I881481

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I881481 B**

(45)公告日： 中華民國 114 (2025) 年 04 月 21 日

(21)申請案號：112136719 (22)申請日： 中華民國 107 (2018) 年 08 月 13 日

(51)Int. Cl.： ***C07K16/40 (2006.01)*** ***A61K38/00 (2006.01)***
A61K38/48 (2006.01) ***A61K39/395 (2006.01)***
C12N9/50 (2006.01)

(30)優先權：2017/08/15 美國 62/545,864
2017/10/19 美國 62/574,690
2018/02/14 美國 62/630,756
2018/03/01 美國 62/637,281

(71)申請人：美商歐米諾斯公司 (美國) OMEROS CORPORATION (US)
美國
萊斯特大學 (英國) UNIVERSITY OF LEICESTER (GB)
英國

(72)發明人：戴莫普勒 格雷戈里 DEMOPULOS, GREGORY A. (US)；達德勒 湯馬斯 DUDLER, THOMAS (CH)；史沃柏 漢斯 SCHWAEBLE, HANS-WILHELM (DE)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CN 101065148A WO 2012/151481A1

審查人員：吳思嫻

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：62 共 524 頁

(54)名稱

用於治療和／或預防與造血幹細胞移植有關的移植物抗宿主病和／或瀰漫性肺泡出血和／或靜脈閉塞性病的方法

(57)摘要

在一個方面，本發明提供在患有與造血幹細胞移植有關的移植物抗宿主病和/或彌漫性肺泡出血和/或靜脈閉塞性病的人受試者中抑制 MASP-2-依賴性補體活化的作用的方法。所述方法包括給予有需要的受試者有效抑制 MASP-2-依賴性補體活化的量的 MASP-2 抑制劑的步驟。

In one aspect, the invention provides methods of inhibiting the effects of MASP-2-dependent complement activation in a human subject suffering from graft-versus-host disease and/or diffuse alveolar hemorrhage and/or veno-occlusive disease associated with a hematopoietic stem cell transplant. The methods comprise the step of administering, to a subject in need thereof, an amount of a MASP-2 inhibitory agent effective to inhibit MASP-2-dependent complement activation.

專利案號：112136719
原申請案號：107128182
I881481

【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於治療和／或預防與造血幹細胞移植有關的移植物抗宿主病和／或瀰漫性肺泡出血和／或靜脈閉塞性病的方法

【英文發明名稱】

METHODS FOR TREATING AND/OR PREVENTING GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE AND/OR DIFFUSE ALVEOLAR HEMORRHAGE AND/OR VENO-OCCLUSIVE DISEASE ASSOCIATED WITH HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT

【中文】

在一個方面，本發明提供在患有與造血幹細胞移植有關的移植物抗宿主病和/或彌漫性肺泡出血和/或靜脈閉塞性病的人受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的作用的方法。所述方法包括給予有需要的受試者有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的步驟。

【英文】

In one aspect, the invention provides methods of inhibiting the effects of MASP-2-dependent complement activation in a human subject suffering from graft-versus-host disease and/or diffuse alveolar hemorrhage and/or veno-occlusive disease associated with a hematopoietic stem cell transplant. The methods comprise the step of administering, to a subject in need thereof, an amount of a MASP-2 inhibitory agent effective to inhibit MASP-2-dependent complement activation.

【指定代表圖】無

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於治療和／或預防與造血幹細胞移植有關的移植物抗宿主病和／或瀰漫性肺泡出血和／或靜脈閉塞性病的方法

【英文發明名稱】

METHODS FOR TREATING AND/OR PREVENTING GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE AND/OR DIFFUSE ALVEOLAR HEMORRHAGE AND/OR VENO-OCCLUSIVE DISEASE ASSOCIATED WITH HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT

【技術領域】

本發明係關於用於治療和/或預防與造血幹細胞移植有關的移植物抗宿主病和/或瀰漫性肺泡出血和/或靜脈閉塞性病的方法。

相關申請的交叉引用

本申請要求2017年8月15日提交的美國臨時申請號62/545,864的權益，並要求2017年10月19日提交的美國臨時申請號62/574,690的權益，並要求2018年2月14日提交的美國臨時申請號62/630,756的權益，並要求2018年3月1日提交的美國臨時申請號62/637,281的權益，所有四個專利申請通過引用以其整體結合到本文中。

關於序列表的說明

本申請隨附的序列表以文本格式代替紙質副本提供，並由此通過引用結合到本說明書中。包含序列表的文字檔的名稱為MP_1_0278_US_SequenceListingasFiled_20180726；文字檔為116 KB；創建於2018年7月26日，和經過EFS-Web隨本說明書的申請一起提交。

【先前技術】

補體系統提供在人和其它脊椎動物中起始、擴大和協調對微生物感染和其它急性損傷的免疫反應的早期作用機制(M. K. Liszewski和J. P. Atkinson, 1993, *Fundamental Immunology*，第三版，由W. E. Paul編輯，Raven Press, Ltd., New York)。儘管補體活化對潛在的病原體提供重要的第一線防禦，但促進防護性免疫反應的補體活性也可代表對宿主的潛在威脅(K. R. Kalli等，*Springer Semin. Immunopathol.* *15*:417-431, 1994; B. P. Morgan, *Eur. J. Clinical Investig.* *24*:219-228, 1994)。例如，C3和C5蛋白水解產物募集和啟動中性粒細胞。儘管對宿主防禦是必不可少的，但啟動的中性粒細胞無差別地釋放破壞性的酶並可導致器官損傷。另外，補體活化可引起溶解的補體組分沉積在鄰近的宿主細胞上以及微生物靶上，導致宿主細胞溶解。

補體系統還涉及許多急性和慢性疾病狀態的發病機理，包括：心肌梗死、中風、ARDS、再灌注損傷、感染

性休克、熱燒傷後的毛細管滲漏、心肺分流術後的炎症、移植物排斥、類風濕性關節炎、多發性硬化、重症肌無力和阿爾茨海默氏病。在幾乎所有的這些病況中，補體不是原因，而是涉及發病機理的數個因素之一。然而，補體活化可能是主要的病理機制和代表在許多這些疾病狀態中臨床控制的有效點。越來越承認在各種疾病狀態中補體-介導的組織損傷的重要性，強調了對有效的補體抑制性藥物的需求。迄今為止，艾庫組單抗(eculizumab)(Solaris®)，一種針對C5的抗體，是唯一的補體-靶向藥物，其已被批准用於人用。然而，C5是在補體系統中位於“下游”的數個效應分子之一，並且C5的阻斷並不抑制補體系統的活化。因此，與“下游”補體抑制劑相比，補體活化的起始步驟的抑制劑將具有顯著的優勢。

目前，廣為接受的是，補體系統可通過三個不同的途徑啟動：經典途徑、凝集素途徑和替代途徑。經典途徑通常通過包含與外來顆粒(*即*，抗原)結合的宿主抗體的複合物觸發，因此需要在先暴露於抗原以產生特異性抗體反應。因為經典途徑的活化依賴於通過宿主的在先的適應性免疫反應，因此經典途徑是獲得性免疫系統的一部分。相比之下，凝集素和替代途徑兩者均不依賴於適應性免疫，並且是先天性免疫系統的一部分。

補體系統的活化導致絲氨酸蛋白酶酶原的序貫活化。經典途徑活化的第一步驟是特定的識別分子C1q與抗原-結合的IgG和IgM分子的結合。C1q與C1r和C1s絲氨酸蛋白酶

酶原作為稱為C1的複合物締合。在C1q與免疫複合物結合後，Clr的Arg-Ile位點的自體蛋白水解裂解之後是Clr-介導的C1s的裂解和活化，其由此需要裂解C4和C2的能力。C4被裂解成兩個片段，稱為C4a和C4b，並且類似地，C2被裂解成C2a和C2b。C4b片段能夠與鄰近的羥基或氨基形成共價鍵和通過與啟動的C2的C2a片段的非共價相互作用產生C3轉化酶(C4b2a)。C3轉化酶(C4b2a)通過蛋白水解裂解成C3a和C3b亞組分來啟動C3，導致產生C5轉化酶(C4b2a3b)，其通過裂解C5導致形成膜攻擊複合物(與C6、C7、C8和C-9組合的C5b，亦稱為“MAC”)，其可破壞細胞膜，導致細胞溶解。啟動形式的C3和C4 (C3b和C4b)共價地沉積在外來靶標表面上，其被多個吞噬細胞上的補體受體識別。

獨立地，通過凝集素途徑的補體系統活化的第一步驟也是特定的識別分子的結合，其之後是締合的絲氨酸蛋白酶酶原的活化。然而，不是通過C1q的免疫複合物的結合，凝集素途徑中的識別分子包括一組糖-結合蛋白(甘露聚糖-結合凝集素(MBL)、H-纖維膠凝蛋白(H-ficolin)、M-纖維膠凝蛋白、L-纖維膠凝蛋白和C-型凝集素CL-11)，統稱為凝集素。參見J. Lu等，*Biochim. Biophys. Acta 1572*:387-400, (2002); Holmskov等，*Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh等，*Immunology 101*:225-232 (2000))。還參見J. Luet等，*Biochim Biophys Acta* 1572: 387-400 (2002); Holmskov等，*Annu Rev Immunol* 21:547-

578 (2003); Teh等，*Immunology* 101:225-232 (2000); Hansen等，*J. Immunol* 185(10):6096-6104 (2010)。

Ikeda等首先證實，像C1q一樣，在以C4-依賴性方式結合至酵母甘露聚糖-包被的紅細胞時，MBL能夠啟動補體系統(Ikeda等，*J. Biol. Chem. 262*:7451-7454, (1987))。MBL，膠原凝集素蛋白家族的一個成員，是鈣-依賴性凝集素，其結合具有位於吡喃糖環的赤道面中的3-和4-羥基的糖。因此，MBL的主要配體是D-甘露糖和N-乙醯基-D-葡糖胺，而不適應該立體要求的糖具有對MBL不可檢出的親和力(Weis等，*Nature* 360:127-134, (1992))。MBL和單價糖之間的相互作用非常弱，解離常數通常在單位數毫摩爾範圍內。通過親合力，即通過同時與彼此緊密靠近的多個單糖殘基相互作用，MBL實現與聚糖配體緊密的特異性結合(Lee等，*Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, (1992))。MBL識別通常裝飾微生物例如細菌、酵母、寄生蟲和某些病毒的糖模式。相比之下，MBL不識別D-半乳糖和唾液酸，次末端和末端的糖，其通常裝飾在哺乳動物血漿和細胞表面糖蛋白上存在的"成熟的"複雜糖綴合物。認為該結合特異性促進“外來”表面的識別和有助於保護免於“自-活化”。然而，MBL以高親和力結合至在哺乳動物細胞的內質網和高爾基體中隔離的N-連接的糖蛋白和糖脂上的高-甘露糖"前體"聚糖簇(Maynard等，*J. Biol. Chem. 257*:3788-3794, (1982))。因此，損壞的細胞是經過MBL結合的凝集素途徑活化的潛在靶標。

纖維膠凝蛋白具有與MBL不同類型的凝集素結構域，稱為纖維蛋白原-樣結構域。纖維膠凝蛋白以Ca^{++}-非依賴性的方式結合糖殘基。在人中，已經鑒定了三類纖維膠凝蛋白(L-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白和H-纖維膠凝蛋白)。兩類血清纖維膠凝蛋白，L-纖維膠凝蛋白和H-纖維膠凝蛋白，共同具有對N-乙醯基-D-葡糖胺的特異性；然而，H-纖維膠凝蛋白還結合N-乙醯基-D-半乳糖按。L-纖維膠凝蛋白、H-纖維膠凝蛋白、CL-11和MBL的糖特異性的差異意味著通過交錯的糖綴合物，不同的凝集素可以是互補的和靶標不同的。這一概念得到了最近報導的支援，即，在凝集素途徑的已知凝集素中，僅L-纖維膠凝蛋白特異性結合至脂磷壁酸，一種在所有革蘭氏陽性細菌上存在的細胞壁糖綴合物(Lynch等，*J. Immunol. 172*:1198-1202, (2004))。膠原凝集素(即，MBL)和纖維膠凝蛋白在胺基酸序列中具有不顯著的相似性。然而，這兩類蛋白具有相似的結構域組織，並且像C1q一樣，裝配成寡聚體結構，其使多位元點結合的可能性最大化。

MBL的血清濃度在健康群體中高度可變，這在遺傳上受到MBL基因的啟動子和編碼區中的多態性/突變控制。作為急性期蛋白，MBL的表達還在炎症期間被增量調節。L-纖維膠凝蛋白以類似於MBL的濃度存在於血清中。因此，凝集素途徑的L-纖維膠凝蛋白分支在強度上潛在地與MBL臂相當。MBL和纖維膠凝蛋白也可作為調理素起作用，其允許吞噬細胞靶向MBL-和纖維膠凝蛋白-裝飾的表

面(參見Jack等，*J Leukoc Biol.*, 77(3):328-36 (2004), Matsushita和Fujita, *Immunobiology*, 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi等，*J Immunol,* 174(1):418-25(2005)。這種調理素作用需要這些蛋白與吞噬細胞受體的相互作用(Kuhlman等，*J. Exp. Med. 169*:1733, (1989); Matsushita等，*J. Biol. Chem. 271*:2448-54, (1996))，其身份尚未確定。

人MBL通過其膠原-樣結構域與獨特的C1r/C1s-樣絲氨酸蛋白酶(稱為MBL-相關絲氨酸蛋白酶(MASP))形成特異性和高-親和力相互作用。迄今為止，描述了三種MASP。首先，單一酶"MASP"被鑒定和表徵為負責補體級聯起始(即，裂解C2和C4)的酶(Matsushita等，*J Exp Med* 176(6):1497-1502 (1992); Ji等，*J. Immunol. 150*:571-578, (1993))。隨後確定MASP活性事實上是兩種蛋白酶的混合物：MASP-1和MASP-2 (Thiel等，*Nature 386*:506-510, (1997))。然而，已證實MBL-MASP-2複合物單獨足以補體活化(Vorup-Jensen等，*J. Immunol.165*:2093-2100, (2000))。此外，MASP-2單獨以高速裂解C2和C4(Ambrus等，*J. Immunol. 170*:1374-1382, (2003))。因此，MASP-2是負責活化C4和C2以產生C3轉化酶C4b2a的蛋白酶。這與經典途徑的C1複合物顯著不同，在經典途徑中兩種特異性絲氨酸蛋白酶(C1r和C1s)的協調作用導致補體系統的活化。另外，第三種新的蛋白酶MASP-3已經分離(Dahl, M. R.等，*Immunity 15*:127-35, 2001)。MASP-1和MASP-3是相同基因的可變剪接產物。

MASP與C1複合物的酶組分C1r和C1s共有相同的結構域組織(Sim等，*Biochem. Soc. Trans. 28*:545, (2000))。這些結構域包括N-末端C1r/C1s/海膽VEGF/骨形態發生蛋白(CUB)結構域、表皮生長因數-樣結構域、第二CUB結構域、串聯的補體控制蛋白結構域和絲氨酸蛋白酶結構域。如在C1蛋白酶中，MASP-2的活化通過裂解鄰近絲氨酸蛋白酶結構域的Arg-I1e鍵發生，這將所述酶分成二硫鍵連接的A和B鏈，後者由絲氨酸蛋白酶結構域組成。

MBL還可與MASP-2的可變剪接形式締合，稱為19 kDa的MBL-相關蛋白(MAp19)或小MBL-相關蛋白(sMAP)，其缺少催化活性MASP2 (Stover, *J. Immunol. 162*:3481-90, (1999); Takahashi等，*Int. Immunol. 11*:859-863, (1999))。MAp19包括MASP-2的起始兩個結構域，接著是四個獨特胺基酸的額外序列。Map19的功能尚不清楚(Degn等，*J Immunol. Methods*, 2011)。MASP-1和MASP-2基因分別位於人第3和1號染色體上(Schwaeble等，*Immunobiology 205*:455-466, (2002))。

若干條證據表明，存在不同的MBL-MASP複合物和在血清中大部分的MASP不與MBL複合(Thiel等，*J. Immunol. 165*:878-887, (2000))。H-和L-纖維膠凝蛋白兩者均結合所有的MASP和啟動凝集素補體途徑，如MBL一樣(Dahl等，*Immunity 15*:127-35, (2001); Matsushita等，*J. Immunol. 168*:3502-3506, (2002))。凝集素和經典途徑兩者形成共同的C3轉化酶(C4b2a)，這兩個途徑在該步驟處匯合。

廣泛認為在首次感染的宿主中，凝集素途徑在宿主防禦感染方面具有重要作用。MBL參與宿主防禦的有力證據來自功能MBL的血清水準降低的患者的分析(Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta1572*:401-413, (2002))。這樣的患者顯示對復發細菌和真菌感染的易感性。在生命的早期，因為母體來源的抗體滴度減弱，在易損性的表觀視窗期間，但在抗體反應的完全庫發展之前，這些症狀通常是明顯的。該綜合征經常因為MBL的膠原部分的數個位點的突變導致，其干擾MBL寡聚體的正確形成。然而，因為MBL可起不依賴於補體的調理素的作用，尚不清楚對感染的易感性增加歸因於受損的補體活化的程度。

與經典和凝集素途徑相反，未發現替代途徑的引發劑實現C1q和凝集素在其它兩個途徑中進行的識別功能。目前廣泛公認的是，替代途徑自發地經歷低水準的更新活化(turnover activation)，其可容易地在外來或其它異常表面(細菌、酵母、病毒感染的細胞或受損組織)上被放大，所述表面缺少控制自發補體活化的適當分子元件。存在四種血漿蛋白直接參與替代途徑的活化：C3、因數B和D、和備解素。

儘管廣泛的證據表明在非感染性人類疾病的發病機理中牽涉到經典和替代補體途徑兩者，但凝集素途徑的作用僅剛開始評估。最近的研究提供了凝集素途徑的活化可能是在缺血/再灌注損傷中補體活化和相關炎症的原因的證據。Collard等(2000)報導了經受氧化應激的培養的內皮細

胞結合MBL和在暴露於人血清時顯示C3沉積(Collard等，*Am. J. Pathol. 156*:1549-1556, (2000))。另外，用封閉性抗-MBL單克隆抗體處理人血清抑制MBL結合和補體活化。這些發現延伸到心肌缺血-再灌注的大鼠模型，其中與用對照抗體處理的大鼠相比，用針對大鼠MBL的封閉性抗體處理的大鼠顯示在冠狀動脈阻塞後顯著較低的心肌損傷(Jordan等，*Circulation 104*:1413-1418, (2001))。在氧化應激後MBL與血管內皮結合的分子機制尚不清楚；最近的研究表明在氧化應激後凝集素途徑的活化可通過MBL結合血管內皮細胞角蛋白和不結合糖綴合物而被介導(Collard等，*Am. J. Pathol. 159*:1045-1054, (2001))。其它研究在缺血/再灌注損傷的發病機理中牽涉到經典和替代途徑，並且凝集素途徑在該疾病中的作用仍有爭議(Riedermann, N. C.等，*Am. J. Pathol. 162*:363-367, 2003)。

最近的研究表明，需要MASP-1 (和可能還有MASP-3)以將替代途徑活化酶因數D從其酶原形式轉化成其酶活性形式(參見Takahashi M.等，*J Exp Med* 207(1):29-37 (2010))。該過程的生理學重要性通過在MASP-1/3-缺陷小鼠的血漿中缺少替代途徑功能活性來說明。從天然C3蛋白水解產生C3b對於替代途徑發揮功能是必需的。因為替代途徑C3轉化酶(C3bBb)包含C3b作為基本亞基，關於經過替代途徑的第一C3b的來源的疑問提出了令人困擾的問題和引起了大量的研究。

C3屬於包含罕見的稱為硫酯鍵的翻譯後修飾的蛋白

(以及C4和α-2巨球蛋白)的家族。硫酯基團包含穀氨醯胺，其末端羰基與遠離三個胺基酸的半胱氨酸的巯基形成共價硫酯鍵。該鍵是不穩定的和親電子穀氨醯基-硫酯可與親核部分例如羥基或氨基反應，因此與其它分子形成共價鍵。當隔離在完整C3的疏水袋內時，硫酯鍵是相當穩定的。然而，C3蛋白水解裂解成C3a和C3b導致高反應性硫酯鍵暴露在C3b上，並且在包括羥基或氨基的鄰近部分親核攻擊後，C3b變成與靶標共價地連接。除了其在C3b與補體靶標共價連接中的充分證明的作用之外，還認為C3硫酯在觸發替代途徑中具有關鍵的作用。根據廣泛公認的"tick-over理論"，替代途徑通過產生液相轉化酶iC3Bb而開始，其自具有水解的硫酯的C3 (iC3；$C3(H_2O)$)和因數B形成(Lachmann, P. J.等，*Springer Semin. Immunopathol. 7*:143-162, (1984))。C3b-樣$C3(H_2O)$通過蛋白的內部硫酯的緩慢自發水解，自天然C3產生(Pangburn, M. K.等，*J. Exp. Med. 154*:856-867, 1981)。通過$C3(H_2O)$Bb轉化酶的活性，C3b分子沉積在靶標表面上，從而引發替代途徑。

關於替代途徑的活化的引發劑瞭解甚少。認為啟動劑包括酵母細胞壁(酵母聚糖)、許多純的多糖、兔紅細胞、某些免疫球蛋白、病毒、真菌、細菌、動物腫瘤細胞、寄生蟲和受損的細胞。這些啟動劑共同的唯一特徵是存在糖，但糖結構的複雜性和多樣性使得其難以建立共有的被識別的分子決定簇。廣泛公認的是，替代途徑活化通過在該途徑的抑制性調節組分(例如因數H、因數I、DAF和CR1

以及作為替代途徑的唯一正調節劑的備解素)之間的精細平衡得到控制(參見Schwaeble W. J.和Reid K. B., *Immunol Today* 20(1):17-21 (1999))。

除了上述明顯未調節的活化機制之外，替代途徑還可為凝集素/經典途徑C3轉化酶(C4b2a)提供有力的擴增環，因為產生的任何C3b可與因數B一起參與形成另外的替代途徑C3轉化酶(C3bBb)。替代途徑C3轉化酶通過結合備解素而穩定。備解素延長替代途徑C3轉化酶的半壽期6-10倍。將C3b添加至替代途徑C3轉化酶導致形成替代途徑C5轉化酶。

認為所有三個途徑(即，經典、凝集素和替代)在C5處匯合，其經裂解形成具有多種促炎效應的產物。匯合的途徑被稱為末端補體途徑。C5a是最有效的過敏毒素，誘發平滑肌和血管緊張度以及血管通透性的改變。它也是有力的化學吸引素以及中性粒細胞和單核細胞的活化劑。C5a-介導的細胞活化可通過誘導釋放多種另外的炎性介質，包括細胞因數、水解酶、花生四烯酸代謝物和活性氧物質，顯著放大炎性反應。C5裂解導致形成C5b-9，亦稱為膜攻擊複合物(MAC)。現在存在有力的證據表明，除了其作為溶解孔-形成複合物的作用之外，亞溶解的(sublytic) MAC沉積還可在炎症中起重要作用。

除了其在免疫防禦中的基本作用之外，在許多臨床條件下補體系統還有助於組織損傷。因此，對開發治療上有效的補體抑制劑以預防這些不良作用存在迫切的需要。

【發明內容】

提供本簡述，以簡單的形式介紹所選擇的概念，其在下文的詳細描述中進一步描述。本簡述不意欲鑒別所要求保護的主題的關鍵特徵，也不意欲用作確定所要求保護的主題的範圍的輔助。

在一個方面，本發明提供在患有血栓性微血管病(TMA)的受試者中抑制微血管內皮細胞損傷和/或血栓形成的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一些實施方案中，所述受試者患有或有風險發生選自溶血性尿毒綜合征(HUS)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)和非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的TMA。在一些實施方案中，在給予組合物之前，所述受試者被確定顯示選自以下的一個或多個症狀：(i) 貧血、(ii) 血小板減少、(iii) 腎機能不全和(iv) 肌酸酐升高，和所述組合物以改進所述一個或多個症狀的有效量和足夠時間給予。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是抗-MASP-2抗體或其片段。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是特異性結合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑抑制微血管內皮細胞損傷。

在另一方面，本發明提供在患有或有風險發生非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制

MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物。在一個實施方案中，在給予組合物之前，所述受試者被確定顯示選自以下的一個或多個症狀：(i) 貧血、(ii) 血小板減少、(iii) 腎機能不全和(iv) 肌酸酐升高，和所述組合物以改進所述一個或多個症狀的有效量和足夠時間給予。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生非-因數H依賴性aHUS。在一個實施方案中，所述受試者患有與因數I、因數B或膜輔因數CD46相關的aHUS。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是特異性結合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗體或其片段，例如抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制微血管內皮細胞損傷。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制血栓形成。

在另一方面，本發明提供減少有風險發生非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的受試者將患有與aHUS有關的臨床症狀的可能性的方法。根據本發明的該方面的方法包括：(a) 在已知與aHUS有關的受試者中確定遺傳標記的存在；(b) 定期監測所述受試者以確定選自貧血、血小板減少、腎機能不全和肌酸酐升高的至少一種症狀的存在與否；和(c) 在確定貧血、血小板減少、腎機能不全或肌酸酐升高的至少之一存在時，給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物，其中所述組合物以改進所述一個或多個症狀的有效量和足夠時間給予。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是特異性結

合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗體或其片段，例如抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在所述方法的一個實施方案中，步驟(a)包括對獲自所述受試者的樣品進行遺傳篩選試驗和鑒定在選自補體因數H (CFH)、因數I (CFI)、因數B (CFB)、膜輔因數CD46、C3、補體因數H-相關蛋白(CFHR1)、抗凝血蛋白凝血調節蛋白(THBD)、補體因數H-相關蛋白3 (CFHR3)和補體因數H-相關蛋白4 (CFHR4)的基因中與aHUS有關的至少一種遺傳標記的存在。在一個實施方案中，所述方法進一步包括監測所述受試者已知與觸發aHUS臨床症狀有關的事件的發生，和在觸發事件發生之前、期間或之後，給予所述受試者包含MASP-2抑制劑的組合物。在一個實施方案中，與觸發aHUS臨床症狀有關的事件選自藥物暴露、感染、惡性腫瘤、損傷、器官或組織移植和妊娠。在一個實施方案中，感染是細菌感染。在一個實施方案中，組合物經皮下給予。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制微血管內皮細胞損傷。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制血栓形成。

在另一方面，本發明提供在患有或有風險發生感染繼發的非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生與肺炎鏈球菌(*S. pneumonia*)感染有關的非腸道aHUS。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是特異性結合SEQ ID NO:6

的一部分的抗-MASP-2抗體或其片段，例如抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制微血管內皮細胞損傷。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制血栓形成。

在另一方面，本發明提供治療患有非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物，其中MASP-2抑制劑通過靜脈內導管或其它導管遞送方法給予。在一個實施方案中，所述方法進一步包括用血漿去除術治療患者。在一個實施方案中，在不存在血漿去除術時給予包含MASP-2抑制劑的組合物。在一個實施方案中，包含MASP-2抑制劑的組合物通過導管給予第一段時間，進一步包括給予包含MASP-2抑制劑的組合物第二段時間，其中組合物在第二段時間期間經皮下給予。在一個實施方案中，所述方法進一步包括定期測定至少一種補體因數的水準，其中與標準值或健康受試者相比，測定至少一種補體因數的水準降低指示需要繼續用組合物治療。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是特異性結合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗體或其片段，例如抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制微血管內皮細胞損傷。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制血栓形成。

在另一方面，本發明提供治療患有血栓性血小板減少性紫癜(TTP)或顯示與TTP的診斷一致的症狀的受試者的方

法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物，其中MASP-2抑制劑通過靜脈內導管或其它導管遞送方法給予所述受試者。在一個實施方案中，所述受試者顯示選自中樞神經系統受累、血小板減少、嚴重的心臟受累、嚴重的肺受累、胃腸梗塞和壞疽的至少一個或多個症狀。在一個實施方案中，所述受試者對ADAMTS13的抑制劑的存在測試陽性，和所述方法進一步包括給予受試者免疫抑制劑。在一個實施方案中，在不存在血漿去除術時給予包含MASP-2抑制劑的組合物第一段時間。在一個實施方案中，所述受試者對ADAMTS-13的抑制劑的存在測試陽性，和所述方法進一步包括給予ADAMTS-13。在一個實施方案中，所述方法進一步包括用血漿去除術治療患者。在一個實施方案中，包含MASP-2抑制劑的組合物在存在血漿去除術時給予。在一個實施方案中，包含MASP-2抑制劑的組合物通過導管給予第一段時間，進一步包括給予包含MASP-2抑制劑的組合物第二段時間，其中在第二段時間期間組合物經皮下給予。在一個實施方案中，所述方法進一步包括定期測定至少一種補體因數的水準，其中與標準值或健康受試者相比，測定至少一種補體因數的水準降低指示需要繼續用組合物治療。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是特異性結合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗體或其片段，例如抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制微血管內皮細胞損傷。在一個

實施方案中，MASP-2抑制劑抑制血栓形成。

在另一方面，本發明提供治療患有難治性血栓性血小板減少性紫癜(TTP)的受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物。在一個實施方案中，組合物經皮下給予。在一個實施方案中，所述方法進一步包括定期測定至少一種補體因數的水準，其中與標準值或健康受試者相比，測定至少一種補體因數的水準降低指示需要繼續用組合物治療。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是特異性結合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗體或其片段，例如抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制微血管內皮細胞損傷。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制血栓形成。

在另一個方面中，本發明提供在患有或有風險發生血栓性微血管病(TMA)的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法，其中TMA是以下的至少一種：(i) 癌症繼發性TMA；(ii) 化學療法繼發性TMA；或(iii) 移植繼發性TMA，包括給予受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物。在一些實施方案中，所述受試者患有或有風險發生癌症繼發性TMA，和MASP-2抑制劑以有效降低發生TMA的風險或減少TMA的嚴重性的量系統性給予所述受試者。在一些實施方案中，所述受試者患有或有風險發生化學療法繼發性TMA，和MASP-2抑制劑在化學療法之前、期間或之後以有效降低

發生TMA的風險或減少TMA的嚴重性的量系統性給予所述受試者。在一些實施方案中，所述受試者患有或有風險發生移植繼發性TMA，和MASP-2抑制劑在移植程式之前、期間或之後以有效降低發生TMA的風險或減少TMA的嚴重性的量系統性給予所述受試者。在一些實施方案中移植程式是同種異體造血幹細胞移植物。在一些實施方案中，所述受試者先前已經經歷或目前正在經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑的治療。在一些實施方案中，所述方法還包括給予受試者抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑，例如人源化的抗-C5抗體或其抗原結合片段，例如艾庫組單抗。

在另一方面，本發明提供在患有或有風險發生Upshaw-Schulman綜合征(USS)的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法，包括給予受試者包含有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物。在一些實施方案中，所述方法包括治療有風險發生USS的受試者，其中所述方法包括給予一定量的MASP-2抑制劑一段時間，其有效改善或預防與TTP有關的一個或多個臨床症狀。在一些實施方案中，所述方法還包括週期性地監測所述受試者和在存在已知與觸發TTP臨床症狀有關的事件時給予MASP-2抑制劑。在一些實施方案中，所述方法還包括週期性地監測所述受試者和在確定存在貧血、血小板減少症或肌酸上升時給予MASP-2抑制劑。在一些實施方案中，所述受試者先前已經經歷或目前正在經歷用抑制

補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑治療。在一些實施方案中，所述方法還包括給予受試者抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑，例如人源化的抗-C5抗體或其抗原結合片段，例如艾庫組單抗。

在另一方面，本發明提供在患有德戈斯病(Degos病)的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法，包括給予受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物。在一些實施方案中，所述受試者先前已經經歷或目前正在經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑的治療。在一些實施方案中，所述方法還包括給予受試者抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑，例如人源化的抗-C5抗體或其抗原結合片段，例如艾庫組單抗。

在另一方面，本發明提供在患有災難性抗磷脂綜合征(CAPS)的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法，包括給予受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物。在一些實施方案中，所述受試者先前已經經歷或目前正在經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑的治療。在一些實施方案中，所述方法還包括給予受試者抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑，例如人源化的抗-C5抗體或其抗原結合片段，例如艾庫組單抗。

在本發明公開的任何方法的一些實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2抑制性抗體或其片段。在一些實施方案

中，MASP-2抑制性抗體具有減少的效應器功能。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是抗-MASP-2單克隆抗體或其片段，其特異性結合SEQ ID NO:6的一部分。在一些實施方案中，抗-MASP-2抗體或其片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化的抗體和人抗體。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和$F(ab')_2$的抗體片段。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體是單鏈分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體選自IgG1分子、IgG2和IgG4分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體是包括S228P突變的IgG4分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體結合人MASP-2的KD為10 nM或更小。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元。在一些實施方案中，在體外測定法中在1%人血清中MASP-2抑制性抗體以10 nM或更小的IC50抑制C3b沉積。在一些實施方案中，在90%人血清中MASP-2抑制性抗體以30 nM或更小的IC50抑制C3b沉積。

在本發明公開的任何方法的一些實施方案中，MASP-2抑制性單克隆抗體或其抗原結合片段包括：(a) 重鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-

102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和(b) 輕鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3。在一些實施方案中，MASP-2抑制性單克隆抗體包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體所識別的表位的至少一部分，所述參考抗體包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

在本發明的另一方面，提供在患有非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段。在一些實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體抑制在來自患有aHUS的受試者的血清中的血栓形成達至少40%。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體以比其對來自同一受試者的血清中的C5b-9沉積的抑制作用高至少20%(例如，高至少30%，高至少40%或高至少50%)的水準抑制在來自患有aHUS的受試者的血清中的血栓形成。在一些實施方案中，所述受試者處於aHUS的急性期。在一些實施方案中，所述受試者處於aHUS的緩解期。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體是單克隆抗體或其片段，其特異

性結合SEQ ID NO:6的一部分。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化的抗體和人抗體。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和$F(ab')_2$的抗體片段。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體是單鏈分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體選自IgG1分子、IgG2和IgG4分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體是包括S228P突變的IgG4分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體結合人MASP-2的KD是10 nM或更小。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元。在一些實施方案中，在體外測定法中在1%人血清中MASP-2抑制性抗體以10 nM或更小的IC50抑制C3b沉積。在一些實施方案中，在90%人血清中MASP-2抑制性抗體以30 nM或更小的IC50抑制C3b沉積。在一些實施方案中MASP-2抑制性單克隆抗體或其抗原結合片段包括：(a) 重鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和(b) 輕鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3。在一些實施方案中，MASP-2抑制性單克

隆抗體包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體所識別的表位的至少一部分，所述參考抗體包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

在另一方面，本發明提供治療患有血漿療法抵抗性aHUS的受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，抗體或其片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，所述受試者之前已經歷，或目前正經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑治療，例如其中末端補體抑制劑是人源化抗-C5抗體或其抗原結合片段。在一個實施方案中，所述方法進一步包括用血漿去除術治療患者。在一個實施方案中，包含MASP-2抑制性抗體的組合物在不存在血漿去除術時給予。

在另一方面，本發明提供治療患有與造血幹細胞移植有關的TMA的受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的抗-MASP-2單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，抗體或其片段選自重組抗體、具

有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，所述受試者之前已經歷，或當前正經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑治療。在一個實施方案中，所述受試者正患有與造血幹細胞移植有關的TMA，其對用血小板輸注的治療有抵抗，和/或對用血漿去除術的治療有抵抗。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體以有效改進與造血幹細胞移植有關的TMA相關的至少一個或多個臨床參數的量給予，例如血小板計數增加(例如，治療之前的血小板計數的至少2倍、至少3倍、至少4倍)、結合珠蛋白增加和/或乳酸脫氫酶減少。

在另一方面，本發明提供治療患有與造血幹細胞移植有關的持續性TMA (HSCT-TMA)的人受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物的步驟之前，鑒定具有與造血幹細胞移植有關的持續性TMA的人受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，抗體或其抗原結合片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在

一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3；和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一個實施方案中，在不存在血漿去除術時MASP-2抑制性抗體給予患者。在一個實施方案中，所述受試者之前已經歷，或當前正經歷用人源化抗-C5抗體或其抗原結合片段治療，例如其中末端補體抑制劑是人源化抗-C5抗體或其抗原結合片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體經全身遞送至所述受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段以有效改進與造血幹細胞移植有關的持續性TMA相關的至少一個或多個以下臨床參數的量給予：(i) 血小板計數增加(例如，治療之前的血小板計數的至少2倍、至少3倍、至少4倍)；(ii) 結合珠蛋白增加；(iii) 乳酸脫氫酶(LDH)減少；和/或(iv) 肌酸酐減少。

在另一方面，本發明提供治療患有或有風險發生移植物抗宿主病(GVHD)的人受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物。在一個實施方案中，所述受試者之前已經歷，或當前正經歷，或將經歷造血幹細胞移植。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活

化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物的步驟之前，鑒定患有或有風險發生移植物抗宿主病的人受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體經全身遞送至所述受試者。在一個實施方案中，所述受試者患有急性GVHD。在一個實施方案中，所述受試者患有類固醇抵抗性GVHD。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

在另一方面，本發明提供治療、預防或改善與移植物抗宿主病或TMA有關的一個或多個神經學症狀的方法，包括給予有需要的受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物。在一個實施方案中，與移植物抗宿主病或TMA有關的一個或多個神經學症狀選自虛弱、感覺異常、四肢麻痹、感覺運動缺乏、植物神經功能不全性多神經病和/或神經

源性膀胱。在一個實施方案中，所述受試者已接受造血幹細胞移植和所述受試者正患有選自感覺異常、四肢麻痹和神經源性膀胱的一個或多個神經學症狀。在一個實施方案中，所述受試者已接受造血幹細胞移植和正患有移植物抗宿主病。在一個實施方案中，所述受試者已接受造血幹細胞移植和正患有HSCT-TMA。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，抗體或其片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體經全身遞送至所述受試者。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物的步驟之前，鑒定患有與造血幹細胞移植有關的一個或多個神經學症狀的人受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

在另一方面，本發明提供治療患有或有風險發生與造血幹細胞移植有關的彌漫性肺泡出血(DAH)的人受試者的

方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物。在一個實施方案中，所述受試者之前已經歷，或當前正經歷，或將經歷造血幹細胞移植。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物的步驟之前，鑒定患有或有風險發生彌漫性肺泡出血(DAH)的人受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體經全身遞送至所述受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在另一方面，本發明提供用於抑制MASP-2-依賴性補體活化的不良作用的組合物，包括治療有效量的MASP-2抑制劑，例如MASP-2抑制性抗體和藥學上可接受的載體。還提供了製備用於在有需要的活受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活

化的不良作用的藥物的方法，其包括在藥用載體中的治療有效量的MASP-2抑制劑。還提供了製備用於抑制MASP-2-依賴性補體活化的藥物的方法，所述藥物用於治療下文描述的病況、疾病和病症的每一種。

在另一方面，本發明提供治療患有或有風險發生與造血幹細胞移植有關的靜脈閉塞性病(VOD)的人受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物。在一個實施方案中，所述受試者之前已經歷，或當前正經歷，或將經歷造血幹細胞移植。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物的步驟之前，鑒定患有或有風險發生靜脈閉塞性病(VOD)的人受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單克隆抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體經全身遞送至所述受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和

CDR-H3，和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在另一方面，本發明提供用於抑制MASP-2-依賴性補體活化的不良作用的組合物，其包含治療有效量的MASP-2抑制劑，例如MASP-2抑制性抗體和藥學上可接受的載體。還提供了製備用於在有需要的活受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的不良作用的藥物的方法，其包含在藥用載體中的治療有效量的MASP-2抑制劑。還提供了製備用於抑制MASP-2-依賴性補體活化的藥物的方法，所述藥物用於治療下文描述的病況、疾病和病症的每一種。

本發明的方法、組合物和藥物可用於在患有或有風險發生血栓性微血管病(TMA)的哺乳動物受試者(包括人)，和/或患有或有風險發生GVHD的受試者，和/或患有或有風險發生幹細胞移植後彌漫性肺泡出血的受試者，和/或患有或有風險發生靜脈閉塞性病(VOD)的受試者中體內抑制MASP-2-依賴性補體活化的不良作用，如本文進一步描述的。

【圖式簡單說明】

當結合附圖時，本發明的前述方面和許多附帶的優勢將變得更易理解，如同參考下面的詳細描述將變得更好理解一樣，其中：

[圖1]是說明人MASP-2的基因組結構的圖示；

[圖2A]是說明人MASP-2蛋白的結構域結構的示意

圖；

[圖2B]是說明人MAp19蛋白的結構域結構的示意圖；

[圖3]是說明鼠MASP-2敲除策略的圖示；

[圖4]是說明人MASP-2微基因構建體的圖示；

[圖5A]表示證明MASP-2-缺陷導致凝集素-途徑-介導的C4活化的丟失的結果，如實施例2中所述的通過在甘露聚糖上缺乏C4b沉積所測量的；

[圖5B]表示證明MASP-2-缺陷導致凝集素-途徑-介導的C4活化的丟失的結果，如實施例2中所述的通過在酵母聚糖上缺乏C4b沉積所測量的；

[圖5C]表示證明獲自MASP-2+/-、MASP-2-/-和野生型品系的血清樣品的相對C4活化水準的結果，如實施例2中所述的通過在甘露聚糖和酵母聚糖上的C4b沉積所測量的；

[圖6]表示證明添加鼠重組MASP-2至MASP-2-/-血清樣品以蛋白濃度依賴性方式恢復凝集素-途徑-介導的C4活化的結果，如實施例2中所述的通過在甘露聚糖上的C4b沉積所測量的；

[圖7]表示證明經典途徑在MASP-2-/-品系中起作用的結果，如實施例8中所述的；

[圖8A]表示證明抗-MASP-2 Fab2抗體#11抑制C3轉化酶形成的結果，如實施例10中所述的；

[圖8B]表示證明抗-MASP-2 Fab2抗體#11結合天然大鼠MASP-2的結果，如實施例10中所述的；

[圖8C]表示證明抗-MASP-2 Fab2抗體#41抑制C4裂解的結果，如實施例10中所述的；

[圖9]表示證明還發現抑制C3轉化酶形成的所有測試的抗-MASP-2 Fab2抗體抑制C4裂解的結果，如實施例10中所述的；

[圖10]是說明用於抗-MASP-2封閉Fab2抗體的表位作圖的源自大鼠MASP-2的重組多肽的圖示，如實施例11中所述的；

[圖11]表示證明抗-MASP-2 Fab2 #40和#60結合大鼠MASP-2多肽的結果，如實施例11中所述的；

[圖12]表示證明在腎缺血/再灌注損傷模型中在再灌注後24和48小時野生型(+/+)和MASP-2 (-/-)小鼠的血尿素氮清除率的結果，如實施例12中所述的；

[圖13A]表示顯示在分離自野生型(+/+)和MASP-2 (-/-)小鼠的RPE-脈絡膜複合物中基線VEGF蛋白水準的結果，如實施例13中所述的；

[圖13B]表示顯示在黃斑變性模型中在鐳射誘導的損傷後在第3天在野生型(+/+)和MASP-2 (-/-)小鼠中在RPE-脈絡膜複合物中VEGF蛋白水準的結果，如實施例13中所述的；

[圖14]表示顯示在野生型(+/+)和MASP-2 (-/-)小鼠中在鐳射誘導的損傷後在第7天平均脈絡膜新血管形成(CNV)體積的結果，如實施例13中所述的；

[圖15A和15B]表示在正常大鼠血清中給予MASP-2

Fab2抗體後，抑制C4b沉積(FIG. 15A)和抑制凝血酶活化(FIG 15B)的劑量反應曲線，如實施例14中所述的；

[圖16A和16B]表示在彌散性血管內凝血的局部Schwartzman反應模型中，與在未處理的野生型小鼠和其中補體途徑被放血劑眼鏡蛇毒因數(CVF)和末端途徑抑制劑(C5aR拮抗劑)抑制的野生型小鼠中(圖16A)的血小板聚集相比，在MASP-2 (-/-)小鼠中(FIG. 16B)測量的血小板聚集(表示為聚集面積)，如實施例15中所述的；

[圖17]圖示說明了在WT (+/+)供體腎的WT (+/+) (B6)或MASP-2 (-/-)移植物受體小鼠中測量的血尿素氮(BUN)水準，如實施例16中所述的；

[圖18]圖示說明了在盲腸結紮和穿刺(CLP)模型中作為微生物感染後天數的函數的WT (+/+)和MASP-2 (-/-)小鼠的百分比存活率，如實施例17中所述的；

[圖19]圖示說明了在盲腸結紮和穿刺(CLP)模型中在微生物感染後在WT (+/+)和MASP-2 (-/-)中測量的細菌數，如實施例17中所述的；

[圖20]是Kaplan-Mayer曲線，說明在用鼻內給予銅綠假單胞菌攻擊後6天WT (+/+)、MASP-2 (-/-)和C3 (-/-)小鼠的百分比存活率，如實施例18中所述的；

[圖21]圖示說明了在WT小鼠中皮下給予0.3 mg/kg或1.0 mg/kg的小鼠抗-MASP-2單克隆抗體後在多個時間點獲得的樣品中按對照的%測量的C4b沉積的水準，如實施例19中所述的；

[圖22]圖示說明了在WT小鼠中在ip給予0.6 mg/kg的小鼠抗-MASP-2單克隆抗體後在多個時間點獲得的樣品中按對照的%測量的C4b沉積的水準，如實施例19中所述的；

[圖23]圖示說明了在用單次ip注射0.3 mg/kg或1.0 mg/kg小鼠抗-MASP-2單克隆抗體預處理的WT (+/+)小鼠中在鐳射誘導的損傷後第7天平均脈絡膜新血管形成(CNV)體積，如實施例20中所述的；

[圖24A]圖示說明了在用5x108/100 µl cfu腦膜炎奈瑟菌感染後MASP-2 (-/-)和WT (+/+)小鼠的百分比存活率，如實施例21中所述的；

[圖24B]圖示說明了在取自用5x108 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染的MASP-2 KO (-/-)和WT (+/+)小鼠的血液樣品中，在不同的時間點回收的腦膜炎奈瑟菌的log cfu/ml，如實施例21中所述的；

[圖25A]圖示說明了在用2x108 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染後MASP-2 KO (-/-)和WT (+/+)小鼠的百分比存活率，如實施例21中所述的；

[圖25B]圖示說明了在取自用2x108 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染的WT (+/+)小鼠的血液樣品中在不同的時間點回收的腦膜炎奈瑟菌的log cfu/ml，如實施例21中所述的；

[圖25C]圖示說明了在取自用2x108 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染的MASP-2 (-/-)小鼠的血液樣品中在不同的時間點回收的腦膜炎奈瑟菌的log cfu/ml，如實施例21中所

述的；

[圖26A]圖示說明了C3b沉積測定的結果，證明MASP-2 (-/-)小鼠保留有功能的經典途徑，如實施例22中所述的；

[圖26B]圖示說明了在酵母聚糖包被板上C3b沉積測定的結果，證明MASP-2 (-/-)小鼠保留有功能的替代途徑，如實施例22中所述的；

[圖27A]圖示說明了在C4 (-/-)小鼠(n=6)和匹配的WT同窩對照(n=7)中冠狀動脈的左前降支(LAD)的結紮和再灌注後心肌缺血/再灌注損傷(MIRI)-誘導的組織損失，表明處於風險的面積(AAR)和梗塞面積(INF)，如實施例22中所述的；

[圖27B]圖示說明了在按圖42A中所述處理的C4 (-/-)和WT小鼠中作為處於風險的面積(AAR)的函數的梗塞面積(INF)，證明C4 (-/-)小鼠與WT對照一樣對MIRI易感(虛線)，如實施例22中所述的；

[圖28A]圖示說明了使用來自WT小鼠、C4 (-/-)小鼠的血清和用甘露聚糖預孵育的來自C4 (-/-)小鼠的血清的C3b沉積測定的結果，如實施例22中所述的；

[圖28B]圖示說明了對與各種濃度的抗-鼠MASP-2 mAb (mAbM11)混合的來自WT、C4 (-/-)和MASP-2 (-/-)小鼠的血清的C3b沉積測定的結果，如實施例22中所述的；

[圖28C]圖示說明了對來自WT (C4充分)和C4缺陷血清的人血清和用甘露聚糖預孵育的來自C4缺陷受試者的血清

的C3b沉積測定的結果，如實施例22中所述的；

[圖28D]圖示說明了對與抗-人MASP-2 mAb (mAbH3)混合的來自WT (C4充分)和C4缺陷受試者的人血清的C3b沉積測定的結果，如實施例22中所述的；

[圖29A]圖示說明了在凝集素活化途徑特異性測定條件下或在經典活化途徑特異性測定條件下測試的在來自各種補體缺陷小鼠品系的血漿中的C3轉化酶活性的比較分析，如實施例22中所述的；

[圖29B]圖示說明了在凝集素活化途徑特異性條件下測試的在來自各種補體缺陷小鼠品系的血漿中的C3轉化酶活性的時間解析動力學，如實施例22中所述的；

[圖30]說明了蛋白質印跡分析的結果，表明通過凝血酶底物FXIa和FXa的a'鏈的存在所證明的人C3的活化，如實施例23中所述的；

[圖31]顯示對獲自WT、MASP-2 (-/-)、F11(-/-)、F11(-/-)/C4 (-/-)和C4 (-/-)的血清樣品的C3沉積測定的結果，如實施例23中所述的；

[圖32A]是Kaplain-Meier存活曲線，顯示在對照小鼠中和在用抗-鼠MASP-2抗體(mAbM11)或抗-人MASP-2抗體(mAbH6)處理的小鼠中在暴露於7.0 Gy輻射後隨時間的百分比存活率，如實施例29中所述的；

[圖32B]是Kaplain-Meier存活曲線，顯示在對照小鼠中和在用抗-鼠MASP-2抗體(mAbM11)或抗-人MASP-2抗體(mAbH6)處理的小鼠中在暴露於6.5 Gy輻射後隨時間的百

分比存活率，如實施例29中所述的；

[圖33]是Kaplan-Meyer曲線，其圖示說明了在給予2.6 x 107 cfu的感染劑量的腦膜炎奈瑟菌血清型A Z2491後MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活率，證明MASP-2缺陷小鼠被保護免於腦膜炎奈瑟菌誘導的死亡，如實施例30中所述的；

[圖34]是Kaplan-Meyer曲線，其圖示說明了在給予6 x 106 cfu的感染劑量的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58後MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活率，證明MASP-2-缺陷小鼠被保護免於腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58誘導的死亡，如實施例30中所述的；

[圖35]圖示說明了在用6x106 cfu的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58 i.p.感染後取自MASP-2 KO和WT小鼠的血液樣品中在不同的時間點恢復的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58的log cfu/ml (對於兩組小鼠在不同的時間點n=3，結果表示為平均值±SEM)，證明儘管MASP-2 KO小鼠用與WT小鼠相同劑量的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58感染，但MASP-2 KO小鼠與WT相比具有對菌血症提高的清除率，如實施例30中所述的；

[圖36]圖示說明了在用6x106 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌血清型血清型B品系MC58感染後3、6、12和24小時，MASP-2和WT小鼠的平均疾病評分，證明MASP-2缺陷小鼠顯示對感染的高抵抗，在6小時具有低得多的疾病評分，如實施例30中所述的；

[圖37]是Kaplan-Meyer曲線，其圖示說明在給予4 x 106/100 μl cfu的感染劑量的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58，接著在感染後3小時給予抑制性抗-MASP-2抗體(1 mg/kg)或對照同種型抗體後，小鼠的百分比存活率，證明抗-MASP-2抗體有效治療和改善用腦膜炎奈瑟菌感染的受試者的存活率，如實施例31中所述的；

[圖38]圖示說明了在以下存在的情況下在孵育後0、30、60和90分鐘在用6.5x106 cfu/100 μl腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58 i.p.感染後在20%人血清濃度下在不同的時間點回收的腦膜炎奈瑟菌血清型B-MC58的活計數的log cfu/ml：(A) 正常人血清(NHS)加人抗-MASP-2抗體；(B) 正常人血清(NHS)加同種型對照抗體；(C) MBL-/-人血清；(D) 正常人血清(NHS)和(E) 熱滅活的正常人血清(NHS)，顯示在人血清中腦膜炎奈瑟菌的補體依賴性殺傷通過加入人抗-MASP-2抗體而顯著提高，如實施例32中所述的；

[圖39]圖示說明了在小鼠血清樣品中在不同的時間點回收的腦膜炎奈瑟菌血清型B-MC58的活計數的log cfu/ml，證明MASP-2 -/-小鼠血清比WT小鼠血清具有對腦膜炎奈瑟菌較高水準的殺菌活性，如實施例32中所述的；

[圖40]圖示說明了通過一定範圍的血清濃度的人血清的甘露聚糖-包被的鼠紅細胞的溶血(如通過溶解的小鼠紅細胞(Crry/C3-/-)釋放進入上清液的血紅蛋白所測量，通過光度法測量)。測試的血清包括熱滅活的(HI) NHS、MBL-

/-、NHS +抗-MASP-2抗體和NHS對照，如實施例33中所述的；

[圖41]圖示說明了通過一定範圍的血清濃度的人血清的未包被的鼠紅細胞的溶血(如通過溶解的WT小鼠紅細胞釋放進入上清液的血紅蛋白所測量，通過光度法測量)。測試的血清包括熱滅活的(HI) NHS、MBL-/-、NHS +抗-MASP-2抗體和NHS對照，證明抑制MASP-2抑制非致敏的WT小鼠紅細胞的補體-介導的溶解，如實施例33中所述的；

[圖42]圖示說明了通過一定範圍的血清濃度的人血清的未包被的鼠紅細胞的溶血(如通過溶解的小鼠紅細胞(CD55/59 -/-)釋放進入上清液的血紅蛋白所測量，通過光度法測量)。測試的血清包括熱滅活的(HI) NHS、MBL-/-、NHS +抗-MASP-2抗體和NHS對照，如實施例33中所述的；

[圖43]圖示說明了在對照小鼠中和在用抗-人MASP-2抗體(mAbH6)處理的小鼠中在暴露於8.0 Gy輻射後隨時間(天)的百分比存活率，如實施例34中所述的；

[圖44]圖示說明了在LPS注射MASP-2 -/-和WT小鼠後，微血管阻塞起始的時間，顯示經60分鐘測量的具有血栓形成的小鼠的百分比，證明在15分鐘後在WT小鼠中檢出血栓形成，多達80%的WT小鼠證實了在60分鐘時血栓形成；相比之下，在60分鐘期間沒有MASP-2 -/-小鼠顯示任何血栓形成(log秩：p=0.0005)，如實施例35中所述的；

[圖45]圖示說明了在STX/LPS-誘導的HUS模型中鹽水處理的對照小鼠(n=5)和抗-MASP-2抗體處理的小鼠(n=5)的隨時間(小時)的百分比存活率，證明到42小時所有對照小鼠死亡，而相比之下，在實驗的整個時間過程中100 %的抗-MASP-2抗體-處理的小鼠存活，如實施例36中所述的；

[圖46]圖示說明了，作為損傷誘導後的時間的函數，在注射FITC/葡聚糖之前16小時和1小時通過給予同種型對照或人MASP-2抗體mAbH6 (10mg/kg)處理後在FITC/葡聚糖UV模型中具有微血管阻塞的小鼠的百分比，如實施例37中所述的；

[圖47]圖示說明了用人MASP-2抗體(mAbH6)和同種型對照抗體處理的小鼠的阻塞時間(分鐘)，其中資料包告為散點，帶有平均值(水準條)和標準誤差條(分隔號)。用於分析的統計學檢驗是非配對t檢驗；其中符號“*”表示p=0.0129，如實施例37中所述的；和

[圖48]圖示說明了在用低光強度(800-1500)的FITC-葡聚糖/光誘導的內皮細胞損傷血栓形成模型中，對於野生型小鼠、MASP-2 KO小鼠和誘導血栓形成之前16小時和再次在之前1小時通過i.p.給予10mg/kg人MASP-2抗體(mAbH6)預處理的野生型小鼠的直到阻塞的時間(分鐘)，如實施例37中所述的；

[圖49]是Kaplan-Meier曲線，顯示在FITC-葡聚糖誘導的血栓性微血管病中在用增加劑量的人MASP-2抑制性抗

體(mAbH6)或同種型對照抗體處理的小鼠中作為時間的函數的具有血栓的小鼠的百分比，如實施例39中所述的；

[圖50]圖示說明了作為mAbH6劑量的函數的血栓形成起始的中位數時間(分鐘)(與對照相比*p<0.01)，如實施例39中所述的；

[圖51]是Kaplan-Meier曲線，顯示在FITC-葡聚糖誘導的血栓性微血管病中在用增加劑量的人MASP-2抑制性抗體(mAbH6)或同種型對照抗體處理的小鼠中作為時間的函數的具有微血管阻塞的小鼠的百分比，如實施例39中所述的；

[圖52]圖示說明了作為mAbH6劑量的函數的至微血管阻塞的中位數時間(與對照相比*p<0.05)，如實施例39中所述的；

[圖53A]圖示說明了在人MASP-2單克隆抗體(OMS646)的存在或不存在下在凝集素途徑-特異性測定條件下MAC沉積的水準，證明OMS646抑制凝集素-介導的MAC沉積，IC_{50}值為大約1 nM，如實施例40中所述的；

[圖53B]圖示說明了在人MASP-2單克隆抗體(OMS646)的存在或不存在下在經典途徑-特異性測定條件下MAC沉積的水準，證明OMS646不抑制經典途徑-介導的MAC沉積，如實施例40中所述的；

[圖53C]圖示說明了在人MASP-2單克隆抗體(OMS646)的存在或不存在下在替代途徑-特異性測定條件下MAC沉積的水準，證明OMS646不抑制替代途徑-介導的MAC沉

積，如實施例40中所述的；

[圖54]圖示說明了在小鼠中人MASP-2單克隆抗體(OMS646)的藥代動力學(PK)概況，顯示OMS646濃度(平均值，n=3只動物/組)作為以指定劑量給予後時間的函數，如實施例40中所述的；

[圖55A]圖示說明了人MASP-2單克隆抗體(OMS646)的藥效學(PD)反應，作為在靜脈內給予後在小鼠中系統凝集素途徑活性的下降測量，如實施例40中所述的；

[圖55B]圖示說明了人MASP-2單克隆抗體(OMS646)的藥效學(PD)反應，作為在皮下給予後在小鼠中系統凝集素途徑活性的下降測量，如實施例40中所述的；

[圖56]圖示說明了與sCR1相比，MASP-2抗體(OMS646)對ADP-啟動的HMEC-1細胞上aHUS血清-誘導的C5b-9沉積的抑制作用，如實施例41中所述的；

[圖57]圖示說明了與sCR1相比，MASP-2抗體(OMS646)對ADP-啟動的HMEC-1細胞上aHUS血清-誘導的血栓形成的抑制作用，如實施例42中所述的；

[圖58]圖示說明了在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療後，在患有持續性造血幹細胞移植相關的血栓性微血管病(HSCT-TMA)的受試者中隨時間(周)從基線的血小板計數的平均變化，如實施例46所述的；

[圖59]圖示說明了在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療後，在患有持續性(HSCT-TMA)的受試者中隨時間(周)從基線的LDH的平均變化，如實施例46所述的；

[圖60]圖示說明了在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療後，在患有持續性(HSCT-TMA)的受試者中隨時間(周)從基線的結合珠蛋白的平均變化，如實施例46所述的；

[圖61]說明了患者在造血幹細胞移植(HSCT)後發生HSCT-TMA和移植物抗宿主病(GVHD)的臨床過程，證實了在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療後HSCT-TMA、GVHD的改善和神經學症狀的改善，如實施例47所述的；

[圖62A]圖示說明了隨時間進行，在同情使用患者#1中肌酸酐的水準，其中垂直線表示用MASP-2抑制性抗體(OMS646)開始治療，如實施例48所述的；

[圖62B]圖示說明了隨時間進行，在同情使用患者#1中結合珠蛋白的水準，其中垂直線表示用MASP-2抑制性抗體(OMS646)開始治療，如實施例48所述的；

[圖62C]圖示說明了隨時間進行，在同情使用患者#1中血紅蛋白的水準，其中垂直線表示用MASP-2抑制性抗體(OMS646)開始治療，如實施例48所述的；

[圖62D]圖示說明了隨時間進行，在同情使用患者#1中LDH的水準，其中垂直線表示用MASP-2抑制性抗體(OMS646)開始治療，如實施例48所述的；和

[圖62E]圖示說明了隨時間進行，在同情使用患者#1中血小板的水準，其中垂直線表示用MASP-2抑制性抗體(OMS646)開始治療，如實施例48所述的。

【實施方式】

序列表描述

SEQ ID NO:1 人MAp19 cDNA

SEQ ID NO:2 人MAp19蛋白(具有前導序列)

SEQ ID NO:3 人MAp19蛋白(成熟)

SEQ ID NO:4 人MASP-2 cDNA

SEQ ID NO:5 人MASP-2蛋白(具有前導序列)

SEQ ID NO:6 人MASP-2蛋白(成熟)

SEQ ID NO:7 人MASP-2 gDNA (外顯子1-6)

抗原：(參考MASP-2成熟蛋白)

SEQ ID NO:8 CUBI序列(aa 1-121)

SEQ ID NO:9 CUBEGF序列(aa 1-166)

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

SEQ ID NO:11 EGF區(aa 122-166)

SEQ ID NO:12 絲氨酸蛋白酶結構域(aa 429 – 671)

SEQ ID NO:13 無活性的絲氨酸蛋白酶結構域(aa 610-625，具有Ser618至Ala突變)

SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL (CUB1肽)

SEQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (CUBI肽)

SEQ ID NO:16 TFRSDYSN (MBL結合區核心)

SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL結合區)

SEQ ID NO:18 IDECQVAPG (EGF肽)

SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALV (絲氨酸蛋白酶結合核心)

肽抑制劑：

SEQ ID NO:20 MBL全長cDNA

SEQ ID NO:21 MBL全長蛋白

SEQ ID NO:22 OGK-X-GP (共有結合)

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 (人h-纖維膠凝蛋白)

SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (人纖維膠凝蛋白p35)

SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (C4裂解位點)

表達抑制劑：

SEQ ID NO:30 CUBI-EGF結構域的cDNA (SEQ ID NO:4的核苷酸22-680)

SEQ ID NO:31

5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3' SEQ ID NO:4的核苷酸12-45，包括MASP-2翻譯起始位點(有義)

SEQ ID NO:32

5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' SEQ ID NO:4的核苷酸361-396，編碼包括MASP-2 MBL結合位元點的區域(有義)

SEQ ID NO:33

5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3' SEQ ID NO:4的核苷酸610-642，編碼包括CUBII結構域的區域

克隆引物：

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

SEQ ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (的用於CUB3' PCR)

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

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

SEQ ID NOS:38-47是用於人源化的抗體的克隆引物

SEQ ID NO:48是9 aa肽鍵

表達載體：

SEQ ID NO:49是MASP-2微基因插入片段

SEQ ID NO: 50是鼠MASP-2 cDNA

SEQ ID NO: 51是鼠MASP-2蛋白(含前導序列)

SEQ ID NO: 52是成熟的鼠MASP-2蛋白

SEQ ID NO: 53是大鼠MASP-2 cDNA

SEQ ID NO: 54是大鼠MASP-2蛋白(含前導序列)

SEQ ID NO: 55是成熟的大鼠MASP-2蛋白

SEQ ID NO: 56-59是用於人MASP-2的定點誘變的寡核苷酸，其用於產生人MASP-2A

SEQ ID NO: 60-63是用於鼠MASP-2的定點誘變的寡核苷酸，其用於產生鼠MASP-2A

SEQ ID NO: 64-65是用於大鼠MASP-2的定點誘變的寡核苷酸，其用於產生大鼠MASP-2A

SEQ ID NO: 66編碼17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)重鏈可變區(VH) (不含信號肽)的DNA

SEQ ID NO: 67 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)重鏈可變區(VH)多肽

SEQ ID NO: 68 17N16mc重鏈可變區(VH)多肽

SEQ ID NO: 69:編碼17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)輕鏈可變區(VL)的DNA

SEQ ID NO: 70: 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646)輕鏈可變區(VL)多肽

SEQ ID NO: 71: 17N16_dc17N9輕鏈可變區(VL)多肽

詳細描述

本發明基於本發明人的出人意料的發現，即有可能抑制凝集素介導的MASP-2途徑，同時保留經典途徑完整。本發明還描述了MASP-2作為用於抑制與凝集素-介導的補體途徑活化有關的細胞損傷，同時保留免疫系統的經典(C1q-依賴性)途徑組分完整的治療靶標的用途。

I. 定義

除非本文明確定義，否則本文使用的所有術語具有與本發明技術領域的普通技術人員所理解的相同的含義。當術語用於說明書和權利要求書中以描述本發明時，為提供關於術語的清楚性，提供以下定義。

如本文所用的，術語“MASP-2-依賴性補體活化”包括凝集素途徑的MASP-2-依賴性活化，其在生理學條件下發生(即，在Ca^{++}存在的情況下)，導致形成凝集素途徑C3轉化酶C4b2a和在C3裂解產物C3b積聚時，隨後形成C5轉化酶C4b2a(C3b)n，其已經確定主要引起調理素作用。

如本文所用的，術語"替代途徑"是指補體活化，其例如通過來自真菌和酵母細胞壁的酵母聚糖、來自革蘭氏陰性細菌外膜的脂多糖(LPS)和兔紅細胞，以及許多純的多糖、兔紅細胞、病毒、細菌、動物腫瘤細胞、寄生蟲和受損的細胞觸發，並且其在傳統上被認為自補體因數C3自發蛋白水解產生C3b而產生。

如本文所用的，術語"凝集素途徑"是指補體活化，其經過血清和非-血清糖結合蛋白的特異性結合發生，所述

糖結合蛋白包括甘露聚糖-結合凝集素(MBL)、CL-11和纖維膠凝蛋白(H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白或L-纖維膠凝蛋白)。

如本文所用的，術語"經典途徑"是指補體活化，其通過與外來顆粒結合的抗體觸發並且需要結合識別分子C1q。

如本文所用的，術語"MASP-2抑制劑"是指與MASP-2結合或直接相互作用的任何試劑，其有效抑制MASP-2-依賴性補體活化，包括抗-MASP-2抗體和其MASP-2結合片段、天然和合成肽、小分子、可溶性MASP-2受體、表達抑制劑和分離的天然抑制劑，還包括與MASP-2競爭結合凝集素途徑中的另一識別分子(例如，MBL、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白或L-纖維膠凝蛋白)的肽，但不包括結合這樣的其它識別分子的抗體。可用於本發明的方法的MASP-2抑制劑可減少MASP-2-依賴性補體活化超過20%，例如超過50%，例如超過90%。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑減少MASP-2-依賴性補體活化超過90%(即，導致僅10%或更小的MASP-2補體活化)。

如本文所用的，術語"抗體"包括源自任何產生抗體的哺乳動物(例如，小鼠、大鼠、兔和靈長類動物包括人)或雜交瘤、噬菌體篩選、重組表達或轉基因動物(或產生抗體或抗體片段的其它方法)的抗體和其抗體片段，其特異性對結合靶多肽，例如MASP-2、多肽或其部分。術語“抗體”不意欲受限於抗體的來源或其製備方式(例如，通過雜

交瘤、噬菌體篩選、重組表達、轉基因動物、肽合成等)。示例性的抗體包括多克隆、單克隆和重組抗體；泛-特異性、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體、三特異性抗體)；人源化的抗體；鼠抗體；嵌合的小鼠-人、小鼠-靈長類動物、靈長類動物-人單克隆抗體；和抗-個體型抗體，和可以是任何完整的抗體或其片段。如本文所用的，術語“抗體”不僅包括完整的多克隆或單克隆抗體，而且包括其片段(例如dAb、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv)、單鏈(ScFv)、其合成變體、天然存在的變體、包括具有所需特異性的抗原-結合片段的抗體部分的融合蛋白、人源化的抗體、嵌合抗體和包括具有所需特異性的抗原-結合位點或片段(表位識別位點)的免疫球蛋白分子的任何其它修飾構型。

“單克隆抗體"是指同質抗體群，其中所述單克隆抗體包括參與表位的選擇性結合的胺基酸(天然存在和非天然存在的)。單克隆抗體對靶抗原具有高度特異性。術語"單克隆抗體"不僅包括完整的單克隆抗體和全長單克隆抗體，而且包括其片段(例如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv)、單鏈(ScFv)、其變體、包括抗原-結合部分的融合蛋白、人源化的單克隆抗體、嵌合的單克隆抗體和包括具有所需特異性和結合表位的能力的抗原-結合片段(表位識別位點)的免疫球蛋白分子的任何其它修飾構型。不意欲限制抗體的來源或其製備方式(例如，通過雜交瘤、噬菌體篩選、重組表達、轉基因動物等)。該術語包括完整的免疫球蛋白以及

上述在"抗體"的定義下的片段等。

如本文所用的，術語"抗體片段"是指源自全長抗體或與全長抗體有關的部分，例如抗-MASP-2抗體，通常包括其抗原結合區或可變區。抗體片段的說明性實例包括Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2和Fv片段、scFv片段、雙抗體、線性抗體、單鏈抗體分子和自抗體片段形成的多特異性抗體。

如本文所用的，"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包括抗體的VH和VL結構域，其中這些結構域存在於單一多肽鏈中。一般而言，Fv多肽還包括VH和VL結構域之間的多肽接頭，其能夠使scFv形成抗原結合所需的結構。

如本文所用的，"嵌合抗體"是包含源自非-人物種(例如，齧齒動物)抗體的可變結構域和互補決定區的重組蛋白，而抗體分子的其餘部分源自人抗體。

如本文所用的，"人源化的抗體"是嵌合抗體，其包括符合源自移植到人抗體框架中的非-人免疫球蛋白的特異性互補決定區的最小序列。人源化的抗體通常是重組蛋白，其中僅抗體互補決定區是非-人來源。

如本文所用的，術語"甘露聚糖-結合凝集素" ("MBL")等同於甘露聚糖-結合蛋白("MBP")。

如本文所用的，"膜攻擊複合物" ("MAC")是指插入到膜中並破壞膜的末端5種補體組分(C5b與C6、C7、C8和C-9組合)的複合物(亦稱為C5b-9)。

如本文所用的，"受試者"包括所有哺乳動物，包括而

不限於人、非-人靈長類動物、狗、貓、馬、綿羊、山羊、牛、兔、豬和齧齒動物。

如本文所用的，胺基酸殘基縮寫如下：丙氨酸(Ala;A)、天冬醯胺(Asn;N)、天冬氨酸(Asp;D)、精氨酸(Arg;R)、半胱氨酸(Cys;C)、谷氨酸(Glu;E)、穀氨醯胺(Gln;Q)、甘氨酸(Gly;G)、組氨酸(His;H)、異亮氨酸(Ile;I)、亮氨酸(Leu;L)、賴氨酸(Lys;K)、甲硫氨酸(Met;M)、苯丙氨酸(Phe;F)、脯氨酸(Pro;P)、絲氨酸(Ser;S)、蘇氨酸(Thr;T)、色氨酸(Trp;W)、酪氨酸(Tyr;Y)和纈氨酸(Val;V)。

在最廣泛的意義上，根據各個胺基酸的側鏈的化學性質，天然存在的胺基酸可分成多個組。"疏水"胺基酸是指Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val、Ala、Cys或Pro。"親水"胺基酸是指Gly、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、Arg或His。胺基酸的這種分組可進一步如下細分。"不帶電荷親水"胺基酸是指Ser、Thr、Asn或Gln。"酸性"胺基酸是指Glu或Asp。"鹼性"胺基酸是指Lys、Arg或His。

如本文所用的，術語"保守胺基酸置換"通過在以下各組內的胺基酸中置換來說明：(1)甘氨酸、丙氨酸、纈氨酸、亮氨酸和異亮氨酸；(2)苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸；(3)絲氨酸和蘇氨酸；(4)天冬氨酸和谷氨酸；(5)穀氨醯胺和天冬醯胺；和(6)賴氨酸、精氨酸和組氨酸。

如本文所用的術語"寡核苷酸"是指核糖核酸(RNA)或去氧核糖核酸(DNA)或其模擬物的寡聚體或多聚體。該術

語還涵蓋了包含天然存在的核苷酸、糖和共價核苷間(主鏈)鍵以及具有非天然存在的修飾的寡核苷酸的那些寡核苷城基。

如本文所用的，"表位"是指抗體所結合的蛋白(例如，人MASP-2蛋白)上的位點。"重疊表位"包括至少一個(例如，2、3、4、5或6個)共同胺基酸殘基，包括線性和非線性表位元。

如本文所用的，術語"多肽"、"肽"和"蛋白質"可互換使用，意指任何肽-連接的胺基酸鏈，無論長度或翻譯後修飾如何。本文所述的MASP-2蛋白可包含或可以是野生型蛋白，或可以是具有不超過50個(例如，不超過1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40或50個)保守胺基酸置換的變體。保守置換通常包括在以下組內的置換：甘氨酸和丙氨酸；纈氨酸、異亮氨酸和亮氨酸；天冬氨酸和谷氨酸；天冬醯胺、穀氨醯胺、絲氨酸和蘇氨酸；賴氨酸、組氨酸和精氨酸；和苯丙氨酸和酪氨酸。

在一些實施方案中，人MASP-2蛋白可具有這樣的胺基酸序列，其與具有SEQ ID NO: 5中所示的胺基酸序列的人MASP-2蛋白具有等於或大於70 (例如，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或100)%同一性。

在一些實施方案中，肽片段可以是至少6個(例如，至

少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500或600個或更多個)胺基酸殘基長度(例如，SEQ ID NO: 5的至少6個連續的胺基酸殘基)。在一些實施方案中，人MASP-2蛋白的抗原肽片段少於500個(例如，少於450、400、350、325、300、275、250、225、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7或6個)胺基酸殘基長度(例如，SEQ ID NOS: 5的任一個中少於500個連續的胺基酸殘基)。

百分比(%)胺基酸序列同一性定義為在比對序列和引入缺口(如果需要的話)以實現最大百分比序列同一性後，在候選序列中與參比序列中的胺基酸相同的胺基酸的百分比。為確定百分比序列同一性的目的，比對可以本領域技術內的各種方法實現，例如使用公眾可得的電腦軟體，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR)軟體。用於測量比對的合適參數，包括在待比

較的序列全長上實現最大比對所需的任何演算法，可通過已知的方法確定。

II. 發明概述

凝集素(MBL、M-纖維膠凝蛋白、H-纖維膠凝蛋白、L-纖維膠凝蛋白和CL-11)是觸發先天性補體系統的特異性識別分子，和該系統包括凝集素起始途徑和放大凝集素-引發的末端補體效應分子活化的相關末端途徑放大環。C1q是觸發獲得性補體系統的特異性識別分子，和該系統包括經典起始途徑和放大C1q-引發的末端補體效應分子活化的相關末端途徑放大環。我們分別稱這兩種主要補體活化系統為凝集素-依賴性補體系統和C1q-依賴性補體系統。

除了其在免疫防禦中的基本作用之外，補體系統還在許多臨床情況下有助於組織損傷。因此，對開發治療有效補體抑制劑以預防這些不良作用存在迫切需要。由於認識到有可能抑制凝集素介導的MASP-2途徑同時保留經典途徑完整，因此認識到特異性地僅抑制引起特定病理學的補體活化系統而不完全關閉補體的免疫防禦能力是特別需要的。例如，在其中補體活化主要由凝集素-依賴性補體系統介導的疾病狀態中，特異性地僅抑制該系統將是有利的。這將保持C1q-依賴性補體活化系統完整，以處理免疫複合物加工和有助於宿主防禦感染。

在特異性抑制凝集素-依賴性補體系統的治療劑的開

發中優選的靶向蛋白組分是MASP-2。在凝集素-依賴性補體系統的所有已知的蛋白組分(MBL、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白、L-纖維膠凝蛋白、MASP-2、C2-C9、因數B、因數D和備解素)中，僅MASP-2是凝集素-依賴性補體系統獨特的，並且是該系統行使功能所需要的。凝集素(MBL、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白、L-纖維膠凝蛋白和CL-11)也是凝集素-依賴性補體系統中的獨特組分。然而，所述凝集素組分的任一個的損失由於凝集素冗餘而將不必然抑制該系統的活化。抑制所有5種凝集素以保證凝集素-依賴性補體活化系統的抑制將是必要的。此外，因為還已知MBL和纖維膠凝蛋白具有不依賴於補體的調理素活性，所以凝集素功能的抑制將導致損失該有利的宿主防禦感染機制。相比之下，如果MASP-2是抑制性靶標的話，該補體-非依賴性凝集素調理素活性將保持完整。MASP-2作為抑制凝集素-依賴性補體活化系統的治療靶標的額外益處是MASP-2的血漿濃度是任何補體蛋白中最低的(大約500 ng/ml)；因此，相對低濃度的MASP-2高-親和力抑制劑可足以獲得完全抑制(Moller-Kristensen, M. 等，*J. Immunol Methods* 282:159-167, 2003)。

III. MASP-2在血栓性微血管病中的作用和使用masp-2抑制劑的治療方法

概述

血栓性微血管病(TMA)是一種特徵在於在小的血管中

的血凝塊的病理(Benz, K.等，*Curr Opin Nephrol Hypertens* 19(3):242–7 (2010))。認為對下面的血管內皮的應激或損傷是主要的驅動因素。TMA的臨床和實驗室發現包括血小板減少症、貧血、紫癜和腎衰竭。經典的TMA是溶血性尿毒綜合征(HUS)和血栓性血小板減少性紫癜(TTP)。TMA的特徵性基礎病理特徵是血小板活化和在小動脈和小靜脈中小血栓的形成。至少部分地通過對微血管內皮的損傷或應激引發的補體活化還牽涉到其它TMA，包括災難性抗磷脂綜合征(CAPS)、系統性德戈斯病以及癌症、癌症化學療法和移植繼發的TMA。

補體在腎炎宿主中的病理學作用的直接證據通過具有特定補體組分的遺傳缺陷的患者的研究來提供。許多報告證明了腎損傷與補體調節因數H的缺陷相關聯(Ault, B. H., *Nephrol.14*:1045-1053, 2000; Levy, M.等，*Kidney Int. 30*: 949-56, 1986; Pickering, M. C.等，*Nat. Genet. 31*:424-8, 2002)。因數H缺陷導致因數B和C3的低的血漿水準，這是由於這些組分的活化-相關的消耗導致。C5b-9的迴圈水準也在這些患者的血清中提高，意味著補體活化。膜增生性腎小球腎炎(MPGN)和特發性溶血性尿毒綜合征(HUS)與因數H缺陷或因數H突變有關。因數H-缺陷的豬(Jansen, J. H. 等，*Kidney Int. 53*:331-49, 1998)和因數-H敲除小鼠(Pickering, M. C., 2002)顯示MPGN-樣症狀，證實因數H在補體調節中的重要性。其它補體組分的缺陷與系統性紅斑狼瘡(SLE)的發生而繼發的腎疾病有關(Walport, M. J.,

Davies等，*Ann. N. Y. Acad. Sci. 815*:267-81, 1997)。C1q、C4和C2的缺陷通過涉及免疫複合物和細胞凋亡物質的不完全清除的機制強烈引起SLE的發生。在許多這些SLE患者中發生狼瘡腎炎，其特徵是在整個腎小球中免疫複合物的沉積。

aHUS

非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)是一組稱為"血栓性微血管病"的病況的一部分。在非典型形式的HUS (aHUS)中，疾病與不完全的補體調節有關，和可以是散發的或家族性的。aHUS的家族性病例與編碼補體活化或補體調節蛋白的基因突變有關，所述蛋白包括補體因數H、因數I、因數B、膜輔因數CD46以及補體因數H-相關蛋白1(CFHR1)和補體因數H-相關蛋白3 (CFHR3)。(Zipfel, P. F.等，*PloS Genetics 3*(3):e41 (2007))。與aHUS有關的該多種多樣的基因突變的統一特徵是在細胞或組織表面上提高的補體活化的傾向。因此，本發明的一個方面包括通過給予有效量的MASP-2抑制劑，治療患有與因數H缺陷有關的aHUS的患者。本發明的另一方面包括通過給予有效量的MASP-2抑制劑，治療患有與因數I、因數B、膜輔因數CD46、CFHR1或CFHR3缺陷有關的HUS的患者。

最近對在通過不同組突變補體因數引起的aHUS中作為增強的補體活化的基礎的分子病理生理學的理解已有顯著進展。該機制對於因數H突變有最佳理解。因數H是豐

富的血清蛋白，包括20個短的共有重複序列(SCR)結構域，其用作在溶液中以及在宿主細胞表面上補體活化的負調節劑。它靶向啟動形式的C3，並且與因數I和其它輔因數一起，促進其失活，阻止進一步的補體活化。為有效控制在宿主細胞表面上的補體活化，因數H需要與宿主細胞相互作用，這被SCR結構域16-20介導。迄今描述的與aHUS有關的所有因數H突變聚集在包括(SCR)結構域16-20的C-末端區。這些突變的因數H蛋白在控制在溶液中的C3活化中具有完全的功能，但不能與宿主細胞表面相互作用，因此不能在細胞表面上控制C3活化(Exp Med 204(6): 1249-56 (2007))。因此，因數H的某些突變與aHUS有關，這是因為突變的因數H蛋白不能與宿主細胞表面相互作用，因此不能有效下調在宿主細胞表面(包括微血管內皮)上的補體活化。結果，一旦出現初始C3活化，在微血管內皮表面上的隨後補體活化繼續進行，在具有因數H突變的患者中不減弱。該不受控制的補體活化最終導致對血管內皮的進行性損傷、隨後的血小板聚集和微血管凝血，和由RBC通過局部閉塞的微血管的完全應激引起的溶血。因此，aHUS疾病表現以及臨床和實驗室發現直接與在微血管內皮表面上的補體負調節的缺陷有關。

類似於因數H突變，在負補體調節劑因數I和膜輔因數蛋白(CD46)中的功能喪失性突變也與aHUS有關。對於因數B有相反的觀察結果，在aHUS中發現C3蛋白與這些蛋白的功能獲得性突變有關(Pediatr Nephrol 25(12):2431-42

(2010))。因此，在aHUS發病機理中許多彙聚的資料牽涉到補體活化。該觀念通過在治療aHUS中艾庫組單抗(阻斷末端補體蛋白C5的單克隆抗體)的治療功效得到最有說服力的支持。

儘管在aHUS中補體作為效應器機制的中心作用為廣泛公認的，但起始補體活化的觸發劑和涉及的分子途徑尚未確定。並非帶有上述突變的所有個體都發生aHUS。事實上，家族性研究已經表明，aHUS的外顯率僅為約50% (Ann Hum Genet 74(1):17-26 (2010))。疾病的自然史表明，在啟動事件(例如感染性發作或損傷)後aHUS最經常發生。啟動補體系統的感染試劑是眾所周知的。在缺少預存在的適應性免疫的情況下，通過感染試劑的補體活化可主要通過凝集素途徑開始。因此，感染觸發的凝集素途徑活化可代表用於在aHUS-易感個體中補體活化的後續病理性放大的起始觸發劑，這最終可導致疾病進展。因此，本發明的另一方面包括通過給予有效量的MASP-2抑制劑，治療患有感染繼發的aHUS的患者。

其它形式的宿主組織損傷將通過凝集素途徑啟動補體，特別是對血管內皮的損傷。易受氧化應激的人血管內皮細胞例如通過表達結合凝集素和啟動補體的凝集素途徑的表面部分而應答(Am J. Pathol 156(6):1549-56 (2000))。缺血/再灌注後的血管損傷也通過體內凝集素途徑啟動補體(Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005))。在該背景中凝集素途徑活化對宿主具有病理結果，和通過阻斷MASP-2

抑制凝集素途徑防止進一步的宿主組織損傷和不良結果(Schwaeble PNAS 2011)。

因此，促成aHUS的其它過程也已知啟動補體的凝集素途徑。因此，很可能的是，凝集素途徑可代表起始補體活化機制，其在遺傳上對aHUS易感的個體中以解除控制的方式被不適當地放大，因此起始aHUS發病機理。通過推論，阻斷通過凝集素途徑的補體活化的試劑，包括抗-MASP-2抗體，預期可在aHUS易感個體中預防疾病進展或減少加重。

在該概念的另一支持中，最近的研究已經在兒科aHUS病例中鑒定肺炎鏈球菌(*S. pneumonia)*作為重要的病原體(Nephrology (Carlton), 17:48-52 (2012); Pediatr Infect Dis J. 30(9):736-9 (2011))。該特定的病因學顯示具有不利的預後，具有顯著的死亡率和長期發病率。特別是，這些病例涉及非腸道感染，導致表現微血管病、尿毒癥和溶血，沒有證據表明同時存在的已知是aHUS病因的補體基因突變。重要的是應注意，肺炎鏈球菌在活化補體中特別有效，和其主要是通過凝集素途徑進行。因此，在與肺炎球菌感染有關的非腸道HUS的情況下，微血管病、尿毒癥和溶血的表現預期主要通過凝集素途徑的活化來驅動，並且阻斷凝集素途徑的試劑，包括抗-MASP-2抗體，預期預防aHUS的進展或減少在這些患者中的疾病嚴重性。因此，本發明的另一方面包括通過給予有效量的MASP-2抑制劑，治療患有與肺炎鏈球菌感染有關的非腸道aHUS的患

者。

根據前述內容，在一些實施方案中，在有風險發生與aHUS有關的腎衰竭的受試者的背景下，提供用於減少發生aHUS或發生與aHUS有關的腎衰竭的可能性的方法，包括給予一定量的MASP-2抑制劑一段時間，其有效改善或預防所述受試者的腎衰竭。在一些實施方案中，方法還包括在發生與aHUS有關的任何症狀之前確定受試者是否有發生aHUS的風險的步驟。在其它實施方案中，方法包括在發生指示aHUS的至少一個或多個症狀(例如，存在貧血、血小板減少症和/或腎功能不全)和/或在獲自所述受試者的活組織檢查中存在血栓性微血管病時，確定受試者是否有發生aHUS的風險。確定受試者是否有發生aHUS的風險包括確定所述受試者是否具有發生aHUS的遺傳素因，其可通過基因組測序或基因-特異性分析(例如，PCR分析)，評價遺傳信息(例如自包含所述受試者的基因型的資料庫)或對所述受試者進行至少一種遺傳篩查檢驗以確定存在或不存在與aHUS有關的遺傳標記(即，確定在編碼補體因數H (CFH)、因數I (CFI)、因數B (CFB)、膜輔因數CD46、C3、補體因數H-相關蛋白1 (CFHR1)或THBD (編碼抗凝血蛋白凝血調節蛋白)或補體因數H-相關蛋白3 (CFHR3)或補體因數H-相關蛋白4 (CFHR4)的基因中存在或不存在與aHUS有關的遺傳突變)來進行；和/或確定所述受試者是否具有aHUS家族史。對存在或不存在與aHUS有關的基因突變進行遺傳篩查的方法已經充分建立，例如參

見Noris M等“Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome,” 2007 Nov 16 [2011 Mar 10更新]，在：Pagon RA, Bird TD, Dolan CR等編輯，GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle。

例如，總的來說，在具有補體因數H (CFH)的突變的那些個體中疾病的外顯率是48%，和對於CD46突變的外顯率是53%，對於CFI的突變是50%，對於C3的突變是56%和對於THBD的突變是64% (Caprioli J.等，Blood, 108:1267-79 (2006); Noris等，Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59 (2010))。如Caprioli等，(2006)，同上，所述，大量具有補體因數H (CFH)突變的個體從未發生aHUS，並且假定在這些個體中在生理學條件下亞最佳CFH活性足以保護宿主免於補體活化的影響，然而，當對啟動補體的試劑的暴露產生高於正常量的C3b時，亞最佳CFH活性不足以阻止C3b沉積在血管內皮細胞上。

因此，在一個實施方案中，提供用於在患有或有風險發生非-因數H-依賴性非典型溶血性尿毒綜合征的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法，包括給予受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物。在另一實施方案中，提供用於在有風險發生因數H-依賴性非典型溶血性尿毒綜合征的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法，包括週期性地監測所述受試者，以確定存在或不存在貧血、血小板減少症或肌酐上升，和在確定存在貧血、血小板減少症或肌酐上升時用

MASP-2抑制劑進行治療。在另一實施方案中，提供用於減少有風險發生因數H-依賴性aHUS的受試者將遭受與aHUS有關的臨床症狀的可能性的方法，包括在已知與觸發aHUS臨床症狀有關的事件(例如，藥物暴露(例如，化學療法)、感染(例如，細菌感染)、惡性腫瘤、損傷、器官或組織移植或妊娠)之前或期間或之後給予MASP-2抑制劑。

在一個實施方案中，提供用於減少有風險發生aHUS的受試者將遭受與aHUS有關的臨床症狀的可能性的方法，包括週期性地監測所述受試者，以確定存在或不存在貧血、血小板減少症或肌酐升高，和在確定存在貧血、血小板減少症或肌酐升高時用MASP-2抑制劑進行治療。

在另一實施方案中，提供用於減少有風險發生aHUS的受試者將遭受與aHUS有關的臨床症狀的可能性的方法，包括在已知與觸發aHUS臨床症狀有關的事件(例如，藥物暴露(例如，化學療法)、感染(例如，細菌感染)、惡性腫瘤、損傷、器官或組織移植或妊娠)之前或期間或之後給予MASP-2抑制劑。

在一些實施方案中，在與觸發aHUS臨床症狀有關的事件之前、期間或之後，給予MASP-2抑制劑至少1天、2天、3天、4天或更長的一段時間，和可以由醫生確定重複進行，直到病況得到解決或被控制。在前-aHUS背景中，MASP-2抑制劑可經系統地給予至所述受試者性，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、經鼻、皮下或其它胃腸外給予。

在一些實施方案中，在初始診斷aHUS的背景中或在顯示與aHUS的診斷一致的一個或多個症狀(例如，存在貧血、血小板減少症和/或腎功能不全)的受試者中，所述受試者用有效量的MASP-2抑制劑(例如，抗-MASP-2抗體)作為第一線療法在不存在血漿去除術時或與血漿去除術組合進行治療。作為第一線療法，MASP-2抑制劑可經系統地給予至所述受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、經鼻、皮下或其它胃腸外給予。在一些實施方案中，在不存在血漿去除術以避免潛在的血漿去除術併發症包括出血、感染和暴露於血漿供體固有的病症和/或過敏反應時，或在另外不願意接受血漿去除術的受試者中，或在其中無法利用血漿去除術的背景中，將MASP-2抑制劑作為第一線療法給予至受試者。

在一些實施方案中，方法包括經過導管(例如，靜脈內)給予MASP-2抑制劑至患有aHUS的受試者持續第一時間段(例如，至少1天至1周或2周)，接著給予MASP-2抑制劑經皮下至所述受試者持續第二時間段(例如，至少2周或更長的慢性期)。在一些實施方案中，在第一和/或第二時間段的給藥在不存在血漿去除術時發生。在一些實施方案中，方法還包括在治療之前和任選在治療期間確定在所述受試者中至少1種補體因數(例如，C3、C5)的水準，其中確定與標準值或健康對照受試者相比至少1種補體因數的水準降低表明需要繼續用MASP-2抑制劑治療。

在一些實施方案中，方法包括靜脈內、肌內或優選皮

下給予MASP-2抑制劑，例如抗-MASP-2抗體至患有或有風險發生aHUS的受試者。治療可以是長期的，和每日至每月給予，但優選每兩周給予。抗-MASP-2抗體可單獨或與C5抑制劑例如艾庫組單抗組合給予。

HUS

與非典型HUS一樣，典型形式的HUS顯示TMA的所有臨床和實驗室結果。然而，典型HUS經常是兒科疾病，通常沒有家族性要素或與補體基因突變的直接關聯。典型HUS的病因與某些腸道病原體的感染緊密有關。患者通常呈現為急性腎衰竭、血紅蛋白尿和血小板減少症，通常接著發生血性腹瀉。該病況通過腸道感染痢疾志賀氏菌*(Shigella dissenteria)*、沙門氏菌或產生志賀菌毒素-樣的腸道出血大腸桿菌菌株例如大腸桿菌O157:H7而引起。所述病原體從污染的食物或供水獲得。HUS是醫學急症，具有5-10%死亡率。相當一部分的存活者發生慢性腎病(Corrigan和Boineau, *Pediatr Rev* 22 (11): 365–9 (2011))並可能需要腎移植。

在典型HUS中微血管凝血主要但不是唯一地發生在腎微血管系統。基礎病理生理學通過志賀菌毒素(STX)介導。通過腸病微生物分泌進入腸腔，STX穿過腸屏障，進入血流和通過blobotriaosyl神經醯胺受體CD77結合至血管內皮細胞(Boyd和Lingwood *Nephron* 51:207 (1989))，所述受體優選在腎小球內皮上表達和介導STX的毒性作用。一

旦與內皮結合，STX誘導破壞血管內皮的一系列事件，啟動白細胞和引起vWF-依賴性血栓形成(Forsyth等，*Lancet* 2: 411–414 (1989); Zoja等，*Kidney Int.* 62: 846–856 (2002); Zanchi等，*J. Immunol.* 181:1460–1469 (2008); Morigi等，*Blood* 98: 1828–1835 (2001); Guessou等，*Infect. Immun.*, 73: 8306–8316 (2005))。這些小血栓阻塞或閉塞腎和其它器官的小動脈和毛細血管。小動脈和毛細血管中通過小血栓的血流阻塞增加施用至RBC的剪切力，因為它們擠壓通過狹窄的血管。這可導致通過剪切力造成的RBC的破壞和形成稱為裂紅細胞的RBC碎片。裂紅細胞的存在是HUS的特徵性發現。這一機制已知為微血管病性溶血。另外，血流的阻塞導致缺血，引發補體-介導的炎性反應，這引起對受累的器官的另外損傷。

補體的凝集素途徑通過兩個原理機制促進HUS的發病機理：1) 由內皮損傷引起的MASP-2-介導的凝固級聯直接活化；和2) 由缺血引起的凝集素-介導的後續補體活化，所述缺血由微血管血流的初始阻塞引起。

STX損傷微血管內皮細胞，和已知損傷的內皮細胞啟動補體系統。如上文詳述的，內皮細胞損傷後的補體活化主要通過凝集素途徑驅動。易受氧化應激的人血管內皮細胞通過表達結合凝集素和啟動補體的凝集素途徑的表面部分而應答(Collard等，*Am J Pathol.* 156(5):1549-56 (2000))。缺血再灌注後的血管損傷還通過體內凝集素途徑啟動補體(Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005))。在該背景中凝集

素途徑活化具有對宿主的病理後果，和通過阻斷MASP-2抑制凝集素途徑防止進一步的宿主組織損傷和不良結果(Schwaeble等，*PNAS* (2011))。除了補體活化之外，MASP-2的凝集素-依賴性活化已經表明導致凝血酶原裂解形成凝血酶和促進凝血。因此，通過損傷的內皮細胞活化補體的凝集素途徑可直接啟動凝血系統。因此根據MASP-2-介導的凝血酶原活化，補體的凝集素途徑可能是連接STX導致的初始內皮損傷與在HUS中發生的凝血和微血管血栓形成的主要分子途徑。因此預期，凝集素途徑抑制劑，包括但不限於阻斷MASP-2功能的抗體，將防止或減輕在患有HUS的患者中微血管凝血、血栓形成和溶血。事實上，給予抗-MASP-2抗體顯著保護在典型HUS的模型中的小鼠。如實施例36所述和圖45所示的，暴露於STX和LPS的所有對照小鼠發生嚴重HUS和在48小時內變得瀕死或死亡。另一方面，如圖45中進一步顯示的，用抗-MASP-2抗體治療和然後暴露於STX和LPS的所有小鼠存活(Fisher準確檢驗 $p<0.01$；$N=5$)。因此，抗-MASP-2療法顯著保護在該HUS模型中的小鼠。預期給予MASP-2抑制劑例如MASP-2抗體將有效治療HUS患者和提供對由腸病性大腸桿菌或其它產生STX的病原體感染引起的微血管凝血、血栓形成和溶血的保護。

