

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7530437号
(P7530437)

(45)発行日 令和6年8月7日(2024.8.7)

(24)登録日 令和6年7月30日(2024.7.30)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	P Z N A
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	7/02 (2006.01)	A 6 1 P	7/02	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
請求項の数 6 (全369頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2022-553016(P2022-553016)	(73)特許権者	501472607	
(86)(22)出願日	令和3年3月5日(2021.3.5)		オメロス コーポレーション	
(65)公表番号	特表2023-516727(P2023-516727 A)		アメリカ合衆国 ワシントン州 9 8 1 1	
			9, シアトル, エリオット アベニュー	
(43)公表日	令和5年4月20日(2023.4.20)		ウエスト 2 0 1	
(86)国際出願番号	PCT/US2021/021217	(74)代理人	100102978	
(87)国際公開番号	WO2021/178902		弁理士 清水 初志	
(87)国際公開日	令和3年9月10日(2021.9.10)	(74)代理人	100160923	
審査請求日	令和4年11月7日(2022.11.7)		弁理士 山口 裕孝	
(31)優先権主張番号	63/140,591	(74)代理人	100119507	
(32)優先日	令和3年1月22日(2021.1.22)		弁理士 刑部 俊	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100142929	
			弁理士 井上 隆一	
(31)優先権主張番号	63/104,229	(74)代理人	100148699	
(32)優先日	令和2年10月22日(2020.10.22)		弁理士 佐藤 利光	
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 コロナウイルス誘発性急性呼吸窮迫症候群の処置および／または予防のためにMASP-2を阻害する方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

COVID-19誘発性急性呼吸窮迫症候群(ARDS)またはCOVID-19誘発性肺炎に罹患しているヒト対象を処置するための薬学的組成物であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を含み、

(i) 前記対象が処置前に人工呼吸器を付けており、かつMASP-2阻害物質が、機械的換気の必要をなくするのに十分な投与量および期間、投与される；および/または

(ii) 前記対象が、処置前に酸素補給を必要としており、かつMASP-2阻害物質が、酸素補給の使用をなくするのに十分な投与量および期間、投与され、かつ

前記MASP-2阻害物質が、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片であり、かつ

前記MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69を含む軽鎖可変領域を含む、薬学的組成物。

【請求項2】

抗体またはその断片が、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項3】

MASP-2阻害抗体が、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項4】

MASP-2阻害抗体が、10%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項5】

前記対象が処置前に標準範囲より高いD-ダイマーレベルを有し、かつMASP-2阻害物質が、該対象におけるD-ダイマーレベルを健常対象の正常範囲内に低減させるのに十分な量および時間、投与される、請求項1記載の薬学的組成物。

【請求項6】

MASP-2阻害物質が止血に影響を及ぼすことなく抗凝固効果および/または抗血栓症効果をもたらす、請求項1記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2020年3月6日に出願された米国仮出願第62/986,566号の恩典を主張し、2020年4月10日に出願された米国仮出願第63/008,540号の恩典を主張し、2020年4月24日に出願された米国仮出願第63/015,299号の恩典を主張し、2020年6月21日に出願された米国仮出願第63/054,298号の恩典を主張し、2020年8月7日に出願された米国仮出願第63/062,843号の恩典を主張し、2020年10月22日に出願された米国仮出願第63/104,229号の恩典を主張し、2020年10月26日に出願された米国仮出願第63/105,637号の恩典を主張し、2021年1月22日に出願された米国仮出願第63/140,591号の恩典を主張する。これらは全て、その全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0002】

配列表に関する記載

本願に関連する配列表はハードコピーの代わりにテキスト形式で提供され、本明細書に参照により組み入れられる。配列表を含むテキストファイルの名前は、MP_1_0312_PCT_Sequence_Listing_20210302_ST25.txtである。このテキストファイルは136KBであり、2021年3月2日に作成され、本明細書の出願と共にEFS-Webを介して提出されている。

【背景技術】

【0003】

背景

補体系は、ヒトおよび他の脊椎動物において微生物感染症および他の急性侵襲に対する免疫応答を開始、増幅、および組織化するための早期作用機構を提供する(M.K.Liszewski and J.P.Atkinson, 1993, in Fundamental Immunology, Third Edition, W.E.Paul 編, Raven Press, Ltd., New York)。補体活性化は潜在的な病原体に対する有益な第一線の防御を提供するが、防御免疫応答を促進する補体活性が宿主にとって潜在的な脅威となることもある(K.R.Kalli, et al., Springer Semin. Immunopathol.15:417-431, 1994; B.P.Morgan, Eur.J. Clinical Investig.24:219-228, 1994)。例えば、C3およびC5タンパク質分解産物は好中球を動員および活性化する。活性化好中球は宿主防御に不可欠であるが見境なく破壊酵素を放出し、臓器損傷を引き起こすことがある。さらに、補体活性化は近くの宿主細胞ならびに微生物標的の表面に溶解性補体成分を沈着させ、その結果として宿主細胞の溶解を引き起こすことがある。

【0004】

現在、補体系は3つの異なる経路:古典経路、レクチン経路、および代替経路を介して活性化できることが広く認められている。古典経路は、通常、外来粒子(すなわち、抗原)に結合した宿主抗体からなる複合体によって誘発され、従って、特異的抗体反応を発生させるために抗原への事前曝露を必要とする。古典経路の活性化は宿主による以前の獲得免疫応答に左右されるので、古典経路は後天免疫系の一部である。対照的に、レクチン経路および代替経路はいずれも獲得免疫とは無関係であり、自然免疫系の一部である。

【0005】

10

20

30

40

50

レクチン経路は、ナイーブな宿主における感染からの宿主防御において主な役割を有すると広く考えられている。宿主防御においてMBLが関与する強力な証拠が機能的MBLの血清中レベルが低い患者の分析から得られた(Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 401-413, (2002))。このような患者は反復性の細菌感染および真菌感染に対して感受性を示す。これらの症状は、通常、若年期に、母由来抗体価が減少している時であるが、抗体反応の全レパートリーが発達する前の見かけの脆弱期間に現れる。この症候群は、多くの場合、MBLオリゴマーの適切な形成を妨害する、MBLコラーゲン部分にある、いくつかの部位の変異に起因する。しかしながら、MBLは補体に関係なくオプソニンとして機能することができるので、感染に対する感受性の増大がどの程度まで補体活性化の障害によるものであるかは分かっていない。

【0006】

3つ全ての経路(すなわち、古典経路、レクチン経路、および代替経路)はC5において1つになると考えられてきた。C5は切断されて、複数の炎症誘発作用を有する産物を形成する。1つになった経路は終末補体経路と呼ばれてきた。C5aは、平滑筋緊張および血管緊張の変化ならびに血管透過性を誘導する最も強力なアナフィラトキシンである。C5aはまた好中球および単球の強力なケモタキシンおよび活性化因子である。C5aを介した細胞活性化は、サイトカイン、加水分解酵素、アラキドン酸代謝産物、および活性酸素種を含む複数種のさらなる炎症メディエーターの放出を誘導することによって炎症反応を著しく増幅することができる。C5が切断されると、膜侵襲複合体(MAC)としても知られるC5b-9が形成される。現在、溶解を引き起こすのに十分でないMAC沈着が、溶解性ポア形成複合体としての役割に加えて炎症において重要な役割を果たし得るという強力な証拠がある。

【0007】

補体系は免疫防御における必須の役割に加えて、多くの臨床状態における組織損傷の一因となる。非感染性ヒト疾患の発生に古典補体経路および代替補体経路を結び付ける幅広い証拠があるが、レクチン経路の役割は評価され始めたばかりである。最近の研究から、レクチン経路の活性化は虚血/再灌流傷害における補体活性化および関連炎症を担っている可能性があるという証拠が得られた。Collard et al.,(2000)は、酸化ストレスに供された培養内皮細胞はMBLに結合し、ヒト血清に曝露されるとC3沈着を示すと報告した(Collard et al., *Am. J. Pathol* 156:1549-1556,(2000))。さらに、ヒト血清を遮断抗MBLモノクローナル抗体で処理するとMBL結合および補体活性化が阻害された。これらの知見をラット心筋虚血-再灌流モデルに広げた。このモデルでは、ラットMBLに対する遮断抗体で処置されたラットは、冠状動脈閉塞時に対照抗体処置ラットより有意に少ない心筋損傷を示した(Jordan et al., *Circulation*, 104:1413-1418,(2001))。酸化ストレス後の血管内皮とのMBL結合の分子機構は不明である。最近の研究から、酸化ストレス後のレクチン経路の活性化は血管内皮サイトケラチンとのMBL結合によって媒介されるが、複合糖質によって媒介されない可能性があることが示唆されている(Collard et al., *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054,(2001))。他の研究は虚血/再灌流傷害の発生に古典経路および代替経路を結び付けており、この疾患におけるレクチン経路の役割は議論の余地が残されている(Riedermann, N.C. et al., *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003)。

