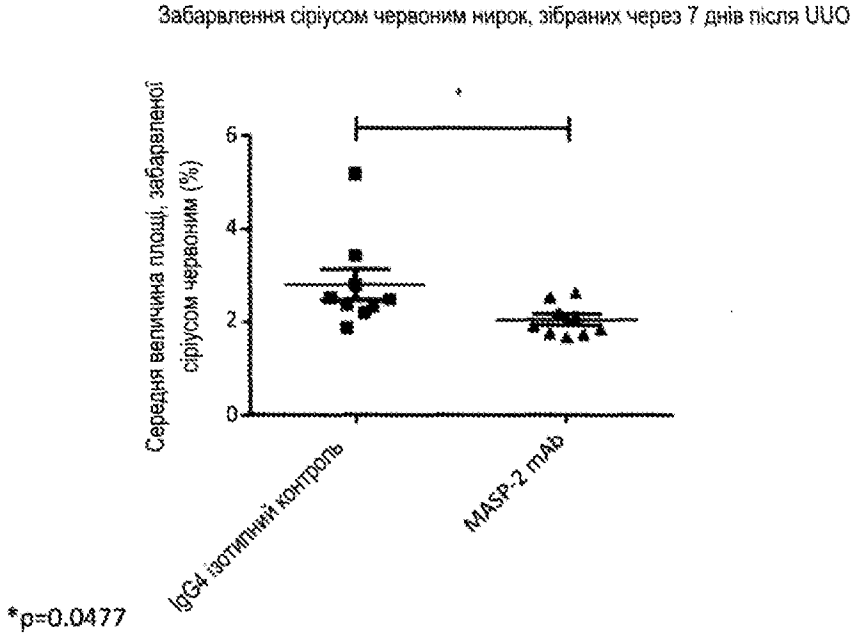
*p=0.0109

Фіг. 19



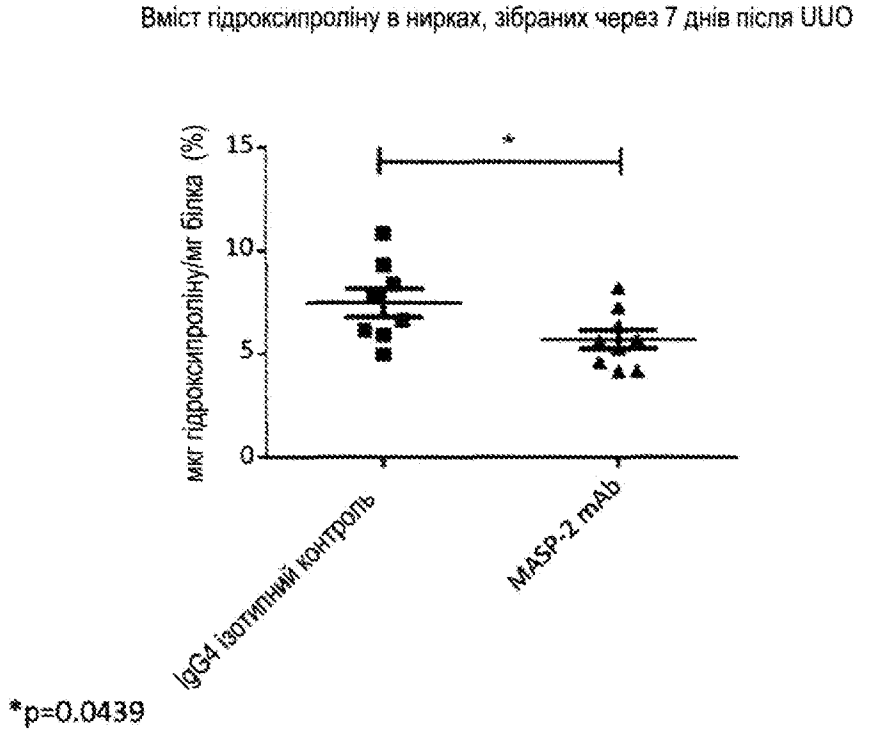
*p=0.0182

Фіг. 20

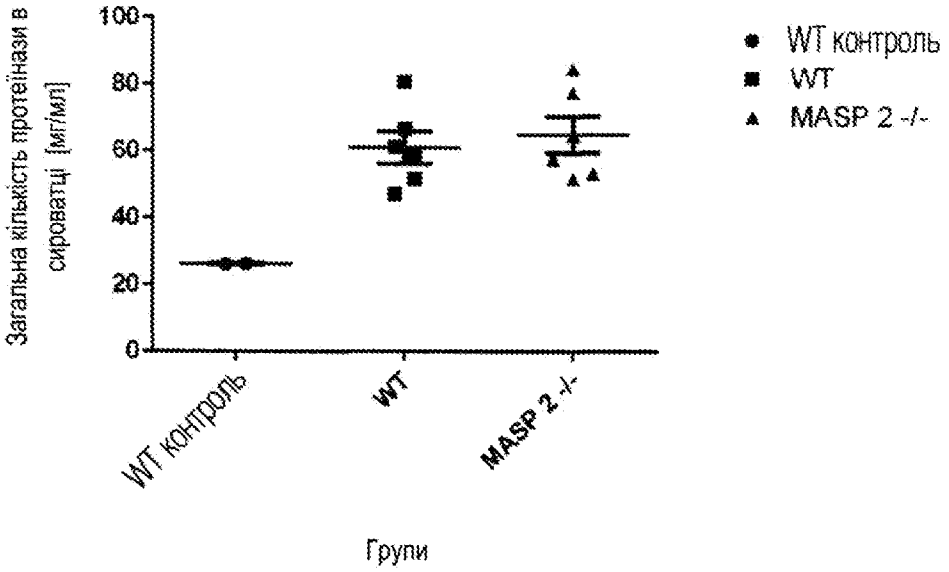


*p=0.0477

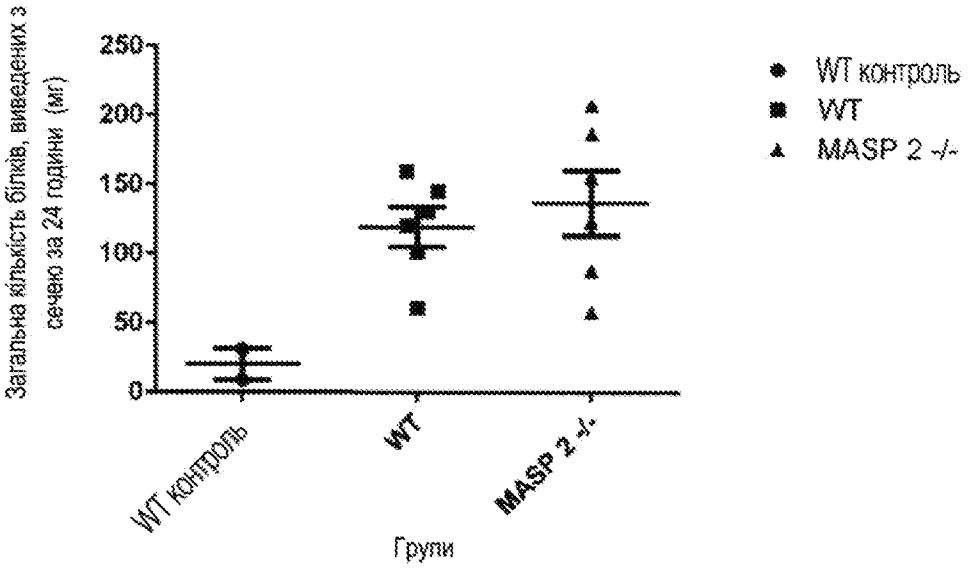
Фіг. 21


Вміст гідроксипроліну в нирках, зібраних через 7 днів після UUO