儘管此處顯示了對於STX引起的HUS，但預期抗-MASP-2療法也將有益於由於其它毒性劑引起的內皮損傷造成的HUS-樣綜合征。這包括試劑例如絲裂黴素、噻氯

匹定、cycplatin、奎寧、環孢黴素、博來黴素以及其它化學療法藥物和免疫抑制藥物。因此，預期抗-MASP-2抗體療法或抑制MASP-2活性的其它藥征將在HUS和其它TMA相關的疾病(即，aHUS和TTP)中有效預防或限制凝血、血栓形成和RBC破壞，和預防腎衰竭。

患有HUS的患者經常表現為腹瀉和嘔吐，它們的血小板計數通常減少(血小板減少症)和RBC減少(貧血)。前-HUS腹瀉期通常持續大約4天，在這期間有風險發生HUS的受試者通常顯示除了嚴重腹瀉之外的1個或多個以下症狀：血細胞比容水準低於30% (塗片表明血管內紅細胞破壞)、血小板減少症(血小板計數<150 x 10^3/mm^3)和/或存在腎功能受損(血清肌酐濃度大於年齡參比範圍的上限)。存在少無尿(尿排出≤0.5 mL/kg/h，達>1天)可用作向發生HUS進展的度量(參見C. Hickey等，*Arch Pediatr Adolesc Med* 165(10):884-889 (2011))。通常對於存在大腸桿菌細菌(大腸桿菌O157:H7)或志賀氏菌或沙門氏菌物種感染進行測試。在對腸原性大腸桿菌(例如，大腸桿菌0157:H7)感染測試陽性的受試者中，禁忌使用抗生素，因為使用抗生素可通過STX產生增加而增加發生HUS的風險(參見Wong C.等，*N Engl J. Med* 342:1930-1936 (2000)。對於志賀氏菌或沙門氏菌測試陽性的受試者，通常給予抗生素以清除感染。對HUS的其它充分建立的第一線療法包括容積擴張、透析和血漿去除術。

根據前述內容，在一些實施方案中，在患有與前-

HUS期有關的1個或多個症狀和有風險發生HUS的受試者(即，所述受試者顯示1個或多個以下症狀：腹瀉、血細胞比容水準低於30% (塗片顯示血管內紅細胞破壞)、血小板減少症(血小板計數小於150 x 10^3/mm^3)和/或存在腎功能受損(血清肌酐濃度大於年齡參比範圍的上限))的背景中，提供用於在所述受試者中降低發生HUS的風險或降低腎衰竭的可能性的方法，包括給予一定量的MASP-2抑制劑一段時間，其有效改善或預防腎功能受損。在一些實施方案中，給予MASP-2抑制劑至少1天、2天、3天、4天或更多天的一段時間，和可按醫生確定重複進行直到病況已經解決或被控制。在前-HUS背景中，MASP-2抑制劑可經系統地給予至所述受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、經鼻、口服、皮下或其它胃腸外給予。

用殺菌性抗生素特別是β-內醯胺治療大腸桿菌0157:H7感染，伴隨增加的發生HUS的風險(Smith等，Pediatr Infect Dis J 31(1):37-41 (2012)。在一些實施方案中，在患有與前-HUS期有關的症狀的受試者的背景中，其中所述受試者已知具有禁忌使用抗生素的腸原性大腸桿菌感染(例如，大腸桿菌0157:H7)，提供用於在所述受試者中降低發生HUS的風險或降低腎衰竭的可能性的方法，包括給予一定量的MASP-2抑制劑持續第一時間段，其有效抑制或預防在所述受試者中存在少無尿(例如，至少1、2、3或4天)，其中在第一時間段期間給予MASP-2抑制劑在不存在抗生素的情況下發生。在一些實施方案中，方法還包括

與抗生素組合給予MASP-2抑制劑至所述受試者第二時間段(例如至少1-2個周)。

在其它實施方案中，在遭受與前-HUS期有關的症狀的受試者的背景中，其中所述受試者已知具有志賀氏菌或沙門氏菌感染，提供用於在所述受試者中降低發生HUS的風險或降低腎衰竭的可能性的方法，包括給予一定量的MASP-2抑制劑一段時間，其有效抑制或預防在所述受試者中存在少無尿，其中給予MASP-2抑制劑在存在或不存在合適的抗生素的情況下進行。

在一些實施方案中，在初始診斷HUS的背景中或在顯示與HUS的診斷一致的1個或多個症狀(例如，存在腎衰竭、或在缺少低纖維蛋白原時的微血管病性溶血性貧血、或血小板減少症)的受試者中，所述受試者用有效量的MASP-2抑制劑(例如抗-MASP-2抗體)作為第一線療法在不存在血漿去除術時或與血漿去除術組合進行治療。作為第一線療法，MASP-2抑制劑可經系統地給予所述受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、經鼻、皮下或其它胃腸外給予。在一些實施方案中，在不存在血漿去除術以避免血漿去除術的併發症例如出血、感染和暴露於血漿供體中固有的病症和/或過敏反應時，或在另外不願意接受血漿去除術的受試者中，或在其中不可利用血漿去除術的背景中，將MASP-2抑制劑作為第一線療法給予受試者。

在一些實施方案中，方法包括通過導管(例如，靜脈

內)給予MASP-2抑制劑至患有HUS的受試者第一時間段(例如，持續至少1天至1周或2周的急性期)，接著皮下給予MASP-2抑制劑至所述受試者第二時間段(例如，至少2周或更長的慢性期)。在一些實施方案中，在第一和/或第二時間段期間的給藥在不存在血漿去除術時發生。在一些實施方案中，方法還包括在治療之前和任選在治療期間確定在所述受試者中至少一種補體因數(例如，C3、C5)的水準，其中確定與標準值或健康對照受試者相比至少一種補體因數的水準降低表明需要治療，和其中正常水準的確定表明改善。

在一些實施方案中，方法包括皮下或靜脈內給予MASP-2抑制劑例如抗-MASP-2抗體至患有或有風險發生HUS的受試者。治療優選每日進行，但頻率可低至每週或每月進行。治療將持續至少1周和多至3個月。抗-MASP-2抗體可單獨或與C5抑制劑例如艾庫組單抗組合給予。

TTP

血栓性血小板減少性紫癜(TTP)是一種有生命危險的血液凝固系統病症，其由啟動凝固級聯或補體系統的自身免疫或遺傳性功能障礙引起(George, JN, *N Engl J Med*; 354:1927-35 (2006))。這導致在全身的小血管中許多微觀血塊或血栓。紅細胞經受剪應力，其破壞它們的膜，導致血管內溶血。由此產生的血流減少和內皮損傷導致器官受損，包括腦、心臟和腎。TTP的臨床特徵為血小板減少

症、微血管病性溶血性貧血、神經改變、腎衰竭和發燒。在血漿交換前的時期，在急性發作期間死亡率為90%。甚至經過血漿交換，6個月時的存活率為大約80%。

TTP可自酶ADAMTS-13 (負責將血管假性血友病因數(vWF)的大的多聚體裂解為較小單元的金屬蛋白酶)的遺傳性或獲得性抑制產生。ADAMTS-13抑制或缺陷最終導致凝血增加(Tsai, H. *J Am Soc Nephrol* 14: 1072–1081, (2003))。ADAMTS-13調節vWF的活性；在其缺乏時，vWF形成大的多聚體，其更可能結合血小板並使患者易於在微血管中造成血小板聚集和血栓形成。

Upshaw-Schulman綜合征(USS，亦稱為先天性TTP)為由於ADAMTS13基因突變造成的ADAMTS13活性的先天性缺陷(Schulman等，*Blood,* 16(1):943-57, 1960; Upshaw等，*New Engl. J. Med,* 298 (24):1350-2, 1978)。在具有先天性TTP的個體中已經鑒定ADAMTS13的許多突變(Kinoshita等，*International Journal of Hematology*, 74:101-108 (2001); Levy等，*Nature,* 413 (6855):488-494 (2001); Kokame等，*PNAS* 99(18):11902-11907 (2002); Savasan等，*Blood*, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto等，*Blood*, 103: 1305-1310 (2004)和Fujimura等，*Brit. J. Haemat* 144: 742-754 (2008))。具有USS的受試者通常具有5-10%的正常ADAMTS13活性(Kokame等，*PNAS* 99(18):11902-11907, 2002)。儘管獲得性TTP和USS具有某些類似性，但USS在臨床特徵上具有一些重要的不同。USS通常出現在嬰兒或

兒童中，特徵為嚴重的血膽紅素過多，在出生後不久具有陰性Coombs試驗，對新鮮血漿輸注有反應，和頻繁復發(Savasan等，*Blood*, 101:4449-4451, 2003)。在一些病例中，具有該遺傳性ADAMTS13缺陷的患者在出生時具有輕度的表型，並在具有增加的血管假性血友病因數水準的臨床條件(例如感染或妊娠)下僅發生與TTP有關的症狀。例如，Fujimura等報告來自具有遺傳上確認的USS的6個家庭的9名日本女性，在她們首次妊娠期間經診斷患有該病症。血小板減少症發生在她們15次妊娠的每次的第二至第三個三個月期間，之後經常有TTP。發現所有這些女性嚴重缺乏ADAMTS13活性(Fujimura等，*Brit. J. Haemat* 144: 742-754, 2008)。

根據前述內容，在一些實施方案中，在具有Upshaw-Schulman綜合征(USS)的受試者的背景中(即，所述受試者已知缺乏ADAMTS13活性和/或所述受試者已知具有1個或多個ADAMTS13基因突變)，提供用於降低發生與先天性TTP有關的臨床症狀(例如，血小板減少症、貧血、發燒和/或腎衰竭)的可能性的方法，包括給予一定量的MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抗體)一段時間，其有效改善或預防與TTP有關的一個或多個臨床症狀。在一些實施方案中，方法還包括在出現與TTP有關的任何症狀之前或在出現至少1個或多個指示TTP的症狀(例如，存在貧血、血小板減少症和/或腎功能不全)時測定受試者是否有風險發生與先天性TTP有關的症狀的步驟。確定受試者是否有風險發生與

先天性TTP有關的症狀(即，所述受試者具有USS)，包括確定所述受試者是否具有在編碼ADAMTS13的基因中的突變和/或確定所述受試者是否缺乏ADAMTS13活性和/或確定所述受試者是否具有USS家族史。遺傳篩查存在或不存在與USS有關的基因突變的方法已充分建立，例如參見Kinoshita等，*International Journal of Hematology*, 74:101-108 (2001); Levy等，*Nature*, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame等，*PNAS* 99(18):11902-11907 (2002); Savasan等，*Blood*, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto等，*Blood*, 103:1305-1310 (2004)和Fujimura等，*Brit. J. Haemat* 144:742-754 (2008)。

在一個實施方案中，提供用於減少診斷具有USS的受試者將遭受與TTP有關的臨床症狀的可能性的方法，包括週期性地監測所述受試者以確定存在或不存在貧血、血小板減少症或肌酐升高，和在確定存在貧血、血小板減少症或肌酐升高時或在存在已知與觸發TTP臨床症狀有關的事件(例如，藥物暴露(例如，化學療法)、感染(例如細菌感染)、惡性腫瘤、損傷、移植或妊娠)時用MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抗體)進行治療。

在另一實施方案中，提供用於治療患有USS和遭受與TTP有關的臨床症狀的受試者的方法，包括給予一定量的MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抗體)一段時間，其有效改善或預防與TTP有關的一個或多個臨床症狀。

TTP也可由於針對ADAMTS-13的自身-抗體而發生。

另外，TTP可在乳腺癌、胃腸道癌或前列腺癌(George JN., *Oncology* (Williston Park). 25:908-14 (2011))、妊娠(第二個三個月或產後) (George JN., *Curr Opin Hematol* 10:339-344 (2003))期間發生，或與疾病例如HIV或自身免疫疾病例如系統性紅斑狼瘡有關(Hamasaki K，等，*Clin Rheumatol.* 22: 355-8 (2003))。TTP也可由某些藥物療法引起，包括肝素、奎寧、免疫介導的成分、癌症化學治療劑(博來黴素、順鉑、阿糖胞苷、柔紅黴素、吉西他濱、絲裂黴素C和他莫西芬)、環孢黴素A、口服避孕藥、盤尼西林、利福平和抗-血小板藥物，包括噻氯匹定和氯吡格雷(Azarm, T.等，*J Res Med Sci.*, 16: 353–357 (2011))。與TTP有關的其它因素或條件是毒素例如蜂毒、膿毒症、脾隔離症、移植、血管炎、血管手術和感染例如肺炎鏈球菌和細胞巨化病毒(Moake JL., *N Engl J Med.*, 347:589–600 (2002))。由於暫態功能性ADAMTS-13缺乏導致的TTP可因為與肺炎鏈球菌感染有關的內皮細胞損傷而發生(*Pediatr Nephrol.*, 26:631-5 (2011))。

血漿交換是TTP的標準治療(Rock GA，等，*N Engl J Med* 325:393-397 (1991))。血漿交換代替具有遺傳缺陷的患者的ADAMTS-13活性和除去在具有獲得性自身免疫TTP的那些患者中的ADAMTS-13自身抗體(Tsai, H-M, *Hematol Oncol Clin North Am.*, 21(4): 609–v (2007))。其它試劑例如免疫抑制藥物常規添加到療法中(George, JN, *N Engl J Med*, 354:1927-35 (2006))。然而，血漿交換對於大約20%的患

者並不成功，在超過三分之一的患者中出現復發，並且血漿去除術具有成本和技術上的要求。此外，許多患者不能耐受血漿交換。因此，對另外的和更好的TTP治療仍有緊迫的需要。

因為TTP是血液凝固級聯的病症，因此用補體系統的拮抗劑治療可有助於穩定和糾正疾病。儘管替代補體途徑的病理性活化與aHUS有關，但補體活化在TTP中的作用不是很清楚。ADAMTS13的功能缺乏對於TTP的易感性是重要的，然而其不足以引起急性發作。環境因素和/或其它遺傳改變可促進TTP的表現。例如，編碼參與調節凝固級聯、vWF、血小板功能、血管內皮表面的組分或補體系統的蛋白的基因可牽涉到急性血栓性微血管病的發生(Galbusera, M.等，*Haematologica*, 94: 166–170 (2009))。具體而言，補體活化已經顯示起關鍵作用；來自與ADAMTS-13缺乏有關的血栓性微血管病的血清已經顯示引起C3和MAC沉積，和隨後的中性粒細胞活化，其可被補體失活廢除(Ruiz-Torres MP，等，*Thromb Haemost*, 93: 443-52 (2005))。另外，最近顯示在TTP急性發作期間存在增加水準的C4d、C3bBbP和C3a (M. Réti等，*J Thromb Haemost.* Feb 28.(2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x. [Epub ahead of print])，與經典/凝集素和替代途徑的活化一致。在急性發作中該增加量的補體活化可引起末端途徑活化和導致進一步的TTP加重。

ADAMTS-13和vWF在TTP中的作用顯然是血小板活化

和聚集，和它們隨後在剪應力和微血管病的沉積中作用的原因。啟動的血小板與補體的經典和替代途徑相互作用，並觸發它們。血小板介導的補體活化增加炎性介質C3a和C5a (Peerschke E等，*Mol Immunol,* 47:2170-5 (2010))。因此，血小板可在遺傳性或自身免疫TTP中用作經典補體活化的靶標。

如上文所述，根據MASP-2介導的凝血酶原活化，補體的凝集素途徑是連接內皮損傷與HUS中發生的凝血和微血管血栓形成的主要分子途徑。類似地，補體的凝集素途徑的活化可直接驅動TTP中的凝血系統。凝集素途徑活化可回應由TTP中ADAMTS-13缺乏引起的初始內皮損傷而啟動。因此預期凝集素途徑抑制劑，包括但不限於阻斷MASP-2功能的抗體，將減輕在患有TTP的患者中與微血管凝血、血栓形成和溶血有關的微血管病。

患有TTP的患者在急診室中通常表現出1個或多個以下症狀：紫癜、腎衰竭、低血小板、貧血和/或血栓形成，包括中風。當前的TTP護理標準包括導管內遞送(例如，靜脈內或其它形式的導管)替換血漿去除術達2周或更長的一段時間，通常一週三次，但至多每日一次。如果所述受試者對存在ADAMTS13抑制劑(即，ADAMTS13的內源性抗體)測試陽性，則血漿去除術可與免疫抑制療法(例如，皮質類固醇、rituxan或環孢黴素)組合進行。具有難治性TTP的受試者(大約20%的TTP患者)對至少2周的血漿去除術療法沒有回應。

根據前述內容，在一個實施方案中，在初始診斷TTP的背景中或在顯示與TTP的診斷一致的1個或多個症狀(例如，中樞神經系統受累、嚴重的血小板減少症(如果沒有阿司匹林，血小板計數低於或等於5000/μL；如果存在阿司匹林，低於或等於20,000/μL)、嚴重的心臟受累、嚴重的肺受累、胃腸梗塞或壞疽)的受試者中，提供用有效量的MASP-2抑制劑(例如，抗-MASP-2抗體)作為第一線療法在不存在血漿去除術時或與血漿去除術組合治療所述受試者的方法。作為第一線療法，MASP-2抑制劑可經系統地給予所述受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、經鼻、皮下或其它胃腸外給予。在一些實施方案中，在不存在血漿去除術以避免血漿去除術的潛在併發症例如出血、感染和暴露於血漿供體中固有的病症和/或過敏反應時，或在另外不願意接受血漿去除術的受試者中，或在其中不可利用血漿去除術的背景中，將MASP-2抑制劑作為第一線療法給予受試者。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑與免疫抑制劑(例如，皮質類固醇、rituxan或環孢黴素)組合(包括共-給予)和/或與濃ADAMTS-13組合給予患有TTP的受試者。

在一些實施方案中，方法包括通過導管(例如，靜脈內)給予患有TTP的受試者MASP-2抑制劑第一時間段(例如，持續至少1天至1周或2周的急性期)，接著皮下給予MASP-2抑制劑至所述受試者第二時間段(例如，至少2周或更長的慢性期)。在一些實施方案中，在第一和/或第二

時間段期間的給藥在不存在血漿去除術時發生。在一些實施方案中，方法用於維持所述受試者，以防止所述受試者患有與TTP有關的一個或多個症狀。

在另一實施方案中，提供通過給予有效減少一個或多個TTP症狀的量的MASP-2抑制劑，治療患有難治性TTP的受試者(即，沒有回應至少2周的血漿除去療法的受試者)的方法。在一個實施方案中，長期(經過至少2周或更長的一段時間)通過皮下或其它胃腸外給藥，將MASP-2抑制劑(例如，抗-MASP-2抗體)給予具有難治性TTP的受試者。給藥可按醫生確定重複進行，直到病況已被解決或得到控制。

在一些實施方案中，方法還包括在治療之前和任選在治療期間確定在所述受試者中至少一種補體因數(例如，C3、C5)的水準，其中確定與標準值或健康對照受試者相比至少一種補體因數的水準降低指示需要繼續用MASP-2抑制劑治療。

在一些實施方案中，方法包括皮下或靜脈內給予MASP-2抑制劑例如抗-MASP-2抗體至患有或有風險發生TTP的受試者。治療優選每日進行，但頻率可低至兩週一次。繼續治療，直至所述受試者的血小板計數大於150,000/ml達至少連續兩天。抗-MASP-2抗體可單獨或與C5抑制劑例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體結合人MASP-2，KD為10

nM或更小；所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元；所述抗體在體外測定法中在1%人血清中抑制C3b沉積，IC50為10 nM或更小；所述抗體在90%人血清中抑制C3b沉積，IC50為30 nM或更小，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包括S228P突變，和/或其中所述抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制替代途徑。在一個實施方案中，抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑或替代途徑(即，抑制凝集素途徑，同時保留經典和替代補體途徑完整)。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體抑制在來自患有TTP的受試者的血清中血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體以比對血清中的C5b-9沉積的抑制作用高至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水準抑制在來自患有TTP的受試者的血清中血栓形成。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體抑制在來自TTP患者的血清中血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如

至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體通過靜脈內導管或其它導管遞送方法給予所述受試者。

在一個實施方案中，本發明提供在患有TTP的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括(I) (a) 重鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b) 輕鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3；或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述

抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67所示胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:70所示胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體OMS646識別的人MASP-2上的表位的至少一部分，所述參考抗體包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

德戈斯病

德戈斯病，亦稱為惡性萎縮性丘疹病，是一種非常罕見的TMA，其影響皮膚、胃腸道和CNS的小血管的內皮。這種血管病引起小靜脈和小動脈的阻塞，導致皮膚損傷、腸缺血和CNS病症，包括中風、癲癇和認知障礙。在皮膚中，由於小動脈的血栓性阻塞導致結締組織壞死。然而，德戈斯病的病因未知。牽涉到血管炎、凝血病或內皮細胞的基本功能障礙。德戈斯病具有僅2-3年的50%存活率。對德戈斯病沒有有效治療，儘管抗血小板藥物、抗凝劑和免疫抑制劑用於減輕症狀。

儘管德戈斯病的機制未知，但牽涉到補體途徑。Margo等鑒定了在四名德戈斯病末期患者的皮膚、胃腸道

和腦血管中主要的C5b-9沉積(Margo等，*Am J Clin Pathol* 135(4):599-610, 2011)。用艾庫組單抗的實驗性治療初始在治療皮膚和腸損傷中有效，但不預防系統性疾病的進展(參見Garrett-Bakelman F.等，“在德戈斯病的病理生理學中C5b-9是潛在的效應器；用艾庫組單抗治療的病例報告”(摘要)，Jerusalem: International Society of Hematology; 2010, Poster #156；和Polito J.等，“系統性德戈斯病(DD)或惡性萎縮性丘疹病(MAP)的早期檢測可增加存活率”(摘要)，San Antonio, TX: American College of Gastroenterology; 2010, Poster #1205)。

許多患有德戈斯病的患者具有血液凝固缺陷。在皮膚中小動脈的血栓性阻塞是該疾病的特徵。因為該疾病中牽涉到補體途徑，正如本文對於其它TMA所述的，預期凝集素途徑抑制劑，包括但不限於阻斷MASP-2功能的抗體，將有益於治療患有德戈斯病的患者。

因此，在另一實施方案中，本發明提供用於治療德戈斯病的方法，通過將在藥用載體中包含治療有效量的MASP-2抑制劑例如MASP-2抗體的組合物給予患有德戈斯病或由德戈斯病導致的病況的受試者。MASP-2抑制劑經系統性給予患有德戈斯病或由德戈斯病導致的病況的所述受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、皮下或其它胃腸外給予，或可能通過口服給予非-肽能藥。抗-MASP-2抗體可單獨或與C5抑制劑例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體結合人MASP-2，KD為10 nM或更小；所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元；所述抗體抑制在體外測定法中在1%人血清中C3b沉積，IC50為10 nM或更小；所述抗體抑制在90%人血清中C3b沉積，IC50為30 nM或更小，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包括S228P突變，和/或其中所述抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制替代途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑或替代途徑(即，抑制凝集素途徑，同時保留經典和替代補體途徑完整)。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體抑制在來自患有德戈斯病的受試者的血清中血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體以比對血清中C5b-9沉積的抑制作用高至少20%或更高(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水準抑制在來自患有德戈斯病的受試者的血清中血栓形成。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體抑制在來自德戈斯病患者的血清中血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，通過靜脈內導管或其它導管遞送方法將MASP-2抑制性抗體給予所述受試者。

在一個實施方案中，本發明提供在患有德戈斯病的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括(I) (a) 重鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b) 輕鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3；或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少

98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體OMS646識別的人MASP-2上的表位的至少一部分，所述參考抗體包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

災難性抗磷脂綜合征(CAPS)

災難性抗磷脂綜合征(CAPS)是抗磷脂抗體(APLA)綜合征的極端變體。CAPS的特徵是由於病原性抗體導致的靜脈和動脈血栓形成。CAPS是具有多器官血栓形成、缺血和器官衰竭的TMA。像其它TMA一樣，在各種器官中小血管的阻塞是特徵性的。在CAPS中存在大約50%的高死亡率，其往往與感染或創傷有關。患者具有抗磷脂抗體，通常為IgG。

在臨床上，CAPS累及具有小血管阻塞的組織病理學

證據的至少三種器官或組織。周圍血栓形成可累及CNS、心血管、腎或肺系統的靜脈和動脈。患者用抗生素、抗凝劑、皮質類固醇、血漿交換和靜脈內免疫球蛋白治療。然而，死亡可由多器官衰竭導致。

在CAPS中牽涉到補體途徑。例如，在動物模型中的研究表明，補體抑制可能是預防與CAPS有關的血栓形成的有效方式(Shapira L.等，Arthritis Rheum 64(8):2719-23, 2012)。此外，如Shapira等進一步報告的，以阻斷補體途徑的劑量給予患有CAPS的受試者艾庫組單抗抑制急性進行性血栓事件和反轉血小板減少症(亦參見Lim W., *Curr Opin Hematol* 18(5):361-5, 2011)。因此，如本文對其它TMA所述的，預期凝集素途徑抑制劑，包括但不限於阻斷MASP-2功能的抗體，將有益於治療患有CAPS的患者。

因此，在另一實施方案中，本發明提供通過給予患有CAPS或由CAPS導致的病況的受試者在藥用載體中包含治療有效量的MASP-2抑制劑例如MASP-2抗體的組合物，治療CAPS的方法。MASP-2抑制劑經系統性給予患有CAPS或由CAPS導致的病況的所述受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、皮下或其它胃腸外給予，或可能通過口服給予非-肽能藥。抗-MASP-2抗體可單獨或與C5抑制劑例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體結合人MASP-2，KD為10 nM或更小；所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域的表位

元；所述抗體在體外測定法中在1%人血清中抑制C3b沉積，IC50為10 nM或更小；所述抗體在90%人血清中抑制C3b沉積，IC50為30 nM或更小，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包括S228P突變，和/或其中所述抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制替代途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑或替代途徑(即，抑制凝集素途徑同時保留經典和替代補體途徑完整)。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體在來自患有CAPS的受試者的血清中抑制血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體以比對血清中的C5b-9沉積的抑制作用高至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水準在來自患有CAPS的受試者的血清中抑制血栓形成。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體在來自CAPS患者的血清中抑制血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例

如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，通過靜脈內導管或其它導管遞送方法將MASP-2抑制性抗體給予所述受試者。

在一個實施方案中，本發明提供在患有CAPS的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括(I) (a) 重鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b) 輕鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3；或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述

抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包括MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體OMS646識別的人MASP-2上的表位的至少一部分，包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

癌症繼發性TMA

任何類型的系統性惡性腫瘤可導致TMA的臨床和病理表現(參見例如，Batts和Lazarus, *Bone Marrow Transplantation* 40:709-719, 2007)。癌症相關的TMA經常在肺中發現，和顯示與腫瘤栓子有關(Francis KK等，*Commun Oncol* 2:339-43, 2005)。腫瘤栓子可減少血流和因此導致受累小動脈和小靜脈的低灌注狀態。由此產生的組織應激和損傷預期以局部的方式啟動補體的凝集素途徑。啟動的凝集素途徑進而可通過MASP-2依賴性裂解凝血酶原為凝血酶而啟動凝固級聯，導致TMA特有的前-血栓性狀態。預期在該背景中MASP-2抑制減少凝血酶的局部活化和因此減輕前-血栓性狀態。

因此，如本文對其它TMA所述的，預期凝集素途徑抑

制劑，包括但不限於阻斷MASP-2功能的抗體，將有益於治療患有癌症繼發性TMA的患者。

因此，在另一實施方案中，本發明提供通過給予患有或有風險發生癌症繼發性TMA的受試者在藥用載體中包含治療有效量的MASP-2抑制劑例如MASP-2抗體的組合物，治療或預防癌症繼發性TMA的方法。MASP-2抑制劑經系統性給予患有或有風險發生癌症繼發性TMA的所述受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、皮下或其它胃腸外給予，或可能通過口服給予非-肽能藥。抗-MASP-2抗體可單獨或與C5抑制劑例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體結合人MASP-2，KD為10 nM或更小；所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域的表位元；所述抗體在體外測定法中在1%人血清中抑制C3b沉積，IC50為10 nM或更小；所述抗體在90%人血清中抑制C3b沉積，IC50為30 nM或更小，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包括S228P突變，和/或其中所述抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制替代途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑或替代途徑(即，抑制凝集素途徑

同時保留經典和替代補體途徑完整)。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體在來自患有癌症繼發性TMA的受試者的血清中抑制血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體在來自患有癌症繼發性TMA的患者的血清中抑制血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，通過靜脈內導管或其它導管遞送方法將MASP-2抑制性抗體給予所述受試者。

在一個實施方案中，本發明提供在患有癌症繼發性TMA的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括(I) (a) 重鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b) 輕鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列

的輕鏈CDR-L3；或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包括MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體OMS646識別的人MASP-2上的表位的至少一部分，包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

癌症化學療法繼發性TMA

化學療法-相關的TMA是一種涉及血小板減少症、微血管病性溶血性貧血和腎功能不全的病況，其發生在2-10%的具有用化學治療劑例如吉西他濱、絲裂黴素、奧沙

利鉑等治療的惡性腫瘤歷史的患者中。化學療法–相關的TMA與高的死亡率、差的臨床結果有關(參見例如，Blake-Haskins等，*Clin Cancer Res* 17(18):5858-5866, 2011)。

認為化學療法-相關的TMA的病因包括對微血管內皮的非-特異性的毒性損傷。在絲裂黴素-誘導的TMA的動物模型中已經顯示對內皮細胞的直接損傷(Dlott J.等，*Ther Apher Dial* 8:102–11, 2004)。已經顯示通過各種機制的內皮細胞損傷啟動補體的凝集素途徑。例如，Stahl等已經表明，暴露於氧化應激的內皮細胞在體內和體外啟動補體的凝集素途徑(Collard等，*Am J Pathol.* 156(5):1549-56, 2000; La Bonte等，*J Immunol.* 15;188(2):885-91, 2012)。在體內，該過程導致血栓形成，和已經表明凝集素途徑的抑制預防血栓形成(La Bonte等*J Immunol.* 15;188(2):885-91, 2012)。此外，如本文實施例37-39所證實的，在其中FITC-Dex的局部光致激發用於誘導對微血管的局部損傷，隨後發生TMA應答的TMA的小鼠模型中，本發明人已證明MASP-2的抑制可預防TMA。因此，通過化學治療劑的微血管內皮損傷可啟動補體的凝集素途徑，其然後產生局部的前-血栓性狀態和促進TMA應答。因為凝集素途徑的活化和前-血栓性狀態的產生是MASP-2-依賴性的，所以預期MASP-2抑制劑，包括但不限於阻斷MASP-2功能的抗體，將減輕TMA應答和降低癌症化學療法-相關的TMA的風險。

因此，在另一實施方案中，本發明提供通過給予患有

或有風險發生化學療法繼發性TMA的受試者在藥用載體中包含治療有效量的MASP-2抑制劑例如MASP-2抗體的組合物，治療或預防化學療法繼發性TMA的方法。MASP-2抑制劑經系統性給予已經經歷、正在經歷或將經歷化學療法的受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、皮下或其它胃腸外給予，或可能通過口服給予非-肽能藥。抗-MASP-2抗體可單獨或與C5抑制劑例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體結合人MASP-2，KD為10 nM或更小；所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域的表位元；所述抗體在體外測定法中在1%人血清中抑制C3b沉積，IC50為10 nM或更小；所述抗體在90%人血清中抑制C3b沉積，IC50為30 nM或更小，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包括S228P突變，和/或其中所述抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制替代途徑。在一個實施方案中，所述抗體結MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑或替代途徑(即，抑制凝集素途徑同時保留經典和替代補體途徑完整)。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2

抑制性抗體在來自患有癌症化學療法繼發性TMA的受試者的血清中抑制血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體在來自患有癌症化學療法繼發性TMA的患者的血清中抑制血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，通過靜脈內導管或其它導管遞送方法將MASP-2抑制性抗體給予所述受試者。

在一個實施方案中，本發明提供在患有癌症化學療法繼發性TMA的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括(I) (a) 重鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b) 輕鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3；或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至

少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包括MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體OMS646識別的人MASP-2上的表位的至少一部分，包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

移植繼發性TMA

移植-相關的TMA (TA-TMA)是一種破壞性的綜合征，其可發生在移植物患者中，例如同種異體造血幹細胞移植物受體(參見例如，Batts和Lazarus, *Bone Marrow Transplantation* 40:709-719, 2007)。該病況的發病機理知之甚少，但可能

涉及最終導致內皮細胞損傷的反應匯合(Laskin B. L.等，*Blood* 118(6):1452-62, 2011)。如上文所述，內皮細胞損傷是對於凝集素途徑活化和前-血栓性環境的產生的一種原型刺激。

最近的資料進一步支援通過凝集素途徑的補體活化在TA-TMA發病機理中的作用。Laskin等已經證實，與對照相比(8%)，腎小動脈C4d沉積在具有組織學TA-TMA的受試者中更加常見(75%) (Laskin B. L.等，*Transplanatation*, 27; 96(2):217-23, 2013)。因此，C4d可能是TA-TMA的病理標誌物，其牽涉到通過凝集素或經典途徑的局部補體固定。

因為凝集素途徑的活化和前-血栓性狀態的產生是MASP-2-依賴性的，因此預期MASP-2抑制劑，包括但不限於阻斷MASP-2功能的抗體，將減輕TMA反應和降低移植-相關的TMA (TA-TMA)的風險。

因此，在另一實施方案中，本發明提供通過給予患有或有風險發生移植繼發性TMA的受試者在藥用載體中包含治療有效量的MASP-2抑制劑例如MASP-2抗體的組合物，治療或預防移植繼發性TMA的方法。MASP-2抑制劑經系統性給予已經經歷、正在經歷或將經歷移植程式的受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、皮下或其它胃腸外給予，或可能通過口服給予非-肽能藥。抗-MASP-2抗體可單獨或與C5抑制劑例如艾庫組單抗組合給予。在一些實施方案中，本發明提供治療或預防同種異體幹細胞移

植繼發性TMA的方法，包括在經歷同種異體幹細胞移植之前、期間或之後給予受試者包含一定量的MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體的組合物。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體結合人MASP-2，KD為10 nM或更小；所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域的表位元；所述抗體在體外測定法中在1%人血清中抑制C3b沉積，IC50為10 nM或更小；所述抗體在90%人血清中抑制C3b沉積，IC50為30 nM或更小，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包括S228P突變，和/或其中所述抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制替代途徑。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑或替代途徑(即，抑制凝集素途徑同時保留經典和替代補體途徑完整)。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體在來自患有移植繼發性TMA的受試者的血清中抑制血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2

抑制性抗體在來自患有移植繼發性TMA的患者的血清中抑制血栓形成達至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。

在一個實施方案中，通過靜脈內導管或其它導管遞送方法將MASP-2抑制性抗體給予所述受試者。

在一個實施方案中，本發明提供在患有移植繼發性TMA的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括(I) (a) 重鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b) 輕鏈可變區，包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3；或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包括MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體OMS646識別的人MASP-2上的表位的至少一部分，包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

IV. MASP-2在其它疾病和病況中的作用和使用masp-2抑制劑的治療方法

腎病況

在各種腎疾病的發病機理中涉及到補體系統的活化；包括系膜增生性腎小球腎炎(IgA-腎病、貝格爾氏病)(Endo, M.等，*Clin. Nephrology 55*:185-191, 2001)、膜腎小球腎炎(Kerjashki, D., *Arch B Cell Pathol. 58*:253-71, 1990; Brenchley, P. E.等，*Kidney Int., 41*:933-7, 1992; Salant, D. J.等，*Kidney Int. 35*:976-84, 1989)、膜增生性腎小球腎炎(系膜毛細管腎小球腎炎) (Bartlow, B. G.等，*Kidney Int. 15*:294-300, 1979; Meri, S.等，*J. Exp. Med. 175*:939-50,

1992)、急性感染後腎小球腎炎(鏈球菌後腎小球腎炎)、冷球蛋白血症性腎小球腎炎(Ohsawa, I.等，*Clin Immunol. 101*:59-66, 2001)、狼瘡腎炎(Gatenby, P. A., *Autoimmunity 11*:61-6, 1991)和Henoch-Schonlein紫癜腎炎(Endo, M.等，*Am. J. Kidney Dis. 35*:401-407, 2000)。已經意識到補體參與腎疾病數十年，但對其在腎疾病的發作、發展和消退期中的準確作用仍存在較多討論。在正常條件下，補體的貢獻有益於宿主，但補體的不適當活化和沉積可促進組織損傷。

存在大量證據表明，腎小球腎炎，腎小球的炎症，經常通過免疫複合物沉積到腎小球或管結構上起始，其然後觸發補體活化、炎症和組織損傷。Kahn和Sinniah證實在取自具有各種形式的腎小球腎炎的患者的活檢中C5b-9在管基底膜上的沉積增加(Kahn, T. N.等，*Histopath. 26*:351-6, 1995)。在具有IgA腎病的患者的研究中(Alexopoulos, A.等，*Nephrol. Dial. Transplant10*:1166-1172, 1995)，C5b-9在管上皮/基底膜結構中的沉積與血漿肌酐水準相關。另一膜腎病的研究證實臨床結果和尿sC5b-9水準之間的關係(Kon, S. P.等，*Kidney Int. 48*:1953-58, 1995)。sC5b-9水準升高與預後差正相關。Lehto等測量了CD59 (抑制質膜中的膜攻擊複合物的補體調節因數)以及在來自具有膜腎小球腎炎的患者的尿中的C5b-9的升高水準(Lehto, T.等，*Kidney Int. 47*:1403-11, 1995)。取自這些相同的患者的活檢樣品的組織病理學分析證實在腎小球中C3和C9蛋白的

沉積，而與正常的腎組織相比，CD59在這些組織中的表達減少。這些各種研究表明，進行性的補體-介導的腎小球腎炎導致補體蛋白的尿排泄，其與組織損傷的程度和疾病預後相關。

在腎小球腎炎的各種動物模型中補體活化的抑制還證實了補體活化在疾病病因中的重要性。在膜增生性腎小球腎炎(MPGN)的模型中，與C6+正常大鼠相比，在C6-缺陷大鼠(其不能形成C5b-9)中輸注抗-Thy1抗血清導致腎小球細胞增殖減少90%、血小板和巨噬細胞侵潤減少80%、膠原IV型(腎小球系膜基質擴張的標誌物)合成減少、和蛋白尿減少50% (Brandt, J.等，*Kidney Int. 49*:335-343, 1996)。這些結果暗示在該大鼠抗-胸腺細胞血清模型中C5b-9作為補體導致的組織損傷的主要介質。在另一腎小球腎炎模型中，輸注分級劑量的兔抗-大鼠腎小球基底膜產生多形核白細胞(PMN)的劑量-依賴性流入，其被先前用眼鏡蛇毒因數的治療(以消耗補體)減弱(Scandrett, A. L.等，*Am. J. Physiol. 268*:F256-F265, 1995)。眼鏡蛇毒因數-治療的大鼠還顯示相比對照大鼠，組織病理減少，長期蛋白尿降低，和更低的肌酐水準。使用三個大鼠GN模型(抗-胸腺細胞血清、Con A抗-Con A和被動Heymann腎炎)，Couser等證實通過使用重組sCR1蛋白抑制補體的方法的潛在治療功效(Couser, W. G.等，*J. Am. Soc. Nephrol. 5*:1888-94, 1995)。用sCR1治療的大鼠顯示相比對照大鼠，PMN、血小板和巨噬細胞流入顯著減少，系膜溶解和蛋白質尿減少。對補體

活化在腎小球腎炎中的重要性的進一步證據通過在NZB/W F1小鼠模型中使用抗-C5 MoAb提供。抗-C5 MoAb抑制C5的裂解，因此阻斷C5a和C5b-9的產生。用抗-C5 MoAb繼續治療6個月導致腎小球腎炎的病程顯著改善。人源化的抗-C5 MoAb單克隆抗體(5G1.1)，其防止人補體組分C5裂解成其促-炎性組分，作為腎小球腎炎的潛在治療，正處於Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut的開發中。

補體在腎損傷中的病理學作用的直接證據通過研究具有特定補體組分的遺傳缺陷的患者來提供。許多報告記載了腎疾病與補體調節因數H的缺陷有關(Ault, B. H., *Nephrol.14*:1045-1053, 2000; Levy, M.，等，*Kidney Int. 30*:949-56, 1986; Pickering, M.C.，等，*Nat. Genet. 31*:424-8, 2002)。因數H缺陷導致因數B和C3的低的血漿水準和C5b-9的消耗。非典型膜增生性腎小球腎炎(MPGN)和特發性溶血性尿毒綜合征(HUS)兩者均與因數H缺陷有關。因數H缺陷型豬(Jansen, J. H.，等，*Kidney Int. 53*:331-49, 1998)和因數H敲除小鼠(Pickering, M. C., 2002)顯示MPGN-樣症狀，證實因數H在補體調節中的重要性。其它補體組分的缺乏與系統性紅斑狼瘡(SLE)的發生繼發的腎疾病有關(Walport, M. J., Davies，等，*Ann. N. Y. Acad. Sci. 815*:267-81, 1997)。通過涉及免疫複合物和細胞凋亡物質的不完全清除的機制，C1q、C4和C2的缺乏強烈易於發生SLE。在許多這些SLE患者中發生狼瘡腎炎，其特徵為免疫複合物

的沉積在整個腎小球上。

關聯補體活化和腎疾病的進一步證據通過鑒定具有針對補體組分的自身抗體的患者來提供，所述補體組分的一些與腎疾病直接相關(Trouw, L. A.，等，*Mol. Immunol. 38*:199-206, 2001)。許多這些自身抗體顯示與腎疾病的高度相關性，以致術語腎炎因數(NeF)被引入以表示該活性。在臨床研究中大約50%的腎炎因數陽性的患者發生MPGN (Spitzer, R. E.，等，*Clin. Immunol. Immunopathol. 64*:177-83, 1992)。C3NeF是針對替代途徑C3轉化酶(C3bBb)的自身抗體並且它穩定該轉化酶，從而促進替代途徑活化(Daha, M. R.，等，*J. Immunol. 116*:1-7, 1976)。同樣，對經典途徑C3轉化酶(C4b2a)具有特異性的自身抗體，稱為C4NeF，穩定該轉化酶，從而促進經典途徑活化(Daha, M. R.等，*J. Immunol. 125*:2051-2054, 1980; Halbwachs, L.，等，*J. Clin. Invest. 65*:1249-56, 1980)。已經描述抗-C1q自身抗體與SLE患者的腎炎相關(Hovath, L.，等，*Clin. Exp. Rheumatol. 19*:667-72, 2001; Siegert, C.，等，*J. Rheumatol. 18*:230-34, 1991; Siegert, C.，等，*Clin. Exp. Rheumatol. 10*:19-23, 1992)，並且這些抗-C1q自身抗體的滴度升高據報導預測腎炎發生(Coremans, I. E.等，*Am. J. Kidney Dis. 26*:595-601, 1995)。自SLE患者的屍檢腎洗脫的免疫沉積物揭示，這些抗-C1q自身抗體的積聚(Mannick, M.，等，*Arthritis Rheumatol. 40*:1504-11, 1997)。所有這些事實指向這些自身抗體的病理學作用。然而，並

非所有具有抗-C1q自身抗體的患者發生腎疾病，而且，一些健康個體具有低滴度的抗-C1q自身抗體(Siegert, C. E.，等，*Clin. Immunol. Immunopathol. 67*:204-9, 1993)。

除了補體活化的替代和經典途徑之外，凝集素途徑也可在腎疾病中具有重要的病理學作用。MBL、MBL-相關的絲氨酸蛋白酶和補體活化產物的水準升高通過免疫組織化學技術對獲自診斷具有幾種不同腎疾病包括Henoch-Schonlein紫癜腎炎(Endo, M.，等，*Am. J. Kidney Dis. 35*:401-407, 2000)、冷球蛋白血症性腎小球腎炎(Ohsawa, I.，等，*Clin. Immunol. 101*:59-66, 2001)和IgA腎病(Endo, M.，等，*Clin. Nephrology 55*:185-191, 2001)的患者的腎活檢材料進行檢測。因此，儘管補體和腎疾病之間的相關性已經知道幾十年的事實，但關於補體如何準確影響這些腎疾病的資料遠不完善。

血液病症

膿毒症由患者對侵入的微生物的壓倒性反應引起。補體系統的主要功能是協調對侵入的細菌和其它病原體的炎性反應。與該生理學作用一致，許多研究中已經證明補體活化在膿毒症的發病機理中具有重要作用(Bone, R. C., *Annals. Internal. Med. 115*:457-469, 1991)。膿毒症的臨床表現的定義在不斷地發展。膿毒症通常定義為對感染的系統性宿主反應。然而，在許多場合，在具有膿毒性症狀的患者中沒有發現感染的臨床證據(例如，陽性細菌血液培

養物)。這種偏差首次在1992年的Consensus Conference中當術語"系統性炎性反應綜合征" (SIRS)建立時提出，並且對於該綜合征無需確定存在細菌感染(Bone, R. C.，等，*Crit. Care Med. 20*:724-726, 1992)。現在廣泛認同膿毒症和SIRS伴隨不能調節炎性反應。為了簡單論述的目的，我們考慮膿毒症的臨床定義還包括嚴重膿毒症、感染性休克和SIRS。

在20世紀80年代後期之前，在膿毒性患者中感染的主要來源是革蘭氏陰性細菌。脂多糖(LPS)，革蘭氏陰性細菌細胞壁的主要組分，已知當注入動物時，刺激來自各種細胞類型的炎性介質釋放和誘導急性感染性症狀(Haeney, M. R.等，*Antmicrobial Chemotherapy 41*(增刊A):41-6, 1998)。引人關注的是，致病的微生物譜似乎從20世紀70年代後期和80年代主要的革蘭氏陰性細菌變化至目前主要的革蘭氏陽性細菌，原因目前尚不清楚(Martin, G. S.等，*N. Eng. J. Med. 348*:1546-54, 2003)。

許多研究證明，補體活化在介導炎症和促進休克(特別是膿毒性和出血性休克)的特徵中的重要性。革蘭氏陰性和革蘭氏陽性微生物通常都促進感染性休克。LPS是有效的補體活化劑，主要通過替代途徑，儘管也出現抗體介導的經典途徑活化(Fearon, D. T.等，*N. Engl. J. Med. 292*:937-400, 1975)。革蘭氏陽性細胞壁的主要組分是肽聚糖和脂磷壁酸，這兩種組分是有效的替代補體途徑活化劑，儘管在存在特異性抗體時它們也可啟動經典補體途徑

(Joiner, K. A.等，*Ann. Rev. Immunol. 2*:461-2, 1984)。

當研究者注意到過敏毒素C3a和C5a介導也可在膿毒症期間發生的各種炎性反應時，在膿毒症的發病機理中最初牽涉到補體系統。這些過敏毒素引起血管舒張和微血管通透性增加，這些事件在感染性休克中起重要作用(Schumacher, W. A.等，*Agents Actions 34*:345-349, 1991)。另外，過敏毒素誘導支氣管痙攣、組胺自肥大細胞釋放和血小板聚集。此外，它們對粒細胞產生許多作用，例如溶酶體酶的趨化性、聚集、粘連、釋放，毒性超氧化物陰離子的產生和白三烯的形成(Shin, H. S.等，*Science 162*:361-363, 1968; Vogt, W., *complement3*:177-86, 1986)。這些生物學作用被認為在膿毒症的併發症例如休克或急性呼吸窘迫綜合征(ARDS)的發生中起作用(Hammerschmidt, D. E.等，*Lancet 1*:947-949, 1980; Slotman, G. T.等，*Surgery 99*:744-50, 1986)。此外，過敏毒素C3a的水準升高與膿毒症的致命結果有關(Hack, C. E.等，*Am. J. Med. 86*:20-26, 1989)。在一些休克動物模型中，某些補體-缺陷品系(例如，C5-缺陷品系)更耐受LPS輸注的影響(Hseuh, W.等，*Immunol. 70*:309-14, 1990)。

在齧齒動物中發生膿毒症期間用抗體阻斷C5a產生已經顯示極大改善存活率(Czermak, B. J.等，*Nat. Med. 5*:788-792, 1999)。當C5a受體(C5aR)被抗體或小分子抑制劑阻斷時，得到類似的發現(Huber-Lang, M. S.等，*FASEB J. 16*:1567-74, 2002; Riedemann, N. C.，等，*J. Clin. Invest.*

110:101-8, 2002)。早期在猴中的實驗研究表明，C5a的抗體阻斷減弱大腸桿菌誘導的感染性休克和成人呼吸窘迫綜合征(Hangen, D. H.，等，*J. Surg. Res. 46*:195-9, 1989; Stevens, J. H.，等，*J. Clin. Invest. 77*:1812-16, 1986)。當與較不嚴重膿毒性患者和存活者相比，在具有膿毒症的人中，C5a提高並與顯著降低的存活率以及多器官衰竭有關(Nakae, H.，等，*Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 84*:189-95, 1994; Nakae，等，*Surg. Today 26*:225-29, 1996; Bengtson, A.，等，*Arch. Surg. 123*:645-649, 1988)。在膿毒症期間C5a產生其有害作用的機制已被較詳細地研究，但最近的資料表明在膿毒症期間C5a的產生顯著損害血液中性粒細胞的先天性免疫功能(Huber-Lang, M. S.，等，*J. Immunol. 169*:3223-31, 2002)、其表現呼吸爆發的能力和其產生細胞因數的能力(Riedemann, N. C.，等，*Immunity 19*:193-202, 2003)。另外，在膿毒症期間C5a產生似乎具有促凝血作用(Laudes, I. J.，等，*Am. J. Pathol. 160*:1867-75, 2002)。補體-調節蛋白CI INH也已表明在膿毒症和ARDS動物模型中的功效(Dickneite, G., *Behring Ins. Mitt. 93*:299-305, 1993)。

凝集素途徑在膿毒症的發病機理中也具有作用。MBL已經表明結合許多臨床上重要的微生物，包括革蘭氏陰性和革蘭氏陽性細菌，和啟動凝集素途徑(Neth, O.，等，*Infect. Immun. 68*:688, 2000)。脂磷壁酸(LTA)越來越被認為是LPS的革蘭氏陽性對應物。它是有效的免疫促進劑，

其誘導細胞因數從單核吞噬細胞和全血釋放(Morath, S.，等，*J. Exp. Med. 195*:1635, 2002; Morath, S.，等，*Infect. Immun. 70*:938, 2002)。最近證實，L-纖維膠凝蛋白特異性結合自許多革蘭氏陽性細菌物種(包括金黃色葡萄球菌)分離的LTA，和啟動凝集素途徑(Lynch, N. J.，等，*J. Immunol. 172*:1198-02, 2004)。MBL還顯示結合來自腸球菌的LTA(其中多甘油磷酸鏈被糖基取代)，但不結合來自9個其它物種包括金黃色葡萄球菌的LTA (Polotsky, V. Y.，等，*Infect. Immun. 64*:380, 1996)。

因此，本發明的一個方面提供通過給予患有膿毒症或由膿毒症產生的病況的受試者在藥用載體中包含治療有效量的MASP-2抑制劑的組合物，治療膿毒症或由膿毒症產生的病況的方法，所述病況包括而不限於由膿毒症造成的嚴重膿毒症、感染性休克、急性呼吸窘迫綜合征，和系統性炎性反應綜合征。提供治療其它血液病症的相關方法，所述病症包括出血性休克、溶血性貧血、自身免疫性血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、溶血性尿毒綜合征(HUS)、非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)或其它骨髓/血液破壞性病況，即通過給予患有這樣的病況的受試者在藥用載體中包含治療有效量的MASP-2抑制劑的組合物。將MASP-2抑制劑經系統性給予所述受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入(特別是在ARDS的情況下)、皮下或其它胃腸外給予，或可能通過口服給予非-肽能藥。MASP-2抑制劑組合物可與一種或多種其它治療劑組合，以抵抗膿毒症和

/或休克的後遺症。對於晚期膿毒症或休克或從其中產生的窘迫病況，MASP-2抑制性組合物可合適地以速效劑型給予，例如通過靜脈內或動脈內遞送包含MASP-2抑制劑組合物的推注溶液。可按醫生確定進行重複給予，直至病況得到解決。

凝血病

已有證據表明補體系統在彌散性血管內凝血("DIC")例如顯著身體創傷繼發的DIC中的作用。

先前的研究表明，C4-/-小鼠不被保護免於腎再灌注損傷。(Zhou, W.，等，"C5b-9在腎缺血/再灌注損傷中的主要作用(Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury)," *J Clin Invest 105*:1363-1371 (2000))。為了研究C4-/-小鼠是否仍可能通過經典或凝集素途徑啟動補體，在對經典或凝集素途徑活化路線特異性的測定法中測量了在C4-/-血漿中的C3更新。儘管當通過經典途徑觸發活化時未能觀察到C3裂解，但觀察到在C4缺陷血清中C3的高度有效的凝集素途徑-依賴性活化(圖30)。可見在甘露聚糖和酵母聚糖上的C3b沉積在MASP-2-/-小鼠中嚴重受損，甚至在實驗條件下，根據許多先前公開的關於替代途徑活化的論文，所述條件應對所有三種途徑都是允許的。當在用免疫球蛋白複合物代替甘露聚糖或酵母聚糖包被的孔中使用相同的血清時，在MASP-2+/+小鼠血清和MASP-2-/-血清中但不在C1q耗盡血清中見到C3b沉積和因數B裂解。這指

示當初始C3b通過經典活性提供時，在MASP-2-/-血清中促進替代途徑活化。圖30C描述令人驚訝的發現，即C3可在C4缺陷血漿中以凝集素途徑-依賴性方式有效地被啟動。

通過用可溶性甘露聚糖或甘露糖預孵育血漿，該"C4旁路"通過抑制凝集素途徑-活化而被廢除。

補體系統的異常的非-免疫活化可能對人是危險的，還可能在血液途徑活化中起重要作用，特別是在嚴重創傷情況中，其中炎性和血液途徑被啟動。在正常的健康者中，C3轉變為總血漿C3蛋白的<5%。在蔓延性感染中，包括敗血病和免疫複合物疾病，C3轉變以經常低於正常的補體水準的大約30%重建自身，這是由於在庫分佈中利用和變化增加導致。大於30%的直接C3途徑活化通常產生血管舒張和對組織的流體損失的明顯的臨床證據。高於30%的C3轉變，起始機制主要是非-免疫的，由此產生的臨床表現有害於患者。補體C5水準在健康和受控制的疾病中顯示比C3穩定得多。C5水準顯著降低和/或轉變與患者對異常多發性損傷(例如，道路交通事故)和可能發生休克性肺綜合征的反應有關。因此，補體C3活化超過血管庫的30%或任何C5參與，或兩者的任何證據可被認為可能是患者中有害病理學變化的預兆。

C3和C5兩者均釋放過敏毒素(C3a和C5a)，其作用於肥大細胞和嗜堿粒細胞，釋放血管舒張性化學物質。它們設定趨化梯度，以指導多形核細胞(PMN)至免疫擾亂的中心(一種有益的反應)，但此處它們不同，因為C5a對這些吞

噬細胞具有特異性凝聚(聚集)作用，防止它們隨機移動遠離反應位點。在感染的正常控制中，C3啟動C5。然而，在多發性損傷中，C5似乎被廣泛啟動，系統性產生C5a過敏毒素。這種不受控制的活性在血管系統內引起多形體凝聚，然後這些凝塊被帶到肺的毛細血管中，在其中它們阻塞和因為超氧化物釋放而產生局部損傷作用。儘管不希望受理論限制，但在急性呼吸窘迫綜合征(ARDS)的發病機理中該機制可能是重要的，雖然該觀點最近已受到挑戰。C3a過敏毒素體外可證明是有效的血小板聚集劑，但它們的體內參與不太確定，並且在傷口修復中血小板物質和纖溶酶的釋放可僅次要涉及補體C3。有可能的是，C3活化的延長升高是產生DIC所需要的。

除了上述的啟動的補體組分的細胞和血管作用(其可解釋創傷和DIC之間的關聯)外，最新的科學發現鑒定了在補體和凝血系統之間的直接分子關聯和功能對話。支援資料獲自在C3缺陷小鼠中的研究。因為C3是各補體途徑的共有組分，預測C3缺陷小鼠缺少所有的補體功能。然而，令人驚訝的是，C3缺陷小鼠完全能夠活化末端補體組分。(Huber-Lang, M.，等，"Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway," *Nat. Med 12*: 682-687 (2006))。深度研究揭示了末端補體組分的C3-非依賴性活化由凝血酶(凝固級聯的限速酶)介導。(Huber等，2006)。在初始補體活化後介導凝血酶活化的分子組分仍然難以理解。

本發明人已經闡明了什麼是在補體和凝固級聯之間對話的分子基礎和鑒定MASP-2作為連接這兩個系統的重要控制點。對MASP-2的底物特異性的生物化學研究鑒定了除了眾所周知的C2和C4補體蛋白之外，凝血酶原為可能的底物。MASP-2在功能相關位點上特異性裂解凝血酶原，產生凝血酶，其為凝固級聯限速酶。(Krarup, A.，等，"Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2," *PLoS. ONE. 2*:e623 (2007))。MASP-2-產生的凝血酶能夠在確定重建的體外系統中促進纖維蛋白沉積，證明MASP-2裂解的功能相關性。(Krarup等，2007)。如下文實施例中所述的，本發明人進一步通過記錄在凝集素途徑活化後在正常齧齒動物血清中凝血酶活化，確證了該發現的生理學意義，並證實了該過程通過中和MASP-2單克隆抗體而阻斷。

MASP-2可代表凝集素途徑中的重要分支點，能夠促進補體和凝血系統二者的活化。因為凝集素途徑活化是許多類型的創傷性損傷的生理反應，本發明人認為同時發生的系統性炎症(通過補體組分介導)和彌散性凝血(通過凝血途徑介導)可通過MASP-2啟動這兩個途徑的能力來解釋。這些發現清楚地表明MASP-2在DIC產生中的作用和MASP-2抑制在治療或預防DIC中的治療益處。MASP-2可提供補體和凝血系統之間的分子關聯，和凝集素途徑的活化，在其在創傷的背景中發生時，可通過MASP-2-凝血酶軸心直接引發凝血系統的活化，提供創傷和DIC之間的機制關

聯。根據本發明的一個方面，MASP-2的抑制將抑制凝集素途徑活化和減少過敏毒素C3a和C5a二者的產生。認為C3活化的延長升高是產生DIC所需要的。

微循環凝血(毛細血管和小血管中的斑點血塊)在背景例如感染性休克中出現。確定凝集素途徑在感染性休克中的作用，如通過實施例17和圖18和19中所述的MASP-2 (-/-)膿毒症小鼠模型的受保護表型所證明的。此外，如實施例15和圖16A和16B中所證實的，MASP-2 (-/-)小鼠在彌散性血管內凝血(DIC)的局部Schwartzman反應模型(一種微血管的局部凝血模型)中得到保護。

V. MASP-2抑制劑

在一個方面中，本發明提供在患有或有風險發生血栓性微血管病的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的方法。MASP-2抑制劑以在活的受試者中有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量給予。在本發明的該方面的實踐中，代表性的MASP-2抑制劑包括：抑制MASP-2的生物學活性的分子(例如小分子抑制劑、抗-MASP-2抗體或與MASP-2相互作用或干擾蛋白-蛋白質相互作用的阻斷肽)，和降低MASP-2表達的分子(例如MASP-2反義核酸分子、MASP-2特異性RNAi分子和MASP-2核酶)，從而防止MASP-2啟動凝集素補體途徑。MASP-2抑制劑可單獨用作主要療法，或作為輔助療法與其它治療劑組合使用以增強其它醫學治療的治療益處。

MASP-2-依賴性補體活化的抑制的特徵為由於根據本發明的方法給予MASP-2抑制劑而出現的在補體系統的組分中的以下變化的至少一個：MASP-2-依賴性補體活化系統產物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9 (MAC)的形成或產生的抑制(例如按實施例2中所述測量)；在溶血測定法中使用未致敏的兔或豚鼠紅細胞評價的補體活化減少(例如按實施例33中所述測量)；C4裂解和C4b沉積的減少(例如按實施例2中所述測量)；或C3裂解和C3b沉積的減少(例如按實施例2中所述測量)。

根據本發明，使用有效抑制MASP-2-依賴性補體活化系統的MASP-2抑制劑。可用於實施本發明的該方面的MASP-2抑制劑包括例如，抗-MASP-2抗體和其片段、MASP-2抑制性肽、小分子、MASP-2可溶性受體和表達抑制劑。MASP-2抑制劑可通過阻斷MASP-2的生物功能抑制MASP-2-依賴性補體活化系統。例如，抑制劑可有效阻斷MASP-2的蛋白質與蛋白質相互作用，干擾MASP-2二聚化或裝配，阻斷Ca2+結合，干擾MASP-2絲氨酸蛋白酶活性位點或可減少MASP-2蛋白表達。

在一些實施方案中，MASP-2抑制劑選擇性抑制MASP-2補體活化，保留C1q-依賴性補體活化系統功能完整。

在一個實施方案中，用於本發明方法的MASP-2抑制劑是特異性MASP-2抑制劑，其特異性結合包括SEQ ID NO:6的多肽，其親和力為對補體系統的其它抗原的至少10

倍。在另一實施方案中，MASP-2抑制劑特異性結合包括SEQ ID NO:6的多肽，其結合親和力為對補體系統的其它抗原的至少100倍。MASP-2抑制劑的結合親和力可使用合適的結合測定法測定。

MASP-2多肽顯示類似於MASP-1、MASP-3和C1r和C1s (C1補體系統的蛋白酶)的分子結構。SEQ ID NO:4所示的cDNA分子編碼MASP-2的一個代表性實例(由SEQ ID NO:5所示的胺基酸序列組成)和提供具有前導序列(aa 1-15)的人MASP-2多肽，其在分泌後裂解，產生成熟形式的人MASP-2 (SEQ ID NO:6)。如圖2中所示，人*MASP 2*基因包括12個外顯子。人MASP-2 cDNA由外顯子B、C、D、F、G、H、I、J、K和L編碼。可變剪接產生20 kDa蛋白，稱為MBL-相關蛋白19 ("MAp19"，亦稱為"sMAP") (SEQ ID NO:2)，其由自外顯子B、C、D和E產生的(SEQ ID NO:1)編碼，如圖2中所示。SEQ ID NO:50所示的cDNA分子編碼鼠MASP-2 (由SEQ ID NO:51所示的胺基酸序列組成)和提供具有前導序列的鼠MASP-2多肽，其在分泌後裂解，產生成熟形式的鼠MASP-2 (SEQ ID NO:52)。SEQ ID NO:53所示的cDNA分子編碼大鼠MASP-2 (由SEQ ID NO:54所示的胺基酸序列組成)和提供具有前導序列的大鼠MASP-2多肽，其在分泌後裂解，產生成熟形式的大鼠MASP-2 (SEQ ID NO:55)。

本領域技術人員將認識到，SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:53中公開的序列分別表示人、鼠和大

鼠MASP-2的單個等位基因，和預期存在等位基因改變和可變剪接。SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:53所示的核苷酸序列的等位基因變體，包括包含沉默突變的那些和其中突變導致胺基酸序列改變的那些，在本發明的範圍內。MASP-2序列的等位元基因變體可根據標準程式通過探查來自不同個體的cDNA或基因組文庫進行克隆。

人MASP-2蛋白(SEQ ID NO:6)的結構域顯示在圖1和2A中，包括N-末端C1r/C1s/海膽Vegf/骨形態發生蛋白(CUBI)結構域(SEQ ID NO:6的aa 1-121)、表皮生長因數-樣結構域(aa 122-166)、第二CUBI結構域(aa 167-293)以及串聯的補體控制蛋白結構域和絲氨酸蛋白酶結構域。*MASP 2*基因的可變剪接產生圖1中所示的MAp19。MAp19是一種非酶蛋白，包含MASP-2的N-末端CUB1-EGF區以及源自外顯子E的四個另外的殘基(EQSL)，如圖1中所示。

數種蛋白已經顯示通過蛋白與蛋白相互作用，與MASP-2結合或相互作用。例如，MASP-2已知與凝集素蛋白MBL、H-纖維膠凝蛋白和L-纖維膠凝蛋白結合和與其形成Ca2+依賴性複合物。各MASP-2/凝集素複合物已經顯示通過蛋白C4和C2的MASP-2-依賴性裂解啟動補體(Ikeda, K.等，*J. Biol. Chem. 262*:7451-7454, 1987; Matsushita, M.，等，*J. Exp. Med.176*:1497-2284, 2000; Matsushita, M.，等，*J. Immunol. 168*:3502-3506, 2002)。研究表明，MASP-2的CUB1-EGF結構域是MASP-2與MBL締合所必需的(Thielens, N. M.等，*J. Immunol. 166*:5068, 2001)。還表明，CUB1EGFCUBII結構域

介導MASP-2的二聚化，其是形成活性MBL複合物所需要的(Wallis, R.等，*J. Biol. Chem. 275*:30962-30969, 2000)。因此，可鑒定結合或干擾已知對MASP-2-依賴性補體活化是重要的MASP-2靶標區的MASP-2抑制劑。

抗-MASP-2抗體

在本發明的該方面的一些實施方案中，MASP-2抑制劑包括抑制MASP-2-依賴性補體活化系統的抗-MASP-2抗體。用於本發明的該方面的抗-MASP-2抗體包括源自任何產生抗體的哺乳動物的多克隆、單克隆或重組抗體，和可以是多特異性、嵌合的、人源化的、抗-個體型，和抗體片段。抗體片段包括Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、Fv片段、scFv片段和單鏈抗體，如本文進一步描述的。

文獻中已經描述了數種抗-MASP-2抗體，其中的一些列於下表1中。針對抑制MASP-2-依賴性補體活化系統的能力，可使用本文描述的測定法篩選這些先前描述的抗-MASP-2抗體。例如，已經鑒定了阻斷MASP-2依賴性補體活化的抗大鼠MASP-2 Fab2抗體，如本文實施例10和11中更詳細描述的。一旦鑒定起MASP-2抑制劑作用的抗-MASP-2抗體，它可用於產生抗-個體型抗體和用於鑒定其它MASP-2結合分子，如下文進一步描述的。

表 1：來自文獻的 MASP-2 特異性抗體

抗原	抗體類型	參考文獻
重組 MASP-2	大鼠多克隆	Peterson, S.V., 等, *Mol. Immunol.* 37:803-811, 2000
重組人 CCP1/2-SP 片段(MoAb 8B5)	大鼠 MoAb (亞型 IgG1)	Moller-Kristensen, M., 等, *J. of Immunol. Methods* 282:159-167, 2003
重組人 MAp19 (MoAb 6G12) (與 MASP-2 交叉反應)	大鼠 MoAb (亞型 IgG1)	Moller-Kristensen, M., 等, *J. of Immunol. Methods* 282:159-167, 2003
hMASP-2	小鼠 MoAb (S/P) 小鼠 MoAb (N-端)	Peterson, S.V., 等, *Mol. Immunol.* 35:409, April 1998
hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP 結構域	大鼠 MoAb: Nimoab101，通過雜交瘤細胞系 03050904 (ECACC)產生	WO 2004/106384
hMASP-2 (全長-his 標籤)	鼠 MoAbs: 通過雜交瘤細胞系 M0545YM035 (DSMZ) 產生的 NimoAb104 通過雜交瘤細胞系 M0545YM029 (DSMZ) 產生的 NimoAb108 通過雜交瘤細胞系 M0545YM046 (DSMZ) 產生的 NimoAb109 通過雜交瘤細胞系 M0545YM048 (DSMZ) 產生的 NimoAb110	WO 2004/106384

具有降低的效應器功能的抗-MASP-2抗體

在本發明的該方面的一些實施方案中，抗-MASP-2抗體具有降低的效應器功能，以減少可自經典補體途徑的活化產生的炎症。已經顯示IgG分子觸發經典補體途徑的能力位於該分子的Fc部分內(Duncan, A. R.等，*Nature 332*:738-740 1988)。其中分子的Fc部分已通過酶裂解被除去的IgG分子沒有該效應器功能(參見Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New

York, 1988)。因此，具有降低的效應器功能的抗體可因為通過具有使效應器功能最小化的基因工程改造的Fc序列而缺少分子的Fc部分，或屬於人IgG2或IgG4同種型而產生。

具有降低的效應器功能的抗體可通過IgG重鏈的Fc部分的標準分子生物學操作產生，如本文實施例9中所述，亦描述於Jolliffe等，*Int'l Rev. Immunol. 10*:241-250, 1993和Rodrigues等，*J. Immunol. 151*:6954-6961, 1998。具有降低的效應器功能的抗體還包括人IgG2和IgG4同種型，其啟動補體和/或與Fc受體相互作用的能力降低(Ravetch, J. V.等，*Annu. Rev. Immunol. 9*:457-492, 1991; Isaacs, J. D.等，*J. Immunol.148*:3062-3071, 1992; van de Winkel, J. G.等，*Immunol. Today 14*:215-221, 1993)。對人MASP-2具有特異性的人源化的或全人抗體，包括IgG2或IgG4同種型，可通過本領域普通技術人員已知的數種方法之一產生，如描述於Vaughan, T. J.等，*Nature Biotechnical 16*:535-539, 1998。

抗-MASP-2抗體的製備

抗-MASP-2抗體可使用MASP-2多肽(例如，全長MASP-2)或使用帶有抗原性MASP-2表位的肽(例如，MASP-2多肽的一部分)製備。免疫原性肽可以小至5個胺基酸殘基。例如，包括SEQ ID NO:6的全部胺基酸序列的MASP-2多肽可用於誘導用於本發明方法的抗-MASP-2抗體。已知參與蛋白-蛋白相互作用的特定MASP-2結構域，

例如CUBI和CUBIEGF結構域，以及包括絲氨酸-蛋白酶活性位元點的區域，可如實施例3中所述作為重組多肽表達並用作抗原。另外，包括MASP-2多肽(SEQ ID NO:6)的至少6個胺基酸的部分的肽亦可用於誘導MASP-2抗體。用於誘導MASP-2抗體的MASP-2來源的抗原的其它實例提供在下表2中。用於產生抗體的MASP-2肽和多肽可作為天然多肽、或重組或合成肽和催化失活的重組多肽分離，例如MASP-2A，如實施例5-7進一步描述的。在本發明該方面的一些實施方案中，抗-MASP-2抗體使用轉基因小鼠品系獲得，如實施例8和9中所述和下文進一步描述的。

用於產生抗-MASP-2抗體的抗原還包括融合多肽，例如MASP-2或其一部分與免疫球蛋白多肽或與麥芽糖-結合蛋白的融合物。多肽免疫原可以是全長分子或其一部分。如果多肽部分是半抗原-樣，所述部分可有利地與大分子載體(例如匙孔蟄血藍蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或破傷風類毒素)結合或連接用於免疫。

表 2：MASP-2 來源的抗原

SEQ ID NO:	胺基酸序列
SEQ ID NO:6	人 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:51	鼠 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:8	人 MASP-2 的 CUBI 結構域 (SEQ ID NO:6 的 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	人 MASP-2 的 CUBIEGF 結構域 (SEQ ID NO:6 的 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	人 MASP-2 的 CUBIEGFCUBII 結構域 (SEQ ID NO:6 的 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	人 MASP-2 的 EGF 結構域 (SEQ ID NO:6 的 aa 122-166)
SEQ ID NO:12	人 MASP-2 的絲氨酸-蛋白酶結構域 (SEQ ID NO:6 的 aa 429-671)
SEQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	呈失活的突變體形式的絲氨酸-蛋白酶 (SEQ ID NO:6 的 aa 610-625，具有突變的 Ser 618)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	人 CUBI 肽
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVL ATLCGQ	人 CUBI 肽
SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	人 CUBI 結構域的 MBL 結合區
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEK PFTGF	人 CUBI 結構域的 MBL 結合區
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	EGF 肽
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRG DSGGALV	來自絲氨酸-蛋白酶活性位點的肽

多克隆抗體

多克隆抗體

針對MASP-2的多克隆抗體可通過使用本領域普通技術人員眾所周知的方法用MASP-2多肽或其免疫原部分免疫動物製備。參見例如，Green等，"Production of Polyclonal Antisera," in *Immunochemical Protocols* (Manson編輯)，第105頁，和如實施例6中進一步描述的。MASP-2多肽的免

疫原性可通過使用佐劑，包括無機凝膠例如氫氧化鋁或弗氏佐劑(完全或不完全)、表面活性物質例如溶血卵磷脂、普盧蘭尼克多元醇、多聚陰離子、油乳劑、匙孔蟄血藍蛋白和二硝基苯酚而增加。多克隆抗體通常在動物例如馬、牛、狗、雞、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、山羊或綿羊中產生。或者，用於本發明的抗-MASP-2抗體也可源自低於人類的靈長類動物。用於在狒狒中產生診斷和治療上有用的抗體的一般性技術可見於例如，Goldenberg等，International Patent Publication No. WO 91/11465和Losman, M. J.等，*Int. J. Cancer 46*:310, 1990。然後使用本領域眾所周知的標準程式自這樣免疫的動物的血液中產生包含免疫活性抗體的血清。

單克隆抗體

在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是抗-MASP-2單克隆抗體。抗-MASP-2單克隆抗體具有高度的特異性，針對單一MASP-2表位。如本文所用的，修飾詞"單克隆"表示獲自基本上均質抗體群的抗體的特徵，和不應解釋為要求通過任何特定的方法製備抗體。單克隆抗體可使用提供通過連續細胞系培養產生抗體分子的任何技術獲得，例如描述於Kohler, G.等，*Nature 256*:495, 1975中的雜交瘤方法，或它們可通過重組DNA方法製備(參見例如，Cabilly的美國專利號4,816,567)。單克隆抗體也可使用描述於Clackson, T.等，*Nature 352*:624-628, 1991和Marks, J. D.

等，*J. Mol. Biol. 222*:581-597, 1991中的技術自噬菌體抗體庫分離。這樣的抗體可屬於任何免疫球蛋白類型，包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD和其任何亞型。

例如，單克隆抗體可通過用包括MASP-2多肽或其部分的組合物注射合適的哺乳動物(例如，BALB/c小鼠)獲得。在預定一段時間後，從小鼠取出脾細胞和懸浮在細胞培養基中。然後將脾細胞與永生細胞系融合，形成雜交瘤。將形成的雜交瘤在細胞培養中生長，並篩選它們產生針對MASP-2的單克隆抗體的能力。進一步描述生產抗-MASP-2單克隆抗體的實例提供在實施例7中。(亦參見*Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons，第2.5.1-2.6.7頁，1991)。

人單克隆抗體可通過使用轉基因小鼠獲得，所述小鼠已被工程改造以在回應抗原攻擊時產生特異性人抗體。在該技術中，將人免疫球蛋白重鏈和輕鏈基因座的元件引入源自胚胎幹細胞系的小鼠品系中，所述幹細胞系包含內源免疫球蛋白重鏈和輕鏈基因座的靶向破壞。轉基因小鼠可合成對人抗原具有特異性的人抗體，所述抗原例如本文描述的MASP-2抗原，和所述小鼠可用於使用常規的Kohler-Milstein技術，通過融合來自所述動物的B-細胞與合適的骨髓瘤細胞系，產生分泌人MASP-2抗體的雜交瘤，如實施例7中進一步描述的。具有人免疫球蛋白基因組的轉基因小鼠是市售可得的(例如，來自Abgenix, Inc., Fremont, CA和Medarex, Inc., Annandale, N. J.)。用於自轉基因小鼠

獲得人抗體的方法描述於例如，Green, L. L.等，*Nature Genet. 7*:13, 1994; Lonberg, N.等，*Nature 368*:856, 1994；和Taylor, L. D.等，*Int. Immun. 6*:579, 1994。

單克隆抗體可通過各種充分建立的技術自雜交瘤培養物分離和純化。這樣的分離技術包括用蛋白-A Sepharose的親和色譜、大小排阻色譜和離子交換色譜(參見例如，Coligan第2.7.1-2.7.12頁和第2.9.1-2.9.3頁；Baines等，"Purification of Immunoglobulin G (IgG)"，於*Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10，第79-104頁，1992)。

一旦產生，首先測試多克隆、單克隆或噬菌體來源的抗體的特異性MASP-2結合。本領域技術人員已知的多種測定法可用於檢測特異性結合MASP-2的抗體。示例性的測定法包括通過標準方法(例如，描述於Ausubel等)的蛋白質印跡或免疫沉澱分析、免疫電泳、酶聯免疫吸附測定法、斑點印跡、抑制或競爭測定法和夾心測定法(如描述於Harlow和Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)。一旦鑒定特異性結合MASP-2的抗體，用數種測定法例如，凝集素-特異性C4裂解測定法(描述於實施例2)、C3b沉積測定法(描述於實施例2)或C4b沉積測定法(描述於實施例2)中的一種測試抗-MASP-2抗體作為MASP-2抑制劑的能力。

抗-MASP-2單克隆抗體的親和力可通過本領域普通技術人員容易地確定(參見例如，Scatchard, A., *NY Acad. Sci.*

51:660-672, 1949)。在一個實施方案中，用於本發明方法的抗-MASP-2單克隆抗體結合MASP-2，其結合親和力為<100 nM，優選地<10 nM和最優選地<2 nM。在一些實施方案中，用於本發明方法的MASP-2抑制性單克隆抗體是MASP-2抑制性單克隆抗體或其抗原結合片段，包括(I) (a)重鏈可變區，包含：i) 包括SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包括SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包括SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b) 輕鏈可變區，包含：i) 包括SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包括SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包括SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3；或(II) 其變體，包括與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

嵌合/人源化抗體

用於本發明方法的單克隆抗體包括嵌合抗體，其中重鏈和/或輕鏈的一部分與源自特定物種或屬於特定抗體類

型或亞型的抗體的相應序列相同或同源，而所述鏈的剩餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體類型或亞型的抗體的相應序列相同或同源；以及這樣的抗體的片段(Cabilly的美國專利號4,816,567；和Morrison, S.L.等，*Proc. Nat'l Acad. Sci.USA 81*:6851-6855, 1984)。

用於本發明的一種形式的嵌合抗體是人源化的單克隆抗-MASP-2抗體。人源化形式的非-人(例如，鼠)抗體是嵌合抗體，其包含源自非-人免疫球蛋白的最小序列。人源化的單克隆抗體通過轉移來自小鼠免疫球蛋白的重和輕可變鏈的非-人(例如，小鼠)互補決定區(CDR)至人可變結構域產生。通常，然後將人抗體的殘基置換到非-人對應物的框架區。此外，人源化的抗體可包括在受體抗體或供體抗體中不存在的殘基。可進行這些修飾以進一步精修抗體性能。通常，人源化的抗體將包括基本上所有的至少一個和通常兩個可變結構域，其中所有或基本上所有的高變環對應於非-人免疫球蛋白的那些，並且所有或基本上所有的Fv框架區為人免疫球蛋白序列的那些。人源化的抗體任選還將包括免疫球蛋白恆定區(Fc)的至少一部分，通常為人免疫球蛋白的恆定區。對於進一步的細節，參見Jones, P. T.等，*Nature 321*:522-525, 1986; Reichmann, L.，等，*Nature 332*:323-329, 1988；和Presta, *Curr. Op. Struct. Biol. 2*:593-596, 1992。

用於本發明的人源化抗體包括包含至少MASP-2結合CDR3區的人單克隆抗體。另外，Fc部分可經替換以產生

IgA或IgM以及人IgG抗體。這樣的人源化抗體將具有特定的臨床用處，因為它們將特異性識別人MASP-2，但在人中不針對抗體本身引發免疫反應。因此，它們更好地適合於在人中體內給予，尤其是當需要重複或長期給予時。

自鼠抗-MASP-2單克隆抗體產生人源化的抗-MASP-2抗體的實例提供在本文的實施例6中。用於產生人源化的單克隆抗體的技術還描述於例如，Jones, P. T.等，*Nature 321*:522, 1986; Carter, P.，等，*Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Sandhu, J. S., Crit. Rev. Biotech. 12*:437, 1992; Singer, I. I.等，*J. Immun. 150*:2844, 1993; Sudhir (編輯)，*Antibody Engineering Protocols,* Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies"，於*Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland等(編輯)，John Wiley & Sons, Inc.，第399-434頁，1996；和Queen的美國專利號5,693,762, 1997。另外，存在從特異性鼠抗體區合成人源化抗體的商業機構，例如Protein Design Labs (Mountain View, CA)。

重組抗體

抗-MASP-2抗體還可使用重組方法製備。例如，人抗體可使用人免疫球蛋白表達文庫(可獲自例如，Stratagene, Corp., La Jolla, CA)製備，以產生人抗體的片段(VH、VL、Fv、Fd、Fab或F(ab')2)。這些片段然後用於使用類似於用於產生嵌合抗體的技術，構建完整的人抗體。

抗-個體型抗體

一旦抗-MASP-2抗體經鑒定具有所需的抑制活性，這些抗體可用於使用本領域眾所周知的技術產生抗-個體型抗體，其模擬MASP-2的一部分。參見例如，Greenspan, N. S.等，*FASEB J.* 7:437, 1993。例如，結合MASP-2和競爭抑制補體活化所需的MASP-2蛋白相互作用的抗體可用於產生抗-個體型，其模擬在MASP-2蛋白上的MBL結合位點，因此結合並中和MASP-2的結合配體，例如MBL。

免疫球蛋白片段

用於本發明方法的MASP-2抑制劑不僅包括完整的免疫球蛋白分子，而且包括眾所周知的片段，包括Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2和Fv片段、scFv片段、雙抗體、線性抗體、單鏈抗體分子和從抗體片段形成的多特異性抗體。

本領域眾所周知，僅抗體分子的一小部分(互補位元)參與抗體與其表位的結合(參見例如，Clark, W. R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986)。抗體的pFc'和Fc區是經典補體途徑的效應器，但不參與抗原結合。pFc'區從其經過酶裂解的抗體或沒有pFc'區而產生的抗體，被稱為F(ab')2片段和保留完整抗體的兩個抗原結合位點。分離的F(ab')2片段因為其兩個抗原結合位點而被稱為二價單克隆片段。類似地，

Fc區從其經過酶裂解的抗體或沒有Fc區而產生的抗體，被稱為Fab片段和保留完整抗體分子的一個抗原結合位點。

抗體片段可通過蛋白水解獲得，例如通過常規方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗體。例如，抗體片段可通過用胃蛋白酶經酶裂解抗體得到稱為F(ab')2的5S片段產生。該片段可使用巯基還原劑進一步裂解以產生3.5S Fab'單價片段。任選地，裂解反應可使用二硫鍵裂解產生的巯基的封閉基團進行。或者，使用胃蛋白酶經酶裂解直接產生兩個單價Fab片段和Fc片段。這些方法描述於例如，Goldenberg的美國專利號4,331,647; Nisonoff, A.等，*Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R. R., Biochem. J. 73*:119, 1959; Edelman等，於*Methods in Enzymology 1*:422, Academic Press, 1967；和Coligan第2.8.1-2.8.10和2.10.-2.10.4頁。

在一些實施方案中，優選使用缺少Fc區的抗體片段，以避免經典補體途徑的活化，經典補體途徑在Fc與Fcγ受體結合時起始。存在數種可產生避免Fcγ受體相互作用的MoAb的方法。例如，單克隆抗體的Fc區可使用蛋白水解酶部分消化(例如無花果蛋白酶消化)經化學除去，從而產生例如，抗原-結合抗體片段例如Fab或F(ab)2片段(Mariani, M.等，*Mol. Immunol. 28*:69-71, 1991)。或者，人γ4 IgG同種型，其不結合Fcγ受體，可在構建人源化抗體期間使用，如本文所述。缺少Fc結構域的抗體、單鏈抗體和抗原-結合結構域也可使用本文描述的重組技術經工程改

造。

單鏈抗體片段

或者，可創建對MASP-2具有特異性的單一肽鏈結合分子，其中連接重鏈和輕鏈Fv區。Fv片段可通過肽接頭連接以形成單鏈抗原結合蛋白(scFv)。這些單鏈抗原結合蛋白通過構建包括通過寡核苷酸連接的編碼VH和VL結構域的DNA序列的結構基因製備。結構基因插入到表達載體，其隨後引入至宿主細胞，例如大腸桿菌。重組宿主細胞合成具有橋接兩個V結構域的接頭肽的單一多肽鏈。用於產生scFvs的方法描述於例如，Whitlow等，"Methods: A Companion to Methods in Enzymology" *2*:97, 1991; Bird等，*Science 242*:423, 1988; Ladner的美國專利號4,946,778; Pack, P.，等，*Bio/Technology 11*:1271, 1993。

作為說明性的實例，MASP-2特異性scFv可通過將淋巴細胞體外暴露於MASP-2多肽，和在噬菌體或類似的載體中選擇抗體展示文庫獲得(例如，通過使用固定的或標記的MASP-2蛋白或肽)。編碼具有潛在的MASP-2多肽結合結構域的多肽的基因可通過篩選展示在噬菌體或細菌例如大腸桿菌上的隨機肽文庫獲得。這些隨機肽展示文庫可用於篩選與MASP-2相互作用的肽。用於產生和篩選這樣的隨機肽展示文庫的技術是本領域眾所周知的(Lardner的美國專利號5,223,409; Ladner的美國專利號4,946,778; Lardner的美國專利號5,403,484; Lardner的美國專利號5,571,698；

和Kay等，*Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996)，隨機肽展示文庫和用於篩選這樣的文庫的試劑盒可市售獲得，例如得自CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.)、Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.)、New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.)和Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N. J.)。

用於本發明的該方面的另一種形式的抗-MASP-2抗體片段是編碼結合MASP-2抗原上的表位和抑制MASP-2-依賴性補體活化的單一互補決定區(CDR)的肽。CDR肽("最小識別單位")可通過構建編碼目的抗體的CDR的基因獲得。這樣的基因，例如，通過使用聚合酶鏈反應從產生抗體的細胞的RNA合成可變區製備(參見例如，Larrick等，*Methods: A Companion to Methods* in *Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies"，於 *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter等(編輯)，第166頁，Cambridge University Press, 1995；和Ward等"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies"，於 *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch等(編輯)，第137頁，Wiley-Liss, Inc., 1995)。

將本文描述的MASP-2抗體給予有需要的受試者以抑制MASP-2-依賴性補體活化。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是高-親和力人或人源化的單克隆抗-MASP-2抗體，具有降低的效應器功能。

肽抑制劑

在本發明的該方面的一些實施方案中，MASP-2抑制劑包括分離的MASP-2肽抑制劑，其包括抑制MASP-2-依賴性補體活化系統的分離的天然肽抑制劑和合成的肽抑制劑。如本文所用的，術語"分離的MASP-2肽抑制劑"是指抑制MASP-2依賴性補體活化的肽，其通過與凝集素途徑的另一識別分子結合、與MASP-2競爭結合凝集素途徑的另一識別分子(例如，MBL、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白或L-纖維膠凝蛋白)和/或直接與MASP-2相互作用以抑制MASP-2-依賴性補體活化，其是基本上純的，並且基本上不含它們在自然界中可能一起存在的其它物質至對其預期應用實際和合適的程度。

肽抑制劑已經在體內成功用於干擾蛋白-蛋白相互作用和催化位點。例如，結構上涉及LFA-1的粘連分子的肽抑制劑最近已獲批准用於凝血病的臨床應用(Ohman, E. M.，等，*European Heart J. 16*:50-55, 1995)。已經描述了防止或干擾整聯蛋白-依賴性粘連的短的線性肽(<30個胺基酸)(Murayama, O.等，*J. Biochem. 120*:445-51, 1996)。較長的肽，長度範圍為25-200個胺基酸殘基，已經成功用於阻斷整聯蛋白-依賴性粘連(Zhang, L.等，*J. Biol. Chem. 271*(47):29953-57, 1996)。通常，較長的肽抑制劑具有比短肽更高的親和力和/或更慢的解離速率，因此可能是更有效的抑制劑。已經顯示環狀肽抑制劑是用於治療人炎性

疾病的整聯蛋白的體內有效抑制劑(Jackson, D. Y.等，*J. Med. Chem. 40*:3359-68, 1997)。產生環狀肽的一種方法包括合成其中肽的末端胺基酸是半胱氨酸的肽，從而允許肽通過在末端胺基酸之間的二硫鍵以環狀形式存在，這已經表明改進親和力和體內半壽期用於治療生血腫瘤(例如，Larson的美國專利號6,649,592)。

合成的MASP-2肽抑制劑

用於本發明的該方面的方法的MASP-2抑制性肽通過模擬對MASP-2功能重要的靶標區的胺基酸序列舉例說明。用於本發明的方法的實踐的抑制性肽的大小範圍是約5個胺基酸至約300個胺基酸。表3提供示例性的抑制性肽的列表，其可用於實踐本發明的該方面。可在數種測定法之一中，包括例如，凝集素特異性C4裂解測定法(描述於實施例2)和C3b沉積測定法(描述於實施例2)，測試候選的MASP-2抑制性肽起MASP-2抑制劑作用的能力。

在一些實施方案中，MASP-2抑制性肽源自MASP-2多肽和選自全長成熟MASP-2蛋白(SEQ ID NO:6)，或選自MASP-2蛋白的特定的結構域，例如CUBI結構域(SEQ ID NO:8)、CUBIEGF結構域(SEQ ID NO:9)、EGF結構域(SEQ ID NO:11)和絲氨酸蛋白酶結構域(SEQ ID NO:12)。如之前描述的，CUBEGFCUBII區已經表明對於二聚化和與MBL結合是必需的(Thielens等，同上)。具體而言，在鑒定帶有在Asp105處純合突變為Gly105的人的研究中，MASP-2

的CUBI結構域中的肽序列TFRSDYN (SEQ ID NO:16)已經表明參與結合MBL，導致MASP-2從MBL複合物丟失(Stengaard-Pedersen, K.等，*New England J. Med. 349*:554-560, 2003)。

在一些實施方案中，MASP-2抑制性肽源自結合MASP-2和參與凝集素補體途徑的凝集素蛋白。已經鑒定了參與該途徑的數種不同的凝集素，包括甘露聚糖-結合凝集素(MBL)、L-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白和H-纖維膠凝蛋白。(Ikeda, K.等，*J. Biol. Chem. 262*:7451-7454, 1987; Matsushita, M.，等，*J. Exp. Med. 176*:1497-2284, 2000; Matsushita, M.，等，*J. Immunol. 168*:3502-3506, 2002)。這些凝集素作為同型三聚亞基的寡聚體存在於血清中，各自具有N-末端膠原-樣纖維，其具有碳水化合物識別結構域。這些不同的凝集素已經顯示結合MASP-2，和凝集素/MASP-2複合物通過蛋白C4和C2的裂解啟動補體。H-纖維膠凝蛋白具有24個胺基酸的氨基-末端區、具有11個Gly-Xaa-Yaa重複的膠原-樣結構域、12個胺基酸的頸結構域和207個胺基酸的纖維蛋白原-樣結構域(Matsushita, M.等，*J. Immunol. 168*:3502-3506, 2002)。H-纖維膠凝蛋白結合GlcNAc和凝集用源自鼠傷寒沙門氏菌(*S. Typhimurium*)、明尼蘇達沙門氏菌(*S. Minnesota)*和大腸桿菌的LPS包被的人紅細胞。H-纖維膠凝蛋白已經顯示與MASP-2和MAp19締合，啟動凝集素途徑(同前)。L-纖維膠凝蛋白/P35還結合GlcNAc和已經顯示與人血清中的MASP-2和MAp19締

合，和該複合物已經顯示啟動凝集素途徑(Matsushita, M.等，*J. Immunol. 164*:2281, 2000)。因此，用於本發明的MASP-2抑制性肽可包括選自MBL蛋白(SEQ ID NO:21)、H-纖維膠凝蛋白(Genbank檢索號NM_173452)、M-纖維膠凝蛋白(Genbank檢索號O00602)和L-纖維膠凝蛋白(Genbank檢索號NM_015838)的至少5個胺基酸的區。

更特別地，科學家已經鑒定在MBL上的MASP-2結合位點，其在12個Gly-X-Y三聯體"GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POGNOG PSG SOG PKG QKG DOG KS" (SEQ ID NO:26)內，位於MBP的膠原-樣結構域的C-末端部分的鉸鏈和頸區之間(Wallis, R.等，*J. Biol. Chem. 279*:14065, 2004)。該MASP-2結合位點區在人H-纖維膠凝蛋白和人L-纖維膠凝蛋白中亦是高度保守的。已經描述了存在於所有三種凝集素蛋白中的共有結合位點，包括胺基酸序列"OGK-X-GP" (SEQ ID NO:22)，其中字母"O"表示羥基脯氨酸和字母"X"是疏水殘基(Wallis等，2004，同上)。因此，在一些實施方案中，用於本發明的該方面的MASP-2抑制性肽為至少6個胺基酸長，並包括SEQ ID NO:22。源自MBL的肽，其包括胺基酸序列"GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SEQ ID NO:24)，已經顯示體外結合MASP-2(Wallis等，2004，同上)。為增強與MASP-2的結合，可合成在各末端上側連兩個GPO三聯體的肽("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O" SEQ ID NO:25)，以提高三重螺旋的形成，如天然MBL蛋白中發現

的那樣(進一步描述於Wallis, R.等，*J. Biol. Chem. 279*: 14065, 2004)。

MASP-2抑制性肽還可源自人H-纖維膠凝蛋白，其包括來自H-纖維膠凝蛋白中的共有MASP-2結合區的序列"GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO" (SEQ ID NO:27)。還包括源自人L-纖維膠凝蛋白的肽，其包括來自在L-纖維膠凝蛋白中的共有MASP-2結合區的序列"GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO" (SEQ ID NO:28)。

MASP-2抑制性肽還可源自C4裂解位點，例如"LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEQ ID NO:29)，其是與抗凝血酶III的C-末端部分連接的C4裂解位點(Glover, G. I.等，*Mol. Immunol. 25*:1261 (1988))。

表 3：示例性的 MASP-2 抑制性肽

SEQ ID NO	來源
SEQ ID NO:6	人 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:8	MASP-2 的 CUBI 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	MASP-2 的 CUBIEGF 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	MASP-2 的 CUBIEGFCUBII 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	MASP-2 的 EGF 結構域(aa 122-166)
SEQ ID NO:12	MASP-2 的絲氨酸-蛋白酶結構域(aa 429-671)
SEQ ID NO:16	MASP-2 中的 MBL 結合區
SEQ ID NO:3	人 MAp19
SEQ ID NO:21	人 MBL 蛋白
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, 其中"O" = 羥基脯氨酸和"X"是疏水胺基酸殘基	來自人 MBL 和人纖維膠凝蛋白的合成肽共有結合位點
SEQ ID NO:23 OGKLG	人 MBL 核心結合位點
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	證實與 MASP-2 結合的人 MBP 三聯體 6-10-
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPO GKLGPOGGPOGPO	人 MBP 三聯體，加入 GPO 以提高三重螺旋的形成
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEP GQGLRGLQGPOGKLG POGNOGPSGSOGPKG QKGDOGKS	人 MBP 三聯體 1-17
SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQ GPOGPOGKMGPKGEO GDO	人 H-纖維膠凝蛋白(Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGE AGTNGKRGERGPOGP OGKAGPOGPNGAOGE O	人 L-纖維膠凝蛋白 P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKA NRPFLVFI	人 C4 裂解位點