【0008】

線維症は、一般的に損傷または傷害に応答した臓器または組織における過剰な結合組織の形成である。線維症の顕著な特徴は、局所外傷後に過剰な細胞外マトリックスが産生されることである。損傷に対する正常な生理学的応答は結合組織の沈着をもたらすが、この最初のうちは有益であった修復プロセスが持続し、病気を起こし、それにより組織の構造および機能に変化する場合がある。細胞レベルでは上皮細胞および線維芽細胞は増殖し、筋線維芽細胞に分化し、その結果としてマトリックスの収縮、硬直性の増加、微小血管の圧迫、および低酸素が起こる。マクロファージおよびリンパ球を含む炎症細胞が流入するとサイトカインが放出され、コラーゲン、フィブロネクチン、および線維症の他の分子マーカーの沈着が増幅する。従来の治療アプローチは、主に、コルチコステロイドおよび免疫抑制薬物を用いて線維症の炎症プロセスに向けられてきた。残念なことに、これらの抗

炎症剤には臨床効果がほとんど無いが、全く無かった。現在、線維症に有効な治療法または治療剤は無いが、動物での研究およびヒトでの事例報告の両方から線維性組織損傷は逆転する可能性がある」と示唆されている(Tampe and Zeisberg, Nat Rev Nephrol, Vol 10:226-237, 2014)。

【0009】

腎臓には傷害から回復する能力があまりない。様々な腎臓病態が、腎臓組織の瘢痕および線維症を引き起こす局所炎症の原因となる。炎症刺激の永続化は、慢性腎臓疾患における尿細管間質の炎症および線維症ならびに進行性の腎機能障害の原動力となる。末期腎不全まで進行すると、かなり高い罹患率および死亡率と結び付けられる。尿細管間質性線維症は複数の腎臓病態の共通するエンドポイントであるので、腎不全の予防を目的とする療法の重要な標的である。原発性腎疾患とは独立した危険因子(例えば、タンパク尿)が局所炎症の原動力となることで腎臓線維症の発症と腎臓排泄機能の喪失の一因となり、その結果として疾患進行が速まる。

10

【0010】

例えば、慢性腎臓疾患につながる尿細管間質性線維症などの多くの疾患および障害における線維症の役割を考慮すると、線維症によって引き起こされるまたは悪化する疾患および状態を処置するための、治療に有効な薬剤を開発する差し迫った必要性がある。さらに、腎疾患における線維促進性の炎症経路を標的とする新たな治療法および既存の治療法がほとんど無いことを考慮すると、腎臓線維症を処置し、阻害し、予防し、および/または逆転させ、それによって進行性の慢性腎臓疾患を予防するための、治療に有効な薬剤を開発する必要性がある。

20

【0011】

コロナウイルス疾患2019(COVID-19)は、SARSウイルスと密接に関連しているウイルスである重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARSコロナウイルス2またはSARS-CoV-2)によって引き起こされる感染症である(World Health Organization, 2/11/2020, Novel Coronavirus Situation Report 22)。COVID-19に冒されている人は発熱、乾性咳、疲労、および息切れを発症することがある。症例は、肺炎、重症急性呼吸窮迫症候群を含む呼吸機能低下に進行することがあり、最も脆弱な人では死亡に進行することがある(例えば、Hui D.S. et al., Int J Infect Dis 91:264-266, Jan 14, 2020を参照されたい)。ワクチンも特異的な抗ウイルス治療法もなく、管理は症状の処置と支持的治療を伴う。

30

【0012】

インフルエンザ(「フルー」としても知られる)はRNAインフルエンザウイルスによって引き起こされる感染症である。インフルエンザウイルス感染症の症状は軽度から重度に及ぶことがあり、高熱、鼻水、咽頭痛、筋肉痛および関節痛、頭痛、咳嗽、ならびに疲労感を含む。これらの症状は、典型的に、ウイルスに曝露された2日後から始まり、最長で続いても1週間未満であるが、咳は2週間を超えて続くことがある(「Influenza Seasonal, World Health Organization 6 November 2018を参照されたい)。インフルエンザの合併症には、ウイルス性肺炎、急性呼吸窮迫症候群(ARDS)、続発性細菌性肺炎、副鼻腔感染症、および喘息または心不全などの以前の健康問題の悪化が含まれ得る(「Key Facts About Influenza (Flu)」Centers for Disease Control and Prevention (CDC), September 9, 2014を参照されたい)。インフルエンザの影響は感冒の影響よりもはるかにひどく、長く続く。ほとんどの人は、およそ1週間から2週間で完全に回復するが、それ以外の人は肺炎などの命にかかわる合併症を発症する。従って、インフルエンザは、特に、体が弱っている人、若年者および老人、免疫系不全の人、または慢性疾患がある人にとって命にかかわることがある。Hilleman MR, Vaccine. 20 (25-26): 3068-87 (2002)を参照されたい。

40

【0013】

4種類のインフルエンザウイルスのうち3種類:A型、B型、およびC型がヒトに影響を及ぼす(「Types of Influenza Viruses Seasonal Influenza (Flu), Centers for Diseases

50

e Control and Prevention (CDC). 27 September 2017を参照されたい)。D型はヒトに感染することが分かっていないが、ヒトに感染する可能性はあると考えられている(「Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics」, Virulence. 8 (8): 1580-91, 2017を参照されたい)。ヒトで確認されたインフルエンザAの血清型は、H1N1(1918年に「スペイン風邪」および2009年に「ブタインフルエンザ」の原因となった);H2N2(1957年に「アジア風邪」の原因となった)、H3N2(1968年に香港風邪の原因となった)、H5N1(2004年に「鳥インフルエンザ(Bird Flu)」の原因となった)、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9、ならびにH6N1である。World Health Organization (30 June 2006). 「Epidemiology of WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection, Wkly Epidemiol Rec. 81 (26): 249-57.; Fouchier RA, et al. (2004) PNAS 101 (5): 13 56-61; Wkly Epidemiol Rec. 83 (46): 415-20, Asian Lineage Avian Influenza A (H7N9) Virus, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 7 December 2018)を参照されたい。

【0014】

発熱、頭痛、および疲労などのインフルエンザウイルス(フルーとしても知られる)の一般的な症状は、大量の炎症誘発性サイトカインおよびケモカイン(例えば、インターフェロンまたは腫瘍壊死因子)がインフルエンザ感染細胞から産生された結果である。Eccles R. et al., Lancet Infect Dis 5(11):718-25 (2005); Schmitz N, et al., Journal of Virology. 79 (10): 6441-8 (2005)を参照されたい。この強力な免疫応答は命にかかわるサイトカインストームを引き起こすことがある。この影響はH5N1鳥インフルエンザと1918年パンデミック株の普通でない死亡率の原因となったと提唱されている。Cheung CY, et al., Lancet. 360 (9348): 1831-37 (2002); Kash JC, et al., Nature. 443 (7111): 578-81 (2006)。インフルエンザはまたプログラム細胞死(アポトーシス)も誘発するように見える。Spiro SG, et al., Clinical Respiratory Medicine, Elsevier Health Sciences. p. 311 (2012)を参照されたい。

【0015】

従って、コロナウイルス誘発性肺炎および急性呼吸窮迫症候群ならびにインフルエンザウイルス誘発性肺炎および急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、および/または予防するために治療上有効な薬剤を開発する差し迫った必要性がある。

【発明の概要】

【0016】

概要

本概要は、以下の詳細な説明においてさらに説明される幅広い概念を簡単な形で紹介するために提供される。本概要は、特許請求の主題の重要な特徴を特定することを目的とせず、特許請求の主題の範囲の決定を助けるものとして用いられることも目的としない。

【0017】

一局面において、本発明は、コロナウイルスに感染した哺乳動物対象において急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一部の態様において、前記対象は1つまたは複数の呼吸症状に罹患しており、前記方法は、少なくとも1つの呼吸症状を改善するのに(すなわち、呼吸機能を改善するのに)有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、SARS-CoV-2に感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、前記組成物を、COVID-19に罹患している対象、例えば、COVID-19に関連する急性呼吸窮迫症候群(ARDS)に罹患している対象に投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、SARS-CoVに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、MERS-CoVに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記対象は、MASP-2阻害物質の投与前に、コロナウイルス(すなわち、SARS-CoV-2、SARS-CoV、またはMERS-CoV)を有すると特定