мкг гідроксипроліну/мг білка (%)
15
10
5
0
*
IgG4 ізотипний контроль
MASP-2 mAb
*p=0.0439

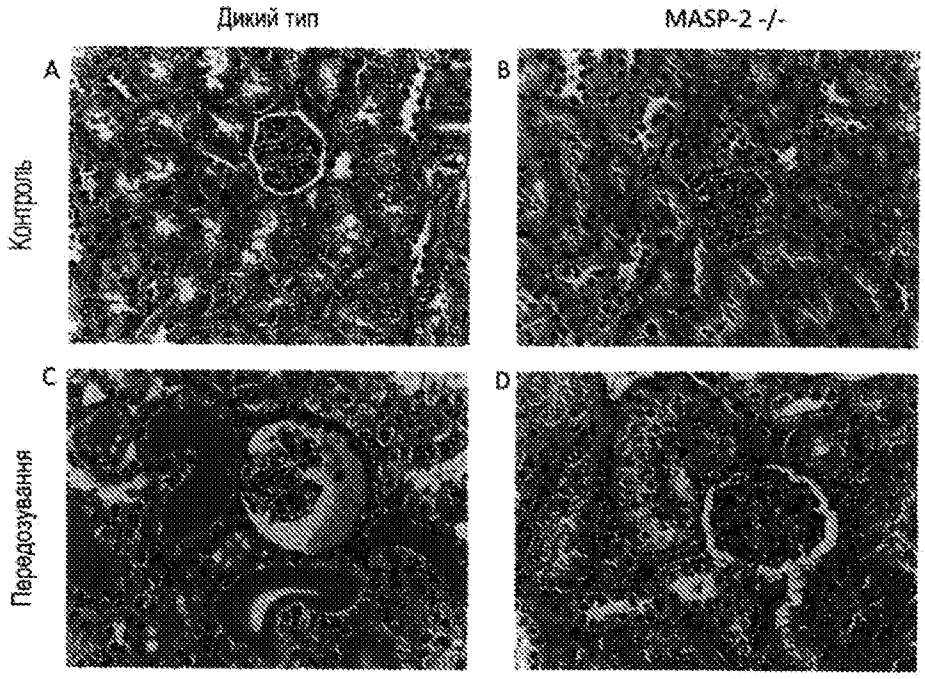
Фіг. 22


Загальна кількість протеїнази в сироватці [мг/мл]
100
80
60
40
20
0
WT контроль
WT
MASP 2 -/-
Групи