注意：字母"O"表示羥基脯氨酸。字母"X"是疏水殘基。

源自 C4 裂解位點的肽以及抑制 MASP-2 絲氨酸蛋白酶

位點的其它肽可經化學修飾，以致它們是不可逆的蛋白酶抑制劑。例如，合適的修飾可包括但不必然限於在C-末端、Asp或Glu或附加到官能側鏈上的鹵代甲基酮(Br、Cl、I、F)；在氨基或其它官能側鏈上的鹵代乙醯基(或其它α-鹵代乙醯基)；在氨基或羧基末端上或在官能側鏈上包含環氧化物或亞胺的基團；或在氨基或羧基末端上或在官能側鏈上的亞胺酸酯。這樣的修飾將提供通過肽的共價連接而永久抑制酶的益處。這可導致較低的有效劑量和/或需要較低頻率給予肽抑制劑。

除了上文所述的抑制性肽之外，用於本發明方法的MASP-2抑制性肽包括包含如本文所述獲得的抗-MASP-2 MoAb的MASP-2-結合CDR3區的肽。用於合成肽的CDR區的序列可通過本領域已知的方法確定。重鏈可變區是通常範圍為100-150個胺基酸長的肽。輕鏈可變區是通常範圍為80-130個胺基酸長的肽。在重鏈和輕鏈可變區內的CDR序列僅包括大約3-25個胺基酸的序列，其可容易地由本領域普通技術人員測序。

本領域技術人員將認識到，上述的MASP-2抑制性肽的基本上同源變體也將顯示MASP-2抑制活性。示例性的變體包括但不必然限於在所述主題肽的羧基末端或氨基末端部分上具有插入、缺失、置換和/或另外的胺基酸的肽和其混合物。因此，具有MASP-2抑制活性的那些同源肽被認為可用於本發明的方法。所述的肽還可包括重複基序和具有保守置換的其它修飾。保守變體在本文他處有所描

述，包括胺基酸交換為具有類似電荷、大小或疏水性等的另一胺基酸。

MASP-2抑制性肽可經修飾以增加溶解度和/或使正電荷或負電荷最大化，以更接近地模擬完整蛋白中的區段。衍生物可以具有或可以不具有確切的本文公開的肽的一級胺基酸結構，只要衍生物在功能上保留所需的MASP-2抑制性質。修飾可包括用通常已知的20種胺基酸之一或用另一種胺基酸、用具有輔助需要特性(例如抵抗酶降解)的衍生的或取代的胺基酸或用D-胺基酸的胺基酸置換，或用另一種模擬一個胺基酸、多個胺基酸或肽的天然構象和功能的分子或化合物例如碳水化合物置換；胺基酸缺失；用通常已知的20種胺基酸之一或用另一種胺基酸、用具有輔助需要特性(例如抵抗酶降解)的衍生的或取代的胺基酸或用D-胺基酸的胺基酸插入，或用另一種模擬一個胺基酸、多個胺基酸或肽的天然構象和功能的分子或化合物例如碳水化合物置換；或用另一種模擬母體肽的天然構象、電荷分佈和功能的分子或化合物例如碳水化合物或核酸單體置換。肽還可通過乙醯化或醯胺化修飾。

衍生物抑制性肽的合成可依賴於已知的肽生物合成、碳水化合物生物合成等技術。作為起點，技術人員可依賴於合適的電腦程式以確定目的肽的構象。一旦獲知本文公開的肽的構象，則技術人員可以合理的設計方式確定可在一個或多個位點上進行什麼類型的置換，以形成保留母體肽的基本構象和荷電分佈但可具有母體肽中不存在或比母

體肽中存在的那些提高的特性的衍生物。一旦候選衍生分子被鑒定，所述衍生物可使用本文描述的測定法經測試以確定它們是否作為MASP-2抑制劑起作用。

篩選MASP-2抑制性肽

還可使用分子建模和合理分子設計以產生和篩選模擬MASP-2的關鍵結合區的分子結構和抑制MASP-2的補體活性的肽。用於建模的分子結構包括抗-MASP-2單克隆抗體的CDR區，以及已知對MASP-2功能是重要的靶標區，包括二聚化所需要的區、參與結合MBL的區和絲氨酸蛋白酶活性位點，如先前所述。用於鑒定結合特定靶標的肽的方法是本領域眾所周知的。例如，分子印跡可用於從頭構建大分子結構，例如結合特定分子的肽。參見例如，Shea, K. J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sties," *TRIP 2*(5) 1994。

作為說明性的實例，一種製備MASP-2結合肽的模擬物的方法如下。將顯示MASP-2抑制的已知的MASP-2結合肽或抗-MASP-2抗體的結合區的功能單體(範本)聚合。然後除去範本，接著在範本留下的空隙中聚合第二類單體，以提供顯示類似於範本的一個或多個所需性質的新分子。除了以這種方式製備肽之外，也可製備作為MASP-2抑制劑的其它MASP-2結合分子例如多糖、核苷、藥物、核蛋白、脂蛋白、碳水化合物、糖蛋白、類固醇、脂質和其它

生物活性物質。該方法可用於設計比它們的天然對應物更穩定的各種生物模擬物，因為它們通常通過功能單體的自由基聚合製備，產生具有不可生物降解的主鏈的化合物。

肽合成

MASP-2抑制性肽可使用本領域眾所周知的技術製備，例如固相合成技術，其最初由Merrifield在*J. Amer. Chem. Soc. 85*:2149-2154, 1963中描述。自動合成可例如，按照製造商提供的說明書使用Applied Biosystems 431A肽合成儀(Foster City, Calif.)實現。其它技術可見於例如，Bodanszky, M.等，*Peptide Synthesis*, 第二版, John Wiley & Sons, 1976以及本領域技術人員已知的其它參考文獻。

肽還可使用本領域技術人員已知的標準基因工程改造技術製備。例如，肽可經酶促產生：將編碼肽的核酸插入表達載體，表達DNA和在存在需要的胺基酸的情況下翻譯DNA成肽。然後使用色譜或電泳技術，或借助可通過將編碼載體蛋白的核酸序列與肽編碼序列同相插入表達載體與肽融合和隨後從肽裂解的載體蛋白將肽純化。融合蛋白-肽可使用色譜、電泳或免疫學技術(例如通過載體蛋白的抗體與樹脂結合)分離。肽可使用化學方法或經酶，例如水解酶裂解。

可用於本發明方法的MASP-2抑制性肽還可在重組宿主細胞中按常規技術產生。為了表達MASP-2抑制性肽編碼序列，編碼所述肽的核酸分子必須與在表達載體中控制

轉錄表達的調節序列可操作連接，然後引入至宿主細胞。除了轉錄調節序列例如啟動子和增強子之外，表達載體可包括翻譯調節序列和標記物基因，其適合於選擇帶有表達載體的細胞。

編碼MASP-2抑制性肽的核酸分子可用"基因機器"使用方案例如磷酸亞胺酸酯方法合成。如果化學合成的雙鏈是應用例如合成基因或基因片段需要的，則各互補鏈單獨製備。短基因(60-80個堿基對)的產生在技術上是簡單的，可通過合成互補的鏈然後將它們退火實現。對於產生較長的基因，將合成的基因(雙鏈)以模組形式從20-100個核苷酸長的單鏈片段裝配。對於有關多核苷酸合成的綜述，參見例如，Glick和Pasternak, "*Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA*", ASM Press, 1994; Itakura, K.等，*Annu. Rev. Biochem. 53*:323, 1984; 和Climie, S.等，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87*:633, 1990。

小分子抑制劑

在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是具有低分子量的小分子抑制劑，包括天然和合成物質，例如肽、擬肽和非肽抑制劑(包括寡核苷酸和有機化合物)。MASP-2的小分子抑制劑可基於抗-MASP-2抗體的可變區的分子結構產生。

小分子抑制劑還可根據MASP-2晶體結構使用電腦藥

物設計而設計和產生(Kuntz I. D.等，*Science 257*:1078, 1992)。已經描述了大鼠MASP-2的晶體結構(Feinberg, H.，等，*EMBO J. 22*:2348-2359, 2003)。使用Kuntz等描述的方法，MASP-2晶體結構座標用作電腦程式例如DOCK的輸入，其輸出預期結合MASP-2的小分子結構的列表。這樣的電腦程式的使用是本領域技術人員眾所周知的。例如，通過使用程式DOCK評價在Cambridge Crystallographic資料庫中存在的化合物與酶的結合位點的配合度，HIV-1蛋白酶抑制劑的晶體結構用於鑒定作為HIV-1蛋白酶抑制劑的獨特的非肽配體(Kuntz, I. D.等，*J. Mol. Biol. 161*: 269-288, 1982; DesJarlais, R. L.，等，*PNAS 87*:6644-6648, 1990)。

通過電腦方法鑒定為潛在的MASP-2抑制劑的小分子結構的列表使用MASP-2結合測定法，例如實施例10中描述的測定法進行篩選。然後在功能測定法例如實施例2中描述的測定法中測定發現結合MASP-2的小分子，以確定它們是否抑制MASP-2-依賴性補體活化。

MASP-2可溶性受體

認為其它合適的MASP-2抑制劑包括MASP-2可溶性受體，其可使用本領域普通技術人員已知的技術產生。

MASP-2的表達抑制劑

在本發明的該方面的另一實施方案中，MASP-2抑制

劑是MASP-2表達抑制劑，其能夠抑制MASP-2-依賴性補體活化。在本發明的該方面的實施中，代表性的MASP-2表達抑制劑包括MASP-2反義核酸分子(例如反義mRNA、反義DNA或反義寡核苷酸)、MASP-2核酶和MASP-2 RNAi分子。

反義RNA和DNA分子用於通過與MASP-2 mRNA雜交和阻止MASP-2蛋白的翻譯直接阻斷MASP-2 mRNA的翻譯。反義核酸分子可以許多不同的方式構建，條件是它能夠干擾MASP-2的表達。例如，反義核酸分子可通過相對於其正常轉錄取向，使MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4)的編碼區(或其一部分)反轉來構建，以允許轉錄其互補物。

反義核酸分子通常與一個或多個靶基因的至少一部分基本上相同。然而，核酸不需要完全相同以抑制表達。通常，較高的同源性可用於補償較短的反義核酸分子的使用。最小的百分比同一性通常大於約65%，但較高的百分比同一性可對內源序列的表達產生更有效阻遏。超過約80%的顯著較大的百分比同一性通常是優選的，儘管約95%的絕對同一性通常是最優選的。

反義核酸分子不需要具有與靶基因相同的內含子或外顯子模式，和靶基因的非編碼區段可與編碼區段同樣在實現靶基因表達的反義阻遏中有效。至少約8個左右的核苷酸的DNA序列可用作反義核酸分子，儘管更長的序列是優選的。在本發明中，有用的MASP-2抑制劑的代表性實例是與由SEQ ID NO:4所示的核酸序列組成的MASP-2 cDNA

的互補序列具有至少90%同一性的反義MASP-2核酸分子。SEQ ID NO:4所示的核酸序列編碼由SEQ ID NO:5所示的胺基酸序列組成的MASP-2蛋白。

反義寡核苷酸靶向結合MASP-2 mRNA是可用於降低MASP-2蛋白合成水準的另一機制。例如，多聚半乳糖醛酸酶和毒蕈鹼2型乙醯膽鹼受體的合成被針對它們各自的mRNA序列的反義寡核苷酸抑制(Cheng的美國專利號5,739,119和Shewmaker的美國專利號5,759,829)。此外，反義抑制的實例用核蛋白細胞週期蛋白、多藥抗性基因(MDG1)、ICAM-1、E-選擇蛋白、STK-1、紋狀體$GABA_A$受體和人EGF得到證實(參見例如，Baracchini的美國專利號5,801,154；Baker的美國專利號5,789,573；Considine的美國專利號5,718,709；和Reubenstein的美國專利號5,610,288)。

已經描述了允許普通技術人員確定哪些寡核苷酸可用於本發明的系統，其包括使用Rnase H裂解作為轉錄物內的序列的可及性的指示劑，探查在靶標mRNA中的合適位點。Scherr, M.等，*Nucleic Acids Res. 26*:5079-5085, 1998; Lloyd，等，*Nucleic Acids Res. 29*:3665-3673, 2001。將與MASP-2轉錄物的某些區互補的反義寡核苷酸的混合物加入至表達MASP-2的細胞提取物中，例如肝細胞，和雜交以產生RNAseH易感位點。該方法可與電腦輔助的序列選擇組合，所述電腦輔助的序列選擇可根據它們形成二聚體、髮夾結構或其它二級結構的相對能力預測反義組合物

的最佳序列選擇，所述二級結構將降低或抑制與在宿主細胞中的靶標mRNA特異性結合。這些二級結構分析和靶標位元點選擇考慮可使用OLIGO引物分析軟體(Rychlik, I., 1997)和BLASTN 2.0.5演算法軟體(Altschul, S.F.，等，*Nucl. Acids Res. 25*:3389-3402, 1997)進行。針對靶標序列的反義化合物優選地包括約8-約50個核苷酸長度。包括約9-約35個左右核苷酸的反義寡核苷酸是特別優選的。本發明人考慮了對於實施本發明的基於反義寡核苷酸的方法，範圍為9-35個核苷酸(即，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或35個左右堿基長的那些)的所有寡核苷酸組合物是高度優選的。MASP-2 mRNA的高度優選的靶標區是在AUG翻譯起始密碼子處或其附近的那些，和與mRNA的5'區基本上互補的那些序列，例如，在*MASP-2*基因核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的–10和+10區之間。示例性的MASP-2表達抑制劑提供在表4中。

表4：MASP-2的示例性的表達抑制劑

SEQ ID NO:30 (SEQ ID NO:4的核苷酸22-680)	編碼CUBIEGF的MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4)的核酸序列
SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3	SEQ ID NO:4的核苷酸12-45，包括MASP-2翻譯起始位點(有義)
SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'	SEQ ID NO:4的核苷酸361-396，編碼包括MASP-2 MBL結合位點的區(有義)
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3'	SEQ ID NO:4的核苷酸610-642，編碼包括CUBII結構域的區

如上文所述，如本文所用的術語"寡核苷酸"是指核糖核酸(RNA)或去氧核糖核酸(DNA)或其模擬物的寡聚體或聚合物。該術語還涵蓋那些寡核苷堿基，包含天然存在的核苷酸、糖和共價核苷間(主鏈)鍵以及具有非-天然存在的修飾的寡核苷酸。這些修飾允許引入通過天然存在的寡核苷酸不能提供的某些需要的性質，例如毒性降低、針對核酸酶降解的穩定性增加和細胞攝取增加。在說明性的實施方案中，本發明的反義化合物不同於天然DNA之處在於修飾磷酸二酯主鏈以延長反義寡核苷酸的壽命，所述反義寡核苷酸中的磷酸酯取代基被置換為硫代磷酸酯。同樣，寡核苷酸的一個或兩個末端可被一個或多個吖啶衍生物取代，其嵌入在核酸鏈內的鄰近的堿基對之間。

反義的另一選擇方案是使用"RNA干擾" (RNAi)。雙鏈RNA (dsRNA)可在哺乳動物體內引起基因沉默。RNAi的天然功能和共阻遏似乎是基因組針對移動性遺傳元件例如反轉座子和病毒入侵的保護，所述遺傳元件當變得具有活性時在宿主細胞中產生異常RNA或dsRNA(參見例如，Jensen, J.，等，*Nat. Genet. 21*:209-12, 1999)。雙鏈RNA分子可通過合成能夠形成雙鏈RNA分子的兩條RNA鏈製備，每條鏈具有約19至25 (例如，19-23個核苷酸)的長度。例如，用於本發明方法的dsRNA分子可包括對應於表4中所列的序列和其互補序列的RNA。優選地，RNA的至少一條鏈具有1-5個核苷酸的3'突出。合成的RNA鏈在形成雙鏈分子的條件下合併。RNA序列可包括SEQ ID NO:4的

至少8個核苷酸的部分，其總長度為25個核苷酸或更小。設計給定靶標的siRNA序列在本領域普通技術的範圍內。可使用設計siRNA序列和保證表達至少70%敲減的商業化服務(Qiagen, Valencia, Calif)。

dsRNA可作為藥物組合物給予和通過已知方法進行，其中將核酸引入至所需的靶細胞中。通常使用的基因轉移方法包括磷酸鈣、DEAE-葡聚糖、電穿孔、顯微注射和病毒方法。這樣的方法在Ausubel等，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1993中教導。

核酶也可用於降低MASP-2的量和/或生物活性，例如靶向MASP-2 mRNA的核酶。核酶是催化性RNA分子，其可裂解具有完全或部分與核酶序列同源的序列的核酸分子。有可能設計編碼RNA核酶的核酶轉基因，其特異性地與靶標RNA配對和在特定位置上裂解磷酸二酯主鏈，從而在功能上滅活靶標RNA。在進行這種裂解時，核酶本身不改變，因此能夠迴圈和裂解其它分子。在反義RNA內包含核酶序列，賦予它們RNA-裂解活性，從而增加反義構建體的活性。

用於實施本發明的核酶通常包括至少約9個核苷酸的雜交區，其在核苷酸序列上與靶標MASP-2 mRNA的至少一部分互補；和催化區，其適合裂解靶標MASP-2 mRNA(通常參見EPA No. 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J.等，*Nature 334*:585-591, 1988; Fedor, M. J.，等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87*:1668-1672, 1990; Cech, T. R.，等，

Ann. Rev. Biochem.55:599-629, 1986)。

核酶可以摻有核酶序列的RNA寡核苷酸的形式直接靶向細胞，或作為編碼所需核酶RNA的表達載體引入至細胞。核酶可以與對於反義多核苷酸所述的幾乎相同的方式使用和應用。

用於本發明方法的反義RNA和DNA、核酶和RNAi分子可通過本領域已知用於合成DNA和RNA分子的任何方法製備。這些方法包括用於化學合成本領域眾所周知的寡聚去氧核糖核苷酸和寡聚核糖核苷酸的技術，例如固相磷酸亞胺酸酯化學合成。或者，RNA分子可通過編碼反義RNA分子的DNA序列的體外和體內轉錄產生。這樣的DNA序列可摻入至包含合適RNA聚合酶啟動子例如T7或SP6聚合酶啟動子的各種載體中。或者，組成地或誘導地(取決於使用的啟動子)合成反義RNA的反義cDNA構建體可穩定地引入至細胞系。

DNA分子的各種眾所周知的修飾可作為增加穩定性和半壽期的工具引入。有用的修飾包括但不限於添加核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸的側翼序列至分子的5'和/或3'端或在寡聚去氧核糖核苷酸主鏈內使用硫代磷酸酯或2' O-甲基而非磷酸二酯酶鍵。

VI. 藥物組合物和遞送方法

給藥

在另一方面，本發明提供用於在患有本文公開的疾病

或病況的受試者中抑制MASP-2-依賴性補體活化的不良作用的組合物，包括給予受試者包含治療有效量的MASP-2抑制劑和藥學上可接受的載體的組合物。MASP-2抑制劑可以治療有效劑量給予有需要的受試者以治療或改善與MASP-2-依賴性補體活化有關的病況。治療有效劑量是指足以導致與所述疾病或病況有關的症狀改善的MASP-2抑制劑的量。

MASP-2抑制劑的毒性和治療功效可通過標準藥學程式，使用實驗動物模型，例如實施例1中描述的表達人MASP-2轉基因的鼠MASP-2 -/-小鼠模型測定。使用這樣的動物模型，NOAEL (未觀察到不良作用水準)和MED (最小有效劑量)可使用標準方法測定。NOAEL和MED效果之間的劑量比率是治療比，其表示為比率NOAEL/MED。顯示大的治療比或指數的MASP-2抑制劑是最優選的。獲自細胞培養測定法和動物研究的資料可用於配製人用劑量範圍。MASP-2抑制劑的劑量優選地在迴圈濃度的範圍內，其包括幾乎沒有或沒有毒性的MED。劑量可在該範圍內改變，取決於使用的劑型和使用的給藥途徑。

對於任何化合物製劑，治療有效劑量可使用動物模型進行評估。例如，劑量可在動物模型中配製以實現包括MED的迴圈血漿濃度範圍。MASP-2抑制劑在血漿中的定量水準還可例如通過高效液相色譜測量。

除了毒性研究之外，有效劑量還可基於存在於活的受試者中的MASP-2蛋白的量和MASP-2抑制劑的結合親和力

估算。已經顯示，在正常人受試者中MASP-2水準以範圍為500 ng/ml的低水準存在於血清中，和在具體的受試者中的MASP-2水準可使用用於MASP-2的定量測定法測定，其描述於Moller-Kristensen M.等，*J. Immunol. Methods 282*: 159-167, 2003。

通常，給予的包括MASP-2抑制劑的組合物的劑量根據以下因素而改變，例如所述受試者的年齡、體重、身高、性別、一般醫學狀況和之前的病史。作為示例，MASP-2抑制劑，例如抗-MASP-2抗體，可以約0.010至10.0 mg/kg、優選地0.010至1.0 mg/kg、更優選地0.010至0.1 mg/kg的受試者體重的劑量範圍給予。在一些實施方案中，組合物包括抗-MASP-2抗體和MASP-2抑制性肽的組合。

本發明的MASP-2抑制性組合物和方法在給定受試者中的治療功效和合適的劑量可根據本領域技術人員眾所周知的補體測定法測定。補體產生許多特異性產物。在近十年來，已經開發了靈敏和特異的測定法，並且對於大多數這些活化產物，包括小活化片段C3a、C4a和C5a和大活化片段iC3b、C4d、Bb和sC5b-9，這些測定法為市售可得的。大多數這些測定法利用與在所述片段上，而不是在它們從其中形成的天然蛋白上暴露的新抗原(neoantigen)反應的單克隆抗體，這使得這些測定法非常簡單和特異。大多數依賴於ELISA技術，儘管放射免疫測定法有時仍用於C3a和C5a。這些後來的測定法測量未處理的片段和它們的

“脫Arg”片段，其是迴圈中存在的主要形式。未處理的片段和C5a脫Arg通過結合細胞表面受體被快速清除，因此以非常低的濃度存在，而C3a脫Arg不結合細胞和在血漿中積聚。C3a的測量提供補體活化的靈敏的、途徑-非依賴性的指示劑。替代途徑活化可通過測量Bb片段進行評價。膜攻擊途徑活化的液相產物sC5b-9的檢測，提供補體被啟動至完成的證據。因為凝集素和經典途徑兩者均產生相同的活化產物C4a和C4d，因此這兩個片段的測量不提供關於這兩個途徑中哪一個產生所述活化產物的任何資訊。

MASP-2-依賴性補體活化的抑制的特徵為由於根據本發明的方法給予MASP-2抑制劑而出現的在補體系統的組分中的以下變化的至少一個：MASP-2-依賴性補體活化系統產物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9 (MAC)的形成或產生的抑制(例如按實施例2中所述測量)、C4裂解和C4b沉積減少(例如按實施例10中所述測量)或C3裂解和C3b沉積減少(例如按實施例10中所述測量)。

其它試劑

包括MASP-2抑制劑的組合物和方法可任選地包括一種或多種其它治療劑，其可增加MASP-2抑制劑的活性或以累加或協同的方式提供相關的治療功能。例如，在治療患有TTP的受試者的情況下，其中所述受試者對於ADAM-TS13抑制劑為陽性，一種或多種MASP-2抑制劑可與一種或多種免疫抑制劑組合給予(包括共-給予)。合適的免疫抑

制劑包括：皮質類固醇、rituxan、環孢黴素等。在治療患有或有風險發生HUS或aHUS的受試者的情況下，一種或多種MASP-2抑制劑可與合適的抗生素組合給予(包括共-給予)。在治療患有或有風險發生aHUS的受試者的情況下，一種或多種MASP-2抑制劑可與其它補體抑制劑例如艾庫組單抗(Soliris)、TT-30、因數B的抗體或抑制末端補體組分或替代途徑放大的其它試劑組合給予(包括共-給予)。

將確定其它試劑的包含和選擇以實現需要的治療結果。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑可與一種或多種抗-炎藥和/或止痛藥組合給予。合適的抗-炎藥和/或止痛藥包括：血清素受體拮抗劑；血清素受體激動劑；組胺受體拮抗劑；緩激肽受體拮抗劑；血管舒緩素抑制劑；速激肽受體拮抗劑，包括神經激肽$_1$和神經激肽$_2$受體亞型拮抗劑；降鈣素基因-相關肽(CGRP)受體拮抗劑；白介素受體拮抗劑；花生四烯酸代謝物合成途徑中有活性的酶的抑制劑，包括磷脂酶抑制劑，包括PLA_2同種型抑制劑和PLCγ同種型抑制劑、環氧合酶(COX)抑制劑(其可以是COX-1、COX-2或非選擇性COX-1和-2抑制劑)、脂加氧酶抑制劑；類前列腺素受體拮抗劑，包括類花生酸EP-1和EP-4受體亞型拮抗劑和血栓素受體亞型拮抗劑；白三烯受體拮抗劑，包括白三烯B4受體亞型拮抗劑和白三烯D4受體亞型拮抗劑；阿片樣物質受體激動劑，包括μ-阿片樣物質、δ-阿片樣物質和κ-阿片樣物質受體亞型激動劑；嘌呤受體激動劑和拮抗劑，包括P2X受體拮抗劑和P2Y受體激動劑；腺苷

三磷酸(ATP)-敏感性鉀通道開放劑；MAP激酶抑制劑；煙鹼乙醯膽鹼抑制劑；和α腎上腺素能受體激動劑(包括α-1、α-2和非選擇性α-1和2激動劑)。

本發明的MASP-2抑制劑還可與一種或多種其它補體抑制劑，例如C5的抑制劑組合給予。迄今為止，艾庫組單抗(Solaris®)，一種針對C5的抗體，是唯一的補體-靶向藥物，其已被批准人用。然而，一些藥劑已經顯示在體內阻斷補體。K76COOH和甲磺酸萘莫司他(nafamstat mesilate)是已經在移植的動物模型中顯示一些有效性的兩種試劑(Miyagawa, S.等，*Transplant Proc. 24*:483-484, 1992)。低分子量肝素也已經顯示在調節補體活性中有效(Edens, R.E.等，*Complement Today*, pp. 96-120, Basel: Karger, 1993)。認為這些小分子抑制劑可用作與本發明的MASP-2抑制劑組合使用的試劑。

其它天然存在的補體抑制劑可與本發明的MASP-2抑制劑組合使用。補體的生物抑制劑包括可溶性補體因數1(sCR1)。這是一種天然存在的抑制劑，其可在人細胞的外膜上發現。其它膜抑制劑包括DAF、MCP和CD59。已經對於重組形式的體外和體內抗-補體活性，測試了重組形式。sCR1已經顯示在異種移植中有效，其中在灌注血液通過新移植的器官的幾分鐘內，補體系統(替代和經典兩者)提供活動過度排斥綜合征的觸發劑(Platt, J. L.等，*Immunol. Today 11*:450-6, 1990; Marino, I. R.等，*Transplant Proc. 1071*:6, 1990; Johnstone, P. S.等，

Transplantation 54:573-6, 1992)。sCR1的使用保護和延長移植的器官的存活時間，在器官存活的發病機理中牽涉到補體途徑(Leventhal, J. R.等，*Transplantation 55*:857-66, 1993; Pruitt, S. K.等，*Transplantation 57*:363-70, 1994)。

以實例的方式，與本發明的組合物組合使用的合適的其它補體抑制劑還包括MoAbs，例如由Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut開發的抗-C5抗體(例如，艾庫組單抗)和抗-備解素MoAbs。

藥用載體和遞送媒介

通常，本發明的MASP-2抑制劑組合物，與任何其它選擇的治療劑組合，合適地包含在藥學上可接受的載體中。所述載體是無毒的、生物相容的和經選擇使得不會有害地影響MASP-2抑制劑(和與其組合的任何其它治療劑)的生物活性。對於肽的示例性的藥學上可接受的載體描述於Yamada的美國專利號5,211,657。用於本發明的抗-MASP-2抗體和抑制性肽可配製成呈固體、半固體、凝膠、液體或氣體形式的製劑，例如片劑、膠囊劑、粉劑、顆粒劑、軟膏劑、溶液劑、貯庫製劑、吸入劑和注射劑，其允許口服、胃腸外或手術給予。本發明還考慮了通過包覆醫學裝置等局部給予組合物。

用於通過注射、輸注或灌洗的胃腸外遞送和局部遞送的合適載體包括蒸餾水、生理學磷酸緩衝鹽水、正常或乳酸林格溶液、葡萄糖溶液、Hank溶液或丙二醇。另外，無

菌的固定油可用作溶劑或懸浮介質。對於該目的，可使用任何生物相容的油，包括合成的甘油一酯或甘油二酯。另外，脂肪酸例如油酸可用於製備注射劑。可將載體和試劑混合為液體、混懸液、聚合或非聚合凝膠、糊劑或油膏。

載體還可包括遞送媒介以維持(即，延長、延遲或調節)試劑的遞送或增強治療劑的遞送、攝取、穩定性或藥代動力學。通過非限制性實例的方式，這樣的遞送介質可包括包含蛋白的微粒、微球、納米球或納米粒；脂質體、碳水化合物、合成的有機化合物、無機化合物、聚合或共聚水凝膠和聚合膠束。合適的水凝膠和膠束遞送系統包括WO 2004/009664 A2中公開的PEO:PHB:PEO共聚物和共聚物/環糊精複合物，和美國專利申請號2002/0019369 A1中公開的PEO和PEO/環糊精複合物。這樣的水凝膠可局部注射在預期作用的部位處，或經皮下或肌內注射形成延遲釋放貯庫。

對於關節內遞送，MASP-2抑制劑可包含在上述可注射的液體或凝膠載體、上述可注射的持續釋放遞送媒介或透明質酸或透明質酸衍生物中。

對於口服給予非-肽能藥，MASP-2抑制劑可包含在惰性填充劑或稀釋劑中，例如蔗糖、玉米澱粉或纖維素。

對於局部給予，MASP-2抑制劑可保持在軟膏劑、洗劑、霜劑、凝膠劑、滴劑、栓劑、噴霧劑、液體或粉劑中，或通過經皮貼劑在凝膠或微膠囊遞送系統中。

各種經鼻和肺遞送系統，包括氣霧劑、計量吸入器、

乾粉吸入器和噴霧器，正在開發和可經合適改變用於分別在氣霧劑、吸入劑或噴霧遞送媒介中進行本發明的遞送。

對於鞘內(IT)或腦室內(ICV)遞送，合適的無菌遞送系統(例如，液體、凝膠、混懸劑等)可用於給予本發明。

本發明的組合物還可包括生物相容的賦形劑，例如分散劑或濕潤劑、助懸劑、稀釋劑、緩衝劑、滲透促進劑、乳化劑、粘合劑、增稠劑、矯味劑(用於口服給予)。

用於抗體和肽的藥用載體

關於抗-MASP-2抗體和抑制性肽更特別的是，示例性的製劑可在含有藥用載體的生理學可接受的稀釋劑中作為注射劑量的化合物溶液或混懸液經胃腸外給予，所述載體可以是無菌液體，例如水、油、鹽水、甘油或乙醇。此外，輔助物質例如濕潤劑或乳化劑、表面活性劑、pH緩衝物質等可存在於包括抗-MASP-2抗體和抑制性肽的組合物中。藥物組合物的其它組分包括油(例如動物、植物或合成來源)，例如，大豆油和礦物油。通常，二醇例如丙二醇或聚乙二醇是用於注射溶液的優選的液體載體。

抗-MASP-2抗體和抑制性肽還可以貯庫注射劑或植入製劑的形式給予，其可以允許活性劑的持續或脈動釋放的方式配製。

用於表達抑制劑的藥學上可接受的載體

關於用於本發明方法的表達抑制劑更特別的是，提供

包括上述表達抑制劑和藥學上可接受的載體或稀釋劑的組合物。組合物還可包括膠體分散系統。

包含表達抑制劑的藥物組合物可包括但不限於溶液劑、乳劑和包含脂質體的製劑。這些組合物可自各種組分產生，包括但不限於預形成的液體、自乳化固體和自乳化半固體。這樣的組合物的製備通常包括混合表達抑制劑與以下的一種或多種：緩衝劑、抗氧化劑、低分子量多肽、蛋白、胺基酸、碳水化合物包括葡萄糖、蔗糖或糊精；螯合劑例如EDTA、谷胱甘肽和其它穩定劑和賦形劑。中性緩衝鹽水或與非-特異性血清白蛋白混合的鹽水是合適的稀釋劑的實例。

在一些實施方案中，組合物可製備和配製為乳劑，其通常是一種液體以微滴形式分散在另一種液體中的異質系統(參見Idson，於*Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1, Rieger和Banker(編輯)，Marcek Dekker, Inc., N. Y., 1988)。用於乳劑配製的天然存在的乳化劑的實例包括阿拉伯膠、蜂蠟、羊毛脂、卵磷脂和磷脂。

在一個實施方案中，包含核酸的組合物可配製為微乳劑。如本文所用的微乳劑是指水、油和兩親化合物的系統，其是單一的光學各向同性的和熱力學穩定的液體溶液(參見Rosoff於*Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1)。本發明的方法還可使用脂質體用於傳遞和遞送反義寡核苷酸至所需部位。

用於局部給予的表達抑制劑的藥物組合物和製劑可包

括經皮貼劑、軟膏劑、洗劑、霜劑、凝膠、滴劑、栓劑、噴霧劑、液體和粉劑。可使用常規的藥用載體以及水、粉或油性基質和增稠劑等。

給藥方式

可以多種方式給予包含MASP-2抑制劑的藥物組合物，這取決於是局部還是全身性給藥方式最適於待治療的病況。此外，如上文關於體外再灌注程式所述，MASP-2抑制劑可通過引入本發明的組合物至再迴圈血液或血漿而給予。此外，本發明的組合物可通過將組合物塗布或摻入可植入的醫療裝置上面或裡面而遞送。

系統遞送

如本文所用，術語“系統遞送”和“系統給藥”意圖包括但不限於口服和胃腸外途徑，包括肌內(IM)、皮下、靜脈內(IV)、動脈內、吸入、舌下、含服、局部、經皮、經鼻、直腸、陰道和其它給藥途徑，這將所遞送的藥物有效地分散到預期治療作用的一個或多個部位。用於本發明組合物的系統遞送的優選途徑包括靜脈內、肌內、皮下和吸入。應當理解，對於用於本發明具體組合物中所選用的藥物，確切的系統給藥途徑將部分地考慮藥物對與指定給藥途徑相關的代謝轉化途徑的敏感性加以確定。例如，肽能藥物可能最適於通過口服以外的途徑給藥。

可通過任何合適的方法將MASP-2抑制性抗體和多肽

遞送到有需要的受試者中。遞送MASP-2抗體和多肽的方法包括經口服、肺部、胃腸外(例如肌內、腹膜內、靜脈內(IV)或皮下注射)、吸入(例如經由微細粉製劑)、經皮、經鼻、陰道、直腸或者舌下給藥途徑給予，並且可將其配製成適於各種給藥途徑的劑型。

通過代表性實例的方式，可以通過將MASP-2抑制性抗體和肽應用到能夠吸收多肽的身體膜上，例如鼻膜、胃腸膜和直腸膜，而將其引入活體內。通常將多肽和滲透促進劑一起應用到可吸收膜上(參見例如Lee, V. H. L., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 5*:69, (1988)； Lee, V. H. L., *J. Controlled Release13*:213, (1990)；Lee, V. H. L.主編, *Peptide and Protein Drug Delivery,* Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A. G.，等人，*J. Controlled Release 13*:241, (1990)。例如，STDHF是梭鏈孢酸的合成衍生物，是結構上類似於膽鹽的甾類表面活性劑，已被用作經鼻遞送的滲透促進劑(Lee, W. A., *Biopharm. 22*, 1990年11/12月)。

可以引入與其它分子(例如脂質)締合的MASP-2抑制性抗體和多肽，以保護多肽不被酶降解。例如，共價連接聚合物、尤其是聚乙二醇(PEG)已被用來保護某些蛋白質不被體內的酶水解，從而延長半壽期(Fuertges, F.，等人，*J. Controlled Release 11*:139, (1990))。已經報導了許多用於蛋白質遞送的聚合物系統(Bae, Y. H.，等人，*J. Controlled Release9*:271, (1989)；Hori, R.，等人，*Pharm. Res. 6*:813,

(1989); Yamakawa, I.，等人，*J. Pharm. Sci. 79*:505, (1990); Yoshihiro, I.，等人，*J. Controlled Release10*:195, (1989); Asano, M.，等人，*J. Controlled Release 9*:111, (1989); Rosenblatt, J.，等人，*J. Controlled Release 9*:195, (1989); Makino, K., *J. Controlled Release 12*:235, (1990); Takakura, Y.，等人，*J. Pharm. Sci. 78*:117, (1989); Takakura, Y.，等人，*J. Pharm. Sci. 78*:219, (1989))。

最近，開發出血清穩定性和迴圈半壽期得到改進的脂質體(參見例如Webb的美國專利號5,741,516)。而且，對脂質體和脂質體樣製備物作為可能的藥物載體的各種方法進行了綜述(參見例如Szoka的美國專利號5,567,434；Yagi的美國專利號5,552,157；Nakamori的美國專利號5,565,213；Shinkarenko的美國專利號5,738,868以及Gao的美國專利號5,795,587)。

對於經皮應用，可將MASP-2抑制性抗體和多肽與其它合適的成分(例如載體和/或佐劑)混合。對這些其它成分的性質沒有限制，只是對於其預期給藥來說必須是藥學上可接受的，並且不能降低組合物中活性成分的活性。合適媒介的實例包括含或不含純化膠原的軟膏、乳膏、凝膠或混懸液。MASP-2抑制性抗體和多肽還可被浸漬到經皮貼劑、膏藥和繃帶中，優選以液體或半液體形式。

可以在為維持治療效果所需水準而確定的間隔的週期性基礎上，系統給予本發明的組合物。例如，可按每2-4周或者以更低頻率的間隔給予組合物(例如經皮下注射)。

給藥方案將由醫師考慮可能影響藥物聯用的作用的各種因素來確定。這些因素包括待治療疾病的進展程度、患者的年齡、性別和體重和其它臨床因素。各獨立藥物的劑量將隨組合物中所包含的MASP-2抑制劑以及任何遞送媒介(例如緩釋遞送媒介)的存在和性質而變化。此外，可在考慮給藥頻率和所遞送藥物的藥代動力學行為的變化後對劑量進行調整。

局部遞送

本文所用術語“局部”包括藥物在預期局部化作用部位上或其周圍的應用，可包括例如局部遞送到皮膚或其它受累組織；眼部遞藥；鞘內(IT)、腦室內(ICV)、關節內、腔內、顱內或肺泡內給藥、安置或沖洗。可優選能夠給予較低劑量的局部給藥以避免全身性不良作用，以及更精確地控制遞藥時間和局部遞藥部位的活性劑濃度。不論患者之間在新陳代謝、血流等方面的變化，局部給藥都在目標部位提供已知的濃度。通過直接遞藥方式亦提供改進的劑量控制。

MASP-2抑制劑的局部遞送可在手術方法的情況下實現以治療疾病或病況，例如在動脈旁路術、經皮腔內斑塊旋切術、鐳射手術、超聲波手術、氣囊血管成形術以及支架安置等手術期間。例如，可將MASP-2抑制劑與氣囊血管成形手術結合起來給予受試者。氣囊血管成形手術包括將帶有已排氣的氣囊的導管插入動脈內。將已排氣的氣囊

置於動脈粥樣硬化斑塊附近，給氣囊充氣使得斑塊向血管壁擠壓。結果，氣囊表面與血管表面的血管內皮細胞層接觸。可以按允許藥物在動脈粥樣硬化斑塊部位釋放的方式，將MASP-2抑制劑附著到氣囊血管成形術導管上。可按照本領域已知標準程式將藥物附著在氣囊導管上。例如，可將藥物保存在氣囊導管的隔室中直到氣囊充氣，此時藥物被釋放到局部環境中。或者，可將藥物浸漬在氣囊表面，使得當氣囊充氣時，藥物就接觸到動脈壁的細胞。還可在多孔氣囊導管中遞送藥物，例如Flugelman, M. Y.，等人，*Circulation85*:1110-1117, (1992)中公開的那些。另見已公開的PCT申請WO 95/23161中對於將治療性蛋白附著到氣囊血管成形術導管上的示例性程式。同樣地，可將MASP-2抑制劑包括在應用於支架上的凝膠或聚合塗層中，或者可將其摻入支架材料中，使得支架在血管安置之後將MASP-2抑制劑洗脫出來。

用於治療關節炎和其它肌肉骨骼疾病的MASP-2抑制性組合物可通過關節內注射來局部遞送。這樣的組合物可適當地包括緩釋遞送媒介。作為其中可能需要局部遞送的另一個實例，用於治療泌尿生殖病況的MASP-2抑制性組合物可適當地滴入膀胱內或者其它泌尿生殖結構中。

在醫學裝置上的塗料

MASP-2抑制劑例如抗體和抑制性肽可固定到可植入或可連接的醫學裝置的表面上(或之內)。改性表面在植入

至動物體內後通常將與活組織接觸。"可植入或可連接的醫學裝置"意指任何裝置，其在裝置(例如，支架和可植入遞藥裝置)的正常操作期間植入或連接動物身體組織。這樣的可植入或可連接醫學裝置可由例如，硝酸纖維素、重氮基纖維素、玻璃、聚苯乙烯、聚乙烯氯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、瓊脂糖、瓊脂、澱粉、尼龍、不銹鋼、鈦和可生物降解和/或生物相容聚合物組成。蛋白與裝置的連接可通過不破壞連接的蛋白的生物活性的任何技術，例如通過連接蛋白的一個或兩個N-C-末端殘基至裝置進行。連接還可在蛋白的一個或多個內部位點上進行。可使用多個連接(蛋白的內部和末端)。對於其上的蛋白固定，可植入或可連接醫學裝置的表面可經改性以包括官能團(例如，羧基、醯胺、氨基、醚、羥基、氰基、次氮基、磺醯胺基、炔基(acetylinic)、環氧化物、矽烷基(silanic)、酸酐、琥珀醯亞胺基(succinimic)、疊氮基)。偶聯化學包括但不限於與MASP-2抗體或抑制性肽上可用的官能團形成酯、醚、醯胺、疊氮基和磺醯胺基衍生物、氰酸酯和其它鍵。MASP-2抗體或抑制性片段還可通過添加親和標籤序列至蛋白非-共價地連接，例如GST (D. B. Smith和K. S. Johnson, *Gene 67*:31, 1988)、多組氨酸(E. Hochuli等，*J. Chromatog. 411*:77, 1987)或生物素。這樣的親和標籤可用於將蛋白可逆連接至裝置。

蛋白質還可共價地連接至裝置體的表面，例如通過醫學裝置的表面的共價活化。通過代表性實例的方式，基質

細胞蛋白可通過任何以下活性基團對連接至裝置體(配對的一個成員存在於裝置體的表面上，而配對的另一個成員位於基質細胞蛋白上)：羥基/羧酸以得到酯鍵；羥基/酸酐以得到酯鍵；羥基/異氰酸酯以得到氨基甲酸乙酯鍵。沒有可用的活性基團的裝置體的表面可用射頻放電等離子體(RFGD)蝕刻處理，以產生活性基團，以允許基質細胞蛋白的沉積(例如，用氧等離子體處理以引入含氧基團；用丙基氨基等離子體處理以引入胺基團)。

包含核酸分子的MASP-2抑制劑，例如反義、RNAi-或DNA-編碼肽抑制劑，可埋入與裝置體附接的多孔基質中。用於製備表面層的代表性的多孔基質是自腱或真皮膠原製備的那些，例如可獲自各種市售來源(例如，Sigma和Collagen Corporation)，或按Jefferies的美國專利號4,394,370和Koezuka的4,975,527所述製備的膠原基質。一種膠原材料稱為UltraFiber™和可獲自Norian Corp. (Mountain View, California)。

如果需要的話，某些聚合基質也可使用，和包括丙烯酸酯聚合物和乳酸聚合物，如公開於例如Urist的美國專利號4,526,909和4,563,489。有用的聚合物的具體實例是那些原酸酯、酸酐、丙烯-共聚延胡索酸酯或一個或多個α-羥基羧酸單體(例如，α-羥基乙酸(乙醇酸)和/或α-羥基丙酸(乳酸))的聚合物。

治療方案

在預防性應用中，將藥物組合物給予對與MASP-2-依賴性補體活化有關的病況易感或另外處於與MASP-2-依賴性補體活化有關的病況的風險中的受試者，其量足以消除或降低發生所述病況的症狀的風險。在治療性應用中，將藥物組合物給予疑似或已經患有與MASP-2-依賴性補體活化有關的病況的受試者，其治療有效量足以緩解或至少部分地減輕所述病況的症狀。在預防性和治療性方案兩者中，包含MASP-2抑制劑的組合物可以數個劑量給予，直到在所述受試者中實現足夠的治療結果。本發明的MASP-2抑制性組合物的施用可通過單次給予所述組合物或有限的給予順序進行，用於治療急性病況，例如，再灌注損傷或其它創傷性損傷。或者，可在長期的一段時間內以定期間隔給予組合物用於治療慢性病況，例如，關節炎或銀屑病。

本發明的方法和組合物可用於抑制通常由診斷和治療醫學和手術程式產生的炎症和相關過程。為抑制這樣的過程，本發明的MASP-2抑制性組合物可圍繞程式(periprocedurally)施用。如本文所用的，"圍繞程式"是指在程式前和/或程式中和/或程式後給予抑制性組合物，即，在程式之前；在程式之前和其中；在程式之前和之後；在程式之前、期間和之後；在程式期間；在程式期間和之後；或在程式之後。圍繞程式施用可通過局部給予組合物至手術或程式部位進行，例如通過注射或連續或間斷沖洗部位或通過系統性給予。局部的手術期間遞送MASP-

2抑制劑溶液的合適方法公開於Demopulos的美國專利號6,420,432和Demopulos的6,645,168。局部遞送包括MASP-2抑制劑的軟骨保護性組合物的合適方法公開於國際PCT專利申請WO 01/07067 A2。用於靶向系統遞送包括MASP-2抑制劑的軟骨保護性組合物的合適方法和組合物公開於國際PCT專利申請WO 03/063799 A2。

在本發明的一個方面，將藥物組合物給予患有或有風險發生血栓性微血管病(TMA)的受試者。在一個實施方案中，TMA選自溶血性尿毒綜合征(HUS)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)和非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)。在一個實施方案中，TMA是aHUS。在一個實施方案中，將組合物給予在疾病的急性期的aHUS患者。在一個實施方案中，將組合物給予在緩解期的aHUS患者(即，在已經從急性期aHUS的發作中恢復或部分恢復的受試者中，這樣的緩解通過例如血小板計數增加和/或血清LDH濃度降低證明，例如描述於Loirat C等，*Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:60, 2011，其通過引用結合到本文中)。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生TMA，其是(i)癌症繼發性TMA；(ii) 化學療法繼發性TMA；或(iii) 移植繼發性TMA (例如，器官移植，例如腎移植或同種異體造血幹細胞移植)。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生Upshaw-Schulman綜合征(USS)。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生德戈斯病。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生災難性抗磷脂

綜合征(CAPS)。在治療性應用中，將藥物組合物給予患有或有風險發生TMA的受試者，其治療有效量足以抑制血栓形成，減輕或至少部分地減輕所述病況的症狀。

在預防性和治療性方案兩者中，包含MASP-2抑制劑的組合物可以數個劑量給予，直到已經在所述受試者中實現足夠的治療結果。在本發明的一個實施方案中，MASP-2抑制劑包括抗-MASP-2抗體，其可以0.1 mg至10,000 mg、更合適1.0 mg至5,000 mg、更合適10.0 mg至2,000 mg、更合適10.0 mg至1,000 mg和還更合適50.0 mg至500 mg的劑量合適地給予成年患者(例如，平均成人體重70 kg)。對於兒科患者，可按患者體重的比例調整劑量。本發明的MASP-2抑制性組合物的施用可進行通過單次給予組合物，或有限順序給予，以治療TMA。或者，組合物可在長期的一段時間內以定期間隔例如每日一次、每週兩次、每週一次、每兩週一次、每月一次或每月兩次給予，用於治療TMA。

在一些實施方案中，患有或有風險發生TMA的受試者先前已經經歷或目前正在經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑治療。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包括MASP-2抑制劑的本發明的組合物和進一步給予受試者抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑。在一些實施方案中，末端補體抑制劑是人源化的抗-C5抗體或其抗原結合片段。在一些實施方案中，末端補體抑制劑是艾庫組單抗。

在本發明的一個方面，將藥物組合物給予對aHUS易感或另外處於aHUS的風險中的受試者，其量足以消除或降低發生所述病況的症狀的風險。在治療性應用中，將藥物組合物給予疑似或已經患有aHUS的受試者，其治療有效量足以減輕或至少部分地減輕所述病況的症狀。在本發明的一個方面，在給藥之前，可檢查所述受試者以確定所述受試者是否顯示aHUS的一個或多個症狀，包括(i) 貧血；(ii) 血小板減少症；(iii) 腎功能不全；和(iv) 肌酐升高，然後以有效量給予本發明的組合物持續一段足夠的時間，以改善這些症狀。

在本發明的另一方面，本發明的MASP-2抑制性組合物可用於預防性治療具有升高的發生aHUS的風險的受試者和從而降低所述受試者將呈現aHUS的可能性。首先通過對獲自受試者的樣品進行遺傳篩選測試和鑒定與aHUS有關的至少一種遺傳標記(補體因數H (CFH)、因數I (CFI)、因數B (CFB)、膜輔因數CD46、C3、補體因數H-相關蛋白(CFHR1)、抗凝血蛋白凝血調節蛋白(THBD)、補體因數H-相關蛋白3 (CFHR3)或補體因數H-相關蛋白4 (CFHR4))的存在來測定受試者中已知與aHUS有關的遺傳標記的存在。然後所述受試者週期性地監測(例如，每月一次、每季度一次、每年兩次或每年一次)以測定aHUS的至少一個症狀的存在或不存在，例如貧血、血小板減少症、腎功能不全和肌酐升高。在測定這些症狀的至少一種存在後，可將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的

MASP-2抑制劑給予所述受試者，以有效量並給予足夠的一段時間，以改進所述一個或多個症狀。在本發明的又一方面，由於已經篩選和測定具有一種與aHUS有關的遺傳標記而有增加的發生aHUS的風險的受試者，可監測其觸發aHUS臨床症狀有關的事件的發生，包括藥物暴露、感染(例如，細菌感染)、惡性腫瘤、損傷、器官或組織移植和妊娠。

在本發明的又一方面，可將包括有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑的組合物給予患有或有風險發生感染繼發性非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的患者。例如，患有或有風險發生與肺炎鏈球菌感染有關的非腸道aHUS的患者可用本發明的組合物治療。

在本發明的又一方面，患有aHUS的受試者可最初用本發明的MASP-2抑制性組合物治療，其通過導管線，例如靜脈內導管線或皮下導管線給予第一時間段，例如1小時、12小時、1天、2天或3天。所述受試者然後可用MASP-2抑制性組合物治療第二時間段，其通過常規皮下注射給予，例如每日一次、每週兩次、每週一次、每兩週一次、每月一次或每兩月一次注射。

在本發明的又一方面，本發明的MASP-2抑制性組合物可在不存在血漿去除術以避免血漿去除術的潛在併發症，包括出血、感染和暴露於血漿供體固有的病症和/或過敏反應的情況下(即，其aHUS症狀未用血漿去除術治療過和在用MASP-2抑制性組合物治療時未用血漿去除術治

療的受試者)，或在另外不願意血漿去除術的受試者中，或在其中不可利用血漿去除術的背景中，給予患有aHUS的受試者。

在本發明的又一方面，可將本發明的MASP-2抑制性組合物給予患有aHUS的受試者，同時用血漿去除術治療患者。例如，接受血漿去除術治療的受試者然後可在血漿交換後給予MASP-2抑制性組合物或與血漿交換交替進行。

在本發明的又一方面，患有或有風險發生aHUS和正用本發明的MASP-2抑制性組合物治療的受試者可通過週期性地(例如每12小時或按每日基礎)檢測至少一種補體因數的水準而監測，其中確定與標準值或健康受試者相比至少一種補體因數的水準降低表示需要繼續用組合物治療。

在預防性和治療性方案兩者中，包含MASP-2抑制劑的組合物可以數個劑量給予，直到在所述受試者中實現足夠的治療結果。在本發明的一個實施方案中，MASP-2抑制劑包括抗-MASP-2抗體，其可適合以0.1 mg至10,000 mg、更合適1.0 mg至5,000 mg、更合適10.0 mg至2,000 mg、更合適10.0 mg至1,000 mg和還更合適50.0 mg至500 mg的劑量給予成年患者(例如，平均成人體重70 kg)。對於兒科患者，可按患者體重比例調整劑量。本發明的MASP-2抑制性組合物的施用可通過單次給予組合物，或有限順序給予進行，用於治療aHUS。或者，組合物可在長期的一段時間內以定期間隔給予，例如每日一次、每週兩次、

每週一次、每兩週一次、每月一次或每兩月一次，用於治療aHUS。

在一些實施方案中，患有aHUS的受試者先前已經經歷或目前正在經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑的治療。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包括MASP-2抑制劑的本發明的組合物和進一步給予受試者抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑。在一些實施方案中，末端補體抑制劑是人源化的抗-C5抗體或其抗原結合片段。在一些實施方案中，末端補體抑制劑是艾庫組單抗。

在本發明的一個方面，將藥物組合物給予對HUS易感或另外有HUS風險的受試者，其量足以消除或降低發生所述病況的症狀的風險。在治療性應用中，將藥物組合物給予疑似或已經患有HUS的受試者，其治療有效量足以減輕或至少部分地減輕所述病況的症狀。

在本發明的另一方面，在有風險發生HUS的受試者中發生腎功能受損的可能性可通過給予受試者有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的本發明的MASP-2抑制性組合物而降低。例如，有風險發生HUS和待用本發明的MASP-2抑制性組合物治療的受試者可顯示與HUS有關的一個或多個症狀，包括腹瀉；血細胞比容水準低於30%，塗片證明血管內紅細胞破壞；血小板減少症和肌酐升高水準。作為進一步的實例，有風險發生HUS和待用本發明的MASP-2抑制性組合物治療的受試者可感染有大腸桿菌、

志賀氏菌或沙門氏菌。感染有大腸桿菌、志賀氏菌或沙門氏菌的這樣的受試者可用本發明的MASP-2抑制性組合物治療，同時用抗生素治療；或者可用MASP-2抑制性組合物治療，未同時用抗生素治療，特別是對於腸原性大腸桿菌，對其禁忌用抗生素治療。感染有腸原性大腸桿菌的已經用抗生素治療的受試者可具有升高的發生HUS的風險，和可合適地用本發明的MASP-2抑制性組合物治療以降低風險。感染有腸原性大腸桿菌的受試者可在缺少抗生素的情況下用本發明的MASP-2抑制性組合物治療第一時間段，然後用本發明的MASP-2抑制性組合物和抗生素治療第二時間段。

在本發明的又一方面，患有HUS的受試者可最初用本發明的MASP-2抑制性組合物治療，其通過導管線例如靜脈內導管線或皮下導管線給予第一時間段，例如1小時、12小時、1天、2天或3天。所述受試者然後可用MASP-2抑制性組合物治療第二時間段，其通過常規皮下注射給予，例如每日一次、每週兩次、每週一次、每兩週一次、每月一次或每兩月一次注射。

在本發明的又一方面，本發明的MASP-2抑制性組合物可在不存在血漿去除術以避免血漿去除術的潛在併發症，包括出血、感染和暴露於血漿供體固有的病症和/或過敏反應的情況下(即，其HUS症狀未用血漿去除術治療過和在用MASP-2抑制性組合物治療時未用血漿去除術治療的受試者)，或在另外不願意血漿去除術的受試者中，

或在其中不可利用血漿去除術的背景中，給予患有HUS的受試者。

在本發明的又一方面，本發明的MASP-2抑制性組合物可給予患有HUS的受試者，同時用血漿去除術治療患者。例如，接受血漿去除術治療的受試者然後可在血漿交換後給予MASP-2抑制性組合物或與血漿交換交替進行。

在本發明的又一方面，患有或有風險發生HUS和正用本發明的MASP-2抑制性組合物治療的受試者可通過週期性地(例如每12小時或按每日基礎)測定至少一種補體因數的水準而監測，其中測定與標準值或健康受試者相比至少一種補體因數的水準降低表示需要繼續用組合物治療。

在預防性和治療性方案中，包括MASP-2抑制劑的組合物可以數個劑量給予，直到在所述受試者中實現足夠的治療結果。在本發明的一個實施方案中，MASP-2抑制劑包括抗-MASP-2抗體，其可適合以0.1 mg至10,000 mg、更合適1.0 mg至5,000 mg、更合適10.0 mg至2,000 mg、更合適10.0 mg至1,000 mg和更合適50.0 mg至500 mg的劑量給予成年患者(例如，平均成人體重70 kg)。對於兒科患者，可按患者體重比例調整劑量。本發明的MASP-2抑制性組合物的施用可通過單次給予組合物，或有限順序給予進行，用於治療HUS。或者，組合物可在長期的一段時間內以定期間隔給予，例如每日一次、每週兩次、每週一次、每兩週一次、每月一次或每兩月一次，用於治療HUS。

在一些實施方案中，患有HUS的受試者先前已經經歷

或目前正在經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑的治療。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含MASP-2抑制劑的本發明的組合物和進一步給予受試者抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑。在一些實施方案中，末端補體抑制劑是人源化的抗-C5抗體或其抗原結合片段。在一些實施方案中，末端補體抑制劑是艾庫組單抗。

在本發明的一個方面，將藥物組合物給予對TTP易感或另外有TTP風險的受試者，其量足以消除或降低發生所述病況的症狀的風險。在治療性應用中，將藥物組合物給予疑似或已經患有TTP的受試者，其治療有效量足以減輕或至少部分地減輕所述病況的症狀。

在本發明的另一方面，顯示TTP的一個或多個症狀，包括中樞神經系統累及、血小板減少症、嚴重心臟累及、嚴重肺累及、胃腸梗塞和壞疽的受試者，可用本發明的MASP-2抑制性組合物治療。在本發明的另一方面，確定具有降低水準的ADAMTS13和還對存在ADAMTS13的抑制劑(即，抗體)測試陽性的受試者可用本發明的MASP-2抑制性組合物治療。在本發明的又一方面，對ADAMTS13的抑制劑的存在測試陽性的受試者可用免疫抑制劑(例如，皮質類固醇、rituxan或環孢黴素)治療，同時用本發明的MASP-2抑制性組合物治療。在本發明的又一方面，確定具有降低水準的ADAMTS13和對存在ADAMTS13的抑制劑測試陽性的受試者可用ADAMTS13治療，同時用本發明的

MASP-2抑制性組合物治療。

在本發明的又一方面，患有TTP的受試者可最初用本發明的MASP-2抑制性組合物治療，其通過導管線例如靜脈內導管線或皮下導管線給予第一時間段，例如1小時、12小時、1天、2天或3天。所述受試者然後可用MASP-2抑制性組合物治療第二時間段，其通過常規皮下注射給予，例如每日一次、每週兩次、每週一次、每兩週一次、每月一次或每兩月一次注射。

在本發明的又一方面，本發明的MASP-2抑制性組合物可在不存在血漿去除術以避免血漿去除術的潛在併發症，包括出血、感染和暴露於血漿供體固有的病症和/或過敏反應的情況下(即，其TTP症狀未用血漿去除術治療過和在用MASP-2抑制性組合物治療時未用血漿去除術治療的受試者)，或在另外不願意血漿去除術的受試者中，或在其中不可利用血漿去除術的背景中，給予患有HUS的受試者。

在本發明的又一方面，本發明的MASP-2抑制性組合物可給予患有TTP的受試者，同時用血漿去除術治療患者。例如，接受血漿去除術治療的受試者然後可在血漿交換後給予MASP-2抑制性組合物或與血漿交換交替進行。

在本發明的又一方面，患有難治性TTP的受試者，即，TTP的症狀不充分響應其它治療例如血漿去除術的受試者，可用本發明的MASP-2抑制性組合物治療，用或不用另外的血漿去除術。

在本發明的又一方面，患有或有風險發生TTP和正用本發明的MASP-2抑制性組合物治療的受試者可通過週期性地(例如每12小時或按每日基礎)檢測至少一種補體因數的水準而監測，其中確定與標準值或健康受試者相比至少一種補體因數的水準降低表示需要繼續用組合物治療。

在預防性和治療性方案兩者中，包含MASP-2抑制劑的組合物可以數個劑量給予，直到在所述受試者中實現足夠的治療結果。在本發明的一個實施方案中，MASP-2抑制劑包括抗-MASP-2抗體，其可合適以0.1 mg至10,000 mg、更合適1.0 mg至5,000 mg、更合適10.0 mg至2,000 mg、更合適10.0 mg至1,000 mg和還更合適50.0 mg至500 mg的劑量給予成年患者(例如，平均成人體重70 kg)。對於兒科患者，可按患者體重比例調整劑量。本發明的MASP-2抑制性組合物的施用可通過單次給予組合物，或有限順序給予進行，用於治療TTP。或者，組合物可在長期的一段時間內以定期間隔給予，例如每日一次、每週兩次、每週一次、每兩週一次、每月一次或每兩月一次，用於治療TTP。

在一些實施方案中，患有TTP的受試者先前已經經歷或目前正在經歷用抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑的治療。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包括MASP-2抑制劑的本發明的組合物和進一步給予受試者抑制補體蛋白C5的裂解的末端補體抑制劑。在一些實施方案中，末端補體抑制劑是人源化的抗-C5抗體或其抗原結合

片段。在一些實施方案中，末端補體抑制劑是艾庫組單抗。

VI. 實施例

以下實施例僅說明目前預期實施本發明的最佳模式，而不應解釋為限制本發明。本文的所有文獻引述通過引用明確地予以結合。

實施例1

本實施例描述MASP-2缺陷(MASP-2-/-)但MAp19充足(MAp19+/+)的小鼠品系的產生。

材料和方法：設計靶向載體pKO-NTKV 1901以破壞編碼鼠MASP-2的C-末端的三個外顯子，包括編碼絲氨酸蛋白酶結構域的外顯子，如圖3中所示。PKO-NTKV 1901用於轉染鼠ES細胞系E14.1a (SV129 Ola)。選擇新黴素-抗性和胸苷激酶-敏感性克隆。篩選600個ES克隆，和在這些克隆中，通過DNA印跡鑒定和驗證4個不同的克隆，以包含預期的選擇性靶向和重組事件，如圖3中所示。從這4個陽性克隆中通過胚胎轉移產生嵌合體。然後將嵌合體在遺傳背景C57/BL6中回交，以產生轉基因雄性。轉基因雄性與雌性雜交，產生F1，其中50%的後代對於破壞的*MASP-2*基因顯示雜合性。雜合小鼠互交，產生純合MASP-2缺陷後代，以1:2:1的比率分別得到雜合和野生型小鼠。

結果和表型：發現得到的純合MASP-2-/-缺陷小鼠能

存活並且可繁殖，並且通過DNA印跡證實正確的靶向事件，通過RNA印跡證實缺少MASP-2 mRNA，和通過蛋白質印跡證實缺少MASP-2蛋白(資料未顯示)，驗證是MASP-2缺陷的。使用時間解析RT-PCR在LightCycler儀器上進一步證實存在MAp19 mRNA和缺少MASP-2 mRNA。MASP-2-/-小鼠的確按期望地繼續表達MAp19、MASP-1和MASP-3 mRNA和蛋白質(資料未顯示)。在MASP-2-/-小鼠中備解素、因數B、因數D、C4、C2和C3的mRNA的存在和豐度通過LightCycler分析評價，和發現與野生型同窩對照相同(資料未顯示)。來自純合MASP-2-/-小鼠的血漿完全缺乏凝集素-途徑-介導的補體活化，如實施例**2**中進一步描述的。

在純C57BL6背景上MASP-2-/-品系的產生：在使用MASP-2-/-品系作為實驗動物模型之前，將MASP-2-/-小鼠與純C57BL6系回交九代。

還如下產生轉基因小鼠品系，其是鼠MASP-2-/-、MAp19+/+和表達人MASP-2轉基因(鼠MASP-2敲除和人MASP-2敲入)：

材料和方法：構建編碼稱為"微小hMASP-2"的人MASP-2的微基因(SEQ ID NO:49)，如圖4中所示，其包括人*MASP 2*基因的啟動子區，所述基因包括前3個外顯子(外顯子1至外顯子3)，接著是表示隨後8個外顯子的編碼序列的cDNA序列，從而編碼通過其內源啟動子驅動的全長MASP-2蛋白。將微小hMASP-2構建體注入MASP-2-/-的受

精卵以通過轉基因表達人MASP-2，替換缺陷的鼠*MASP 2*基因。

實施例2

本實施例證實MASP-2是通過凝集素途徑的補體活化所需要的。

方法和材料：

凝集素途徑特異性C4裂解測定法：C4裂解測定法描述於Petersen等，*J. Immunol. Methods 257*:107 (2001)，其測量由結合L-纖維膠凝蛋白的金黃色葡萄球菌的脂磷壁酸(LTA)導致的凝集素途徑活化。Petersen等(2001)描述的該測定法通過用LPS和甘露聚糖或酵母聚糖包被板，然後加入來自MASP-2 -/-小鼠的血清，經改良以測量經過MBL的凝集素途徑活化，如下文所述。該測定法還經改良，以除去由於經典途徑導致的C4裂解的可能性。這通過使用包含1 M NaCl的樣品稀釋緩衝液實現，其允許凝集素途徑識別組分與它們的配體高親和力結合，但阻止內源C4的活化，從而通過解離C1複合物排除經典途徑的參與。簡言之，在改良的測定法中，將血清樣品(在高鹽(1 M NaCl)緩衝液中稀釋)加入配體包被的板，接著加入在具有生理學濃度的鹽的緩衝液中的恆定量的純化的C4。包含MASP-2的結合的識別複合物裂解C4，導致C4b沉積。

測定方法：

1) Nunc Maxisorb微量滴定板(Maxisorb, Nunc, Cat. No. 442404, Fisher Scientific)用在包被緩衝液(15 mM Na2CO3, 35 mM NaHCO3, pH 9.6)中稀釋的1 μg/ml甘露聚糖(M7504 Sigma)或任何其它配體(例如，下文列舉的那些)包被。

測定法中使用以下試劑：

a. 甘露聚糖(1 μg/孔甘露聚糖(M7504 Sigma)，在100 μl包被緩衝液中)；

b. 酵母聚糖(1 μg/孔酵母聚糖(Sigma)，在100 μl包被緩衝液中)；

c. LTA (1μg/孔，在100 μl包被緩衝液中；或2 μg/孔，在20 μl甲醇中)；

d. 1 μg的H-纖維膠凝蛋白特異性Mab 4H5，在包被緩衝液中；

e. 來自綠色氣球菌(Aerococcus viridans)的PSA (2 μg/孔，在100 μl包被緩衝液)；

f. 100 μl/孔的福馬林固定的金黃色葡萄球菌DSM20233 (OD550=0.5)，在包被緩衝液中。

2) 將板在4℃孵育過夜。

3) 在孵育過夜後，殘餘的蛋白結合位點通過用0.1% HSA-TBS封閉緩衝液(0.1% (w/v) HAS，在10 mM Tris-CL,

140 mM NaCl, 1.5 mM NaN3中，pH 7.4)孵育板1-3小時來飽和，然後用TBS/tween/Ca2+ (TBS，含0.05% Tween 20和5 mM CaCl2, 1 mM MgCl2, pH 7.4)洗滌板3X。

4) 待測試的血清樣品在MBL-結合緩衝液(1 M NaCl)中稀釋和將稀釋的樣品加入至板中，在4℃孵育過夜。僅接受緩衝液的孔用作陰性對照。

5) 在4℃孵育過夜後，用TBS/tween/Ca2+將板洗滌3X。然後將人C4 (100 µl/孔的1 µg/ml，在BBS (4 mM巴比妥，145 mM NaCl，2 mM CaCl2，1 mM MgCl2，pH 7.4)中稀釋)加入板中，和在37℃孵育90分鐘。用TBS/tween/Ca2+將板再次洗滌3X。

6) C4b沉積用鹼性磷酸酶-綴合的雞抗-人C4c (在TBS/tween/Ca2+中1:1000稀釋)檢測，將其加入板中，和在室溫下孵育90分鐘。然後用TBS/tween/Ca2+將板再次洗滌3X。

7) 鹼性磷酸酶通過加入100 µl的對硝基苯基磷酸酯底物溶液，在室溫下孵育20分鐘和在微量滴定板閱讀器中讀出OD405進行檢測。

結果：圖5A-B顯示在來自MASP-2+/+ (十字)，MASP-2+/- (實心圓)和MASP-2-/- (實心三角)的血清稀釋液中，在甘露聚糖(圖5A)和酵母聚糖(圖5B)上C4b沉積的量。圖5C顯示根據測量標準化至野生型血清的C4b沉積的量，在用來自MASP-2-/+小鼠(n=5)和MASP-2-/-小鼠(n=4)的酵母聚糖(白色條)或甘露聚糖(陰影條)包被的板上，相對於野生

型小鼠(n=5)的相對C4轉化酶活性。誤差棒表示標準差。如圖5A-C中所示，在甘露聚糖和酵母聚糖包被的板上，來自MASP-2-/-小鼠的血漿完全缺乏凝集素-途徑-介導的補體活化。這些結果清楚證實，MASP-2是凝集素途徑的效應器組分。

在來自MASP-2-/-小鼠的血清中重組MASP-2重建凝集素途徑-依賴性C4活化

為了確定MASP-2的缺乏是MASP-2-/-小鼠中凝集素途徑-依賴性C4活化喪失的直接原因，用上述的C4裂解測定法檢查添加重組MASP-2蛋白至血清樣品中的作用。按下文實施例**3**所述，產生和純化在功能上有活性的鼠MASP-2和催化失活的鼠MASP-2A (其中絲氨酸蛋白酶結構域中的活性位元點絲氨酸殘基被置換為丙氨酸殘基)重組蛋白。用遞增蛋白濃度的重組鼠MASP-2或失活的重組鼠MASP-2A預孵育來自4 MASP-2 -/-小鼠的合併的血清，按上文所述測定C4轉化酶活性。

結果：如圖6中所示，添加功能上有活性的鼠重組MASP-2蛋白(以空心三角形表示)至獲自MASP-2 -/-小鼠的血清以蛋白濃度依賴性方式恢復凝集素途徑-依賴性C4活化，而催化失活的鼠MASP-2A蛋白(以星號表示)未恢復C4活化。圖6中顯示的結果標準化至用合併的野生型小鼠血清觀察到的C4活化(以虛線表示)。

實施例3

本實施例描述重組全長人、大鼠和鼠MASP-2、MASP-2衍生的多肽和MASP-2的催化失活的突變形式的重組表達和蛋白質產生。

全長人、鼠和大鼠MASP-2的表達：

將人MASP-2的全長cDNA序列(SEQ ID NO: 4)也亞克隆至哺乳動物表達載體pCI-Neo (Promega)，其在CMV增強子/啟動子區的控制下驅動真核表達(描述於Kaufman R. J.等，*Nucleic Acids Research19*:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, *185*:537-66 (1991))。將全長小鼠cDNA (SEQ ID NO:50)和大鼠MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:53)各自亞克隆至pED表達載體。然後使用Maniatis等，1989中描述的標準磷酸鈣轉染程式，將MASP-2表達載體轉染至粘附的中國倉鼠卵巢細胞系DXB1。用這些構建體轉染的細胞生長極慢，意味著編碼的蛋白酶是細胞毒性的。

在另一方法中，將包含MASP-2的人cDNA的微基因構建體(SEQ ID NO:49) (通過其內源啟動子驅動)暫態轉染至中國倉鼠卵巢細胞(CHO)。人MASP-2蛋白分泌至培養基，如下文所述分離。

全長的催化失活的MASP-2的表達：

原理：在識別亞組分MBL或纖維膠凝蛋白(L-纖維膠

凝蛋白、H-纖維膠凝蛋白或M-纖維膠凝蛋白)結合它們各自的碳水化合物模式後，MASP-2通過自身催化裂解來啟動。導致MASP-2活化的自身催化裂解經常發生在自血清分離MASP-2的過程期間，或在重組表達後的純化期間。為了獲得較穩定的蛋白製備物用作抗原，催化失活形式的MASP-2，被稱為MASP-2A，通過替代存在於蛋白酶結構域的催化三聯體中的絲氨酸殘基為大鼠(SEQ ID NO:55 Ser617至Ala617)、小鼠(SEQ ID NO:52 Ser617至Ala617)或人(SEQ ID NO:3 Ser618至Ala618)中的丙氨酸殘基產生。

為了產生催化失活的人和鼠MASP-2A蛋白，使用表5中顯示的寡核苷酸進行定點誘變。表5中的寡核苷酸經設計以退火至編碼有酶活性的絲氨酸的人和鼠cDNA區，和所述寡核苷酸包含錯配以改變絲氨酸密碼子為丙氨酸密碼子。例如，PCR寡核苷酸SEQ ID NOS:56-59與人MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4)組合使用，以擴增自起始密碼子至有酶活性的絲氨酸和自絲氨酸至終止密碼子的區域，以產生包含Ser618至Ala618突變的突變MASP-2A的完整開放閱讀形式。PCR產物在瓊脂糖凝膠電泳和條帶製備後純化，和單一腺苷重疊使用標準加尾程式產生。然後將腺苷加尾的MASP-2A克隆至pGEM-T easy載體，轉化至大腸桿菌。

催化失活的大鼠MASP-2A蛋白如下產生：以等摩爾量組合SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65、在100℃加熱2分鐘和緩慢冷卻至室溫，使這兩種寡核苷酸經激酶啟動(kinasing)和退火。得到的退火片段具有Pst1和Xba1相容末

端，和將其插入，代替野生型大鼠MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:53)的Pst1-Xba1片段，以產生大鼠MASP-2A。

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

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

將人、鼠和大鼠MASP-2A各自進一步亞克隆至哺乳動物表達載體pED或pCI-Neo的任一個中，和轉染至中國倉鼠卵巢細胞系DXB1，如下文所述。

在另一方法中，催化失活形式的MASP-2使用描述於Chen等，*J. Biol. Chem.*, *276*(28):25894-25902, 2001中的方法構建。簡言之，包含全長人MASP-2 cDNA的質粒(描述於Thiel等，*Nature 386*:506, 1997)用*Xho*1和*EcoR*1消化，將MASP-2 cDNA (本文稱為SEQ ID NO:4)克隆至pFastBac1杆狀病毒轉移載體(Life Technologies, NY)的相應的限制位點。然後通過用編碼肽區域胺基酸610-625 (SEQ ID NO:13)的雙鏈寡核苷酸置換天然區域胺基酸610-625，將在Ser618處的MASP-2絲氨酸蛋白酶活性位點改變為Ala618，以產生具有失活的蛋白酶結構域的MASP-2全長多肽。

包含源自人Masp-2的多肽區域的表達質粒的構建

以下構建體使用MASP-2信號肽(SEQ ID NO:5的殘基1-15)產生以分泌MASP-2的各種結構域。表達人MASP-2

CUBI結構域(SEQ ID NO:8)的構建體通過PCR擴增編碼MASP-2的殘基1–121 (SEQ ID NO:6)的區域(對應於N-末端CUB1結構域)製備。表達人MASP-2 CUBIEGF結構域(SEQ ID NO:9)的構建體通過PCR擴增編碼MASP-2 (SEQ ID NO:6)的殘基1–166的區域(對應於N-末端CUB1EGF結構域)製備。表達人MASP-2 CUBIEGFCUBII結構域(SEQ ID NO:10)的構建體通過PCR擴增編碼MASP-2 (SEQ ID NO:6)的殘基1-293的區域(對應於N-末端CUBIEGFCUBII結構域)擴增。上述的結構域使用$Vent_R$聚合酶和pBS-MASP-2作為範本，按照已建立的PCR方法，通過PCR進行擴增。有義引物的5'引物序列(5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO:34)在PCR產物的5'末端引入*Bam*HI限制位點(底線)。下表5中顯示的用於各MASP-2結構域的反義引物，經設計以在各PCR產物末端在*Eco*RI位點(底線)之前引入終止密碼子(粗體)。一旦擴增，DNA片段用*Bam*HI和*Eco*RI消化，和克隆至pFastBac1載體的相應位點。得到的構建體通過限制性作圖表徵和通過dsDNA測序證實。

表5：MASP-2 PCR引物

MASP-2結構域	5' PCR引物	3' PCR引物
SEQ ID NO:8 CUBI (SEQ ID NO:6的aa 1–121)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (SEQ ID NO:6的aa 1–166)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGCT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (SEQ ID NO:6的aa 1-293)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGAT 3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 人MASP-2	5'ATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGCCTTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_正向	5'TTAAAATCACTAATTATGTTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_反向
SEQ ID NO:4 人MASP-2 cDNA	5'CAGAGGTGACGCAGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_正向	5'GTGCCCCTCCTGCGTCACCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_反向
SEQ ID NO:50 鼠MASP-2 cDNA	5'ATGAGGCTACTCATCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_正向	5'TTAGAAATTACTTATTATGTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_反向
SEQ ID NO:50 鼠MASP-2 cDNA	5'CCCCCCCTGCGTCACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_正向	5'CTGCAGAGGTGACGCAGGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_反向

MASP-2的重組真核表達和酶失活小鼠、大鼠和人MASP-2A的蛋白質產生

使用標準磷酸鈣轉染程式將上述的MASP-2和MASP-2A表達構建體轉染至DXB1細胞(Maniatis等，1989)。MASP-2A在無血清培養基中產生，以確保製備物未被其它血清蛋白污染。每2天自匯合的細胞收穫培養基(總共四次)。對於三個物種的每一個，重組MASP-2A的水準平均為大約1.5 mg/升培養基。

MASP-2A蛋白純化： MASP-2A (上述的Ser-Ala突變

體)通過親和色譜在MBP-A-瓊脂糖柱上純化。該策略能夠快速純化而不使用外源標籤。將MASP-2A (100-200 ml的用等體積的上樣緩衝液(50 mM Tris-Cl，pH 7.5，包含150 mM NaCl和25 mM $CaCl_2$)稀釋的培養基)上樣到用10 ml的上樣緩衝液預平衡的MBP-瓊脂糖親和柱(4 ml)上。在用另外10 ml的上樣緩衝液洗滌後，蛋白用包含1.25 M NaCl和10 mM EDTA的50 mM Tris-Cl，pH 7.5以1 ml流分洗脫。包含MASP-2A的流分通過SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳鑒定。在必要時，MASP-2A通過在MonoQ柱(HR 5/5)上離子交換色譜進一步純化。蛋白質用包含50 mM NaCl的50 mM Tris-Cl pH 7.5透析，和上樣到用相同緩衝液平衡的柱上。在洗滌後，結合的MASP-2A用經10 ml的0.05–1 M NaCl梯度洗脫。

結果：自200 ml培養基獲得產量為0.25–0.5 mg的MASP-2A蛋白。由於糖基化，通過MALDI-MS測定的分子量77.5 kDa大於未修飾多肽的計算值(73.5 kDa)。在各個*N*-糖基化位點處聚糖的連接是觀測的品質的原因。MASP-2A在SDS-聚丙烯醯胺凝膠上作為單一條帶遷移，證明在生物合成期間其未被蛋白水解加工。對於糖基化多肽的同二聚體，通過平衡超速離心測定的重均分子量與計算值一致。

重組人Masp-2多肽的產生

用於產生重組MASP-2和MASP2A衍生的多肽的另一方法描述於Thielens, N.M.，等，*J. Immunol.*166:5068-5077,

2001。簡言之，*Spodoptera frugiperda*昆蟲細胞(獲自Novagen, Madison, WI的Ready-Plaque Sf9細胞)在添加有50 IU/ml青黴素和50 mg/ml鏈黴素(Life Technologies)的Sf900II無血清培養基(Life Technologies)中生長和維持。*Trichoplusia ni* (High Five)昆蟲細胞(由Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France提供)在添加有50 IU/ml青黴素和50 mg/ml鏈黴素的包含10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France)的TC100培養基(Life Technologies)中維持。重組杆狀病毒使用Bac-to-Bac系統(Life Technologies)產生。使用Qiagen midiprep純化系統(Qiagen)純化杆粒DNA，並且使用cellfectin/Sf900 II SFM培養基(Life Technologies)按製造商的方案所述，將杆粒DNA用於轉染Sf9昆蟲細胞。4天后收集重組病毒顆粒，通過病毒斑測定法滴定，和按King和Possee在*The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Chapman and Hall Ltd., London，第111-114頁，1992中描述進行擴增。

High Five細胞(1.75 x 10^7個細胞/175-cm^2組織培養瓶)用包含MASP-2多肽的重組病毒以2的多重性感染在Sf900 II SFM培養基中在28℃感染96 h。上清液通過離心收集，加入二異丙基氟代磷酸酯至終濃度1 mM。

MASP-2多肽分泌在培養基中。培養上清液針對50 mM NaCl，1 mM $CaCl_2$，50 mM三乙醇胺鹽酸鹽，pH 8.1透析，和以1.5 ml/min上樣到用相同緩衝液平衡的Q-Sepharose

Fast Flow柱(Amersham Pharmacia Biotech) (2.8 x 12 cm)上。通過應用在相同緩衝液中至350 mM NaCl的1.2升線性梯度進行洗脫。包含重組MASP-2多肽的流分通過蛋白質印跡分析鑒定，通過加入$(NH_4)_2SO_4$至60% (w/v)進行沉澱，和在4℃放置過夜。將沉澱重懸浮於145 mM NaCl，1 mM $CaCl_2$，50 mM三乙醇胺鹽酸鹽，pH 7.4中，並施加到用相同緩衝液平衡的TSK G3000 SWG柱(7.5 x 600 mm) (Tosohaas, Montgomeryville, PA)上。然後通過在Microsep微量濃縮器(m.w.截止=10,000) (Filtron, Karlstein, Germany)上超濾將純化的多肽濃縮至0.3 mg/ml。

實施例4

本實施例描述了產生針對MASP-2多肽的多克隆抗體的方法。

材料和方法：

MASP-2抗原：多克隆抗-人MASP-2抗血清通過用以下分離的MASP-2多肽免疫兔產生：分離自血清的人MASP-2 (SEQ ID NO:6)；重組人MASP-2 (SEQ ID NO:6)、包含無活性蛋白酶結構域的MASP-2A (SEQ ID NO:13)，如實施例**3**中所述；和如上文實施例**3**中所述表達的重組CUBI (SEQ ID NO:8)、CUBEGFI (SEQ ID NO:9)和CUBEGFCUBII (SEQ ID NO:10)。

多克隆抗體：6周齡兔，用BCG (桿菌Calmette-Guerin

疫苗)引發，通過注射100 μg在無菌鹽水溶液中的100 μg/ml的MASP-2多肽進行免疫。每4周進行注射，通過ELISA測定法監測抗體滴度，如實施例**5**中所述。收集培養上清液用於通過蛋白A親和色譜進行抗體純化。

實施例5

本實施例描述用於產生針對大鼠或人MASP-2多肽的鼠單克隆抗體的方法。

材料和方法：

雄性A/J小鼠(Harlan, Houston, Tex.)，8-12周齡，用在200 μl的磷酸緩衝鹽水(PBS) pH 7.4中在完全弗氏佐劑(Difco Laboratories, Detroit, Mich)中100 μg人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽(按實施例**3**中所述製備)皮下注射。以兩周間隔，小鼠用在不完全弗氏佐劑中的50 μg的人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽兩次皮下注射。在第四周，小鼠用在PBS中的50 μg的人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽注射和4天后融合。

對於各融合，自免疫小鼠的脾製備單細胞懸浮液和用於與Sp2/0骨髓瘤細胞融合。5x108個Sp2/0和5x108個脾細胞在包含50%聚乙二醇(M. W. 1450) (Kodak, Rochester, N. Y.)和5%二甲基亞碸(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)的培養基中融合。然後在添加有10%胎牛血清、100個單位/ml青黴素、100 μg/ml鏈黴素、0.1 mM次黃嘌呤、0.4 μM氨基

蝶呤和16 μM胸苷的Iscove培養基(Gibco, Grand Island, N. Y.)中將細胞調整至1.5x105個脾細胞/200 μl懸浮液的濃度。將200微升的細胞懸浮液加入至大約20個96-孔微量培養板的各孔。在大約10天后，吸出培養上清液用於在ELISA測定法中篩選與純化的因數MASP-2的反應性。

ELISA測定法：Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.)微量測試板的各孔通過加入50 μl的50 ng/ml的純化hMASP-2或大鼠rMASP-2 (或rMASP-2A)在室溫下包被過夜。用於包被的低濃度的MASP-2能夠選擇高-親和力抗體。在包被溶液通過輕彈板除去後，將200 μl含BLOTTO (脫脂奶粉)的PBS加入至各孔中1小時，以封閉非-特異性位點。在1小時後，然後用緩衝液PBST (包含0.05% Tween 20的PBS)洗滌各孔。自各融合孔的50微升的培養上清液經收集和與50 μl的BLOTTO混合，然後加入至微量測試板的各個孔中。在1小時孵育後，各孔用PBST洗滌。然後，結合的鼠抗體通過與辣根過氧化物酶(HRP)綴合和以1:2,000稀釋在BLOTTO中的山羊抗-小鼠IgG (Fc特異性) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.)反應而檢測。將包含0.1% 3,3,5,5四甲基聯苯胺(Sigma, St. Louis, Mo.)和0.0003%過氧化氫(Sigma)的過氧化物酶底物溶液加入至各孔用於顯色30分鐘。通過每孔加入50 μl的2M H2SO4終止反應。反應混合物在450 nm的光密度用BioTek ELISA Reader (BioTek Instruments, Winooski, Vt.)讀出。

MASP-2結合測定法：

在上述的MASP-2 ELISA測定法中測試陽性的培養上清液可在結合測定法中測試，以測定MASP-2抑制劑對MASP-2具有的結合親和力。類似的測定法也可用於測定抑制劑是否結合在補體系統中的其它抗原。

聚苯乙烯微量滴定板的各孔(96-孔培養基結合板，Corning Costar, Cambridge, MA)用在磷酸緩衝鹽水(PBS) pH 7.4中的MASP-2 (20 ng/100 µl/孔，Advanced Research Technology, San Diego, CA)在4℃包被過夜。在吸出MASP-2溶液後，各孔用包含1%牛血清白蛋白(BSA; Sigma Chemical)的PBS在室溫下封閉2小時。沒有MASP-2包被的各孔用作背景對照。將在封閉溶液中各種濃度的等份的雜交瘤上清液或純化的抗-MASP-2 MoAb加入至各孔。在室溫孵育2 h後，各孔用PBS充分漂洗。MASP-2-結合的抗-MASP-2 MoAb通過加入在封閉溶液中的過氧化物酶綴合的山羊抗-小鼠IgG (Sigma Chemical)，使其在室溫下孵育1h而檢測。再次用PBS充分漂洗板，和加入100 µl的3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)底物(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)。TMB的反應通過加入100 µl的1M磷酸淬滅，和在微板閱讀器(SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)中在450 nm讀出板。

然後在功能測定法例如實施例**2**所述的C4裂解測定法中測試來自陽性孔的培養上清液抑制補體活化的能力。然

後通過有限稀釋而克隆陽性孔中的細胞。在上述ELISA測定法中再次測試MoAb與hMASP-2的反應性。將選擇的雜交瘤在旋轉瓶中生長，和收集耗盡的培養上清液用於通過蛋白A親和色譜進行抗體純化。

實施例6

本實施例描述人源化的鼠抗-MASP-2抗體和抗體片段的形成和製備。

鼠抗-MASP-2單克隆抗體在雄性A/J小鼠中產生，如實施例**5**中所述。然後將鼠抗體按下文所述人源化，以通過替代鼠恆定區為它們的人對應物以產生抗體的嵌合IgG和Fab片段，降低其免疫原性，其根據本發明可用於抑制在人受試者中MASP-2-依賴性補體活化的不良作用。

1. 從鼠雜交瘤細胞克隆抗-MASP-2可變區基因。使用RNAzol按製造商的方案(Biotech, Houston, Tex.)，將總RNA自分泌抗-MASP-2 MoAb的雜交瘤細胞(如實施例7中所述獲得)分離。第一鏈cDNA使用寡聚dT作為引物自總RNA合成。使用免疫球蛋白恆定C區衍生的3'引物和源自前導肽或鼠VH或VK基因的第一框架區的簡並引物組作為5'引物進行PCR。錨定PCR按Chen和Platsucas (Chen, P. F., *Scand. J. Immunol.* 35:539-549, 1992)所述進行。對於克隆VK基因，雙鏈cDNA使用NotI-MAK1引物(5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO:38)製備。將退火的接頭AD1 (5'-GGAATTCACTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID

NO:39)和AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO:40)連接至雙鏈cDNA的5'和3'末端。在3'末端的接頭通過Not1消化除去。然後消化的產物用作PCR範本，用AD1寡核苷酸作為5'引物和 MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO:41)作為3'引物。將大約500 bp的DNA片段克隆至pUC19。選擇數個克隆用於序列分析以驗證克隆的序列包括預期的鼠免疫球蛋白恆定區。Not1-MAK1和MAK2寡核苷酸源自VK區和分別為在Cκ基因的第一城基對下游182和84 bp。選擇包括完整VK和前導肽的克隆。

對於克隆VH基因，使用Not1 MAG1引物(5'-CGCGGCCGCAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO:42)製備雙鏈cDNA。將退火的接頭AD1和AD2連接至雙鏈cDNA的5'和3'末端。3'末端的接頭通過Not1消化除去。消化的產物用作PCR範本，其中AD1寡核苷酸和MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO:43)作為引物。將500-600 bp長度的DNA片段克隆至pUC19。Not1-MAG1和MAG2寡核苷酸源自鼠Cγ.7.1區，和分別為在鼠Cγ.7.1基因的第一城基對的下游180和93 bp。選擇包含完整VH和前導肽的克隆。

2. 用於嵌合MASP-2 IgG和Fab表達載體的構建。上文描述的克隆的VH和VK基因用作PCR反應的範本，以添加Kozak共有序列至核苷酸序列的5'末端和添加剪接供體至3'末端。在分析序列以證實PCR錯誤不存在後，將VH和VK基因插入分別包含人C.γ1和C.κ的表達載體盒，得到

pSV2neoVH-huCγ1和pSV2neoV-huCγ。CsCl梯度純化的重鏈和輕鏈載體的質粒DNA用於通過電穿孔轉染COS細胞。在48小時後，培養上清液通過ELISA測試以證實存在大約200 ng/ml的嵌合IgG。收穫細胞和製備總RNA。第一鏈cDNA自總RNA使用寡聚dT作為引物合成。該cDNA用作PCR範本以產生Fd和κ DNA片段。對於Fd基因，使用5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAACT-3' (SEQ ID NO:44)作為5'引物和CH1-衍生的3'引物(5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO:45)進行PCR。DNA序列經證實包含人IgG1的完整的VH和CH1結構域。在用合適的酶消化後，將Fd DNA片段插入在表達載體盒pSV2dhfr-TUS的HindIII和BamHI限制位點，得到pSV2dhfrFd。pSV2質粒為市售可得的，並由來自各種來源的DNA區段組成：pBR322 DNA (細線)包含pBR322 DNA複製起點(pBR ori)和內醯胺酶氨苄青黴素抗性基因(Amp)；SV40 DNA，通過通過較寬陰影表示和標注，包含SV40 DNA複製起點(SV40 ori)、早期啟動子(5'至dhfr和neo基因)和多腺苷酸化信號(3'至dhfr和neo基因)。SV40-來源的多腺苷酸化信號(pA)還位於Fd基因的3'末端。

對於κ基因，使用5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO:46)作為5'引物和CK-衍生的3'引物(5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO:47)進

行PCR。DNA序列證實包含完整的VK和人CK區。在用合適的限制酶消化後，將κDNA片段插入表達載體盒pSV2neo-TUS的HindIII和BamHI限制位點以得到pSV2neoK。Fd和κ基因的表達受HCMV-衍生的增強子和啟動子元件驅動。因為Fd基因不包括參與鏈間二硫鍵的半胱氨酸胺基酸殘基，該重組嵌合Fab包含非-共價地連接的重鏈和輕鏈。該嵌合Fab被稱為cFab。

為了獲得具有重鏈和輕鏈間二硫鍵的重組Fab，可延長上述的Fd基因以包括來自人IgG1的鉸鏈區的另外9個胺基酸(EPKSCDKTH SEQ ID NO:48)的編碼序列。編碼Fd基因的3'末端的30個胺基酸的BstEII-BamHI DNA區段可置換為編碼延長的Fd的DNA區段，產生pSV2dhfrFd/9aa。

3. 嵌合抗-MASP-2 IgG的表達和純化

為了產生分泌嵌合抗-MASP-2 IgG的細胞系，NSO細胞用純化的pSV2neoVH-huC.γ1和pSV2neoV-huCκ質粒DNA通過電穿孔轉染。在存在0.7 mg/ml G418的情況下選擇轉染的細胞。使用包含血清的培養基在250 ml旋轉瓶中培養細胞。

將100 ml旋轉培養物的培養上清液上樣到10-ml PROSEP-A柱(Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.)上。柱用10床體積的PBS洗滌。結合的抗體用50 mM檸檬酸鹽緩衝液pH 3.0洗脫。將等體積的1 M Hepes, pH 8.0加入至包含純化抗體的流分中，以調整pH至7.0。殘留的鹽通過用PBS

通過Millipore膜超濾(M.W.截止：3,000)進行緩衝液交換而除去。純化的抗體的蛋白濃度通過BCA方法(Pierce)測定。

4. 嵌合抗-MASP-2 Fab的表達和純化

為了產生分泌嵌合抗-MASP-2 Fab的細胞系，CHO細胞用純化的pSV2dhfrFd (或pSV2dhfrFd/9aa)和pSV2neokappa質粒DNA通過電穿孔轉染。在存在G418和甲氨蝶呤的情況下選擇轉染的細胞。選擇的細胞系在遞增濃度的甲氨蝶呤中擴增。細胞是通過有限稀釋亞克隆的單細胞。高產量的單細胞亞克隆細胞系然後在100 ml旋轉培養物中使用無血清培養基進行培養。

嵌合抗-MASP-2 Fab通過親和色譜使用小鼠抗-個體型MoAb純化成MASP-2 MoAb。抗-個體型MASP-2 MoAb可通過用與匙孔蟅血藍蛋白(KLH)綴合的鼠抗-MASP-2 MoAb免疫小鼠和篩選可與人MASP-2競爭的特異性MoAb結合來製備。對於純化，將來自產生cFab或cFab/9aa的CHO細胞的旋轉培養物的100 ml上清液上樣到與抗-個體型MASP-2 MoAb偶聯的親和柱上。然後用PBS充分洗滌柱，之後用50 mM二乙胺pH 11.5洗脫結合的Fab。殘留的鹽按上述通過緩衝液交換除去。純化Fab的蛋白濃度通過BCA方法(Pierce)測定。