されている。一態様において、MASP-2阻害物質はMASP-2抗体またはその抗原結合断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化を阻害する低分子、例えば、合成または半合成の低分子である。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2の発現阻害因子である。一態様において、MASP-2阻害抗体は、ヒトMASP-2に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片である。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその断片は、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される。一態様において、MASP-2阻害抗体は古典経路を実質的に阻害しない。一態様において、MASP-2阻害抗体は90%ヒト血清(すなわち、正常ヒト血清)中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0018】

別の局面において、本発明は、インフルエンザウイルスに感染した哺乳動物対象において急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一部の態様において、前記対象は1つまたは複数の呼吸症状に罹患しており、前記方法は、少なくとも1つの呼吸症状を改善するのに(すなわち、呼吸機能を改善するのに)有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む。一態様において、前記対象は、インフルエンザウイルスA型、インフルエンザウイルスB型、およびインフルエンザウイルスC型からなる群より選択されるインフルエンザウイルスに感染している。一態様において、前記対象はインフルエンザA型に感染している。一態様において、前記対象は、H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9、およびH6N1からなる群より選択されるインフルエンザA型血清型に感染している。一態様において、前記対象は、MASP-2阻害物質の投与前にインフルエンザウイルスを有すると特定されている。一態様において、MASP-2阻害薬はMASP-2抗体またはその抗原結合断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化を阻害する低分子、例えば、合成または半合成の低分子である。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2の発現阻害因子である。一態様において、MASP-2阻害抗体は、ヒトMASP-2に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片である。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその断片は、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される。一態様において、MASP-2阻害抗体は古典経路を実質的に阻害しない。一態様において、MASP-2阻害抗体は90%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0019】

別の局面において、本発明は、線維症および/もしくは炎症、例えば、コロナウイルス感染症によって引き起こされるもしくは悪化する疾患もしくは障害に罹患しているかまたはその発症リスクがある哺乳動物対象において、線維症を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、線維症を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一態様において、MASP-2阻害物質はMASP-2抗体またはその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する。

【0020】

10

別の局面において、本発明は、コロナウイルスに感染した哺乳動物対象において、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、またはコロナウイルス感染症の他の何らかの肺での症状発現もしくは他の症状発現、例えば血栓症を、処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は低分子MASP-2阻害化合物である。

【0021】

20

別の局面において、本発明は、COVID-19誘発性急性呼吸窮迫症候群(ARDS)または肺炎に罹患しているヒト対象を処置するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一態様において、前記対象は処置前に人工呼吸器(侵襲的人工呼吸器または非侵襲的人工呼吸器)を付けており、MASP-2阻害物質は、機械的換気の必要をなくするのに十分な投与量および期間、投与される。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は低分子MASP-2阻害化合物である。

【0022】

30

別の局面において、本発明は、SARS-CoV-2に感染したヒト対象において重症度または凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、または低減させるための方法であって、前記対象において凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、またはその重症度を低減させるのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一態様において、前記対象は処置前に標準範囲より高いD-ダイマーレベルを有し、MASP-2阻害物質は、前記対象におけるD-ダイマーレベルを健常対象の正常範囲内に低減させるのに十分な量および時間、投与される。一態様において、MASP-2阻害物質は、止血に影響を及ぼすことなく抗凝固効果および/または抗血栓症効果をもたらす。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は低分子MASP-2阻害化合物である。

【0023】

40

別の局面において、本発明は、SARS-CoV-2に現在感染しているかまたはSARS-CoV-2に感染したことがあるヒト対象において、1つもしくは複数のCOVID-19関連長期後遺症を処置する、寛解させる、予防する、またはその発症リスクを低減させるための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一態様において、前記対象はCOVID-19誘発性肺炎またはARDSに罹患しており、MASP-2阻害物質は呼吸機能を改善するのに有効な量で投与される。一態様において、前記対象はCOVID-19誘発性肺炎またはARDSから回復しており、MASP-2阻害物質は、1つもしくは複数の長期後遺症を処置するまたは寛解させる量で投与される。一態様において、前記対象はCOVID-19誘発性凝固または血栓症に罹患しており、MASP-2阻害物質は、前記対象において凝固もしくは血栓症を処置する、予

50

防する、またはその重症度を低減させるのに有効な量で前記対象に投与される。一態様において、前記対象はCOVID-19誘発性凝固または血栓症から回復しており、MASP-2阻害物質は、1つもしくは複数の長期後遺症を処置するまたは寛解させる量で投与される。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は低分子MASP-2阻害化合物である。

【0024】

別の局面において、本発明は、インフルエンザウイルスに感染した哺乳動物対象において、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、またはインフルエンザウイルス感染症の他の何らかの肺での症状発現もしくは他の症状発現を、処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一態様において、インフルエンザウイルスはインフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスB、またはインフルエンザウイルスCである。一態様において、インフルエンザウイルスAは、H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9、およびH6N1からなる群より選択される。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である。一態様において、MASP-2阻害物質は低分子MASP-2阻害化合物である。

【0025】

図面の説明

本発明の前述の局面および付随する利点の多くは、添付の図面と共に考慮された場合に以下の詳細な説明を参照することによってさらに深く理解されるようになるので、さらに容易に認識されるようになる。

[本発明1001]

COVID-19誘発性急性呼吸窮迫症候群(ARDS)または肺炎に罹患しているヒト対象を処置するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を該対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1002]

前記対象が処置前に人工呼吸器を付けており、かつMASP-2阻害物質が、機械的換気の必要をなくすのに十分な投与量および期間、投与される、本発明1001の方法。

[本発明1003]

前記対象が侵襲的人工呼吸器を付けている、本発明1002の方法。

[本発明1004]

前記対象が非侵襲的人工呼吸器を付けている、本発明1002の方法。

[本発明1005]

前記対象が、処置前に酸素補給を必要としており、かつMASP-2阻害物質が、酸素補給の必要をなくすのに十分な投与量および期間、投与される、本発明1001の方法。

[本発明1006]

MASP-2阻害物質がMASP-2抗体またはその断片である、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1007]

MASP-2阻害物質が、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である、本発明1006の方法。

[本発明1008]

MASP-2抗体またはその断片が、SEQ ID NO:6を含むポリペプチドに、補体系における異なる抗原に結合するよりも少なくとも10倍高い親和性で特異的に結合する、本発明1006または1007の方法。

[本発明1009]

抗体またはその断片が、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される、本発明1006～1008のい

10

20

30

40

50

ずれかの方法。

[本発明1010]

MASP-2阻害抗体が、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する、本発明1006～1009のいずれかの方法。

[本発明1011]

MASP-2阻害抗体が、10%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、本発明1006～1010のいずれかの方法。

[本発明1012]

MASP-2阻害抗体が、90%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、本発明1006～1010のいずれかの方法。

[本発明1013]

MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、本発明1006～1012のいずれかの方法。

[本発明1014]

MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69を含む軽鎖可変領域を含む、本発明1006～1013のいずれかの方法。

[本発明1015]

MASP-2阻害物質が低分子MASP-2阻害化合物である、本発明1001～1005のいずれかの方法。

[本発明1016]

MASP-2阻害化合物が合成低分子または半合成低分子である、本発明1015の方法。

[本発明1017]

MASP-2阻害物質が、MASP-2の発現阻害因子である、本発明1001の方法。

[本発明1018]

低分子MASP-2阻害化合物が、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)、または(VIIB)のいずれか1つの化合物である、本発明1015の方法。

[本発明1019]

MASP-2阻害物質が、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与、経口投与されるか、または吸入剤として投与される、本発明1001～1018のいずれかの方法。

[本発明1020]

SARS-CoV-2に感染したヒト対象において重症度または凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、または低減させるための方法であって、該対象において凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、またはその重症度を低減させるのに有効な量のMASP-2阻害物質を該対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1021]

前記対象が処置前に標準範囲より高いD-ダイマーレベルを有し、かつMASP-2阻害物質が、該対象におけるD-ダイマーレベルを健常対象の正常範囲内に低減させるのに十分な量および時間、投与される、本発明1020の方法。

[本発明1022]

MASP-2阻害物質が止血に影響を及ぼすことなく抗凝固効果および/または抗血栓症効果をもたらす、本発明1020または1021の方法

[本発明1023]

MASP-2阻害物質がMASP-2抗体またはその断片である、本発明1020～1022のいずれかの方法。

[本発明1024]

MASP-2阻害物質が、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一

10

20

30

40

50

部に特異的に結合するその断片である、本発明1023の方法。

[本発明1025]

MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、本発明1023の方法。

[本発明1026]

MASP-2阻害物質が低分子MASP-2阻害化合物である、本発明1020～1022のいずれかの方法。

[本発明1027]

低分子MASP-2阻害化合物が、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)、または(VIIB)のいずれか1つの化合物である、本発明1026の方法。