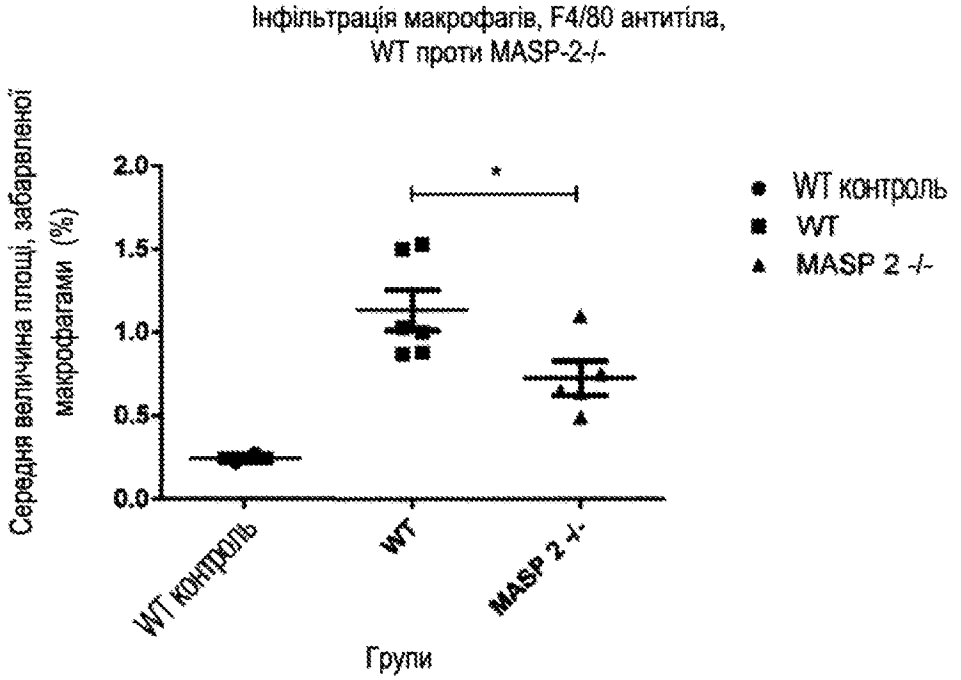
Фіг. 23


Загальна кількість білків, виведених з сечею за 24 години (мг)
250
200
150
100
50
0
WT контроль
WT
MASP 2 -/-
Групи
WT контроль
WT
MASP 2 -/-