嵌合MASP-2 IgG、cFab和cFAb/9aa抑制MASP-2-依賴性補體途徑的能力可通過使用**實施例2或實施例7**中描述的

抑制性測定法測定。

實施例7

本實施例描述了體外C4裂解測定，用作功能性篩選，以鑒定能夠經由L-纖維膠凝蛋白/P35、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白或甘露聚糖而阻斷MASP-2-依賴性補體活化的MASP-2抑制劑。

C4裂解測定：C4裂解測定已經描述於Petersen, S. V.，等人，*J. Immunol. Methods* 257:107, 2001，其檢測了由結合L-纖維膠凝蛋白的來自金黃色葡萄球菌的脂磷壁酸(LTA)所致的凝集素途徑活化。

試劑：福馬林固定的金黃色葡萄球菌(DSM20233)製備如下：將細菌在胰腖大豆血培養基(tryptic Soy blood medium)中於37℃培養過夜，用PBS洗滌3次，然後在室溫下在PBS/0.5%福馬林中固定1小時，再用PBS洗滌3次後，重懸浮於包被緩衝液(15 mM Na_2CO_3、35 mM $NaHCO_3$，pH 9.6)中。

測定：Nunc MaxiSorb微量滴定板(Nalgene Nunc International, Rochester, NY)的各孔用以下成分包被：100 µl福馬林固定的金黃色葡萄球菌DSM20233 (OD550=0.5)的包被緩衝液與1 ug L-纖維膠凝蛋白的包被緩衝液。孵育過夜後，各孔用0.1%人血清白蛋白(HSA)的TBS溶液(10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.4)封閉，然後用含有0.05% Tween 20和5mM CaCl2的TBS溶液(洗滌緩衝液)洗滌。將人

血清樣品稀釋於20 mM Tris-HCl，1 M NaCl, 10 mM CaCl2，0.05% Triton X-100，0.1% HSA，pH 7.4中，這防止了內源C4的活化，並使C1複合物(由C1q、C1r和C1s組成)解離。將不同濃度的MASP-2抑制劑(包括抗-MASP-2 MoAb和抑制性肽)加到血清樣品中。將稀釋的樣品加到板中，在4℃下孵育過夜。24小時後，各板用洗滌緩衝液充分洗滌，然後向各孔中加入0.1μg經純化的人C4 (按照Dodds, A. W., *Methods Enzymol.* 223:46，1993所述獲得)/100μl 4 mM 巴比妥、145 mM NaCl，2 mM $CaCl_2$，1 mM $MgCl_2$，pH 7.4。在37℃ 1.5小時後，各板再次經洗滌，使用鹼性磷酸酶-綴合的雞抗人C4c (獲自Immunsystem, Uppsala, Sweden)，檢測C4b沉積，並使用比色底物磷酸對硝基苯酯進行測定。

在甘露聚糖上的C4測定：在加入與各種MASP-2抑制劑混合的血清之前，通過用LSP和甘露聚糖包被測定板，修改上述測定法以測定經由MBL的凝集素途徑活化。

在H-纖維膠凝蛋白(Hakata Ag)上的C4測定：在加入與各種MASP-2抑制劑混合的血清之前，通過用LSP和H-纖維膠凝蛋白包被測定板，修改上述測定法以測定經由H-纖維膠凝蛋白的凝集素途徑活化。

實施例8

以下測定法證實在野生型和MASP-2-/-小鼠中存在經典途徑活化。

方法：免疫複合物通過在室溫下用在10 mM Tris，140 mM NaCl，pH 7.4中的0.1%人血清白蛋白包被微量滴定板(Maxisorb, Nunc, cat. No. 442404, Fisher Scientific) 1小時，接著在4℃用以1:1000在TBS/tween/Ca2+中稀釋的綿羊抗全血清抗血清(Scottish Antibody Production Unit, Carluke, Scotland)孵育過夜來原位產生。血清樣品獲自野生型和MASP- 2- /-小鼠和加入至包被的板中。製備對照樣品，其中C1q從野生型和MASP- 2- /-血清樣品中耗盡。C1q-耗盡的小鼠血清使用包被有兔抗-人C1q IgG (Dako, Glostrup, Denmark)的蛋白-A-偶聯的Dynabeads (Dynal Biotech, Oslo, Norway)根據供應商的說明書製備。板在37℃孵育90分鐘。結合的C3b用在TBS/tw/ Ca^{++}中以1:1000稀釋的多克隆抗-人-C3c抗體(Dako A 062)檢測。第二抗體是山羊抗-兔IgG。

結果：圖7顯示在包被有野生型血清、MASP-2-/-血清、C1q-耗盡的野生型和C1q-耗盡的MASP-2-/-血清的IgG的板上的相對C3b沉積水準。這些結果證實，在MASP-2-/-小鼠品系中經典途徑是完整的。

實施例9

下面的測定法用來通過在經典途徑被免疫複合物啟動的條件下分析MASP-2抑制劑的作用，從而檢測MASP-2抑制劑是否阻斷了經典途徑。

方法：為了測試MASP-2抑制劑對補體活化條件(其中

經典途徑被免疫複合物啟動)的影響，在10 μg/mL免疫複合物(IC)或PBS存在時，將一式三份的含有90% NHS的50 μl樣品在37℃孵育，並且還包括平行的一式三份的樣品(+/-IC)，其在37℃孵育期間含有200 nM抗備解素單克隆抗體。在37℃孵育2小時後，將13 mM EDTA加到所有樣品中以終止進一步的補體活化，並立即將樣品冷卻到5℃。再將樣品保存於-70℃，然後按照生產商的說明書，使用ELISA試劑盒(Quidel，目錄號A015和A009)進行補體活化產物(C3a和sC5b-9)的測定。

實施例10

本實施例描述了阻斷MASP-2活性的高親和性抗-MASP-2 Fab2抗體片段的鑒定。

背景和原理：MASP-2是具有許多獨立功能結構域的複雜蛋白質，包括：MBL和纖維膠凝蛋白的結合位點、絲氨酸蛋白酶催化位點、蛋白水解底物C2的結合位點、蛋白水解底物C4的結合位點、MASP-2酶原自身活化的MASP-2裂解位點和兩個Ca^{++}結合位點。鑒定出與MASP-2高親和性結合的Fab2抗體片段，並在功能測定法中測定所鑒定的Fab2片段，以確定它們是否能夠阻斷MASP-2功能活性。

為了阻斷MASP-2功能活性，抗體或Fab2抗體片段必須結合並干擾MASP-2功能活性所需要的MASP-2上的結構表位元。因此，許多或所有的高親和性結合抗-MASP-2 Fab2可能不能抑制MASP-2功能活性，除非它們結合直接

參與MASP-2功能活性的MASP-2上的結構表位元。

測定抑制凝集素途徑C3轉化酶形成的功能測定法被用來評價抗-MASP-2 Fab2的“阻斷活性”。已知MASP-2在凝集素途徑中的主要生理作用是產生凝集素介導的補體途徑的下一個功能成分，即凝集素途徑C3轉化酶。凝集素途徑C3轉化酶是蛋白水解裂解C3成為C3a和C3b的關鍵酶複合物(C4bC2a)。MASP-2不是凝集素途徑C3轉化酶(C4bC2a)的結構成分；然而，需要MASP-2功能活性以產生組成凝集素途徑C3轉化酶的兩個蛋白質成分(C4b、C2a)。此外，為了使MASP-2產生凝集素途徑C3轉化酶，似乎需要所有上述MASP-2的獨立功能活性。出於這些原因，認為用於評價抗-MASP-2 Fab2的“阻斷活性”優選的測定法是測定抑制凝集素途徑C3轉化酶形成的功能測定法。

高親和性Fab2的產生：應用人可變輕鏈和重鏈抗體序列的噬菌體展示文庫以及用於鑒定與所選出的目標配體反應的Fab2的自動抗體篩選技術，來產生抗大鼠MASP-2蛋白(SEQ ID NO: 55)的高親和性Fab2。利用已知量的大鼠MASP-2 (~1 mg，純度>85%)蛋白進行抗體篩選。利用三輪擴增以選出具有最高親和性的抗體。挑選約250個不同的表達抗體片段的目標(hit)用於ELISA篩選。隨後對高親和性目標進行測序以確定不同抗體的獨特性。

將50個獨特的抗-MASP-2抗體純化，將250μg各經純化的Fab2抗體用於表徵MASP-2結合親和性和補體途徑功能測定，更詳述如下。

用於評價抗-MASP-2 Fab2的抑制(阻斷)活性的測定法

1. 測定抑制凝集素途徑C3轉化酶形成的測定法：

背景：凝集素途徑C3轉化酶是蛋白水解裂解C3成為兩個有效促炎片段過敏毒素C3a和調理素C3b的酶複合物(C4bC2a)。C3轉化酶的形成似乎是在介導炎症方面的凝集素途徑中的關鍵步驟。MASP-2不是凝集素途徑C3轉化酶(C4bC2a)的結構成分；因此，抗-MASP-2抗體(或Fab2)不會直接抑制之前已存在的C3轉化酶的活性。然而，為了產生組成凝集素途徑C3轉化酶的兩個蛋白質成分(C4b、C2a)，MASP-2絲氨酸蛋白酶活性是必需的。因此，抑制MASP-2功能活性的抗-MASP-2Fab2 (即阻斷性抗-MASP-2Fab2)抑制凝集素途徑C3轉化酶從頭形成。C3含有獨特的高反應性硫酯基團作為其結構的部分。在該測定法中當C3轉化酶裂解C3時，C3b上的硫酯基團可與通過酯鍵或醯胺鍵固定在塑膠孔底部的大分子上的羥基或氨基形成共價鍵，從而有利於在ELISA測定法中檢測出C3b。

酵母甘露聚糖是凝集素途徑的已知啟動劑。在測定C3轉化酶形成的下列方法中，將用甘露聚糖包被的塑膠孔與稀釋的大鼠血清在37℃下孵育30分鐘以啟動凝集素途徑。然後洗滌各孔，並採用標準ELISA方法測定固定在孔中的C3b。在該測定法中所產生的C3b的量直接反映了從頭形成的凝集素途徑C3轉化酶。在該測定法中測定選定濃度的抗-MASP-2 Fab2抑制C3轉化酶形成和隨後C3b產生的能

力。

方法：

將96孔Costar培養基結合板與稀釋於50 mM碳酸鹽緩衝液(pH9.5)的甘露聚糖以1μg/50 μl/孔在5℃下孵育過夜。過夜孵育後，各孔用200 μl PBS洗滌3次。然後各孔用100 μl/孔的1%牛血清白蛋白的PBS溶液封閉，在室溫下孵育1小時並溫和攪動。然後各孔用200μl PBS洗滌3次。在5℃，將抗-MASP-2 Fab2樣品稀釋於含Ca^{++}和Mg^{++}的GVB緩衝液(4.0 mM 巴比妥，141 mM NaCl，1.0 mM $MgCl_2$，2.0 mM $CaCl_2$，0.1%明膠, pH 7.4)至選定濃度。在5℃，將0.5%大鼠血清加到上述樣品中，將100μl轉移到各孔。將板蓋上，在37℃水浴中孵育30分鐘以允許補體活化。將板從37℃水浴轉移至裝有冰-水混合物的容器中終止反應。各孔用200μl PBS-Tween 20 (0.05% Tween 20的PBS溶液)洗滌5次，再用200 μl PBS洗滌2次。加入100 μl/孔的1:10,000稀釋的第一抗體(兔抗人C3c，DAKO A0062)，該抗體溶於含有2.0mg / ml牛血清白蛋白的PBS中，在室溫下輕輕攪動孵育1小時。各孔用200 μl PBS洗滌5次。加入100 μl/孔的1:10,000稀釋的第二抗體(過氧化物酶-綴合的山羊抗兔IgG, American Qualex A102PU)，該抗體溶於含有2.0mg / ml牛血清白蛋白的PBS中，在室溫下在振盪器中輕輕攪動孵育1小時。各孔用200 μl PBS洗滌5次。加入100 μl/孔的過氧化物酶底物TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)，

在室溫下孵育10分鐘。通過加入100 µl/孔1.0 M H_3PO_4終止過氧化物酶反應，測定OD_{450}。

2. 測量抑制MASP-2-依賴性C4裂解的測定法

背景：MASP-2的絲氨酸蛋白酶活性是高度特異性的，僅鑒定出用於MASP-2的兩種蛋白質底物：C2和C4。C4裂解產生C4a和C4b。抗-MASP-2 Fab2可結合直接參與C4裂解的MASP-2的結構表位元(例如C4的MASP-2結合位點；MASP-2絲氨酸蛋白酶催化位點)，從而抑制MASP-2的C4裂解功能活性。

酵母甘露聚糖是凝集素途徑的已知啟動劑。在測定MASP-2的C4裂解活性的下列方法中，將用甘露聚糖包被的塑膠孔與稀釋的大鼠血清在37℃下孵育30分鐘以啟動凝集素途徑。因為用於該ELISA測定法中的第一抗體僅識別人C4，所以稀釋的大鼠血清還補充了人C4 (1.0 µg/mL)。然後洗滌各孔，採用標準ELISA方法測定固定到孔中的人C4b。在該測定法中所產生的C4b的量可衡量MASP-2-依賴性C4裂解活性。在該測定法中，測定選定濃度的抗-MASP-2 Fab2抑制C4裂解的能力。

方法：將96孔Costar培養基結合板與稀釋於50 mM碳酸鹽緩衝液(pH9.5)的甘露聚糖以1 µg/50 µl/孔在5℃下孵育過夜。各孔用200 µl PBS洗滌3次。然後各孔用100µl/孔的1%牛血清白蛋白的PBS溶液封閉，並在室溫下孵育1小時並溫和攪動。各孔用200 µl PBS洗滌3次。在5℃，將抗-

MASP-2 Fab2樣品稀釋於含Ca^{++}和Mg^{++}的GVB緩衝液(4.0 mM巴比妥，141 mM NaCl，1.0 mM $MgCl_2$，2.0 mM $CaCl_2$，0.1%明膠，pH 7.4)至選定濃度。1.0 μg/mL人C4 (Quidel)也包括在這些樣品中。在5℃，將0.5%大鼠血清加到上述樣品中，將100μl轉移到各孔。將板蓋上，在37℃水浴中孵育30分鐘以允許補體活化。將板從37℃水浴轉移至裝有冰-水混合物的容器中終止反應。各孔用200 μl PBS-Tween 20 (0.05% Tween 20的PBS溶液)洗滌5次，然後各孔再用200 μl PBS洗滌2次。加入100 μl/孔的1:700稀釋的生物素-綴合的雞抗人C4c (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden)，該抗體溶於含有2.0mg/ml牛血清白蛋白的PBS中，在室溫下輕輕攪動孵育1小時。各孔用200 μl PBS洗滌5次。加入100 μl/孔的0.1 μg/mL過氧化物酶-綴合的鏈黴抗生物素(Pierce Chemical #21126)，其溶於含有2.0mg/ml BSA的PBS中，在室溫下在振盪器中輕輕攪動孵育1小時。各孔用200 μl PBS洗滌5次。加入100 μl/孔的過氧化物酶底物TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)，在室溫下孵育16分鐘。通過加入100 μl/孔1.0 M H_3PO_4終止過氧化物酶反應，並測定OD_{450}。

3. 抗大鼠MASP-2 Fab2與“天然”大鼠MASP-2的結合測定法

背景：MASP-2通常作為還包括特異性凝集素分子(甘露糖-結合蛋白(MBL)和纖維膠凝蛋白)的MASP-2二聚體複

合物存在於血漿中。因此，如果有興趣研究抗-MASP-2 Fab2與MASP-2生理學相關形式的結合，則重要的是開發出結合測定法，其中利用Fab2與血漿中的“天然”MASP-2之間，而不是與純化的重組MASP-2之間的相互作用。在該結合測定法中，先將得自10%大鼠血清的“天然”MASP-2-MBL複合物固定在甘露聚糖包被的孔內。然後採用標準ELISA方法，對各種抗-MASP-2 Fab2與固定化“天然”MASP-2的結合親和性進行了研究。

方法：將96孔Costar高結合板與稀釋於50 mM碳酸鹽緩衝液(pH9.5)的甘露聚糖以1 μg/50 μl/孔在5℃下孵育過夜。各孔用200 μl PBS洗滌3次。然後各孔用100μl/孔的含0.5%脫脂奶粉的PBST (含0.05% Tween 20的PBS)封閉，並在室溫下孵育1小時並溫和攪動。各孔用200 μl TBS/Tween/Ca^{++}洗滌緩衝液(Tris-緩衝鹽水，0.05% Tween 20，含有5.0 mM $CaCl_2$，pH 7.4)洗滌3次。在冰上製備含10%大鼠血清的高鹽結合緩衝液(20 mM Tris，1.0 M NaCl，10 mM $CaCl_2$，0.05% Triton-X100，0.1% (w/v)牛血清白蛋白，pH 7.4)。加入100 μl/孔並在5℃孵育過夜。各孔用200 μl TBS/Tween/Ca^{++}洗滌緩衝液洗滌3次。然後，各孔用200 μl PBS洗滌2次。加入100 μl/孔的稀釋於含Ca^{++}和Mg^{++}的GVB緩衝液(4.0 mM巴比妥，141 mM NaCl，1.0 mM $MgCl_2$，2.0 mM $CaCl_2$，0.1%明膠，pH 7.4)的選定濃度的抗-MASP-2 Fab2，並在室溫下孵育1小時並溫和攪動。各孔用200 μl PBS洗滌5次。加入在2.0 mg/mL牛血清

白蛋白的PBS中1:5000稀釋的100 µl/孔的HRP-綴合的山羊抗Fab2 (Biogenesis Cat No 0500-0099)，並在室溫下孵育1小時並溫和攪動。各孔用200 µl PBS洗滌5次。加入100 µl/孔的過氧化物酶底物TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)並在室溫下孵育70分鐘。通過加入100 µl/孔1.0 M H_3PO_4終止過氧化物酶反應，並測定OD_{450}。

結果：

挑選了與大鼠MASP-2蛋白進行高親和性反應的約250個不同的Fab2用於ELISA篩選。對這些高親和性Fab2進行了測序以確定不同抗體的獨特性，對50個獨特的抗-MASP-2抗體進行純化，用於進一步分析。250 µg各經純化的Fab2抗體用來表徵MASP-2結合親和性及補體途徑功能測定。該分析的結果見下表6。

表6：阻斷凝集素途徑補體活化的抗-MASP-2 FAB2

Fab2 抗體#	C3 轉化酶(IC50 (nM)	Kd	C4 裂解 IC50 (nM)
88	0.32	4.1	ND
41	0.35	0.30	0.81
11	0.46	0.86	<2 nM
86	0.53	1.4	ND
81	0.54	2.0	ND
66	0.92	4.5	ND
57	0.95	3.6	<2 nM
40	1.1	7.2	0.68
58	1.3	2.6	ND
60	1.6	3.1	ND
52	1.6	5.8	<2 nM
63	2.0	6.6	ND
49	2.8	8.5	<2 nM
89	3.0	2.5	ND
71	3.0	10.5	ND
87	6.0	2.5	ND
67	10.0	7.7	ND

如上表6所示，在所測的50個抗-MASP-2 Fab2中，17個Fab2被鑒定為MASP-2-阻斷性Fab2，其有效抑制C3轉化酶形成，IC50等於或小於10 nM Fab2 (34%陽性命中率)。所鑒定的17個Fab2中有8個的IC50範圍為納摩爾以下。此外，表6中所示的所有17個MASP-2阻斷性Fab2在凝集素途徑C3轉化酶測定法中基本上完全抑制C3轉化酶形成。圖8A圖示了對於Fab2抗體#11的C3轉化酶形成測定法的結果，其代表了測試的其它Fab2抗體，結果顯示在表6。這是重要的考慮因素，因為理論上可能的是，甚至當各MASP-2分子被Fab2結合時，“阻斷性”Fab2可能僅微弱地抑制MASP-2功能。

儘管甘露聚糖是凝集素途徑的已知啟動劑，但是在大

鼠血清中存在的抗甘露聚糖抗體也可能啟動經典途徑，並且通過經典途徑C3轉化酶產生C3b，這在理論上是可能的。然而，在本實施例所列的17個阻斷性抗-MASP-2 Fab2中的每一個都有效地抑制了C3b產生(>95%)，因此證明了該測定法對於凝集素途徑C3轉化酶的特異性。

為了計算各個Fab2的表觀Kd，對所有17個阻斷性Fab2都進行結合測定。對於6個阻斷性Fab2，抗大鼠MASP-2 Fab2與天然大鼠MASP-2的結合測定的結果也見表6。圖8B圖示了用Fab2抗體#11的結合測定法的結果。對於其它Fab2也進行了類似的結合測定，其結果見表6。一般而言，對於6個Fab2的每一個結合“天然”MASP-2所獲得的表觀Kd與在C3轉化酶功能測定中Fab2的IC50恰好適當對應。有證據表明，在啟動其蛋白酶活性時，MASP-2經歷了從“無活性”到“活性”形式的構象變化(Feinberg等人，*EMBO J 22*:2348-59 (2003)；Gal等人，*J. Biol. Chem. 280*:33435-44 (2005))。在用於C3轉化酶形成測定法的正常大鼠血漿中，MASP-2主要以“無活性”酶原構象存在。相比之下，在結合測定法中，MASP-2作為與MBL (其結合到固定化甘露聚糖)的複合物的部分而存在；因此，MASP-2可能為“活性”構象(Petersen等人，*J. Immunol Methods 257*:107-16, 2001)。因此，對於這兩個功能測定法中所測定的17個阻斷性Fab2的每一個，不必預期IC50和Kd之間確切的對應性，因為在各個測定法中，Fab2可結合不同構象形式的MASP-2。儘管如此，除了Fab2#88以外，對於兩種

測定法中所測的其它16個Fab2的每一個，IC50和表觀K_d之間顯示出相當密切的對應性(參見表6)。

評價若干阻斷性Fab2對於MASP-2-介導的C4裂解的抑制。圖8C圖示了C4裂解測定法的結果，顯示用Fab2 #41的抑制，IC50為0.81 nM (見表6)。如圖9所示，發現所有測試的Fab2都抑制C4裂解，IC50類似於C3轉化酶測定法中所獲得的IC50 (見表6)。

儘管甘露聚糖是凝集素途徑的已知啟動劑，但是大鼠血清中抗甘露聚糖抗體的存在理論上也可能啟動經典途徑，從而通過C1s介導的C4裂解而產生C4b。然而，已經鑒定出有效抑制C4b產生(>95%)的若干抗-MASP-2 Fab2，因此證明了該測定法對於MASP-2-介導的C4裂解的特異性。C4，如同C3一樣，含有獨特的高反應性硫酯基團作為其結構部分。在該測定法中當通過MASP-2裂解C4時，C4b上的硫酯基團可與通過酯鍵或醯胺鍵固定在塑膠孔底部的大分子上羥基或氨基形成共價鍵，因此有利於在ELISA測定法中檢測C4b。

這些研究清楚表明，大鼠MASP-2蛋白的高親和性FAB2的產生，功能性地阻斷C4和C3轉化酶活性，從而防止了凝集素途徑活化。

實施例11

本實施例描述了對若干按照實施例10所述方法產生的阻斷性抗大鼠MASP-2 Fab2抗體進行的表位作圖。

方法：

如圖10所示，使用pED4載體，在CHO細胞中表達下列所有具有N端6個His標籤的蛋白質：

大鼠MASP-2A，一種全長MASP-2蛋白，通過活性中心上的絲氨酸改變為丙氨酸(S613A)而失活；

大鼠MASP-2K，經改變降低了自身活化的全長MASP-2蛋白(R424K)；

CUBI-II，一種僅含有CUB1、EGF樣和CUBII結構域的大鼠MASP-2的N端片段；和

CUBI/EGF樣，一種僅含有CUBI和EGF樣結構域的大鼠MASP-2的N端片段。

如前所述，將這些蛋白質通過鎳-親和層析從培養上清液中純化(Chen等人，*J. Biol. Chem.* 276:25894-02 (2001))。

採用pTrxFus (Invitrogen)，使含有CCPII和大鼠MASP-2絲氨酸蛋白酶結構域的C端多肽(CCPII-SP)，在大腸桿菌中表達成為硫氧還蛋白融合蛋白。用Thiobond親和樹脂將蛋白質從細胞裂解物中純化。硫氧還蛋白融合配偶體由pTrxFus空載體表達作為陰性對照。

將所有重組蛋白透析到TBS緩衝液中，通過測量OD(280nm)，測得其濃度。

斑點印跡分析:

將上述和圖10中所示的連續稀釋的5種重組MASP-2多

肽(以及硫氧還蛋白多肽作為CCPII-絲氨酸蛋白酶多肽的陰性對照)點在硝酸纖維素膜上。蛋白質的點樣量在5重步驟中的範圍為100 ng至6.4 pg。在稍後的實驗中，蛋白質的點樣量再次在5重步驟中的範圍由50 ng降至16 pg。該膜用含5%脫脂奶粉的TBS溶液(封閉緩衝液)封閉，然後與含1.0 μg/mL抗-MASP-2 Fab2的封閉緩衝液(含有5.0 mM Ca^{++})一起溫育。用HRP-綴合的抗人Fab (AbD /Serotec；1/10,000稀釋)和ECL檢測試劑盒(Amersham)檢測結合的Fab2。一塊膜與作為陽性對照的多克隆兔抗人MASP-2Ab(參見Stover等人，*J Immunol 163*:6848-59 (1999))一起溫育。在這種情況下，用HRP-綴合的山羊抗兔IgG (Dako；1/2,000稀釋)，檢測結合的Ab。

MASP-2結合測定法：

ELISA板用含1.0 μg/孔的重組MASP-2A或CUBI-II多肽的碳酸鹽緩衝液(pH9.0)在4℃下包被過夜。各孔用含1% BSA的TBS溶液封閉，然後加入含連續稀釋的抗-MASP-2 Fab2的TBS溶液(含有5.0mM Ca^{2+})。將各板在室溫下孵育1小時。用TBS /Tween/ Ca^{2+}洗滌3次後，加入按1/10,000稀釋於TBS/Ca^{2+}的HRP-綴合的抗人Fab (AbD/Serotec)，將各板再次在室溫下孵育1小時。用TMB過氧化物酶底物試劑盒(Biorad)檢測結合的抗體。

結果：

斑點印跡法分析的結果表明了Fab2與下表7中提供的各種MASP-2多肽的反應性。表7提供的數值表明，所需要的蛋白質點樣量提供大約最大信號強度的一半。如表所示，所有多肽(僅硫氧還蛋白融合配偶體除外)均被陽性對照Ab(多克隆抗人MASP-2血清，在兔中產生)識別。

表7：斑點印跡法中與不同重組大鼠MASP-2多肽的反應性

Fab2 抗體#	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-樣	CCPII-SP	硫氧還蛋白
40	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
41	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
11	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
49	0.16 ng	NR	NR	>20 ng	NR
52	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
57	0.032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
60	0.4 ng	0.4 ng	NR	NR	NR
63	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
66	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
67	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
71	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
81	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
86	0.4 ng	NR	NR	10 ng	NR
87	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
陽性對照	<0.032 ng	0.16 ng	0.16 ng	<0.032 ng	NR

在第二和第三周期間觀察到途徑活性，並且到給予抗-MASP-2 MoAb後17天時在小鼠中凝集素途徑完全恢復。NR=無反應。陽性對照抗體是在兔中產生的多克隆抗人MASP-2血清。

所有Fab2均與MASP-2A以及MASP-2K反應(資料未顯示)。大多數Fab2識別CCPII-SP多肽但不識別N端片段。Fab2#60和Fab2#57是兩個例外。Fab2#60識別MASP-2A和

CUBI-II片段，但不識別CUBI / EGF樣多肽或CCPII-SP多肽，提示它結合CUBII的表位，或者跨越CUBII和EGF樣結構域。Fab2#57識別MASP-2A但不識別任何所測試的MASP-2片段，表明該Fab2識別CCP1的表位。Fab2#40和#49僅結合完整的MASP-2A。在圖11所示的ELISA結合測定法中，Fab2#60還結合CUBI-II多肽，雖然只具有略微較低的表觀親和性。

這些發現表明對於MASP-2蛋白多個區域的獨特阻斷性Fab2的鑒定。

實施例12

本實施例描述在鼠腎缺血/再灌注模型中MASP-2-/-小鼠的分析。

背景/原理：體溫下在腎中的缺血-再灌注(I/R)損傷具有許多臨床病況的相關性，包括低血容量休克、腎動脈阻塞和鉗閉過程。

腎缺血-再灌注(I/R)是急性腎衰竭的重要原因，與高達50%的死亡率有關(Levy等，*JAMA 275*:1489-94, 1996; Thadhani等，*N. Engl. J. Med. 334*:1448-60, 1996)。移植後腎衰竭是在腎移植後常見和危險的併發症(Nicholson等，*Kidney Int. 58*:2585-91, 2000)。目前沒有腎I/R損傷的有效治療，和血液透析是唯一的可用治療。腎I/R損傷的生理病理學是複雜的。最近研究表明，補體活化的凝集素途徑可在腎I/R損傷的發病機理中具有重要作用(deVries等，

Am. J. Path. 165:1677-88, 2004)。

方法：

MASP-2(-/-)小鼠按實施例**1**中所述產生，和與C57Bl/6回交至少10代。將Hypnovel (6.64 mg/kg; Roche products Ltd. Welwyn Garden City, UK)經腹膜內注射給予6只雄性MASP-2(-/-)和6只野生型(+/+)小鼠，體重為22-25 g，和隨後通過吸入異氟烷(Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK)麻醉。選擇異氟烷，因為它是溫和的吸入麻醉劑，具有最小的肝毒性；準確產生濃度和動物快速恢復，甚至在延長的麻醉後。給予Hypnovel是因為它在動物中產生安定鎮痛的條件和意味著需要給予較少的異氟烷。將加溫墊置於動物之下以保持恆定體溫。接著，進行腹部中線切開，使用一對牽開器保持體腔打開。在右腎和左腎的腎靜脈和動脈之上和之下清除結締組織，和通過施用小動脈瘤鉗，將腎蒂鉗住55分鐘的時間。該缺血時間最初基於在該實驗室進行的之前研究(Zhou等，*J. Clin. Invest.* 105: 1363-71 (2000))。另外，在缺血性滴定後選擇55分鐘的標準缺血時間，發現55分鐘產生一致的損傷，其也是可逆的，具有低於5%的低死亡率。在阻塞後，將0.4 ml的溫熱鹽水(37℃)置於腹腔中，然後在缺血期間閉合腹部。在除去小動脈瘤鉗後，觀察腎，直到顏色改變，即指示血液重新流到腎。將另外的0.4 ml溫熱鹽水置於腹腔中，和縫合開口，隨之將動物放回它們的籠子。在除去鉗後24小時收集尾血樣

品，和在48小時將小鼠處死，和收集另外的血樣。

評價腎損傷：在再灌注後24和48小時在6只雄性MASP-2(-/-)和6只WT (+/+)小鼠中評價腎功能。血液肌酐測量通過質譜測定，其提供可再現的腎功能指數(敏感性< 1.0 μmol/L)。圖12圖示說明了野生型C57Bl/6對照和MASP-2 (-/-)在再灌注後24小時和48小時的血尿素氮清除率。如圖12中所示，MASP-2(-/-)小鼠顯示與野生型對照小鼠相比，在24和48小時血液尿素的量顯著降低，指示在缺血再灌注損傷模型中免於腎損傷的保護功能作用。

總體上，在手術程式和缺血性創傷後24和48小時在WT (+/+)和MASP-2 (-/-)小鼠中均可見血液尿素增加。在非缺血性WT (+/+)手術動物中血液尿素的水準單獨測定為5.8 mmol/L。除了圖12提供的資料之外，一隻MASP-2 (-/-)動物顯示幾乎完全保護免於缺血性損傷，在24和48小時分別具有6.8和9.6 mmol/L的值。該動物作為可能的異常值從組分析中排除，其中可能不存在缺血性損傷。因此，圖12所示的最終分析包括5只MASP-2(-/-)小鼠和6只WT (+/+)小鼠，和在24和48小時在MASP-2 (-/-)小鼠中見到血液尿素統計顯著降低(Student t-檢驗 $p<0.05$)。這些發現表明，MASP-2活性的抑制預期對由於缺血性損傷導致的腎損傷具有保護或治療作用。

實施例13

本實施例描述了鼠黃斑變性模型中MASP-2-/-的結

果。

背景/原理：在工業化國家，年齡相關性黃斑變性(AMD)是55歲之後失明的首要原因。AMD以兩種主要形式發生：新生血管(濕性)AMD和萎縮性(幹性) AMD。新生血管(濕性)形式占與AMD相關的嚴重視力喪失的90%，即使僅約20%的AMD個體發展濕形式。AMD的臨床特點包括多個玻璃疣、地圖樣萎縮和脈絡膜新生血管形成(CNV)。在2004年12月，FDA批准Macugen藥物(呱加他尼(pegaptanib))，一類新的特異性靶向並阻斷血管內皮生長因數(VEGF)作用的眼科藥物，以治療濕性(新生血管)形式的AMD(Ng等，*Nat Rev. Drug Discov* 5:123-32 (2006))。雖然Macugen藥物對於AMD患者亞群代表了有前景的新的治療選擇，但對於這種複雜疾病仍迫切需要開發其他治療。多個獨立系列的調查暗示了補體活化在AMD發病機制中的中心作用。最嚴重形式的AMD，脈絡膜新生血管形成(CNV)的發病機制可涉及補體途徑啟動。

二十五年來，Ryan描述了CNV的鐳射誘導損傷的動物模型(Ryan, S. J., *Tr. Am. Opth. Soc. LXXVII*: 707-745, 1979)。最初使用恆河猴開發該模型，然而，同樣的技術此後已被用於在各種研究動物包括小鼠中開發CNV的類似模型(Tobe等，*Am. J. Pathol. 153*:1641-46, 1998)。在該模型中，鐳射光凝用來破壞布魯赫膜，該行為導致形成CNV樣膜。鐳射誘導的模型包括人類病況的許多重要特徵(最近的綜述，參見Ambati等，*Survey Ophthalmology 48*:257-

293, 2003)。鐳射誘導的小鼠模型現已確立，並且在一個大的且數目不斷增加的研究專案中被用作試驗基礎。普遍認為，鐳射誘導的模型與人類CNV享有足夠的生物相似性，以致使用這種模型進行發病機制和藥物抑制的臨床前研究與人類CNV相關。

方法：

如實施例1中所述生成MASP-2-/-小鼠，用C57Bl/6回交10代。目前的研究比較了當在鐳射誘導的CNV過程中評價MASP-2(-/-)和MASP-2(+/+)雄性小鼠時的結果，鐳射誘導的CNV是新生血管性AMD的加速模型，通過掃描鐳射共聚焦顯微術集中於鐳射誘導的CNV的體積作為組織損傷的量度，並通過ELISA測定鐳射損傷後視網膜色素上皮細胞(RPE)/脈絡膜中的VEGF水準，VEGF是CNV中涉及的強效血管生成因數，

誘導脈絡膜新生血管生成(CNV)：鐳射光凝(532 nm, 200 mW, 100 ms, 75μm; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA)由對藥物組分配掩蓋的單個人在第0天對各動物的雙眼進行。使用裂隙燈遞送系統和蓋玻片作為接觸透鏡，以標準化方式圍繞視神經施加鐳射點。鐳射損傷的形態學終點是空化氣泡的出現，認為該跡象與布魯赫膜的破壞關聯。進行評價的具體方法和終點如下。

螢光素血管造影：鐳射光凝後1周，用相機和成像系統進行螢光素血管造影(TRC 50 1A camera; ImageNet 2.01

system; Topcon, Paramus, NJ)。在腹膜內注射0.1毫升的2.5%螢光素鈉後，用與眼底照相機透鏡接觸的20-D透鏡捕獲照片。沒有參與鐳射光凝或血管造影的視網膜專家以蒙面方式在單個位置評估了螢光素血管造影。

脈絡膜新生血管形成(CNV)的體積：鐳射損傷後一周，摘出眼睛，並在4℃用4%多聚甲醛固定30分鐘。通過去除前段獲得眼杯，在PBS中洗滌三次，接著通過甲醇系列脫水和再水合。在室溫下用緩衝液(含有1%牛血清白蛋白和0.5%的Triton X-100的PBS)封閉兩次達30分鐘後，在4℃用含有0.2%BSA和0.1%的Triton X-100的PBS稀釋的0.5%的FITC-異凝集素B4 (Vector laboratories, Burlingame, CA)孵育眼杯過夜，其結合內皮細胞表面上的末端β-D-半乳糖殘基並選擇性標記鼠血管。經過兩次用含有0.1%Triton X-100的PBS洗滌後，感覺神經視網膜被輕輕剝離，從視神經切斷。產生四個鬆弛的放射狀切口，其餘RPE-脈絡膜鞏膜複合物平展安放在防褪色介質中(Immu-Mount Vectashield Mounting Medium; Vector Laboratories)並用蓋玻片蓋上。

用掃描鐳射共聚焦顯微鏡(TCS SP; Leica, Heidelberg, Germany)檢查了平展安放(flat-mount)。通過用藍色氬波長(488納米)激發並捕捉515和545納米之間的發射，使血管視覺化。40X油浸物鏡被用於所有的成像研究。水準光學切片(1μm步長)獲自RPE脈絡膜鞏膜複合物的表面。其中可識別連接到病變的周邊脈絡膜血管網的最深焦平面判定為病變層。在鐳射靶向區域和該基準面表面的任何血管判

斷為CNV。各切片的圖像進行數位存儲。CNV相關螢光面積通過電腦化圖像分析與顯微鏡軟體(TCS SP; Leica)進行測量。各水準切片中整個螢光區域的總和被用作CNV體積指數。成像通過對治療組分配掩蓋的操作員執行。

因為每個發展CNV的鐳射病變概率受到其所屬的組(小鼠、眼和鐳射點)影響，利用具有裂區重複測量設計的線性混合模型比較平均病變體積。整個區劃因數是該動物所屬的遺傳組，而裂區因數是眼睛。統計顯著性以0.05的水準來確定。用Bonferroni調整構建*Post hoc*均值比較，以供多重比較。

VEGF ELISA。在12個鐳射點損傷後三天，將RPE脈絡膜複合物在裂解緩衝液(20mM咪唑HCl、10 mM KCl、1 mM $MgCL_2$、10 mM EGTA、1% Triton X-100、10 mM NaF、1mM鉬酸鈉和1mM含蛋白酶抑制劑的EDTA)在冰上超聲處理15分鐘。通過識別所有剪接變體的ELISA試劑盒(Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)在450至570納米(R&D Systems, Minneapolis, MN)測定上清液中的VEGF蛋白水準，並標準化至總蛋白。以蒙面的方式，由不參與光凝、成像或血管造影的操作員執行重複測量。VEGF數字被表示為至少三個獨立實驗的平均值+/-SEM並使用Mann Whitney U檢驗比較。零假設在P <0.05拒絕。

結果：

VEGF水準的評估：

圖13A圖示了在第0天分離自C57B16野生型和MASP-2(-/-)小鼠的RPE脈絡膜複合物的VEGF蛋白水準。如圖13A所示，VEGF水準的評估表明相對於C57B1野生型對照小鼠，MASP-2 (-/-)小鼠中基線水準的VEGF降低。圖13B圖示了鐳射誘導損傷後第三天測得的VEGF蛋白水準。如圖13B所示，鐳射誘導損傷後第三天，在野生型(+/+)小鼠中，VEGF水準顯著增加，這與已發表的研究一致(Nozaki等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:2328 33 (2006))。然而，在MASP-2 (-/-)小鼠中，觀察到VEGF的令人驚訝的非常低的水準。

脈絡膜新生血管形成(CNV)的評估：

除了鐳射誘導性黃斑變性後VEGF水準降低外，在鐳射損傷前和後測定CNV區域。圖14圖示了在鐳射誘導損傷後第7天在C57b1野生型小鼠和MASP-2(-/-)小鼠中測得的CNV體積。如圖14所示，相比於野生型對照小鼠，在鐳射誘導損傷後第7天MASP-2(-/-)小鼠的CNV區域顯示減少約30%。

這些結果表明與野生型(+/+)對照相比MASP (-/-)小鼠所見的VEGF和CNV減少，並且在黃斑變性的治療中用抑制劑阻斷MASP-2具有預防或治療性效果。

實施例14

本實施例表明，凝血酶活化可在凝集素途徑活化後在

下列生理條件下發生，並表明MASP-2參與的程度。在正常大鼠血清中，凝集素途徑活化導致與補體活化(評估為C4沉積)併發的凝血酶活化(評估為凝血酶沉積)。如從圖15A和15B可看到，本系統中凝血酶活化由MASP-2阻斷抗體(Fab2形式)抑制，表現出抑制濃度-反應曲線(圖15B)，這與對於補體活化的抑制類似(圖15A)。這些資料表明，凝集素途徑的活化，當它發生在創傷中時，將導致在完全依賴於MASP-2的過程中補體和凝血系統兩者活化。由此推斷，MASP-2阻斷抗體可證明有效減輕過度的全身凝血例如彌散性血管內凝血的情況，彌散性血管內凝血是嚴重創傷病例中導致死亡的標誌之一。

實施例15

本實施例提供了在MASP-2 -/-缺陷和MASP-2 +/+充足小鼠中使用評估DIC中凝集素途徑作用的彌散性血管內凝血(“DIC”)的局部Schwarztman反應模型產生的結果。

背景/原理：

如上文所述，阻斷MASP-2抑制了凝集素途徑啟動和減少了過敏毒素C3a和C5a兩者的產生。C3a過敏毒素可以顯示是體外有效的血小板聚合劑，但它們的體內參與還不太明確，在傷口修復中血小板物質和纖溶酶的釋放可能僅次要涉及補體C3。在本實施例中，在MASP-2(-/-)和WT(+/+)小鼠中分析凝集素途徑的作用以解決以下問題：

是否需要C3活化的延長升高而產生彌散性血管內凝血。

方法：

如實施例1所述產生本研究中使用的MASP-2(-/-)小鼠，並與C57B1/6回交至少10代。

在此實驗中採用局部Schwarztman反應模型。局部Schwarztman反應(LSR)是脂多糖(LPS)誘導的反應，其具有來自先天免疫系統的細胞和體液成分的充分表徵的作用。LSR對補體的依賴已經充分確立(Polak, L.等，*Nature 223*:738-739 (1969); Fong J. S.等，*J Exp Med 134*:642-655 (1971))。在LSR模型中，提供TNFα給小鼠4小時(500 ng，陰囊內)，然後將小鼠麻醉，並準備用於提睪肌的活體顯微術。選定具有良好血流量(1-4 mm/s)的毛細血管後靜脈(15-60 μm直徑)網路用於觀察。動物用螢光抗體處理以選擇性標記中性粒細胞或血小板。依次掃描血管網路並數位記錄所有血管圖像供以後分析。記錄微循環的基礎狀態後，小鼠接受單次靜脈內注射LPS(100 μg)，無論是單獨還是與以下列出的藥劑一起。然後每10分鐘掃描同一血管網路達1小時。通過減去背景螢光而確定螢光團的具體累積，並通過使圖像閾值化而增強。反應幅度根據記錄的圖像進行測定。Schwarztman反應的主要量度是聚集資料。

該研究比較了暴露於已知補體途徑耗盡劑、眼鏡蛇毒因數(CVF)或終端途徑抑制劑(C5aR拮抗劑)的MASP-2 +/+充足或野生型小鼠。結果(圖16A)表明，CVF以及C5aR拮

抗劑均防止聚集體在脈管中出現。另外，MASP-2 -/-缺陷小鼠(圖16B)還表現出局部Schwarztman反應的完全抑制，支持凝集素途徑的參與。這些結果清楚地表明MASP-2在DIC生成的作用，並支持使用MASP-2抑制劑治療和預防DIC。

實施例16

本實施例描述在鼠腎移植模型中MASP-2 (-/-)小鼠的分析。

背景/原理：

MASP-2在腎移植的功能結果中的作用使用小鼠模型評價。

方法：

腎移植的功能結果使用單腎同基因移植至單側腎切除後的受體小鼠來評價，包括6只WT (+/+)移植受體(B6)和6只MASP-2 (-/-)移植受體。為了評價移植的腎的功能，剩餘的天然腎在移植後5天從受體中除去，之後24小時通過測量血尿素氮(BUN)水準評價腎功能。

結果：

圖17圖示說明了在腎移植後6天時在WT (+/+)受體和MASP-2 (-/-)受體中腎的血尿素氮(BUN)水準。如圖17所

示，在WT (+/+) (B6)移植受體中觀察到強升高的BUN水準(小鼠中的正常BUN水準為<5 mM)，表明腎衰竭。相比之下，MASP-2 (-/-)同基因移植受體小鼠顯示顯著更低的BUN水準，表明腎功能改善。注意，這些結果使用來自WT (+/+)腎供體的移植物獲得，表明在移植受體中僅缺少功能性凝集素途徑足以實現治療益處。

總之，這些結果表明，通過MASP-2抑制暫時抑制凝集素途徑提供了降低在腎移植中的發病率和延遲移植物功能的方法，該方法可能用於其它移植背景中。

實施例17

該實施例證實在鼠多微生物膿毒性腹膜炎模型中MASP-2 (-/-)小鼠抵抗感染性休克。

背景/原理：

為了評價MASP-2 (-/-)在感染中的可能作用，評價了盲腸結紮和穿刺(CLP)模型，一個多微生物膿毒性腹膜炎的模型。該模型被認為最準確地模擬人膿毒性腹膜炎的過程。盲腸結紮和穿刺(CLP)模型是其中盲腸被結紮和被針穿刺的模型，導致細菌持續洩露至腹腔，其通過淋巴引流到達血液，然後分佈於所有腹部器官，導致多器官衰竭和感染性休克(Eskandari等，*J Immunol 148*(9):2724-2730 (1992))。CLP模型類比患者中觀察到的膿毒症的過程和誘導早期過多炎性反應，之後是顯著的低-炎性階段。在該

階段，動物對細菌攻擊高度敏感(Wichterman等，*J. Surg. Res. 29*(2):189-201 (1980))。

方法：

使用盲腸結紮和穿刺(CLP)模型的多微生物感染的死亡率在WT (+/+) (n=18)和MASP-2 (-/-) (n=16)小鼠中測定。簡言之，將MASP-2缺陷小鼠和它們的野生型同窩仔麻醉，將盲腸外置和在遠端以上30%處結紮。之後，用0.4 mm直徑的針將盲腸穿刺一次。然後將盲腸放回腹腔，和用鉗閉合皮膚。經過CLP的小鼠的存活在CLP後14天的時間內監測。CLP後16小時在小鼠中收集腹膜灌洗液以測量細菌載量。在PBS中製備連續稀釋的腹膜灌洗液和接種到Mueller Hinton板中，之後在37℃在厭氧條件下孵育24小時，之後測量細菌載量。

還在WT (+/+)和MASP-2 (-/-)小鼠中CLP後16小時在肺和脾中通過定量即時聚合酶鏈反應(qRT-PCR)監測對細菌感染的TNF-α細胞因數反應。CLP後16小時在WT (+/+)和MASP-2 (-/-)小鼠中TNF-α的血清水準還通過夾心ELISA定量。

結果：

圖18圖示說明了CLP處理的動物的百分比存活，其作為CLP程式後天數的函數。如圖18中所示，與WT (+/+)小鼠相比，在使用盲腸結紮和穿刺模型的多微生物感染後在

MASP-2 (-/-)小鼠中缺乏凝集素途徑不增加小鼠的死亡率。然而，如圖19中所示，當與它們的WT (+/+)同窩仔相比，MASP-2 (-/-)小鼠顯示在CLP後的腹膜灌洗液中顯著更高的細菌載量(細菌數大約1000倍增加)。這些結果表明，MASP-2 (-/-)缺陷小鼠抵抗感染性休克。在該模型中在MASP-2缺陷小鼠中降低的細菌清除率可能歸因於C3b介導的吞噬作用受損，因為已經證實C3沉積是MASP-2依賴性的。

已確定與WT (+/+)對照(資料未顯示)相比，對細菌感染的TNF-α細胞因數反應在MASP-2 (-/-)小鼠中不升高。還確定，CLP後16小時在WT (+/+)小鼠中存在顯著更高血清濃度的TNF-α，這與MASP-2 (-/-)小鼠相反，其中TNF-α的血清水準保持幾乎未改變。這些結果表明，對膿毒性病況的強烈炎性反應在MASP-2 (-/-)小鼠中減輕和在存在較高細菌計數的情況下允許這些動物存活。

總之，這些結果證實凝集素途徑補體活化在敗血症的情況下的潛在有害作用和在具有嚴重膿毒症患者中增加的死亡率。這些結果還證實，在膿毒症期間MASP-2缺乏調節炎性免疫反應和降低炎性介質的表達水準。因此，認為通過給予針對MASP-2的抑制性單克隆抗體的MASP-2 (-/-)的抑制將有效降低在患有感染性休克的受試者中的炎性反應。

實施例18

本實施例描述在鼠鼻內感染性模型中MASP-2 (-/-)小鼠的分析。

背景/原理：

銅綠假單胞菌是革蘭氏陰性條件性人細菌病原體，其引起廣泛的感染，特別是在缺乏免疫力的個體中。它是獲得性醫院感染的主要來源，特別是醫院獲得性肺炎。它也是在囊性纖維化(CF)患者中顯著的發病率和死亡率的原因。銅綠假單胞菌肺部感染的特徵為強中性粒細胞募集和顯著的肺炎症，導致廣泛的組織損傷(Palanki M. S.等，*J. Med. Chem 51*:1546-1559 (2008))。

在本實施例中，進行研究以確定在MASP-2 (-/-)小鼠中除去凝集素途徑是否增加小鼠對細菌感染的易感性。

方法：

22只WT (+/+)小鼠、22只MASP-2 (-/-)小鼠和11只C3 (-/-)小鼠用鼻內給予銅綠假單胞菌細菌菌株攻擊。在感染後6天內監測小鼠和構建Kaplan-Mayer曲線，顯示百分比存活率。

結果：

圖20是感染後6天WT (+/+)、MASP-2 (-/-)或C3 (-/-)小鼠的百分比存活率的Kaplan-Mayer曲線。如圖20中所示，在MASP-2 (-/-)小鼠對比WT (+/+)小鼠中未觀察到差異。

然而，在C3 (-/-)小鼠中除去經典(C1q)途徑導致對細菌感染的嚴重易感性。這些結果證實，MASP-2抑制不增加對細菌感染的易感性，表明通過抑制MASP-2有可能減少在創傷患者中不需要的炎性併發症，而不損害患者使用經典補體途徑對抗感染的能力。

實施例19

本實施例描述了如實施例10所述而鑒定的代表性的高親和性抗-MASP-2 Fab2抗體的藥效動力學分析。

背景/原理：

如**實施例10**所述，為了鑒定阻斷大鼠凝集素途徑的高親和性抗體，大鼠MASP-2蛋白用於淘選噬菌體展示文庫。該文庫經設計以提供高免疫多樣化，並使用完整人免疫球蛋白基因序列來構建。如實施例10所述，通過ELISA篩選鑒定了大約250個單個噬菌體克隆，其以高親和性與大鼠MASP-2蛋白結合。對這些克隆測序，鑒定了50個編碼獨特MASP-2抗體的噬菌體。從這些克隆中表達Fab2蛋白，純化並分析MASP-2結合親和性和凝集素補體途徑功能性抑制。

如實施例10表6所示，該分析的結果是鑒定了17個具有功能阻斷活性的抗-MASP-2 Fab2 (34%命中率，對於阻斷性抗體)。Fab2對凝集素補體途徑的功能性抑制在C4沉積水準上是明顯的，其是MASP-2對C4裂解的直接度量。

重要的是，當評價C3轉化酶活性時，抑制同樣明顯，表明凝集素補體途徑的功能性阻斷。如實施例10所述鑒定的17個MASP-2封閉性Fab2有效抑制C3轉化酶形成，IC50等於或小於10 nM。所鑒定的17個Fab2中有8個的IC50值的範圍為納摩爾以下。此外，如圖8A-C所示和實施例10表6所概述，所有17個MASP-2阻斷性Fab2在凝集素途徑C3轉化酶測定法中基本上完全抑制C3轉化酶形成。此外，表6所示的17個阻斷性抗-MASP-2 Fab2的每一個有效抑制C3b產生(>95%)，因此證明了該測定法對凝集素途徑C3轉化酶的特異性。

大鼠IgG2c和小鼠IgG2a全長抗體同種型變體衍生自Fab2 #11。本實施例描述了在體內對這些同種型的藥效動力學參數的表徵。

方法：

如實施例10所述，大鼠MASP-2蛋白用於淘選Fab噬菌體展示文庫，從中鑒定出Fab2 #11。大鼠IgG2c和小鼠IgG2a全長抗體同種型變體衍生自Fab2 #11。如下在體內表徵了大鼠IgG2c和小鼠IgG2a兩者全長抗體同種型的藥效動力學參數。

在小鼠中的體內研究：

在小鼠中進行藥效動力學研究，以研究抗-MASP-2抗體劑量在體內對血漿凝集素途徑活性的作用。在本研究

中，在凝集素途徑測定法中，在經皮下(sc)和腹膜內(ip)給予0.3 mg/kg或1.0 mg/kg小鼠抗-MASP-2 MoAb（衍生自Fab2#11的小鼠IgG2a全長抗體同種型)之後的不同時間點，離體測定C4沉積。

圖21圖示了在經皮下給予0.3 mg/kg或1.0 mg/kg小鼠抗-MASP-2 MoAb後的不同時間點，采自小鼠(n=3小鼠/組)的未稀釋的血清樣品中離體測定的凝集素途徑特異性C4b沉積。在給予抗體前采自小鼠的血清樣品作為陰性對照(100%活性)，在體外補充100 nM所述阻斷性抗-MASP-2抗體的血清用作陽性對照(0%活性)。

圖21所示的結果表明在經皮下給予1.0 mg/kg劑量的小鼠抗-MASP-2 MoAb後對C4b沉積的快速和完全的抑制。在經皮下給予0.3 mg/kg劑量的小鼠抗-MASP-2 MoAb後，見到對C4b沉積的部分抑制。

在小鼠中，在單次ip給予0.6 mg/kg小鼠抗-MASP-2 MoAb後，追蹤檢查了3周內的凝集素途徑恢復的時間進程。如圖22所示，在給予抗體後，發生凝集素途徑活性的急劇下降，接著是在i.p.給予後持續大約7天的完全的凝集素途徑抑制。緩慢凝集素恢復。

這些結果證明當系統性遞送時，衍生自Fab2 #11的小鼠抗-MASP-2 Moab以劑量-反應方式抑制小鼠的凝集素途徑。

實施例20

本實施例描述了在年齡相關性黃斑變性的小鼠模型中，分析源自Fab2 #11的小鼠抗-MASP-2 Moab的功效。

背景/原理：

如在實施例10中所述，大鼠MASP-2蛋白用於淘選Fab噬菌體展示文庫，從中鑒定出Fab2 #11為功能活性抗體。從Fab2 #11產生大鼠IgG2c和小鼠IgG2a同種型的全長抗體。表徵了小鼠IgG2a同種型的全長抗-MASP-2抗體的藥效動力學參數(如實施例19所述)。在該實施例中，在年齡相關性黃斑變性(AMD)的小鼠模型中，分析源自Fab2 #11的小鼠抗-MASP-2全長抗體，如Bora P. S.等，*J Immunol 174*:491-497 (2005)所述。

方法：

在如實施例13所述的年齡相關性黃斑變性(AMD)的小鼠模型中，測試如實施例19所述源自Fab2 #11的小鼠IgG2a全長抗-MASP-2抗體同種型，其中改動如下。

小鼠抗-MASP-2 MoAb的給藥

CNV誘導前16小時，將兩個不同劑量(0.3 mg/kg和1.0 mg/kg)的小鼠抗-MASP-2 MoAb以及同種型對照MoAb處理ip注射入WT(+/+)小鼠(每組N=8只小鼠)。

誘導脈絡膜新生血管形成(CNV)

如實施例13中所述，使用鐳射光凝進行脈絡膜新生血管形成(CNV)的誘導和CNV體積的測量。

結果：

圖23圖示了在用同種型對照MoAb或小鼠抗-MASP-2 MoAb (0.3 mg/kg和1.0 mg/kg)處理的小鼠中，在鐳射損傷後7天測量CNV面積。如圖23所示，在預先用1.0 mg/kg 抗-MASP-2 MoAb處理的小鼠中，在鐳射處理後7天觀察到CNV約50%的統計學顯著(P <0.01)減少。如在圖23中進一步示出，觀察到0.3 mg/kg劑量的抗-MASP-2 MoAb不能有效減少CNV。應該注意的是，0.3 mg/kg劑量的抗-MASP-2 MoAb顯示出部分和暫態抑制皮下給藥後的C4b沉積，如實施例19中描述並在圖21示出的。

本實施例中所述的結果證明用抑制劑例如抗-MASP-2 MoAb阻斷MASP-2，在黃斑變性的治療中具有預防和/或治療性效果。應該注意的是，這些結果與實施例13中描述的在MASP-2(-/-)小鼠中進行的研究所觀察到的結果一致，在實施例13中，相比於野生型對照小鼠，在鐳射處理後7天觀察到MASP-2(-/-)小鼠的CNV減少30%。此外，本實施例結果進一步證明，全身性遞送抗-MASP-2抗體提供眼睛的局部治療益處，從而突出表明全身性給藥途徑治療AMD患者的潛力。總之，這些結果提供了證據，支援在AMD的治療中採用MASP-2 MoAb。

實施例21

本實施例證實，在用腦膜炎奈瑟菌感染後，MASP-2缺陷小鼠受到保護免於腦膜炎奈瑟菌誘導的死亡率，和與野生型對照小鼠相比具有提高的菌血症清除率。

原理：腦膜炎奈瑟菌是一種異養的革蘭氏陰性雙球菌，已知其在腦膜炎和其它形式的腦膜炎球菌疾病例如腦膜炎球菌血症中的作用。腦膜炎奈瑟菌是在兒童期間發病率和死亡率的主要原因。嚴重的併發症包括敗血病、Waterhouse-Friderichsen綜合征、腎上腺功能不全和彌散性血管內凝血(DIC)。參見例如，Rintala E等，*Critical Care Medicine28*(7):2373-2378 (2000)。在本實施例中，在MASP-2(-/-)和WT (+/+)小鼠中分析凝集素途徑的作用，以解決MASP-2缺陷小鼠是否對腦膜炎奈瑟菌誘導的死亡率敏感。

方法：

MASP-2敲除小鼠如實施例1所述產生，並與C57B1/6回交至少10代。10周齡的MASP-2 KO小鼠(n=10)和野生型C57/B6小鼠(n=10)通過靜脈內注射接種在400 mg/kg鐵葡聚糖中的5x108 cfu/100 µl、2x108 cfu/100 µl或3x107 cfu/100 µl的劑量的腦膜炎奈瑟菌血清型A Z2491。在72小時時間段內監測感染後小鼠的存活。感染後以每小時的間隔自小鼠獲取血液樣品，分析以確定腦膜炎奈瑟菌的血清水準(log cfu/ml)，以證實感染和確定細菌自血清的清除率。

結果：

圖24A圖示說明了給予感染劑量的5x108/100 µl cfu腦膜炎奈瑟菌後MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活率。如圖24A中所示，在用最高劑量的5x108/100 µl cfu腦膜炎奈瑟菌感染後，100%的MASP-2 KO小鼠在感染後的整個72小時期間存活。相比之下，僅20%的WT小鼠在感染後24小時仍存活。這些結果證實，MASP-2缺陷小鼠受到保護免於腦膜炎奈瑟菌誘導的死亡率。

圖24B圖示說明了在不同的時間點在取自用5x108 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染的MASP-2 KO和WT小鼠的血液樣品中回收的腦膜炎奈瑟菌的log cfu/ml。如圖24B中所示，在WT小鼠中在感染後24小時在血液中腦膜炎奈瑟菌的水準達到約6.5 log cfu/ml的峰值，和到感染後48小時下降到零。相比之下，在MASP-2 KO小鼠中，在感染後6小時腦膜炎奈瑟菌的水準達到約3.5 log cfu/ml的峰值和到感染後36小時下降到零。

圖25A圖示說明了在用2x108 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染後MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活率。如圖25A中所示，在用2x108 cfu/100 µl劑量的腦膜炎奈瑟菌感染後，在感染後整個72小時期間100%的MASP-2 KO小鼠存活。相比之下，僅80%的WT小鼠在感染後24小時仍存活。與圖24A所示的結果一致，這些結果還證實MASP-2缺陷小鼠受到保護免於腦膜炎奈瑟菌誘導的死亡率。

圖25B圖示說明了在不同的時間點在取自用2x108 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染的WT小鼠的血液樣品中回收的腦膜炎奈瑟菌的log cfu/ml。如圖25B中所示，在用2x108 cfu感染的WT小鼠的血液中腦膜炎奈瑟菌的水準在感染後12小時達到約4 log cfu/ml的峰值和到感染後24小時下降到零。圖25C圖示說明了在不同的時間點在取自用2x108 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染的MASP-2 KO小鼠的血液樣品中回收的腦膜炎奈瑟菌的log cfu/ml。如圖25C中所示，在用2x108 cfu感染的MASP-2 KO小鼠的血液中腦膜炎奈瑟菌的水準在感染後2小時達到約3.5 log cfu/ml的峰值和在感染後3小時下降到零。與圖24B中顯示的結果一致，這些結果證實儘管MASP-2 KO小鼠用與WT小鼠相同劑量的腦膜炎奈瑟菌感染，但MASP-2 KO小鼠具有與WT相比提高的菌血症清除率。

用最低劑量的3x107 cfu/100 µl腦膜炎奈瑟菌感染後在72小時的時間內MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活率為100%(資料未顯示)。

討論

這些結果表明，MASP-2缺陷小鼠受到保護免於腦膜炎奈瑟菌誘導的死亡率和與WT小鼠相比具有提高的菌血症清除率。因此，鑒於這些結果，預期MASP-2抑制劑(例如MASP-2 MoAb)的治療應用，將預期有效治療、預防或減輕被腦膜炎奈瑟菌細菌感染(即，膿毒症和DIC)的影

響。此外，這些結果顯示MASP-2抑制劑例如MASP-2 MoAb的治療應用不會使受試者遭受腦膜炎奈瑟菌感染的風險增加。

實施例22

該實施例描述了新的凝集素途徑介導的和MASP-2依賴性的補體C3的C4-旁路啟動的發現。

原理：

二十年前，利用補體活化的抑制劑，以限制心肌缺血/再灌注損傷(MIRI)的主要治療益處令人信服地在心肌梗死的實驗性大鼠模型中證實：靜脈內給予重組sCR1，一種細胞表面補體受體1型的可溶性截短衍生物(CR1)，並在MIRI的大鼠體內模型中評估其效果。用sCR1治療減少梗死體積超過40% (Weisman, H. F.等，*Science 249*:146-151 (1990))。該重組抑制劑的治療潛力隨後在臨床試驗中證實，顯示給予MI患者sCR1在缺血後心臟中防止了收縮失敗(Shandelya, S.等，Circulation 87:536-546 (1993))。但是還沒有最終確定導致補體在缺血組織中啟動的主要機制，主要是由於缺乏合適的實驗模型，對導致氧氣剝奪細胞中補體活化的分子過程瞭解有限，並且不同補體活化途徑之間的交叉對話和協同作用。

作為免疫應答的基本組分，補體系統通過抗體依賴性和非依賴性機制兩者提供保護，防止入侵微生物。它主導

免疫應答中的許多細胞和體液相互作用，包括趨化、吞噬作用、細胞粘附和B細胞分化。三種不同的途徑引發補體級聯：經典途徑、替代途徑和凝集素途徑。經典途徑識別亞組分C1q結合到各種靶標-最顯著的是免疫複合物-以啟動相關絲氨酸蛋白酶C1r和C1s的逐步啟動，為被適應性免疫系統銜接後的病原體和免疫複合物清除提供了主要機制。C1q結合免疫複合物使C1r酶原二聚體轉化成其活性形式以裂解並從而啟動C1s。C1s將Clq結合以兩個裂解步驟轉化成補體活化：它首先將C4轉化成C4a和C4b，然後裂解C4b結合的C2，以形成C3轉化酶C4b2a。這種複合物將豐富的血漿組分C3轉化成C3a和C3b。與C4b2a複合物緊鄰的C3b積累將對C3的底物特異性轉移至C5，以形成C5轉化酶$C4b2a(C3b)_n$。通過經典途徑啟動產生的C3和C5轉化酶複合物與通過凝集素途徑啟動路線生成的那些是相同的。在替代途徑中，組分C3的自發低水準水解導致蛋白質片段沉積到細胞表面，引發對外源細胞的補體活化，而宿主組織中的細胞相關調節蛋白避免啟動，從而防止自破壞。如同替代途徑，凝集素途徑可能在缺乏免疫複合物時啟動。活化通過多分子凝集素途徑啟動複合物與病原體相關分子模式(PAMP)結合而啟動，PAMP主要是細菌、真菌或病毒性病原體上存在的碳水化合物結構或細胞凋亡、壞死、惡性或氧氣剝奪細胞中的異常糖基化模式(Collard, C. D.等，*Am. J. Pathol. 156*:1549-1556 (2000); Walport, M. J., *N. Engl. J. Med. 344*:1058-1066 (2001); Schwaeble, W.等，

Immunobiology 205:455-466 (2002)；和Fujita, T., *Nat. Rev. Immunol. 2*:346-353 (2002))。

甘露聚糖結合凝集素(MBL)是顯示出與一組新的絲氨酸蛋白酶形成複合物的第一碳水化合物識別亞組分，所述絲氨酸蛋白酶稱為MBL相關絲氨酸蛋白酶(MASP)並根據其發現的順序編號(即，MASP-1、MASP-2和MASP-3)。在人中，凝集素途徑啟動複合物可與具有不同碳水化合物結合特異性的四個替代碳水化合物識別亞組分形成，即，MBL2和三種不同的纖維膠凝蛋白家族成員，即L-纖維膠凝蛋白、H-纖維膠凝蛋白和M-纖維膠凝蛋白與MASP。在小鼠和大鼠血漿中，兩種形式的MBL，MBL A和MBL C以及纖維膠凝蛋白-A與MASP形成凝集素啟動途徑複合物。我們先前克隆和表徵了MASP-2和19 kDa的額外的截短MASP-2基因產物，在人類、小鼠和大鼠中稱為MAp19或sMAP (Thiel, S.等，*Nature 386*:506-510 (1997);. Stover, C.M.等，*J. Immunol. 162*:3481-3490 (1999); Takahashi, M.等，*Int. Immunol. 11*:859-863 (1999)；和Stover, C. M.等，*J. Immunol. 163*:6848-6859 (1999))。MAp19/ sMAP缺乏蛋白酶活性，但可通過競爭MASP與碳水化合物識別複合物的結合而調節凝集素途徑啟動(Iwaki, D.等，*J. Immunol. 177*:8626-8632 (2006))。

有證據表明，在三種MASP中，僅需要MASP-2將凝集素途徑識別複合物的結合轉化為補體活化(Thiel, S.等(1997); Vorup-Jensen, T.等，*J. Immunol. 165*:2093-2100

(2000); Thiel, S.等，*J. Immunol. 165*:878-887 (2000); Rossi, V.等，*J. Biol. Chem. 276*:40880-40887 (2001))。最近描述的MASP-1和MASP-3缺陷的小鼠品系的表型突出表明了這個結論。除了在體外凝集素途徑介導的補體活化的啟動延遲外，MASP-1/3缺陷的小鼠保留凝集素途徑的功能活性。用重組MASP-1重構MASP-1-和MASP-3缺陷型血清克服了凝集素途徑啟動的這種延遲，暗示MASP-1可促進MASP-2活化(Takahashi, M.等，*J. Immunol. 180*:6132-6138 (2008))。最近的一項研究表明，需要MASP-1(以及可能還有MASP-3)將替代途徑啟動酶因數D自其酶原形式轉化成其酶促活性形式(Takahashi, M.等，*J. Exp. Med. 207*:29-37 (2010))。在MASP-1/3缺陷小鼠的血漿中缺乏替代途徑的功能活性突出表明了這一過程的生理重要性。

最近產生的小鼠品系與凝集素途徑碳水化合物識別亞組分MBL A和MBL C的組合靶向缺陷仍然可以經由剩餘的鼠凝集素途徑識別亞組分纖維膠凝蛋白A而啟動凝集素途徑啟動(Takahashi, K.等，*Microbes Infect. 4*:773-784 (2002))。在MASP-2缺陷型小鼠中沒有任何殘餘凝集素途徑的功能活性，這提供了一個明確的模型以研究先天體液免疫的該效應器分支在健康和疾病中的作用。

C4-和MASP-2缺陷型小鼠品系的可用性允許我們定義新的凝集素途徑特異性的、但MASP-2依賴性的補體C3的C4-旁路啟動途徑。MIRI中MASP-2缺乏的顯著保護性表型突出表明了該新的凝集素途徑介導的C4旁路啟動途徑對缺

血後組織損失的重要貢獻，而在同一個模型中測試的C4缺陷型小鼠沒有顯示保護作用。

在本實施例中，我們描述了新的凝集素途徑介導的和MASP-2依賴性的補體C3的C4-旁路活化。在心肌缺血/再灌注損傷(MIRI)實驗模型中，這個新的啟動途徑的生理相關性是由MASP-2缺乏的保護性表型建立的，在該模型中C4缺陷型動物未受到保護。

方法：

MASP-2缺陷型小鼠沒有表現出肉眼可見的異常。如實施例1所述生成MASP-2缺陷型小鼠。雜合$^{(+/-)}$和純合$^{(-/-)}$MASP-2缺陷型小鼠兩者是健康和可育的，沒有表現出肉眼可見的異常。其平均壽命類似於其WT同窩小鼠(>18個月)。在實驗性疾病模型中研究這些小鼠的表型前，我們的MASP-2$^{-/-}$系經回交11代為C57BL/6背景。完全沒有MASP-2 mRNA通過聚A +選擇的肝RNA製備物的RNA印跡證實，而編碼MAp19或sMAP的1.2kb mRNA (MASP-2基因的截短可變剪接產物)大量表達。

使用特異於MASP-2的絲氨酸蛋白酶結構域的編碼序列(B鏈)或A鏈的其餘編碼序列的引物對進行qRT-PCR分析，表明在MASP- 2$^{-/-}$小鼠中沒有可檢測的B鏈編碼RNA，而擾亂的A鏈mRNA轉錄物的豐度顯著增加。同樣地，MASP-2$^{+/-}$和MASP-2$^{-/-}$小鼠中MAp19/ sMAP編碼mRNA的豐度增加。通過ELISA對每種基因型的五隻動物

測定的血漿MASP-2水準，對於WT對照為300ng/ ml(範圍260-330ng/ ml)，對於雜合小鼠為360ng/ ml(範圍330-395ng/ ml)，而在MASP- 2-/-小鼠中不可檢測。使用qRT-PCR，建立mRNA表達譜，表明MASP-2-/-小鼠表達MBL A、MBL C、纖維膠凝蛋白A、MASP-1、MASP-3、C1q、C1rA、C1sA、因數B、因數D、C4和C3的mRNA，其豐度類似於其MASP-2足夠的同窩小鼠(資料未示出)。

MASP-2-/-(n=8)和MASP-2+/+ (n=7)同窩小鼠的血漿C3水準使用市售小鼠C3 ELISA試劑盒(Kamiya, Biomedical, Seattle, WA)測定。MASP-2缺陷型小鼠的C3水準(平均0.84 mg/ml，+/-0.34)類似於WT對照的水準(平均0.92，+/-0.37)。

結果：

MASP-2對於凝集素途徑的功能活性必不可少。

如實施例2中所述和圖5中所示，MASP-2-/-血漿的體外分析顯示出在活化性甘露聚糖和酵母聚糖包被的表面上完全不存在凝集素途徑的功能活性用於啟動C4。同樣，在包被有N-乙醯葡糖胺的表面上的MASP-2-/-血漿中，凝集素途徑依賴性的C4和C3裂解兩者都不可檢測，N-乙醯葡糖胺結合並經由MBL A、MBL C和纖維膠凝蛋白A而觸發啟動(資料未示出)。

MASP-2 -/-小鼠的血漿和血清分析清楚地表明，基本上需要MASP-2以通過凝集素途徑來啟動補體。然而，凝集素途徑功能活性的總缺乏使得其它補體活化途徑完整：

MASP-2-/-血漿仍可通過經典(圖26A)和替代途徑(圖26B)而啟動補體。在圖26A和26B中，符號“*”表示來自WT(MASP-2(+/+))的血清；符號“●”表示WT的血清(C1q耗盡)；符號“□”表示MASP-2(-/-)的血清；和符號“Δ”表示MASP-2(-/-)的血清(C1q耗盡)。

圖26A圖示了MASP-2-/-小鼠保留功能性經典途徑：C3b沉積在包被有免疫複合物的微量滴定板(通過用BSA包被然後加入山羊抗-BSA IgG而原位產生)上測定。圖26B圖示了MASP-2缺陷型小鼠保留功能性替代途徑：在僅允許替代途徑啟動(含有Mg^{2+}和EGTA的緩衝液)的條件下在酵母聚糖包被的微量滴定板上測定C3b沉積。圖26A和圖26B示出的結果是重複的均值，並且代表三個獨立實驗。從始至終使用相同的符號表示血漿來源。這些結果表明，功能性替代途徑存在於MASP-2缺陷型小鼠，如在設計成直接觸發替代途徑的實驗條件下如圖26B所示結果證明的，而使經典途徑和凝集素途徑均失活。

補體活化的凝集素途徑關鍵性地促成心肌缺血/再灌注損傷(MIRI)中的炎性組織損失。

為了研究凝集素途徑功能活性對MIRI的作用，我們在MIRI模型中，在冠狀動脈左前降支(LAD)暫態結紮和再灌注後，比較了MASP-2-/-小鼠和WT同窩對照。補體C4的存在或不存在對MIRI的缺血組織損失程度沒有影響。我們評估了在實驗性MIRI後C4缺乏對梗塞面積的影響。如圖27A和圖27B所示，在C4缺陷型小鼠及其WT同窩小鼠兩者中觀

察到幾乎相同的梗塞面積。圖27A圖示了在C4-/-小鼠(n=6)和匹配的WT同窩對照(n=7)中，在LAD結紮和再灌注後MIRI誘導的組織損失。圖27B圖示了INF作為AAR的函數，清楚地表明C4-/-小鼠與其WT對照(虛線)同樣易受MIRI。

這些結果表明，C4缺陷型小鼠未受保護而免於MIRI。該結果是出乎意料的，因為它與廣泛接受的觀點衝突，廣泛接受的觀點即主要C4啟動片段C4b是經典和凝集素途徑C3轉化酶C4b2a的基本組分。因此，我們評估了在C4-缺陷型小鼠和人血漿中是否可檢測到補體C3的殘留凝集素途徑的特異性啟動。

凝集素途徑可通過新的MASP-2依賴性C4-旁路啟動途徑在不存在C4時啟動補體C3。

歷史報告表明在C4缺陷型豚鼠血清中C4旁路啟動途徑的存在(May, J. E.和M. Frank, *J. Immunol. 111*:1671-1677(1973))，受此激勵，我們分析了C4缺陷型小鼠是否可具有殘餘經典或凝集素途徑的功能活性，並且在排除替代途徑作用的途徑特異性測定條件下監測C3活化。

以抑制替代途徑啟動的血漿濃度(1.25%和以下)使用再鈣化的血漿，在甘露聚糖包被的微量滴定板上測定C3b沉積。儘管在測試經典途徑啟動的C4缺陷的血漿中沒有檢測到C3裂解(資料未示出)，但當通過凝集素途徑引發補體活化時，在C4缺陷的小鼠血漿中觀察到強烈的殘留C3裂解活性。凝集素途徑依賴性通過將C4缺陷的血漿稀釋液與

可溶性甘露聚糖預孵育後C3裂解的競爭性抑制而證明(參見圖28A)。如圖28A-D所示，在不存在C4時觀察到C3的MASP-2依賴性啟動。圖28A圖示了通過C4+/+ (十字)和C4-/- (空心圓)小鼠血漿的C3b沉積。在測定前將C4-/-血漿與過量的(1 μg/ml)流體相甘露聚糖預孵育，完全抑制了C3沉積(實心圓)。結果代表3個獨立實驗。圖28B圖解說明了實驗結果，其中野生型、MASP-2缺陷型(空心方塊)和C4-/-小鼠血漿(1%)與不同濃度的抗-大鼠MASP-2 mAbM11 (橫坐標)混合，並在甘露聚糖包被的平板上測定C3b沉積。結果是4個測定(每種類型血漿中的2個的重複)的均值(±SD)。圖28C圖示了實驗結果，其中人血漿：合併的NHS(十字)、C4-/-血漿(空心圓)和與1 μg/ml甘露聚糖預孵育的C4-/-血漿(實心圓)。結果代表三個獨立實驗。圖28D圖示了在C4-足夠和C4缺陷的人血漿(1%)中通過抗-人MASP-2 mAbH3 (均值±一式三份的SD)抑制C3b沉積。如圖28B所示，在平行測定的MASP-2-/-血漿中沒有檢測到凝集素途徑依賴性C3啟動，暗示C3的該C4-旁路活化途徑是MASP-2依賴性的。

為了進一步證實這些發現，我們建立了一系列重組抑制性mAb，所述mAb通過針對重組人和大鼠MASP-2A (其中活性蛋白酶結構域的絲氨酸殘基通過定點誘變被替換為丙氨酸殘基，以防止抗原的自溶降解)的親和力篩選，分離自噬菌體展示抗體文庫。利用重組人和大鼠MASP-2A作為抗原(Chen, C. B.和Wallis, *J. Biol. Chem.* *276*:25894-

25902 (2001))，針對MASP-2的重組抗體(AbH3和AbM11)從組合抗體文庫(Knappik, A.等，*J. Mol. Biol. 296*:57-86 (2000))中分離。在小鼠血漿中有效抑制凝集素途徑介導的C4和C3啟動的抗大鼠Fab2片段(IC50~1 nM)被轉化為全長IgG2a抗體。多克隆抗鼠MASP-2A抗血清在大鼠中產生。這些工具使我們證實C3的這種新的凝集素途徑特異性C4-旁路活化途徑的MASP-2依賴性，如下面進一步描述。

如圖28B所示，選擇性結合小鼠和大鼠MASP-2的抑制性單克隆抗體M211通過凝集素途徑以濃度依賴性的方式以相似的IC_{50}值抑制C4缺陷型小鼠的C3的C4-旁路活化以及WT小鼠血漿的C3活化。所有測定均在高血漿稀釋度下進行，使得替代途徑啟動路線功能障礙(最高血漿濃度為1.25%)。

為了研究人類中C3的類似凝集素途徑特異性C4-旁路啟動的存在，我們分析了兩個人類C4基因(即，C4A和C4B)遺傳缺陷(導致C4完全缺失)的供體血漿(Yang, Y.等，*J. Immunol. 173*:2803-2814 (2004))。圖28C顯示，該患者的血漿在高血漿稀釋度下有效啟動C3(使得替代啟動途徑功能障礙)。在甘露聚糖包被的平板中C3啟動的凝集素途徑特定模式在鼠C4缺陷血漿(圖28A)和人C4缺陷血漿(圖28C)中通過加入過量濃度的流體相甘露聚糖而證明。使用特異性結合人MASP-2和除去MASP-2功能活性的單克隆抗體AbH3，在人C4缺陷血漿中評估了這種C3啟動機制對MASP-2的依賴。如圖28D所示，在C4-足夠和C4-缺乏的人

血漿兩者中AbH3以相當效力抑制C3b(和C3dg)沉積。

為了評估其它補體成分在C3的C4-旁路活化中可能發揮的作用，我們在凝集素途徑特異性和經典途徑特異性的測定條件下測試了MASP-1/3-/-和Bf/ C2-/-小鼠血漿以及MASP-2-/-、C4-/-和C1q-/-血漿(作為對照)。C3裂解的相對量針對使用WT血漿時沉積的C3量作圖。

圖29A圖示了在凝集素啟動途徑或經典啟動途徑特異性測定條件下測試的各種補體缺陷小鼠品系中血漿的C3轉化酶活性的比較分析。平行測試了WT小鼠(1%)(n=6)、MASP-2-/-小鼠(n=4)、MASP-1/3-/-小鼠(n=2)、C4-/-小鼠(n=8)、C4/MASP-1/3-/-小鼠(n=8)、Bf/C2-/-(n=2)和C1q-/-小鼠(n=2)的稀釋血漿樣品。用2.5μg/ ml重組大鼠C2(Bf/C2-/-+C2)重構Bf/C2-/-血漿恢復了C3b沉積。結果是均值(±SD)。**P <0.01(與WT血漿相比)。如圖29A所示，在凝集素途徑特異性測定條件下而不是在經典途徑特異性條件下測試的C4-/-血漿中觀察到顯著C3沉積。再次，在MASP-2缺陷的血漿中沒有觀察到通過凝集素途徑啟動路線的C3沉積，而同樣的血漿經由經典途徑使C3沉積。在MASP-1/3-/-血漿中，C3沉積在凝集素和經典途徑特異性測定條件下均發生。無論是使用凝集素途徑還是經典途徑特異性條件，在C4和MASP-1/3組合缺乏時沒有觀察到血漿中C3沉積。在C2/Bf-/-血漿中沒有可檢測的C3沉積，無論是通過凝集素途徑還是通過經典途徑。但是，用重組C2重構C2/Bf-/-小鼠血漿恢復了凝集素途徑和經典途徑介導

的C3裂解。使用C1q-/-血漿驗證了測定條件。

圖29B圖示了在凝集素啟動途徑特異性測定條件下測試的各種補體缺陷的小鼠品系WT、fB-/-、C4-/-、MASP-1/3-/-和MASP-2-/-血漿(1%血漿，結果代表三個獨立的實驗)中血漿的C3轉化酶活性的時間分辨動力學。如圖29B所示，雖然在MASP-2-/-血漿中沒有觀察到C3裂解，但fB-/-血漿以與WT血漿相似的動力學裂解C3。在C4-/-以及在MASP-1/3缺乏的血漿中，觀察到C3經凝集素途徑依賴性轉化為C3b (和C3dg)的顯著延遲。C3活化在MASP-1/3-/-血漿中的這種延遲最近證明是MASP-1依賴性的，而不是MASP-3依賴性的(Takahashi, M.等，*J. Immunol. 180*:6132-6138 (2008))。

討論：

在本實施例中描述的結果有力地表明，MASP-2的功能活性是C4存在和不存時C3通過凝集素途徑活化所必需的。此外，C3的該新的凝集素途徑特異性C4-旁路啟動途徑需要C2和MASP-1起作用。MASP-2-/-以及C4-/-血漿中凝集素途徑功能活性的比較分析顯示存在補體C3的先前未認識的C4-非依賴性的、但MASP-2依賴性的活化途徑，並且表明C3可以在完全不存在C4時以凝集素途徑依賴性模式被啟動。儘管這種新的MASP-2依賴性C3轉化酶的詳細分子組成和啟動事件的順序尚待闡明，但我們的結果暗示該C4-旁路啟動途徑還需要補體C2以及MASP-1的存在。C4

和MASP-1/3合併缺乏的小鼠血漿中凝集素途徑介導的C3裂解活性的損失可通過最近描述的MASP-1作用進行說明，該作用即通過直接裂解和活化MASP-2而提高MASP-2依賴性補體活化(Takahashi, M.等，*J. Immunol. 180*:6132-6138 (2008))。同樣地，MASP-1可以通過其裂解C2的能力而有助於MASP-2功能活性(Moller-Kristensen等，*Int. Immunol. 19*:141-149 (2007))。兩種活性可以解釋降低的速率，由此MASP-1/3缺陷的血漿經由凝集素啟動途徑裂解C3，並解釋可能需要MASP-1經由C4-旁路啟動途徑來維持C3轉化的原因。

C2/fB-/-血漿不能通過凝集素途徑啟動C3被證明是C2依賴性的，由於在甘露聚糖包被的平板上將重組大鼠C2加入C2/fB-/-血漿恢復了重構血漿啟動C3的能力。

以下發現需要對各種疾病模型(包括實驗性肺炎鏈球菌感染(Brown, J. S.等，*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99*:16969-16974 (2002));實驗性變應性腦脊髓炎(Boos, L.A.等，*Glia 49*:158-160 (2005))和C3依賴性鼠肝再生模型(Clark, A.等，*Mol. Immunol. 45*:3125-3132 (2008)))中凝集素途徑的作用進行重新評估：C4缺乏特異性破壞經典補體活化途徑而凝集素途徑通過MASP-2依賴性C4-旁路啟動途徑保留生理學臨界水準的C3轉化酶活性。後一組證明，C4缺陷小鼠可以替代途徑非依賴性的方式啟動C3，由於在C4-/-小鼠中通過抗體介導的因數B功能活性耗盡而體內抑制替代途徑並沒有影響C3裂解依賴性肝再生(Clark, A.