[本発明1028]

SARS-CoV-2に現在感染しているかまたはSARS-CoV-2に感染したことがあるヒト対象において、1つもしくは複数のCOVID-19関連長期後遺症を処置する、寛解させる、予防する、またはその発症リスクを低減させるための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を該対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1029]

前記対象がCOVID-19誘発性肺炎またはARDSに罹患しており、かつMASP-2阻害物質が、呼吸機能を改善するのに有効な量で投与される、本発明1028の方法。

[本発明1030]

前記対象がCOVID-19誘発性凝固または血栓症に罹患しており、かつMASP-2阻害物質が、該対象において凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、またはその重症度を低減させるのに有効な量で該対象に投与される、本発明1028の方法。

[本発明1031]

MASP-2阻害物質がMASP-2抗体またはその断片である、本発明1028～1030のいずれかの方法。

[本発明1032]

MASP-2阻害物質が、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である、本発明1031の方法。

[本発明1033]

MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、本発明1031の方法。

[本発明1034]

MASP-2阻害物質が低分子MASP-2阻害化合物である、本発明1028～1030のいずれかの方法。

[本発明1035]

低分子MASP-2阻害化合物が、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)、または(VIIB)のいずれか1つの化合物である、本発明1034の方法。

[本発明1036]

1つまたは複数のCOVID-19関連長期後遺症が、心血管合併症(心筋損傷、心筋症、心筋炎、血管内凝固、脳卒中、静脈および動脈合併症、ならびに肺血栓症を含む); 神経学的合併症(認知困難、混乱状態、記憶喪失、「ブレインフォグ」とも呼ばれるもの、頭痛、脳卒中、めまい、失神、発作、食欲不振、不眠、嗅覚脱失、味覚脱失、ミオクロヌス、神経因性疼痛、筋肉痛、例えばアルツハイマー病、ギランバレー症候群、ミラー・フィッシャー症候群、パーキンソン病等の神経学的疾患の発症を含む)、腎臓損傷(例えば、急性腎障

10

20

30

40

50

害(AKI); 肺合併症(肺線維症、呼吸困難、肺塞栓症を含む)、炎症状態、例えば、川崎病、川崎病様疾患、小児多系統炎症性症候群、多系統臓器不全、極度の疲労、筋力低下、微熱、集中力の欠如、記憶の欠落、気分変化、睡眠困難、腕および脚における針で刺されるような痛み(needle pain)、下痢および嘔吐、味覚および嗅覚の喪失、咽頭痛および嚥下困難、糖尿病および高血圧の新規発症、皮膚発疹、息切れ、胸痛、ならびに動悸からなる群より選択される、本発明1028~1035のいずれかの方法。

[本発明1037]

前記対象がCOVID-19誘発性肺炎またはARDSから回復しており、かつMASP-2阻害物質が、1つもしくは複数の長期後遺症を処置するまたは寛解させる量で投与される、本発明1036の方法。

10

[本発明1038]

前記対象がCOVID-19誘発性凝固または血栓症から回復しており、かつMASP-2阻害物質が、1つもしくは複数の長期後遺症を処置するまたは寛解させる量で投与される、本発明1036の方法。

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】 ヒトMASP-2のゲノム構造を示した図である。

【図2】 図2Aは、ヒトMASP-2タンパク質のドメイン構造を示した模式図である。図2Bは、ヒトMAP19タンパク質のドメイン構造を示した模式図である。

【図3】 マウスMASP-2ノックアウト戦略を示した図である。

20

【図4】 ヒトMASP-2ミニ遺伝子構築物を示した図である。

【図5A】 実施例2に記載のように、マンナン上へのC4b沈着の欠如によって測定された場合に、MASP-2欠損が、レクチン経路によって媒介されるC4活性化の消失につながることを証明した結果を図示する。

【図5B】 実施例2に記載のように、ザイモサン上へのC4b沈着の欠如によって測定された場合に、MASP-2欠損が、レクチン経路によって媒介されるC4活性化の消失につながることを証明した結果を図示する。

【図5C】 実施例2に記載のように、マンナン上およびザイモサン上へのC4b沈着によって測定された場合に、MASP-2^{+/-};MASP-2^{-/-}および野生型系統から得られた血清試料の相対C4活性化レベルを証明した結果を図示する。

30

【図6】 実施例2に記載のように、マンナン上へのC4b沈着によって測定された時に、マウス組換えMASP-2をMASP-2^{-/-}血清試料に添加することによって、レクチン経路によって媒介されるC4活性化がタンパク質濃度依存的に回復することを証明した結果を図示する。

【図7】 実施例8に記載のように、古典経路がMASP-2^{-/-}系統において機能することを証明した結果を図示する。

【図8A】 実施例10に記載のように、抗MASP-2 Fab2抗体#11がC3コンバーターゼ形成を阻害することを証明した結果を図示する。

【図8B】 実施例10に記載のように、抗MASP-2 Fab2抗体#11がネイティブラットMASP-2に結合することを証明した結果を図示する。

40

【図8C】 実施例10に記載のように、抗MASP-2 Fab2抗体#41がC4切断を阻害することを証明した結果を図示する。

【図9】 実施例10に記載のように、C3コンバーターゼ形成を阻害した、試験された抗MASP-2 Fab2抗体の全てがC4切断も阻害することが見出されたことを証明した結果を図示する。

【図10】 実施例11に記載のように、MASP-2遮断Fab2抗体のエピトープマッピングに用いられたラットMASP-2由来組換えポリペプチドを示した図である。

【図11】 実施例11に記載のように、抗MASP-2 Fab2#40および#60とラットMASP-2ポリペプチドとの結合を証明した結果を図示する。

【図12A】 実施例12に記載のように、レクチン経路特異的アッセイ条件下で、ヒトMAS

50

P-2モノクローナル抗体(OMS646)の存在下または非存在下でのMAC沈着レベルを図示する。これにより、OMS646は、レクチンを介したMAC沈着を約1nMのIC₅₀値で阻害することが証明される。

【図12B】実施例12に記載のように、古典経路特異的アッセイ条件下で、ヒトMASP-2モノクローナル抗体(OMS646)の存在下または非存在下でのMAC沈着レベルを図示する。これにより、OMS646は、古典経路を介したMAC沈着を阻害しないことが証明される。

【図12C】実施例12に記載のように、代替経路特異的アッセイ条件下で、ヒトMASP-2モノクローナル抗体(OMS646)の存在下または非存在下でのMAC沈着レベルを図示する。これにより、OMS646は、代替経路を介したMAC沈着を阻害しないことが証明される。

【図13】実施例12に記載のように、マウスにおけるヒトMASP-2モノクローナル抗体(OMS646)の薬物動態学的(PK)プロファイルを図示する。示された用量で投与された後の時間の関数としてのOMS646濃度(n=3動物/群の平均)を示した。

【図14A】実施例12に記載のように、静脈内投与後のマウスにおける全身レクチン経路活性の低下として測定した、ヒトMASP-2モノクローナル抗体(OMS646)の薬力学的(PD)応答を図示する。

【図14B】実施例12に記載のように、皮下投与後のマウスにおける全身レクチン経路活性の低下として測定した、ヒトMASP-2モノクローナル抗体(OMS646)の薬力学的(PD)応答を図示する。

【図15】シリウスレッドで染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。ここで、組織切片は、実施例14に記載のように、片側尿管結紮(unilateral ureteric obstruction)(UUO)を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスから入手した。

【図16】F4/80マクロファージ特異的抗体で染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。ここで、組織切片は、実施例14に記載のように、片側尿管結紮(UUO)を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスから入手した。

【図17】実施例14に記載のように、片側尿管結紮(UUO)を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスから入手した腎臓組織切片において定量PCR(qPCR)によって測定した時のコラーゲン-4の相対mRNA発現レベルを図示する。

【図18】実施例14に記載のように、片側尿管結紮(UUO)を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスから入手した腎臓組織切片においてqPCRによって測定した時のトランスフォーミング成長因子β-1(TGFβ-1)の相対mRNA発現レベルを図示する。

【図19】実施例14に記載のように、片側尿管結紮(UUO)を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスから入手した腎臓組織切片においてqPCRによって測定した時のインターロイキン-6(IL-6)の相対mRNA発現レベルを図示する。

【図20】実施例14に記載のように、片側尿管結紮(UUO)を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスから入手した腎臓組織切片においてqPCRによって測定した時のインターフェロン-γの相対mRNA発現レベルを図示する。

【図21】シリウスレッドで染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。ここで、組織切片は、実施例15に記載のように、MASP-2阻害抗体で処置した野生型マウスおよびアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウスから、片側尿管結紮(UUO)を7日間行った後に入手した。