Фіг. 24

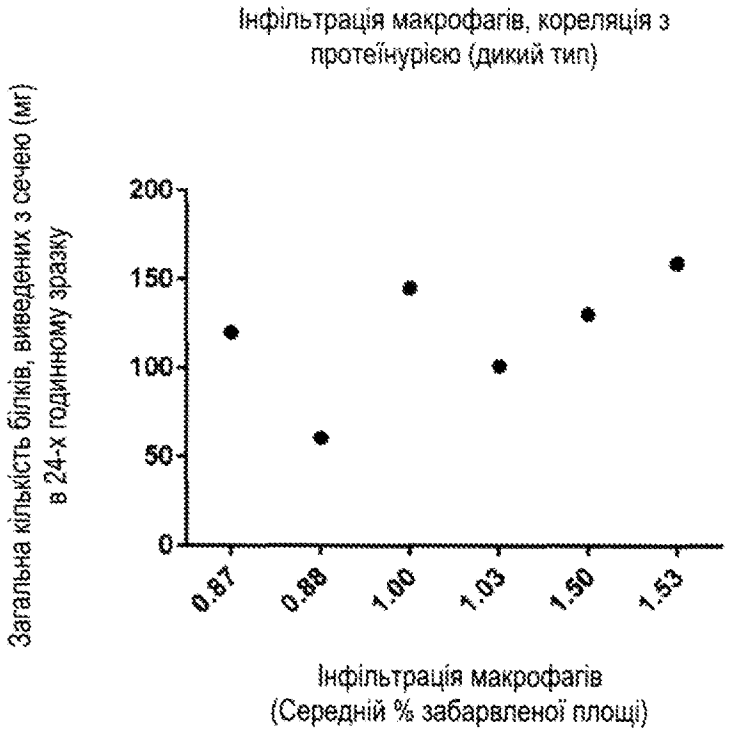

Дикий тип
MASP-2 -/-
A
B
C
D
Контроль
Переозування

Фіг. 25

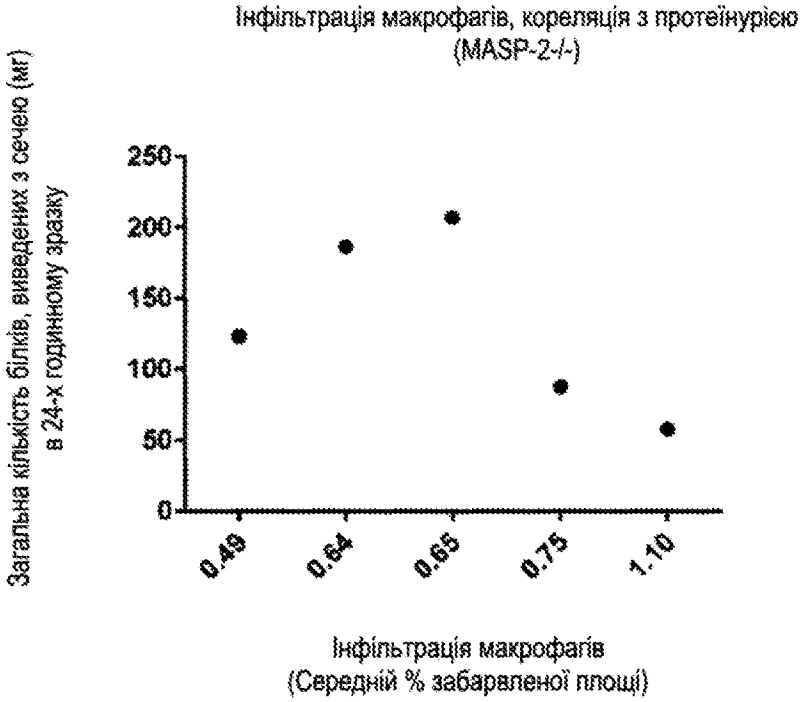


*p=0.035

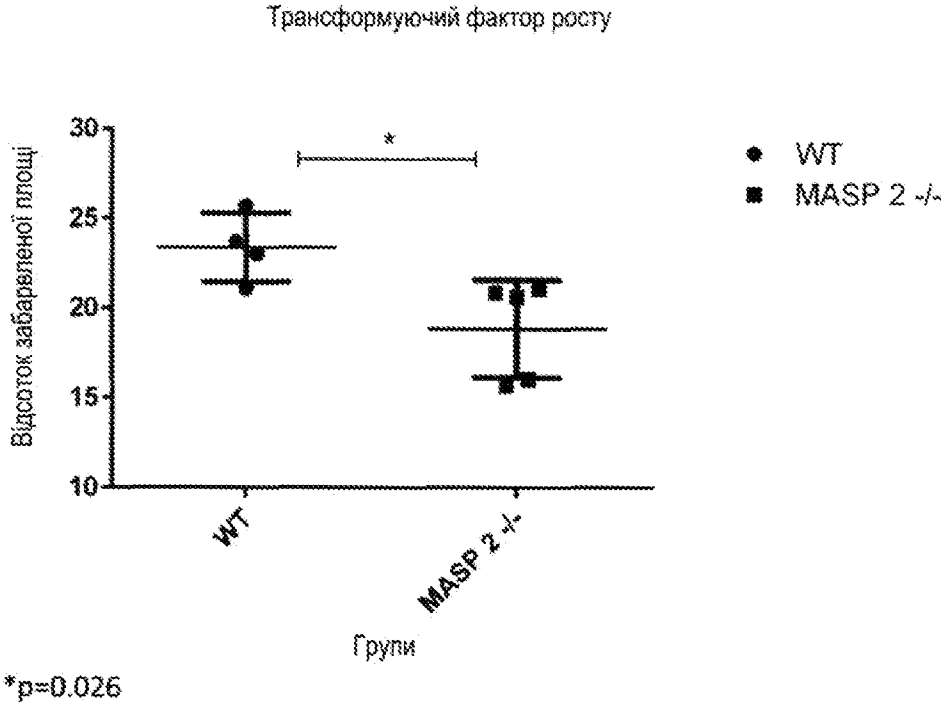
Фіг. 26



Фіг. 27А

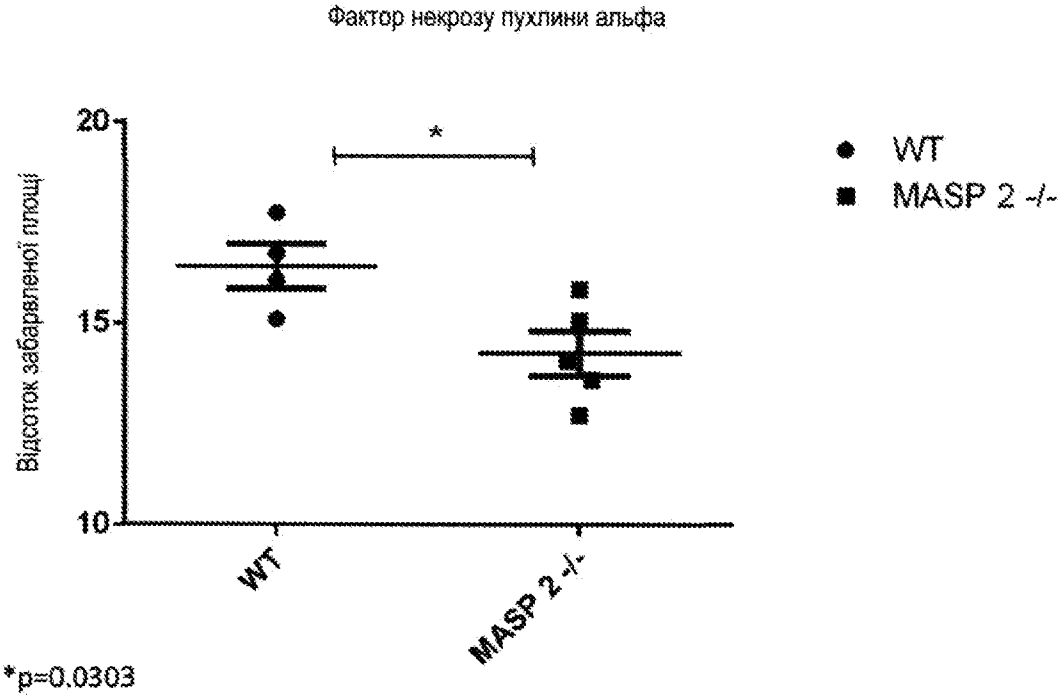


Фіг. 27B

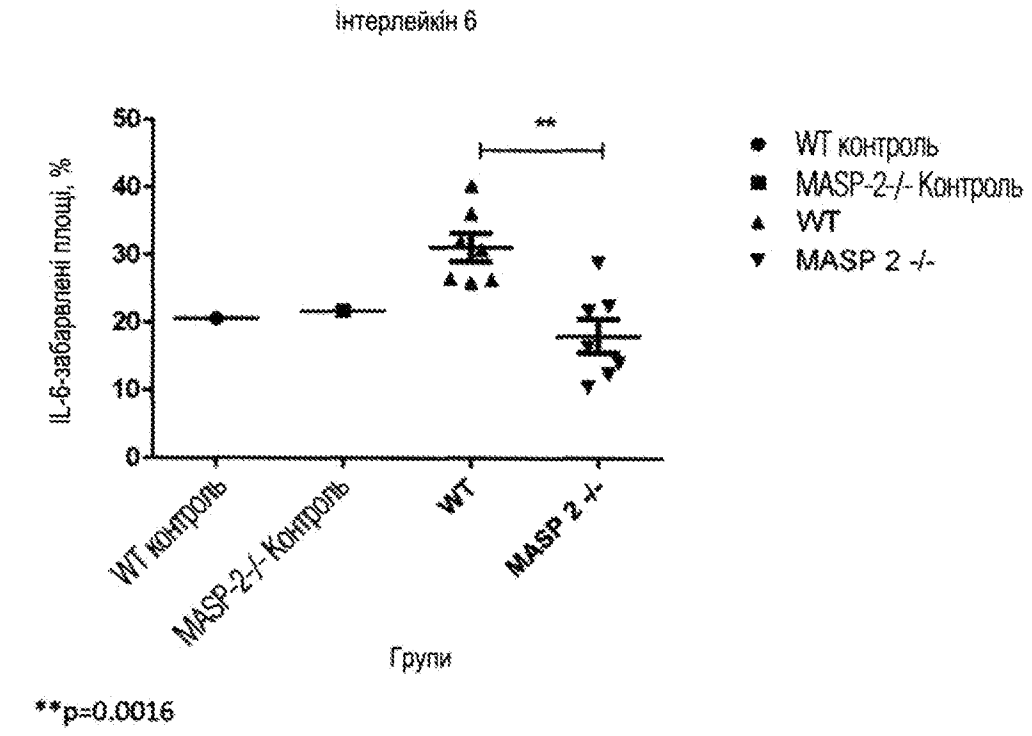


*p=0.026

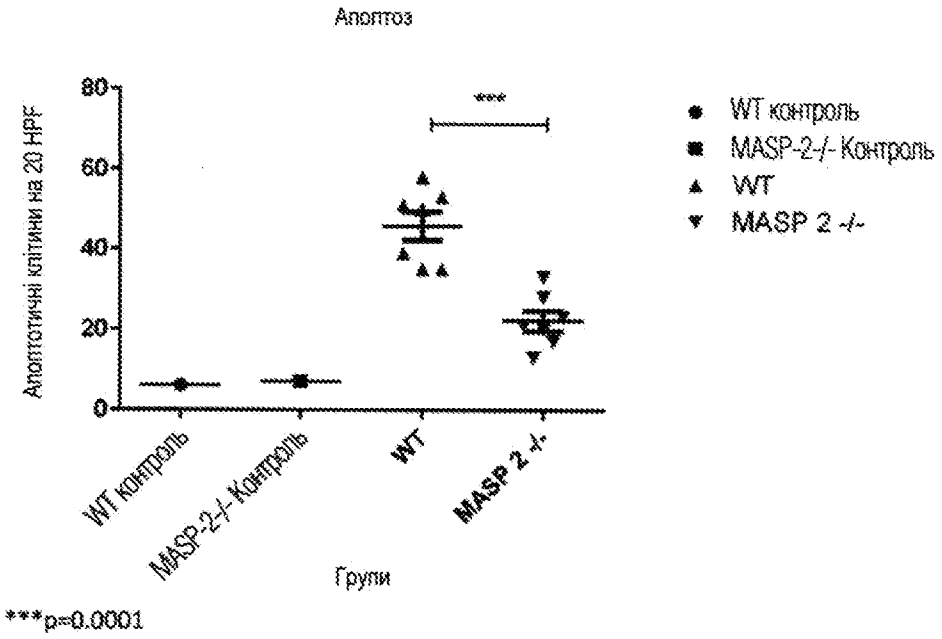