等(2008))。在我們的MIRI模型以及在先前描述的腎同種異體移植物排斥模型中(Lin, T.等，*Am. J. Pathol. 168*: 1241-1248 (2006))，C3的這種凝集素途徑介導的C4-旁路啟動途徑還可以解釋C4缺乏的保護性表型的缺乏。相比之下，我們最近的結果已獨立地證明在腎移植模型中MASP-2-/-小鼠的顯著保護性表型(Farrar, C. A.等，*Mol. Immunol. 46*:2832 (2009))。

總之，本實施例的結果支持這樣的觀點：C3的MASP-2依賴性C4-旁路啟動是生理學相關機制，該機制在C4可用性限制C3啟動的條件下可能是重要的。

實施例23

本實施例描述了在WT(+/+)、MASP-2(-/-)、F11(-/-)、F11/C4(-/-)和C4(-/-)小鼠中通過凝血酶底物活化C3和在甘露聚糖上的C3沉積。

原理：

如實施例14中描述的，確定凝血酶活化可在生理條件下在凝集素途徑活化後發生，並表明了MASP-2參與的程度。C3在補體系統的活化中起中心作用。經典和替代補體活化途徑均需要C3活化。進行實驗，以確定C3是否由凝血酶底物活化。

方法：

通過凝血酶底物活化C3

在下列活化形式的凝血酶底物存在的情況下測定C3活化：人FCXIa，人FVIIa，牛FXa，人FXa，人活化蛋白C和人凝血酶。將C3與各種凝血酶底物孵育，然後在10%SDS-聚丙烯醯胺凝膠上在還原條件下分離。使用纖維素膜的電泳轉移後，將膜與單克隆生物素-偶聯的大鼠抗小鼠C3孵育，用鏈黴抗生物素-HRP試劑盒檢測和使用ECL試劑顯影。

結果：

C3的活化涉及完整a-鏈裂解成截短a'鏈和可溶的C3a(未顯示在圖30中)。圖30示出了對凝血酶底物活化人C3的蛋白質印跡分析的結果，其中未裂解的C3α鏈和活化產物a'鏈用箭頭示出。如圖30所示，C3與活化形式的人凝血因數XI和因數X，以及活化的牛凝血因數X孵育，可以在沒有任何補體蛋白酶的情況下在體外裂解C3。

在甘露聚糖上的C3沉積

對獲自WT、MASP-2(-/-)、F11(-/-)、F11(-/-)/C4(-/-)和C4(-/-)的血清樣品進行了C3沉積測定。F11是編碼凝血因數XI的基因。為了測量C3活化，微量滴定板用甘露聚糖(1 μg/孔)包被，然後加入在TBS/Tween/Ca^{2+}中的山羊抗HSA血清(2 μg/ml)。板用0.1%HSA/TBS封閉並如上所述洗滌。將血漿樣品在4 mM巴比妥，145 mM NaCl，2 mM

$CaCl_2$，1 mM $MgCl_2$，pH 7.4中稀釋，加入板中，並在37℃孵育1.5小時。洗滌後，使用兔抗人C3c(Dako)，然後用鹼性磷酸酶綴合的山羊抗兔IgG和pNPP檢測結合的C3b。

結果：

圖31示出了對獲自WT、MASP-2(-/-)、F11(-/-)、F11(-/-)/C4(-/-)和C4(-/-)的血清樣品的C3沉積測定結果。如圖31所示，即使在完全不存在C4時，也存在功能性凝集素途徑。如在圖31中進一步示出的，這種新的凝集素途徑依賴性補體活化需要凝血因數XI。

討論：

在這個實驗中獲得的結果之前，本領域技術人員認為補體的凝集素途徑的活性需要C4。因此，C4敲除小鼠(和C4缺陷型人)的資料用這樣的假設來解釋：這樣的生物是凝集素途徑缺陷的(除了經典途徑缺陷外)。目前的結果表明，這種觀點是錯誤的。因此，基於C4-缺陷動物的表型表明凝集素途徑在某些疾病情況下不重要的過去研究結論可能是錯誤的。在本實施例中描述的資料還表明，在全血清的生理情況下，凝集素途徑可以啟動凝血級聯的組分。因此證明存在涉及MASP-2的補體和凝血之間的交叉對話。

實施例24

本實施例描述評價抗-MASP-2抗體對獲自陣發性夜間血紅蛋白尿(PNH)患者的血液樣品的紅細胞溶解的作用的方法。

背景/原理：

陣發性夜間血紅蛋白尿(PNH)，亦稱為Marchiafava-Micheli綜合征，是一種獲得性的潛在生命威脅的血液疾病，特徵為補體-誘導的血管內溶血性貧血。PNH的標誌是慢性血管內溶血，其是補體的替代途徑的活化不受調節的結果。Lindorfer, M. A.等，*Blood 115*(11) (2010)。PNH中的貧血歸因於血流中紅細胞的破壞。PNH的症狀包括紅色尿，其歸因於在尿液中出現血紅蛋白和血栓形成。PNH可自身發生，稱為"原發性PNH"或在其它骨髓病症例如再生障礙性貧血的背景中發生，稱為"繼發性PNH"。PNH的治療包括輸血(對於貧血)、抗凝血(對於血栓形成)和使用單克隆抗體艾庫組單抗(Soliris)，其通過抑制補體系統保護血細胞免於免疫破壞(Hillmen P.等，*N. Engl. J. Med. 350* (6):552-9 (2004))。然而，相當大一部分的用艾庫組單抗治療的PNH患者具有臨床上顯著的免疫-介導的溶血性貧血，這是因為所述抗體不阻斷補體的替代途徑的活化。

本實施例描述評價抗-MASP-2抗體對來自獲自PNH患者(未用Soliris治療)的血液樣品的紅細胞的溶解的作用的方法，所述紅細胞用ABO-匹配的酸化正常人血清孵育。

方法:

試劑：

來自正常供體和來自患有PNH的患者(未用Soliris治療)的紅細胞通過靜脈穿刺獲得，和按Wilcox, L. A.，等，*Blood 78*:820-829 (1991)中所述製備，其通過引用結合到本文中。具有凝集素途徑的功能阻斷活性的抗-MASP-2抗體可如實施例10中所述的產生。

溶血分析：

使用描述於Lindorfer, M. A.，等，*Blood 15*(11):2283-91 (2010)和Wilcox, L. A.，等，*Blood 78*:820-829 (1991)中的方法，實施用於測定抗-MASP-2抗體在阻斷來自PNH患者的紅細胞的溶血的能力上的作用的方法，這兩篇文獻通過引用結合到本文中。如Lindorfer等所述，將來自PNH患者樣品的紅細胞離心，吸出血沉棕黃層和細胞用明膠佛羅拿緩衝液(GVB)洗滌，然後進行各實驗。按下測試紅細胞對APC-介導的溶解的易感性。ABO-匹配的正常人血清用包含0.15 mM CaCl2和0.5 mM MgCl2的GVB (GVB+2)稀釋和酸化至pH 6.4 (酸化NHS、aNHS)和用於重構紅細胞為在50% aNHS中1.6%的血細胞比容。然後在37℃孵育混合物，和在1小時後，通過離心使紅細胞沉澱。等份的回收上清液的光密度在405 nM測量和用於計算百分比溶解。在酸化血清-EDTA中重構的樣品進行類似地處理和用於定義背景非補體-介導的溶解(通常少於3%)。在蒸餾水中孵育

紅細胞後測定完全溶解(100%)。

為了測定抗-MASP-2抗體對PNH紅細胞的溶血的作用，將來自PNH患者的紅細胞在aNHS中在缺少增加濃度的抗-MASP-2抗體的情況下孵育，和隨後定量測定溶血的存在/量。

考慮抗-MASP-2抗體已經顯示阻斷隨後替代補體途徑的活化的事實，預期抗-MASP-2抗體將有效阻斷替代途徑-介導的PNH紅細胞溶血，和將用作治療患有PNH的患者的療法。

實施例25

本實施例描述評價抗-MASP-2阻斷抗體對通過在獲自患有冷球蛋白血症的患者的血液樣品中的冷球蛋白的補體活化的作用的方法。

背景/原理：

冷球蛋白血症的特徵為在血清中存在冷球蛋白。冷球蛋白為單一或混合的免疫球蛋白(通常是IgM抗體)，其在低溫下經過可逆聚集。聚集導致經典途徑補體活化和血管床中的炎症，特別是在外周。冷球蛋白血症的臨床表現包括血管炎和腎小球腎炎。

冷球蛋白血症可基於冷球蛋白組成如下分類：I型冷球蛋白血症或簡單冷球蛋白血症，為單克隆免疫球蛋白(通常是免疫球蛋白M (IgM))的結果；II和III型冷球蛋白血

症(混合性冷球蛋白血症)包含類風濕因數(RF)，其通常為與多克隆IgG的Fc部分複合的IgM。

與冷球蛋白血症有關的病況包括丙型肝炎感染、淋巴增生性病症和其它自身免疫疾病。包含冷球蛋白的免疫複合物導致系統性炎症的臨床綜合征，可能歸因於它們啟動補體的能力。儘管IgG免疫複合物通常啟動補體的經典途徑，但包含IgM的複合物還可通過凝集素途徑啟動補體(Zhang, M.，等，*Mol Immunol 44*(1-3):103-110 (2007)和Zhang. M.，等，*J. Immunol. 177*(7):4727-34 (2006))。

免疫組織化學研究進一步證實了冷球蛋白免疫複合物包含凝集素途徑的組分，和冷球蛋白血症性腎小球腎炎患者的活檢顯示凝集素途徑原位活化的免疫組織化學證據(Ohsawa, I.，等，*Clin Immunol 101*(1):59-66 (2001))。這些結果表明凝集素途徑可促進炎症和冷球蛋白疾病中的不利結果。

方法：

用於確定抗-MASP-2抗體對阻斷冷球蛋白血症的不良作用的能力的作用的方法使用用於液相C3轉化的測定法進行，如Ng Y. C.等，*Arthritis and Rheumatism 31*(1):99-107 (1988)中所述，其通過引用結合到本文中。如Ng等所述，在特發性混合性冷球蛋白血症(EMC)中，單克隆類風濕因數(mRF)，通常IgM，與多克隆IgG複合以形成特徵性冷沉澱物免疫複合物(IC) (II型冷球蛋白)。免疫球蛋白和C3已

經在受累組織例如皮膚、神經和腎的血管壁中得到證實。如Ng等中所述，將125I-標記的mRF加入至血清(正常人血清和獲自患有冷球蛋白血症的患者的血清)，在37℃孵育和測量與紅細胞的結合。

在血清(正常人血清和獲自患有冷球蛋白血症的患者的血清)中在存在或不存在以下IC的情況下測定液相C3轉化：BSA-抗BSA、mRF、mRF加IgG、或冷球蛋白，在存在或不存在抗-MASP-2抗體的情況下。C3和C4固定至IC使用共沉澱測定法用F(ab')2抗-C3和F(ab')2抗-C4測量。

考慮抗-MASP-2抗體已顯示阻斷凝集素途徑活化的事實，預期抗-MASP-2抗體將有效阻斷與冷球蛋白血症有關的補體介導的不良作用，和可用作治療患有冷球蛋白血症的患者的療法。

實施例26

本實施例描述評價抗-MASP-2抗體對獲自冷凝集素疾病(其表現為貧血)的患者的血液樣品的作用的方法。

背景/原理：

冷凝集素疾病(CAD)是一類自身免疫性溶血性貧血。冷凝集素抗體(通常IgM)被低溫啟動並結合紅細胞和使其凝集。冷凝集素抗體與補體結合並攻擊紅細胞表面上的抗原。這導致紅細胞的調理素作用(溶血)，其觸發它們通過網狀細胞內皮系統清除。凝集發生的溫度在患者之間不

同。

CAD表現為貧血。當紅細胞破壞的破壞率超過骨髓產生足夠數量的攜氧細胞的能力時，則發生貧血。CAD可由基礎性疾病或病症引起，稱為"繼發性CAD"，例如感染性疾病(支原體肺炎、腮腺炎、單核細胞增多症)、淋巴增生性疾病(淋巴瘤、慢性淋巴細胞性白血病)或結締組織病症。原發性CAD患者被認為具有低程度的淋巴增生性骨髓病症。原發性和繼發性CAD是獲得性病況。

方法:

試劑：

來自正常供體和來自患有CAD的患者的紅細胞通過靜脈穿刺獲得。具有凝集素途徑的功能阻斷活性的抗-MASP-2抗體可如實施例10中所述的產生。

抗-MASP-2抗體阻斷冷凝集素-介導的凝集素途徑活化的作用可如下測定。在存在或不存在抗-MASP-2抗體的情況下將來自血液組I陽性患者的紅細胞用冷凝集素(即，IgM抗體)敏化。然後通過測量C3結合，測試紅細胞啟動凝集素途徑的能力。

考慮抗-MASP-2抗體已顯示阻斷凝集素途徑活化的事實，預期抗-MASP-2抗體將有效阻斷與冷凝集素疾病有關的補體介導的不良作用，和可用作治療患有冷凝集素疾病的患者的療法。

實施例27

本實施例描述評價抗-MASP-2抗體對在獲自非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的小鼠的血液樣品中的紅細胞溶解的作用的方法。

背景/原理：

非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的特徵為溶血性貧血、血小板減少症和在腎和其它器官的微循環中的血小板血栓引起的腎衰竭。aHUS與不完全的補體調節有關，和可以是散發性或家族性的。aHUS與編碼補體活化的基因的突變有關，包括補體因數H、膜輔因數B和因數I，以及補體因數H-相關1 (CFHR1)和補體因數H-相關3 (CFHR3)。Zipfel, P. F.等，*PloS Genetics 3*(3):e41 (2007)。本實施例描述評價抗-MASP-2抗體對來自獲自aHUS小鼠的血液樣品的紅細胞溶解的作用的方法。

方法：

抗-MASP-2抗體治療aHUS的作用可在該疾病的小鼠模型中測定，其中內源小鼠fH基因已被置換為編碼通常在aHUS患者中發現的突變形式的fH的人同源物。參見Pickering M. C.等，*J. Exp. Med.* 204(6):1249-1256 (2007)，通過引用結合到本文中。如在Pickering等中所述，這樣的小鼠出現aHUS樣病理。為了評價抗-MASP-2抗體用於治療aHUS的作用，將抗-MASP-2抗體給予突變體aHUS小鼠，並比較獲

自抗-MASP-2 ab治療和未治療的對照的紅細胞的溶解。考慮抗-MASP-2抗體已顯示阻斷凝集素途徑活化的事實，預期抗-MASP-2抗體將有效阻斷在患有aHUS的哺乳動物受試者中紅細胞的溶解。

實施例28

本實施例描述評價抗-MASP-2抗體用於治療青光眼的作用的方法。

原理/背景：

已經表明不受控制的補體活化促進青光眼中視網膜神經節細胞(RGC)、它們的突觸和軸突的變性損傷的進展。參見Tezel G.等，*Invest Ophthalmol Vis Sci 51*:5071-5082 (2010)。例如，人組織的組織病理研究和使用不同動物模型的體內研究已經證實，在青光眼視網膜中合成補體組分包括C1q和C3，並形成末端補體複合物(參見Stasi K.等，*Invest Ophthalmol Vis Sci 47*:1024-1029 (2006), Kuehn M.H.等，*Exp Eye Res 83*:620-628 (2006))。如在Kuehn M.H.等，*Experimental Eye Research 87*:89-95 (2008)中進一步描述的，補體合成和沉積由視網膜I/R誘導，和補體級聯的破壞延遲RGC變性。在該研究中，當與正常動物相比，發現帶有補體組分C3的靶向破壞的小鼠在暫時視網膜I/R後顯示延遲的RGC變性。

方法：

用於測定抗-MASP-2抗體對RGC變性的作用的方法在視網膜I/R的動物模型中進行，如在Kuehn M. H.等，*Experimental Eye Research* 87:89-95 (2008)中所述的，通過引用結合到本文中。如Kuehn等所述的，通過麻醉動物，然後通過角膜插入與包含磷酸緩衝鹽水的儲器連接的30-規針頭至眼的前室中，誘導視網膜缺血。然後升高鹽水儲器，以獲得眼內壓104 mmHg，其足以完全阻止通過視網膜血管系統的迴圈。升高的眼內缺血通過漂白虹膜和視網膜來證實，和僅在左眼中保持缺血45分鐘；右眼用作對照和不接受導管插入術。然後在缺血損傷後1或3周將小鼠安樂死。將抗-MASP-2抗體局部給予小鼠至眼或系統性給予，以評價在缺血損傷之前給予的抗-MASP抗體的作用。

眼的免疫組織化學使用針對C1q和C3的抗體進行，以檢測補體沉積。眼神經損傷還可使用標準電子顯微鏡檢查方法而評價。存活的視網膜RGC的定量測定使用γ突觸核蛋白標記進行。

結果：

如Kuehn等描述的，在正常對照小鼠中，短暫視網膜缺血導致視神經的變性變化以及C1q和C3的視網膜沉積，其可通過免疫組織化學檢測。相比之下，在誘導後1周，C3缺陷小鼠顯示軸突變性的顯著降低，顯示僅較小水準的視神經損傷。根據這些結果，預期當在MASP-2敲除小鼠

中進行該測定法和當在缺血損傷之前將抗-MASP-2抗體給予正常小鼠時，將觀察到類似結果。

實施例29

本實施例證實MASP-2抑制劑，例如抗-MASP-2抗體，有效治療輻射暴露和/或治療、改善或預防急性輻射綜合征。

原理：

暴露於高劑量的電離輻射通過兩個主要機制引起死亡：對骨髓的毒性和胃腸綜合征。骨髓毒性導致所有血液細胞下降，通過感染和出血誘發生物體死亡。胃腸綜合征更為嚴重，且通過由於腸上皮層分解導致的腸屏障功能損失和腸內分泌功能損失驅動。這導致膿毒症和相關的系統性炎性反應綜合征，其可導致死亡。

補體的凝集素途徑是先天免疫機制，其在響應組織損傷和暴露於外來表面(即，細菌)時引發炎症。該途徑的阻斷在缺血性腸組織損傷或感染性休克的小鼠模型中導致較好的結果。假定凝集素途徑在回應輻射誘導的組織損傷時可觸發過度和有害的炎症。凝集素途徑的阻斷因此可減少繼發性損傷和增加在急性輻射暴露後的存活率。

按本實施例所述進行的研究的目標是在輻射損傷的小鼠模型中通過給予抗-鼠MASP-2抗體評價凝集素途徑阻斷對存活率的作用。

方法和材料：

材料。用於本研究的試驗物是(i) 高親和力抗-鼠MASP-2抗體(mAbM11)和(ii) 高親和力抗-人MASP-2抗體(mAbH6)，其阻斷在轉染的哺乳動物細胞中產生的凝集素補體途徑的MASP-2蛋白組分。劑量濃度為1 mg/kg的抗-鼠MASP-2抗體(mAbM11)、5mg/kg的抗-人MASP-2抗體(mAbH6)或無菌鹽水。對於各給藥期間，製備適當體積的新鮮給藥溶液。

動物。幼小成體雄性Swiss-Webster小鼠獲自Harlan Laboratories (Houston, TX)。將動物飼養在具有Alpha-Dri墊料的實底籠中，自由提供經檢驗的PMI 5002齧齒動物飼料(Animal Specialties, Inc., Hubbard OR)和水。監測溫度，動物飼養室以12小時光照/12小時黑暗的光週期運行。

輻射。在設施中2-周適應後，以各組10只以劑量速率0.78 Gy/min使用配備有320-kV高穩定性X-射線發生器、金屬陶瓷X-射線管、可變x-射線束准直儀和濾波器的Therapax X-RAD 320系統(Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT)，通過全身暴露以6.5和7.0 Gy輻射小鼠。劑量水準根據用相同的小鼠品系進行的先前研究進行選擇，表明$LD_{50/30}$介於6.5和7.0 Gy之間(資料未顯示)。

藥物配製和給藥。根據方案，合適體積的濃縮儲液用冰冷鹽水稀釋，以製備0.2 mg/ml抗-鼠MASP-2抗體

(mAbM11)或0.5 mg/ml抗-人MASP-2抗體(mAbH6)的給藥溶液。根據動物體重使用25-規針頭通過IP注射給予抗-MASP-2抗體mAbM11和mAbH6，以遞送1 mg/kg mAbM11、5mg/kg mAbH6或鹽水溶媒。

研究設計。將小鼠隨機分組，如表8中所述。每日測量和記錄體重和溫度。組7、11和13中的小鼠在輻射後第7天處死和在深度麻醉下通過心臟穿刺收集血液。在輻射後第30天存活的動物以相同的方式處死和收集血液。根據方案，血漿從收集的血液樣品製備和返回到Sponsor用於分析。

表 8：研究組

組 ID	N	輻射水準 (Gy)	治療	劑量方案
1	20	6.5	溶媒	輻射前 18 小時，輻射後 2 小時，每週加強
2	20	6.5	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	僅輻射前 18 小時
3	20	6.5	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	輻射前 18 小時，輻射後 2 小時，每週加強
4	20	6.5	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	輻射後 2 小時，每週加強
5	20	6.5	抗-人 MASP-2 ab (mAbH6)	輻射前 18 小時，輻射後 2 小時，每週加強
6	20	7.0	溶媒	輻射前 18 小時，輻射後 2 小時，每週加強
7	5	7.0	溶媒	僅輻射後 2 小時
8	20	7.0	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	僅輻射前 18 小時
9	20	7.0	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	輻射前 18 小時，輻射後 2 小時，每週加強
10	20	7.0	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	輻射後 2 小時，每週加強
11	5	7.0	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	僅輻射後 2 小時
12	20	7.0	抗-人 MASP-2 ab (mAbH6)	輻射前 18 小時，輻射後 2 小時，每週加強
13	5	無	無	無

統計學分析。產生Kaplan-Meier存活曲線和使用log-Rank和Wilcoxon方法用於比較在治療組之間的平均存活時間。報告具有標準差的平均值或具有平均值標準誤差的平均值。使用雙尾非配對t-檢驗在對照輻射動物和各個治療

組之間進行統計學比較。

結果

對於7.0和6.5 Gy暴露組的Kaplan-Meier存活曲線分別提供在圖32A和32B，和在下表9中概述。總體上，與溶媒治療的輻射對照動物相比，在6.5 (20%增加)和7.0 Gy (30%增加)暴露水準上，輻射前用抗-鼠MASP-2 ab (mAbM11)治療增加輻射小鼠的存活率。與溶媒對照輻射動物比較，在6.5 Gy暴露水準，輻射後用抗-鼠MASP-2 ab治療導致存活率適度增加(15%)。

相比之下，與溶媒治療的輻射對照動物相比，在7.0 Gy暴露水準所有治療的動物顯示存活率增加。存活率的最大變化出現在接受mAbH6的動物中，與對照動物相比具有45%增加。此外，在7.0 Gy暴露水準，與對於溶媒治療的輻射對照動物的輻射後第8天相比，在mAbH6治療組中死亡首次出現在輻射後第15天，比對照動物增加了7天。在7.0 Gy暴露水準下，與對照動物(20.7 ± 2.0天)相比，對於接受mAbH6的小鼠，平均死亡時間(27.3 ± 1.3天)顯著增加(p=0.0087)。

在整個研究中記錄與輻射前當天(第-1天)相比體重的百分比改變。暫時的體重損失出現在所有輻射的動物中，沒有證據表明與對照相比因mAbM11或mAbH6治療導致的不同變化(資料未顯示)。在研究結束時，所有存活的動物顯示自起始(第-1天)體重的體重增加。

表 9：暴露於輻射的試驗動物的存活率

試驗組	暴露水準	存活率(%)	死亡時間(平均值± SEM, 天)	首次/最後死亡(天)
對照輻射	6.5 Gy	65 %	24.0 ± 2.0	9/16
mAbM11暴露前	6.5 Gy	85 %	27.7 ± 1.5	13/17
mAbM11暴露前+後	6.5 Gy	65 %	24.0 ± 2.0	9/15
mAbM11暴露後	6.5 Gy	80 %	26.3 ± 1.9	9/13
mAbH6暴露前+後	6.5 Gy	65 %	24.6 ± 1.9	9/19
對照輻射	7.0 Gy	35 %	20.7 ± 2.0	8/17
mAbM11暴露前	7.0 Gy	65 %	23.0 ± 2.3	7/13
mAbM11暴露前+後	7.0 Gy	55 %	21.6 ± 2.2	7/16
mAbM11暴露後	7.0 Gy	70 %	24.3 ± 2.1	9/14
mAbH6暴露前+後	7.0 Gy	80 %	27.3 ± 1.3*	15/20

*p = 0.0087，以相同的輻射暴露水準在對照輻射動物和治療組之間通過雙尾非配對 t-檢驗。

討論

急性輻射綜合征由三個確定的亞綜合征組成：生血性、胃腸性和腦血管性。觀察到的綜合征依賴於輻射劑量，用超過1 Gy的顯著的部分或全身輻射暴露，在人中觀察到生血作用。生血性綜合征的特徵為嚴重阻抑骨髓功能，導致血計數(紅細胞和白細胞以及血小板)改變的各類血細胞減少，同時發生對免疫系統的損傷。在最壞的情況發生時，在外周血中幾乎不存在中性粒細胞和血小板，中性粒細胞減少、發燒、膿毒症的併發症和不受控制的出血導致死亡。

在本研究中，發現在以7.0 Gy輻射的Swiss-Webster雄

性小鼠中給予mAbH6增加全身x-射線輻射的存活性。值得注意的是，在7.0 Gy暴露水準，與35%的溶媒治療的對照輻射動物相比，80%的接受mAbH6的動物存活至30天。重要的是，在該治療組中死亡第一天在輻射後第15天才出現，比在溶媒治療的對照輻射動物中觀察到的增加7天。奇怪的是，在較低的X-射線暴露(6.5 Gy)時，與溶媒治療的對照輻射動物相比，給予mAbH6未顯示影響存活性或延遲死亡。對於在暴露水準之間的該回應差異，可能存在多個原因，儘管任何假設的驗證可能需要另外的研究，包括中間樣品採集用於微生物培養和血液學參數。一種解釋可簡單為分配到各組的動物數可能已經使得不能見到任何細微的治療-相關的差異。例如，對於n=20的組大小，在65% (mAbH6，以6.5 Gy暴露)和80% (mAbH6，以7.0 Gy暴露)之間的存活率差異為3只動物。另一方面，在35% (溶媒對照，以7.0 Gy暴露)和80% (mAbH6，以7.0 Gy暴露)之間的差異為9只動物，並提供了治療-相關差異的合理證據。

這些結果證實，抗-MASP-2抗體有效治療處於急性輻射綜合征的有害影響的風險中或遭受急性輻射綜合征的有害影響的哺乳動物受試者。

實施例30

本實施例證實在用腦膜炎奈瑟菌血清型A或腦膜炎奈瑟菌血清型B感染後，MASP-2缺陷小鼠受到保護免於腦膜炎奈瑟菌誘導的死亡。

方法：

MASP-2敲除小鼠(MASP-2 KO小鼠)按實施例1中所述產生。10周齡的MASP-2 KO小鼠(n=10)和野生型(WT)C57/BL6小鼠(n=10)通過腹膜內(i.p.)注射100 µl體積而接種2.6 x 107 CFU劑量的腦膜炎奈瑟菌血清型A Z2491。將感染劑量聯合終濃度400 mg/kg的鐵葡聚糖給予小鼠。在72小時時間內監測感染後的小鼠存活。

在另一實驗中，10周齡的MASP-2 KO小鼠(n=10)和野生型C57/BL6小鼠(n=10)通過i.p.注射100 µl體積而接種6 x 106 CFU劑量的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58。將感染劑量聯合最終劑量為400 mg/kg的鐵葡聚糖給予小鼠。在72小時時間內監測感染後的小鼠存活。對於WT和MASP-2 KO小鼠，在感染後72小時時間期間還根據下文描述於表**10**的疾病評分參數(其基於Fransen等(2010)的方案，略微改變)，確定疾病評分。

表10：與感染小鼠的臨床體征有關的疾病評分

體征	**評分**
正常	0
毛略微皺起	1
毛皺起，遲緩和粘滯眼睛	2
毛皺起，昏睡和閉眼	3
重病和在刺激後不移動	4
死亡	5

為了證實感染和確定細菌從血清的清除率，感染後以每小時的間隔自小鼠獲取血液樣品和分析，以確定腦膜炎

奈瑟菌的血清水準(log cfu/mL)。

結果：

圖33是Kaplan-Meyer曲線，圖示說明給予感染劑量2.6 x 107 cfu的腦膜炎奈瑟菌血清型A Z2491後MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活率。如圖33中所示，在感染後整個72小時期間100%的MASP-2 KO小鼠存活。相比之下，僅80%的WT小鼠(p=0.012)在感染後24小時仍存活，和僅50%的WT小鼠在感染後72小時仍存活。這些結果證實，MASP-2-缺陷小鼠受到保護免於腦膜炎奈瑟菌血清型A Z2491-誘導的死亡。

圖34是Kaplan-Meyer曲線，圖示說明給予感染劑量6 x 106 cfu的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58後MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活率。如圖34中所示，在感染後整個72小時期間90%的MASP-2 KO小鼠存活。相比之下，僅20%的WT小鼠(p=0.0022)在感染後24小時仍存活。這些結果證實MASP-2-缺陷小鼠受到保護免於腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58-誘導的死亡。

圖35圖示說明了在用6x106 cfu的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58 i.p.感染(在不同的時間點對於兩組小鼠，n=3)後，在不同的時間點在取自MASP-2 KO和WT小鼠的血液樣品中回收的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58的log cfu/mL。結果表示為平均值±SEM。如圖35中所示，在感染後24小時在WT小鼠中在血液中腦膜炎奈瑟菌的水準達

到大約6.0 log cfu/mL的峰值和到感染後36小時下降至大約4.0 log cfu/mL。相比之下，在MASP-2 KO小鼠中，在感染後12小時腦膜炎奈瑟菌的水準達到大約4.0 log cfu/mL的峰值和到感染後36小時下降至大約1.0 log cfu/mL (符號"*"表示p<0.05；符號"**"表示p=0.0043)。這些結果證實儘管MASP-2 KO小鼠用與WT小鼠相同劑量的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58感染，但與WT相比MASP-2 KO小鼠具有提高的菌血症清除率。

圖36圖示說明了在用6x106 cfu的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58感染後3、6、12和24小時MASP-2 KO和WT小鼠的平均疾病評分。如圖36所示，MASP-2-缺陷小鼠顯示對感染高抵抗，與WT小鼠相比低得多的疾病評分在感染後6小時(符號"*"表示p=0.0411)、12小時(符號"**"表示p=0.0049)和24小時(符號"***"表示p=0.0049)。圖36中的結果表示為平均值±SEM。

簡言之，本實施例的結果證實用腦膜炎奈瑟菌血清型A或腦膜炎奈瑟菌血清型B感染後，MASP-2-缺陷小鼠受到保護免於腦膜炎奈瑟菌誘導的死亡。

實施例31

本實施例證實，用腦膜炎奈瑟菌感染後給予抗-MASP-2抗體增加用腦膜炎奈瑟菌感染的小鼠的存活率。

背景/原理：

如實施例10中所述的，大鼠MASP-2蛋白用於淘選Fab噬菌體展示文庫，從其中鑒定Fab2 #11為功能活性抗體。大鼠IgG2c和小鼠IgG2a同種型的全長抗體自Fab2 #11產生。小鼠IgG2a同種型的全長抗-MASP-2抗體用藥效學參數表徵(如實施例19中所述)。

在本實施例中，在腦膜炎奈瑟菌感染的小鼠模型中分析源自Fab2 #11的小鼠抗-MASP-2全長抗體。

方法:

如上文所述產生的源自Fab2 #11的小鼠IgG2a全長抗-MASP-2抗體同種型，在腦膜炎奈瑟菌感染的小鼠模型中如下進行測試。

感染後給予小鼠-抗-MASP-2單克隆抗體(MoAb)

在i.p.注射高劑量(4x106 cfu)的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58 3小時後，9周齡的C57/BL6 Charles River小鼠用抑制性小鼠抗-MASP-2抗體(1.0 mg/kg) (n=12)或對照同種型抗體(n=10)治療。

結果：

圖37是Kaplan-Meyer曲線，圖示說明在給予感染劑量4x106 cfu的腦膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58，接著感染後3小時給予抑制性抗-MASP-2抗體(1.0 mg/kg)或對照同種型抗體後，小鼠的百分比存活率。如圖37中所示，90%的用

抗-MASP-2抗體治療的小鼠在感染後整個72小時期間存活。相比之下，僅50%的用同種型對照抗體治療的小鼠在感染後整個72小時期間存活。符號"*"表示p=0.0301，如通過比較兩個存活曲線測定的。

這些結果證實，給予抗-MASP-2抗體有效治療和改善用腦膜炎奈瑟菌感染的受試者的存活率。

如本文所證實的，當在感染後3小時內給予時，在治療用腦膜炎奈瑟菌感染的受試者中使用抗-MASP-2抗體是有效的，預期在感染後24小時至48小時內是有效的。腦膜炎球菌疾病(腦膜炎球菌血症或腦膜炎)是醫學急症，如果懷疑是腦膜炎球菌疾病的話，療法通常立即開始(即，在腦膜炎奈瑟菌作為病原體被鑒定陽性之前)。

考慮實施例30證實的在MASP-2 KO小鼠中的結果，認為在用腦膜炎奈瑟菌感染之前給予抗-MASP-2抗體也將有效預防或改善感染的嚴重性。

實施例32

本實施例證實給予抗-MASP-2抗體有效治療人血清中的腦膜炎奈瑟菌感染。

原理：

功能性MBL血清水準降低的患者對復發性細菌和真菌感染的敏感性增加(Kilpatrick等人，*Biochim Biophys Acta* 1572:401-413 (2002))。已知腦膜炎奈瑟菌被MBL識別，已

經證實MBL-缺乏的血清不溶解奈瑟菌。

考慮到實施例30和31中所述的結果，進行了一系列實驗以確定在補體-缺乏的和對照人血清中給予抗-MASP-2抗體治療腦膜炎奈瑟菌感染的功效。在高濃度血清(20%)中進行實驗以保護補體途徑。

方法：

1. 在不同補體-缺乏的人血清和在用人抗-MASP-2抗體處理的人血清中的血清殺菌活性

以下補體-缺乏的人血清和對照人血清用於本實驗：

表11：所測試的人血清樣品(如圖38所示)

樣品	血清類型
A	正常人血清(NHS) +人抗-MASP-2 Ab
B	NHS + 同種型對照 Ab
C	MBL -/-人血清
D	NHS
E	熱滅活的(HI) NHS

針對人MASP-2的重組抗體分離自組合抗體文庫(Knappik, A.，等人，*J. Mol. Biol. 296*:57-86 (2000))，使用重組人MASP-2A作為抗原(Chen, C. B.和Wallis, *J. Biol. Chem. 276*:25894-25902 (2001))。在人血漿中強力抑制C4和C3的凝集素途徑-介導的活化(IC50~20 nM)的抗人scFv片段被鑒定並轉化為全長人IgG4抗體。

在37℃並伴隨振盪，將腦膜炎奈瑟菌血清型B-MC58與表11所示的不同血清(各自的血清濃度為20%)一起孵育，加或不加抑制性人抗-MASP-2抗體(3 μg在100 μl總體

積中)。在以下時間點採集樣品：0-、30-、60-和90-分鐘間隔，倒平板(plated out)，然後測定活菌計數。熱滅活的人血清用作陰性對照。

結果：

圖38圖示了在表11所示的人血清樣品中，在不同時間點回收的腦膜炎奈瑟菌血清型B菌株MC58的活菌計數的log cfu/mL。表12提供圖38的Student's t-檢驗結果。

表12：圖38的Student's t-檢驗結果(時間點60分鐘)

	平均差(Log)	**顯著性? P<0.05?**	**P值概述**
A vs B	-0.3678	是	***(0.0002)
A vs C	-1.1053	是	***(p<0.0001)
A vs D	-0.2111	是	**(0.0012)
C vs D	1.9	是	***(p<0.0001)

如圖38和表12所示，通過加入人抗-MASP-2抑制性抗體而顯著增強了在人20%血清中的腦膜炎奈瑟菌的補體-依賴性殺傷。

2. 在缺乏MASP-2的20% (v/v)小鼠血清中，腦膜炎奈瑟菌的補體-依賴性殺傷。

以下補體-缺乏的小鼠血清和對照小鼠血清用於本實驗：

表13：所測試的小鼠血清樣品(如**圖39**所示)

樣品	**血清類型**
A	WT
B	MASP-2 -/-
C	MBL A/C -/-
D	WT 熱滅活的(HIS)

在37℃並伴隨振盪，腦膜炎奈瑟菌血清型B-MC58與不同的補體-缺乏的小鼠血清(各自的血清濃度為20%)一起孵育。在以下時間點採集樣品：0-、15-、30-、60-、90-和120-分鐘間隔，倒平板，然後測定活菌計數。熱滅活的人血清用作陰性對照。

結果：

圖39圖示了在表13所示的小鼠血清樣品中，在不同時間點回收的腦膜炎奈瑟菌血清型B-MC58的活菌計數的log cfu/mL。如圖39所示，MASP-2 -/-小鼠血清與WT小鼠血清相比，對腦膜炎奈瑟菌具有更高水準的殺菌活性。符號“**”表示p=0.0058，符號“***”表示p=0.001。表14提供圖39的Student's t-檢驗結果。

表14：圖39的Student's t-檢驗結果

比較	時間點	平均差(LOG)	顯著性？(p<0.05)?	P值概述
A vs. B	60 min.	0.39	是	** (0.0058)
A vs. B	90 min.	0.6741	是	*** (0.001)

總之，本實施例的結果證明與WT血清相比，MASP-2 -/-血清對腦膜炎奈瑟菌具有更高水準的殺菌活性。

實施例33

本實施例表明MASP-2缺乏對得自陣發性夜間血紅蛋白尿(PNH)小鼠模型的血液樣品的紅細胞溶解的抑制性作用。

背景/原理：

陣發性夜間血紅蛋白尿(PNH)，也稱為Marchiafava-Micheli綜合征，是一種獲得性的、可能危及生命的血液病，特徵在於補體-誘導的血管內溶血性貧血。PNH的標誌是慢性補體-介導的血管內溶血，這是PNH紅細胞上缺乏補體調節劑CD55和CD59所致的補體替代途徑的未經調節的活化的結果，隨後是血紅蛋白尿和貧血。Lindorfer, M. A.，等人，*Blood 115*(11) (2010), Risitano, A. M, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11:528-535 (2011)。PNH中的貧血是因為血流中的紅細胞破壞所致。PNH的症狀包括血尿(因尿中可見血紅蛋白)、背痛、疲勞、呼吸短促和血栓形成。PNH可以自發產生，稱為“原發性PNH”或在其它骨髓病症例如再生障礙性貧血的情況下發生，稱為“繼發性PNH”。PNH的治療包括針對貧血的輸血，針對血栓形成的抗凝，和使用單克隆抗體艾庫組單抗(Soliris®)，該抗體保護血細胞免於因抑制補體系統所致的免疫破壞(Hillmen P.等人，*N. Engl. J. Med. 350*(6):552-9 (2004))。艾庫組單抗(Soliris®)是人源化單克隆抗體，其靶向補體成分C5，封閉其被C5轉化酶裂解，從而阻止C5a的產生和MAC的裝配。用艾庫組單抗治療PNH患者，在大約半數患者中導致血管內溶血減少(經乳酸脫氫酶(LDH)測定)，導致血紅蛋白穩定化和輸血非依賴性(Hillmen P，等人，Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, vol 11(6) (2011))。

儘管經歷艾庫組單抗治療的幾乎所有患者都達到正常或幾乎正常的LDH水準(因為控制了血管內溶血)，但僅有大約三分之一的患者的血紅蛋白值達到高於11gr/dL，接受艾庫組單抗的其餘患者以大約相同比例繼續表現出中度至嚴重(即輸血-依賴性的)貧血(Risitano A. M.等人，*Blood* 113:4094-100 (2009))。正如Risitano等人，Mini-Reviews in *Medicinal Chemistry* 11:528-535 (2011)所述，已經證明接受艾庫組單抗的PNH患者含有與他們的大部分PNH紅細胞結合的C3片段(而未經治療的患者則沒有)，得到以下結論：膜-結合的C3片段作為調理素對PNH紅細胞起作用，導致它們通過特異性C3受體而被俘獲到網狀內皮細胞中並且隨後導致血管外溶血。因此，對於發生C3-片段-介導的血管外溶血的那些患者，需要除了使用艾庫組單抗之外的治療策略，因為他們繼續需要輸入紅細胞。

本實施例描述了評價MASP-2-缺乏的血清和用MASP-2抑制劑處理的血清對得自PNH小鼠模型的血液樣品的紅細胞溶解的作用的方法，並且證明了MASP-2抑制對治療患有PNH的受試者的功效，並且還支持在經歷C5抑制劑例如艾庫組單抗治療的PNH受試者中使用MASP-2抑制劑以改善C3片段-介導的血管外溶血的作用。

方法：

PNH動物模型：

血液樣品得自具有Crry和C3缺陷(Crry/C3-/-)的基因靶

向小鼠和CD55/CD59-缺陷型小鼠。這些小鼠丟失了各自的表面補體調節劑，因此它們的紅細胞易於發生自發補體自溶，如同PNH人紅細胞那樣。

為了進一步敏化這些紅細胞，使用這些細胞，用或不用甘露聚糖包被，然後在WT C56/BL6血漿、無MBL血漿、MASP-2 -/-血漿、人NHS、人MBL -/-血漿和用人抗-MASP-2抗體處理的NHS中測試其溶血。

1. 在MASP-2-缺乏的/耗盡的血清和對照中，Crry/C3和CD55/CD59雙重-缺陷型鼠紅細胞的溶血測定

第一天. 鼠RBC的製備(±甘露聚糖包被)。

材料包括：新鮮小鼠血液，BBS/Mg^{2+}/Ca^{2+} (4.4 mM巴比妥酸、1.8 mM巴比妥鈉、145 mM NaCl、pH 7.4, 5mM Mg^{2+}、5mM Ca^{2+})、氯化鉻、$CrCl_3 \cdot 6H_20$ (0.5mg/mL在BBS/Mg^{2+}/Ca^{2+}中)和甘露聚糖，100 μg/mL在BBS/Mg^{2+}/Ca^{2+}中。

在4℃冷凍離心機中以2000xg將全血(2 mL)離心1-2 min。吸去血漿和血沉棕黃層。然後通過將RBC沉澱物重懸於2 mL冰冷的BBS/明膠/Mg^{2+}/Ca^{2+}中並重複離心步驟，將樣品洗滌3次。第3次洗滌後，將沉澱物重懸於4 mL BBS/Mg^{2+}/Ca^{2+}中。將2 mL等分試樣的RBC留出，作為未包被對照。向剩餘的2 mL中加入2 mL CrC13和2 mL甘露聚糖，並將樣品在室溫下孵育同時溫和攪拌5分鐘。通過加入7.5 mL BBS/明膠/Mg^{2+}/Ca^{2+}而終止反應。將樣品如上所述地離心，重懸於2 mL BBS/明膠/Mg^{2+}/Ca^{2+}和如上所述地

再洗滌2次，然後貯存於4℃。

第二天. 溶血測定

材料包括BBS/明膠/Mg^{2+}/Ca^{2+} (如上)、測試血清、96-孔圓底和平底板和分光光度計，其在410-414 nm處閱讀96孔板。

首先測定RBC濃度並將細胞調整至10^9/mL，並在此濃度下貯存。使用前，將測定緩衝液稀釋至10^8/mL，然後採用100 ul每孔。在410-414 nm處(允許比541nm更高的靈敏度)測定溶血。在冰冷的BBS/明膠/Mg^{2+}/Ca^{2+}中製備測試血清稀釋液。將100μl每種血清稀釋液移入圓底板中(參見板佈置)。加入100 μl適當稀釋的RBC製備物(即10^8/mL) (參見板佈置)，在37℃孵育大約1小時，並觀察溶血。(此時可對各板拍照)。然後將板在最大速率離心5分鐘。吸出100 μl液相，轉移至平底板中，並在410-414 nm處記錄OD。保留RBC沉澱物(這些可以在隨後用水溶解，以得到相反結果)。

實驗#1：

新鮮血液得自CD55/CD59雙重-缺陷型小鼠，並且如以上方案詳述，製備Crry/C3雙重-缺陷型小鼠的血液和紅細胞。將細胞分開，一半細胞用甘露聚糖包被，另一半不處理，調節終濃度至1x108/mL，其中100 μl用於溶血測定，所述測定如上所述地進行。

實驗#1的結果：在PNH動物模型中，凝集素途徑參與紅細胞溶解

在初步實驗中，已經確定非-包被的WT小鼠紅細胞在任何小鼠血清中都不溶解。進一步確定了甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠紅細胞在WT小鼠血清中緩慢溶解(在37度時超過3小時)，但它們在無MBL血清中不溶解(資料未顯示)。

已經確定甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠紅細胞在人血清中快速溶解，但在熱滅活的NHS中不溶解。重要的是，甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠紅細胞在稀釋至1/640的NHS中溶解(即1/40、1/80、1/160、1/320和1/640稀釋度中全都溶解)(資料未顯示)。在這一稀釋度中，替代途徑不起作用(AP功能活性在低於8%血清濃度中顯著降低)。

實驗#1的結論

甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠紅細胞在具有MBL的高度稀釋的人血清中溶解得非常好，但在無MBL的高度稀釋的人血清中不溶解。在所測的各個血清濃度中的有效溶解暗示替代途徑不參與這種溶解或這種溶解無需替代途徑。MBL-缺乏的小鼠血清和人血清不能溶解甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠紅細胞，表明經典途徑亦與所觀察的溶解無關。因為需要凝集素途徑識別分子(即MBL)，所以這種溶解由凝集素途徑介導。

實驗#2：

新鮮血液得自Crry/C3和CD55/CD59雙重-缺陷型小鼠，並且在如上所述的溶血測定中，在以下人血清存在時，分析甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠紅細胞：無MBL；WT；用人抗-MASP-2抗體預處理的NHS；和熱滅活的NHS作為對照。

實驗#2的結果：在PNH動物模型中，MASP-2抑制劑阻止紅細胞溶解

將甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠紅細胞與以下一起孵育：在稀釋至1/640的NHS稀釋液中(即1/40、1/80、1/160、1/320和1/640)、人MBL-/-血清、用抗-MASP-2 mAb預處理的NHS、和熱滅活的NHS作為對照。

將ELISA微量滴定板離心並在圓孔板底部收集非-溶解的紅細胞。收集各孔的上清液，並通過在ELISA讀板器中讀取OD415 nm而測定從溶解的紅細胞中釋放的血紅蛋白量。

在對照熱滅活的NHS (陰性對照)中，正如所料，未見溶解。MBL-/-人血清在1/8和1/16稀釋度溶解甘露聚糖-包被的小鼠紅細胞。抗-MASP-2-抗體-預處理的NHS在1/8和1/16稀釋度溶解甘露聚糖-包被的小鼠紅細胞，而WT人血清在低至1/32稀釋度溶解甘露聚糖-包被的小鼠紅細胞。

圖40圖示了在來自熱滅活的(HI) NHS、MBL-/-、用抗

-MASP-2抗體預處理的NHS和NHS對照的血清中，一系列血清濃度的人血清使甘露聚糖-包被的鼠紅細胞溶血(通過溶解的小鼠紅細胞(Crry/C3-/-)的血紅蛋白釋放至上清液中來測量，所述上清液按照光度測定法測定)。

根據圖40所示的結果，顯示用抗-MASP-2抗體的MASP-2抑制顯著改變CH_{50}和抑制補體-介導的缺乏免於自身補體活化的保護的致敏紅細胞溶解。

實驗#3

在存在以下血清的情況下，在如上文描述的溶血測定法中分析在未包被的Crry-/-小鼠紅細胞中的獲自Crry/C3和CD55/CD59雙缺陷小鼠的新鮮血液：MBL -/-；WT血清；用人抗-MASP-2抗體預處理的NHS和熱滅活的NHS作為對照。

結果：

圖41圖示了在來自熱滅活的(HI) NHS、MBL-/-、用抗-MASP-2抗體預處理的NHS和NHS對照的血清中，通過一系列血清濃度的人血清，非-包被的鼠紅細胞的溶血(通過溶解的WT小鼠紅細胞的血紅蛋白釋放至上清液中來測量，所述上清液按照光度測定法測定)。如圖41所示的，證明了抑制MASP-2抑制補體-介導的非-敏化的WT小鼠紅細胞的溶解。

圖42圖示了在來自熱滅活的(HI) NHS、MBL-/-、用抗

-MASP-2抗體預處理的NHS和NHS對照的血清中，通過一系列血清濃度的人血清使非-包被的鼠紅細胞溶血(通過溶解的小鼠紅細胞(CD55/59-/-)的血紅蛋白釋放至上清液中來測量，所述上清液按照光度測定法測定)。

表12：表示為血清濃度的CH_{50}值

血清	**WT**	**CD55/59 -/-**
熱滅活的NHS	不溶解	不溶解
MBL AO/XX供體(MBL缺陷型)	7.2%	2.1%
NHS + 抗-MASP-2抗體	5.4%	1.5%
NHS	3.1%	0.73%

注意："CH_{50}"是補體-介導的溶血達到50%的點。

總之，本實施例的結果證明了抑制MASP-2抑制敏化和非-敏化紅細胞的補體介導的溶解，所述紅細胞缺乏免於自體補體活化的保護。因此，MASP-2抑制劑可以用於治療患有PNH的個體，並且還可用於在經歷用C5抑制劑例如艾庫組單抗(Soliris®)的治療的PNH患者中改善(即抑制、阻止或降低其嚴重程度)血管外溶血。

實施例34

本實施例描述上文實施例29中描述的研究的跟蹤研究，提供進一步的證據證實MASP-2抑制劑例如MASP-2抗體有效治療輻射暴露和/或治療、改善或預防急性輻射綜合征。

原理：在實施例29中描述的起始研究中，證實與溶媒治療的輻射對照動物相比以6.5 Gy和7.0 Gy暴露水準，在小鼠中輻射前用抗-MASP-2抗體治療增加輻射小鼠的存活

率。在實施例29中還證實，與溶媒對照輻射動物相比，以6.5 Gy暴露水準，輻射後用抗-MASP-2抗體治療導致存活率的適度增加。本實施例描述進行的第二個輻射研究，以證實第一個研究的結果。

方法：

研究A的設計：

Swiss Webster小鼠(n=50)暴露於電離輻射(8.0 Gy)。評價了輻射暴露之前18小時和輻射暴露之後2小時以及之後每週給予的抗-MASP-2抗體療法(mAbH6 5mg/kg)對死亡率的影響。

研究A的結果：

如圖43中所示，確定在暴露於8.0 Gy的小鼠中給予抗-MASP-2抗體mAbH6增加存活率，與接受溶媒對照的小鼠相比，調整的中位數存活率增加4-6天，和當與接受溶媒對照的小鼠相比死亡率降低12%(log-rank檢驗，p=0.040)。

研究B的設計：

按以下組，將Swiss Webster小鼠(n=50)暴露於電離輻射(8.0 Gy)：(I：溶媒)鹽水對照；(II：低)抗-MASP-2抗體mAbH6 (5 mg/kg)，輻射之前18小時和輻射之後2小時給予；(III：高) mAbH6 (10 mg/kg)，輻射之前18小時和輻射之後2小時給予；和(IV：後高) mAbH6 (10mg/kg)，僅輻射

之後2小時給予。

研究B的結果：

與接受溶媒對照的動物相比，輻射之前和之後給予抗-MASP-2抗體調整平均存活率4-5天。與溶媒對照小鼠相比，抗-MASP-2抗體-治療的小鼠的死亡率降低6-12%。還注意到，沒有觀察到顯著的有害治療作用(資料未顯示)。

總之，本實施例中顯示的結果與實施例29中顯示的結果一致，進一步證實了抗-MASP-2抗體有效治療處於急性輻射綜合征的有害作用的風險中或遭受急性輻射綜合征的有害作用的哺乳動物受試者。

實施例35

本研究探討MASP-2-缺乏在LPS(脂多糖)誘導的血栓形成的小鼠模型中的作用。

原理：

由產志賀毒素的大腸桿菌感染引起的溶血性尿毒綜合征(HUS)是兒童中急性腎衰竭的首要原因。在此實施例中，在MASP-2 -/- (KO)小鼠中進行LPS誘導的血栓形成(微血管凝血)的Schwarztman模型，以確定MASP-2抑制是否有效抑制或阻止血管內血栓的形成。

方法：

在LPS誘導的血栓形成(微血管凝血)的Schwarztman模型中分析了MASP-2 -/- (n=9)和WT(n=10)小鼠。將沙雷氏菌LPS給予小鼠並監測隨時間的血栓形成。對微血栓和LPS誘導的微血管凝血的發生率進行比較。

結果：

值得注意的是，在沙雷氏菌LPS給藥後，所有受試MASP-2-/-小鼠(9/9)沒有形成血管內血栓。相比之下，在平行測試的10只WT小鼠中，在7只中檢測到微血栓(P=0.0031，Fischer's exact)。如圖44所示，在MASP-2 -/-和WT小鼠中測定至LPS感染後微血管閉塞發作的時間，顯示了經60分鐘測定的具有血栓形成的WT小鼠的百分比，其中早在約15分鐘時檢測到血栓形成。高達80%的WT小鼠在60分鐘時出現血栓形成。相比之下，如圖44所示，在60分鐘時，MASP-2 -/-無一具有血栓形成(對數秩：P=0.0005)。

這些結果表明，在HUS模型中，MASP-2的抑制針對血管內血栓的發生具有防護作用。

實施例36

本實施例描述了使用腹膜內共注射純化的志賀毒素2(STX2)加LPS，在HUS的小鼠模型中抗-MASP-2抗體的作用。

背景：

使用腹膜內共注射純化的志賀毒素2 (STX2)加LPS，開發HUS的小鼠模型。小鼠腎臟的生化和微陣列分析揭示了STX2加LPS攻擊與任一單獨藥劑的效果截然不同。這些小鼠的血液和血清分析表明，中性粒細胞增多，血小板減少，紅細胞溶血，並且血清肌酐和血液尿素氮增加。此外，小鼠腎的組織學分析和電子顯微術顯示出腎小球纖維蛋白沉積，紅細胞充血，微血栓形成，和腎小球超微結構改變。確定該HUS模型在C57BL/6小鼠中誘導人HUS病理學的所有臨床症狀，包括定義人類疾病的血小板減少，溶血性貧血，和腎衰竭。(J. Immunol 187(1):172-80 (2011))。

方法：

經稱量在18至20g的C57BL/6雌性小鼠購自Charles River實驗室並分成兩組(每組五隻小鼠)。一組小鼠通過腹膜內(i.p.)注射在150µl鹽水的總體積中稀釋的重組抗-MASP-2抗體mAbM11(每只小鼠100 µg；對應於5 mg/kg體重的終濃度)而預處理。對照組接受鹽水，沒有任何抗體。在i.p.注射抗-MASP-2抗體mAbM11後6小時，所有小鼠接受在150µl總體積中組合的i.p.注射亞致死劑量(3 µg/動物；對應於150 µg/kg體重)的粘質沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)LPS (L6136; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)和4.5 ng/動物劑量(相當於225 ng/kg) STX2 (LD50劑量的2倍)。鹽水注射被用於對照。

給藥後每6小時監測小鼠的存活。當小鼠達到了HUS

病理的昏睡階段，就將其處死。36小時後，處死所有小鼠，取出雙腎用於免疫組織化學和掃描電子顯微術。在實驗結束時通過心臟穿刺取血樣。分離血清並將其冷凍保存於-80℃，用於在治療組和對照組中測定BUN和血清肌酐水準。

免疫組織化學

將各小鼠腎臟的三分之一固定在4%多聚甲醛中24小時，處理和石蠟包埋。切成三微米厚的切片，並置於裝載的載玻片上，用於後續H&E染料染色。

電子顯微術

將腎臟的中間部分切成約1至2 mm^3的塊，並在4℃在2.5%戊二醛/1×PBS中固定過夜。固定的組織隨後由萊斯特大學的電子顯微鏡設備處理。

冰凍切片

將腎臟的另一三分之一切成約1至2 mm^3的塊並在液氮中快速冷凍並保持在-80℃，用於冷凍切片和mRNA分析。

結果：

圖45圖示了在STX/LPS誘導的模型中，鹽水處理的對照小鼠(n=5)和抗-MASP-2抗體治療的小鼠(n=5)隨時間(小時)的存活百分率。值得注意的是，如圖45所示，對照小

鼠到42小時為止全部死亡。形成鮮明對比的是，100%的抗-MASP-2抗體治療的小鼠在整個實驗的時間過程中存活。與圖45所示結果一致的是，觀察到所有死亡或因嚴重疾病跡象而必須處死的未經處理小鼠具有顯著腎小球損傷，而所有抗-MASP-2-抗體治療的小鼠的腎小球看起來正常(資料未顯示)。這些結果表明，MASP-2抑制劑例如抗-MASP-2抗體可用於治療患有或有風險發展血栓性微血管病(TMA)例如溶血性尿毒綜合征(HUS)、非典型HUS(aHUS)或血栓性血小板減少性紫癜(TTP)的受試者。

實施例37

該實施例描述了MASP-2缺乏和MASP-2抑制在鼠FITC-葡聚糖/光誘導的內皮細胞損傷的血栓形成模型中的作用。

背景/原理：如實施例35和36所示，在典型HUS模型中，MASP-2缺乏(MASP-2 KO)和MASP-2抑制(通過給予抑制性MASP-2抗體)保護小鼠，而所有暴露於STX和LPS的對照小鼠出現嚴重的HUS，變得垂死或48小時內死亡。例如，如圖54所示，用MASP-2抑制性抗體處理，然後暴露於STX和LPS的所有小鼠均存活(Fisher' exact P <0.01；N=5)。因此，在該HUS模型中，抗MASP-2療法保護小鼠。

進行下面的實驗以分析血栓性微血管病(TMA)的異硫氰酸螢光素(FITC)葡聚糖誘導的內皮細胞損傷模型中

MASP-2缺乏和MASP-2抑制的作用，以進一步證明MASP-2抑制劑治療HUS、aHUS、TTP和具有其他病因的TMA的益處。

方法：

活體內顯微術

如Frommhold等，*BMC Immunology* 12:56-68, 2011所述，製備用於活體內顯微術的小鼠。簡言之，將小鼠用腹膜內(i.p.)注射氯胺酮(125 mg/kg體重，Ketanest, Pfitzer GmbH, Karlsruhe, Germany)和賽拉嗪(12.5 mg/kg體重；Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany)而麻醉，並放置在加熱墊上以保持體溫在37℃。用鹽水浸泡目鏡(SW 40/0.75數值孔徑，Zeiss, Jena, Germany)在直立顯微鏡(Leica, Wetzlar, Germany)上進行活體內顯微術。為了緩解呼吸，小鼠採用PE 90管(Becton Dickson和Company, Sparks, MD, USA)插管。左頸動脈用PE10管(Becton Dickson和Company, Sparks, MD, USA)插管進行血液取樣和系統性單克隆抗體(mAb)給藥。

提睾肌的準備

如Sperandio等，*Blood,* 97:3812-3819, 2001所述進行提睾肌手術準備，用於活體內顯微術。簡言之，打開陰囊和使提睾肌鬆動。在縱行切開肌肉並將其伸展在蓋玻片上後，移動附睾和睾丸並將其固定到一邊，充分顯微觀察提

睪肌微循環。在Panasonic S-VHS錄影機上通過CCD攝像機(CF8/1; Kappa, Gleichen, Germany)記錄提睪肌小靜脈。如先前由Frommhold等，*BMC Immunology* 12:56-68, 20112011所述，用熱控制的(35℃碳酸氫鹽緩衝鹽水)表面灌流提睪肌。

光激發FITC葡聚糖損傷模型

通過光毒性(FITC)-葡聚糖的光激發誘導提睪肌小靜脈和小動脈內皮中受控的光劑量依賴性血管損傷(Cat. No. FD150S, Sigma Aldrich, Poole, U. K.)。該程式啟動局部血栓形成。作為光毒性試劑，將60μL 10%w/v FITC-葡聚糖溶液通過左頸動脈入口注入並使其均勻分佈在整個迴圈血液10分鐘。在選定良好灌注的小靜脈後，將低到中範圍強度(800-1500)鹵素光聚焦於目的血管以對內皮表面誘導FITC-葡聚糖螢光和輕度至中度光毒性，以便以可再現的受控方式刺激血栓形成。使用鹵素燈(12V, 100W, Zeiss, Oberkochen, Germany)產生激發FITC-葡聚糖必需的光毒性光強度。由螢光的光致激發而產生的光毒性需要光強度閾值和/或照明持續時間，並且通過內皮表面直接加熱或通過產生活性氧自由基引起，如Steinbauer等，*Langenbecks Arch Surg* 385:290-298, 2000所述。

施加到各血管的光強度通過用於低功率測量的波長校正二極體檢測器(Labmaster LM-2, Coherent, Auburn, USA)測量，以便調節。視頻掃描的離線分析借助電腦輔助微循

環分析系統(CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg)進行，並如Zeintl等，*Int J Microcirc Clin Exp*, 8(3):293-302, 2000所述，測定紅細胞速度。

在誘導血栓形成前，施用單克隆抗人MASP-2抑制性抗體(mAbH6)和溶媒對照

採用盲法研究設計，在活體內顯微術的提睪肌模型中，在光毒性誘導血栓形成前16小時，將MASP-2功能活性的抑制劑即重組單克隆人MASP-2抗體(mAbH6)(以10mg/kg體重的終濃度給予)或等量的同種型對照抗體(無MASP-2抑制活性) i.p.注射給予9周齡雄性C57BL/6 WT同窩小鼠。在誘導血栓形成前1小時，給予第二劑量的mAbH6或對照抗體。也在該模型中評價MASP-2敲除(KO)小鼠。

mAbH6 (針對重組人MASP-2建立)是人MASP-2功能活性的有效抑制劑，其與小鼠MASP-2交叉反應，與之結合並抑制小鼠MASP-2，但由於物種特異性，親和力較低(資料未示出)。為了彌補mAbH6對於小鼠MASP-2的較低親和力，以高濃度(10mg/kg體重)給予mAbH6，以克服物種特異性變化和對於小鼠MASP-2的較低親和力，從而在體內條件下提供鼠MASP-2功能活性的有效阻斷。

在該盲法研究中，記錄各個受試小靜脈完全閉塞所需要的時間(選擇標準是通過可比的直徑和血流速度)。

經60分鐘觀察期，使用活體內顯微術錄影記錄，評價具有微血管閉塞的小鼠百分比、發病時間和至閉塞的時

間。

結果：

圖46圖示了，作為損傷誘導後時間的函數，在FITC/葡聚糖UV模型中，在注射FITC/葡聚糖之前16小時和1小時給予同種型對照或人MASP-2抗體mAbH6 (10mg/kg)處理後，具有微血管閉塞的小鼠的百分比。如圖46所示，85%的接受同種型對照抗體的野生型小鼠在30分鐘或更短時間內閉塞，而只有19%的經人MASP-2抗體(mAbH6)預處理的野生型小鼠在同一時間內閉塞，並且在人MASP-2抗體處理組中的確最終閉塞的小鼠中至閉塞的時間延遲。進一步注意的是，3只經MASP-2 mAbH6處理的小鼠在60分鐘觀察期間內完全沒有閉塞(即，被保護免於血栓閉塞)。

圖47圖示了對於經人MASP-2抗體(mAbH6)和同種型對照抗體處理的小鼠以分鐘計的閉塞時間。資料包告為散點圖，具有平均值(水準條)和標準誤差條(分隔號)。該圖示出了可觀察到閉塞的小鼠中的閉塞時間。因此，在60分鐘觀察期間沒有閉塞的3只MASP-2抗體處理的小鼠並沒有包括在本分析(沒有未閉塞的對照處理的小鼠)。用於分析的統計檢驗是非配對t檢驗；其中符號“*”表示p值=0.0129。如示於圖47中，在採用低光強度(800-1500)的FITC-葡聚糖/光誘導的內皮細胞損傷的血栓形成模型中，在閉塞的4只MASP-2抗體(mAbH6)處理的小鼠中，與同種型對照抗體處理的小鼠相比，用MASP-2抗體處理顯著增加了靜脈閉

塞時間。同種型對照的完全閉塞時間平均為19.75分鐘，而MASP-2抗體處理組的完全閉塞時間平均為32.5分鐘。

圖48圖示了在採用低光強度(800-1500)的FITC-葡聚糖/光誘導的內皮細胞損傷的血栓形成模型中，對於野生型小鼠、MASP-2 KO小鼠和用人MASP-2抗體(mAbH6)預處理(在誘導血栓形成前16小時以10mg/kg i.p.給藥，然後在誘導血栓形成前1小時再次i.v給藥)的野生型小鼠，以分鐘計的閉塞時間。僅閉塞的動物被包括在圖48中；對於接受同種型對照抗體的野生型小鼠，n=2；對於MASP-2 KO，n=2；和對於接受人MASP-2抗體(mAbH6)的野生型小鼠，n=4。符號“*”表示P<0.01。如示於圖48，在採用低光強度(800-1500)的FITC-葡聚糖/光誘導的內皮細胞損傷的血栓形成模型中，MASP-2缺乏和MASP-2抑制(10mg/kg的mAbH6)增加靜脈閉塞時間。

結論：

本實施例的結果進一步證明，在TMA的小鼠模型中，阻斷凝集素途徑的MASP-2抑制劑(例如，阻斷MASP-2功能的抗體)抑制微血管凝血和血栓形成，微血管凝血和血栓形成是多種微血管病症的標誌。因此，預期在患有HUS、aHUS、TTP或其他微血管病症的患者中，給予MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體將是一種有效療法，並提供保護而免於微血管凝血和血栓形成。

實施例38

本實施例描述了一項研究，表明人MASP-2抑制性抗體(mAbH6)在富含血小板的人血漿中對血小板功能沒有影響。

背景/原理：如實施例37中描述的，證明在FITC-葡聚糖/光誘導的內皮細胞損傷的血栓形成模型中，用人MASP-2抑制性抗體(mAbH6)抑制MASP-2增加了靜脈閉塞時間。進行以下實驗，以確定MASP-2抑制性抗體(mAbH6)是否對血小板功能具有影響。

方法：如下對血小板的ADP誘導的聚集測試人mAbH6 MASP-2抗體的作用。將40 μL溶液中1 μg/ml或0.1 μg/ml濃度的人MASP-2 mAbH6加入360 μL新鮮製備的富血小板的人血漿中。同種型對照抗體被用作陰性對照。在將抗體加入血漿中後，血小板活化通過添加2μM終濃度的ADP而誘導。該測定通過用小磁體在1 mL反應杯中攪拌溶液而開始。血小板聚集在雙通道Chrono-log Platelet Aggregometer Model 700 Whole Blood/Optical Lumi-Aggregometer中測定。

結果：

在5分鐘時間段內測定溶液中的聚集百分比。其結果示於下表13。

表 13：在 5 分鐘時間段內的血小板聚集。

抗體	幅度(聚集百分比)	斜率(隨時間變化的聚集百分比)
MASP-2抗體(mAbH6) (1 μg/ml)	46%	59
同種型對照抗體(1 μg/ml)	49%	64
MASP-2抗體(mAbH6) (0.1 μg/ml)	52%	63
同種型對照抗體(0.1 μg/ml)	46%	59

如上表13所示，用對照抗體或MASP-2 mAbH6抗體處理的ADP誘發的血小板聚集之間沒有觀察到顯著差異。這些結果表明，人MASP-2抗體(mAbH6)對血小板功能沒有影響。因此，實施例37中描述的結果表明在FITC-葡聚糖/光誘導的內皮細胞損傷的血栓形成模型中，用人MASP-2抑制性抗體(mAbH6)抑制MASP-2增加了靜脈閉塞時間，該結果並非由於mAbH6對血小板功能的影響。因此，MASP-2抑制防止血栓形成，而不直接影響血小板功能，揭示出與現有抗血栓形成劑不同的治療機制。

實施例39

本實施例描述在TMA的鼠模型中MASP-2抑制對血栓形成和血管阻塞的影響。

背景/原理：在內皮細胞應激或損傷的背景中凝集素途徑在活化補體系統中起主要作用。該活化通過替代途徑被快速放大，替代途徑在呈現具有aHUS的許多患者中失調。因此預期防止MASP-2和凝集素途徑的活化將終止連續的酶反應，所述酶反應導致形成膜攻擊複合物、血小板

活化和白細胞募集。該作用限制組織損傷。

另外，MASP-2具有因數Xa-樣活性，並裂解凝血酶原以形成凝血酶。該MASP-2-驅動的凝血系統活化可使止血失調，導致TMA病理。因此，使用MASP-2抑制劑例如阻斷補體活化和凝血系統的MASP-2抑制性抗體抑制MASP-2預期改善aHUS和其它TMA-相關病況的結果。

如實施例37中所述的，證實在血栓形成的FITC-葡聚糖/光誘導的內皮細胞損傷模型中，用人MASP-2抑制性抗體(mAbH6)的MASP-2抑制增加靜脈阻塞時間。在該TMA模型中，小鼠通過IV注射FITC-葡聚糖敏化，接著在小鼠提睾肌的微血管中局部光活化FITC-葡聚糖(Thorlacius H等，*Eur J Clin. Invest* 30(9):804-10, 2000; Agero等，*Toxicon* 50(5):698-706, 2007)。

進行以下實驗以確定在TMA鼠模型中，MASP-2抑制性抗體(mAbH6)對血栓形成和血管阻塞是否具有劑量反應作用。

方法：在C57 Bl/6小鼠的提睾肌的微血管中通過光活化異硫氰酸螢光素標記的葡聚糖(FITC-葡聚糖)誘導局部血栓形成，和使用具有以下修改的描述於實施例37中的方法，使用活體顯微鏡檢查測量血栓形成和血管阻塞的起始。在TMA誘導前1小時通過靜脈內(iv)注射，將mAbH6(2mg/kg、10 mg/kg或20 mg/kg)或同種型對照抗體(20 mg/kg)給予各組小鼠。記錄發生血栓形成的時間和完全血管阻塞的時間。在30-60分鐘記錄的活體顯微鏡檢查圖像

的視頻再現分析用於評價血管大小、血流速度、光強度、發生血栓形成(相當於血小板粘附)的速度、發生血栓形成的時間、總血管阻塞速度和直到總血管阻塞的時間。使用SigmaPlot v12.0進行統計學分析。

結果：

開始血栓形成

圖49是Kaplan-Meier曲線，顯示在用增加劑量的人MASP-2抑制性抗體(mAbH6，2 mg/kg、10mg/kg或20 mg/kg)或同種型對照抗體治療的小鼠中，在FITC-葡聚糖誘導的血栓性微血管病中，具有血栓的小鼠的百分比作為時間的函數。如圖49中所示，相對於對照治療的小鼠，在mAbH6-治療的小鼠中以劑量-依賴性方式，血栓形成的開始被延遲。

圖50圖示說明了至發生血栓形成的中位數時間(分鐘)，其為mAbH6劑量的函數(與對照相比*p<0.01)。如圖50中所示，用增加劑量的mAbH6，至發生血栓形成的中位數時間從對照組的6.8分鐘增加至20 mg/kg mAbH6治療組的17.7分鐘(p<0.01)。基礎實驗資料和統計學分析提供在表14和15中。

基於圖像記錄評價，在單個小鼠中記錄的至發生血栓形成的時間詳述於下表14中。

表 14：在光染料誘導的損傷後至發生血栓形成的時間

對照治療		mAbH6治療		
至發病的時間(分鐘)	對照	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
	6.07	5.93	12.75	10.00
	1.07	6.95	2.53	10.33
	8.00	8.92	14.00	21.00
	2.40	11.92	3.05	11.50
	8.48	12.75	8.00	19.00
	4.00	12.53	8.17	10.37
	4.00		15.83	22.65
	7.83		11.70	16.37
	6.83		50.67	21.75*
	15.00			32.25*
	15.67			

* 在指定的觀察期間血管未顯示發病。

比較在對照和mAbH6治療的動物之間至發生阻塞的時間的統計學分析顯示在下表15中。

表 15：至發病的時間：資料來自 FITC Dex 劑量反應研究

統計學	對照	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
事件數/動物數(%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/10 (80.0%)
中位數時間(分鐘) (95% CI)	6.8 (2.4, 8.5)	10.4 (5.9, 12.8)	11.7 (2.5, 15.8)	17.7 (10.0, 22.7)
Wilcoxon p-值*		0.2364	0.1963	0.0016
事件=至觀察到發病的時間 中位數(分鐘)和其95% CI基於Kaplan-Meier評估 NE=不可估計 *p-值通過Dunnett-Hsu多重比較進行調整				

微血管阻塞

圖51是Kaplan-Meier曲線，顯示在用增加劑量的人MASP-2抑制性抗體(mAbH6，2 mg/kg、10mg/kg或20 mg/kg)或同種型對照抗體治療的小鼠中，在FITC-葡聚糖

誘導的血栓性微血管病中，具有微血管阻塞的小鼠的百分比，其為時間的函數。如圖51中所示，與對照小鼠相比，在mAbH6治療組中完全微血管阻塞被延遲。

圖52圖示說明了至微血管阻塞的中位數時間，其為mAbH6劑量的函數(與對照相比*p<0.05)。如圖52中所示，至完全微血管阻塞的中位數時間從對照組的23.3分鐘增加至2mg/kg mAbH6治療組的38.6分鐘(p<0.05)。10 mg/kg或20 mg/kg劑量的mAbH6與2 mg/kg mAbH6治療組表現類似(完全微血管阻塞的中位數時間分別是40.3和38分鐘)。基礎實驗資料和統計學分析提供在表16和17中。

基於圖像記錄的原始評價，在單個小鼠中記錄的至完全血管阻塞的時間詳細描述於表16中。

表16：在光染料誘導的損傷後至完全阻塞的時間

對照治療		**mAbH6治療**		
至阻塞的時間(分鐘)	**對照**	**2 mg/kg**	**10 mg/kg**	**20 mg/kg**
	37.50	42.3	30.92	38.00
	29.07	21.91	17.53	28.00
	27.12	24.4	51.38	40.58
	19.38	31.38	36.88	33.00
	19.55	61.17*	26.83	39.10
	18.00	61.55*	40.28	32.03
	16.50		55.83	38.53
	23.33		71.93*	21.75*
	14.83		98.22*	32.25*
	30*			33.17*
	61.8*			

*在指示的觀察期間血管未完全阻塞。

在對照和mAbH6治療的動物之間比較至完全阻塞的時間統計學分析顯示在下表17中。

表 17：至完全微血管阻塞的時間：來自 FITC Dex 劑量反應研究的資料

統計學	**對照**	**mAbH6 (2 mg/kg)**	**mAbH6 (10 mg/kg)**	**mAbH6 (20 mg/kg)**
事件數/動物數(%)	9/11 (81.8%)	4/6 (66.7%)	7/9 (77.8%)	7/10 (70.0%)
中位數時間(分鐘) (95% CI)	23.3 (16.5, 37.5)	36.8 (21.9, NE)	40.3 (17.5, NE)	38.0 (28.0, 40.6)
Wilcoxon p-值*		0.0456	0.0285	0.0260
事件=至觀察到阻塞的時間 中位數(分鐘)和其95% CI基於Kaplan-Meier估計 NE=不可估計 *p-值通過Dunnett-Hsu多重比較進行調整				

概述

如表18中所概述的，相對於對照治療的小鼠，在mAbH6治療的小鼠中血栓形成的起始以劑量-依賴性方式被延遲(至發病的中位數時間為10.4-17.7分鐘，相對於6.8分鐘)。相對於對照治療組，在所有mAbH6-治療組中，至完全阻塞的中位數時間被顯著延遲(表18)。

表 18：至發生血栓形成和完全阻塞的中位數時間

	對照	**mAbH6 (2 mg/kg)**	**mAbH6 (10 mg/kg)**	**mAbH6 (20 mg/kg)**
至發生血栓形成的中位數#時間(分鐘)	6.8	10.4	11.7	17.7*
至完全微血管阻塞的中位數#時間(分鐘)	23.3	36.8*	40.3*	38.0*

#中位數值基於 Kaplan-Meier 估計

*與對照相比 $p<0.05$(通過用於多重比較的 Dunnett-Hsu 調整的 Wilcoson)

這些結果證實，mAbH6，一種結合MASP-2和阻斷補體系統的凝集素途徑的人單克隆抗體，在TMA的實驗小鼠模型中以劑量-依賴性方式減少微血管血栓形成。因此，預期給予MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體，將是患有HUS、aHUS、TTP或其它微血管病性病症，例如其它TMA，包括災難性抗磷脂綜合征(CAPS)、系統性德戈斯病；和癌症、癌症化學療法和移植繼發性TMA的患者的有效療法和提供保護免於微血管凝血和血栓形成。

實施例 40

本實施例描述使用噬菌體展示鑒定結合MASP-2和抑制凝集素-介導的補體活化，同時保留免疫系統的經典(C1q-依賴性)途徑和替代途徑組分完整的完全人scFv抗體。

概述：

完全人高-親和力MASP-2抗體通過篩選噬菌體展示文庫進行鑒定。抗體的可變輕鏈和重鏈片段以scFv形式和全長IgG形式分離。人MASP-2抗體可用於抑制與凝集素途徑-介導的替代補體途徑活化有關的細胞損傷，同時保留免疫系統的經典(C1q-依賴性)途徑組分完整。在一些實施方案中，本發明的MASP-2 抑制性抗體具有以下特徵：(a)對人MASP-2的高親和力(例如，KD為10 nM或更小)；和(b)在90%人血清中抑制MASP-2-依賴性補體活性，其IC50為30 nM或更小。

方法：

全長催化失活的MASP-2的表達：

人MASP-2的全長cDNA序列(SEQ ID NO: 4)，其編碼具有前導序列的人MASP-2多肽(SEQ ID NO:5)，被亞克隆至哺乳動物表達載體pCI-Neo (Promega)，其在CMV增強子/啟動子區的控制下驅動真核表達(描述於Kaufman R. J.等，*Nucleic Acids Research19*:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, *185*:537-66 (1991))。

為了產生催化失活的人MASP-2A蛋白，按US2007/0172483中所述進行定點誘變，其通過引用結合到本文中。PCR產物在瓊脂糖凝膠電泳和條帶製備後純化，和使用標準加尾程式產生單個腺苷重疊。然後將腺苷加尾的MASP-2A克隆

至pGEM-T easy載體中和轉化到大腸桿菌。將人MASP-2A進一步亞克隆至哺乳動物表達載體pED或pCI-Neo。

將上述MASP-2A表達構建體轉染到DXB1細胞，使用標準磷酸鈣轉染程式(Maniatis等人，1989)。在無血清培養基中產生MASP-2A，以確保製備物不被其它血清蛋白污染。每隔一天從彙集細胞中收穫培養基(共4次)。重組MASP-2A水準平均為大約1.5 mg/升培養基。MASP-2A (上述Ser-Ala突變體)通過親和色譜在MBP-A-瓊脂糖柱上純化。

在經淘選/scFv轉化和過濾篩選而鑒定的ScFv侯選克隆的MASP-2A ELISA

對人免疫球蛋白輕鏈-和重鏈-可變區序列的噬菌體展示文庫進行抗原淘選，接著經過自動化抗體篩選和選擇，以鑒定針對人MASP-2蛋白的高親和性scFv抗體。進行了針對HIS-標記的或生物素標記的MASP-2A的scFv噬菌體文庫的三輪淘選。第三輪淘選先用MBL洗脫，再用TEA (鹼性)洗脫。為了監測噬菌體展示scFv片段對靶MASP-2A的特異性富集，進行了針對固定化MASP-2A的多克隆噬菌體ELISA。將來自3輪淘選的scFv基因克隆到pHOG表達載體中並進行小規模過濾篩選，以尋找針對MASP-2A的特定克隆。

挑出含有編碼來自第三輪淘選的scFv片段的質粒的細菌菌落，點在硝基纖維素膜上並在非誘導性培養基中培養

過夜以產生主機板。從第三輪淘選中總共挑出並分析了18,000個菌落，半數來自競爭性洗脫，半數來自隨後的TEA洗脫。淘選針對MASP-2A的scFv噬菌粒文庫，接著scFv轉化和過濾篩選，得到137個陽性克隆。108/137克隆在ELISA測定法中對MASP-2結合呈陽性(資料未顯示)，其中進一步分析了其中的45個克隆在正常人血清中阻斷MASP-2活性的能力。

測定抑制凝集素途徑C3轉化酶形成的測定法

測定抑制凝集素途徑C3轉化酶形成的功能測定法用於評價MASP-2 scFv候選克隆的“阻斷活性”。為了產生包含凝集素途徑C3轉化酶的兩種蛋白成分(C4b、C2a)，需要MASP-2絲氨酸蛋白酶活性。因此，抑制MASP-2功能活性的MASP-2 scFv (即阻斷性MASP-2 scFv)將抑制凝集素途徑C3轉化酶的從頭形成。C3含有獨特的高反應性硫酯基團作為其結構部分。在該測定法中當C3轉化酶裂解C3時，C3b上的硫酯基團可與通過酯鍵或醯胺鍵固定在塑膠孔底部的大分子上的羥基或氨基形成共價鍵，從而有利於在ELISA測定法中檢測出C3b。

酵母甘露聚糖是凝集素途徑的已知啟動劑。在測定C3轉化酶形成的下列方法中，將用甘露聚糖包被的塑膠孔與稀釋的人血清孵育以啟動凝集素途徑。然後洗滌各孔，並採用標準ELISA方法測定固定在孔中的C3b。在該測定法中所產生的C3b的量直接反映了從頭形成的凝集素途徑C3

轉化酶。在該測定法中測定選定濃度的MASP-2 scFv克隆抑制C3轉化酶形成和隨後C3b產生的能力。

方法：

將如上所述地鑒定的45個候選克隆表達、純化並稀釋至相同的儲液濃度，再將其稀釋在含Ca^{++}和Mg^{++}的GVB緩衝液(4.0 mM巴比妥，141 mM NaCl，1.0 mM $MgCl_2$，2.0 mM $CaCl_2$，0.1%明膠，pH 7.4)中，以確保所有克隆都具有相同量的緩衝液。以一式三份，測定濃度為2 μg/mL的每個scFv克隆。陽性對照是OMS100 Fab2並以0.4 μg/mL測定。在有和沒有scFv/IgG克隆存在時監測C3c形成。

將甘露聚糖在50mM碳酸鹽緩衝液(15 mM Na_2CO_3+35 mM $NaHCO_3$+1.5 mM NaN_3，pH 9.5)中稀釋至濃度20 μg/mL (1 μg/孔)並包被在ELISA板上，在4℃過夜。次日，將甘露聚糖-包被的板用200 μl PBS洗滌3次。再將100 μl 1% HSA封閉溶液加入各孔並在室溫下孵育1小時。將各板用200 μl PBS洗滌3次，並貯存在冰上在200 μl PBS中，直到加入樣品。

將正常人血清在CaMgGVB緩衝液中稀釋至0.5%，並以一式三份，向該緩衝液中加入scFv克隆或OMS100 Fab2陽性對照，濃度為0.01 μg/mL、1 μg/mL (僅OMS100對照)和10 μg/mL，並在冰上預孵育45分鐘，然後加入到封閉的ELISA板上。通過在37℃孵育1小時啟動反應，並通過將各板移至冰浴而終止反應。用兔α-小鼠C3c抗體，接著是

山羊α-兔HRP來檢測C3b沉積。陰性對照是無抗體緩衝液(無抗體=最大C3b沉積)，陽性對照是含EDTA的緩衝液(無C3b沉積)。通過進行同樣的測定法來檢測背景，除了各孔中無甘露聚糖之外。將無甘露聚糖板的背景信號從含甘露聚糖的孔的信號中減去。截止標準設定為僅無關scFv克隆(VZV)和緩衝液的活性的一半。

結果：基於截止標準，發現共13個克隆阻斷MASP-2的活性。選擇所有產生>50%途徑抑制的13個克隆並測序，獲得10個獨特的克隆。發現所有10個克隆具有相同的輕鏈亞類λ3，但有三個不同的重鏈亞類VH2、VH3和VH6。在功能測定法中，使用0.5%人血清，10個候選scFv克隆中有5個的IC50 nM值小於25 nM目標標準。

為了鑒定具有改善的效力的抗體，對如上所述鑒定的3個母scFv克隆進行輕鏈重排(shuffling)。此過程涉及由與源自六個健康供體的首次用於實驗的人類λ輕鏈(VL)的文庫配對的每個母克隆的VH組成的組合文庫的生成。然後篩選此文庫中具有改善的結合親和性和/或功能性的scFv克隆。

表 19：前導子克隆和它們各自的母克隆(都以 scFv 形式)的 IC50 (nM)的功能效力的比較

scFv 克隆	**1%人血清 C3 測定 (IC_{50} nM)**	**90%人血清 C3 測定 (IC_{50} nM)**	**90%人血清 C4 測定 (IC_{50} nM)**
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

以下給出的是上表19所示的母克隆和子克隆的重鏈可變區(VH)序列。

Kabat CDR (31-35 (H1)、50-65 (H2)和95-107 (H3))以粗體表示；Chothia CDR (26-32 (H1)、52-56 (H2)和95-101 (H3))以底線表示。

17D20_35VH-21N11VL重鏈可變區(VH) (SEQ ID NO:67，由SEQ ID NO:66編碼)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS**RG**KMGVSWIRQPPGKALEW**LA**HIFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTAT**YYCARIRR**GGIDYWGQGTLVTVSS

d17N9重鏈可變區(VH) (SEQ ID NO:68)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSTSAAWNWIRQSPSRGLEW**LG**RTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT**AVYYCARD**PFGVPFDIWGQGTMVTVSS

以下給出的是母克隆和子克隆的輕鏈可變區(VL)序

列。

Kabat CDR (24-34 (L1)；50-56 (L2)；和89-97 (L3)以粗體表示；Chothia CDR (24-34 (L1)；50-56 (L2)和89-97 (L3)以底線表示。這些區域是相同的，無論按照Kabat還是Chothia系統編號。

17D20m_d3521N11輕鏈可變區(VL) (SEQ ID NO:70，由SEQ ID NO:69編碼)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS**GEKLGDKYAYW**YQQKPGQSPVLVMYQ**DKQRPSG**IPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ**AWDSSTAVF**GGGTKLTVL

17N16m_d17N9輕鏈可變區(VL) (SEQ ID NO:71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCA**GDNLGKKRVHW**YQQRPGQAPVLVIYD**DSDRPSG**IPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQ**VWDIATDHV**VFGGGTKLTVLAAAGSEQKLISE

通過斑點印跡分析，對於表位結合，分析了MASP-2抗體OMS100和MoAb_d3521N11VL (包括SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區，亦稱為“OMS646”和“mAbH6”)，這兩者已證明以高親和性與人MASP-2結合並具有阻斷功能性補體活性的能力。結果表明OMS646和OMS100抗體對MASP-2是高特異性，而不與MASP-1/3結合。抗體既不與MAp19結合，也不與不含MASP-2的CCP1結構域的MASP-2片段結合，得到以下結論：結合位點包含CCP1。

MASP-2抗體OMS646經測定強烈接合重組MASP-2 (Kd 60-250pM)，與C1s、C1r或MASP-1相比具有>5000倍的選擇性(見下表20)：

表20：OMS646 MASP-2 抗體-MASP-2 相互作用的親和力和特異性，如通過固相 ELISA 研究所評價

抗原	K_D (pM)
MASP-1	>500,000
MASP-2	62±23*
MASP-3	>500,000
純化的人 C1r	>500,000
純化的人 C1s	~500,000

*平均值±SD; n=12

OMS646特異性阻斷末端補體組分的凝集素-依賴性活化

方法：

OMS646對膜攻擊複合物(MAC)沉積的作用使用對於凝集素途徑、經典途徑和替代途徑的途徑-特異性條件進行分析。對於該目的，按照製造商的說明書使用Wieslab Comp300補體篩選試劑盒(Wieslab, Lund, Sweden)。

結果：

圖53A圖示說明了在存在或不存在抗-MASP-2抗體(OMS646)的情況下在凝集素途徑-特異性測定條件下MAC沉積的水準。圖53B圖示說明了在存在或不存在抗-MASP-2抗體(OMS646)的情況下在經典途徑-特異性測定條件下

MAC沉積的水準。圖53C圖示說明了在存在或不存在抗-MASP-2抗體(OMS646)的情況下在替代途徑-特異性測定條件下MAC沉積的水準。

如圖53A中所示，OMS646阻斷MAC沉積的凝集素途徑-介導的活化，其IC_{50}值為大約1nM。然而，OMS646對自經典途徑-介導的活化(圖53B)或自替代途徑-介導的活化(圖53C)產生的MAC沉積沒有作用。

在靜脈內(IV)或皮下(SC)給予小鼠後OMS646的藥代動力學和藥效學

在小鼠的28天單劑量PK/PD研究中評價OMS646的藥代動力學(PK)和藥效學(PD)。研究測試皮下(SC)給予的5 mg/kg和15 mg/kg的OMS646的劑量水準，以及靜脈內(IV)給予的5 mg/kg OMS646的劑量水準。

關於OMS646的PK概況，圖54圖示說明了OMS646濃度(n=3只動物/組的平均值)，其為給予指定劑量的OMS646後的時間的函數。如圖54中所示，以5 mg/kg SC，給藥後大約1-2天，OMS646達到5-6 ug/mL的最大血漿濃度。以5 mg/kg SC，OMS646的生物利用度為大約60%。如圖54中進一步顯示的，以15 mg/kg SC，給藥後大約1-2天，OMS646達到10-12 ug/mL的最大血漿濃度。對於所有組，OMS646從系統迴圈中被緩慢清除，具有大約8-10天的終末半壽期。OMS646的概況對於人抗體在小鼠中是典型的。

OMS646的PD活性圖示在圖55A和55B。圖55A和55B顯示對於5mg/kg IV (圖55A)和5mg/kg SC (圖55B)組的各小

鼠的PD反應(系統性凝集素途徑活性下降)。虛線表示測定基線(最大抑制；測定之前體外加入過量OMS646的幼稚小鼠血清)。如圖55A中所示，在IV給予5mg/kg的OMS646後，系統性凝集素途徑活性立刻下降至接近不可檢測的水準，和經過28天的觀察期凝集素途徑活性顯示僅適度恢復。如圖55B中所示，在給予5mg/kg的OMS646 SC的小鼠中，觀察到凝集素途徑活性的時間-依賴性抑制。凝集素途徑活性在給予藥物24小時內下降至接近不可檢測的水準和保持在低水準至少7天。凝集素途徑活性隨時間逐漸增加，但在28天觀察期內未恢復至給藥前水準。給予15 mg/kg SC後觀察到的凝集素途徑活性vs時間曲線類似於5 mg/kg SC劑量(資料未顯示)，表明PD終點的飽和。資料還表明，IV或SC給予的每週劑量5mg/kg的OMS646足以在小鼠中實現系統性凝集素途徑活性的持續抑制。

實施例41

本實施例證實在暴露於來自非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)的患者的在疾病的急性期和緩解期獲得的血清後，MASP-2抑制性抗體(OMS646)抑制在啟動的人微血管內皮細胞(HMEC-1)的表面上aHUS血清誘導的補體C5b-9沉積。

背景/原理：進行以下研究來分析在存在或不存在OMS646 (特異性結合MASP-2並抑制凝集素途徑活化的MASP-2抗體)的情況下，在暴露於aHUS患者的在疾病的(1)急性期和(2)緩解期期間獲得的血清後，在啟動的

HMEC-1細胞的表面上aHUS血清誘導的補體C5b-9沉積。

方法：

患者：選擇在疾病的急性期期間和緩解期間研究的四名aHUS患者，用於本研究，他們包括在International Registry of HUS/TTP和通過Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases of the Mario Negri Institute進行基因分型。一名aHUS患者具有雜合性p.R1210C補體因數H (CFH)突變和一名具有抗-CFH自身抗體，在其它兩名aHUS患者中未發現CFH的突變或抗體。

表21和22概述了在本研究中分析的這四名aHUS患者中篩選補體基因突變和抗-CFH自身抗體的結果，以及在急性期或緩解期測量的臨床和生物化學資料。

表21：本研究中的四名aHUS患者的臨床參數

病例號	突變或抗-CFH Ab	疾病期	血小板 (150-400* 10^3/μl)	LDH (266-500 IU/l)	血紅蛋白 (14-18g/dl)	s-肌酐 (0.55-1.25 mg/dl)
#1	無突變，無抗-CFH Ab	急性	31,000	1396	12.9	2.37
		緩解	267,000	n.a.	11.5	3.76
#2	*CFH*-R1210C	急性	46,000	1962	7	5.7
		緩解	268,000	440	13.4	7.24
#3	抗-CFH Ab	急性	40,000	3362	9.5	1.77
		緩解	271,000	338	8.8	0.84
#4	無突變，無抗-CFH Ab	急性	83,000	1219	7.8	6.8
		緩解	222,000	495	12.2	13

注釋：n.a.= 不可獲得

表22：本研究中的四名aHUS患者的補體參數

病歷號	突變或抗-CFH Ab	疾病期	血清C3 (83-180 mg/dl)	血漿SC5b-9 (127-400 ng/ml)
#1	無突變，無抗-CFH Ab	急性	51	69
		緩解	n.a.	117
#2	*CFH*-R1210C	急性	79	421
		緩解	119	233
#3	抗-CFH Ab	急性	58	653
		緩解	149	591
#4	無突變，無抗-CFH Ab	急性	108	n.a.
		緩解	n.a.	n.a.