【図22】実施例15に記載のように、IgG4アイソタイプ対照で処置した野生型マウスから入手した、結紮された腎臓に由来する組織におけるヒドロキシシルプロリンレベルと比較した時の、MASP-2阻害抗体で処置した野生型マウスから入手した、片側尿管結紮(UUO)を7日間行った後に採取した腎臓からのヒドロキシシルプロリン含有量を図示する。

10

20

30

40

50

【図23】実施例16に記載のように、生理食塩水だけ与えた野生型対照マウス(n=2)、BSAを与えた野生型マウス(n=6)、およびBSAを与えたMASP-2-/-マウス(n=6)における、タンパク質過負荷(protein overload)研究の15日目に測定した血清タンパク質の総量(mg/ml)を図示する。

【図24】実施例16に記載のように、生理食塩水だけ与えた野生型対照マウス(n=2)、BSAを与えた野生型(n=6)、およびBSAを与えたMASP-2-/-マウス(n=6)からの、タンパク質過負荷研究の15日目に24時間にわたって収集した尿中の排泄タンパク質の総量(mg)を図示する。

【図25】実施例16に記載のように、以下の通りタンパク質過負荷研究の15日目に、以下のマウス群:(パネルA)野生型対照マウス;(パネルB)MASP-2-/-対照マウス、(パネルC)BSAで処置した野生型マウス;および(パネルD)ウシ血清アルブミン(BSA)で処置したMASP-2-/-マウスから得た代表的なヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色腎臓組織切片を示す。

【図26】マクロファージ平均染色領域(%)を示す、マクロファージ特異的抗体F4/80で染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。ここで、組織切片は、実施例16に記載のように、タンパク質過負荷研究の15日目に、野生型対照マウス(n=2)、BSAで処置した野生型マウス(n=6)、およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=5)から入手した。

【図27A】実施例16に記載のように、24時間試料に由来する尿中で測定した総排泄タンパク質対マクロファージ浸潤(平均染色領域%)をプロットすることによって、BSAで処置した、それぞれの野生型マウス(n=6)にマクロファージ-タンパク尿の相関が存在するかどうかの分析を図示する。

【図27B】実施例16に記載のように、24時間試料中の尿中総排泄タンパク質対マクロファージ浸潤(平均染色領域%)をプロットすることによって、BSAで処置した、それぞれのMASP-2-/-マウス(n=5)にマクロファージ-タンパク尿の相関が存在するかどうかの分析を図示する。

【図28】実施例16に記載のように、BSAで処置した野生型マウス(n=4)およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=5)における、抗TGF β 抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%TGF β 抗体染色領域として測定した)を図示する。

【図29】実施例16に記載のように、BSAで処置した野生型マウス(n=4)およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=5)における、抗TNF α 抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%TNF α 抗体染色領域として測定した)を図示する。

【図30】実施例16に記載のように、野生型対照マウス、MASP-2-/-対照マウス、BSAで処置した野生型マウス(n=7)、およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=7)における、抗IL-6抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%IL-6抗体染色領域として測定した)を図示する。

【図31】実施例16に記載のように、野生型対照マウス(n=1)、MASP-2-/-対照マウス(n=1)、BSAで処置した野生型マウス(n=6)、およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=7)の腎皮質に由来する組織切片から得た連続して選択した20個の高倍率視野(HPF)において計数したTUNELアポトーシス細胞の頻度を図示する。

【図32】実施例17に記載のように、BSAで処置した後、15日目の以下のマウス群:(パネルA)生理食塩水で処置した野生型対照マウス、(パネルB)アイソタイプ抗体で処置した対照マウス、および(パネルC)MASP-2阻害抗体で処置した野生型マウスからの代表的なH&E染色組織切片を示す。

【図33】実施例17に記載のように、生理食塩水対照およびBSAで処置した野生型マウス(n=8)、アイソタイプ対照抗体およびBSAで処置した野生型マウス(n=8)、ならびにMASP-2阻害抗体およびBSAで処置した野生型マウス(n=7)の腎皮質に由来する組織切片から得た連続して選択した20個の高倍率視野(HPF)において計数したTUNELアポトーシス細胞の頻度を図示する。

【図34】実施例17に記載のように、BSAおよび生理食塩水で処置した野生型マウス(n=8)、BSAおよびアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウス(n=7)、ならびにBSAおよび

10

20

30

40

50

MASP-2阻害抗体で処置した野生型マウス(n=8)における、抗TGF β 抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%TGF β 抗体染色領域として測定した)を図示する。

【図35】実施例17に記載のように、BSAおよび生理食塩水で処置した野生型マウス(n=8)、BSAおよびアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウス(n=7)、ならびにBSAおよびMASP-2阻害抗体で処置した野生型マウス(n=8)における、抗TNF α 抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%TNF α 抗体染色領域として測定した)を図示する。

【図36】実施例17に記載のように、BSAおよび生理食塩水で処置した野生型マウス(n=8)、BSAおよびアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウス(n=7)、ならびにBSAおよびMASP-2阻害抗体で処置した野生型マウス(n=8)における、抗IL-6抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%IL-6抗体染色領域として測定した)を図示する。

【図37】実施例18に記載のように、アドリマイシンまたは生理食塩水だけ(対照)で処置した後、14日目の以下のマウス群:(パネルA-1、A-2、A-3)生理食塩水だけで処置した野生型対照マウス;(パネルB-1、B-2、B-3)アドリマイシンで処置した野生型マウス;および(パネルC-1、C-2、C-3)アドリマイシンで処置したMASP-2-/-マウスからの代表的なH&E染色組織切片を示す。

【図38】実施例18に記載のように、アドリマイシンまたは生理食塩水だけ(野生型対照)で処置した後、14日目の以下のマウス群:生理食塩水だけで処置した野生型対照マウス;アドリマイシンで処置した野生型マウス;生理食塩水だけで処置したMASP-2-/-マウス、およびアドリマイシンで処置したMASP-2-/-マウスからのマクロファージ平均染色領域(%)を示した、マクロファージ特異的抗体F4/80で染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。**p=0.007。

【図39】実施例18に記載のように、アドリマイシンまたは生理食塩水だけ(野生型対照)で処置した後、14日目の以下のマウス群:生理食塩水だけで処置した野生型対照マウス;アドリマイシンで処置した野生型マウス;生理食塩水だけで処置したMASP-2-/-マウス、およびアドリマイシンで処置したMASP-2-/-マウスからのコラーゲン沈着染色領域(%)を示す、シリウスレッドで染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。**p=0.005。

【図40】実施例19に記載のように、12週間の研究中にMASP-2阻害抗体(OMS646)を用いて毎週処置した2人のIgA患者における尿アルブミン/クレアチニン比(uACR)を図示する。

【図41A】実施例21に記載のように、COVID-19患者肺に由来する中隔血管の組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像(H&E, 400x)を図示する。

【図41B】実施例21に記載のように、COVID-19患者肺に由来する中隔血管の組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像(H&E, 400x)を図示する。

【図41C】実施例21に記載のように、COVID-19患者に由来する中間直径(medium diameter)肺中隔血管の組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像を図示する。

【図41D】実施例21に記載のように、COVID-19患者に由来する肝実質の組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像(H&E, 400x)を図示する。

【図42A】実施例21に記載のように、この研究の一部でないCOVID-19患者(n=33)におけるCEC/ml数と比較した時の正常健常対照(n=6)の末梢血中にある循環内皮細胞(CEC)/ml数を図示する。

【図42B】実施例21に記載のように、ナルソプリマブ処置前(ベースライン)とナルソプリマブ処置後に、この研究のために選択された6人の患者におけるCEC/ml数を図示する。箱は第1四分位数から第3四分位数までの値を表し、横線は中央値を示し、ひげは最小値と最大値を示している。

【図43】実施例21に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、6人のCOVID-19患者におけるC反応性タンパク質(CRP)の血清

10

20

30

40

50

レベル(中央値;四分位数間範囲(IQR))を図示する。

【図44】実施例21に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での6人のCOVID-19患者における乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の血清レベル(中央値;IQR)を図示する。

【図45】実施例21に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、6人のCOVID-19患者におけるインターロイキン6(IL-6)の血清レベル(中央値;四分位数間範囲(IQR))を図示する。

【図46】実施例21に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、6人のCOVID-19患者におけるインターロイキン8(IL-8)の血清レベル(中央値;四分位数間範囲(IQR))を図示する。