Фіг. 28


Фактор некрозу пухлини альфа
Відсоток забарвленої площі
20
15
10
*
WT
MASP 2 -/-
WT
MASP 2 -/-
*p=0.0303

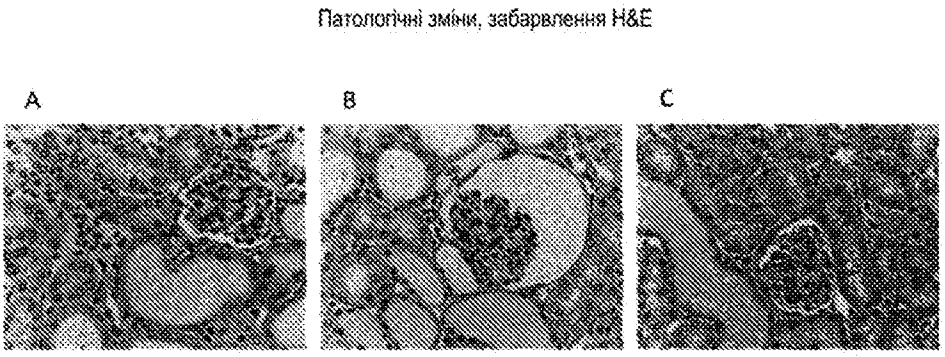
Фіг. 29


Інтерлейкін 6
IL-6-забарвлені площі, %
50
40
30
20
10
0
**
WT контроль
MASP-2-/- Контроль
WT
MASP 2 -/-
WT контроль
MASP-2-/- Контроль
WT
MASP 2 -/-
Групи
**p=0.0016