實驗方法：將來自真皮來源的人微血管內皮細胞系(HMEC-1)的細胞平鋪到載玻片上和當匯合時使用。匯合的HMEC-1細胞用10 μM ADP (腺苷二磷酸)活化10分鐘，然後用來自上文在表23和24中描述的四名aHUS患者的在疾病的急性期採集的或來自同一aHUS患者在緩解期採集的或來自四名健康對照受試者的血清孵育4小時。在存在或不存在按上文實施例40中所述產生的MASP-2抑制性抗體OMS646 (100 μg/mL)的情況下，或在存在可溶性補體受體1 (sCR1) (150 μg/mL)作為補體抑制的陽性對照的情況下，用測試培養基(含0.5% BSA的HBSS)將血清按1:2稀釋。在孵育步驟結束時，HMEC-1細胞用兔抗-人補體C5b-9處理，接著用FITC-綴合的第二抗體處理。在各實驗中，來自一名健康對照的血清與aHUS患者血清(急性期和緩解期)平行測試。共聚焦倒置鐳射顯微鏡用於獲得內皮細胞表面上的螢光染色。獲得15個視野/樣品，並且螢光染色佔據的面積使用軟體Image J的內置特定功能通過自動邊緣

檢測進行評價，表示為圖元^2/分析的視野。將顯示最低和最高值的視野從計算中排除。

對於統計學分析(單向ANOVA，接著是Tukey多重比較檢驗)，對於各患者和對照，使用在各實驗條件中考慮的13個視野的圖元^{2}的結果。

結果：

用來自四名aHUS患者的血清的補體沉積分析的結果概述在下表23A中，並來自四名健康受試者的血清的結果概述在下表23B中。

表23A：在ADP-活化的HMEC-1細胞中補體抑制劑對aHUS血清誘導的C5b-9沉積的作用

aHUS患者#	**aHUS急性期**			**aHUS緩解期**		
	未治療	+sCR1	+OMS646	未治療	+sCR1	+OMS646
患者#1(無突變，無抗-CFH ab)	5076 ± 562°	551 ± 80*	3312 ± 422**	4507 ± 533°	598 ± 101§	1650 ± 223§
患者#2(*CFH*-R 1210C)	5103 ± 648°	497 ± 67*	2435 ± 394*	3705 ± 570°	420 ± 65§	2151 ± 250§§§
患者#3(抗-CFH ab)	3322 ± 421°	353 ± 64*	2582 ± 479	6790 ± 901°	660 ± 83§	2077 ± 353§
患者#4(無突變，無抗-CFH ab)	4267 ± 488°	205 ± 34*	2369 ± 265**	5032 ± 594°	182 ± 29§	3290 ± 552§§

表 23B：在 ADP-活化的 HMEC-1 細胞中補體抑制劑對四名健康對照受試者(未患有 aHUS)血清的 C5b-9 沉積的作用

健康對照受試者#	未治療	+sCR1	+OMS646
對照受試者 #1 (與aHUS受試者#1平行分析)	481 ± 66	375 ± 43	213 ± 57
對照受試者#2 (與aHUS受試者#2平行分析)	651 ± 61	240 ± 33	490 ± 69
對照受試者#3 (與aHUS受試者#3平行分析)	602 ± 83	234 ± 35	717 ± 109
對照受試者#4 (與aHUS受試者#4平行分析)	370 ± 53	144 ± 20	313 ± 36

對於表 23A 和 23B：數據為平均值± SE。°P<0.001 vs 對照；*P<0.001, **P<0.01 vs 未治療的 aHUS 急性期；§P<0.001, §§P<0.01, §§§P<0.05 vs 未治療的 aHUS 緩解期。

圖 56 圖示說明了 MASP-2 抗體 (OMS646) 和 sCR1 對在 ADP-活化的 HMEC-1 細胞中 aHUS 血清誘導的 C5b-9 沉積的抑制作用。在圖 56 中，數據為平均值± SE。°P<0.0001 vs 對照；*P<0.0001 vs 未治療的 aHUS 急性期；^P<0.0001 vs aHUS 急性期 + sCR1；§P<0.0001 vs 未治療的 aHUS 緩解期和 #P<0.0001 vs aHUS 緩解期 + sCR1。

如表 23A、23B 和圖 56 中所示，ADP-刺激的 HMEC-1 細胞在靜態條件下暴露於 aHUS 患者的血清(在急性期或緩解期收集) 4 小時，顯示在細胞表面上 C5b-9 的強烈沉積，如通過共聚焦顯微鏡測定的。通過測量 C5b-9 覆蓋的面積，與在暴露於來自健康對照受試者的血清的細胞中相比，在暴露於來自 aHUS 患者的血清的細胞中觀察到顯著更高量

的C5b-9沉積，不管aHUS血清在急性期還是在緩解期收集。在急性期和緩解期之間未觀察到血清誘導的內皮C5b-9沉積的差異。

如表23A、23B和圖56中進一步顯示的，與未治療的aHUS血清相比，加入MASP-2抗體OMS646至aHUS血清(獲自急性期或緩解期的患者)導致在內皮細胞表面上的C5b-9沉積顯著降低。然而，與補體泛-抑制劑sCR1產生的作用相比，OMS646對C5b-9沉積的抑制作用較不明顯。事實上，在存在OMS646 vs. sCR1時觀察到aHUS血清誘導的C5b-9沉積的統計學顯著差異(圖56和表23A和23B)。

當計算為四名aHUS患者的平均值時，在存在補體抑制劑時觀察到的C5b-9沉積的降低的百分比(與通過來自同一患者的未治療的血清誘導的認為是100%的C5b-9沉積相比)如下：

急性期:

sCR1 (150 μg/ml)：C5b-9沉積降低91%

OMS646 (100 μg/ml)：C5b-9沉積降低40%

緩解期:

sCR1 (150 μg/ml)：C5b-9沉積降低91%

OMS646 (100 μg/ml)：C5b-9沉積降低54%

結論：本實施例中描述的結果證實補體的凝集素途徑被啟動的微血管內皮細胞刺激，該刺激是aHUS特有的放

大的補體活化反應的有效驅動器。還證實，凝集素途徑的該刺激和由此產生的放大的補體活化反應在aHUS的急性期和臨床緩解期發生。此外，該發現未顯示受限於與aHUS有關的任何特定的補體缺陷。如本實施例中進一步證實的，用MASP-2抑制性抗體例如OMS646選擇性抑制凝集素途徑減少具有各種病因的aHUS患者中的補體沉積。

實施例42

本實施例證實，在暴露於在aHUS的(1)急性期和(2)緩解期獲得的aHUS患者血清後，MASP-2抑制性抗體(OMS646)抑制在啟動的人微血管內皮細胞(HMEC-1)的表面上aHUS血清誘導的血小板聚集和血栓形成。

方法：

患者：研究了在疾病的急性期和緩解期的三名aHUS患者(患者#1、#2和#4，如實施例41的表21、22、23A和23B中所述的)(一名患者具有雜合p.R1210C CFH突變，在其它兩名患者中未發現突變或抗-CFH抗體)。對於本研究選擇患者，他們包括在International Registry of HUS/TTP中和通過Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases of the Mario Negri Institute進行基因分型。還選擇五名健康受試者作為血液供體用於灌注實驗。

方法：匯合的HMEC-1細胞用10 μM ADP啟動10分

鐘，然後用來自三名aHUS患者(患者#1、2和4，描述於實施例41)的在疾病的急性期收集的或來自相同患者的在緩解期收集的血清或用來自健康受試者的對照血清，孵育三小時。在存在或不存在按實施例40所述產生的MASP-2抑制性抗體OMS646 (100 μg/mL)的情況下，血清用試驗培養基(含0.5% BSA的HBSS)按1:2稀釋；或用sCR1 (150 μg/mL)作為補體抑制的陽性對照。對於患者#1和#2，另外的孔用包含100 μg/mL的無關同種型對照抗體的試驗培養基或用20 μg/mL的OMS646按1:2稀釋的血清(來自急性期和緩解期)孵育(對於後者，病例#1僅測試緩解期和病例#2測試急性期和緩解期兩者)。

在孵育步驟結束時，將HMEC-1細胞與獲自健康受試者的肝素化全血(10 UI/mL) (包含標記血小板的螢光染料米帕林)以微循環中遇到的剪應力(60達因/cm^2，三分鐘)灌注到流動室。在三分鐘灌注後，將內皮-細胞單層在丙酮中固定。通過共聚焦倒置鐳射顯微鏡獲得內皮細胞表面上的每個血小板血栓樣品15個圖像，並且血栓佔據的面積使用Image J軟體評價。將顯示最低和最高值的視野從計算中排除。

對於統計學分析(單向ANOVA，接著Tukey多重比較檢驗)，對於各患者和對照，使用在各實驗條件中考慮的13個視野的圖元^{2}的結果。

結果：

用來自三名aHUS患者的血清的血栓形成實驗的結果概述在下表24A中，和用來自五名健康受試者的血清的結果概述在下表24B中。

表24A：在ADP-啟動的HMEC-1細胞中補體抑制劑對aHUS血清誘導的血栓形成的作用(圖元 ^{2}±SE)

實驗條件	**疾病期**	**aHUS病例#1** 血栓形成 (圖元^2±SE) (無突變，無抗-CFH ab)	**aHUS病例#2** 血栓形成 (圖元^2±SE) (*CFH*-R1210C)	**aHUS病例#4** 血栓形成 (圖元^2±SE) (無突變，無抗-CFH ab)
未治療	急性	5499 ± 600	22320 ± 1273°	10291 ± 1362°
	緩解	6468 ± 1012°	3387 ± 443°	17676 ± 1106°
+sCR1 (150 µg/mL)	急性	4311 ± 676	5539 ± 578*	5336 ± 1214***
	緩解	573 ± 316§	977 ± 102§	2544 ± 498§
+OMS646 (20 µg/mL)	急性	未測定	6974 ± 556*	未測定
	緩解	832 ± 150§	1224 ± 252§	未測定
+OMS646 (100 µg/mL)	急性	3705 ± 777	9913 ± 984*	2836 ±509*
	緩解	3321 ± 945§§§	733 ± 102§	1700 ± 321§
+無關的同種型對照抗體(100 µg/mL)	急性	5995 ± 725	18655 ± 1699	未測定
	緩解	10885 ± 1380	2711 ± 371	未測定

表 24B：在血栓形成(圖元 ^{2}±SE)測定法中在 ADP-啟動的 HMEC-1 細胞中，補體抑制劑對來自五名健康對照受試者(未患有 aHUS)的血清的作用

實驗條件	**對照#1** 血栓形成 (圖元^2±SE)	**對照#2** 血栓形成 (圖元^2±SE)	**對照#3** 血栓形成 (圖元^2±SE)	**對照#4** 血栓形成 (圖元^2±SE)	**對照#5** 血栓形成 (圖元^2±SE)
未治療	2880±510	1046 ± 172	1144 ± 193	735 ± 124	2811 ± 609
+sCR1 (150 μg/mL)	5192 ± 637	1527 ± 153	1198 ± 138	2239 ± 243	2384 ± 410
+OMS646 (100 μg/mL)	7637 ± 888	1036 ± 175	731 ± 203	2000 ± 356	7177 ± 1477
無關的同種型對照抗體 (100 μg/mL	6325 ± 697	1024 ± 235	399 ± 82	45269	未測定
與來自aHUS受試者的血清平行分析	#1 (急性期血清)	#1 (緩解期血清)	#2 (急性期血清)	#2 (緩解期血清)	#5 (急性和緩解期血清)

對於表 24A 和 24B：數據為平均值± SE。°P<0.001 vs 對照；*P<0.001, ***P<0.05 vs 未治療的 aHUS 急性期；§P<0.001, §§§P<0.05 vs 未治療的 aHUS 緩解期。

圖 57 圖示說明了 MASP-2 抗體 (OMS646) 和 sCR1 對在 ADP-啟動的 HMEC-1 細胞中 aHUS 血清誘導的血栓形成的作

用。在圖57中，顯示的資料為平均值± SE。°P<0.0001, °°P<0.01 vs對照；*P<0.0001, **P<0.01 vs未治療的aHUS急性期；§P<0.0001 vs未治療的aHUS緩解期。

如表24A和圖57中所示，與暴露於來自健康對照受試者的血清的細胞相比，在用急性期或緩解期收集的aHUS血清治療的HMEC-1細胞中觀察到血栓覆蓋的面積的顯著增加(表24B和圖57)。如圖57和表24A中所示，OMS646(100 μg/ml和20 μg/ml)顯示在預先暴露於取自急性期的aHUS血清的細胞中血栓形成的部分抑制。在兩個不同劑量的OMS646之間抗-血栓形成作用是相當的，並且與sCR1的作用沒有不同(圖57和表24A)。加入無關的同種型對照抗體對aHUS-血清誘導的血栓形成沒有抑制作用。

如圖57和表24A中進一步顯示的，對取自緩解期的aHUS血清，OMS646的抑制作用甚至更加明顯。事實上，將100 μg/ml和20 μg/ml劑量的OMS646加入取自緩解期的aHUS患者血清，導致幾乎完全抑制血栓形成，這類似於加入sCR1所觀察到的。無關的同種型對照抗體未顯示顯著的抑制作用。

當計算為三名aHUS患者的平均值時，對於補體抑制劑記錄的血栓沉積覆蓋的HMEC-1表面的減少百分比(與通過來自相同患者的未治療的血清誘導的血栓面積相比，其作為100%)如下：

急性期:

sCR1 (150 μg/ml)：降低60%

OMS646 (100 μg/ml)：降低57%

OMS646 (20 μg/ml)：降低45%

緩解期:

sCR1 (150 μg/ml)：降低85%

OMS646 (100 μg/ml)：降低79%

OMS646 (20 μg/ml)：降低89%

結果討論：

本實施例的結果證實MASP-2抑制性抗體例如OMS646(按實施例40所述產生)，對在HMEC-1細胞中aHUS血清-誘導的血栓形成具有強抑制作用。令人驚訝的是，OMS646對血栓形成的抑制作用大於其對在HMEC-1中誘導的C5b-9沉積的作用(如實施例41所述)。還令人驚訝的是，將100 μg/ml和20 μg/ml劑量的OMS646加入取自緩解期的aHUS患者血清導致幾乎完全抑制血栓形成。另一令人驚訝的發現是，觀察到在急性期和緩解期，OMS646與陽性對照sCR1一樣有效，sCR1是補體系統的廣泛和幾乎完全抑制劑(Weisman H.等，*Science* 249:146-151, 1990; Lazar H.等，*Circulation* 100:1438-1442, 1999)。

注意，來自健康受試者的對照血清也在HMEC-1細胞中誘導適度的血栓形成。對對照血清誘導的血栓形成，我們未觀察到與OMS646或sCR1一致的抑制作用。儘管不希

望受任何特定理論的束縛，但認為對照誘導的血栓不依賴於補體，如通過在用對照血清孵育的HMEC-1中觀察到的極低的C5b-9沉積所支持的(參見實施例41)。

結論：

總之，MASP-2抑制性抗體例如OMS646的觀察的抗-血栓性作用基本上顯示大於基於在本實驗系統中觀察到的OMS646對C5b-9沉積的抑制作用所預期的(如描述於實施例a41和顯示於圖56)。例如，如描述於Gastoldi等，Immunobiology 217:1129-1222 Abstract 48 (2012)，標題為“C5a/C5aR interaction mediates complement activation and thrombosis on endothelial cells in atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS)”，確定加入抑制C5b-9沉積(減少60%)的C5抗體限制在HMEC-1中的血栓形成至相當的程度(減少60%)。相比之下，MASP-2抑制性抗體(OMS646，100 μg/mL)抑制C5b-9沉積(平均值：急性期=減少40%；緩解期=減少54%)；和以顯著更高的百分比抑制血栓形成(急性期=減少57%；緩解期=減少79%)。比較而言，OMS646以比陽性對照補體抑制劑(sCR1，150 μg/mL，C5b-9沉積的急性期抑制=減少91%；緩解期=減少91%)更低的百分比抑制補體沉積，但在抑制血栓形成中與sCR1陽性對照同等有效(sCR1，150 μg/mL，急性期=減少60%；緩解期=減少85%)。這些結果證實，MASP-2抑制性抗體(例如，OMS646)令人驚訝地在獲自急性期和緩解期的aHUS受試

者的血清中有效抑制血栓形成。

根據前述內容，在一個實施方案中，本發明提供在患有或有風險發生血栓性微血管病(TMA)的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一個實施方案中，TMA選自溶血性尿毒綜合征(HUS)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)和非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)。在一個實施方案中，TMA是aHUS。在一個實施方案中，在疾病的急性期將組合物給予aHUS患者。在一個實施方案中，在緩解期將組合物給予aHUS患者(即，在已從急性期aHUS的發作中恢復或部分恢復的受試者中，這樣的減輕例如通過血小板計數增加和/或血清LDH濃度降低證明，例如描述於Loirat C等，*Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:60, 2011中，其通過引用結合到本文中)。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體結合人MASP-2，KD為10 nM或更小；所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元；所述抗體在體外測定法中在1%人血清中抑制C3b沉積，IC50為10 nM或更小；所述抗體在90%人血清中抑制C3b沉積，IC50為30 nM或更小，其中抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗體片段，其中抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包括S228P突變，和/或其中抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實

施方案中，抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制替代途徑。在一個實施方案中，抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑或替代途徑(即，抑制凝集素途徑同時保留經典和替代補體途徑完整)。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體在來自患有TMA例如aHUS (急性或緩解期)的受試者的血清中抑制血栓形成至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體在來自患有aHUS的受試者的血清中以超過對血清中C5b-9沉積的抑制作用至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水準抑制血栓形成。

在一個實施方案中，與未處理的血清相比，MASP-2抑制性抗體在來自緩解期的aHUS患者的血清中抑制血栓形成至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。在一些實施方案中，MASP-2抑制性抗體在緩解期的aHUS患者的血清中以超過對血清中C5b-9沉積的抑制作用至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水準抑制血栓形成。

在一個實施方案中，通過靜脈內導管或其它導管遞送方法將MASP-2抑制性抗體給予所述受試者。

在一個實施方案中，本發明提供在患有TMA的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，包括(I)(a)重鏈可變區，包含：i)包括SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii)包括SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii)包括SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b)輕鏈可變區，包含：i)包括SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii)包括SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii)包括SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3；或(II)其變體，包括與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

在一個實施方案中，TMA選自非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)(急性或緩解期)、HUS和TTP。在一個實施方案中，所述受試者處於aHUS的急性期。在一個實施方案中，所述受試者處於aHUS的緩解期。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，包括

包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，包括包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體OMS646識別的人MASP-2上的表位的至少一部分，所述參考抗體包括SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。結合成員之間的競爭可容易地體外測定，例如使用ELISA和/或通過標記特定的報告分子至一個結合成員，其可在存在其它未標記的結合成員的情況下檢出，以能夠鑒定結合相同表位或重疊表位的特定結合成員。因此，本發明提供包含人抗體抗原-結合位點的特異性抗體或其抗原結合片段，其與參考抗體OMS646競爭結合人MASP-2。

實施例43

本實施例證實人MASP-2抑制性抗體(OMS646)能夠在真皮來源的原代人微血管內皮細胞(MVEC)中抑制TMA患者血漿-介導的細胞凋亡誘導。

背景/原理：

TMA的病理生理學已知涉及由各種因素誘導的內皮細胞損傷，之後是由血小板栓和/或纖維蛋白血栓導致的小

血管(例如，小動脈和毛細血管)阻塞(Hirt-Minkowsk P.等，*Nephron Clin Pract* 114:c219-c235, 2010; Goldberg R. J.等，*Am J Kidney Dis* 56(6):1168-1174, 2010)。已經顯示當體外暴露於來自TMA-相關病症的患者的血漿時，MVEC經過細胞凋亡損傷(參見Stefanescu等，*Blood* Vol 112 (2):340-349, 2008; Mitra D.等，*Blood* 89:1224-1234, 1997)。與TMA有關的細胞凋亡損傷在獲自這樣的患者的組織活檢(皮膚、骨、骨髓、脾、腎、回腸)的MVEC中證明。還顯示對MVEC的細胞凋亡損傷降低MVEC的膜-結合補體調節蛋白的水準(參見例如，Mold & Morris, *Immunology* 102:359-364, 2001; Christmas等，*Immunology* 119:522, 2006)。

包括末端補體組分的正回饋環被認為參與TMA的病理生理學，包括非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)和與災難性抗磷脂綜合征(CAPS)、德戈斯病有關的TMA以及癌症、癌症化學療法、自身免疫和移植繼發性TMA，這些病況的每一種都是已知的，或被認為對用mAb艾庫組單抗的抗-C5療法應答(Chapin J.等，*Brit. J. Hematol* 157:772-774, 2012; Tsai等，*Br J Haematol* 162(4):558-559, 2013); Magro C. M.等，*Journal of Rare Diseases* 8:185, 2013)。

進行以下實驗以分析在獲自患有aHUS、ADAMTS13缺乏-相關的血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、CAPS和系統性德戈斯病以及癌症、移植、自身免疫疾病和化學療法繼發性TMA的患者的血漿樣品中，人MASP-2抑制性抗體(OMS646)阻斷在原代人真皮MVEC中TMA患者血漿-介導

的細胞凋亡誘導的能力。

方法：

進行體外測定法以分析MASP-2抑制性抗體(OMS646)阻斷在真皮來源的原代人MVEC中TMA患者血漿-介導的細胞凋亡誘導的功效，如Stefanescu R.等，*Blood* Vol 112 (2):340-349, 2008中所述，其通過引用結合到本文中。用於本測定法的血漿樣品獲自一批健康對照受試者和獲自具有急性期或恢復期血栓性微血管病的個體。在TMA患者中微血管病的存在通過在外周血塗片上檢測裂紅細胞來評價。另外，TTP按Stefanescu R.等，*Blood* Vol 112 (2):340-349, 2008中所述診斷。

內皮細胞(EC)培養

如Stefanescu等所述，真皮來源的原代人MVEC購自ScienCell Research Labs (San Diego, CA)。MVEC表達CD34直至第5和6代(*Blood* 89:1224-1234, 1997)。在用含0.1%明膠的水包被的聚苯乙烯瓶中，將MVEC維持在包含內皮細胞生長添加劑、青黴素、鏈黴素和15%胎牛血清的ECM1001培養基(ScienCell Research Labs)中。所有MVEC在第2-6代使用。次代培養包括5-10分鐘暴露於0.25%胰蛋白酶-EDTA。

細胞凋亡測定法

已知對TTP/HUS血漿誘導的細胞凋亡易感的代表性的真皮來源的原代人MVEC用磷酸緩衝鹽水(PBS)洗滌和以0.15x10^6個活細胞/mL鋪板在用含0.1%明膠的水包被的12-孔板的各室中。將鋪板的MVEC細胞在完全培養基中饑餓24小時，然後在存在或不存在MASP-2 mAb OMS646 (150 μg/mL)的情況下暴露於各種濃度(2%-20% v/v)的TMA患者血漿樣品或健康供體血漿18小時，然後通過胰蛋白酶消化收穫細胞。各TMA患者樣品一式兩份分析。血漿-介導的細胞凋亡程度使用碘化丙啶(PI)染色評價，在細胞螢光圖中分析>5 x10^3個細胞和A0峰通過電腦軟體確定(MCycle Av, Phoenix Flow Systems, San Diego, CA)。還根據製造商的說明書(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)，進行基於酶聯免疫吸附測定法(ELISA)的來自細胞裂解物的胞質組蛋白相關DNA片段的定量測定。

結果：

在存在MASP-2 mAb (OMS646)的情況下，TMA患者血漿誘導的MVEC細胞凋亡測定法的結果顯示在下表25中。

表 25：在存在 MASP-2 mAb (OMS646)的情況下在真皮來源的原代人 MVEC 中測試的 TMA 患者血漿

受試者 #	年齡/性別	臨床診斷(TMA)和其它病況	MASP-2 ng/ml	基於 Cre/LDH的診斷	C5a	sC5-b9	ADAMS 活性	基於 ADAMS活性的診斷	用 OMS646 保護
#2	41/f	TTP	174	TTP	34.42	772	30%	aHUS	應答者
#3	52/f	TTP	150	TTP	48.32	1399	70%	aHUS	非應答者
#4	20/m	TTP	224	TTP	36.9	1187	<10%	TTP	應答者
#10	60/f	TTP	175.4	TTP	49.5	4406	64%	aHUS	非應答者
#11	59/f	TTP	144.9	TTP	40.3	1352	<10%	TTP	非應答者
#13	49/f	HUS, 癌症, TTP	142.8	TTP	48.6	3843	86%	aHUS	非應答者
#42	27/m	TTP	341.5	TTP	100.0	5332	<5%	TTP	非應答者
#46	25/f	TTP, 德戈斯病, SLE	225.11	TTP	53.9	3426	ND	ND	應答者
#48	53/f	TTP, SLE, 腎炎 s/p 腎移植	788.5	aHUS	31.2	1066	66%	aHUS	應答者
#49	64/f	TTP, APLAs, CVA	494.5		35.4	2100	ND	ND	應答者
#51	25/f	aHUS, APLAs	313.1	TTP	26.8	1595	23%	aHUS	應答者
#52	56/f	aHUS, SLE	333.1	TTP	18.9	1103	97%	aHUS	非應答者
#53	56/f	aHUS 緩解	189.9	緩解 TTP	28.69	344	74%	aHUS	非應答者

用於表 25 的縮寫：

“APLAs” = 與災難性抗磷脂綜合征(CAPS)有關的抗磷脂抗體

“SLE” = 系統性紅斑狼瘡

“CVA” = 腦血管意外(中風)

與 Stefanescu R.等，*Blood* Vol 112 (2):340-349, 2008 中報告的結果一致，在存在13份TMA患者血漿樣品的情況

下在缺少MASP-2抗體時，對於真皮來源的原代MVEC觀察到顯著的細胞凋亡。將來自健康人受試者的對照血漿樣品平行運行，在MVEC中未誘導細胞凋亡(資料未顯示)。如表25中所示，在13份測試的患者血漿樣品的6份中(46%)，MASP-2抑制性mAb (OMS646)在原代MVEC中抑制TMA患者血漿-介導的細胞凋亡誘導(表25中的“應答者”)。具體而言，應注意MASP-2抑制性mAb (OMS646)在獲自患有aHUS、TTP、德戈斯病、SLE、移植和APLA (CAPS)的患者的血漿中抑制細胞凋亡。關於在該測定法中測試的其中MASP-2 mAb未阻斷細胞凋亡的7份患者樣品(表25中的“非應答者”)，應注意細胞凋亡可通過數個途徑誘導，並非所有的途徑是補體依賴性的。例如，如在Stefanescu R.等，*Blood* Vol 112 (2):340-349, 2008中所述的，在EC測定法中細胞凋亡依賴於基礎EC活化狀態，其受血漿因數的影響，所述因數可在測定誘導細胞凋亡所需的損傷的水準中起作用。如在Stefanescu R.等中進一步描述的，能夠調節細胞凋亡的其它因數可能存在於TMA患者血漿中，例如細胞因數和補體系統的各種組分。因此，因為這些複雜的因素，並非出人意料的是，MASP-2抗體未在顯示TMA-血漿誘導的細胞凋亡的所有血漿樣品中都顯示阻斷作用。

此外在這一點上，應注意使用TMA-血漿誘導的細胞凋亡測定法用抗-C5抗體艾庫組單抗進行了類似分析，並觀察到非常類似的結果(參見Chapin等，*Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts): Abstract #3342, 120: 2012)。艾

庫組單抗(一種高度成功的市售產品)的臨床功效顯示大於在該模型中證實的功效，表明該體外模型可能低估了補體抑制性藥物的臨床潛力。

這些結果證實，MASP-2抑制性抗體例如OMS646在獲自患有TMA例如aHUS、TTP、德戈斯病、SLE、移植和APLA (CAPS)的患者的血漿中有效抑制TMA-血漿-誘導的細胞凋亡。已知內皮損傷和細胞凋亡在TMA例如特發性TTP和散發性HUS的病理中起關鍵作用(Kim等，*Microvascular Research* vol 62(2):83-93, 2001)。如Dang等所述，在TTP患者而不是在健康對照受試者的脾紅髓中顯示細胞凋亡(Dang等，Blood 93(4):1264-1270, 1999)。在HUS患者的MVEC來源的腎腎小球細胞中觀察到細胞凋亡的證據(Arends M. J.等，*Hum Pathol* 20:89, 1989)。因此，預期給予MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體(例如，OMS646)將是患有TMA例如aHUS、TTP或其它微血管病性病症(例如其它TMA，包括CAPS、系統性德戈斯病和癌症繼發性TMA、化學療法繼發性TMA或移植繼發性TMA)的患者的有效療法。

根據前述內容，在一個實施方案中，本發明提供在患有或有風險發生血栓性微血管病(TMA)的受試者中抑制內皮細胞損傷和/或內皮細胞凋亡和/或血栓形成的方法，包括給予受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一個實施方案中，TMA選自非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)、血栓性血小板

減少性紫癜(TTP)和溶血性尿毒綜合征(HUS)。在一個實施方案中，TMA是aHUS。在一個實施方案中，在疾病的急性期將組合物給予aHUS患者。在一個實施方案中，在緩解期將組合物給予aHUS患者(即，在已從急性期aHUS發作中恢復或部分恢復的受試者中，這樣的緩解通過例如，血小板計數增加和/或血清LDH濃度降低來證明，例如描述於Loirat C等，*Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:60, 2011，其通過引用結合到本文中)。

在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生TMA，其為(i) 癌症繼發性TMA；(ii) 化學療法繼發性TMA；或(iii) 移植繼發性TMA (例如，器官移植，例如腎移植或同種異體造血幹細胞移植)。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生Upshaw-Schulman綜合征(USS)。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生德戈斯病。在一個實施方案中，所述受試者患有或有風險發生災難性抗磷脂綜合征(CAPS)。

根據任何本文公開的實施方案，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體結合人MASP-2，KD為10 nM或更小；所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元；在體外測定法中在1%人血清中所述抗體抑制C3b沉積，IC50為10 nM或更小；在90%人血清中所述抗體抑制C3b沉積，IC50為30 nM或更小，其中抗體是選自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗體片段，其中抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是

IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包括S228P突變，和/或其中抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制替代途徑。在一個實施方案中，抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑(即，抑制凝集素途徑同時保留經典補體途徑完整)。

在一個實施方案中，在來自患有TMA例如aHUS (急性或緩解期)、溶血性尿毒綜合征(HUS)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、癌症繼發性TMA、化學療法繼發性TMA、移植(例如，器官移植，例如腎移植或同種異體造血幹細胞移植)繼發性TMA的受試者的血清中，或在來自患有Upshaw-Schulman綜合征(USS)的受試者的血清中，或在來自患有德戈斯病的受試者的血清中，或在患有災難性抗磷脂綜合征(CAPS)的受試者中，MASP-2抑制性抗體抑制血漿誘導的MVEC細胞凋亡，其中與未處理的血清相比，血漿誘導的MVEC細胞凋亡被抑制至少5%、例如至少10%、例如至少20%、例如至少30%、例如至少40%、例如至少50%、例如至少60%、例如至少70%、例如至少80%、例如至少85%、例如至少90%、例如至少95%直至99%。在一些實施方案中，在來自患有TMA (例如aHUS (急性或緩解期)、溶血性尿毒綜合征(HUS)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、癌症繼發性TMA、化學療法繼發性TMA、移植(例如，器官移植，例如腎移植或同種異體造血幹細胞移植)繼發性TMA的受試者的血清中，或在來自患有Upshaw-

Schulman綜合征(USS)的受試者的血清中，或在來自患有德戈斯病的受試者的血清中，或在患有災難性抗磷脂綜合征(CAPS)的受試者中，MASP-2抑制性抗體以超過對血清中C5b-9沉積的抑制作用至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水準抑制血栓形成。

在一個實施方案中，通過靜脈內導管或其它導管遞送方法將MASP-2抑制性抗體給予所述受試者。

在一個實施方案中，本發明提供在患有TMA (例如aHUS (急性或緩解期)、溶血性尿毒綜合征(HUS)、血栓性血小板減少性紫癜(TTP)、癌症繼發性TMA、化學療法繼發性TMA、移植(例如，器官移植，例如腎移植或同種異體造血幹細胞移植)繼發性TMA的受試者中，或在來自患有Upshaw-Schulman綜合征(USS)的受試者的血清中，或在來自患有德戈斯病的受試者的血清中，或在患有災難性抗磷脂綜合征(CAPS)的受試者中抑制血栓形成的方法，包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，包括(I) (a) 重鏈可變區，包含：i) 包括SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包括SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包括SEQ ID NO:67的95-102的胺基酸序列的重鏈CDR-H3；和b) 輕鏈可變區，包含：i) 包括SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包括SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包括SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3；

或(II) 其變體，包括與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的輕鏈可變區。

在一個實施方案中，所述受試者患有TMA，選自癌症繼發性TMA、化學療法繼發性TMA、移植(例如，器官移植，例如腎移植或同種異體造血幹細胞移植)繼發性TMA、Upshaw-Schulman綜合征(USS)、德戈斯病和災難性抗磷脂綜合征(CAPS)。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，包括包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區。在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，包括包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，方法包括給予受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性地識別由參考抗體OMS646識別的人MASP-2上的表位的至少一部分，所述參考抗體包括SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

實施例44

本實施例描述了在具有血栓性微血管病(TMA)的成人中評價全人單克隆MASP-2抑制性抗體的安全性和臨床功效的正進行的2期臨床試驗的初始結果。

背景：TMA是一類罕見的、虛弱性和威脅生命的病症，特徵為在身體器官(最常見是腎和腦)的微循環中的過多血栓(凝塊)(血小板的聚集)。

方法：

開放標籤的2期臨床試驗的第一階段在具有原發性非典型溶血性尿毒綜合征(aHUS)、血漿療法抵抗性aHUS和血栓性血小板減少性紫癜(TTP)的受試者中進行。鑒於該疾病的威脅生命性質，該2期臨床試驗沒有安慰劑組。

在篩選時受試者年齡≥18歲，和僅在他們具有以下TMA之一的診斷時包括在該研究中：

1) 原發性aHUS，其經臨床診斷和在血漿中具有ADAMTS13活性>10%。有或沒有證明的補體突變或抗-CFH抗體的患者均符合條件。患者根據他們對血漿療法(血漿交換或血漿輸注)的反應分類：

血漿療法抵抗性aHUS患者，為本研究的目的，滿足所有以下條件：

(a) 儘管在篩選之前至少四次血漿療法治療，但篩選血小板計數<150,000/μL；

(b) 微血管病性血細胞溶解的證據(存在裂紅細胞，血清乳酸脫氫酶(LDH) >正常值上限(ULN)，結合珠蛋白< LLN)；和

(c) 血清肌酸酐> ULN。

慢性血漿療法-反應性aHUS患者(血漿療法-敏感性)必須需要在第一劑OMS646之前至少每週一次的血漿療法，持續四周，以及血清肌酸酐> ULN。

2) TTP，定義為具有所有以下條件：

血小板計數<150,000/μL；

微血管病性血細胞溶解的證據(存在裂紅細胞，血清LDH>ULN，或結合珠蛋白<LLN)；和

在TTP的當前發作期間或在歷史上ADAMTS13活性≤10%。

注意：如果在篩選前3個月內具有艾庫組單抗療法，則受試者從研究中排除。患者確定為血漿療法抵抗性的標準是為在本研究中確定資格的目的。在本發明的其它方面，待用MASP-2抑制劑治療的血漿療法抵抗性患者之前用血漿療法治療至少一次，和在這樣的血漿療法治療後仍具有通過這樣的血漿療法治療未充分減少或消除的一種或多種aHUS臨床標記。

本研究中使用的單克隆抗體OMS646是針對人MASP-2的全人IgG4 mAb。如實施例40所證實的，OMS646緊密結合重組MASP-2 (100 pM範圍的表觀平衡解離常數)和顯示同源蛋白C1s、C1r和MASP-1的大於5,000倍選擇性。在功

能測定中，OMS646以納摩爾效力(大約3 nM的濃度，導致50%抑制[IC_{50}])抑制人凝集素途徑，但對經典途徑沒有顯著影響。通過靜脈內(IV)或皮下(SC)注射給予小鼠、非人靈長類和人的OMS646導致高的血漿濃度，其在離體試驗中與凝集素途徑活化的抑制有關。如實施例42進一步描述的，OMS646治療在TMA的體外模型中減少C5b-9沉積和血栓形成，和在TMA的小鼠模型中減少血栓形成，因此證實了OMS646具有治療功用。

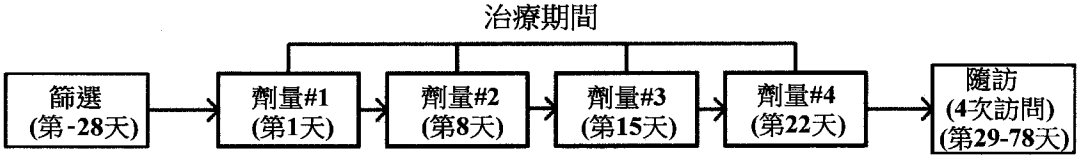
在本研究中，OMS646藥物以濃度100 mg/mL提供，其被進一步稀釋用於IV給予。使用注射器將合適計算體積的OMS646 100 mg/mL注射溶液從小瓶抽出，用於劑量製備。在製備的四小時內施用輸注袋。

在研究的階段1中，OMS646被給予至劑量遞增組(3個受試者/組)。階段1的每個受試者接受四次每週一次劑量的OMS646，如下表26所示。

表26：階段1的給藥方案

階段, 組	受試者數量	OMS646 劑量(mg/kg)
1, 組1	3	0.675, 每週一次 x 4
1, 組2	3	2.0, 每週一次 x 4
1, 組3	3	4.0, 每週一次 x 4

階段1研究設計示意圖



稀釋的研究藥物在30分鐘內經靜脈內輸注。

主要終點

共-主要終點是：

- 通過AE、生命體征、ECG和臨床實驗室檢驗評價的安全性
- 通過血小板計數變化評價的臨床活性

次要終點

次要終點是：

- TMA臨床活性
  - 血清LDH
  - 血清結合珠蛋白
  - 血紅蛋白
  - 血清肌酸酐
  - TMA-相關症狀
  - 需要血漿療法(血漿交換或血漿輸注)
  - 需要透析

允許的共存療法

- 血漿療法抵抗性aHUS–在OMS646治療期間血漿療法是允許的，如果研究者認為它在醫學上是有必要的話。
- 慢性血漿療法反應性aHUS–研究者被提議，血漿療法應該繼續，直到存在TMA改善的跡象，例如，血小板計數增加，LDH降低，結合珠蛋白增加，血紅蛋白增加，肌

酸酐降低，此時研究者被提議考慮不給於血漿療法和監測TMA參數以評價血漿療法是否可以停止。

- TTP–血漿療法是允許的，如果研究者認為它在醫學上是有必要的話。
- 研究者被提議，腎透析療法應該根據護理標準進行管理。
- 在研究期間不給予艾庫組單抗。

結果：

第一組受試者由三個用最低劑量的OMS646治療的aHUS患者組成。在該研究組的所有患者中觀察到TMA疾病標記的改進。血小板計數、血清乳酸脫氫酶(LDH)和血清結合珠蛋白作為疾病活動的標記進行測量。當與基線水準比較時，血小板計數在所有患者中改進。血清LDH水準在一個患者中保持正常，在另一個中顯著降低至接近正常範圍和在第三個中保持升高。結合珠蛋白在兩個患者中改進，在一個中正常化。在一個具有獨立腎功能的患者中肌酸酐水準也得到改進。

按設計的，三個患者在該臨床試驗的第二個中等劑量組中治療。兩個患者具有血漿療法抵抗性aHUS和一個患者具有血栓性血小板減少性紫癜(TTP)。具有aHUS的兩個患者在研究招募之前和之時進行腎透析。在第二個或中等劑量組中，具有血漿療法抵抗性aHUS的兩個患者證實：

- 平均血小板計數增加47%，導致兩個患者具有正常

範圍的計數

- 平均裂紅細胞計數降低86%，其中裂紅細胞在一個患者中消失
- 平均結合珠蛋白增加71%，其中兩個患者在治療期間達到正常範圍，一個患者在最後劑量後一周略微下滑至低於正常值
- 平均LDH水準降低5%，其中在兩個患者中水準保持略微升高至高於正常範圍。

具有TTP的中等劑量組患者在進入研究之前需要重複血漿輸注療法。實驗室參數未顯示一致的改進，但該患者在用OMS646治療時不需要血漿療法，從完成治療至今也不需要血漿療法。

在整個治療期間，該藥物被所有患者良好耐受。基於來自第二個或中等劑量組的正面資料，第三個或高劑量組開始，和aHUS患者已完成了研究治療過程。所有患者參考的資料包括至最後劑量後一周的測量。

第三個(高劑量)組中的第一個患者(血漿療法抵抗性aHUS患者，具有另外的併發症，包括丙型肝炎、冷球蛋白血症和淋巴瘤)也已完成用OMS646治療。在OMS646治療之前，該患者需要重複透析。在整個治療中和在完成OMS646療程後至今，該患者已保持不進行透析。血液學和腎參數顯示：

- 血小板計數改進63%，回到正常水準
- 裂紅細胞降低100%

- 結合珠蛋白從不可檢測的水準增加和正常化
- LDH降低43%，導致剛剛略微高於正常值的水準
- 肌酸酐水準降低24%

如在第一個和第二個組中，該藥物被良好耐受。

在此開放標籤的2期臨床試驗中主要終點是血小板計數的變化。中等劑量和高劑量組的所有三個aHUS患者(中等劑量組中的兩個和高劑量組中的一個)的血小板計數回到正常值，具有從基線大約68,000個血小板/mL的統計學顯著的平均增加(p=0.0055)。

簡言之，到目前為止從該2期臨床試驗獲得的資料表明OMS646在具有原發性aHUS、血漿療法抵抗性aHUS的患者中和在具有TTP的患者中的功效。

根據前述內容，在一個實施方案中，本發明提供治療患有血漿療法抵抗性aHUS的受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一些實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含MASP-2抑制性抗體的組合物之前，鑒定患有血漿療法抵抗性aHUS的受試者的步驟。

根據任何本文公開的實施方案，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體以10 nM或更小的K_D結合人MASP-2，所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元，所述抗體在體外測定中在1%人血清中以10 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，所述抗體在90%人血清

中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、$F(ab)_2$和$F(ab')_2$的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中IgG4分子包含S228P突變。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑(即，抑制凝集素途徑，同時保留經典補體途徑完整)。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體以有效改進與aHUS有關的至少一個或多個臨床參數(例如血小板計數增加、LDH降低、結合珠蛋白增加、血紅蛋白增加和/或肌酸酐降低)的量給予。

在一些實施方案中，所述方法包括通過導管(例如，靜脈內)給予MASP-2抑制性抗體至患有血漿療法抵抗性aHUS的受試者，持續第一段時間(例如，至少一天至一周或兩周)，接著皮下給予MASP-2抑制性抗體至所述受試者，持續第二段時間(例如，至少兩周或更長的慢性階段)。在一些實施方案中，在第一段時間和/或第二段時間的給予在不存在血漿療法時發生。在一些實施方案中，在第一段時間和/或第二段時間的給予在存在血漿療法時發生。

在一些實施方案中，所述方法包括經靜脈內、肌內或優選地皮下，給予MASP-2抑制性抗體至患有血漿療法抵抗性aHUS的受試者。治療可以是慢性的，和每日至每月給予，但優選每兩周給予。MASP-2抑制性抗體可單獨給

予，或與C5抑制劑、例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，所述方法包括治療患有血漿療法抵抗性aHUS的受試者，包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含(I) (a) 重鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的胺基酸序列的重鏈CDR-H3，和b) 輕鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3，或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性，例如至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性識別在人MASP-2上由參考抗體OMS646識別的表位的至少一部分，參考抗體OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

實施例45

本實施例描述了在具有血栓性微血管病(TMA)的成人中評價全人單克隆MASP-2抑制性抗體的安全性和臨床功效的正進行的2期臨床試驗(如實施例44描述的)中獲得的另外的結果。

背景：如實施例44所述，TMA是一類罕見的、虛弱性和威脅生命的病症，特徵為在身體器官(最常見是腎和腦)的微循環中的過多血栓(凝塊)(血小板的聚集)。如本文所述的，移植相關的TMA (TA-TMA)是一種破壞性綜合征，其可在移植患者、例如造血幹細胞移植(HSCT)受體中發生。本實施例描述了在患有造血幹細胞移植相關的TMA的患者中評價全人單克隆MASP-2抑制性抗體的安全性和臨床功效的2期臨床試驗的初始結果。

方法：

如實施例44所述，2期TMA試驗由MASP-2抑制性抗體OMS646的三個水準的劑量範圍階段，接著固定劑量階段

組成。如實施例44進一步描述的，從aHUS患者和一個TTP患者獲得了正面結果，具有功效度量的一致和穩健改進。如在低劑量組中，在整個治療期間在中等劑量和高劑量組中OMS646被所有患者良好耐受。臨床前毒性研究已經完成，和證實了沒有安全性顧慮，允許在臨床試驗中慢性給藥。

如實施例44所述，來自OMS646 2期TMA臨床試驗的資料從aHUS和TTP患者獲得。使用實施例44描述的方法，對於高劑量組的另外的造血幹細胞移植相關TMA患者，給藥現已完成。這是具有淋巴瘤史的患者，為此他經歷了造血幹細胞移植。他的移植後過程因為許多威脅生命的病症，包括需要輸注血小板的TMA而變得複雜。儘管輸血，但他的幹細胞移植相關TMA持續，和他被招募至OMS646 2期試驗。

結果：

如實施例44所述，在四周給藥期之後(高劑量組)，具有幹細胞移植相關TMA的患者證實：

- 血小板計數4倍，導致血小板計數超過100,000；
- 結合珠蛋白水準超過2倍，並且為正常值；
- 血漿乳酸脫氫酶水準(血管內損傷的度量)降低35%，但仍高於正常值；
- 裂紅細胞計數保持在僅1個。

在整個OMS646給藥期間和從完成OMS646治療以來，

該患者不需要任何血小板輸注或血漿去除術。

簡言之，到目前為止從該2期臨床試驗獲得的資料(如實施例44和本實施例所述)顯示OMS646在具有原發性aHUS、血漿療法抵抗性aHUS、TTP的患者中和在具有造血幹細胞移植相關TMA的患者中的功效。

根據前述內容，在一個實施方案中，本發明提供治療患有與造血幹細胞移植相關的TMA的人受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一個實施方案中，所述受試者正患有與造血幹細胞移植相關的TMA，其抵抗用血小板輸注和/或血漿去除術治療。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物的步驟之前，鑒定患有與造血幹細胞移植相關的TMA的人受試者，其抵抗用血小板輸注和/或血漿去除術治療。

根據任何本文公開的實施方案，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體以10 nM或更小的K_D結合人MASP-2，所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元，所述抗體在體外測定中在1%人血清中以10 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，所述抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、$F(ab)_2$和$F(ab')_2$的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗

體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中所述IgG4分子包含S228P突變。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑(即，抑制凝集素途徑，同時保留經典補體途徑完整)。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體以的量給予有效改進與造血幹細胞移植相關TMA有關的至少一個或多個臨床參數，例如血小板計數增加(例如，治療之前的血小板計數的至少2倍、至少3倍、至少4倍)、結合珠蛋白增加和/或乳酸脫氫酶降低。

在一些實施方案中，所述方法包括通過導管(例如，靜脈內)給予MASP-2抑制性抗體至患有與造血幹細胞移植相關的TMA的受試者，持續第一段時間(例如，至少一天至一周或兩周)，接著皮下給予MASP-2抑制性抗體至所述受試者，持續第二段時間(例如，至少兩周或更長的慢性階段)。在一些實施方案中，在第一段時間和/或第二段時間的給予在不存在血漿療法時發生。在一些實施方案中，在第一段時間和/或第二段時間的給予在存在血漿療法時發生。

在一些實施方案中，所述方法包括經靜脈內、肌內或優選地皮下，給予MASP-2抑制性抗體至患有與造血幹細胞移植相關的TMA的受試者。治療可以是慢性的，和每日至每月給予，但優選每兩周給予。MASP-2抑制性抗體可單獨給予，或與C5抑制劑、例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，所述方法包括治療患有與造血幹

細胞移植相關的TMA的受試者，包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含(I) (a) 重鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的胺基酸序列的重鏈CDR-H3，和b) 輕鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3，或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性，例如至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述

抗體或其抗原結合片段特異性識別在人MASP-2上由參考抗體OMS646識別的表位的至少一部分，參考抗體OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

實施例46

本實施例描述了在實施例44和45描述的在具有血栓性微血管病(TMA)的成人中評價全人單克隆MASP-2抑制性抗體的安全性和臨床功效的正進行的2期臨床試驗中獲得的另外的結果。

背景：如實施例45所述，移植相關的TMA (TA-TMA)是一種破壞性綜合征，其可在移植患者、例如造血幹細胞移植(HSCT)受體中發生。造血幹細胞移植相關的TMA (HSCT-TMA)是一種威脅生命併發症，其由內皮損傷觸發。儘管HSCT-TMA可以為一種還涉及肺、腸、心臟和腦的多系統疾病，但腎是最通常受到影響的器官。甚至輕度TMA的發生也與長期腎損傷有關。根據各種診斷標準和調節以及移植物抗宿主病預防方案，同種異體HSCT後相關的TMA的發生在頻率方面不同，其中鈣依賴磷酸酶抑制劑是涉及的最常用的藥物(Ho VT等，*Biol Blood Marrow Transplant*, 11(8):571-5, 2005)。免疫抑制性鈣依賴磷酸酶抑制劑方案的更改可導致在減少或停止鈣依賴磷酸酶抑制劑給予的幾周內，在一些患者中TMA改善。

TMA是一種潛在威脅生命的HSCT併發症和目前主要

通過改善刺激因素包括避免免疫抑制劑(例如，鈣依賴磷酸酶抑制劑)和治療正進行的感染，以及支持措施例如血液透析來控制。儘管許多HSCT-TMA患者對減少或停止免疫抑制劑的反應良好，但一部分患者具有持續性HSCT-TMA，儘管保守治療措施(即，TMA對減少或停止免疫抑制劑無反應)。對這些保守治療措施無反應的患者具有差的預後。血漿交換未顯示功效，和沒有其它療法被批准。

實施例45描述了在患有持續性造血幹細胞移植相關的TMA (HSCT-TMA)的患者中評價全人單克隆MASP-2抑制性抗體(OMS646)的安全性和臨床功效的2期臨床試驗的初始正面結果。本實施例描述了在患有抵抗保守治療措施的持續性HSCT-TMA的三個另外的受試者中評價OMS646的安全性和臨床功效的正進行的2期臨床試驗的另外的結果。

方法：

如實施例44所述，2期TMA試驗由MASP-2抑制性抗體OMS646的三個水準的劑量範圍階段，接著固定劑量階段組成。在整個治療期間OMS646被低、中和高劑量組的所有患者良好耐受。臨床前毒性研究已完成，和證實了沒有安全性顧慮，允許在臨床試驗中慢性給藥。

2期TMA試驗包括患有抵抗保守治療措施的持續性HSCT相關的TMA的受試者，其為該研究的目的被定義為在減少或停止免疫抑制劑(例如，鈣依賴磷酸酶抑制劑治

療)後至少兩周或移植後至少30天，具有以下所有條件：

- 血小板減少(血小板計數<150,000/μL)；和
- 微血管病性溶血性貧血的證據(存在裂紅細胞，血清乳酸脫氫酶(LDH)>正常值上限(ULN)，或結合珠蛋白<正常值下限(LLN))。

對HSCT相關TMA允許的共存療法

- 在OMS646治療期間血漿療法是允許的，如果研究者認為它在醫學上是有必要的話。給予血漿療法的患者可接受額外半劑量的OMS646。
- 研究者被提議，腎透析療法應該根據護理標準進行管理。
- 在研究期間不給予艾庫組單抗。

正進行的TMA研究包括患有抵抗標準治療措施的持續性HSCT-TMA (即，減少或停止鈣依賴磷酸酶抑制劑治療後至少兩周的持續性TMA)的受試者。

如實施例45所述，對於高劑量組(一週一次IV給予4 mg/kg OMS646，持續四周)的患有持續性HSCT-TMA的患者(患者#1)，使用實施例44描述的方法完成給藥。

如下文所述的，對於患有持續性HSCT-TMA的另外4個患者，給藥現在已經完成。

患者#1 (描述於實施例44)用OMS646治療四周(4mg/kg IV，每週一次)；

患者#2和#3用OMS646治療八周(4mg/kg IV，每週一

次)；

患者#4和#5用OMS646治療(4mg/kg IV，每週一次)，分別持續兩周和三周。分別在兩周和三周後從研究中退出的患者#4和#5，對治療無反應並且惡化。注意這些患者之一在研究允許進入時具有顯著升高的肌酸酐。

結果：

具有持續性HSCT-TMA的5個患者被招募至本研究。所有受試者都是成人，和對於血液學惡性腫瘤接受HSCT。圖58、59和60提供了在用MASP-2抑制性抗體OMS646治療後TMA變數從基線的變化。這些圖提供了所有5個患者的資料，其中兩個患者在2-3周後停止研究，其中一個隨後復發和另一個接受姑息護理。如圖58、59和60所示的，最後可能的治療在第7周給予。

圖58圖示說明了在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療後，在患有持續性造血幹細胞移植相關的血栓性微血管病(HSCT-TMA)的受試者中，隨時間(周)血小板計數從基線的平均變化。

圖59圖示說明了在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療後，在患有持續性(HSCT-TMA)的受試者中隨時間(周)LDH從基線的平均變化。

圖60圖示說明了在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療後，在患有持續性(HSCT-TMA)的受試者中隨時間(周)結合珠蛋白從基線的平均變化。

如圖59和60所示，在治療期間觀察到統計學顯著的LDH和結合珠蛋白改進。如圖58所示，血小板計數改進，但在該小數量的患者中未達到統計學顯著性。在完成治療的這些患者中，一個患者未顯示肌酸酐的改進，但正接受共存的腎毒性劑。在其他兩個患者中肌酸酐改進或保持正常。在延長的隨訪中，一個患者經歷移植失敗，和正等待第二次移植。其他兩個患者保持穩定。

儘管在兩個受試者中與骨髓抑制和腎毒性有關的藥物的可能混淆的效果，但在患有持續性HSCT-TMA的三個受試者中(其之一描述於實施例45)觀察到OMS646的有益的治療效果，並在下文進一步描述。特別地，在三個響應者的每個中的治療效果在用OMS646治療大約三周後開始見到。

患者#1 (治療4周，如實施例45所述)：簡言之，血小板計數4倍，導致超過100,000/μL的血小板計數；結合珠蛋白水準超過2倍，和是正常值；血漿乳酸脫氫酶水準降低35%，但仍高於正常值；和裂紅細胞計數保持僅1個。

患者#2 (治療8周)：血小板計數對治療無反應，儘管患者還患有用伐更昔洛韋共存治療繼發的骨髓抑制和隨後移植失敗；血漿乳酸脫氫酶水準從712 U/L降低至低至256 U/L；結合珠蛋白水準從不可檢測的水準增加至高達250 mg/dL。

患者#3 (治療8周)：血小板計數從13,500/μL增加至133,000/μL；血漿乳酸脫氫酶水準從537降低至225 U/L，

結合珠蛋白水準從不可檢測的水準增加至高達181 mg/dL。

結果概述：

對於完成用OMS646給藥的患有持續性HSCT相關TMA的三個患者，資料證實強和一致的功效信號。在治療期間觀察到LDH和結合珠蛋白的統計學顯著的改進。血小板計數改進，但在該小數量的患者中未達到統計學顯著性。在完成治療的三個患者中，一個患者未顯示肌酸酐改進，但正接受共存的腎毒性劑。在其他兩個患者中肌酸酐改進或保持正常。

結論：

在對保守治療措施無反應的患有持續性HSCT-TMA的患者中，OMS646改進TMA標記。用OMS646治療的HSCT-TMA患者代表了最難以治療的一些患者，從而證實在高風險持續性HSCT-TMA的患者中(儘管保守治療措施) OMS646的治療效果的臨床證據。

根據前述內容，在一個實施方案中，本發明提供治療患有與造血幹細胞移植相關的TMA的人受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一個實施方案中，所述受試者正患有與造血幹細胞移植有關的持續性TMA，其抵抗保守治療措施。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依

賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物的步驟之前，鑒定患有抵抗保守治療措施的與造血幹細胞移植有關的持續性TMA的人受試者。

根據任何本文公開的實施方案，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體以10 nM或更小的K_D結合人MASP-2，所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元，所述抗體在體外測定中在1%人血清中以10 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，所述抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、$F(ab)_2$和$F(ab')_2$的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中所述IgG4分子包含S228P突變。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑(即，抑制凝集素途徑，同時保留經典補體途徑完整)。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體以的量給予有效改進與造血幹細胞移植相關TMA有關的至少一個或多個臨床參數，例如血小板計數增加(例如，治療之前的血小板計數的至少2倍、至少3倍、至少4倍)、結合珠蛋白增加和/或乳酸脫氫酶降低。

在一些實施方案中，所述方法包括通過導管(例如，靜脈內)給予MASP-2抑制性抗體至患有與造血幹細胞移植相關的TMA的受試者，持續第一段時間(例如，至少一天至一周或兩周或三周或四周或更長)，接著皮下給予

MASP-2抑制性抗體至所述受試者，持續第二段時間(例如，至少兩周或更長的慢性階段)。在一些實施方案中，在第一段時間和/或第二段時間的給予在不存在血漿療法時發生。在一些實施方案中，在第一段時間和/或第二段時間的給予在存在血漿療法時發生。

在一些實施方案中，所述方法包括經靜脈內、肌內或皮下，給予MASP-2抑制性抗體至患有與造血幹細胞移植相關的TMA的受試者。治療可以是慢性的，和每日至每月給予，但優選至少每兩周或至少一週一次、例如一周兩次或一週三次給予。MASP-2抑制性抗體可單獨給予，或與C5抑制劑、例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，所述方法包括治療患有與造血幹細胞移植相關的持續性TMA的受試者，包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些實施方案中，組合物包含MASP-2抑制性抗體，其包含(a) 重鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的胺基酸序列的重鏈CDR-H3，和b) 輕鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈

CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3，或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性，例如至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性識別在人MASP-2上由參考抗體OMS646識別的表位的至少一部分，參考抗體OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予患有或有風險發生與HSCT有關的TMA的受試者，包括患有抵抗保守治療措施的與造血幹細胞移植有關的持續性TMA的受試者，

包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區，劑量為1 mg/kg-10 mg/kg (即，1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg)，至少每週一次(例如至少每週兩次或至少每週三次)，持續至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周的時間。

實施例47

本實施例描述了證實用MASP-2抑制性抗體OMS646有效治療移植物抗宿主病(GVHD)相關的微血管病的病例研究。

背景：移植物抗宿主病是一種造血幹細胞移植(HSCT)的常見併發症。急性和慢性形式二者均存在，和由識別受體患者為外來組織的供體免疫細胞產生。這觸發了針對受體患者的免疫反應。急性GvHD在多達50%或更多的接受同種異體移植的患者中發生。急性GvHD最常見靶向皮膚、胃腸道和肝臟，但也可影響腎、眼、肺和血細胞。慢性GvHD在大約40%的接受同種異體移植的患者中發生，和最常見影響皮膚、肝臟、眼、胃腸道和肺。急性和慢性GvHD二者均涉及明顯的發病率和死亡率。

方法和結果

在第二次完全緩解(CR)中受T細胞急性成淋巴細胞性白血病(T-ALL)影響的46歲男性經歷用環磷醯胺和全身輻射方案(TBI-Cy)的完全骨髓消融調節以及來自不相關的35歲9/10 HLA相容性(在基因座A的抗原錯配)女性供體的外周血幹細胞(PBSC)同種異體HSCT移植。移植物抗宿主病(GVHD)的預防基於抗胸腺細胞球蛋白(ATG，5 mg/kg) (在調節期間)、環孢菌素A (CSA)和甲氨蝶呤的短期療程(即，在第+1、+3、+6天的甲氨蝶呤(由於低CD34+而降低劑量))。他實現穩健的血液學重建(移植物移入：在第+15天WBC >1000/mmc，嗜中性粒細胞>500/mmc；在第+18天血小板>20000/mmc，在第+21天50000/mmc)。在第+30、+60、+90、+180、+354天以完全供體(骨髓和外周血，CD3+和CD3-部分)觀察到嵌合現象。在第+30、+60、+90、+180天，完全緩解得到證實(免疫表型，分子MRD)。

在移植後第+35天，他發生胃腸(GI) GVHD (表現為嘔吐、食欲缺乏、腹瀉、腹痛；結腸檢查：彌漫性糜爛；組織學：彌漫性粘膜潰瘍、固有層中淋巴粒細胞性炎症、腺和隱窩變形、凋亡小體)，和被診斷為急性GvHD，階段4(腸)，總體等級4以及巨細胞病毒(CMV)結腸炎(通過對腸活檢的陽性免疫組織化學和即時PCR；全身CMV再活化(在外周血中2614 UI/mL)確定)。兩種病況用甲潑尼龍(1 mg/Kg)、膦甲酸和更昔洛韋同時治療，其中反應良好和類固醇逐漸縮減至停止。

在移植後第+121天，他經歷類固醇難治性GI GVHD的復發(表現為嘔吐、食欲缺乏、腹瀉、腹痛；組織學發現(胃和十二指腸))，和被診斷為晚期發作性急性GI GvHD階段4（腸），總體等級4，其根據登記的臨床研究(ClinicalTrials.Gov Identifier NCT02032446)通過繼續CSA以及序貫給予噴司他丁和間質幹細胞治療，其中反應良好。

在移植後第+210天，患者表現為體重減輕、顯著虛弱、全身肌肉萎縮、四肢軟弱、深部腱反射降低、雙側腓腸感覺異常、神經源性膀胱和在不存在排尿刺激時的尿失禁。臨床檢查和腦脊液、神經放射學和電生理學發現描述了軸突、感覺運動和植物神經功能不全性多神經病的圖片。神經放射學表明正常的MRI (腦和脊柱)和腦脊液是正常的。T-ALL的復發、感染、血管損傷、營養缺乏、脫髓鞘病症和後部可逆腦病綜合征(PRES)被排除。給予高劑量免疫球蛋白沒有益處。還證明了共存的血小板減少(6 x 10^9/L)以及沒有腎損傷的大血管病變性溶血性貧血(6.7 g/dL)、網狀細胞增多(335 x 10^9/L)、LDH增加(1635 U/L)和不可檢測的結合珠蛋白的特徵。直接抗球蛋白檢測是陰性的。在外周血塗片中(2-3/視野50x)觀察到裂紅細胞，以及不存在抗-B ab (主要不相容性患者/供體)、正常ADAMTS13活性、不存在抗-ADAMTS13 Ab、正常凝固測試和具有正常肌酸酐值的蛋白尿。他還在內窺鏡檢查中表現黑糞為證明的結腸性潰瘍；組織病理學研究顯示粘膜水

腫、纖維化、擴張的小血管以及管腔內纖維蛋白沉積、腺萎縮和凋亡小體，沒有微生物學發現。因此，儘管有證據表明持續性GI GVHD，但臨床和組織病理學圖片也與結腸的移植相關的血栓性微血管病的診斷一致。因為復發的GI GVHD，CSA逐漸減少，但不停止(谷水準100-150 ng/mL)，沒有獲得臨床或血液學變化。

在移植後第+263天，該患者被招募至上文實施例45和46中描述的臨床試驗，所述臨床試驗涉及用OMS646 (抑制補體活化的凝集素途徑的MASP-2抑制性抗體)治療。如圖61所示，在前兩次每週劑量的藥物後，觀察到臨床和實驗室反應，其中黑糞和溶血消退以及血小板計數升高。在4個劑量後，令人感興趣的是，還證明了顯著的神經學改進，具有感覺運動缺乏的臨床和電生理學改進。在8個劑量的OMS646後，儘管CSA逐漸減少，但GvHD反應得到保持，未觀察到毒性。到移植後第+354天，該患者證實進一步的神經學改進和排尿缺乏開始恢復。該患者實現的快速臨床益處提示，給予OMS646導致的補體介導的內皮損傷的有效抑制可特別有效地用於治療GVHD相關的TMA。

簡言之，本實施例描述了移植後具有共存在的HSCT-TMA和GvHD的HSCT患者的病例報告，二者在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療後被消除。用OMS646治療前，患者具有困難的移植後過程，其被類固醇難治性GvHD、巨細胞病毒感染和HSCT-TMA的多種發作複雜化。在兩次在前的GvHD發作後，患者表現為血性腹瀉。腸活檢證實

了HSCT-TMA和GvHD二者。未鑒定出感染。特別地，患者還具有感覺異常、四肢麻痹和神經源性膀胱的新發作的神經學症狀，它們已被報導為GvHD和TMA的神經學表現。患者由於四肢麻痹不能行走和需要至少每日一次輸血。血液學標記證實具有血小板減少、乳糖脫氫酶(LDH)增加和裂紅細胞的HSCT-TMA。患者進入臨床試驗和開始接受OMS646。他的免疫抑制(環孢菌素)在初期2周被降低，和根據其類固醇難治性GvHD的歷史，他僅接受低劑量皮質類固醇。他不接受其它GvHD治療。在2個OMS646劑量後，他的血性腹瀉消除和他的血液學標記改善。在4個OMS646劑量後，他能夠行走。他完成8周的OMS646治療，和在家表現良好。HSCT-TMA和GvHD的所有跡象和症狀已經消除。他的神經學症狀繼續改進。OMS646治療之前，該患者正在惡化，和有早期死亡的高風險。用OMS646治療後，觀察到GvHD、HSCT-TMA和神經學症狀改善，和患者在家表現良好。

根據前述內容，在一個實施方案中，本發明提供治療患有或有風險發生移植物抗宿主病(GVHD)的人受試者的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物，從而治療GVHD或降低GVHD的發生風險，或降低與GVHD有關的一個或多個症狀的嚴重性。在一個實施方案中，GVHD是活性的急性GVHD。在一個實施方案中，GVHD是慢性GVHD。在一個實施方案中，GVHD是類固醇抵抗性的(即，儘管類固

醇治療但仍持續)。在一個實施方案中，GVHD是胃腸(GI) GVHD。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在用MASP-2抑制性抗體治療之前，確定在受試者中存在GVHD的步驟。

在一個實施方案中，所述受試者正患有，或有風險發生與造血幹細胞移植有關的GVHD。在一個實施方案中，所述受試者正患有，或有風險發生與造血幹細胞移植相關的TMA相關的GVHD。在一個實施方案中，所述受試者正患有白血病，例如T細胞急性成淋巴細胞性白血病。

在一個實施方案中，所述受試者正患有與GvHD和/或TMA有關的一種或多種神經學症狀，例如虛弱、感覺異常、四肢麻痹、感覺運動缺乏、植物神經功能不全性多神經病和/或神經源性膀胱，和MASP-2抑制性抗體以足以改善一種或多種神經學症狀的量和時間給予。

根據任何本文公開的實施方案，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體以10 nM或更小的K_D結合人MASP-2，所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元，所述抗體在體外測定中在1%人血清中以10 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，所述抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，其中所述抗體是選自Fv、Fab、Fab'、$F(ab)_2$和$F(ab')_2$的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中所述IgG4分子包含S228P突變。在一個實施方案中，所述抗體結合

MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑(即，抑制凝集素途徑，同時保留經典補體途徑完整)。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體以有效改進與GVHD有關的至少一個或多個臨床參數的量給予。

在一些實施方案中，所述方法包括經靜脈內、肌內或皮下，給予MASP-2抑制性抗體至患有與造血幹細胞移植相關的GVHD的受試者。治療可以是慢性的，和每日至每月給予，但優選至少每兩周或至少一週一次、例如一周兩次或一週三次給予。MASP-2抑制性抗體可單獨給予，或與C5抑制劑、例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，所述方法包括治療患有與造血幹細胞移植相關的GVHD的受試者，包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些實施方案中，組合物包含MASP-2抑制性抗體，其包含(a) 重鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的胺基酸序列的重鏈CDR-H3，和b) 輕鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列

的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3，或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性，例如至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性識別在人MASP-2上由參考抗體OMS646識別的表位的至少一部分，參考抗體OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予患有或有風險發生GVHD的受試者，例如將經歷、正經歷或已經歷HSCT的受試者，包括患有GVHD相關的TMA的受試者，包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗

體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區，劑量為1 mg/kg-10 mg/kg (即，1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg)，至少每週一次(例如至少每週兩次或至少每週三次)，持續至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周的時間。

實施例48

本實施例描述了證實在造血幹細胞移植後用MASP-2抑制性抗體OMS646有效治療TMA和彌漫性肺泡出血(DAH)的病例研究。

背景：造血幹細胞移植(HSCT)誘導顯著的內皮損傷，其促進嚴重的HSCT後併發症，例如血栓性微血管病(TMA)、移植物抗宿主病(GvHD)、彌漫性肺泡出血(DAH)和靜脈閉塞性病(VOD)。(參見E. Carreras和M. Diaz-Ricart, *Bone Marrow Transplant* vol 46:1495-1502, 2011; Akil等，*Biol Blood Marrow Transplant* 21:1739-1745, 2015；和Vion等，*Semin Thromb Hemost* 41(06):629-643, 2015，其各自通過引用結合到本文中)。

彌漫性肺泡出血(DAH)是可在造血幹細胞移植(HSCT)受體中發生的綜合征。在HSCT受體中DAH的診斷標準包括肺侵潤、呼吸困難和缺氧(參見E. Carreras和M. Diaz-Ricart, *Bone Marrow Transplant* vol 46:1495-1502, 2011，

通過引用結合到本文中)。DAH的懷疑發病機制是隱性感染以及HSCT調節加上移入的嗜中性粒細胞導致的肺毛細管內皮損傷，允許紅細胞洩露至肺泡(*E. Carreras和M. Diaz-Ricart, Bone* Marrow *Transplant* vol 46:1495-1502, 2011)。靜脈閉塞性病(VOD)，亦稱為竇狀隙閉塞綜合征(SOS)，是可在造血幹細胞移植(HSCT)患者中發生的另一種綜合征。VOD的臨床表現包括由於液體潴留導致的顯著體重增加、肝臟大小增加和血液中膽紅素水準升高(參見E. Carreras和M. Diaz-Ricart, *Bone Marrow Transplant* vol 46:1495-1502, 2011，通過引用結合到本文中)。

方法和結果：

人口統計學和過去的醫學史

在治療開始時患者為14歲白人女性，在本實施例中稱為“同情使用患者#1”。該患者具有先天性再生障礙性貧血和空蝶鞍綜合征的歷史。

患者結果

患者在第877天是存活的。

需要移植的疾病

該患者具有先天性再生障礙性貧血的歷史。她從嬰兒期以來每3周需要RBC輸注，和之前發生鐵超負荷。

移植

在2015年9月該患者經歷她的幹細胞移植。她接受來自9/10匹配的不相關供體的PBSC移植。到大約第35天發生嗜中性粒細胞移入。到第184天未實現血小板移入。她需要血小板和RBC輸注超過1年。

移植後併發症

該患者具有複雜的移植後過程。在出院後不久，她在第67天因為呼吸急促和推定的肺炎重新入院。她在第162天出院。她在第167天重新入院，其中用阿昔洛維治療水痘帶狀皰疹再活化和用皮質類固醇治療多漿膜炎。她具有持續性血小板減少和貧血、LDH升高、結合珠蛋白降低、裂紅細胞和陰性直接抗體測試。做出TMA的診斷。免疫抑制被改變為MMF和潑尼松。她還經歷HHV6和EBV再活化。她在第197天出院。

在第229天，她因為持續性TMA和嚴重呼吸性窘迫再次入院。她被診斷為彌漫性肺泡出血，其用CPAP和皮質類固醇治療。在第231天，她具有胸膜和心包積液，以及氧合惡化。她的血壓增加。她需要ACE抑制劑、鈣通道阻滯劑、β-阻滯劑、利尿劑和硝酸甘油用於BP控制。她經歷癲癇發作和加入可樂定。腦MRI顯示腦中的鐵與來自她的RBC輸注歷史的繼發性血色素沉著病一致。血液透析在第231天開始。在第259天，由於持續的腎功能不全和肺狀態惡化，她開始艾庫組單抗治療。她的TMA改善，但她發生

急性肺水腫和艾庫組單抗被中斷。她的TMA惡化和在第269、276和278天她經歷血漿交換，沒有改善。她用去纖苷治療，其由於凝血紊亂而中斷和沒有TMA改善。在大約第320天開始，她再次接受較低劑量的艾庫組單抗。艾庫組單抗再次由於肺水腫而停止。TMA持續。她還發生了艱難梭菌(C. difficile)感染。在第379天她出院，接受了潑尼松、MMF、伏立康唑、複方增效磺胺(cotrimazole)、氨氯地平、紅細胞生成素、熊去氧膽酸和奧美拉唑。

她在第380天因為發熱、寒戰和呼吸困難再次入院。她具有肺炎克雷伯氏菌(K. pneumoniae)肺炎和屎場球菌(E. faecium)膿毒症。她的MMF停止。她用塔唑西林、美羅培南和萬古黴素治療。因為持續性菌血症，她的中心線改變，和她的抗生素改變為利奈唑胺、達托黴素和克林黴素。她的TMA持續，需要每週3次血液透析和每日輸注血小板。肺水腫診斷為彌漫性肺泡出血(用皮質類固醇治療，沒有反應)。在第404天，在同情使用方案下OMS646治療開始。如本文所述，OMS646是抑制補體活化的凝集素途徑的MASP-2抑制性抗體。

她每週三次用4 mg/kg OMS646的劑量治療。她的氧中斷，和她的皮質類固醇劑量降低。她的實驗室TMA標記改進。她在第414天出院。

她作為門診患者繼續OMS646治療，每週三次，和在第416天她的血液透析降低至每週一次。她的抗高血壓藥物也減少至僅氨氯地平、可樂定和呋塞米。在第423天她

能夠停止血液透析和在第428天她的OMS646降低至每週兩次，她的皮質類固醇和呋塞米劑量減少。在這期間她的血小板輸注顯著減少。

她繼續表現良好，直到第486天，此時她發生RSV感染。她的肌酸酐和LDH增加，和她的血小板計數和結合珠蛋白降低。她被診斷為復發性TMA，和OMS646治療增加至每週三次。她的TMA因為OMS646治療增加而消除。

她保持無血液透析，和她的最後一次血小板輸注發生在大約第630天。她目前表現良好，和接受用OMS646、去鐵胺、左旋甲狀腺素、司維拉姆、安美汀、左乙拉西坦、別嘌醇、氨氯地平、萘比洛爾、可樂定和紅細胞生成素的治療。對於血色素沉著病，她正接受靜脈切開術。

TMA發作

該患者具有一個持續和/或復發TMA的困難過程。她的過程與多器官TMA一致，和她具有彌漫性肺泡出血(DAH)，其為另一種內皮損傷綜合征。她初始對艾庫組單抗有反應，但不耐受該治療。開始OMS646治療之前，她進行血液透析和需要每日輸血。OMS646治療後不久，她的TMA消除，她的DAH消除，和她能夠停止透析。隨後她能夠顯著減少和隨後停止血小板和RBC輸注，同時保持穩定的或增加的血小板計數和血紅蛋白值。這些結果在圖62A-62E中證實，如下：

圖62A圖示說明了隨時間在同情使用患者#1中肌酸酐

的水準，其中垂直線表示開始用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療。

圖62B圖示說明了隨時間在同情使用患者#1中結合珠蛋白的水準，其中垂直線表示開始用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療。

圖62C圖示說明了隨時間在同情使用患者#1中血紅蛋白的水準，其中垂直線表示開始用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療。

圖62D圖示說明了隨時間在同情使用患者#1中LDH的水準，其中垂直線表示開始用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療。

圖62E圖示說明了隨時間在同情使用患者#1中血小板的水準，其中垂直線表示開始用MASP-2抑制性抗體(OMS646)治療。

總體上，該患者的療程證實了TMA和DAH的成功OMS646治療，允許患者停止氧療法、血液透析和輸血。

簡述

簡言之，本實施例描述了青少年女孩(同情使用患者#1)的HCST-TMA病例報告，所述女孩不耐受艾庫組單抗治療，但對OMS646治療的同情使用反應良好。OMS646治療後不久，她的TMA消除，她的DAH消除，和她能夠停止透析。如實施例47所述，提供了另一個HSCT-TMA病例報告，描述了具有困難的移植後療程的患者，包括類固醇抵

抗性GvHD和巨細胞病毒感染。他發生對保守措施無反應的TMA和具有共存在GvHD以及多種神經學併發症，和不能夠行走。如實施例47所述，在OMS646治療後，他的TMA和GvHD消除，和他的神經學併發症改善。他能夠回到工作，和他的神經學狀態持續改善。

在HSCT受體中總體存活和TMA標記的改善，結合在這些臨床疾病患者中GvHD的消除和彌漫性肺泡出血的消除，表明凝集素途徑在這些綜合征中起到的作用，和在治療和/或預防幹細胞移植後TMA、移植物抗宿主病和彌漫性肺泡出血中使用MASP-2抑制性抗體OMS646的功效。

根據前述內容，在一個實施方案中，本發明提供治療患有與造血幹細胞移植有關的彌漫性肺泡出血的人受試者(即，在HSCT受體中)的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物的步驟之前，鑒定患有與HSCT有關的彌漫性肺泡出血的人受試者。

根據任何本文公開的實施方案，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體以10 nM或更小的K_D結合人MASP-2，所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元，所述抗體在體外測定中在1%人血清中以10 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，所述抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積，其中所述抗體是選

自Fv、Fab、Fab'、$F(ab)_2$和$F(ab')_2$的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中所述IgG4分子包含S228P突變。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑(即，抑制凝集素途徑，同時保留經典補體途徑完整)。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體以在HSCT受體中有效改進與彌漫性肺泡出血有關的至少一個或多個臨床參數的量給予。在一些實施方案中，所述方法包括經靜脈內、肌內或皮下，給予MASP-2抑制性抗體至患有彌漫性肺泡出血的受試者。治療可以是慢性的，和每日至每月給予，但優選至少每兩周或至少一週一次、例如一周兩次或一週三次給予。MASP-2抑制性抗體可單獨給予，或與C5抑制劑、例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，所述方法包括治療患有與造血幹細胞移植相關的彌漫性肺泡出血的受試者，包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些實施方案中，組合物包含MASP-2抑制性抗體，其包含(a)重鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-

65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的胺基酸序列的重鏈CDR-H3，和b) 輕鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3，或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性，例如至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性識別在人MASP-2上由參考抗體OMS646識別的表位的至少一部分，參考抗體OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予患有或有風險發生與HSCT有關的彌漫性肺泡出血的受試者，包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區，劑量為1 mg/kg-10 mg/kg (即，1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg)，至少每週一次(例如至少每週兩次或至少每週三次)，持續至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周的時間。

根據前述內容，在另一個實施方案中，本發明提供治療患有與造血幹細胞移植有關的靜脈閉塞性病(VOD)的人受試者(即，在HSCT受體中)的方法，包括給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物。在一個實施方案中，所述方法進一步包括在給予所述受試者包含有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物的步驟之前，鑒定患有與HSCT有關的靜脈閉塞性病的人受試者。

根據任何本文公開的實施方案，MASP-2抑制性抗體顯示至少一個或多個以下特徵：所述抗體以10 nM或更小的K_D結合人MASP-2，所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位元，所述抗體在體外測定中在1%人血清中以10 nM或更小的IC_{50}制C3b沉積，所述抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}制C3b沉積，其中所述抗體是選自

Fv、Fab、Fab'、$F(ab)_2$和$F(ab')_2$的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中所述IgG4分子包含S228P突變。在一個實施方案中，所述抗體結合MASP-2和選擇性抑制凝集素途徑和基本上不抑制經典途徑(即，抑制凝集素途徑，同時保留經典補體途徑完整)。

在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體以在HSCT受體中有效改進與靜脈閉塞性病有關的至少一個或多個臨床參數的量給予。在一些實施方案中，所述方法包括經靜脈內、肌內或皮下，給予MASP-2抑制性抗體至患有靜脈閉塞性病的受試者。治療可以是慢性的，和每日至每月給予，但優選至少每兩周或至少一週一次、例如一周兩次或一週三次給予。MASP-2抑制性抗體可單獨給予，或與C5抑制劑、例如艾庫組單抗組合給予。

在一個實施方案中，所述方法包括治療患有與造血幹細胞移植相關的靜脈閉塞性病的受試者，包括給予所述受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些實施方案中，組合物包含MASP-2抑制性抗體，其包含(a) 重鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的

胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的胺基酸序列的重鏈CDR-H3，和b) 輕鏈可變區，其包含：i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3，或(II) 其變體，包含與SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重鏈可變區和與SEQ ID NO:70具有至少90%同一性，例如至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予患有與HSCT相關的靜脈閉塞性病的受試者包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予所述受試者包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段特異性識別在人MASP-2上由參考抗體OMS646識別的表位的至少一部分，參考抗體OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重鏈可變區和SEQ ID NO:70所示

的輕鏈可變區。

在一些實施方案中，所述方法包括給予患有或有風險發生與HSCT相關的靜脈閉塞性病的受試者，包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述抗體或其抗原結合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的輕鏈可變區，劑量為1 mg/kg-10 mg/kg (即，1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg)，至少每週一次(例如至少每週兩次或至少每週三次)，持續至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周的時間。

儘管已經例舉和描述了說明性的實施方案，但應理解，可在其中進行各種變化而不背離本發明的精神和範圍。

【序列表】

<110> 美商歐米諾斯公司 **(Omeros Corporation)**
萊斯特大學 (University of Leicester)

<120> **用於治療和/或預防與造血幹細胞移植有關的移植物抗宿主病和/或瀰漫性肺泡出血和/或靜脈閉塞性病的方法**

<130> MP.1.0278.US

<150> **US**62/545,864
<151> 2017-08-15

<150> **US**62/574,690
<151> 2017-10-19

<150> **US**62/630,756
<151> 2018-02-14

<150> **US**62/637,281
<151> 2018-03-01

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 725
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(584)

<400> 1

```
ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt        53
                              Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu
                              1               5

ctg tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct        101
Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro
10                  15                  20                  25

gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat        149
Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn
                30                  35                  40

gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg        197
Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu
            45                  50                  55

cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag        245
Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu
        60                  65                  70

tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg        293
Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu
    75                  80                  85
```

```
tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act        341
Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr
90                  95                  100                 105

ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac        389
Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
                110                 115                 120

tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag        437
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> PRT
<213> 智人

<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> PRT
<213> 智人

<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> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(2082)

<400> 4

```
ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg          51
                       Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu
                       1               5                   10

tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg          99
Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val
                   15                  20                  25

ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat gac         147
Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp
               30                  35                  40

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> PRT
<213> 智人

<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> PRT
<213> 智人

<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> DNA
<213> 智人

<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 caccgccccc 240

gccctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccacccccc 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 caccttccc 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 aggggccctt 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> PRT
<213> 智人

<400> 8

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
130 135

<210> 9
<211> 181
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser
180

<210> 10
<211> 293
<212> PRT
<213> 智人

<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> PRT
<213> 智人

<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> PRT
<213> 智人

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 13

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ala Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 14

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
1 5 10 15

<210> 15
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 15

Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp
1 5 10 15

Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser
20 25 30

Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln
35 40

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 16

Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn
1 5

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 18

Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly
1 5

<210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<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> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (51)..(797)

<400> 20
attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56
Met Ser
1

ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct 104
Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser
5 10 15

tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca 152
Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala
20 25 30

gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat 200
Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp
35 40 45 50

```
ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc        248
Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu
                55                  60                  65

aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca        296
Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro
            70                  75                  80

ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga        344
Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly
        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> PRT
<213> 智人

<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> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> 其它特徵
<222> (1)..(1)
<223> 其中位置1 的X 表示羥基脯胺酸

<220>
<221> 其它特徵
<222> (4)..(4)
<223> 其中位置4 的X 表示羥基脯胺酸

<400> 22

Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> 其它特徵
<222> (1)..(1)
<223> 其中X 表示羥基脯胺酸

<400> 23

Xaa Gly Lys Leu Gly
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> 其它特徵
<222> (9)..(15)
<223> 其中位置9 和15 的X 表示羥基脯胺酸

<400> 24

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly
1 5 10 15

<210> 25
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> 其它特徵
<222> (3)..(27)
<223> 其中位置3, 6, 15, 21, 24, 27 的X 表示羥基脯胺酸

<400> 25

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly
1 5 10 15

Lys Leu Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa
20 25

<210> 26
<211> 53
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> 其它特徵
<222> (26)..(26)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> 其它特徵
<222> (35)..(35)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> 其它特徵
<222> (41)..(41)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> 其它特徵
<222> (50)..(50)
<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 26

Gly Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
1 5 10 15

Gln Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa
20 25 30

Gly Asn Xaa Gly Pro Ser Gly Ser Xaa Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly
35 40 45

Asp Xaa Gly Lys Ser
50

<210> 27
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> 其它特徵
<222> (3)..(33)
<223> 其中位置3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 的X 表示羥基脯胺酸

<400> 27

Gly Ala Xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly
1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Xaa Gly Asp
20 25 30

Xaa

<210> 28
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> 其它特徵
<222> (3)..(45)
<223> 其中位置3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 的X 表示羥基脯胺酸

<400> 28

Gly Cys Xaa Gly Leu Xaa Gly Ala Xaa Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly
1 5 10 15

Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys
20 25 30

Ala Gly Pro Xaa Gly Pro Asn Gly Ala Xaa Gly Glu Xaa
35 40 45

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<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> DNA
<213> 智人

<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> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 31
cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc 34

<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic

<400> 32
gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag 33

<210> 33
<211> 33

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 33
agcagccctg aatacccacg gccgtatccc aaa 33

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 34
cgggatccat gaggctgctg accctc 26

<210> 35
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 35
ggaattccta ggctgcata 19

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 36
ggaattccta cagggcgct 19

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 37
ggaattccta gtagtggat 19

<210> 38
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 38

tgcggccgct gtaggtgctg tcttt 25

<210> 39
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 39
ggaattcact cgttattctc gga 23

<210> 40
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 40
tccgagaata acgagtg 17

<210> 41
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 41
cattgaaagc tttggggtag aagttgttc 29

<210> 42
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 42
cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga 27

<210> 43
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 43
cggtaagctt cactggctca gggaaata 28

<210> 44
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 44
aagaagcttg ccgccaccat ggattggctg tggaact 37

<210> 45
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 45
cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 46
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 46
aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 47
cgggatcctt ctccctctaa cactct 26

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 48

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
1 5

<210> 49
<211> 4960
<212> DNA
<213> 智人

<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

atcccccggc tttccagggg agtatgccaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc 1500

acccccggc taccgcctgc gcctctactt cacccacttc gacctggagc tctcccacct 1560

ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctggggtt tctcagggtc 1620

gggggtccc 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
cccgcccccc 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 gtggcccccgg 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> DNA
<213> 鼠

<220>
<221> CDS
<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> PRT
<213> 鼠

<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> PRT
<213> 鼠

<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> DNA
<213> 大鼠

<220>
<221> CDS
<222> (10)..(2067)

<400> 53
tggcacaca atg agg cta ctg atc gtc ctg ggt ctg ctt tgg agt ttg gtg 51
Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val
1 5 10

gcc aca ctt ttg ggc tcc aag tgg cct gag cct gta ttc ggg cgc ctg 99
Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
15 20 25 30

gtg tcc ctg gcc ttc cca gag aag tat ggc aac cat cag gat cga tcc 147
Val Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser
35 40 45

tgg acg ctg act gca ccc cct ggc ttc cgc ctg cgc ctc tac ttc acc 195
Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr
50 55 60

cac ttc aac ctg gaa ctc tct tac cgc tgc gag tat gac ttt gtc aag 243
His Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys
65 70 75

```
ttg acc tca ggg acc aag gtg cta gcc acg ctg tgt ggg cag gag agt        291
Leu Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser
    80                  85                  90

aca gat act gag cgg gca cct ggc aat gac acc ttc tac tca ctg ggt        339
Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly
95                  100                 105                 110

ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc gac tac tcc aat gag aag cca        387
Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro
                115                 120                 125

ttc aca gga ttt gag gcc ttc tat gca gcg gag gat gtg gat gaa tgc        435
Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys
            130                 135                 140

aga aca tcc ctg gga gac tca gtc cct tgt gac cat tat tgc cac aac        483
Arg Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn
        145                 150                 155

tac ctg ggc ggc tac tac tgc tcc tgc cga gtg ggc tac att ctg cac        531
Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His
    160                 165                 170

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> PRT
<213> 大鼠

<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> PRT
<213> 大鼠

<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> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 56
atgaggctgc tgaccctcct gggccttc 28

<210> 57
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 57
gtgcccctcc tgcgtcacct ctg 23

<210> 58
<211> 23
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 58
cagaggtgac gcaggagggg cac 23

<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 59
ttaaaatcac taattatgtt ctcgatc 27

<210> 60
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠

<400> 60
atgaggctac tcatcttcct gg 22

<210> 61
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠

<400> 61
ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23

<210> 62
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠

<400> 62
ccccccctgc gtcacctctg cag 23

<210> 63
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠

<400> 63
ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29

<210> 64
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠

<400> 64
gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt 29

<210> 65
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠

<400> 65
ctagaaacac taatgcccct cctgcgtcac ctctgca 37

<210> 66
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 66
caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg 60

acctgcaccg tctctgggtt ctcactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt 120

cagccccag 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> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 67

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly
20 25 30

Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 318

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> 其它特徵
<222> (246)..(246)
<223> n 是 a, c, g, 或 t

<400> 69
cagccagtgc tgactcagcc cccctcactg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60

acctgctctg gagagaaatt gggggataaa tatgcttact ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtcccctg tgttggtcat gtatcaagat aaacagcggc cctcagggat ccctgagcga 180

ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240

gatgangctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg 300

accaagctga ccgtccta 318

<210> 70
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 70

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 71
<211> 120
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種有效抑制MASP-2-依賴性補體活化的MASP-2抑制性單克隆抗體或其抗原結合片段在製備用於治療患有與造血幹細胞移植有關的彌漫性肺泡出血的人受試者的藥物中的用途，包括給予該受試者包含該MASP-2抑制性單克隆抗體抗體或其抗原結合片段的組合物，其中該MASP-2抑制性單克隆抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3；和輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:70所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3，其中使用Kabat或Chothia編號確定該CDR。

【請求項2】請求項1之用途，其中該抗體或其片段選自重組抗體、具有降低的效應器功能的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。

【請求項3】請求項1之用途，其中該MASP-2抑制性單克隆抗體基本上不抑制經典途徑。

【請求項4】請求項1之用途，其中該MASP-2抑制性單克隆抗體在90%人血清中以30 nM或更小的IC_{50}抑制C3b沉積。

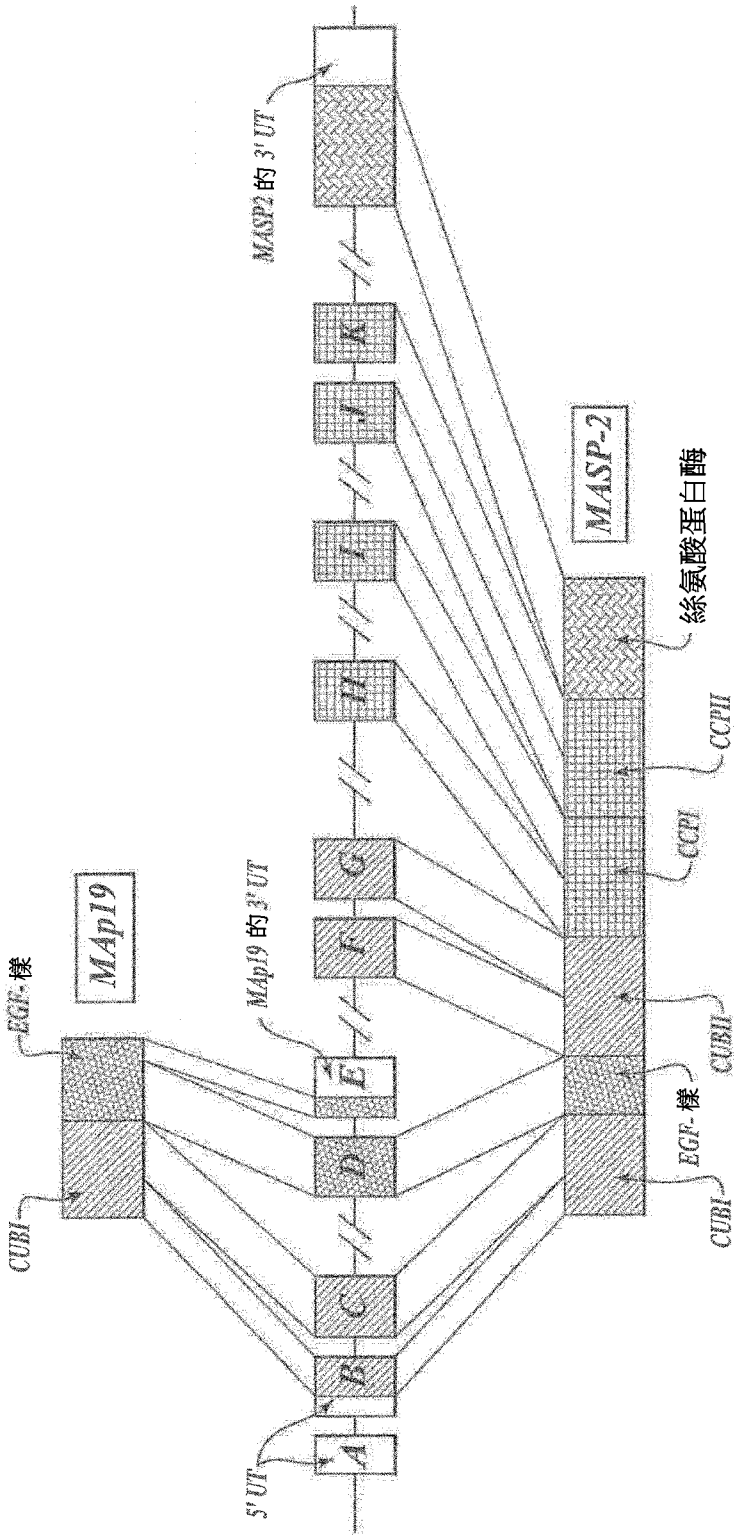
【請求項5】請求項1之用途，其中該MASP-2抑制性單克隆抗體經全身遞送至該受試者。

【請求項6】請求項1之用途，其中該治療進一步包括在給予該受試者該組合物的步驟之前，鑒定患有或有風險發生彌漫性肺泡出血的人受試者。

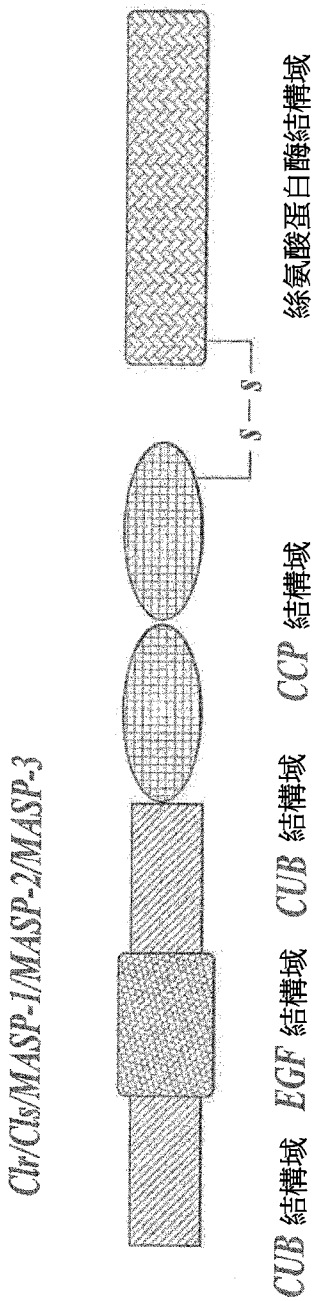
【請求項7】請求項1之用途，其中該受試者之前已經歷，或當前正經歷，或將經歷造血幹細胞移植。

【請求項8】請求項1-7中任一項之用途，其中該治療包括至少一週一次給予該受試者包含劑量為1 mg/kg至10 mg/kg的該MASP-2抑制性單克隆抗體的組合物。

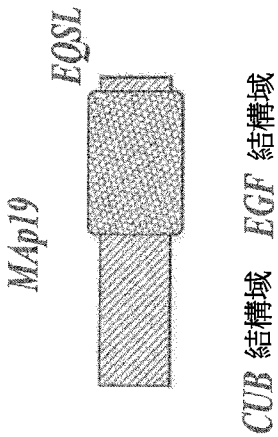
【發明圖式】


MASP2 的 3' UT
K
J
I
H
G
F
E
D
C
B
A
5' UT
MAp19 的 3' UT
MAp19
EGF-樣
CUBI
MASP-2
絲氨酸蛋白酶
CCPII
CCPI
CUBII
EGF-樣
CUBI

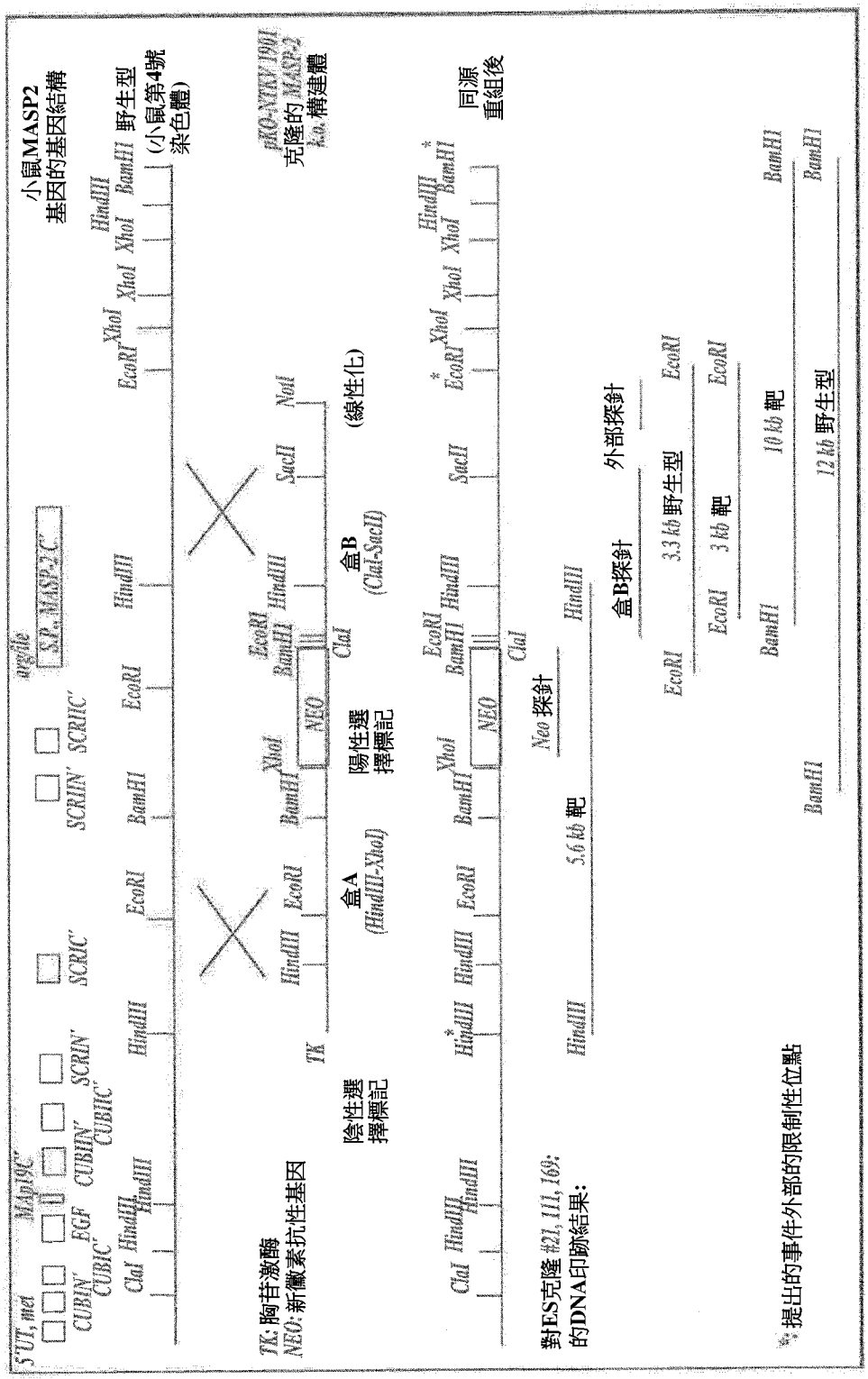
【圖 1】


C1r/C1s/MASP-1/MASP-2/MASP-3
CUB 結構域
EGF 結構域
CUB 結構域
CCP 結構域
S — S
絲氨酸蛋白酶結構域

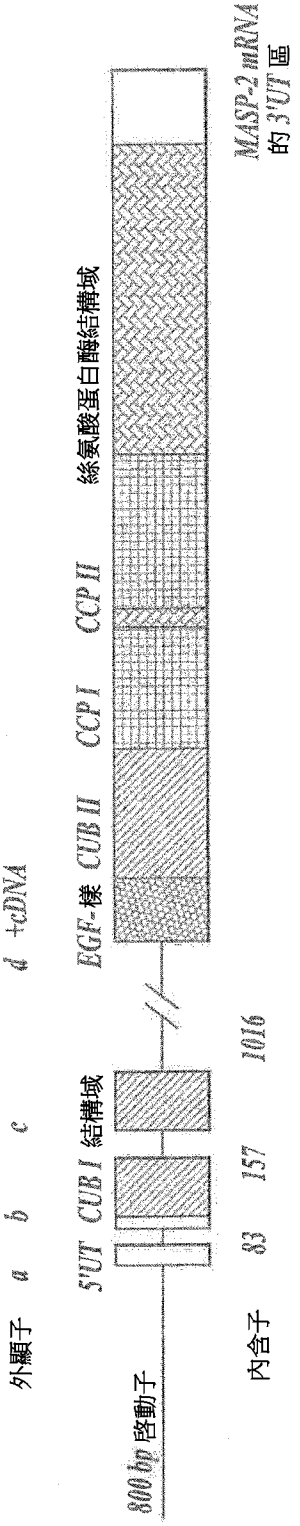
【圖 2A】


MAp19
EQSL
CUB 結構域
EGF 結構域

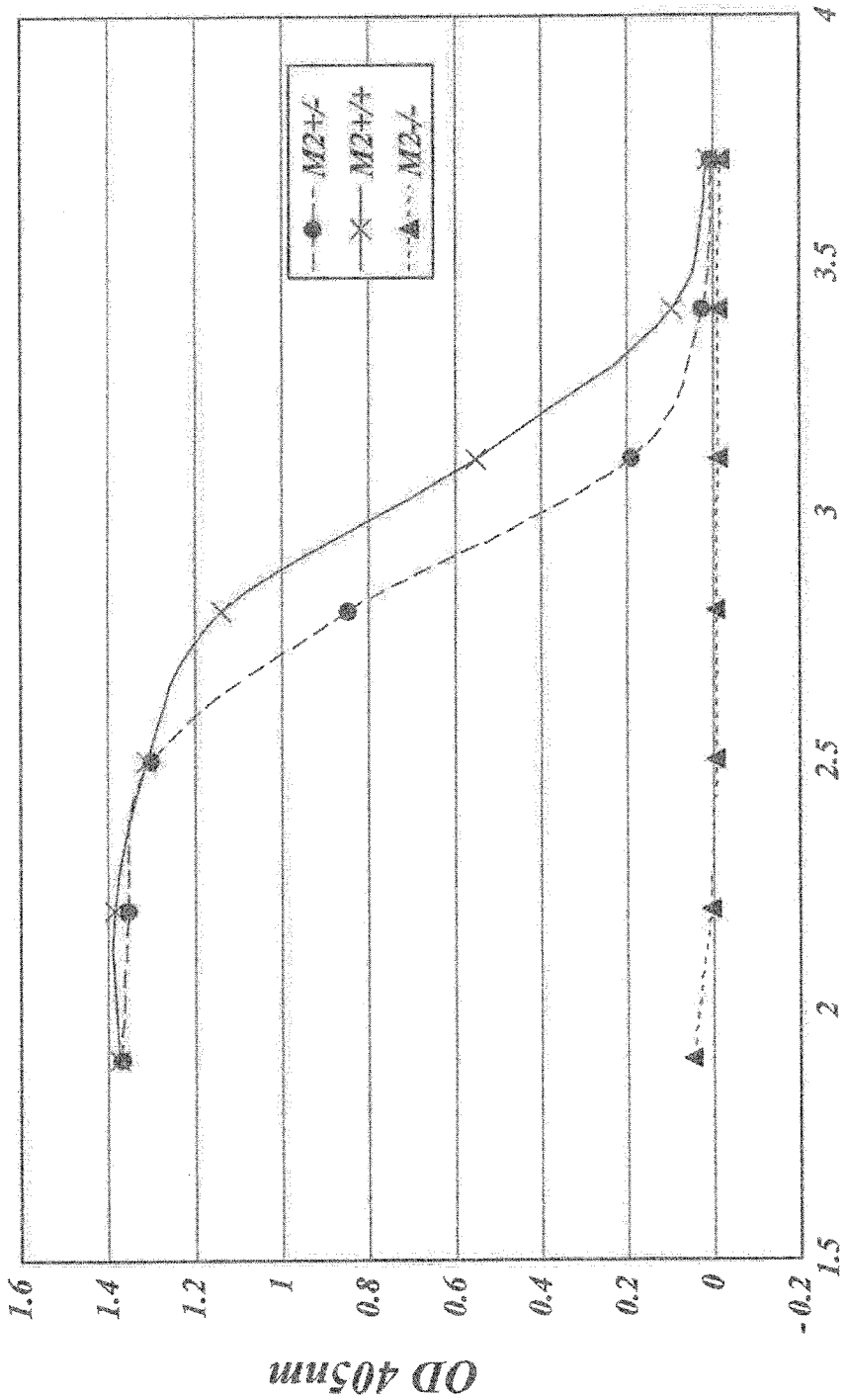
【圖 2B】


小鼠MASP2
基因的基因結構
5'UT, met
CUBIN'
EGF
CUBIC'
CUBIN'
CUBIC'
SCRIN'
SCRIC'
agile
SP, MASP2-C'
SCRIN'
SCRIC'
ClaI HindIII
HindIII
HindIII
EcoRI
BamHI
EcoRI
HindIII
EcoRI XhoI
XhoI
HindIII BamHI
野生型
(小鼠第4號染色體)
TK: 胸苷激酶
NEO: 新黴素抗性基因
陰性選擇標記
TK
盒A
(HindIII-XhoI)
陽性選擇標記
NEO
盒B
(ClaI-SacII)
(線性化)
pKO-NTKV 1901
克隆的 MASP-2
k.o. 構建體
ClaI HindIII
HindIII
HindIII
EcoRI
BamHI
XhoI
NEO
ClaI
EcoRI
BamHI
HindIII
SacII
NotI
EcoRI XhoI
XhoI
HindIII BamHI
同源
重組後
對ES克隆 #21, 111, 169;
的DNA印跡結果:
HindIII
5.6 kb 靶
Neo 探針
HindIII
盒B探針
外部探針
EcoRI
3.3 kb 野生型
EcoRI
EcoRI
3 kb 靶
EcoRI
BamH1
10 kb 靶
BamH1
BamH1
12 kb 野生型
BamH1
*: 提出的事件外部的限制性位點