【図47】図47Aは、実施例21に記載のように、登録から(すなわち、ナルソプリマブ処置後)5日目の患者#4のCTスキャンを図示する。このCTスキャンで、患者は、重度の間質性肺炎と、末梢領域と中心領域の両方が関与する広汎性のスリガラス陰影、下肺葉、特に、左肺の下肺葉の硬化、ならびに広範囲の両側肺塞栓症と葉間動脈および分節動脈における陰影欠損(示さず)を有することが観察された。図47Bは、実施例21に記載のように、スリガラス陰影が有意に少なくなり、実質硬化がほぼ完全に消散した、登録から(すなわち、ナルソプリマブ処置後)16日目の患者#4のCTスキャンを図示する。

【図48】実施例21に記載のように、ナルソプリマブで処置したCOVID-19患者におけるベースライン時およびナルソプリマブ処置後の異なる時点(2回の投薬の後、4回の投薬の後)でのIL-6の血清レベル(pg/mL)を図示する。箱は第1四分位数から第3四分位数までの値を表し、横線は中央値を示し、点は患者全員の値を図示する。

【図49】実施例21に記載のように、ナルソプリマブで処置したCOVID-19患者におけるベースライン時およびナルソプリマブ処置後の異なる時点(2回の投薬の後、4回の投薬の後)でのIL-8の血清レベル(pg/mL)を図示する。箱は第1四分位数から第3四分位数までの値を表し、横線は中央値を示し、点は患者全員の値を図示する。

【図50】実施例21に記載のように、ナルソプリマブで処置した6人のCOVID-19患者の臨床アウトカムを図示する。

【図51A】実施例21に記載のように、ナルソプリマブ処置前およびナルソプリマブ処置後のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の血清レベル(ユニット/リットル、U/L)値を図示する。黒色の線は中央値および四分位数間範囲(IQR)を表している。赤色の線は正規性(normality)レベルを表している。点は、患者全員の値を示している。

【図51B】4人のCOVID-19患者におけるD-ダイマーの血清レベル値(ng/ml)を図示する。ベースライン値は、ナルソプリマブ処置開始前に入手することができた。黒色の丸はステロイド処置開始時を示している。実施例21に記載のように、赤色の線は正規性レベルを表している。

【図52A】実施例22に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、ナルソプリマブで処置した7人目のCOVID-19患者(患者#7)におけるD-ダイマー値の血清レベル(ng/ml)を図示する。この図では、ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印で示し、横線は正規性レベルを表している。

【図52B】実施例22に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、COVID-19患者#7におけるC反応性タンパク質(CRP)の血清レベルを図示する。この図では、ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印で示し、横線は正規性レベルを表している。

【図52C】実施例22に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、COVID-19患者#7におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の血清レベル(ユニット/リットル、U/L)を図示する。この図では、ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印で示し、横線は正規性レベルを表している。

【図52D】実施例22に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、COVID-19患者#7におけるアラントランスアミナーゼ(ALT)の血清レベル(ユニット/リットル、U/L)を図示する。この図では、ナルソプリマブによ

10

20

30

40

50

る投薬を縦の矢印で示し、横線は正規性レベルを表している。

【図52E】実施例22に記載のように、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、COVID-19患者#7における乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の血清レベルを図示する。この図では、ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印で示し、横線は正規性レベルを表している。

【図53】実施例22に記載のように、患者#7における抗SARS-CoV-2抗体の力価を経時的に図示する。この図から、ナルソプリマブ処置は適応免疫応答のエフェクター機能を妨害しないことが分かる。

【発明を実施するための形態】

【0027】

配列表の説明

SEQ ID NO:1 ヒトMAp19 cDNA

SEQ ID NO:2 ヒトMAp19タンパク質(リーダーあり)

SEQ ID NO:3 ヒトMAp19タンパク質(成熟)

SEQ ID NO:4 ヒトMASP-2 cDNA

SEQ ID NO:5 ヒトMASP-2タンパク質(リーダーあり)

SEQ ID NO:6 ヒトMASP-2タンパク質(成熟)

SEQ ID NO:7 ヒトMASP-2 gDNA(エキソン1~6)

抗原:(MASP-2成熟タンパク質を基準にした)

SEQ ID NO:8 CUBI配列(aa1~121)

SEQ ID NO:9 CUBEGF配列(aa1~166)

SEQ ID NO:10 CUBEGFCUBII(aa1~293)

SEQ ID NO:11 EGF領域(aa122~166)

SEQ ID NO:12 セリンプロテアーゼドメイン(aa429~671)

SEQ ID NO:13 セリンプロテアーゼドメイン不活性(Ser618→Ala変異を有するaa610~625)

SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL (CUBI ペプチド)

SEQ ID NO:15

TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLC

GQ (CUBI ペプチド)

SEQ ID NO:16 TFRSDYSN (MBL 結合領域コア)

SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL 結合領域コア)

SEQ ID NO:18 IDECQVAPG (EGF ペプチド)

SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSSGGALV (セリンプロテアーゼ結合コア)

ペプチド阻害因子:

SEQ ID NO:20 MBL 完全長cDNA

SEQ ID NO:21 MBL 完全長タンパク質

SEQ ID NO:22 OGK-X-GP (コンセンサス結合)

10

20

30

40

50

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

(ヒトh-フィコリン)

SEQ ID NO:28

GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPN

GAOGEO (ヒトフィコリンp35)

SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (C4 切断部位)

発現阻害因子:

SEQ ID NO:30 CUBI-EGFドメインのcDNA (SEQ ID NO:4のヌクレオチド22~680)

SEQ ID NO:31

5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3'

MASP-2翻訳開始点を含むSEQ ID NO:4のヌクレオチド12~45(センス)

SEQ ID NO:32

5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'

MASP-2 MBL結合部位を含む領域をコードするSEQ ID NO:4のヌクレオチド361~396(センス)

SEQ ID NO:33

5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3'

CUBIIドメインを含む領域をコードするSEQ ID NO:4のヌクレオチド610~642

クローニングプライマー:

SEQ ID NO:34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (CUB用の

5' PCR)

SEQ ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (CUB用の3' PCR)

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

SEQ ID NO:37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (CUBIEGFCUBII用の

3' PCR)

SEQ ID NO:38~47は、ヒト化抗体用のクローニングプライマーである。

SEQ ID NO:48は、9aaペプチド結合である。

発現ベクター:

SEQ ID NO:49は、MASP-2ミニ遺伝子インサートである。

SEQ ID NO:50は、マウスMASP-2 cDNAである。

SEQ ID NO:51は、マウスMASP-2タンパク質(リーダーあり)である。

SEQ ID NO:52は、成熟マウスMASP-2タンパク質である。

SEQ ID NO:53は、ラットMASP-2 cDNAである。

SEQ ID NO:54は、ラットMASP-2タンパク質(リーダーあり)である。

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:55は、成熟ラットMASP-2タンパク質である。

SEQ ID NO:56～59は、ヒトMASP-2Aを生成するために用いられるヒトMASP-2の部位特異的変異誘発用オリゴヌクレオチドである。

SEQ ID NO:60～63は、マウスMASP-2Aを生成するために用いられるマウスMASP-2の部位特異的変異誘発用オリゴヌクレオチドである。

SEQ ID NO:64～65は、ラットMASP-2Aを生成するために用いられるラットMASP-2の部位特異的変異誘発用オリゴヌクレオチドである。

SEQ ID NO:66 17D20_dc35VH21N11VL(OMS646)重鎖可変領域(VH)(シグナルペプチドなし)をコードするDNA

SEQ ID NO:67 17D20_dc35VH21N11VL(OMS646)重鎖可変領域(VH)ポリペプチド

SEQ ID NO:68 17N16mc重鎖可変領域(VH)ポリペプチド

SEQ ID NO:69 17D20_dc35VH21N11VL(OMS646)軽鎖可変領域(VL)ポリペプチド

SEQ ID NO:70 17D20_dc35VH21N11VL(OMS646)軽鎖可変領域(VL)をコードするDNA

SEQ ID NO:71 17N16_dc17N9軽鎖可変領域(VL)ポリペプチド

SEQ ID NO:72: SGMI-2L(完全長)

SEQ ID NO:73: SGMI-2M(ミディアム切断型バージョン)

SEQ ID NO:74: SGMI-2S(ショート切断型バージョン)

SEQ ID NO:75: VH-M2ab6-SGMI-2-Nと、ヒンジ変異があるヒトIgG4定常領域とを含む成熟ポリペプチド

SEQ ID NO:76: VH-M2ab6-SGMI-2-Cと、ヒンジ変異があるヒトIgG4定常領域とを含む成熟ポリペプチド

SEQ ID NO:77: VL-M2ab6-SGMI-2-NとヒトIgλ定常領域とを含む成熟ポリペプチド

SEQ ID NO:78: VL-M2ab6-SGMI-2-CとヒトIgλ定常領域とを含む成熟ポリペプチド

SEQ ID NO:79: ペプチドリンカー(10aa)