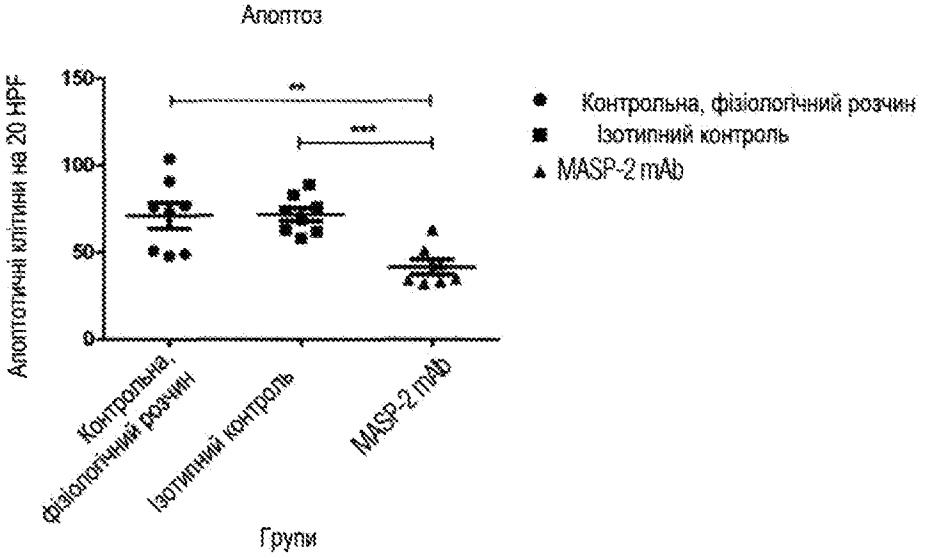
Фіг. 30


Апоптоз
Апоптотичні клітини на 20 HPF
80
60
40
20
0
***
WT контроль
MASP-2-/- Контроль
WT
MASP 2 -/-
WT контроль
MASP-2-/- Контроль
WT
MASP 2 -/-
Групи
***p=0.0001

Фіг. 31


Патологічні зміни, забарвлення H&E
A
B
C
Контрольна група, що одержувала фізіологічний розчин
Група, що одержувала ізотипний контроль
Група, що одержувала MASP-2 mAb