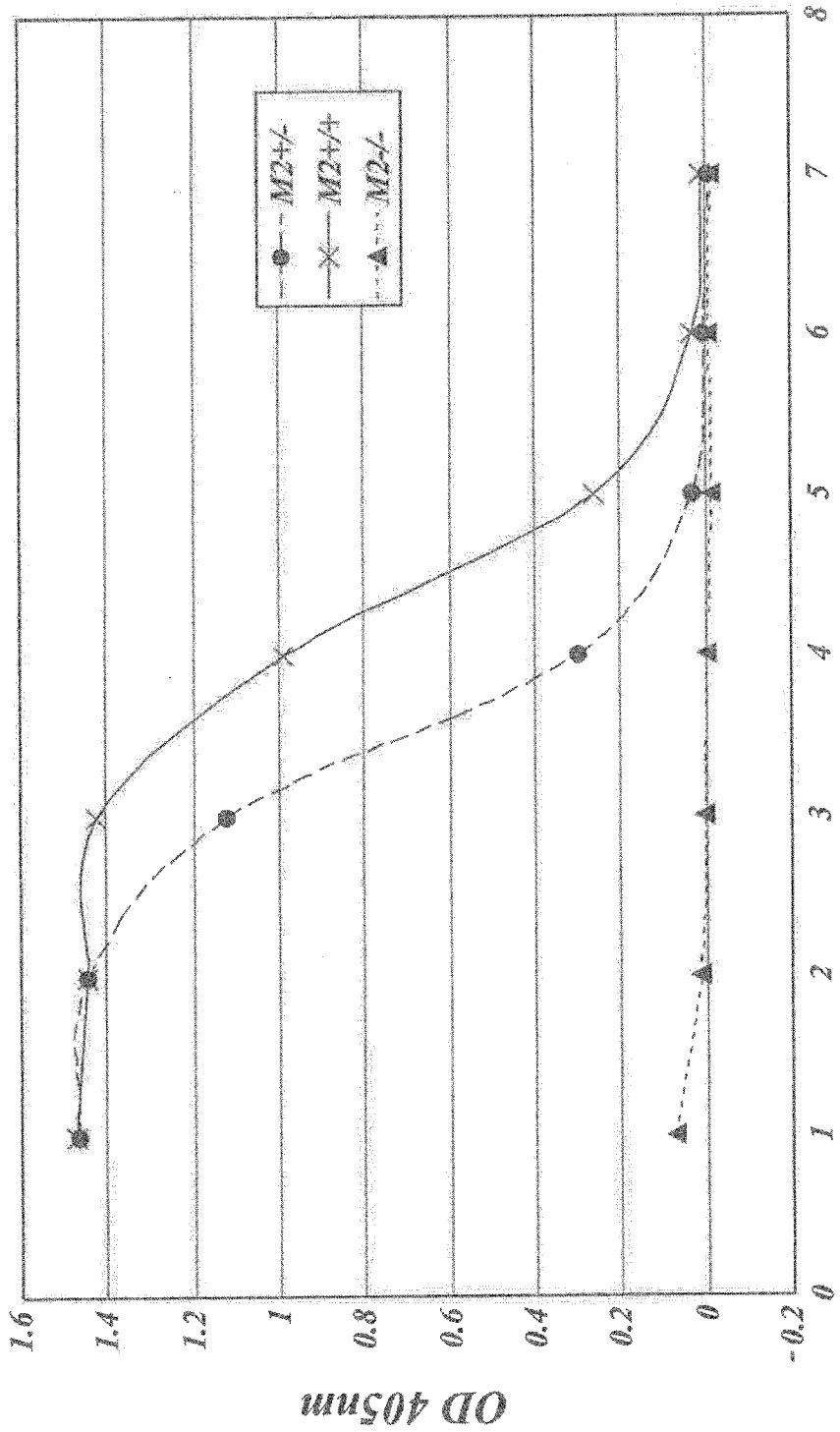
【圖 3】


外顯子
a
b
c
d +cDNA
5'UT
CUB I 結構域
EGF-樣 CUB II CCP I CCP II 絲氨酸蛋白酶結構域
MASP-2 mRNA
的 3'UT 區
800 bp 啓動子
內含子
83
157
1016

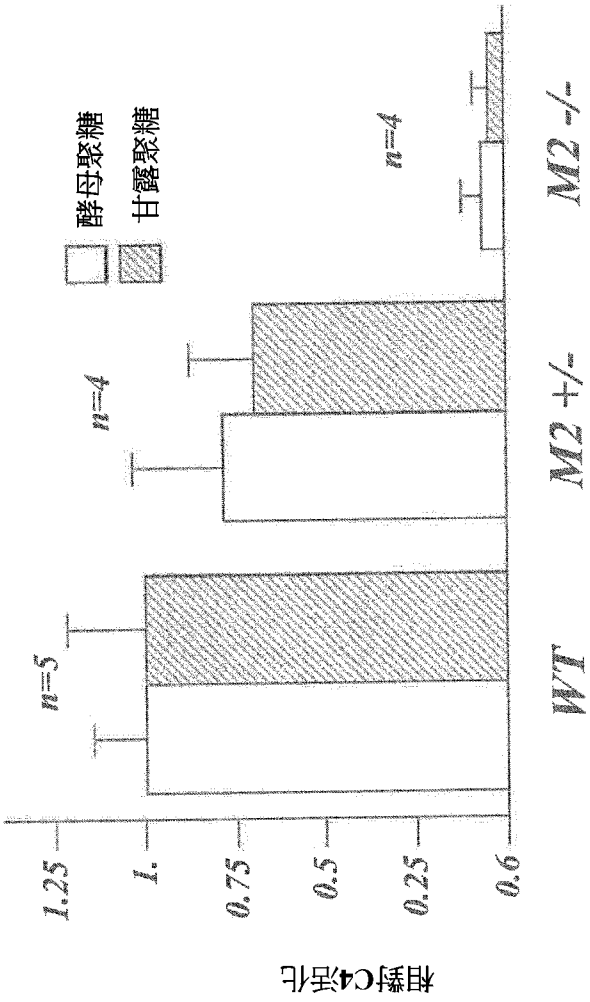
【圖 4】



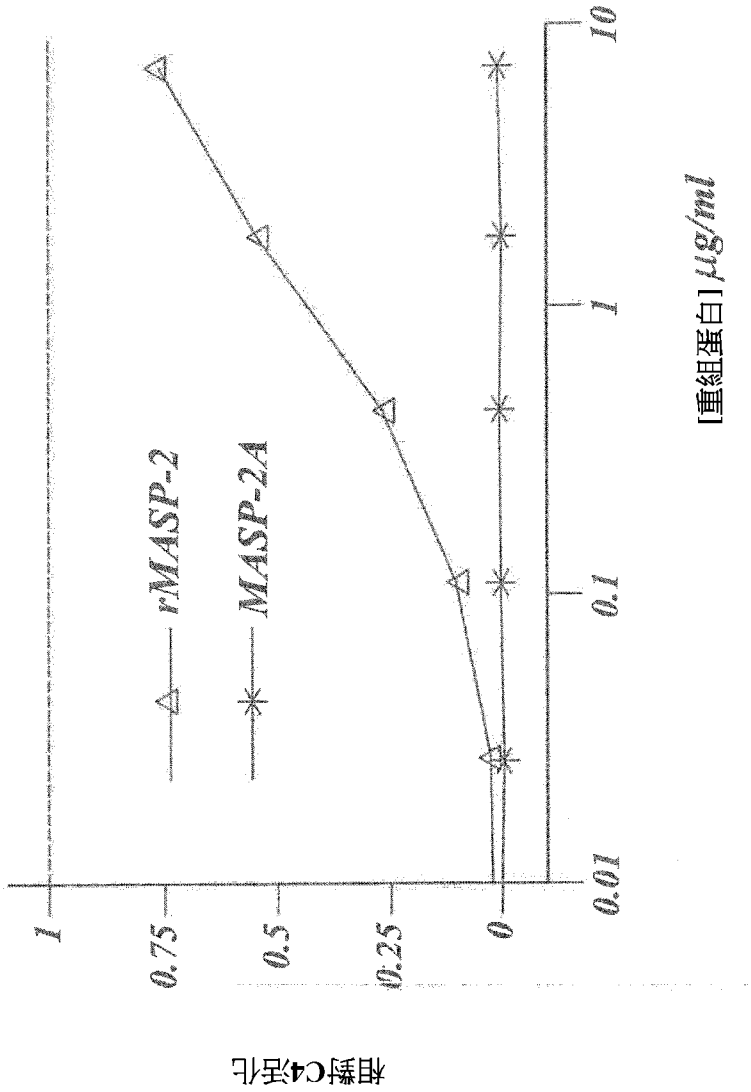
【圖 5A】



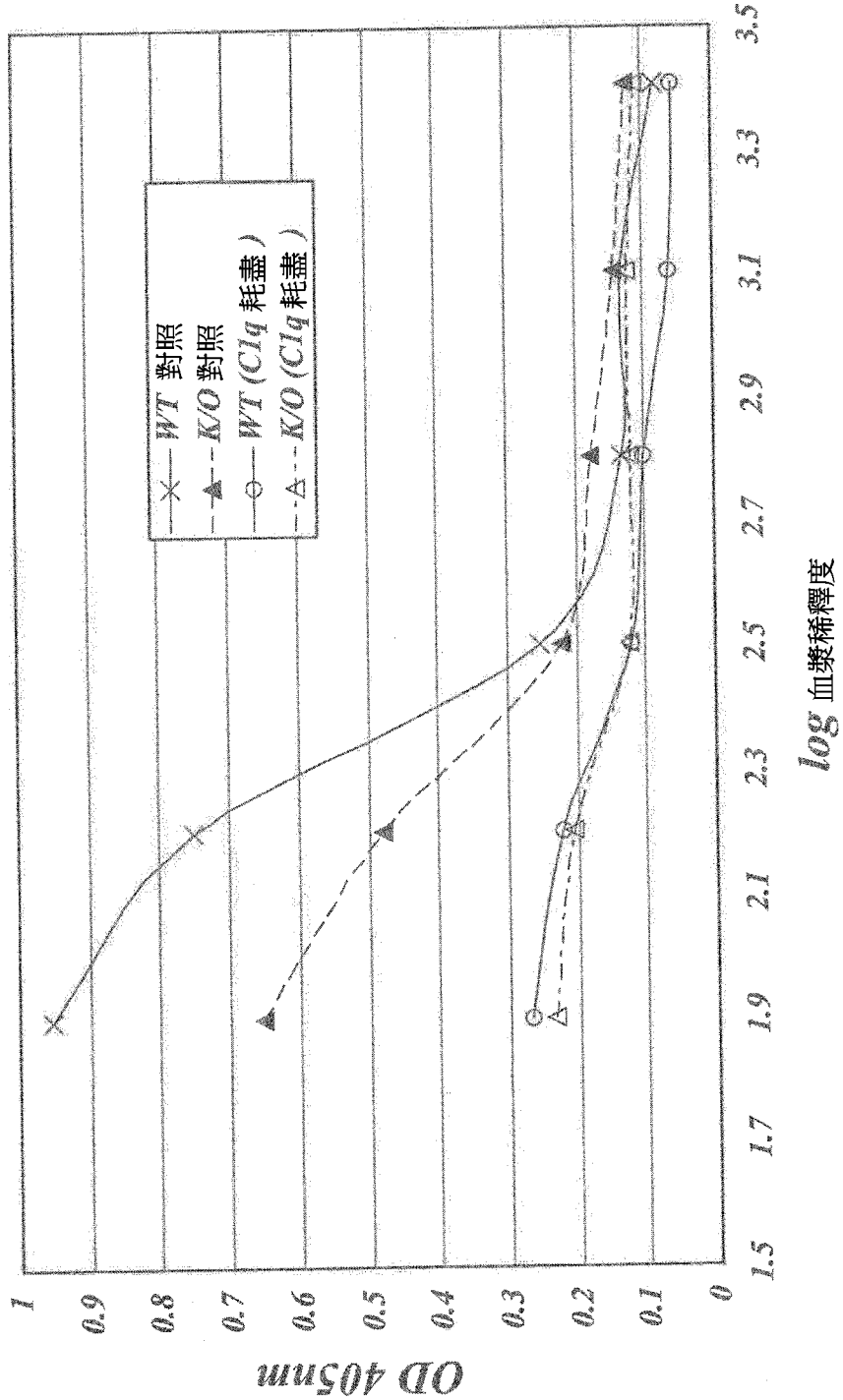
【圖 5B】



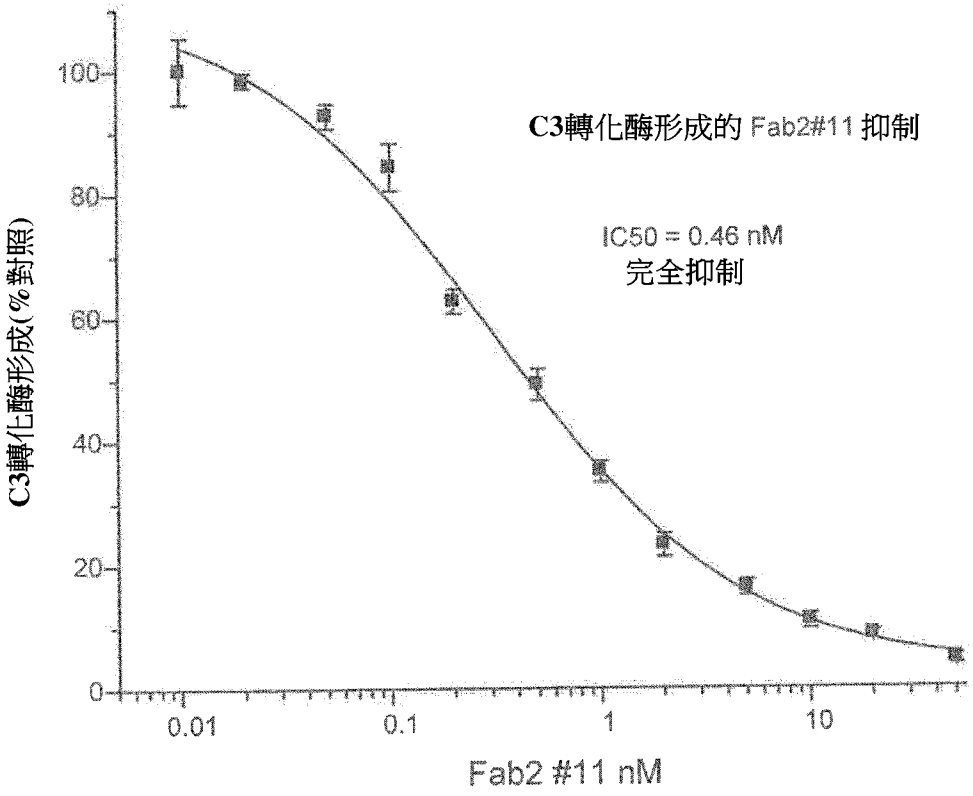
【圖 5C】



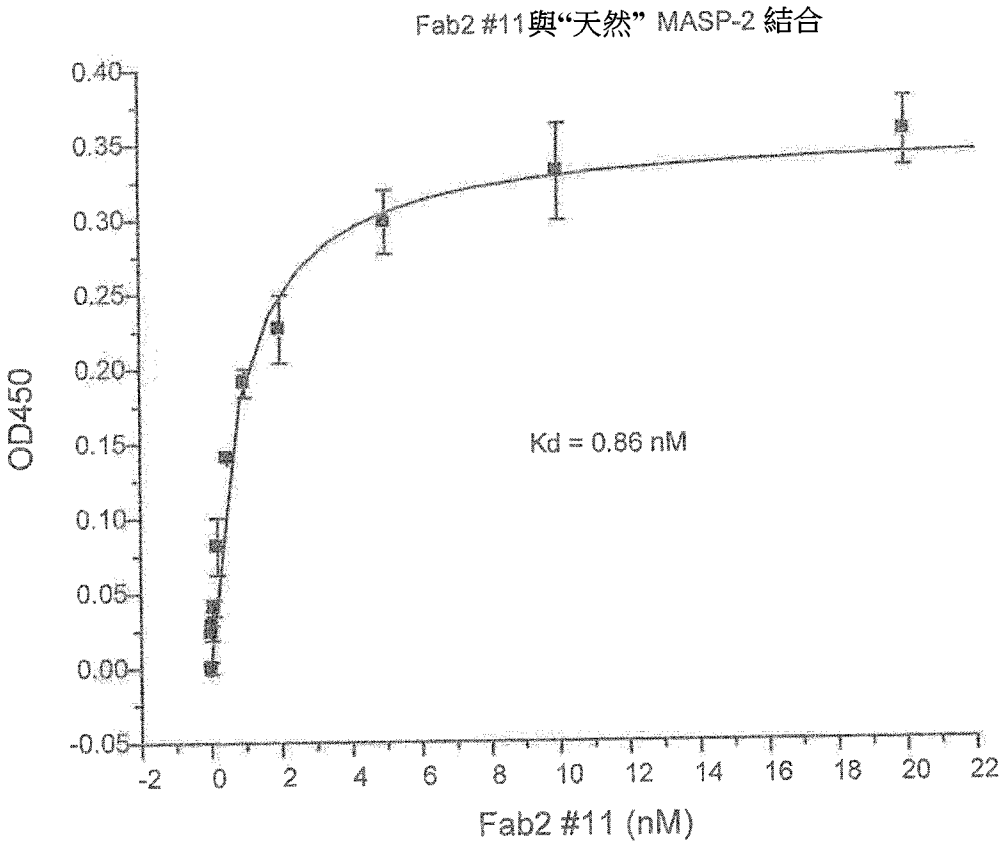
【圖6】


OD 405nm
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
1.5
1.7
1.9
2.1
2.3
2.5
2.7
2.9
3.1
3.3
3.5
log 血漿稀釋度
WT 對照
K/O 對照
WT (C1q 耗盡)
K/O (C1q 耗盡)

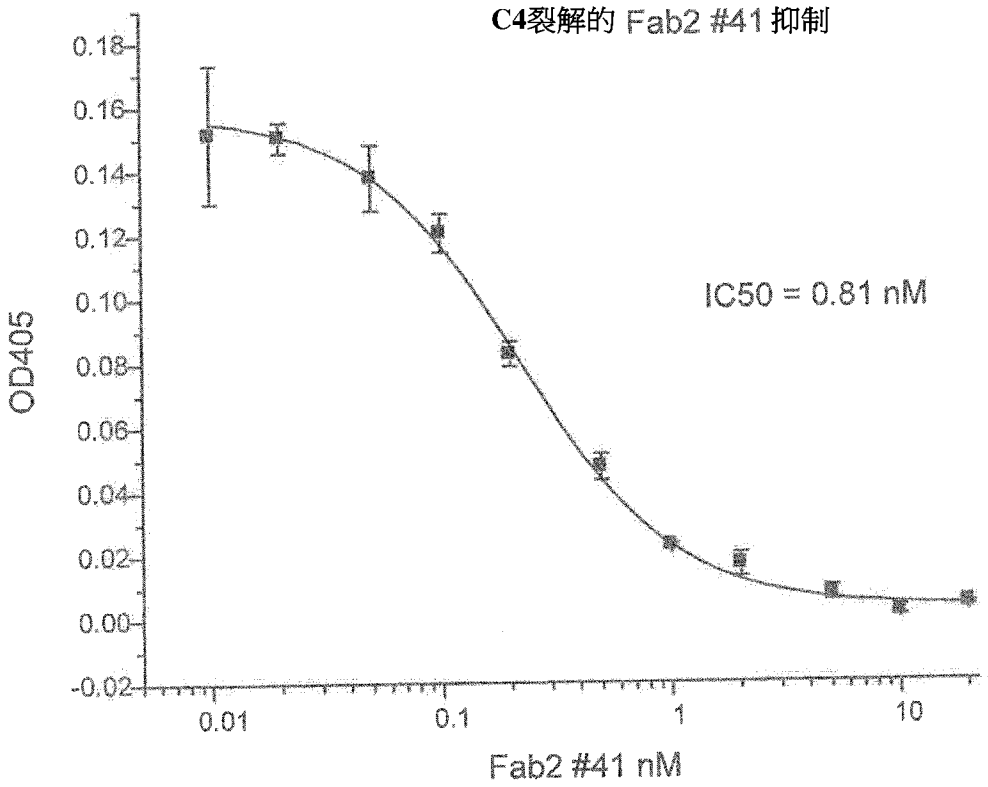
【圖 7】


C3轉化酶形成的 Fab2#11 抑制
IC50 = 0.46 nM
完全抑制
C3轉化酶形成(%對照)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
Fab2 #11 nM

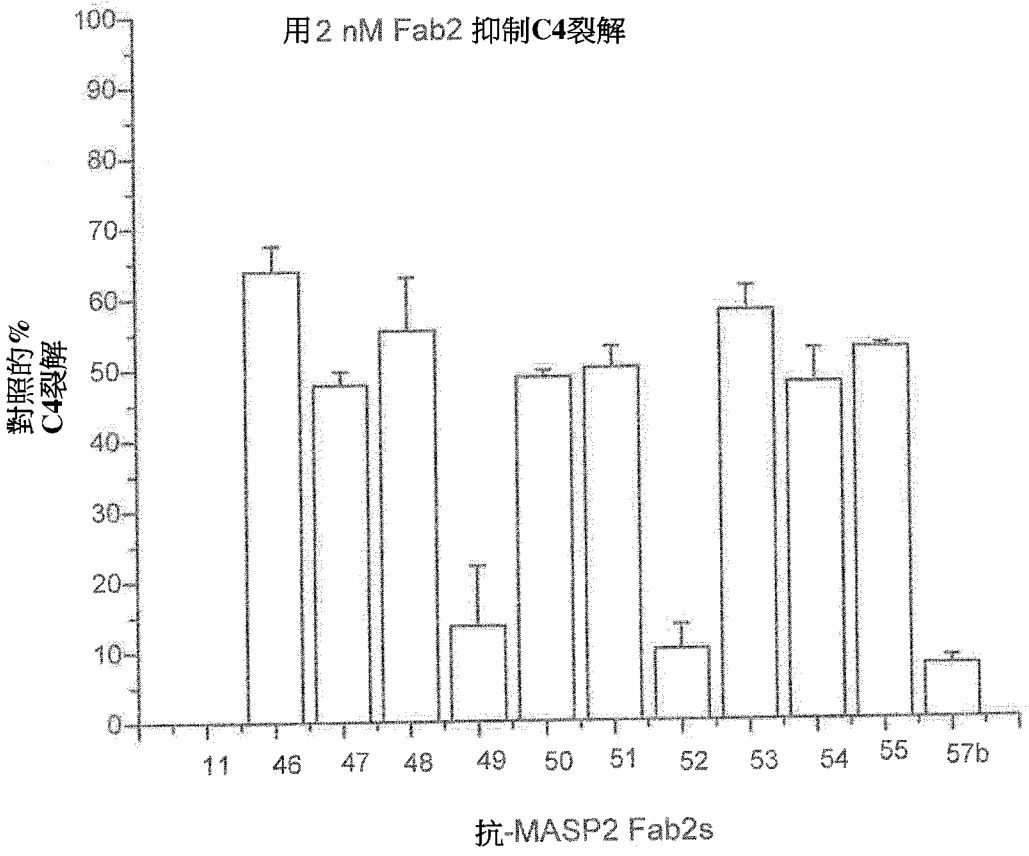
【圖 8A】


Fab2 #11與"天然" MASP-2 結合
OD450
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Kd = 0.86 nM
Fab2 #11 (nM)

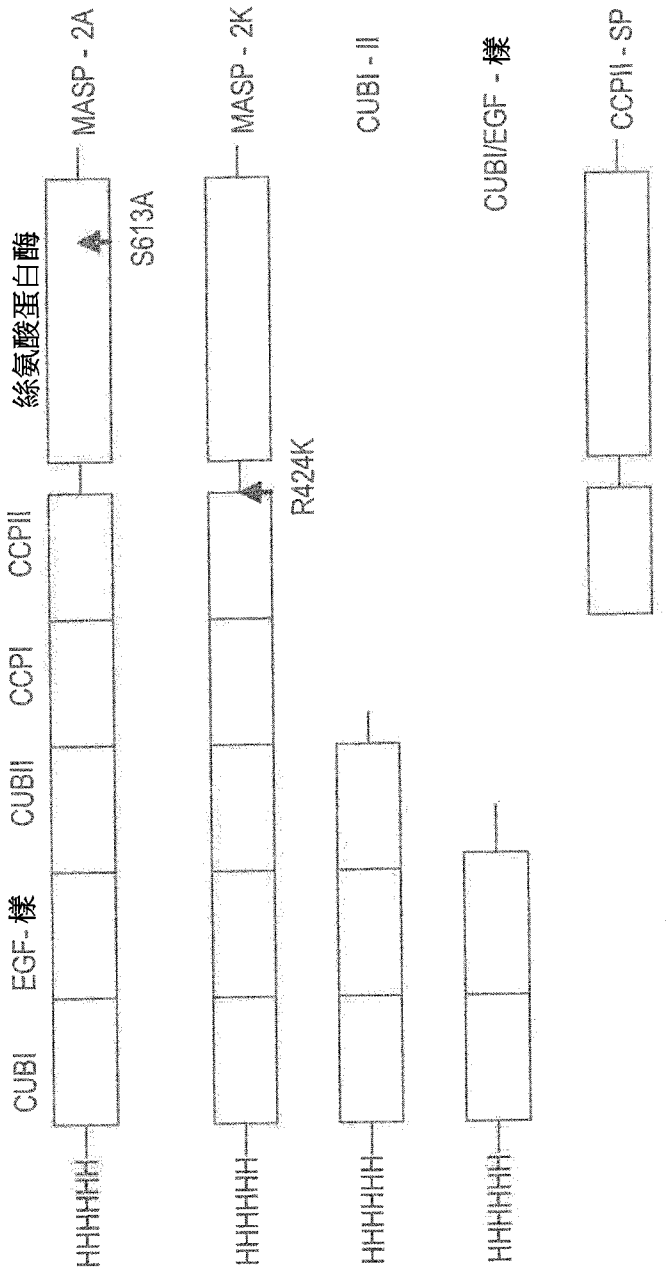
【圖 8B】


C4裂解的 Fab2 #41 抑制
IC50 = 0.81 nM
OD405
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
-0.02
0.01
0.1
1
10
Fab2 #41 nM

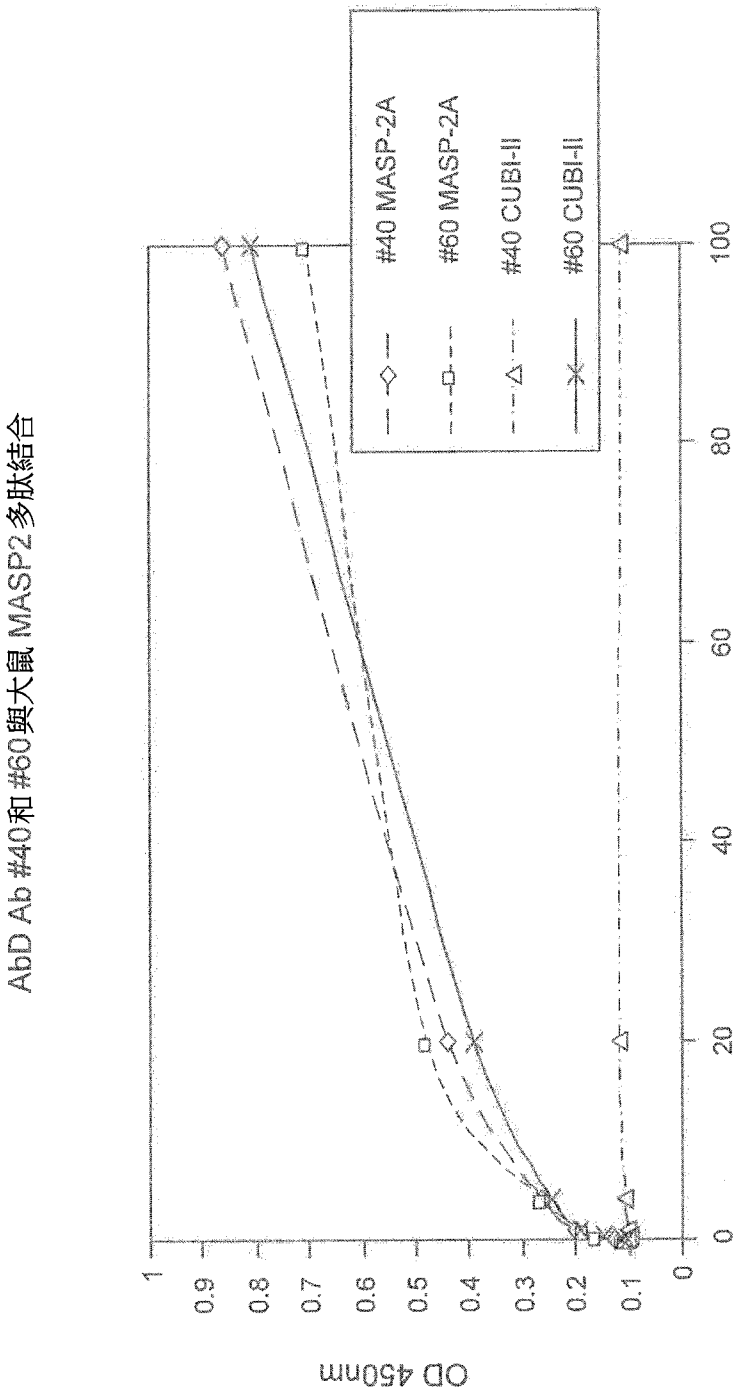
【圖 8C】


用2 nM Fab2 抑制C4裂解
對照的%
C4裂解
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
11
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
57b
抗-MASP2 Fab2s

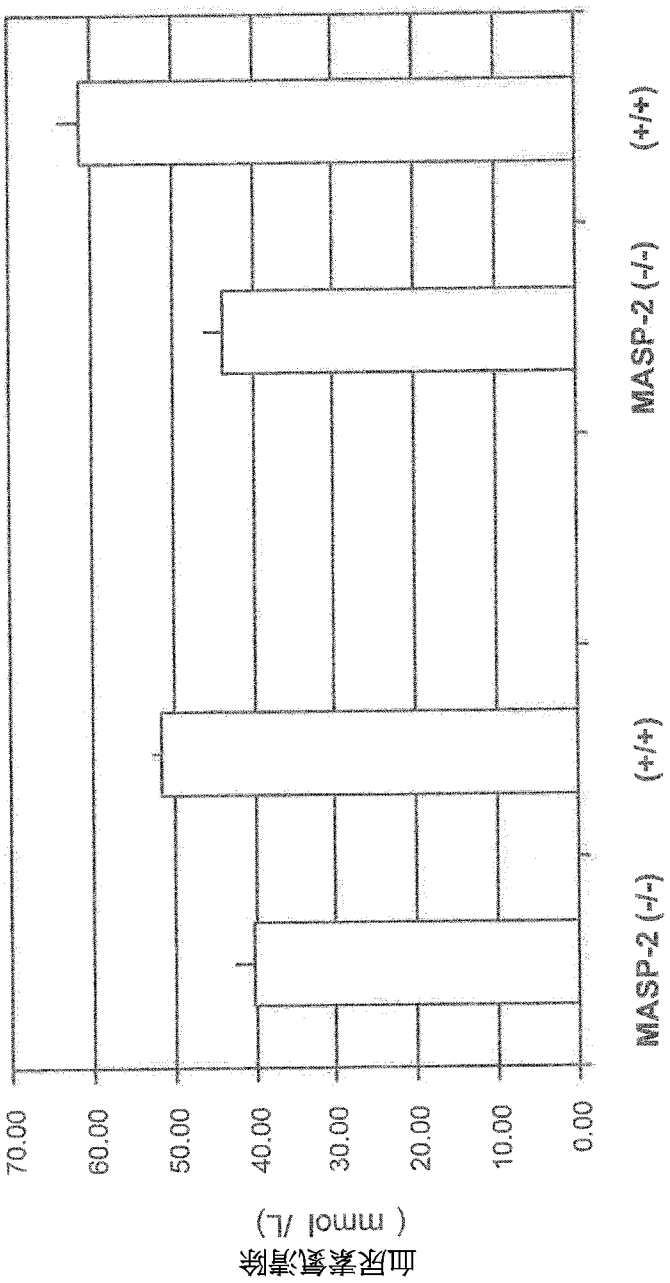
【圖 9】


CUBI
EGF-樣
CUBII
CCPI
CCPII
絲氨酸蛋白酶
MASP - 2A
S613A
HHHHHH
MASP - 2K
R424K
HHHHHH
CUBI - II
HHHHHH
CUBI/EGF - 樣
HHHHHH
CCPII - SP

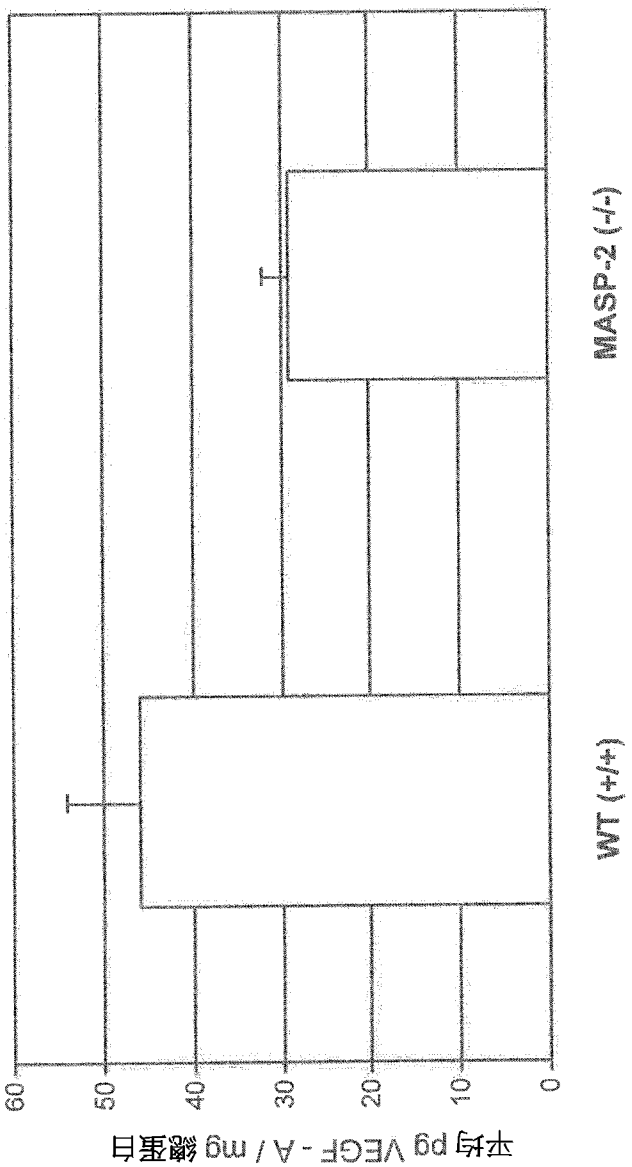
【圖 10】


AbD Ab #40和 #60與大鼠 MASP2多肽結合
#40 MASP-2A
#60 MASP-2A
#40 CUBI-II
#60 CUBI-II
OD 450nm
[Ab] nM
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
0
20
40
60
80
100

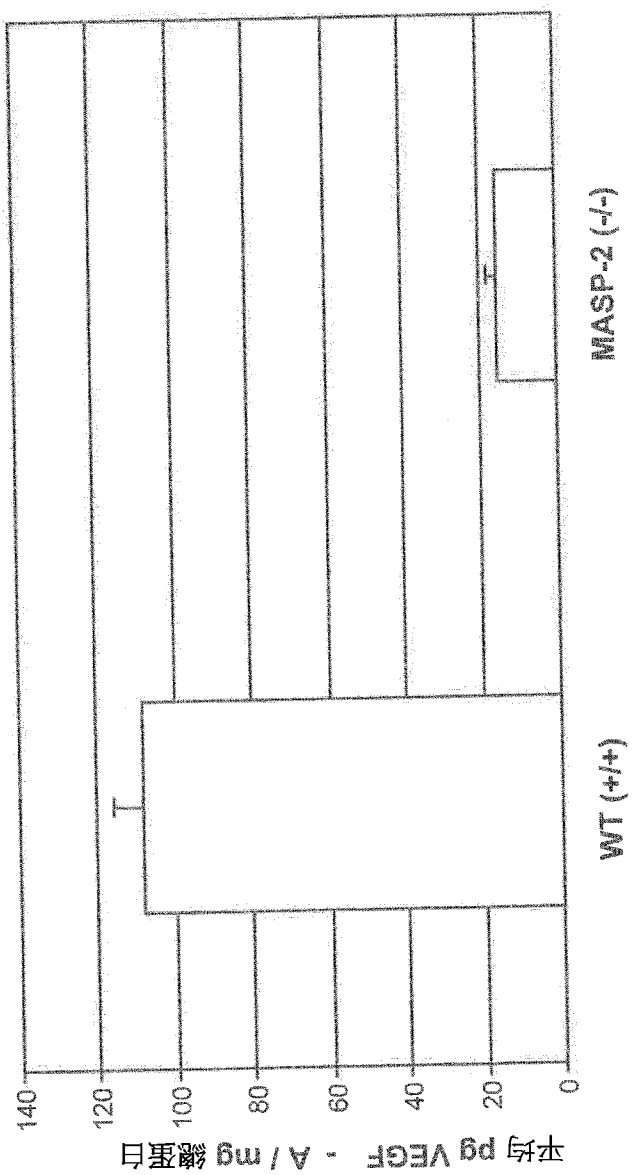
【圖 11】


血尿素氮清除
(mmol /L)
70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
MASP-2 (-/-)
(+/+)
24 hr
MASP-2 (-/-)
(+/+)
48 hr

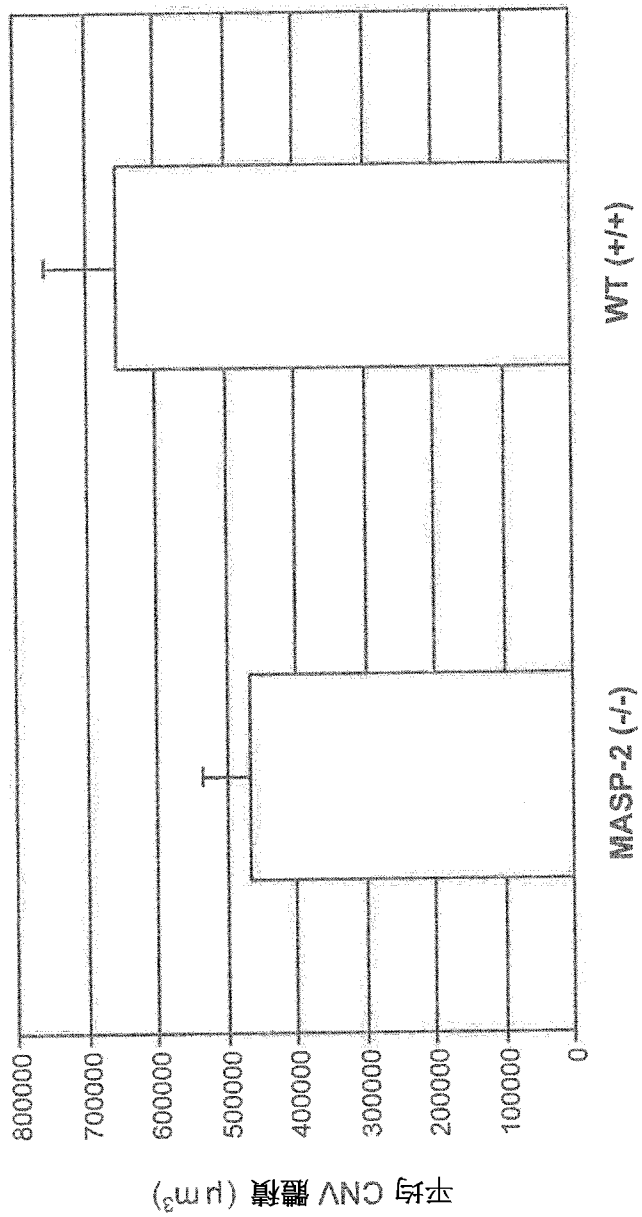
【圖 12】



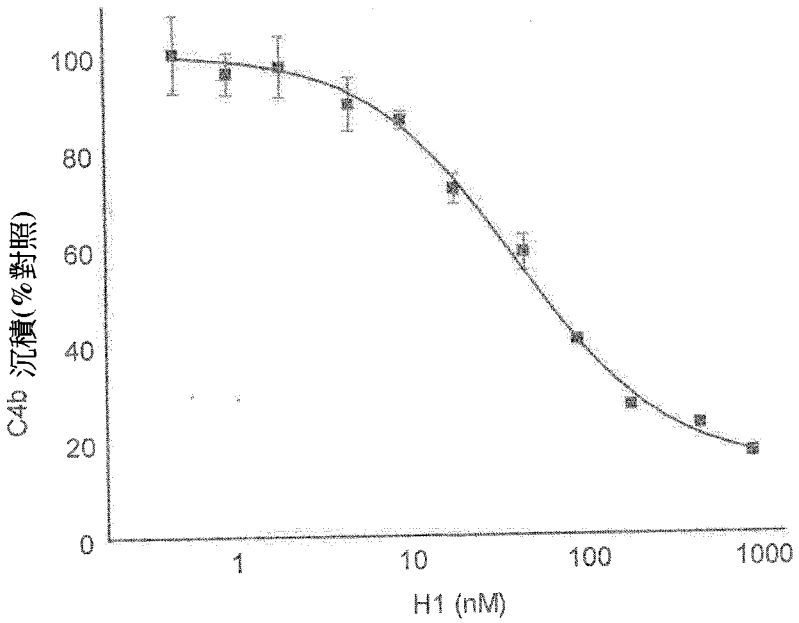
【圖 13A】



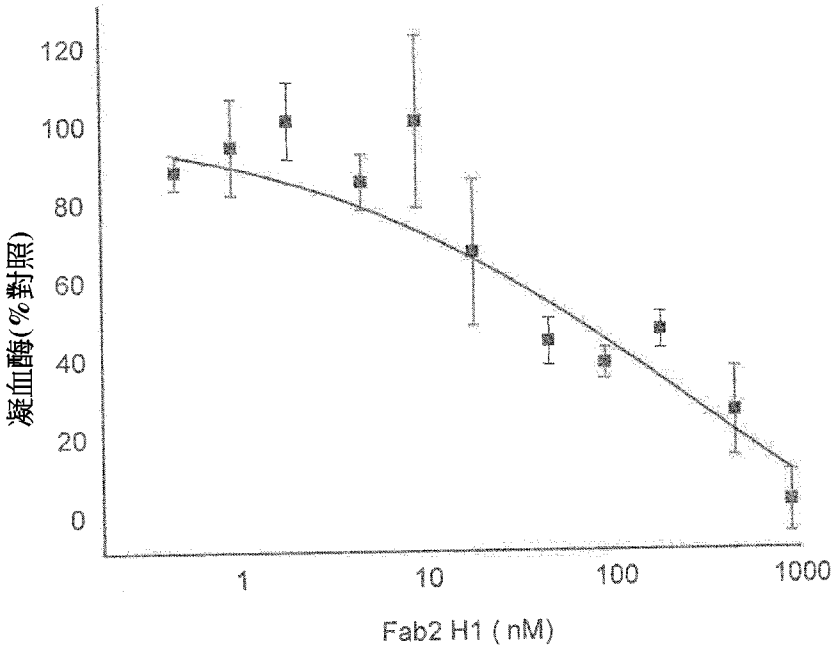
【圖 13B】


平均 CNV 體積 (μm^3)
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
WT (+/+)
MASP-2 (-/-)

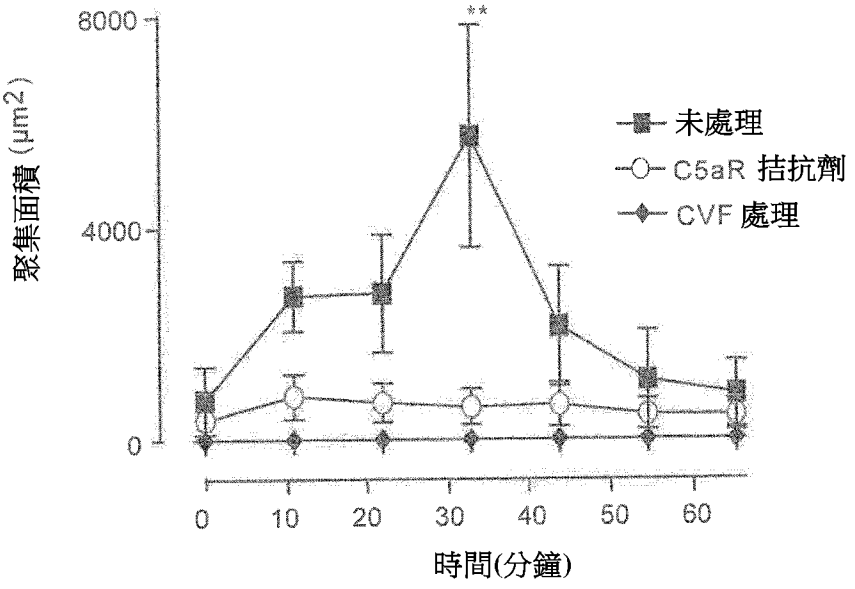
【圖 14】


100
80
60
40
20
0
C4b 沉積(%對照)
1
10
100
1000
H1 (nM)

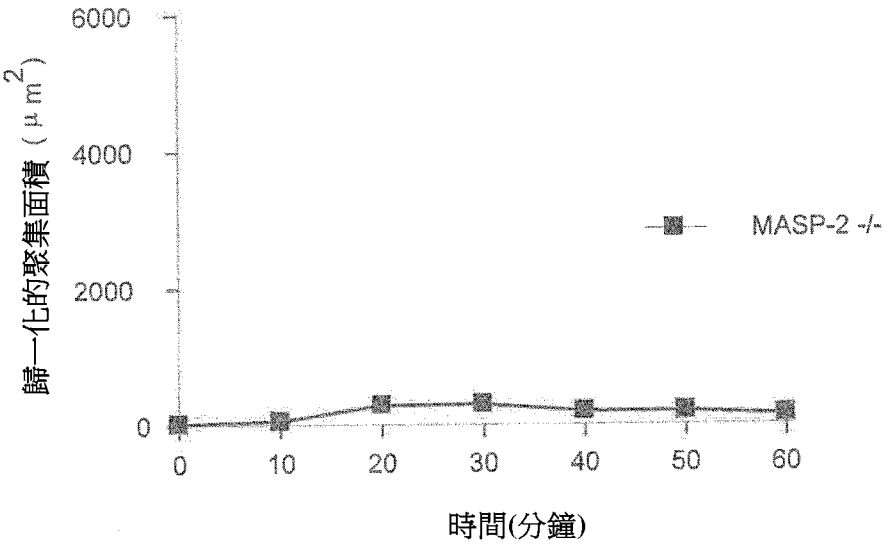
【圖 15A】


120
100
80
60
40
20
0
凝血酶(%對照)
1
10
100
1000
Fab2 H1 (nM)

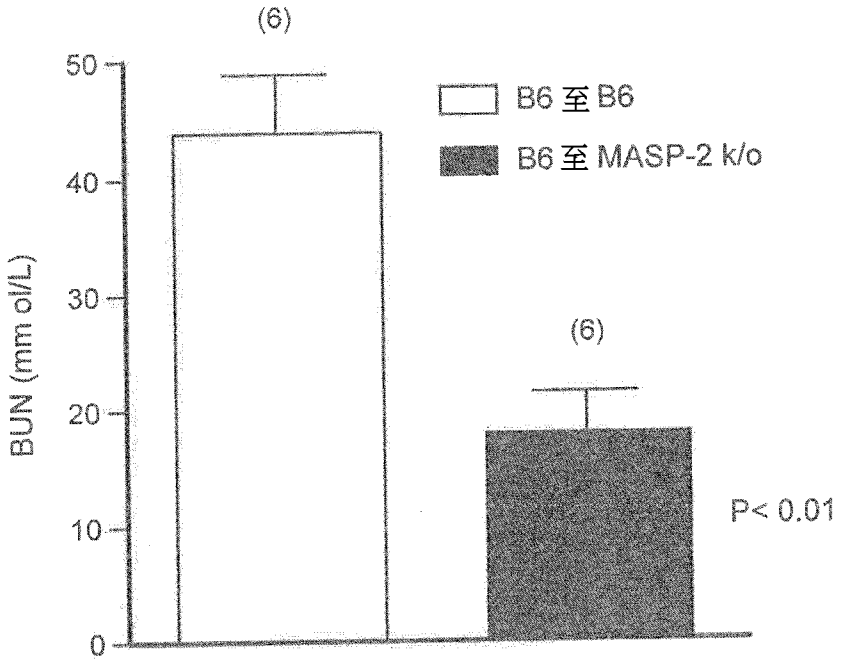
【圖 15B】


8000
4000
0
聚集面積 (μm2)
**
未處理
C5aR 拮抗劑
CVF 處理
0
10
20
30
40
50
60
時間(分鐘)

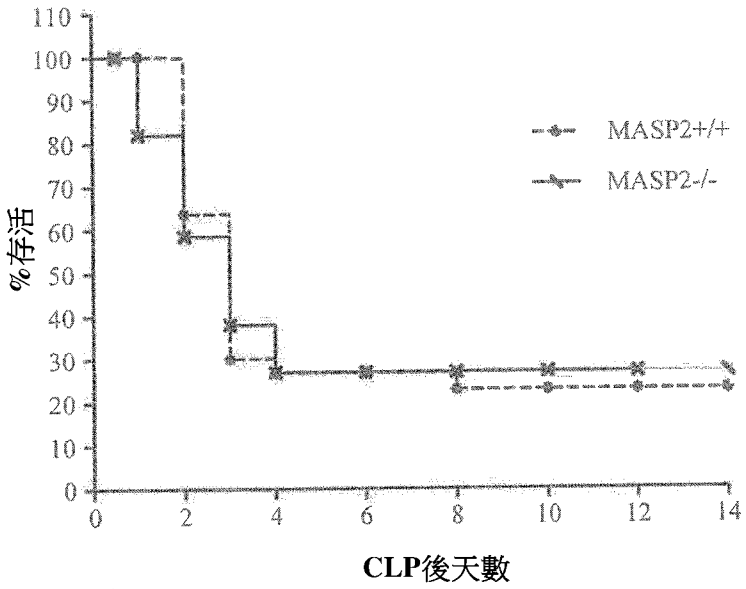
【圖 16A】


6000
4000
2000
0
歸一化的聚集面積 (μm2)
MASP-2 -/-
0
10
20
30
40
50
60
時間(分鐘)

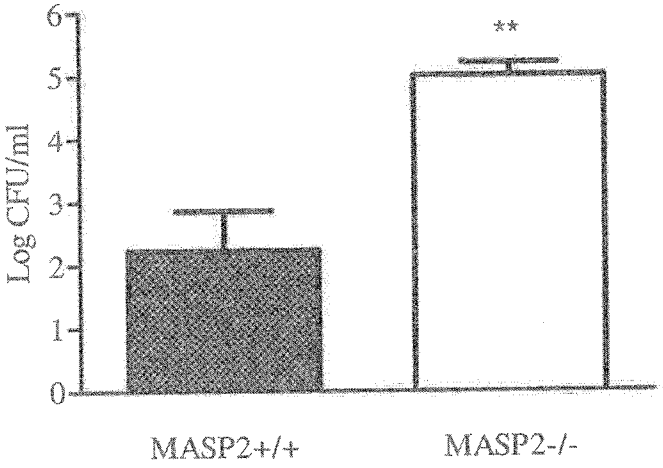
【圖 16B】



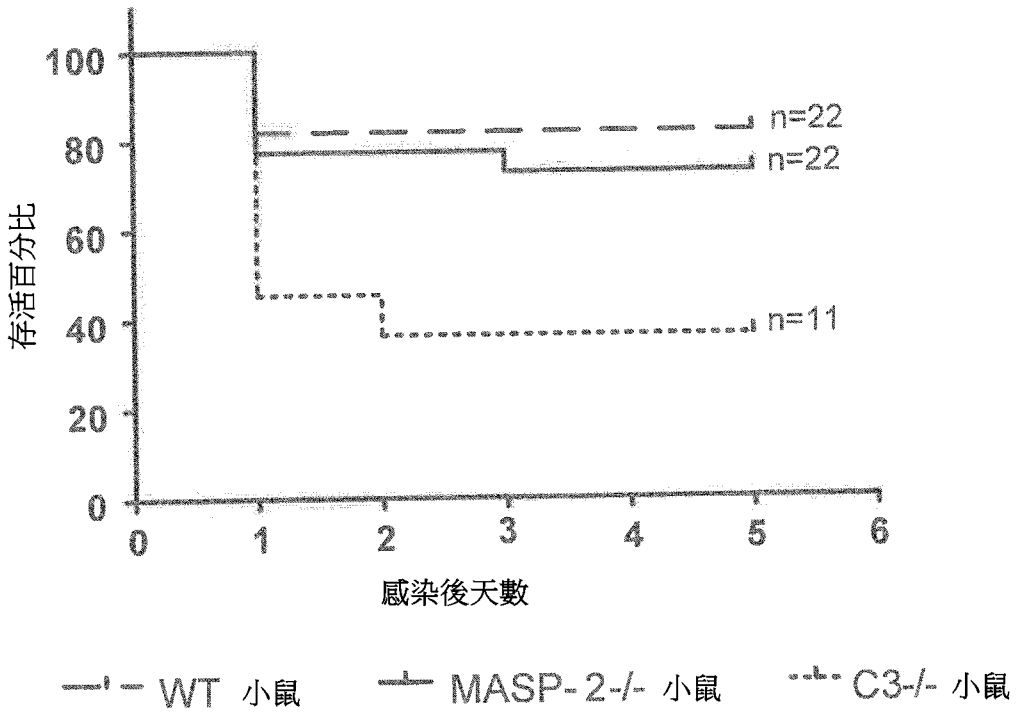
【圖 17】


110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
%存活
0
2
4
6
8
10
12
14
CLP後天數
MASP2+/+
MASP2-/-

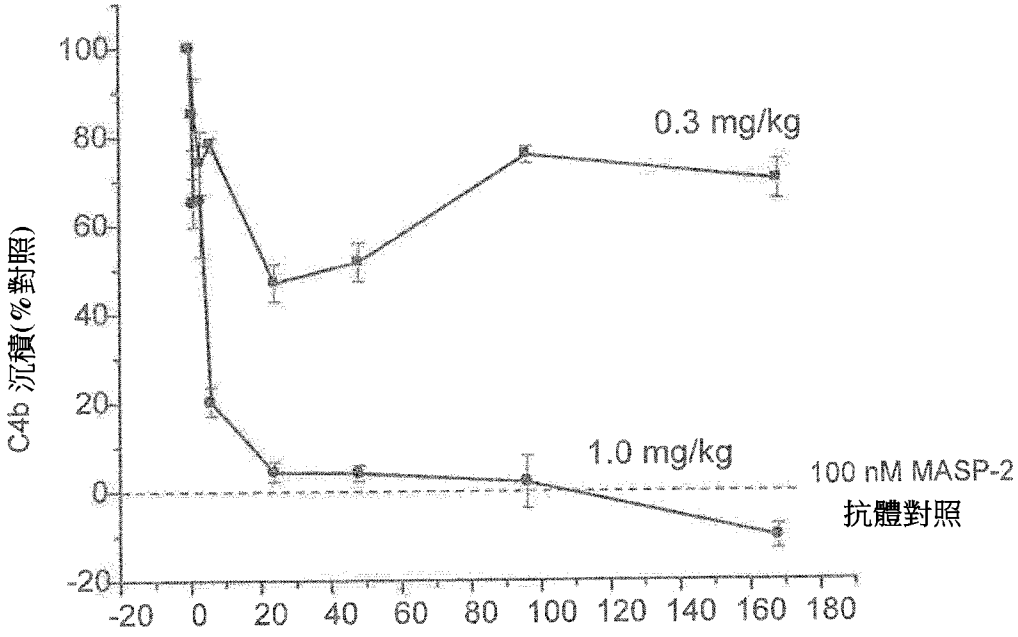
【圖 18】


6
5
4
3
2
1
0
Log CFU/ml
**
MASP2+/+
MASP2-/-

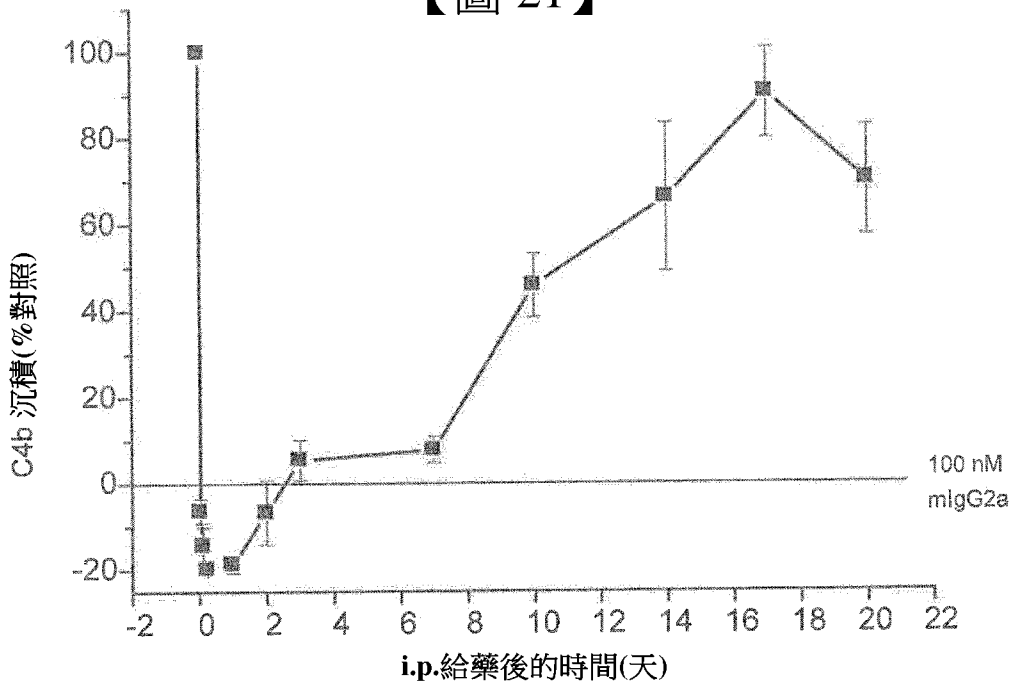
【圖 19】


100
80
60
40
20
0
存活百分比
0
1
2
3
4
5
6
感染後天數
n=22
n=22
n=11
WT 小鼠
MASP-2-/- 小鼠
C3-/- 小鼠

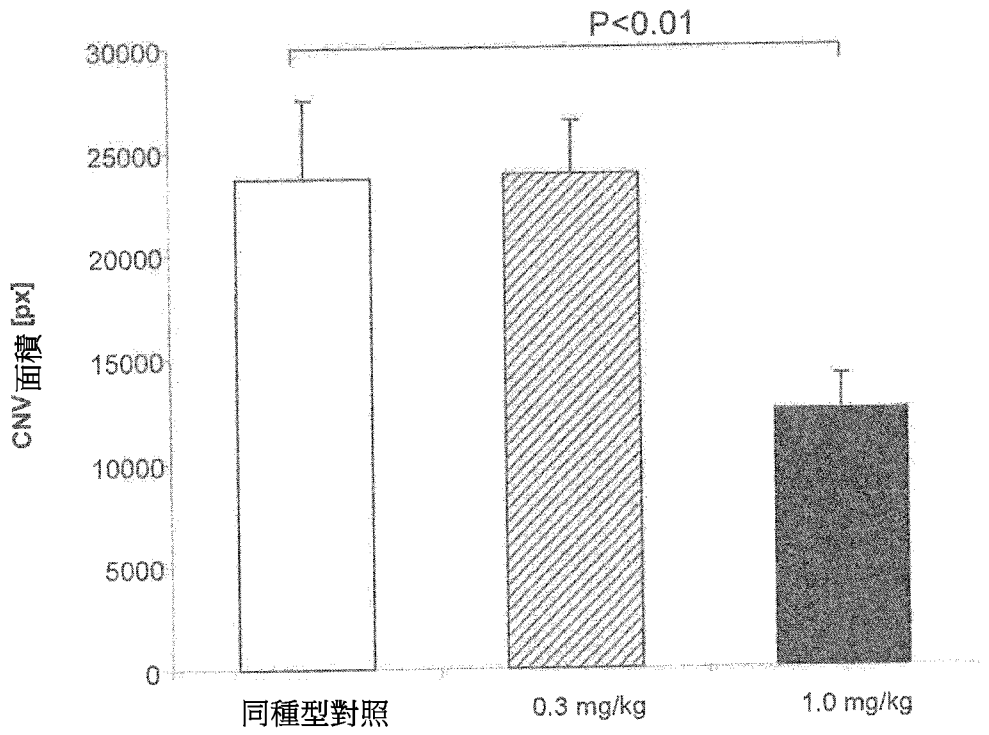
【圖 20】


C4b 沉積(%對照)
100
80
60
40
20
0
-20
0.3 mg/kg
1.0 mg/kg
100 nM MASP-2
抗體對照
-20 0 20 40 60 80 100 120 140 160 180
s.c.給藥後的時間(小時)

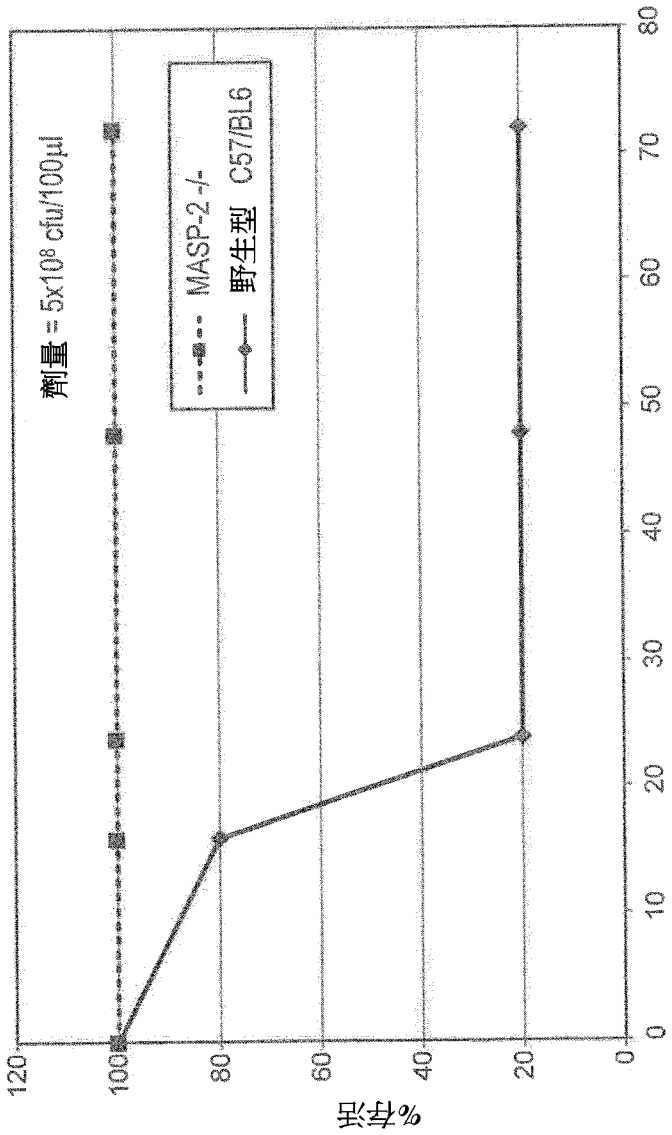
【圖 21】


C4b 沉積(%對照)
100
80
60
40
20
0
-20
100 nM
mIgG2a
-2 0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
i.p.給藥後的時間(天)

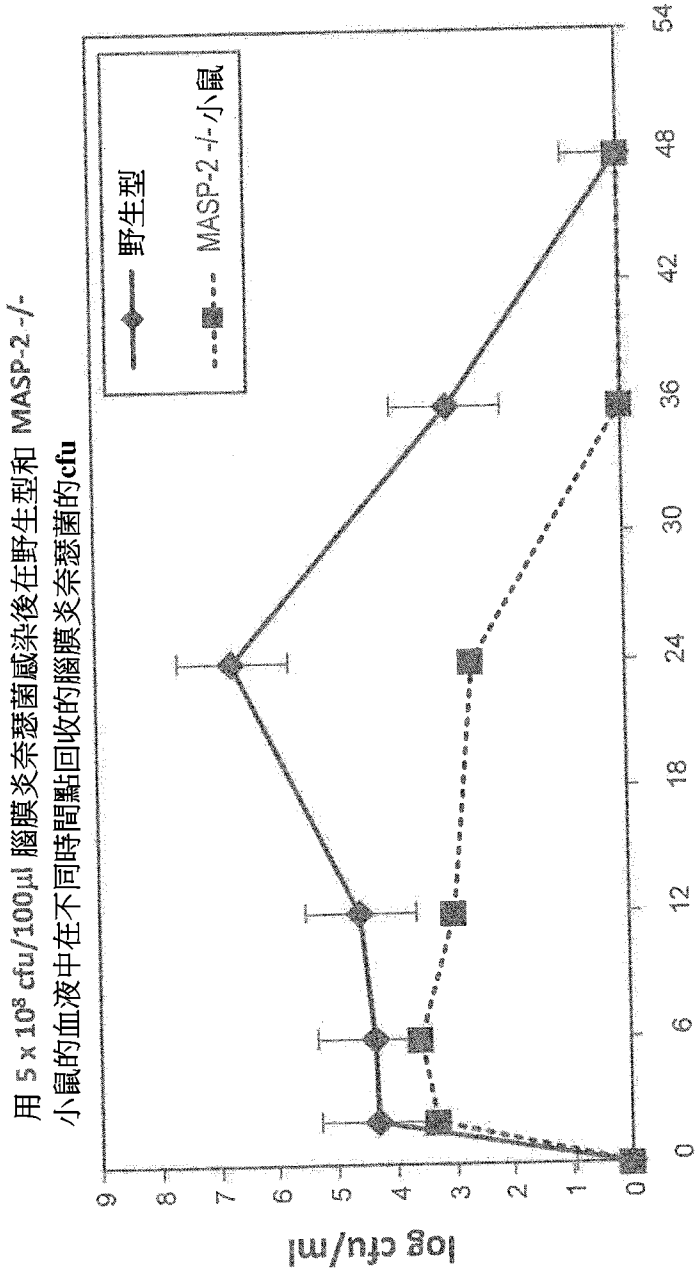
【圖 22】


P<0.01
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
CNV面積 [px]
同種型對照
0.3 mg/kg
1.0 mg/kg

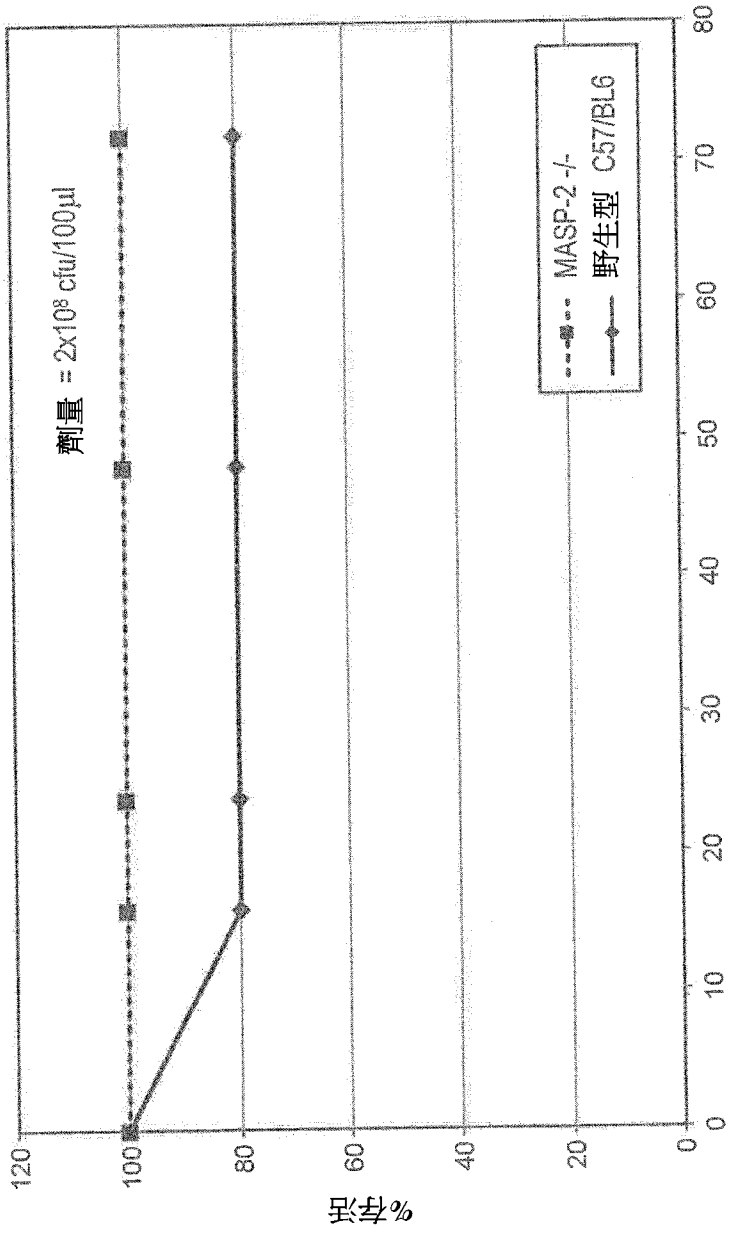
【圖 23】


劑量 = 5x10⁸ cfu/100μl
MASP-2 -/-
野生型 C57/BL6
%存活
時間(小時)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80

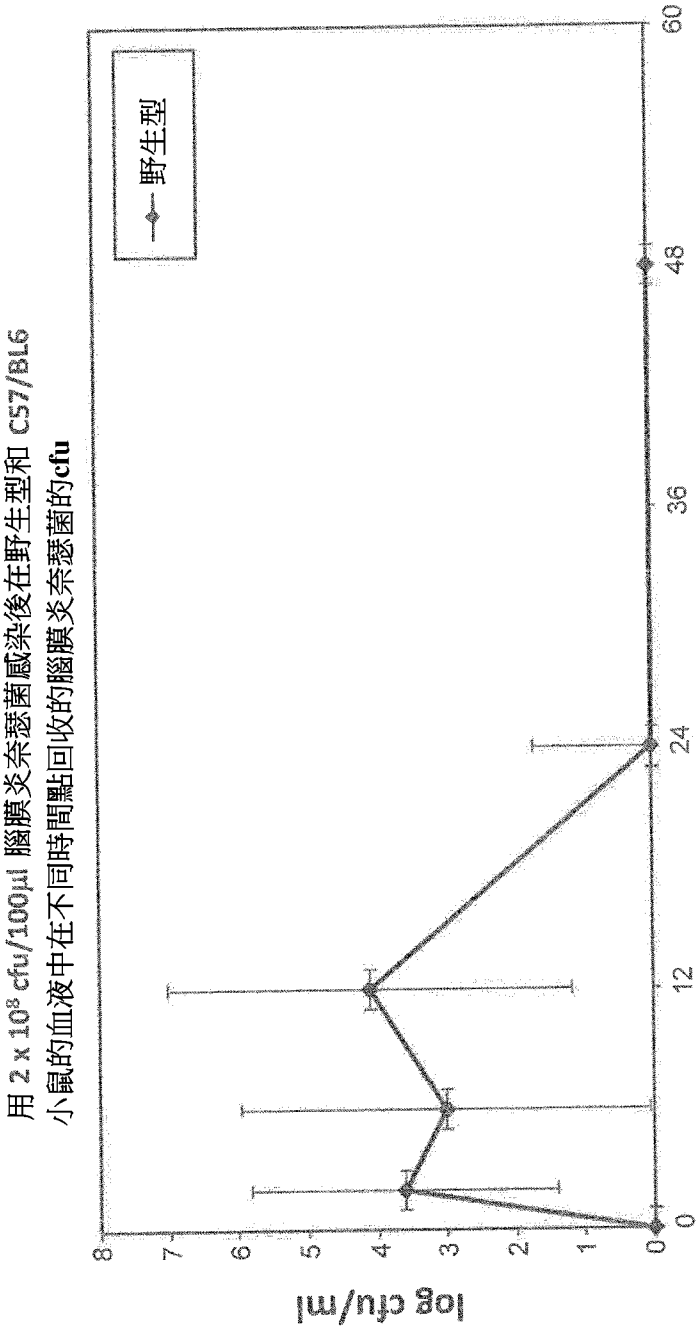
【圖 24A】


用 5 x 10⁸ cfu/100μl 腦膜炎奈瑟菌感染後在野生型和 MASP-2 -/-
小鼠的血液中在不同時間點回收的腦膜炎奈瑟菌的cfu
野生型
MASP-2 -/- 小鼠
log cfu/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
0
6
12
18
24
30
36
42
48
54
時間(小時)

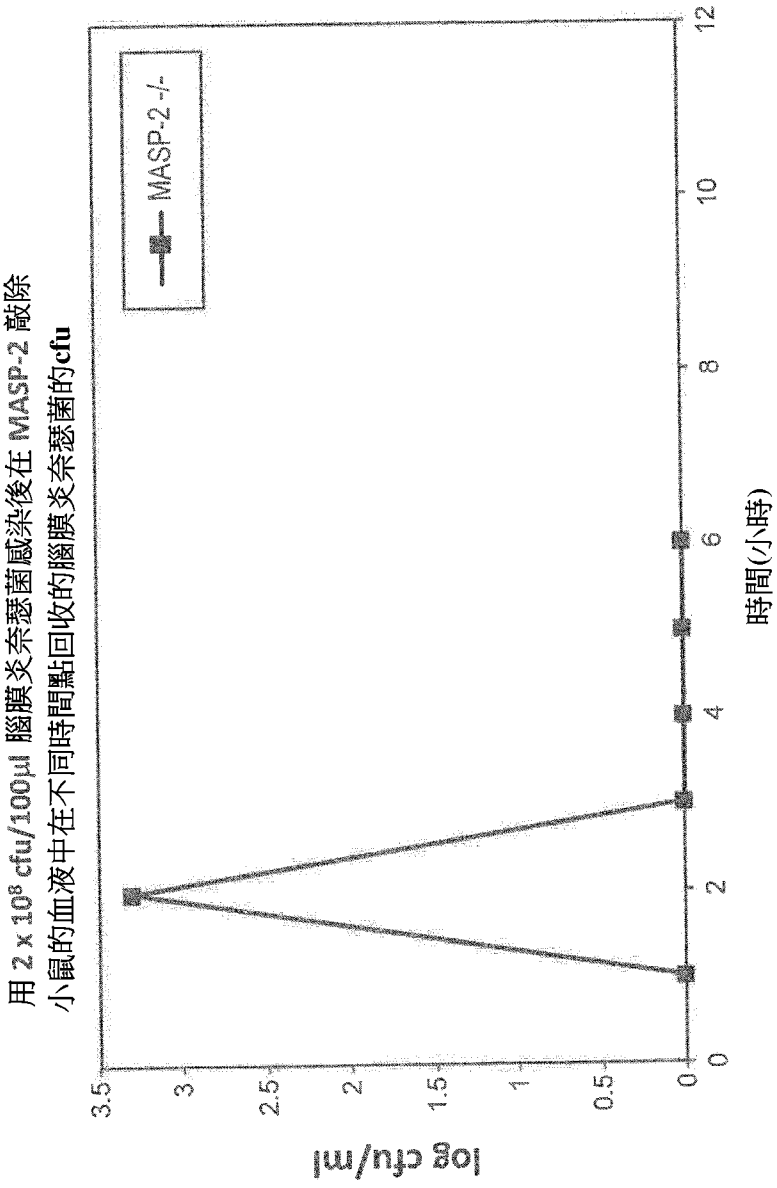
【圖 24B】


劑量 = 2x10⁸ cfu/100µl
MASP-2 -/-
野生型 C57/BL6
%存活
時間(小時)
0
20
40
60
80
100
120
0
10
20
30
40
50
60
70
80

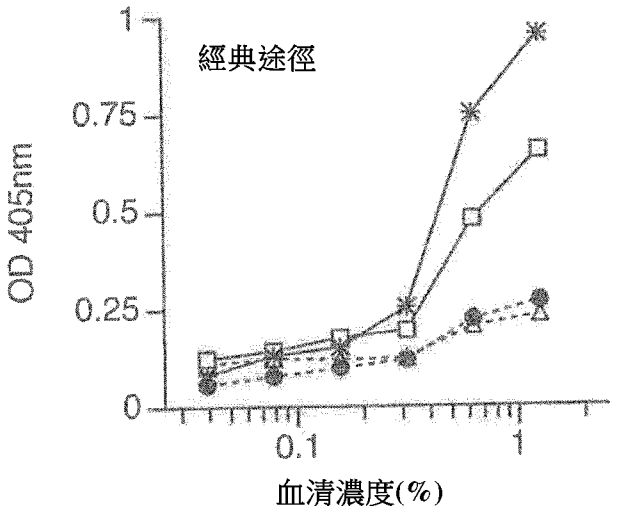
【圖 25A】


用 2 x 10³ cfu/100μl 腦膜炎奈瑟菌感染後在野生型和 C57/BL6
小鼠的血液中在不同時間點回收的腦膜炎奈瑟菌的cfu
野生型
log cfu/ml
0
1
2
3
4
5
6
7
8
0
12
24
36
48
60
時間(小時)

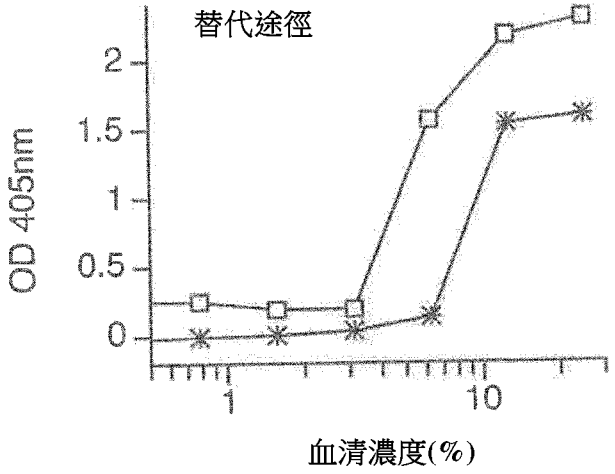
【圖 25B】


用 2 x 10^8 cfu/100μl 腦膜炎奈瑟菌感染後在 MASP-2 敲除
小鼠的血液中在不同時間點回收的腦膜炎奈瑟菌的cfu
MASP-2 -/-
log cfu/ml
時間(小時)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
0
2
4
6
8
10
12

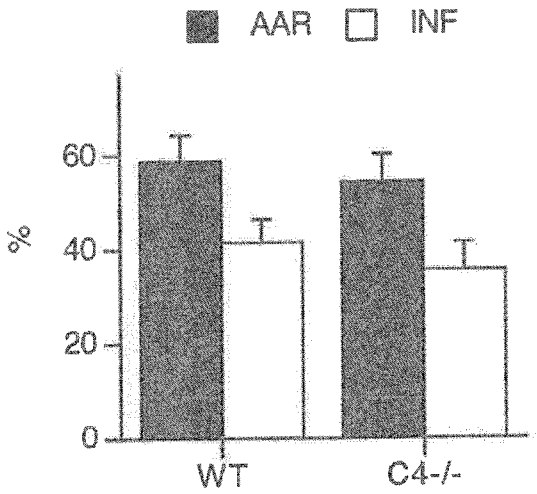
【圖 25C】


經典途徑
OD 405nm
1
0.75
0.5
0.25
0
0.1
1
血清濃度(%)

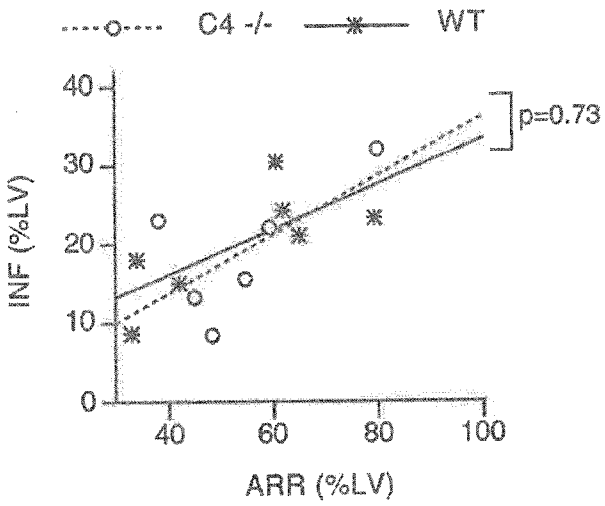
【圖 26A】


替代途徑
OD 405nm
2
1.5
1
0.5
0
1
10
血清濃度(%)

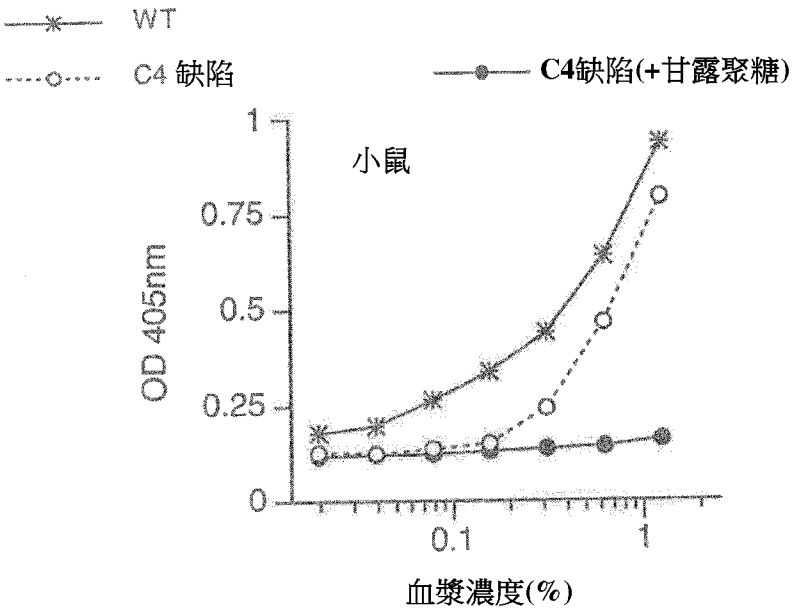
【圖 26B】


AAR
INF
%
60
40
20
0
WT
C4-/-

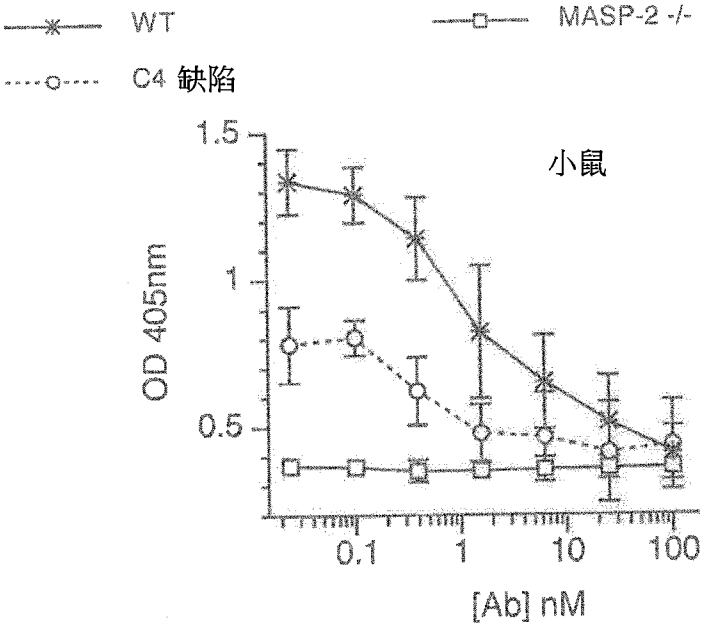
【圖 27A】


C4 -/-
WT
p=0.73
INF (%LV)
40
30
20
10
0
40
60
80
100
ARR (%LV)

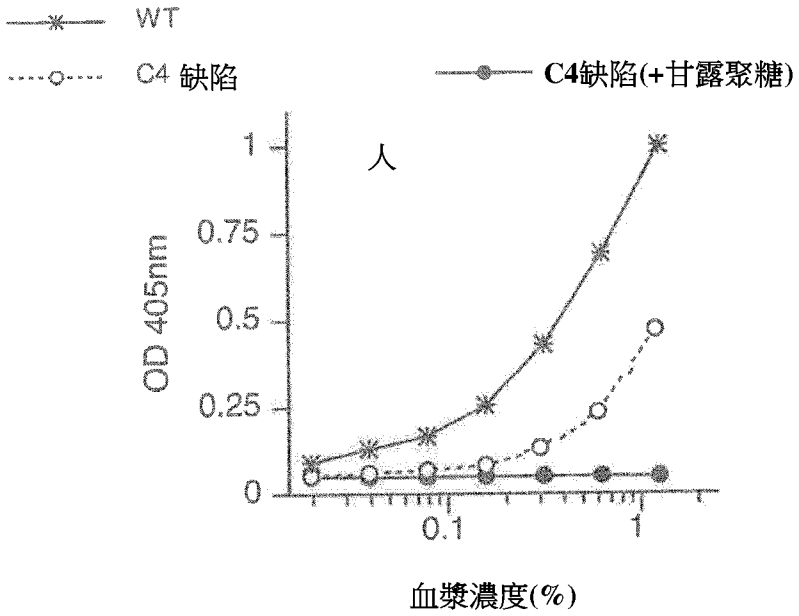
【圖 27B】


WT
C4 缺陷
C4缺陷(+甘露聚糖)
小鼠
OD 405nm
1
0.75
0.5
0.25
0
0.1
1
血漿濃度(%)

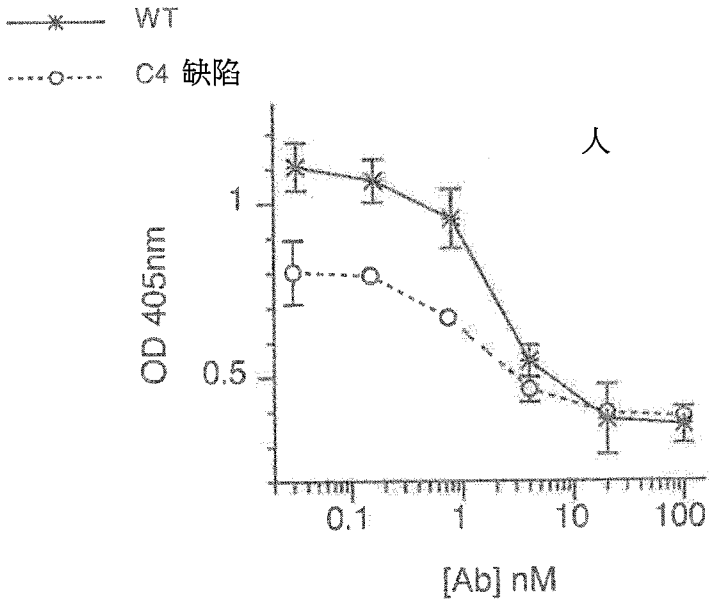
【圖 28A】


WT
MASP-2 -/-
C4 缺陷
小鼠
OD 405nm
1.5
1
0.5
0.1
1
10
100
[Ab] nM

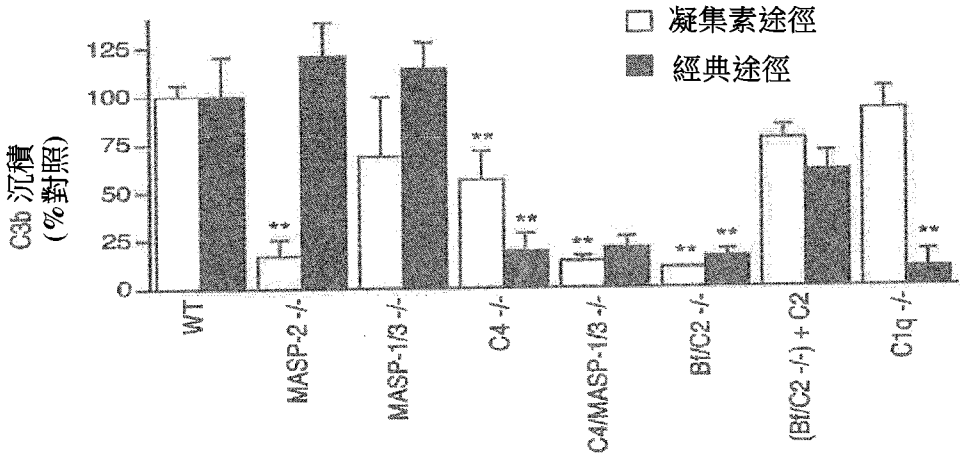
【圖 28B】


WT
C4 缺陷
C4缺陷(+甘露聚糖)
人
OD 405nm
1
0.75
0.5
0.25
0
0.1
1
血漿濃度(%)

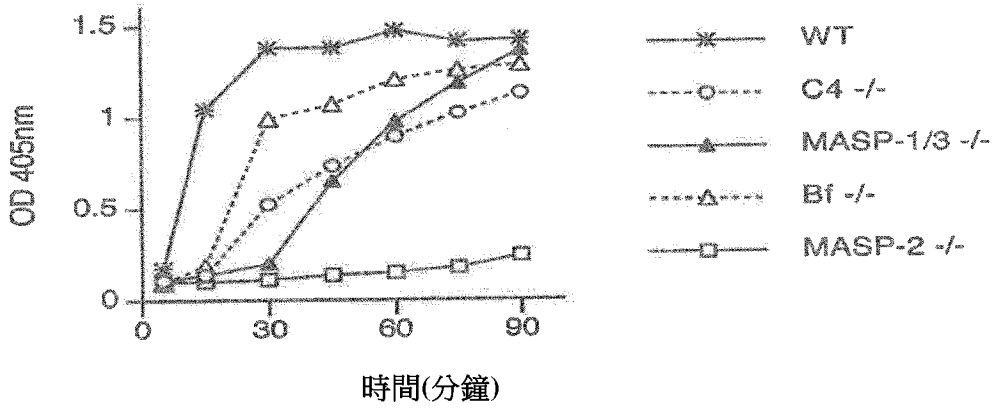
【圖 28C】


WT
C4 缺陷
人
OD 405nm
1
0.5
0.1
1
10
100
[Ab] nM

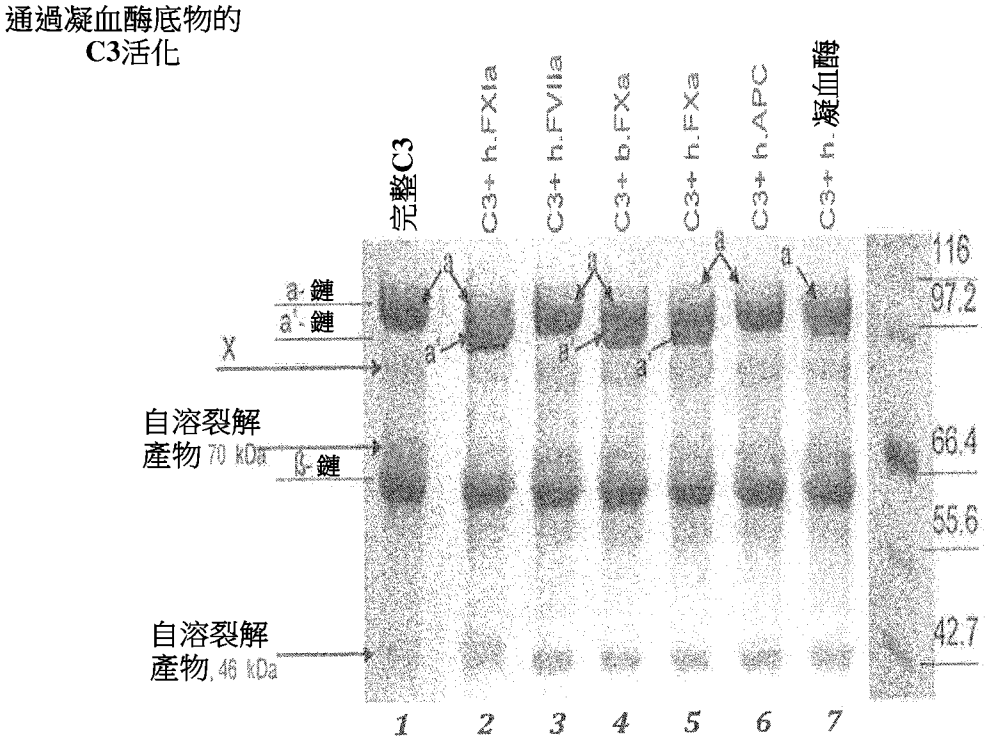
【圖 28D】


凝集素途徑
經典途徑
C3b 沉積
(%對照)
125
100
75
50
25
0
WT
MASP-2 -/-
MASP-1/3 -/-
C4 -/-
C4/MASP-1/3 -/-
Bf/C2 -/-
(Bf/C2 -/-) + C2
C1q -/-
**