SEQ ID NO:80: ペプチドリンカー(6aa)

SEQ ID NO:81: ペプチドリンカー(4aa)

SEQ ID NO:82: VH-M2ab6-SGMI-2-Nと、ヒンジ変異があるヒトIgG4定常領域とを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

SEQ ID NO:83: VH-M2ab 6-SGMI-2-Cと、ヒンジ変異があるヒトIgG4定常領域とを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

SEQ ID NO:84: VL-M2ab6-SGMI-2-NとヒトIgλ定常領域とを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

SEQ ID NO:85: VL-M2ab6-SGMI-2-CとヒトIgλ定常領域とを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

【0028】

詳細な説明

本発明は、腎臓線維症の片側尿管結紮(unilateral ureteral obstruction)(UUO)モデル、タンパク質過負荷モデル、およびアドリアマイシン誘発性腎臓病(adriamycin-induced nephrology)モデルを含む線維性疾患の様々な動物モデルにおいて、補体系のレクチン経路の重要な制御因子であるマンナン結合レクチン関連セリンプロテアーゼ-2(MASP-2)を阻害すると炎症および線維症が大幅に低減するという本発明者らによる驚くべき発見に基づいている。従って、本発明者らによって、根底にある原因に関係なく、MASP-2媒介性レクチン経路活性化の阻害が、腎臓線維症、例えば、尿細管間質の炎症および線維症を寛解させる、処置する、または予防するための有効な治療アプローチとなることが証明された。さらに本明細書に記載のように、MASP-2阻害抗体(OMS646)の使用は、免疫グロブリンA腎症(IgAN)および膜性腎症(MN)に罹患しているヒト対象において腎機能を改善し、コルチコステロイドの必要性を減らすのに有効である。本明細書においてさらに説明されるように、MASP-2阻害物質の使用はまた、SARS-CoV-2などのコロナウイルスに感染した対象において急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、軽減させる、または予防す

10

20

30

40

50

るのにも有用であり、インフルエンザウイルスに感染した対象において急性呼吸窮迫を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するのにも有用である。

【0029】

I. 定義

本明細書において特に定義がない限り、本明細書において用いられる全ての用語は、本発明の当業者によって理解されるものと同じ意味を有する。本発明を説明するために明細書および特許請求の範囲において用いられる用語をわかりやすくするために、以下の定義が提供される。

【0030】

本明細書で使用する「MASP-2依存性補体活性化」という用語は、レクチン経路C3コンバーゼC4b2aの形成とそれに続く、C3切断産物C3bの蓄積時のC5コンバーゼC4b2a(C3b)nの形成につながる、生理学的条件下(すなわち、Ca⁺⁺の存在下)で起こるレクチン経路のMASP-2依存性活性化を含み、主に、オプソニン化を引き起こすことが判明している。

【0031】

本明細書で使用する「代替経路」という用語は、例えば、真菌細胞壁および酵母細胞壁に由来するザイモサン、グラム陰性細菌の外膜に由来するリポ多糖(LPS)、およびウサギ赤血球、ならびに多くの純粋な多糖、ウサギ赤血球、ウイルス、細菌、動物腫瘍細胞、寄生生物、および損傷細胞によって誘発され、従来、補体因子C3からC3bの自発的タンパク質分解生成から生じると考えられてきた補体活性化を指す。

【0032】

本明細書で使用する「レクチン経路」という用語は、マンナン結合レクチン(MBL)、CL-11、およびフィコリン(H-フィコリン、M-フィコリン、またはL-フィコリン)を含む血清炭水化物結合タンパク質および非血清炭水化物結合タンパク質の特異的結合を介して起こる補体活性化を指す。

【0033】

本明細書で使用する「古典経路」という用語は、外来粒子に結合している抗体によって誘発され、認識分子C1qの結合を必要とする補体活性化を指す。

【0034】

本明細書で使用する「MASP-2阻害物質」という用語は、MASP-2に結合するかまたはMASP-2と直接相互作用して、MASP-2依存性補体活性化を効果的に阻害する任意の作用物質を指し、抗MASP-2抗体およびそのMASP-2結合断片、天然ペプチドおよび合成ペプチド、低分子、可溶性MASP-2受容体、発現阻害因子、ならびに単離された天然阻害因子を含み、レクチン経路において別の認識分子(例えば、MBL、H-フィコリン、M-フィコリン、またはL-フィコリン)との結合においてMASP-2と競合するペプチドも包含するが、このような他の認識分子に結合する抗体を包含しない。本発明の方法において有用なMASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化を20%超、例えば、50%超、例えば、90%超低下させ得る。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化を90%超低下させる(すなわち、MASP-2補体活性化を10%またはそれ未満しかもたらさない)。

【0035】

本明細書で使用する「線維症」という用語は、臓器または組織において過剰な結合組織が形成または存在することを指す。線維症は、組織損傷または炎症などの刺激に対する修復応答または交換応答として発生する場合がある。線維症の顕著な特徴は過剰な細胞外マトリックスが産生されることである。損傷に対する正常な生理学的応答は治癒プロセスの一環として結合組織の沈着をもたらすが、この結合組織沈着が持続し、病気を起こし、それにより組織の構造および機能に変化する場合がある。細胞レベルでは上皮細胞および線維芽細胞が増殖し、筋線維芽細胞に分化し、その結果、マトリックスの収縮、硬直性の増加、微小血管の圧迫、および低酸素が起こる。

【0036】

本明細書で使用する「線維症および/もしくは炎症によって引き起こされるもしくは悪化する疾患もしくは障害に罹患しているかまたはその発症リスクがある哺乳動物対象におい

10

20

30

40

50

て、線維症を処置する」という用語は、前記哺乳動物対象において線維症を逆転させる、軽減させる、寛解させる、または阻害することを指す。

【0037】

本明細書で使用する「タンパク尿」という用語は、尿中タンパク質が異常な量で存在すること、例えば、ヒト対象からの24時間尿収集体中に0.3gタンパク質を超える量で存在すること、またはヒト対象において1リットルあたり1gを超える濃度で存在することを指す。

【0038】

本明細書で使用する「タンパク尿を改善する」または「タンパク尿を低減させる」という用語は、タンパク尿に罹患している対象における24時間尿タンパク質排泄を、MASP-2阻害物質を用いた処置の前の対象におけるベースライン24時間尿タンパク質排泄と比較して少なくとも20%、例えば、少なくとも30%、例えば、少なくとも40%、例えば、少なくとも50%、またはそれより多く低減させることを指す。一態様において、本発明の方法に従うMASP-2阻害物質を用いた処置は、ヒト対象においてタンパク尿を低減させるのに、例えば、20パーセント超の24時間尿タンパク質排泄低下、もしくは、例えば、30パーセント超の24時間尿タンパク質排泄低下、もしくは、例えば、40パーセント超の24時間尿タンパク質排泄低下、もしくは、例えば、50パーセント超の24時間尿タンパク質排泄低下を成し遂げるのに有効である。

【0039】

本明細書で使用する「低分子」、「有機低分子」、および「無機低分子」という用語は、それぞれ、天然または合成であり、かつ約50Da超であり、約2500Da未満の分子量を有する分子(有機、有機金属、または無機のいずれか)、有機分子、および無機分子を指す。有機(例えば)低分子は、約2000Da未満、約100Da〜約1000Da、または約100〜約600Da、または約200〜500Daでもよい。

【0040】

本明細書で使用する「抗体」という用語は、標的ポリペプチド、例えば、MASP-2ポリペプチドまたはその一部に特異的に結合する、任意の抗体産生哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、およびヒトを含む霊長類)に由来するかあるいはハイブリドーマ、ファージセクション、組換え発現、またはトランスジェニック動物(または抗体もしくは抗体断片を産生する他の方法)に由来する抗体およびその抗体断片を包含する。「抗体」という用語は、抗体源、または抗体が作製されるやり方の点で(例えば、ハイブリドーマ、ファージセクション、組換え発現、トランスジェニック動物、ペプチド合成などによって)限定されることが意図されない。例示的な抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、および組換え抗体;汎(pan)特異的、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体、三重特異性抗体);ヒト化抗体;マウス抗体;キメラ、マウス-ヒト、マウス-霊長類、霊長類-ヒトモノクローナル抗体;および抗イディオタイプ抗体を含み、任意のインタクトな抗体またはその断片でもよい。本明細書で使用する「抗体」という用語は、インタクトなポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体だけでなく、その断片(例えば、dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、単鎖(ScFv)、その合成変種、天然変種、抗体部分と、必要とされる特異性の抗原結合断片を含む融合タンパク質、ヒト化抗体、キメラ抗体、および必要とされる特異性の抗原結合部位または断片(エピトープ認識部位)を含む免疫グロブリン分子の他の任意の改変された構成も包含する。