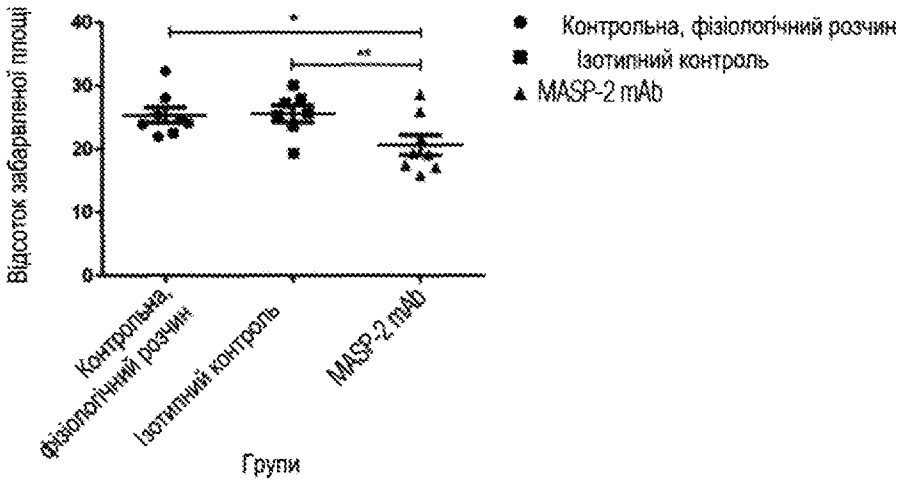
Фіг. 32



**p=0.0002
***p=0.0052

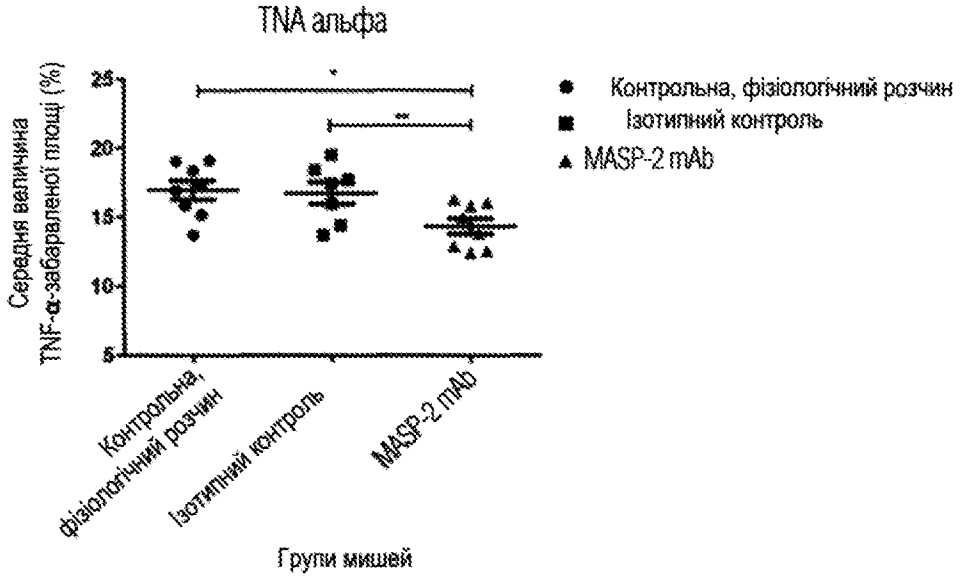
Фіг. 33

TGFB



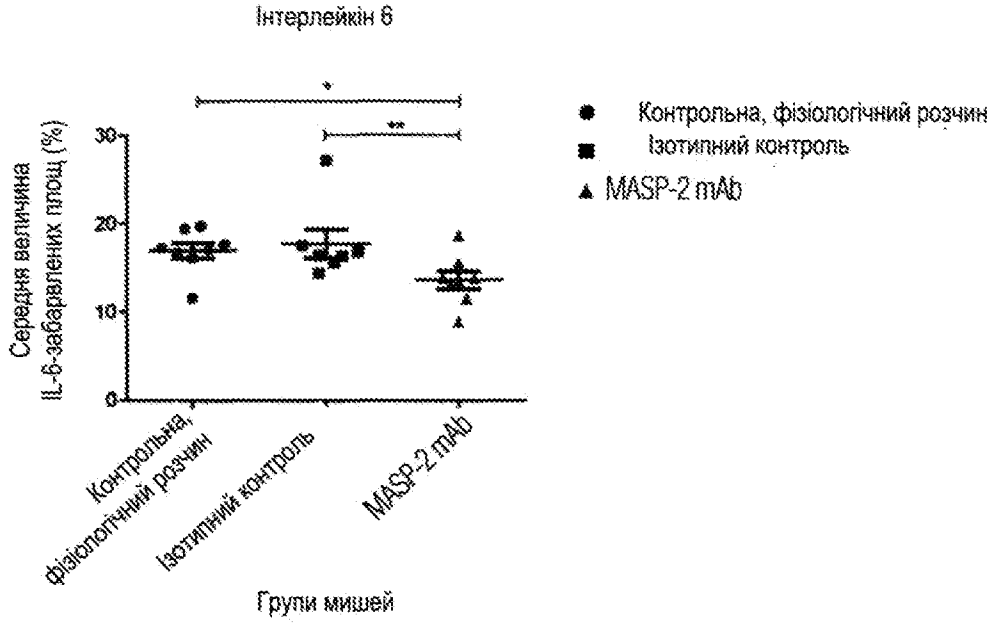
*p = 0.0324
**p=0.0349

Фіг. 34



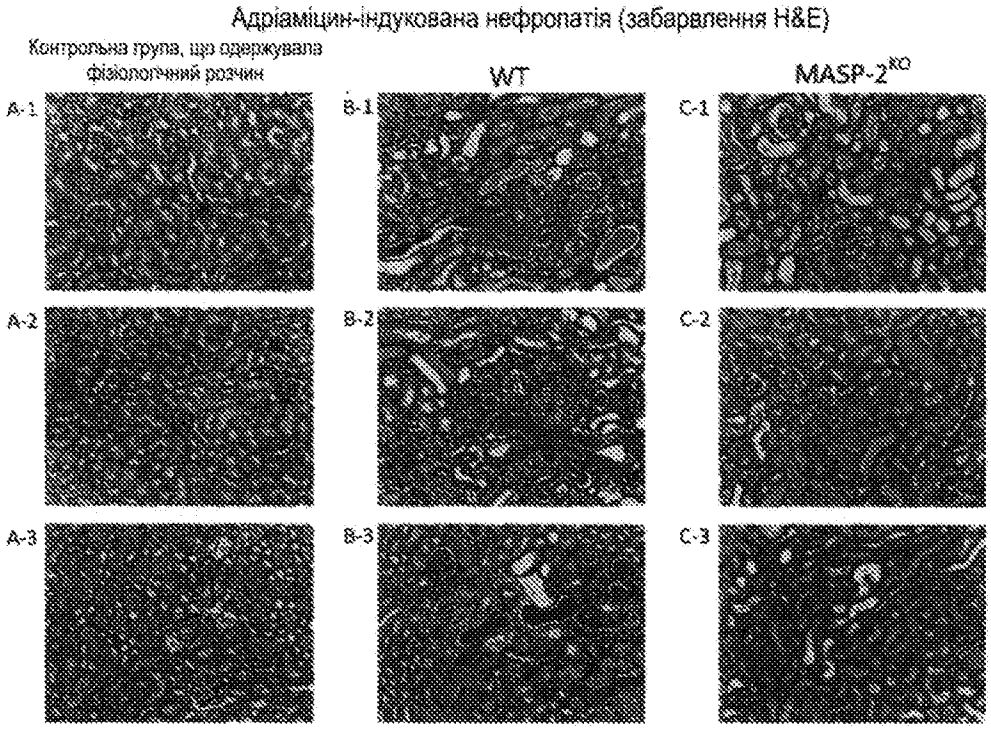
*p=0.011
**p=0.0285

Фіг. 35

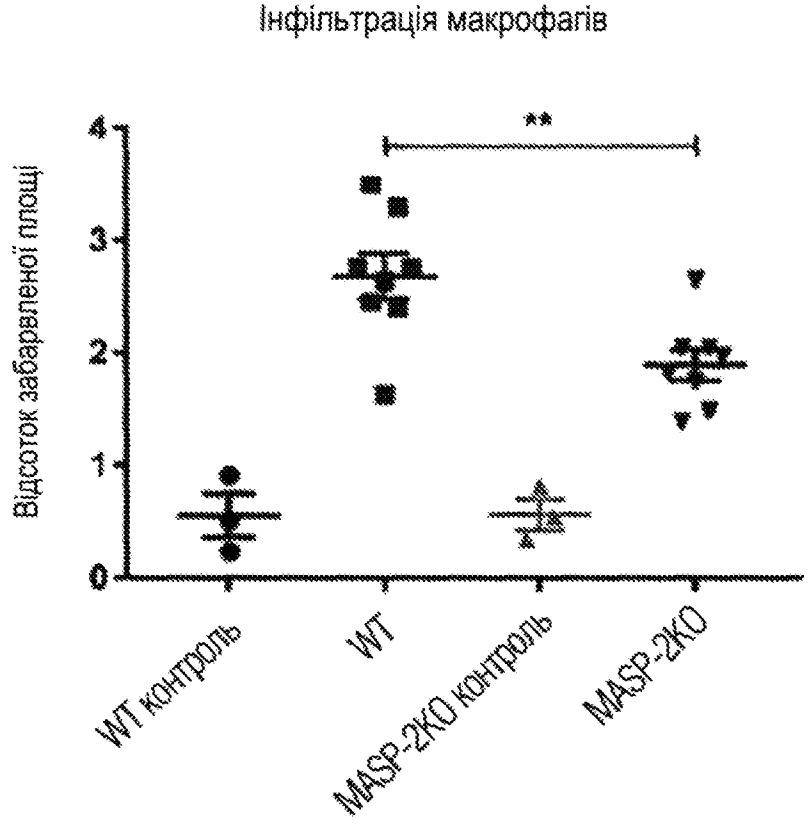


*p=0.0269
**p=0.0445

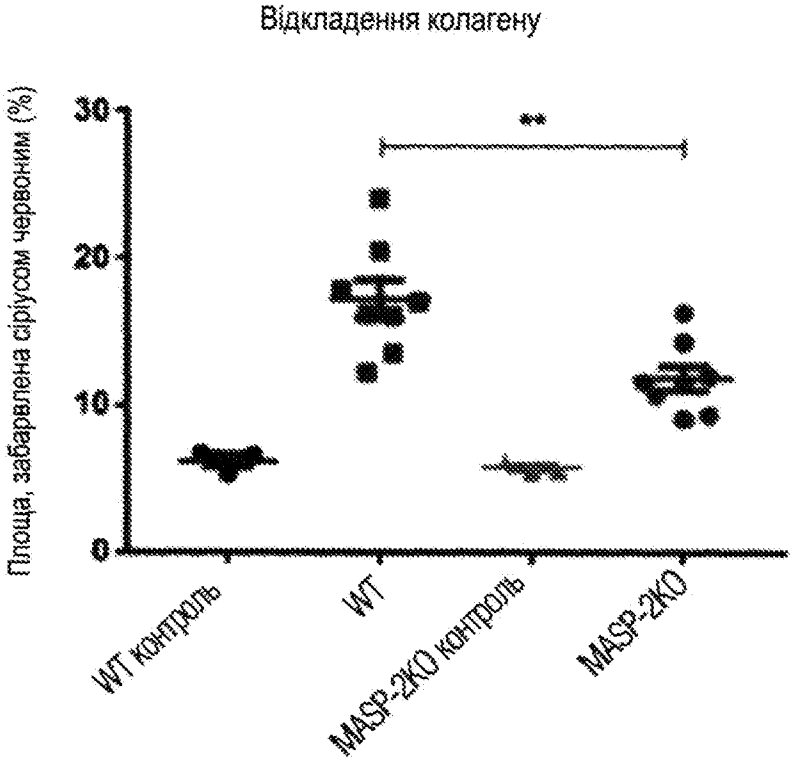
Фіг. 36


Адріаміцин-індукована нефропатія (забарвлення H&E)