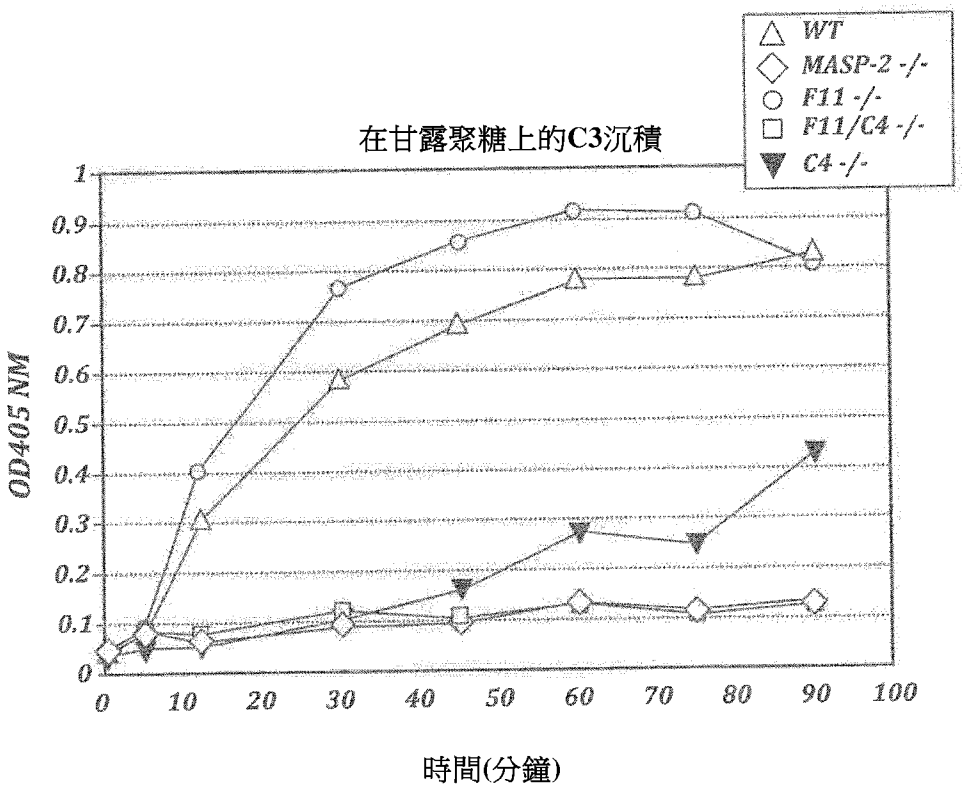
【圖 29A】


OD 405nm
1.5
1
0.5
0
0
30
60
90
時間(分鐘)
WT
C4 -/-
MASP-1/3 -/-
Bf -/-
MASP-2 -/-

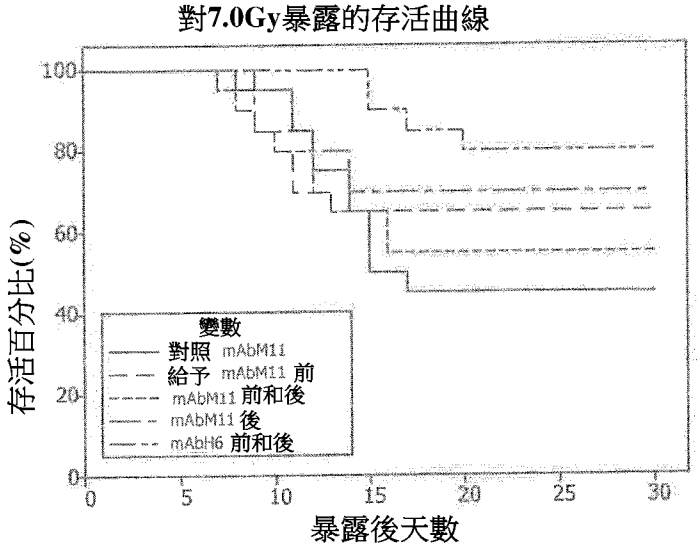
【圖 29B】


通過凝血酶底物的
C3活化
完整C3
C3+ h.FXIa
C3+ h.FVIIa
C3+ b.FXa
C3+ h.FXa
C3+ h.APC
C3+ h. 凝血酶
a-鏈
a'-鏈
X
自溶裂解
產物 70 kDa
β-鏈
自溶裂解
產物, 46 kDa
116
97.2
66.4
55.6
42.7
1
2
3
4
5
6
7

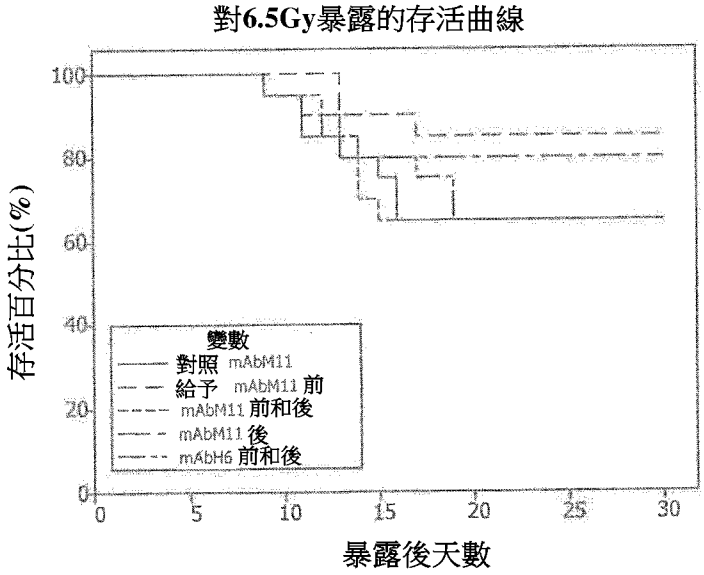
【圖 30】


在甘露聚糖上的C3沉積
WT
MASP-2 -/-
F11 -/-
F11/C4 -/-
C4 -/-
OD405 NM
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
時間(分鐘)

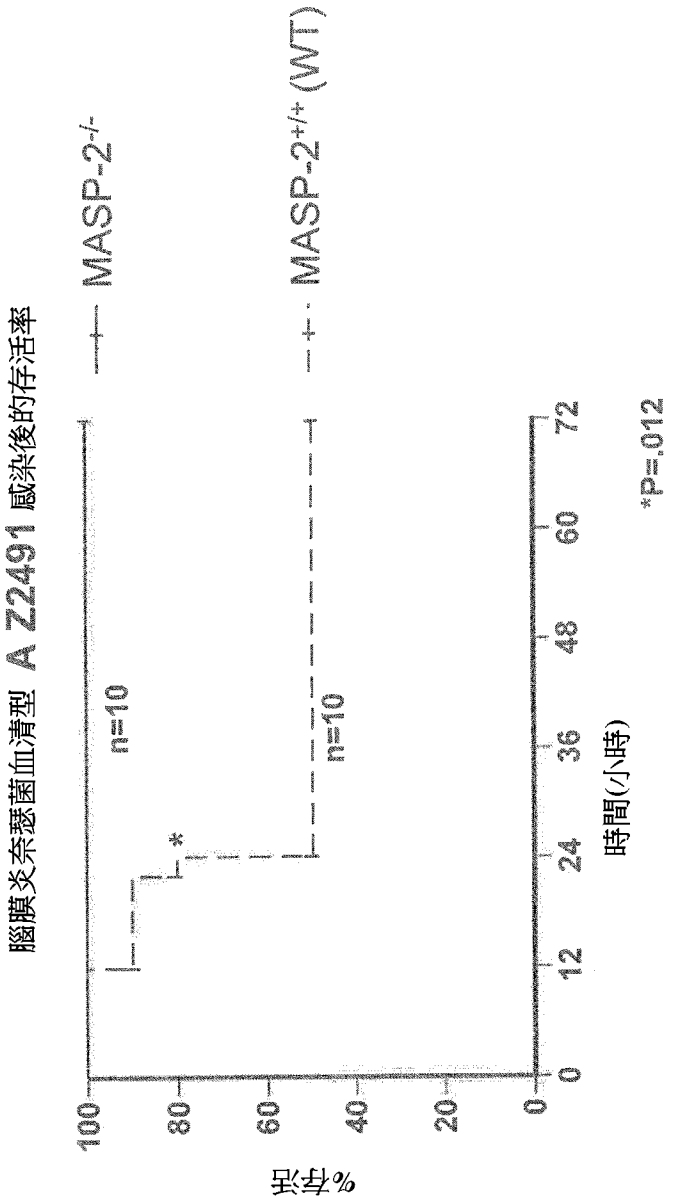
【圖 31】


對7.0Gy暴露的存活曲線
存活百分比(%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
暴露後天數
變數
對照 mAbM11
給予 mAbM11 前
mAbM11 前和後
mAbM11 後
mAbH6 前和後

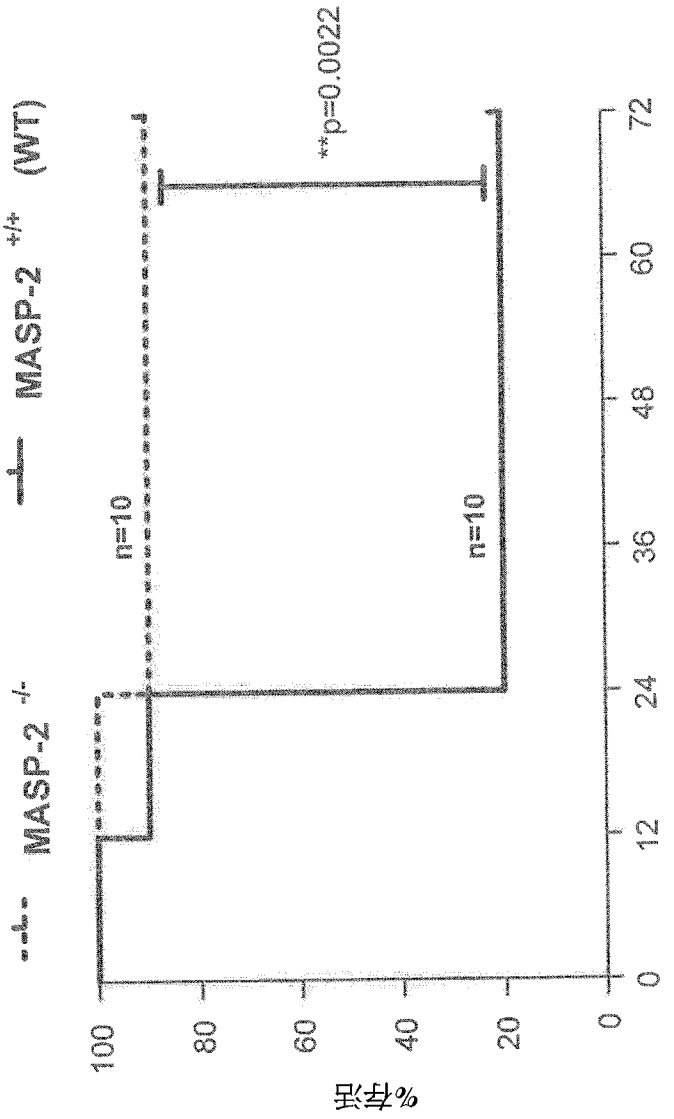
【圖 32A】


對6.5Gy暴露的存活曲線
存活百分比(%)
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
30
暴露後天數
變數
對照 mAbM11
給予 mAbM11 前
mAbM11 前和後
mAbM11 後
mAbH6 前和後

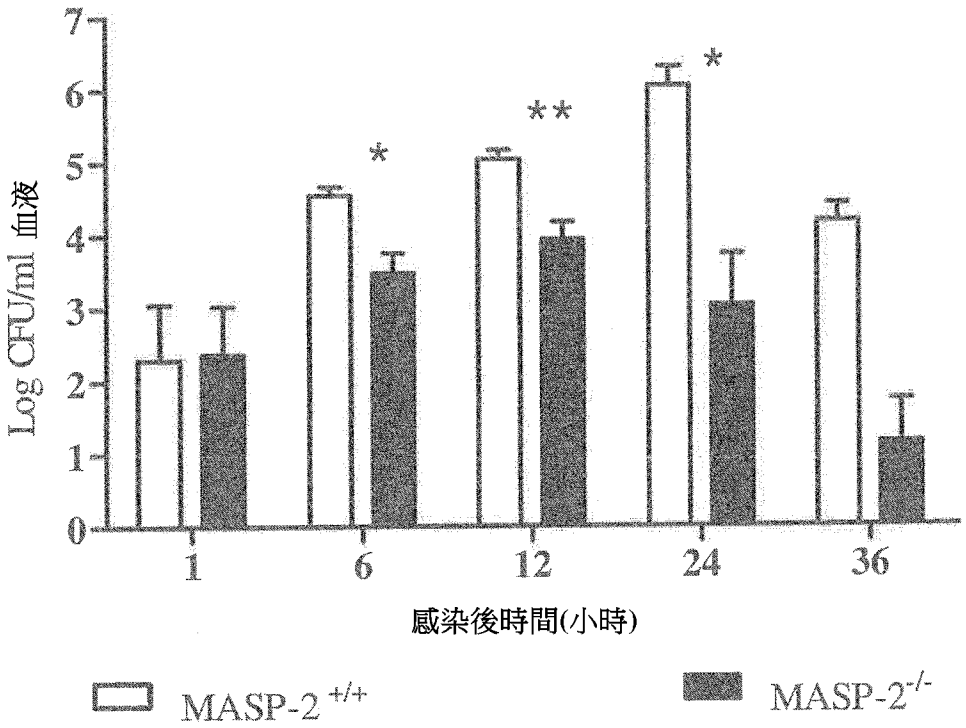
【圖 32B】


腦膜炎奈瑟菌血清型 A Z2491 感染後的存活率
MASP-2-/-
MASP-2+/+ (WT)
n=10
n=10
*
*P=.012
%存活
時間(小時)
0
20
40
60
80
100
0
12
24
36
48
60
72

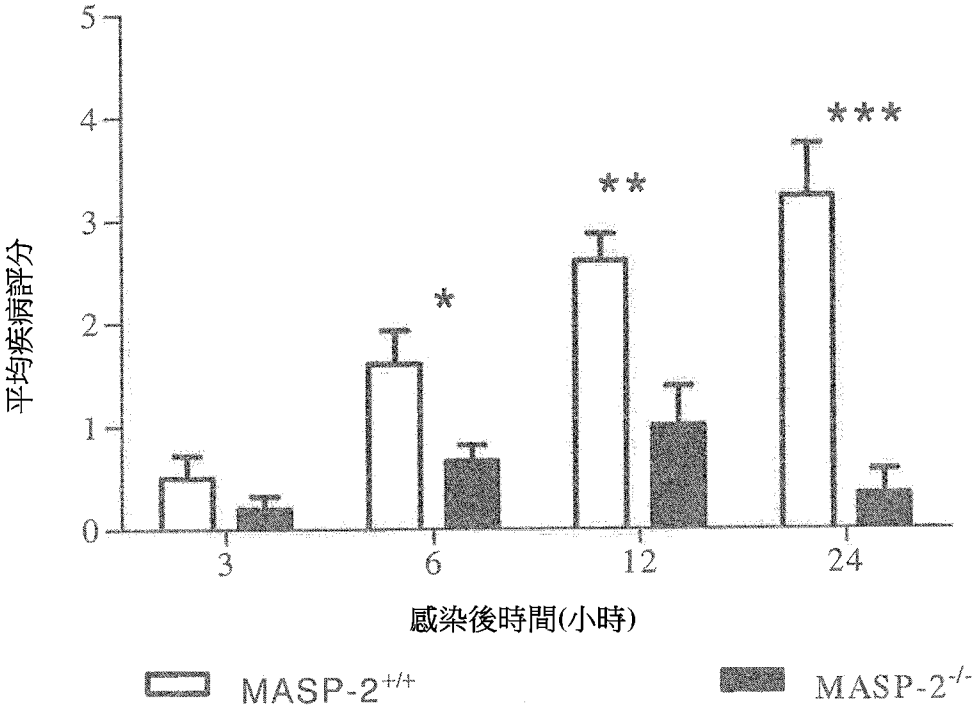
【圖 33】


MASP-2 -/-
MASP-2 +/+ (WT)
n=10
n=10
**p=0.0022
% 存活
感染後時間(小時)
0
20
40
60
80
100
0
12
24
36
48
60
72

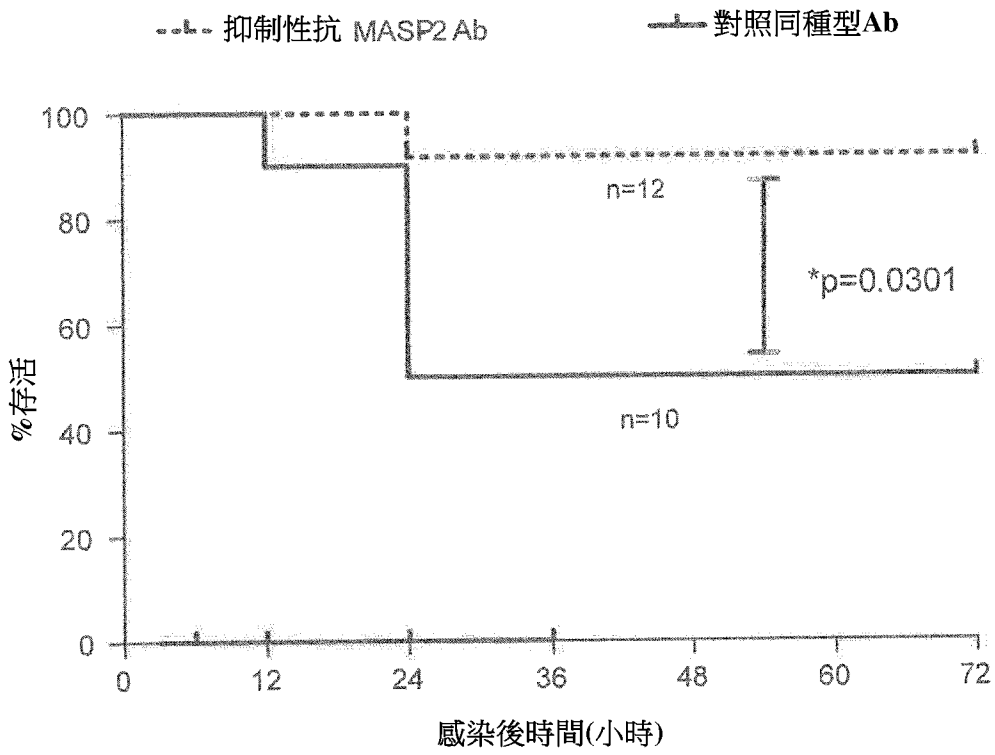
【圖 34】



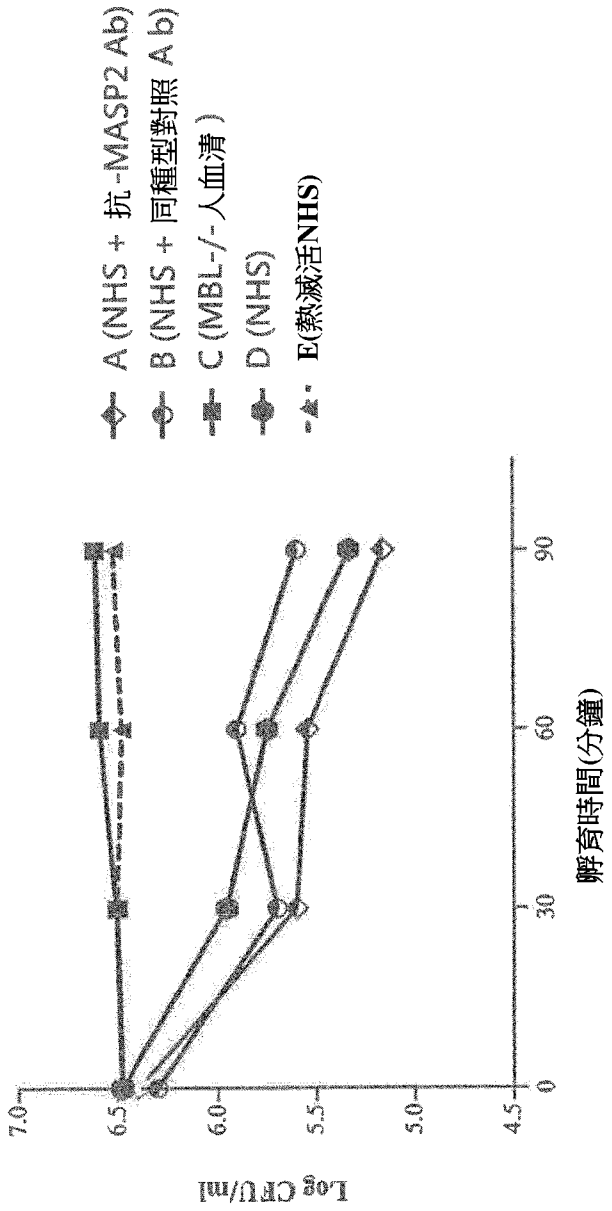
【圖 35】



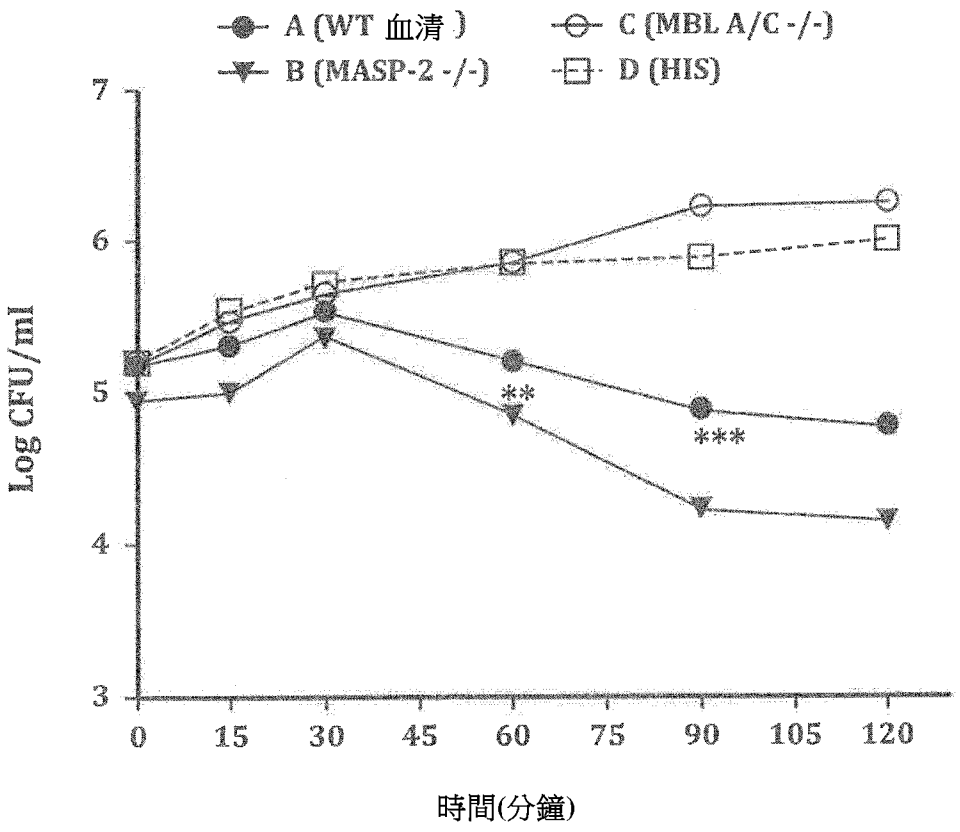
【圖 36】


抑制性抗 MASP2 Ab
對照同種型Ab
100
80
60
40
20
0
%存活
n=12
*p=0.0301
n=10
0
12
24
36
48
60
72
感染後時間(小時)

【圖 37】

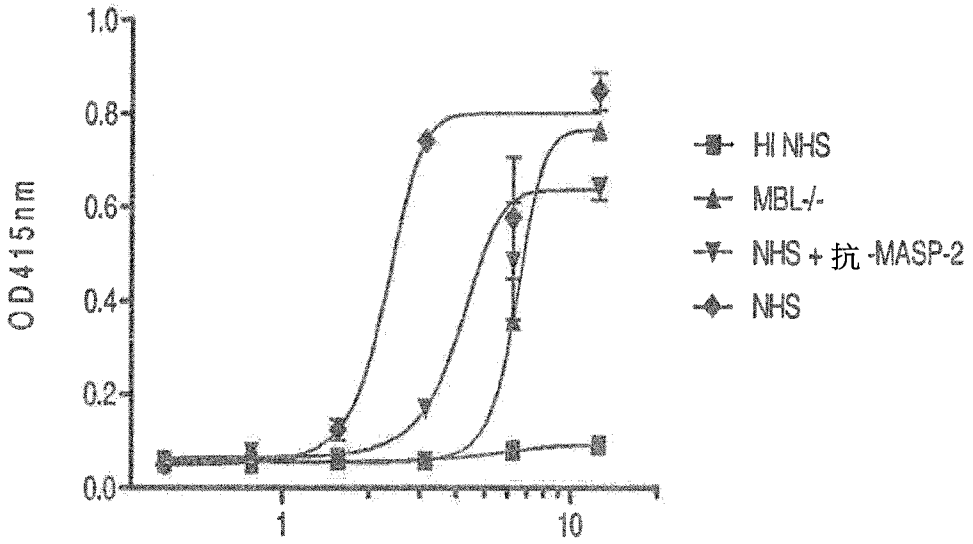

A (NHS + 抗-MASP2 Ab)
B (NHS + 同種型對照 A b)
C (MBL-/-人血清)
D (NHS)
E(熱滅活NHS)
Log CFU/ml
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
0
30
60
90
孵育時間(分鐘)

【圖 38】

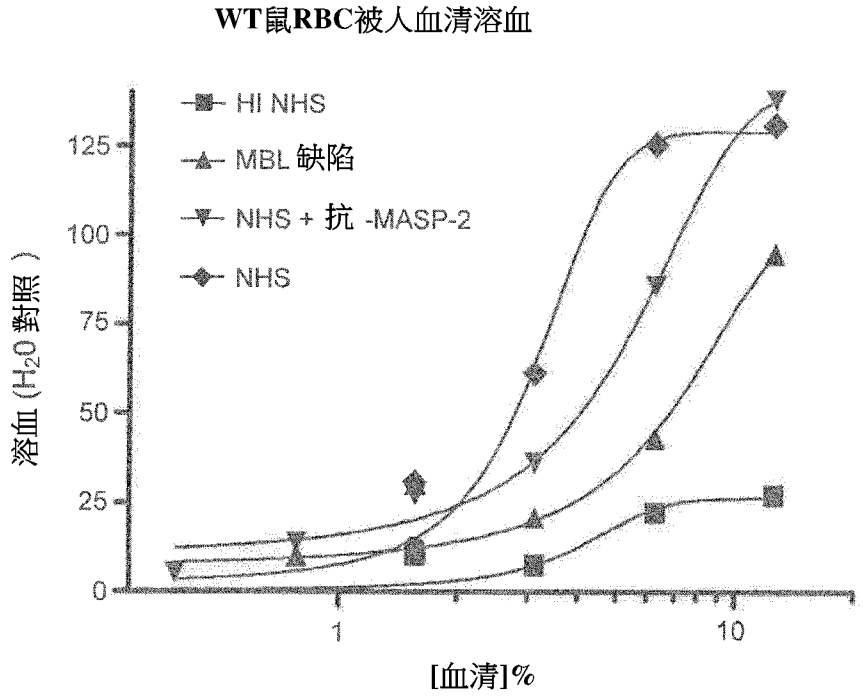

A (WT 血清)
C (MBL A/C -/-)
B (MASP-2 -/-)
D (HIS)
Log CFU/ml
7
6
5
4
3
0
15
30
45
60
75
90
105
120
**
***
時間(分鐘)

【圖 39】

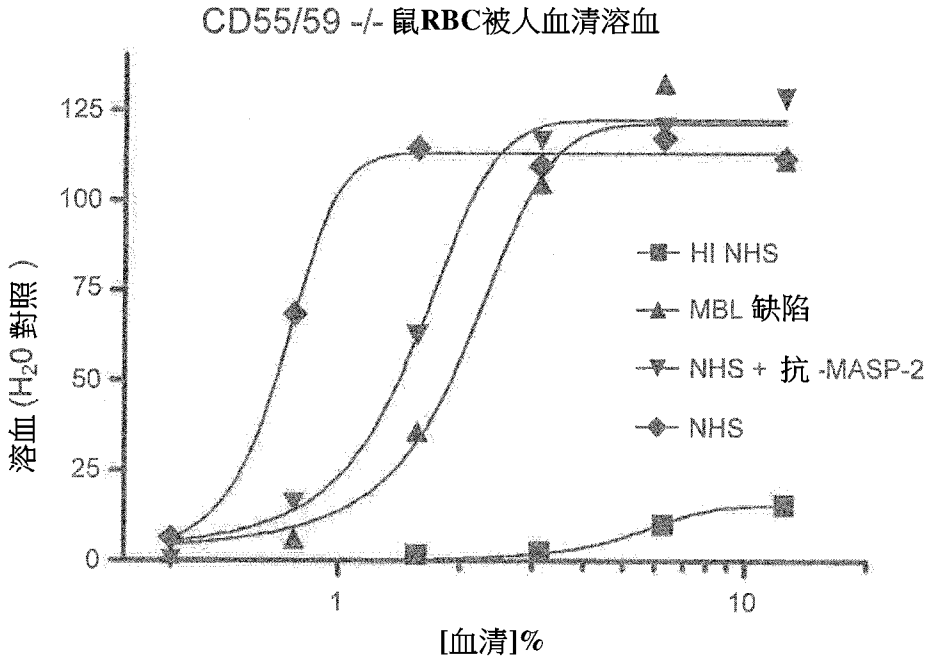
甘露聚糖-包被的鼠RBC被人血清溶血



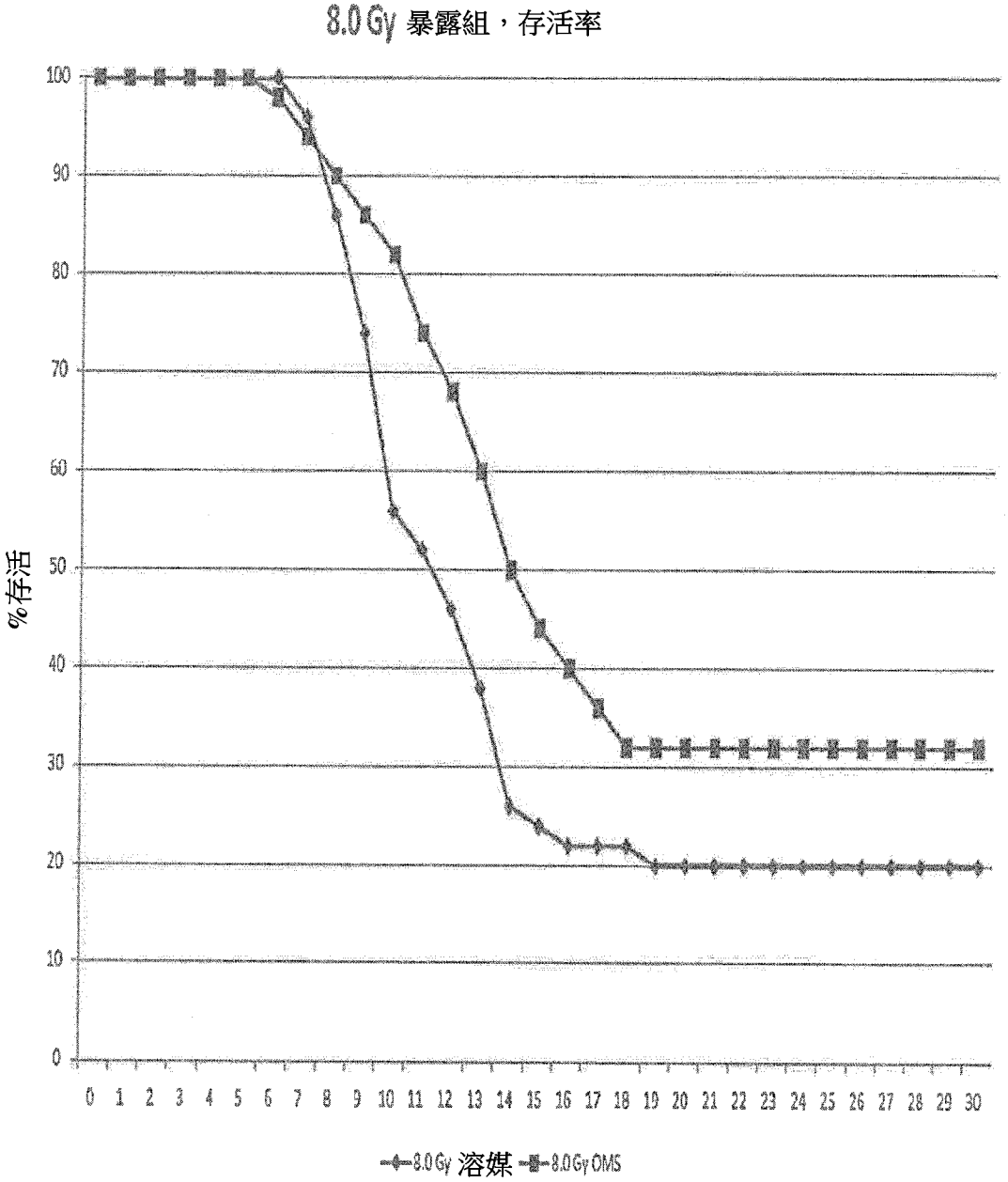
【圖 40】


WT鼠RBC被人血清溶血
HI NHS
MBL 缺陷
NHS + 抗 -MASP-2
NHS
溶血 (H_2O 對照)
125
100
75
50
25
0
1
10
[血清]%

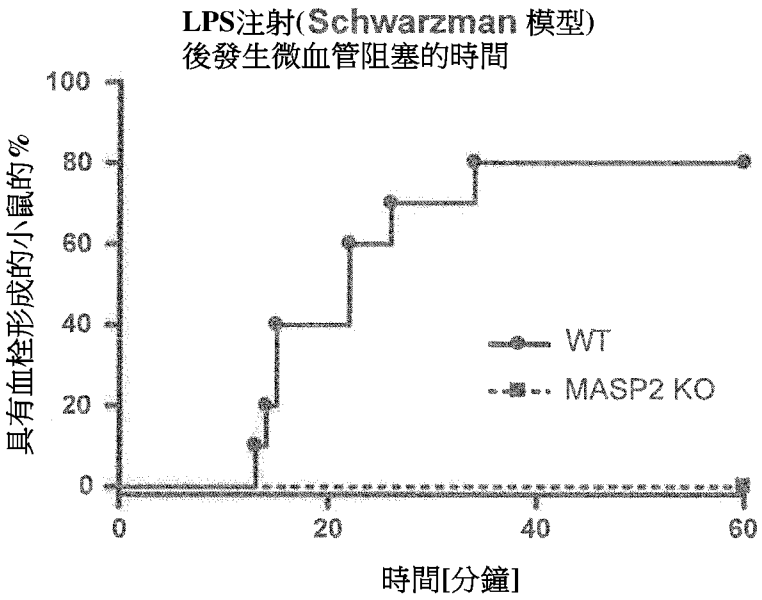
【圖 41】


CD55/59 -/- 鼠RBC被人血清溶血
125
100
75
50
25
0
溶血 (H_2O 對照)
1
10
[血清]%
HI NHS
MBL 缺陷
NHS + 抗 -MASP-2
NHS

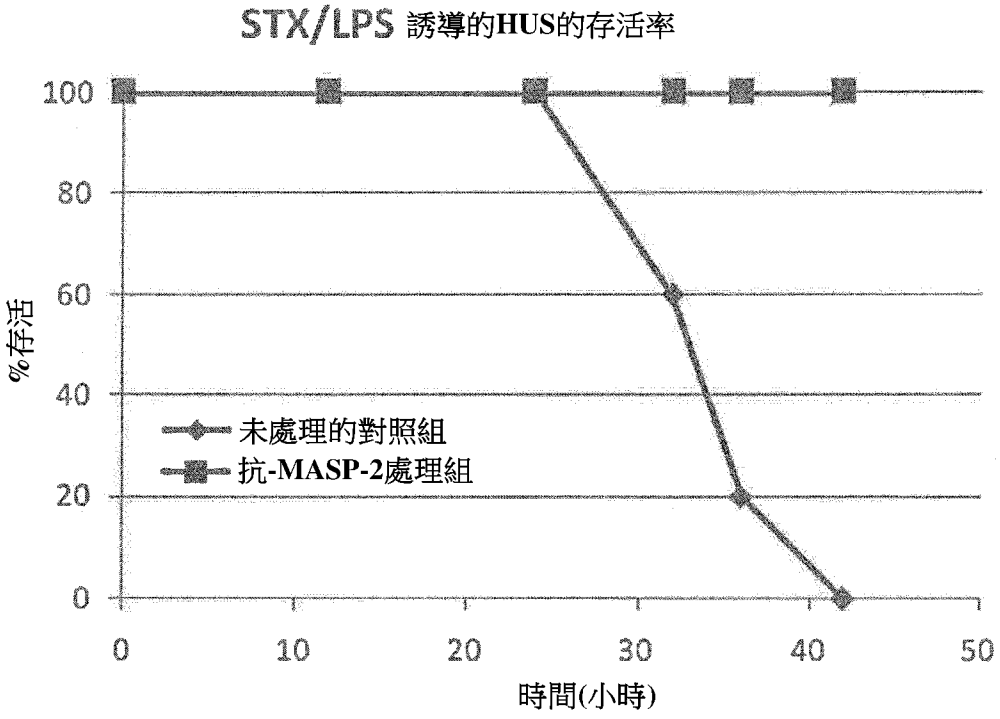
【圖 42】


8.0 Gy 暴露組，存活率
%存活
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
8.0 Gy 溶媒
8.0 Gy OMS

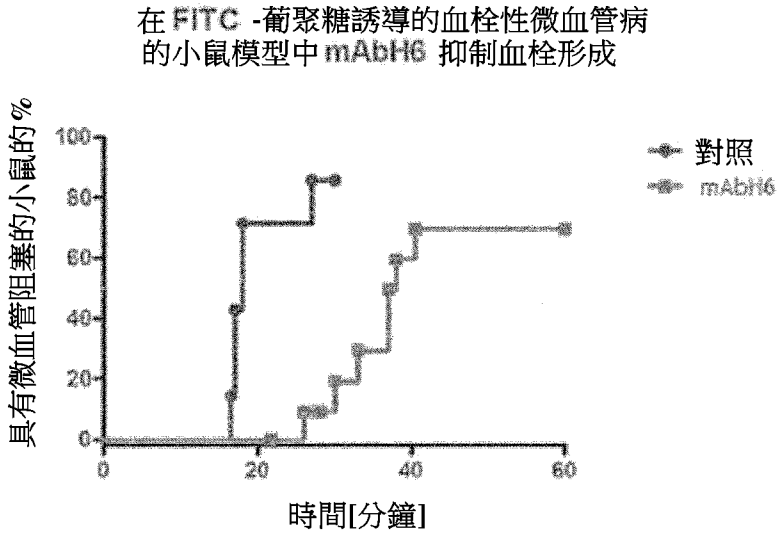
【圖 43】


LPS注射(Schwarzman 模型)
後發生微血管阻塞的時間
具有血栓形成的小鼠的%
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
WT
MASP2 KO
時間[分鐘]

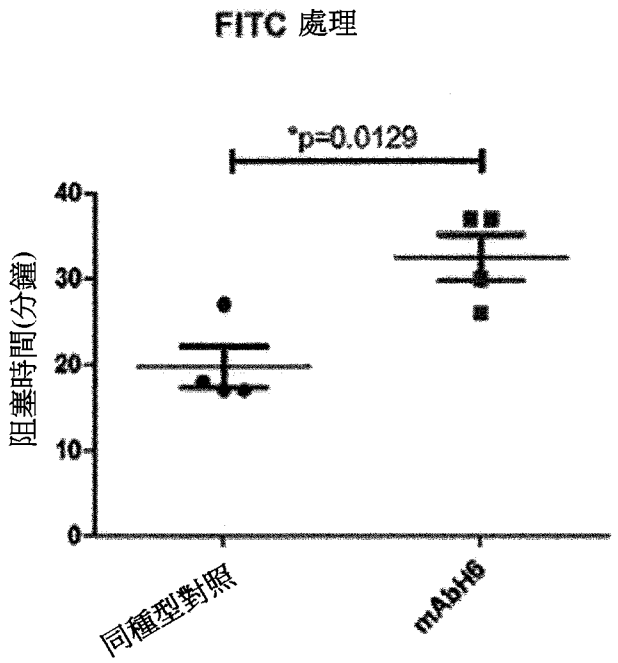
【圖 44】


STX/LPS 誘導的HUS的存活率
100
80
60
40
20
0
%存活
未處理的對照組
抗-MASP-2處理組
0
10
20
30
40
50
時間(小時)

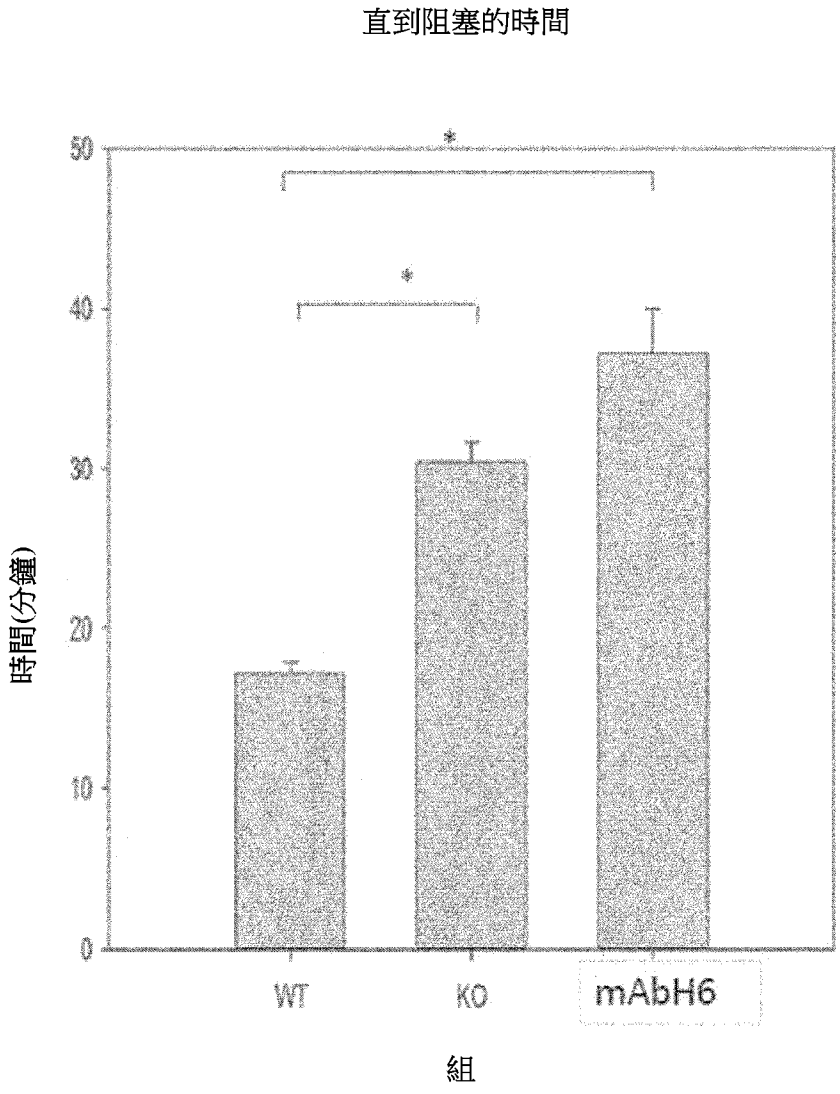
【圖 45】


在 FITC -葡聚糖誘導的血栓性微血管病
的小鼠模型中 mAbH6 抑制血栓形成
具有微血管阻塞的小鼠的 %
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
時間[分鐘]
對照
mAbH6

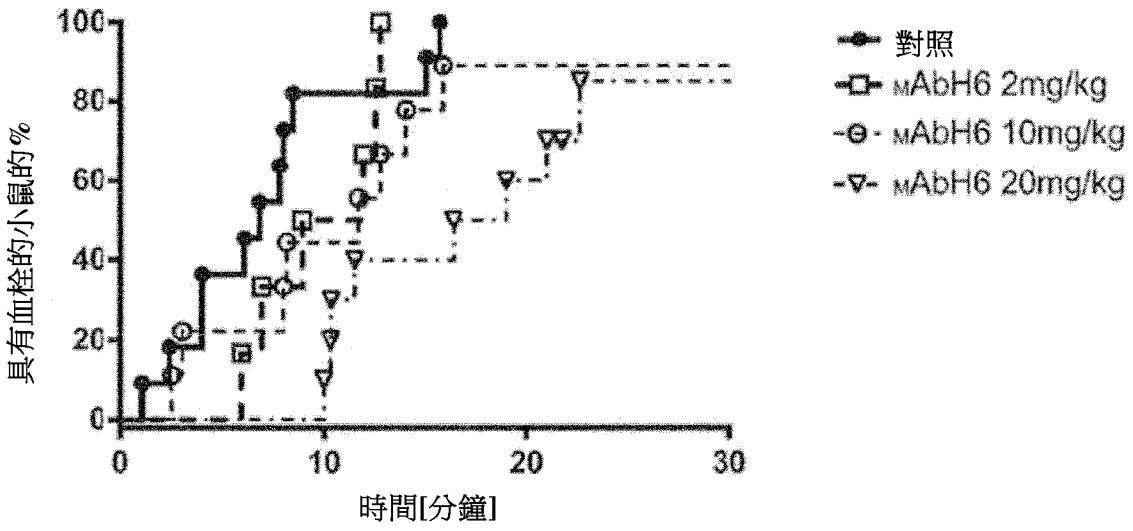
【圖 46】



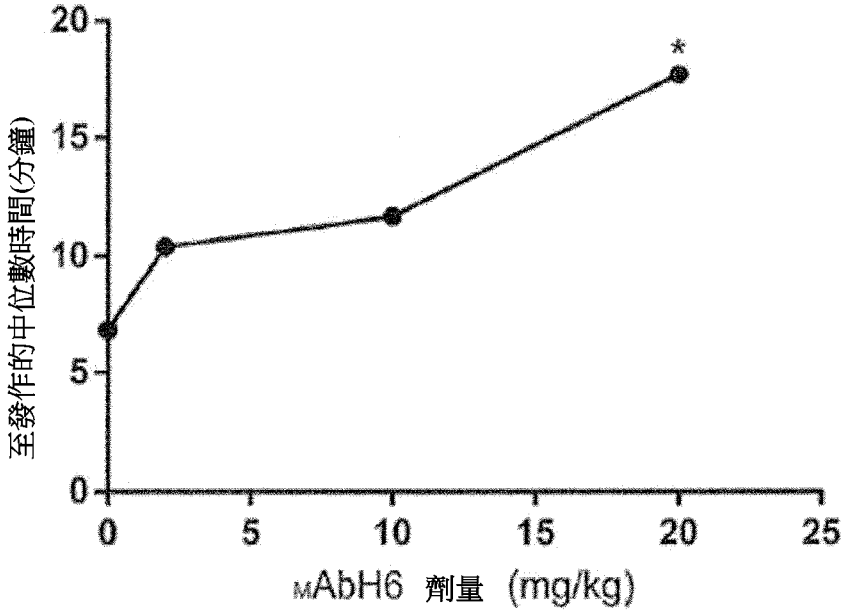
【圖 47】



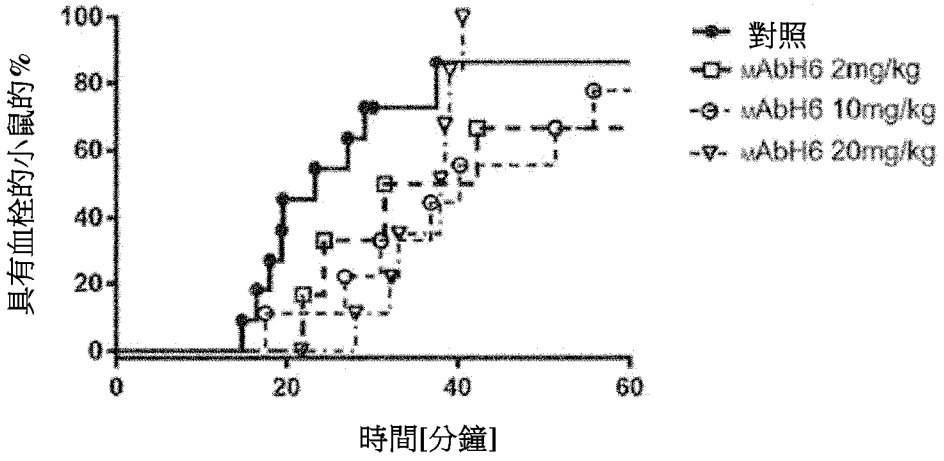
【圖 48】


100
80
60
40
20
0
具有血栓的小鼠的%
0
10
20
30
時間[分鐘]
對照
mAbH6 2mg/kg
mAbH6 10mg/kg
mAbH6 20mg/kg

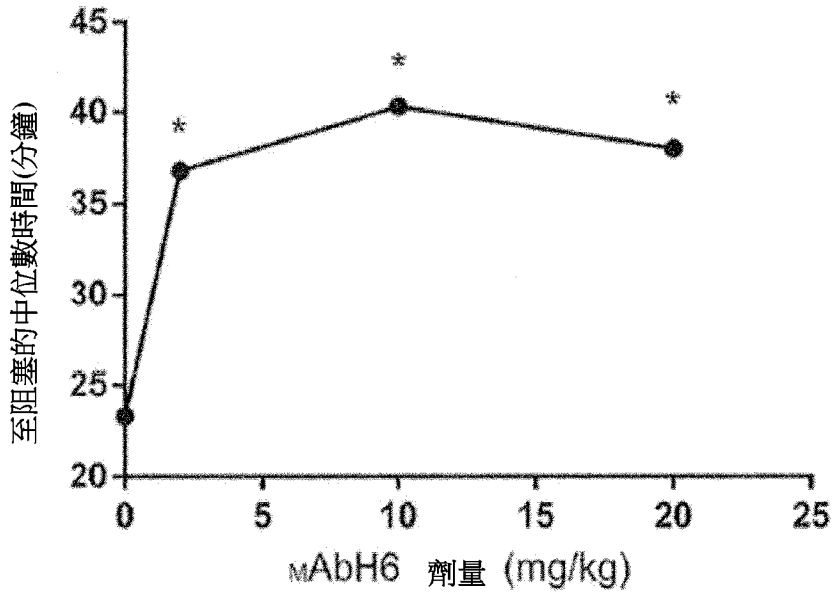
【圖 49】



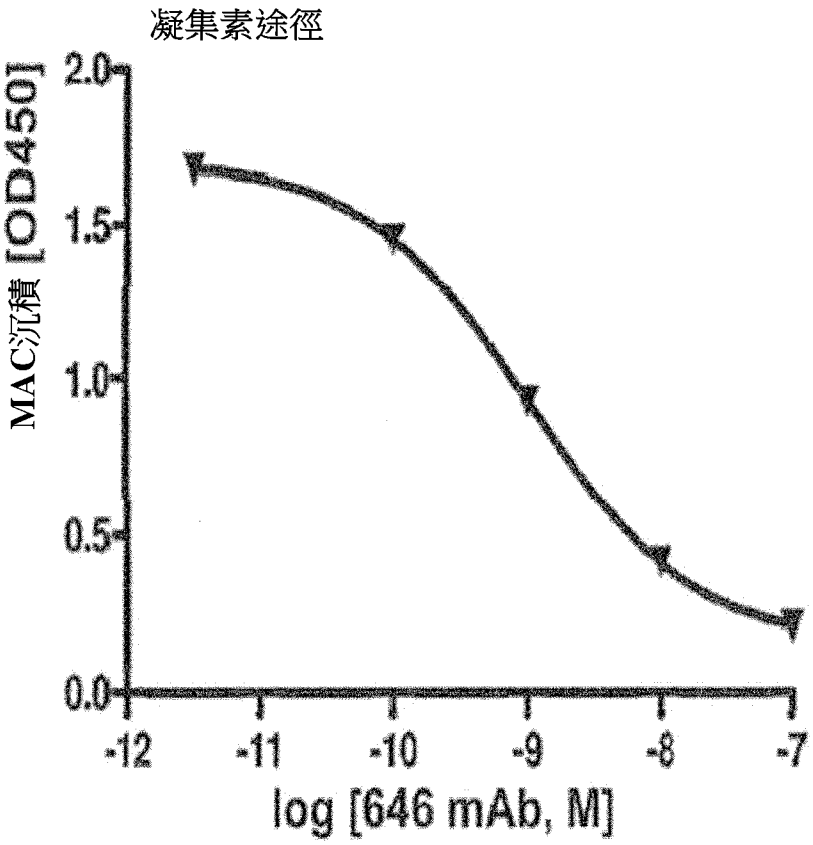
【圖 50】


具有血栓的小鼠的%
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
時間[分鐘]
對照
ωAbH6 2mg/kg
ωAbH6 10mg/kg
ωAbH6 20mg/kg

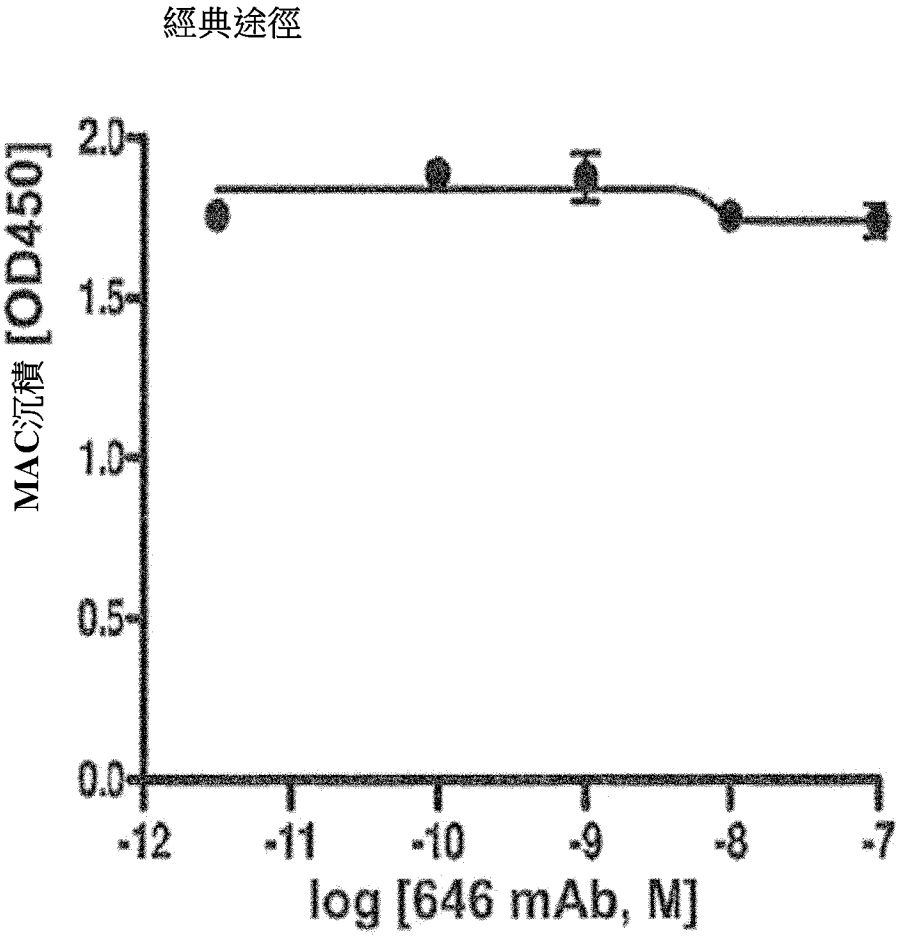
【圖 51】



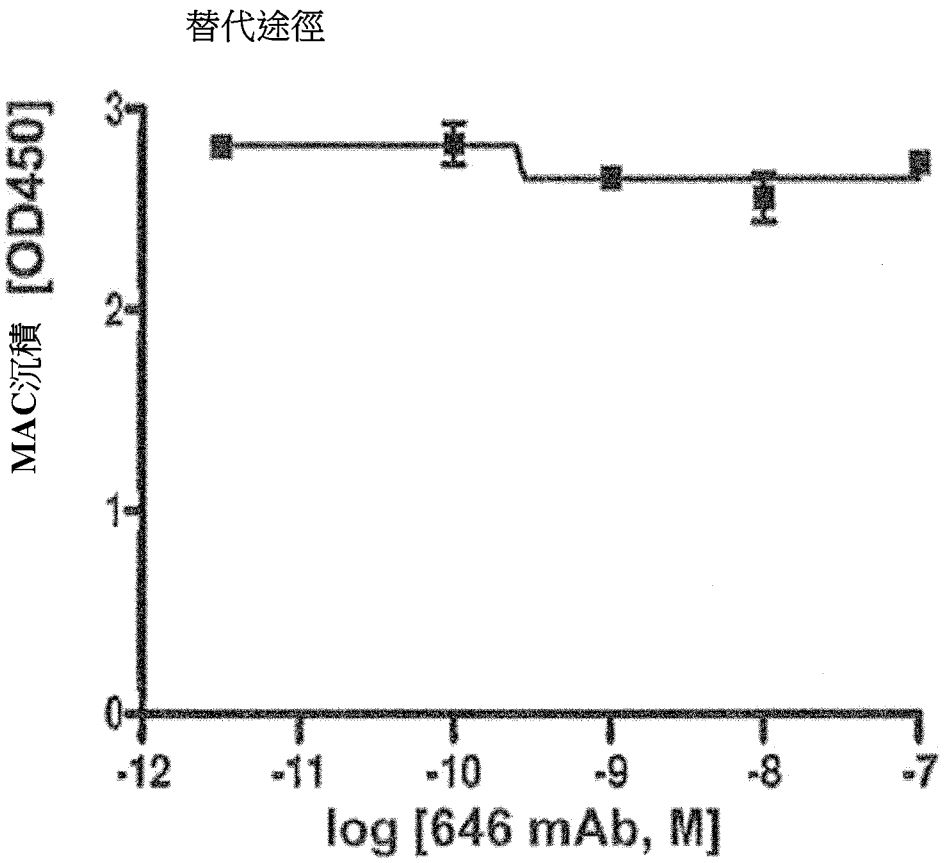
【圖 52】



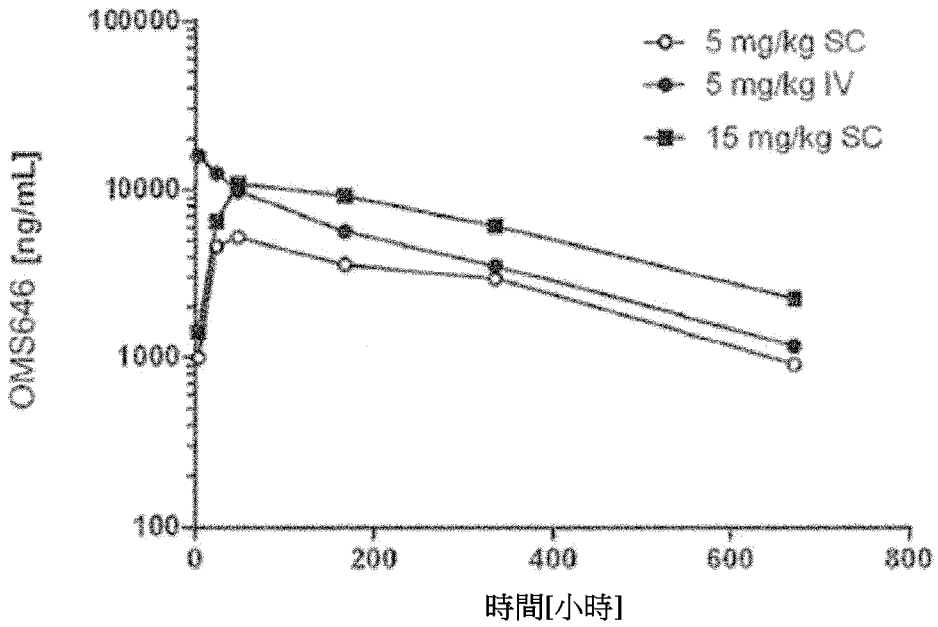
【圖 53A】



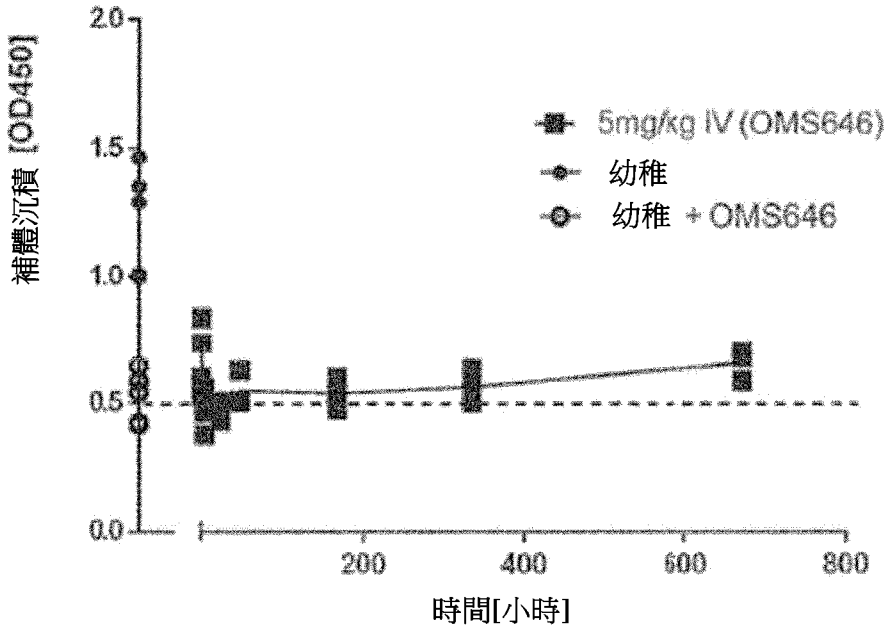
【圖 53B】



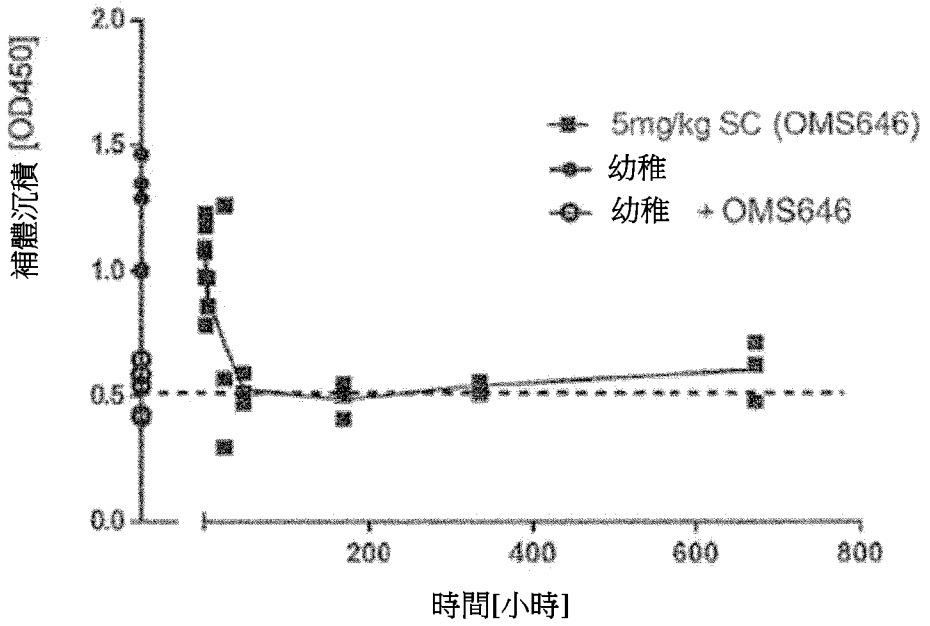
【圖 53C】


100000
10000
1000
100
OMS646 [ng/mL]
0
200
400
600
800
時間[小時]
5 mg/kg SC
5 mg/kg IV
15 mg/kg SC

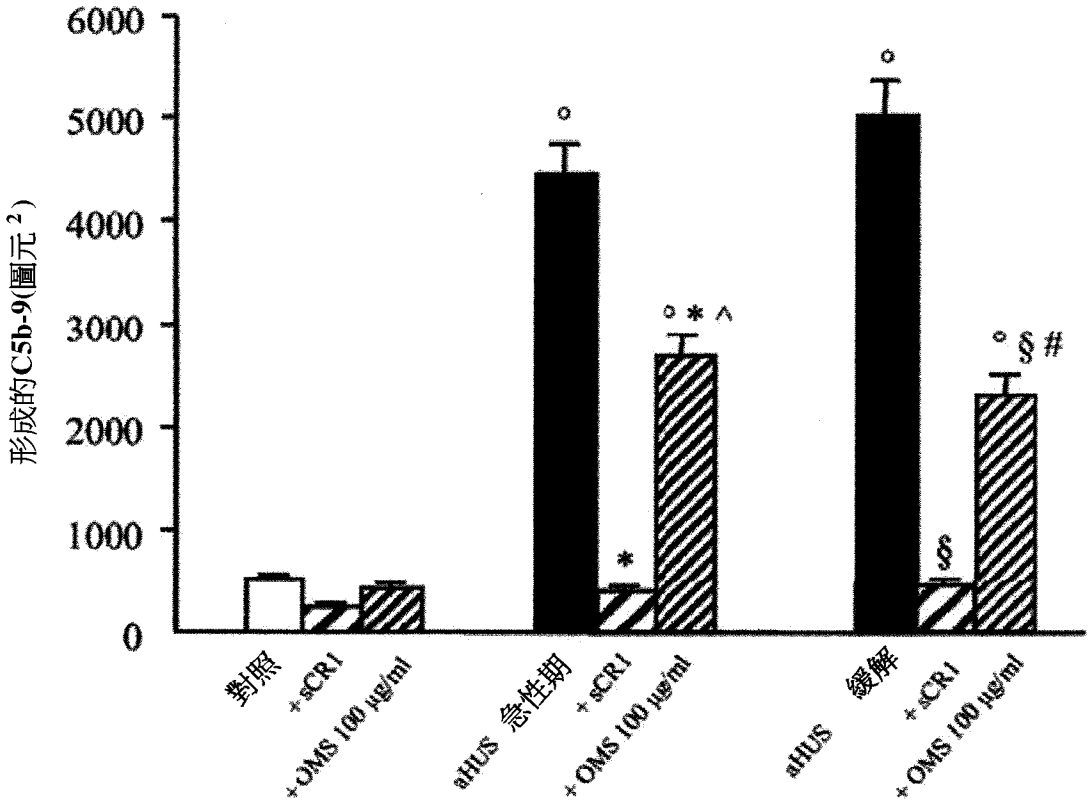
【圖 54】


補體沉積 [OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
400
600
800
時間[小時]
5mg/kg IV (OMS646)
幼稚
幼稚 + OMS646

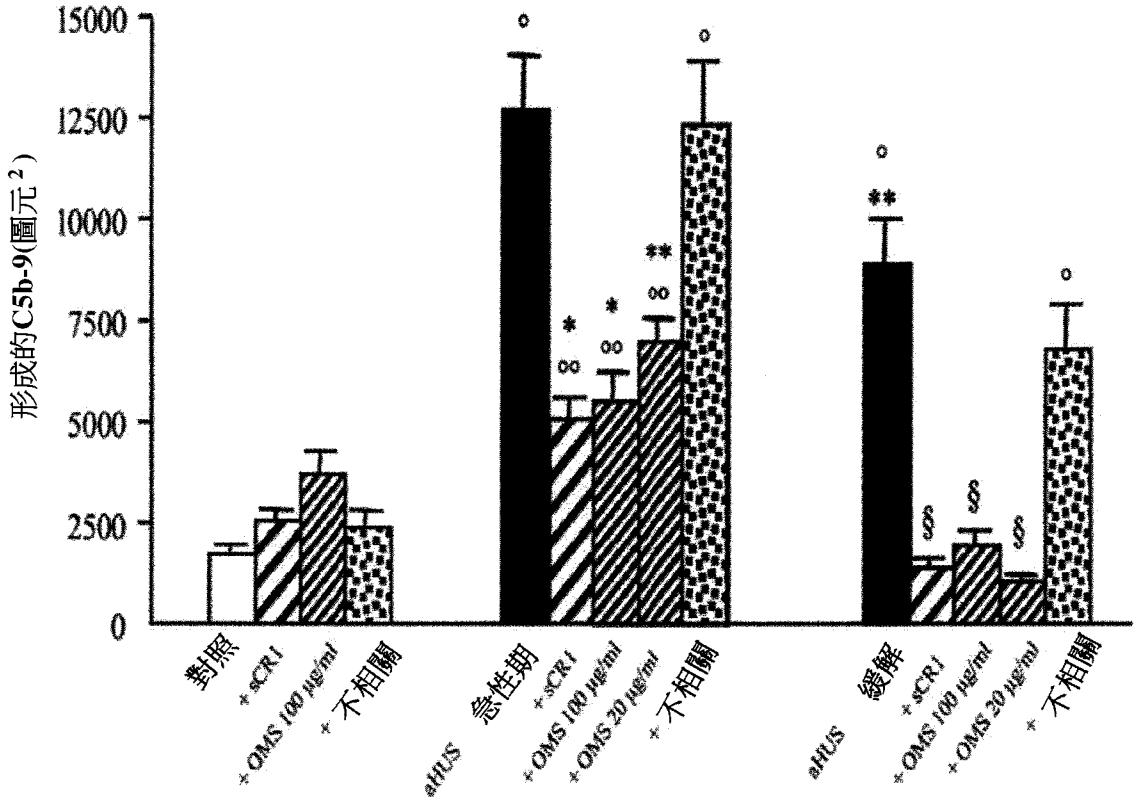
【圖 55A】


補體沉積 [OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
400
600
800
時間[小時]
5mg/kg SC (OMS646)
幼稚
幼稚 + OMS646

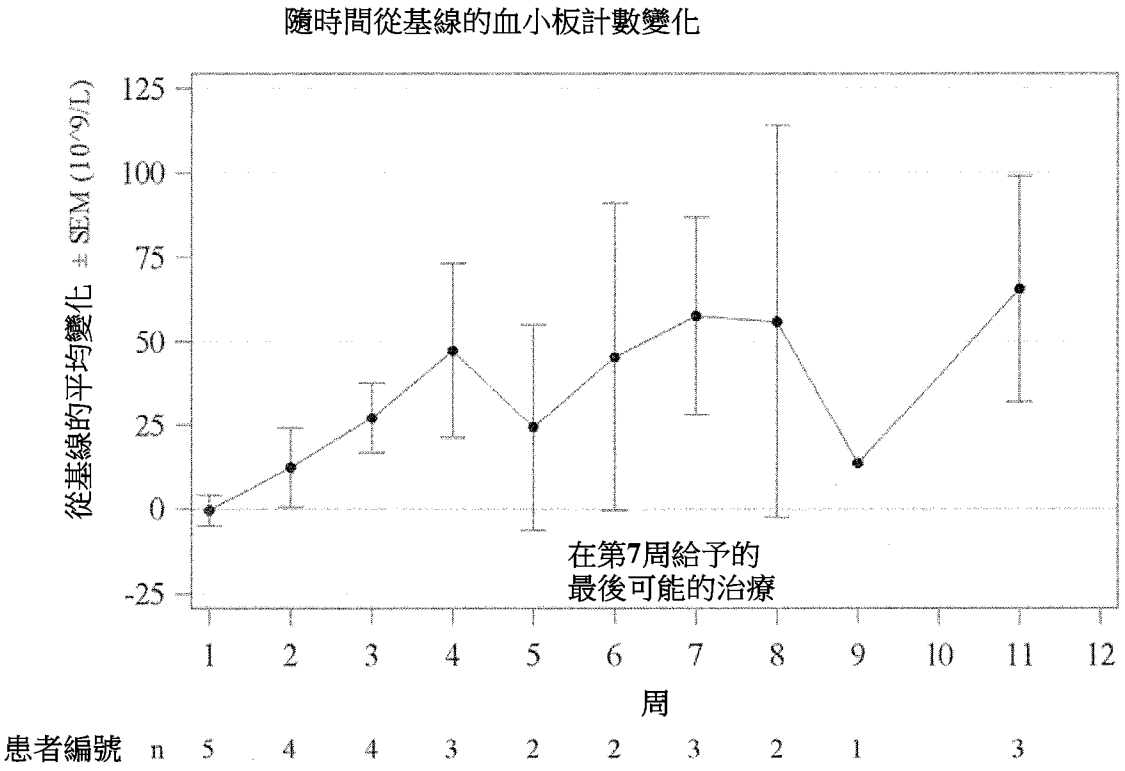
【圖 55B】


形成的C5b-9(圖元 2)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
°
°
°*^
*
°§#
§
對照
+sCR1
+OMS 100 μg/ml
aHUS 急性期
+sCR1
+OMS 100 μg/ml
aHUS 緩解
+sCR1
+OMS 100 μg/ml

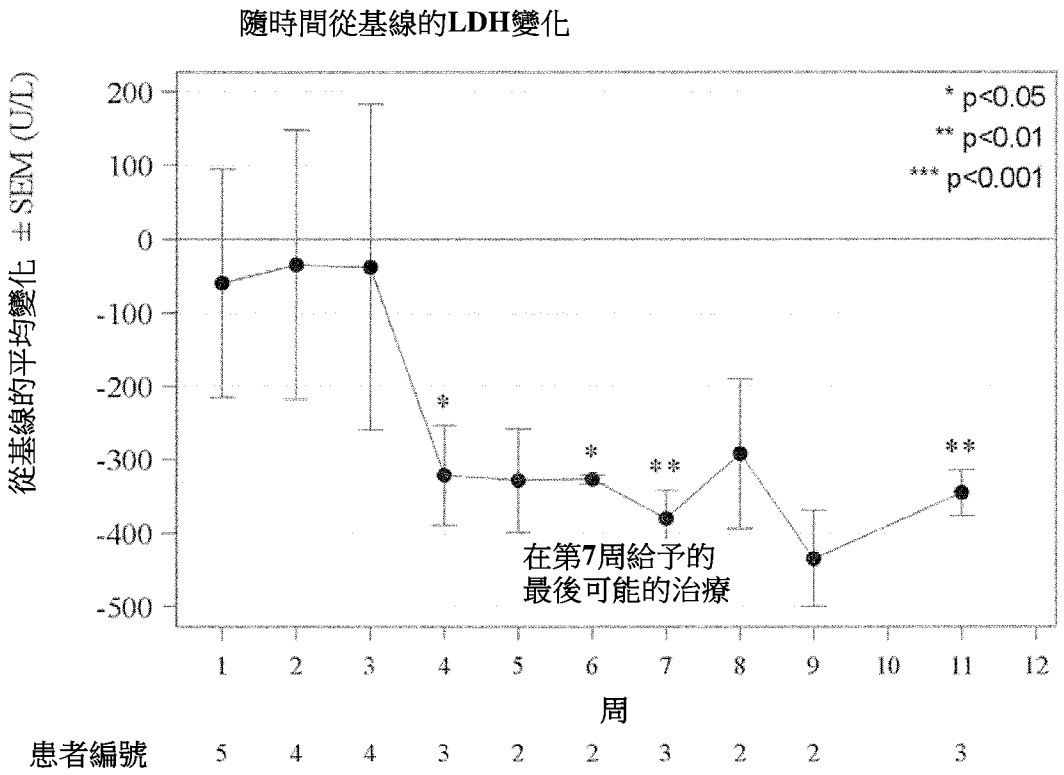
【圖 56】


15000
12500
10000
7500
5000
2500
0
形成的C5b-9(圖元²)
對照
+ sCR1
+ OMS 100 μg/ml
+ 不相關
aHUS
急性期
+ sCR1
+ OMS 100 μg/ml
+ OMS 20 μg/ml
+ 不相關
aHUS
緩解
+ sCR1
+ OMS 100 μg/ml
+ OMS 20 μg/ml
+ 不相關

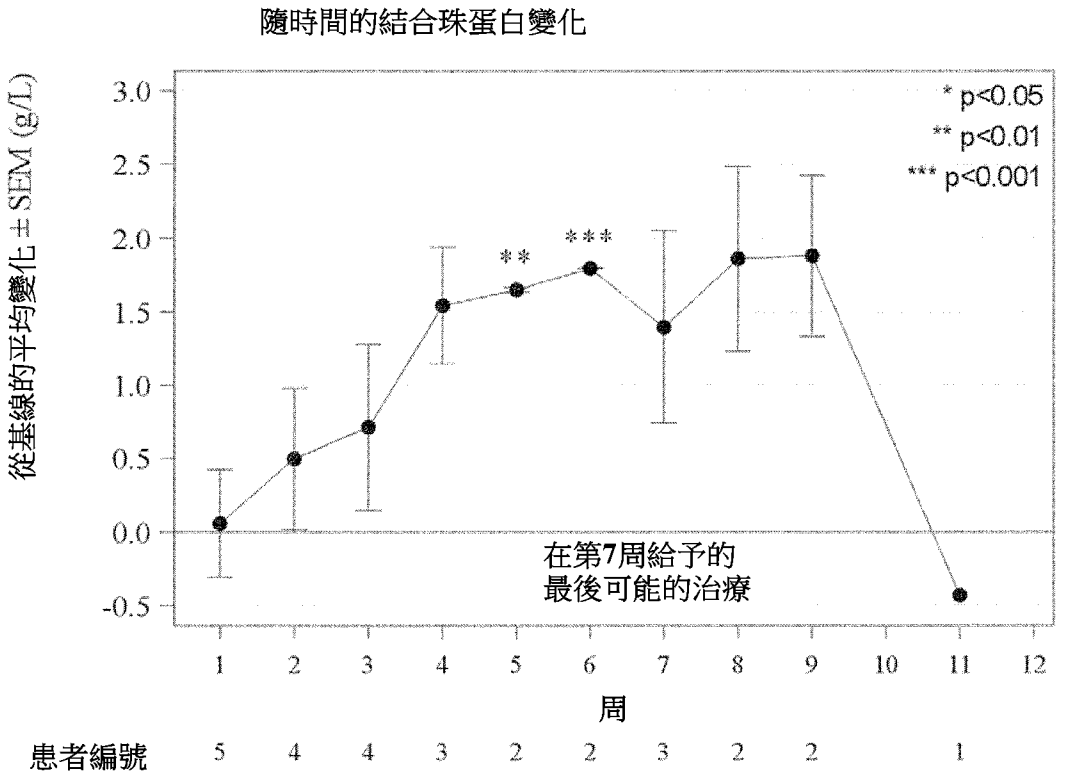
【圖 57】


隨時間從基線的血小板計數變化
從基線的平均變化 ± SEM (10^9/L)
125
100
75
50
25
0
-25
在第7周給予的
最後可能的治療
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
周
患者編號 n 5 4 4 3 2 2 3 2 1 3

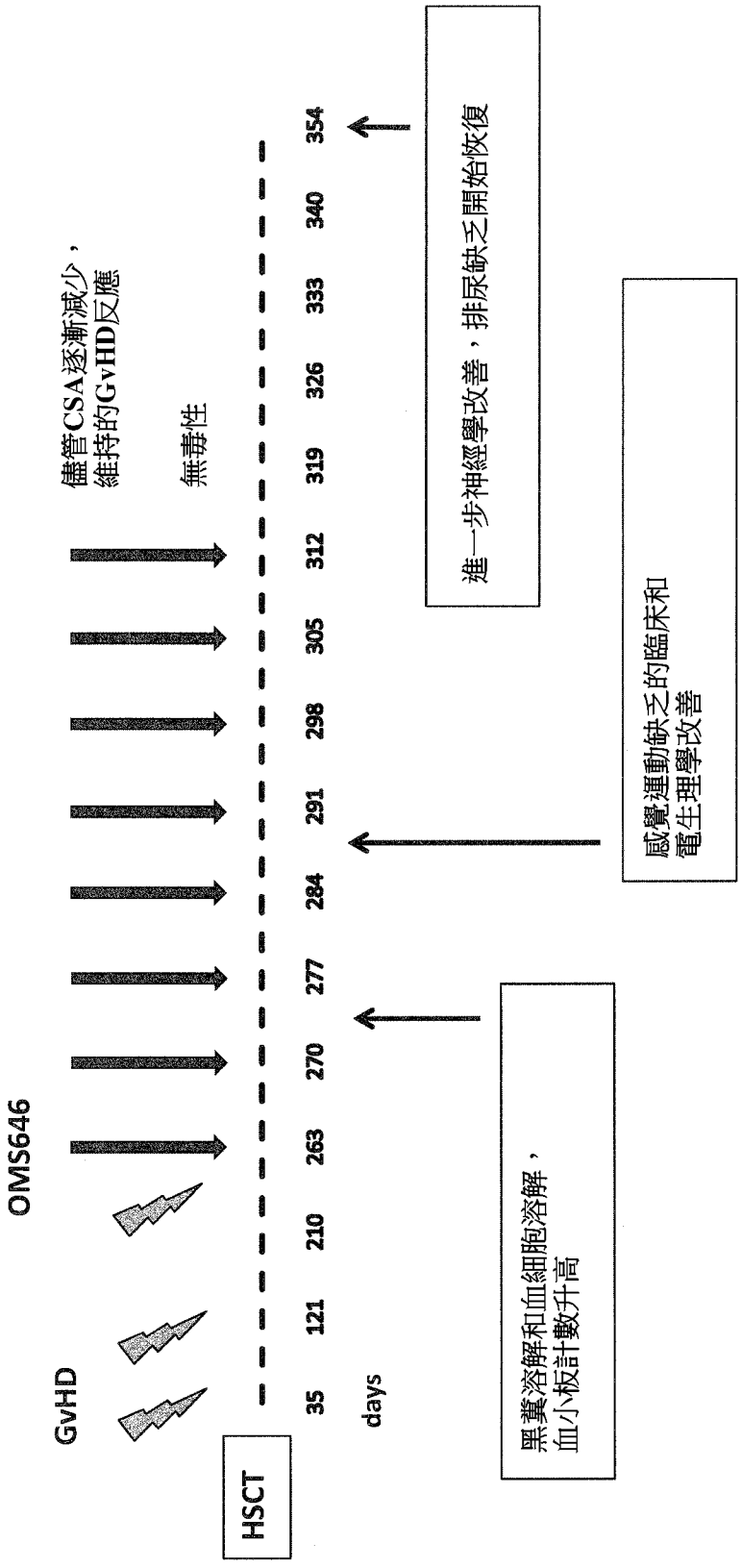
【圖 58】


隨時間從基線的LDH變化
從基線的平均變化 ± SEM (U/L)
200
100
0
-100
-200
-300
-400
-500
* p<0.05
** p<0.01
*** p<0.001
在第7周給予的
最後可能的治療
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
周
患者編號
5
4
4
3
2
2
3
2
2
3

【圖 59】

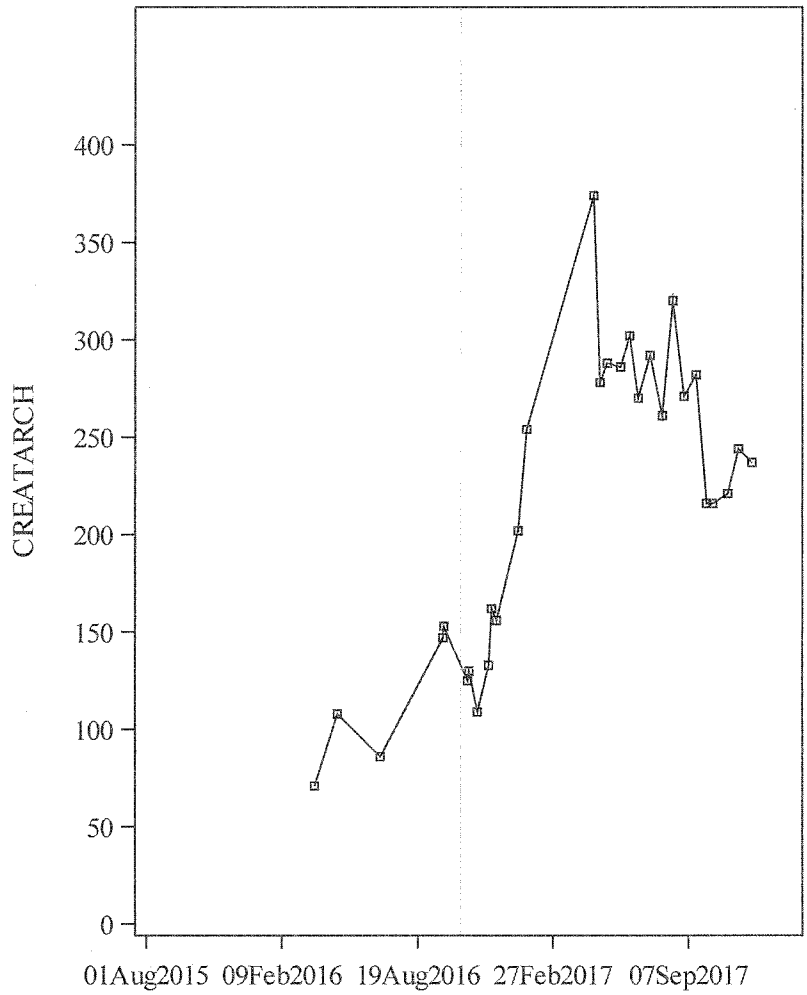

隨時間的結合珠蛋白變化
從基線的平均變化 ± SEM (g/L)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
* p<0.05
** p<0.01
*** p<0.001
**
***
在第7周給予的
最後可能的治療
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
周
患者編號
5
4
4
3
2
2
3
2
2
1

【圖 60】

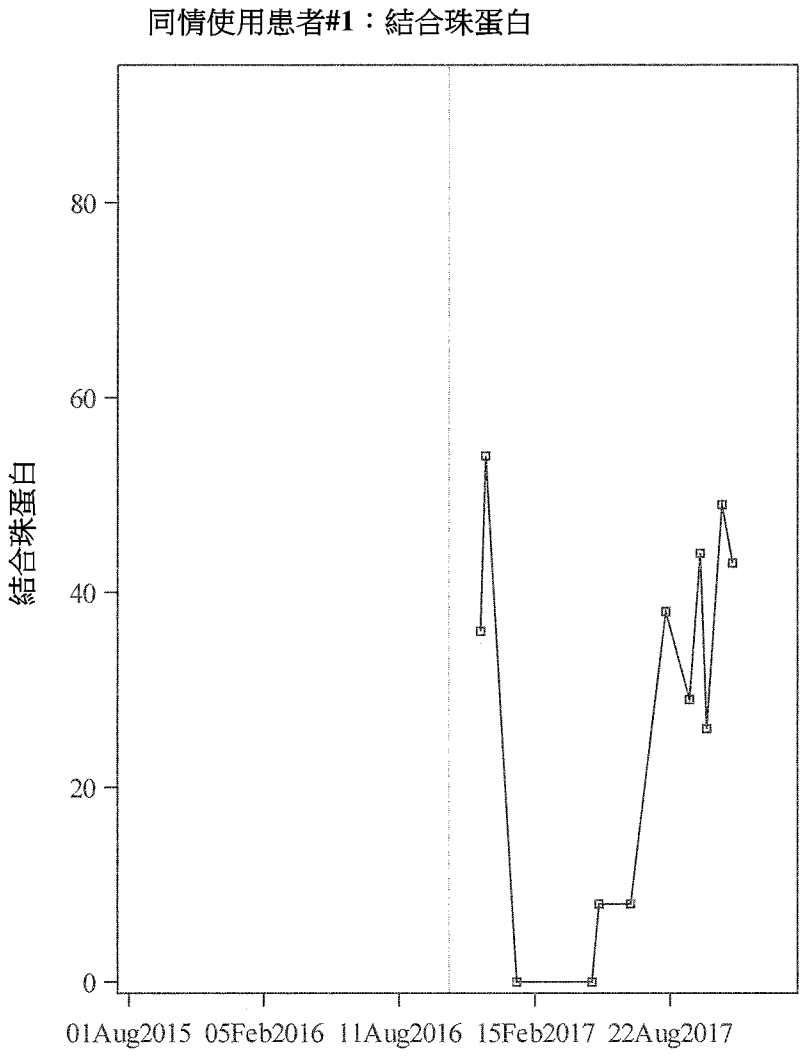

HSCT
GvHD
OMS646
儘管CSA逐漸減少，
維持的GvHD反應
無毒性
35
121
210
263
270
277
284
291
298
305
312
319
326
333
340
354
days
黑糞溶解和血細胞溶解，
血小板計數升高
進一步神經學改善，排尿缺乏開始恢復
感覺運動缺乏的臨床和
電生理學改善

【圖 61】

同情使用患者#1：肌酸酐

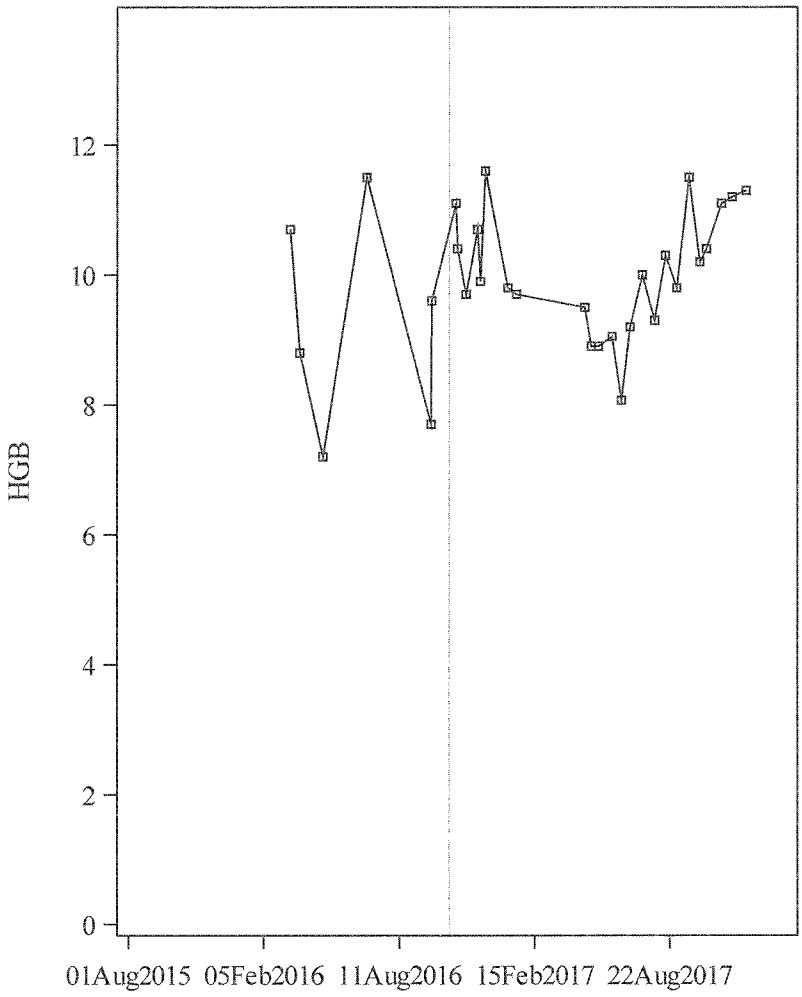


【圖 62A】


同情使用患者#1：結合珠蛋白
結合珠蛋白
80
60
40
20
0
01Aug2015
05Feb2016
11Aug2016
15Feb2017
22Aug2017

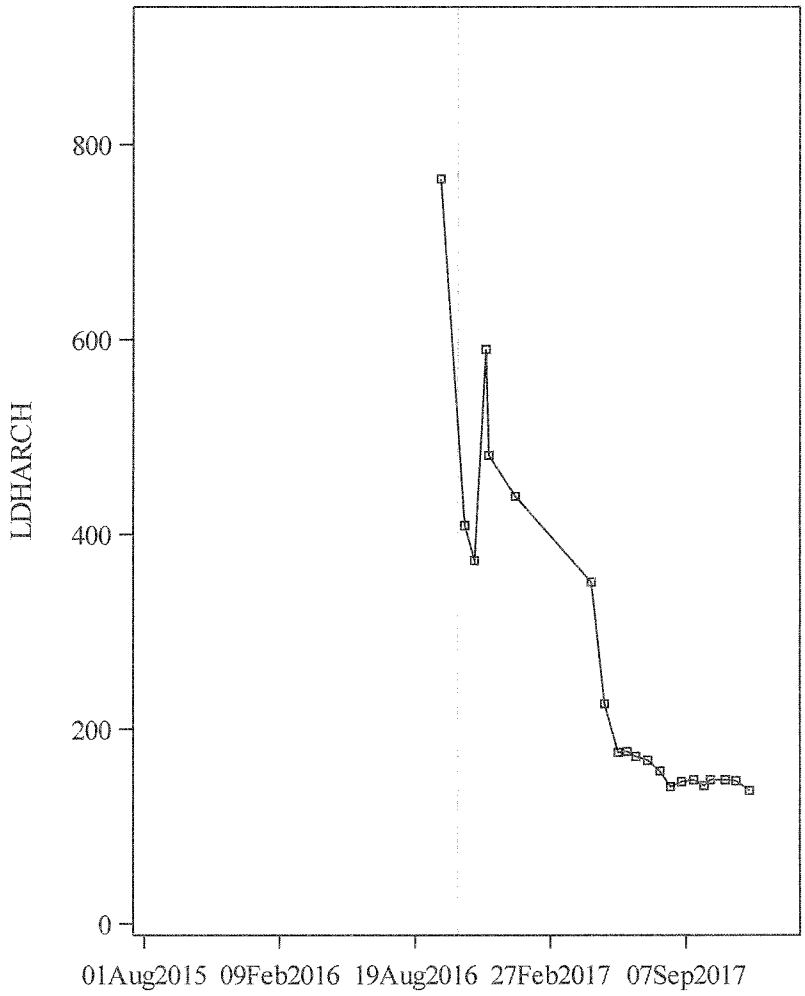
【圖 62B】

同情使用患者#1：血紅蛋白



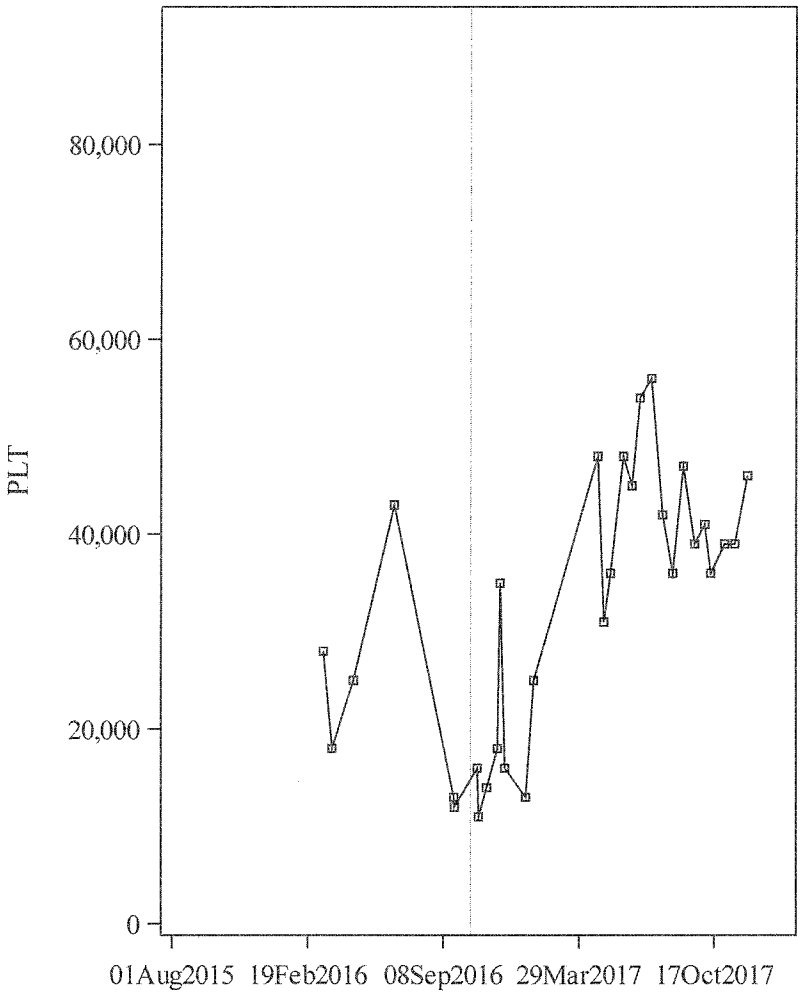
【圖 62C】

同情使用患者#1：**LDH**



【圖 62D】

同情使用患者#1：血小板



【圖 62E】