Контрольна група, що одержувала фізіологічний розчин
WT
MASP-2KO
A-1
B-1
C-1
A-2
B-2
C-2
A-3
B-3
C-3

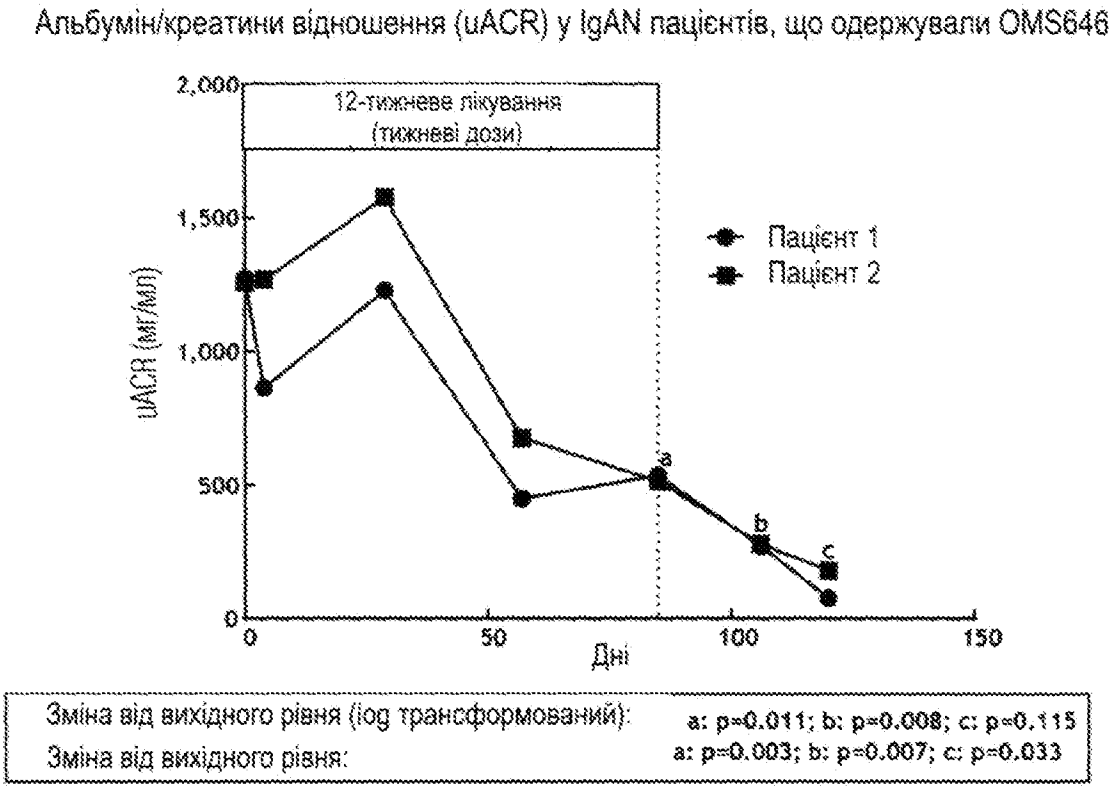
Фіг. 37


Інфільтрація макрофагів
Відсоток забарвленої площі
**
0
1
2
3
4
WT контроль
WT
MASP-2KO контроль
MASP-2KO

Фіг. 38



Фіг. 39



Фіг. 40

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

ДО "Український національний офіс інтелектуальної власності та інновацій", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601