【0041】

「モノクローナル抗体」は均質な抗体集団を指し、モノクローナル抗体は、エピトープの選択的結合に関与するアミノ酸(天然および非天然)からなる。モノクローナル抗体は標的抗原に対して高度に特異的である。「モノクローナル抗体」という用語は、インタクトなモノクローナル抗体および完全長モノクローナル抗体だけでなく、その断片(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、単鎖(ScFv)、その変種、抗原結合部分を含む融合タンパク質、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、ならびに必要とされる特異性およびエピトープに結合する能力の抗原結合断片(エピトープ認識部位)を含む免疫グロブリン

10

20

30

40

50

ン分子の他の任意の改変された構成も包含する。この用語は、抗体源、または抗体が作製されるやり方の点で(例えば、ハイブリドーマ、ファージセクション、組換え発現、トランスジェニック動物などによって)限定されることが意図されない。この用語は、「抗体」の定義で前述された免疫グロブリン全体および断片などを含む。

【0042】

本明細書で使用する「抗体断片」という用語は、完全長抗体、例えば、抗MASP-2抗体に由来または関連する、一般的には、その抗原結合領域または可変領域を含む、部分を指す。抗体断片の例示的な例には、Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、およびFv断片、scFv断片、ダイアボディ、直鎖抗体、単鎖抗体分子、ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれる。

10

【0043】

本明細書で使用する「単鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のV_HドメインまたはV_Lドメインを含み、これらのドメインは1本のポリペプチド鎖に存在する。一般的に、Fvポリペプチドは、V_HドメインとV_Lドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、このためにscFvは抗原結合のために望ましい構造を形成することができる。

【0044】

本明細書で使用する「キメラ抗体」は、非ヒト種(例えば、げっ歯類)抗体に由来する可変ドメインおよび相補性決定領域を含有するが、抗体分子の残りがヒト抗体に由来する、組換えタンパク質である。

【0045】

本明細書で使用する「ヒト化抗体」は、ヒト抗体フレームワークに移植された、非ヒト免疫グロブリンに由来する特異的な相補性決定領域に一致する最小配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は、典型的には、抗体相補性決定領域のみが非ヒトに由来する組換えタンパク質である。

20

【0046】

本明細書で使用する「マンナン結合レクチン」(「MBL」)という用語は、マンナン結合タンパク質(「MBP」)と同意義である。

【0047】

本明細書で使用する「膜侵襲複合体」(「MAC」)は、膜に入り込み、膜を破壊する、5種類の終末補体成分の複合体(C5bとC6、C7、C8、およびC9との組み合わせ)(C5b-9とも呼ばれる)を指す。

30

【0048】

本明細書で使用する「対象」は、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウサギ、ブタ、およびげっ歯類を含むが、それに限定されるわけではない、全ての哺乳動物を含む。

【0049】

本明細書で使用するアミノ酸残基の略語は以下の通りである:アラニン(Ala;A)、アスパラギン(Asn;N)、アスパラギン酸(Asp;D)、アルギニン(Arg;R)、システイン(Cys;C)、グルタミン酸(Glu;E)、グルタミン(Gln;Q)、グリシン(Gly;G)、ヒスチジン(His;H)、イソロイシン(Ile;I)、ロイシン(Leu;L)、リジン(Lys;K)、メチオニン(Met;M)、フェニルアラニン(Phe;F)、プロリン(Pro;P)、セリン(Ser;S)、スレオニン(Thr;T)、トリプトファン(Trp;W)、チロシン(Tyr;Y)、およびバリン(Val;V)。

40

【0050】

最も広い意味では、天然アミノ酸は、それぞれのアミノ酸の側鎖の化学特性に基づいてグループに分けることができる。「疎水性」アミノ酸とは、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val、Ala、CysまたはProを意味する。「親水性」アミノ酸とは、Gly、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、Arg、またはHisを意味する。このアミノ酸グループは、以下のように、さらにサブグループに分けることができる。「無電荷親水性」アミノ酸とは、Ser、Thr、Asn、またはGlnを意味する。「酸性」アミノ酸とはGluまたはAspを意味する。「塩基性」アミノ酸とはLys、Arg、またはHisを意味する。

50

【0051】

本明細書で使用する「保存的アミノ酸置換」という用語は、以下のそれぞれのグループ内のアミノ酸間の置換によって例示される:(1)グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、(2)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、(3)セリンおよびスレオニン、(4)アスパラギン酸およびグルタミン酸、(5)グルタミンおよびアスパラギン、ならびに(6)リジン、アルギニンおよびヒスチジン。

【0052】

本明細書で使用する「オリゴヌクレオチド」という用語は、リボ核酸(RNA)もしくはデオキシリボ核酸(DNA)またはその模倣物のオリゴマーまたはポリマーを指す。この用語は、天然のヌクレオチド、糖、およびヌクレオシド間(バックボーン)共有結合からなるオリゴヌクレオ塩基(oligonucleobase)、ならびに非天然改変を有するオリゴヌクレオチドもカバーする。

10

【0053】

本明細書で使用する「エピトープ」は、抗体が結合する、タンパク質(例えば、ヒトMASP-2タンパク質)上の部位を指す。「重複エピトープ」は、直鎖エピトープおよび非直鎖エピトープを含む、少なくとも1個(例えば、2個、3個、4個、5個、または6個)の共通アミノ酸残基を含む。

【0054】

本明細書で使用する「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」という用語は同義に用いられ、長さにも翻訳後修飾に関係なく任意のペプチド結合アミノ酸鎖を意味する。本明細書に記載のMASP-2タンパク質は野生型タンパク質を含有してもよく、野生型タンパク質でもよく、50個以下(例えば、1個以下、2個以下、3個以下、4個以下、5個以下、6個以下、7個以下、8個以下、9個以下、10個以下、12個以下、15個以下、20個以下、25個以下、30個以下、35個以下、40個以下、または50個以下)の保存的アミノ酸置換を有する変種でもよい。保存的置換は、典型的には、以下のグループ内の置換を含む;グリシンおよびアラニン;バリン、イソロイシン、およびロイシン;アスパラギン酸およびグルタミン酸;アスパラギン、グルタミン、セリン、およびスレオニン;リジン、ヒスチジン、およびアルギニン;ならびにフェニルアラニンおよびチロシン。

20

【0055】

一部の態様において、ヒトMASP-2タンパク質は、SEQ ID NO:5に示されたアミノ酸配列を有するヒトMASP-2タンパク質と70(例えば、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、もしくは100)%同一、または70(例えば、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、もしくは100)%超同一のアミノ酸配列を有してもよい。

30

【0056】

一部の態様において、ペプチド断片は、長さが少なくとも6個(例えば、少なくとも7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、20個、21個、22個、23個、24個、25個、26個、27個、28個、29個、30個、31個、32個、33個、34個、35個、36個、37個、38個、39個、40個、41個、42個、43個、44個、45個、46個、47個、48個、49個、50個、55個、60個、65個、70個、75個、80個、85個、90個、95個、100個、110個、120個、130個、140個、150個、160個、170個、180個、190個、200個、250個、300個、350個、400個、450個、500個、もしくは600個、またはそれ以上の)アミノ酸残基(例えば、SEQ ID NO:5の少なくとも6個の連続したアミノ酸残基)でもよい。一部の態様において、ヒトMASP-2タンパク質の抗原性ペプチド断片は、長さが500個未満(例えば、450個未満、400個未満、350個未満、325個未満、300個未満、275個未満、250個未満、225個未満、200個未満、190個未満、180個未満、170個未満、160個未満、150個未満、140個未満、130個未満、120個未満、110個未満、100個未満、95個未満、90個未満、85個未満、80個未満、75個

40

50

未満、70個未満、65個未満、60個未満、55個未満、50個未満、49個未満、48個未満、47個未満、46個未満、45個未満、44個未満、43個未満、42個未満、41個未満、40個未満、39個未満、38個未満、37個未満、36個未満、35個未満、34個未満、33個未満、32個未満、31個未満、30個未満、29個未満、28個未満、27個未満、26個未満、25個未満、24個未満、23個未満、22個未満、21個未満、20個未満、19個未満、18個未満、17個未満、16個未満、15個未満、14個未満、13個未満、12個未満、11個未満、10個未満、9個未満、8個未満、7個未満、または6個未満)のアミノ酸残基(例えば、SEQ ID NO:5のいずれか1つにある500個未満の連続したアミノ酸残基)である。

【0057】

アミノ酸配列同一性パーセント(%)は、最大の配列同一性パーセントを実現するように配列をアラインメントし、必要であればギャップを導入した後の、参照配列中のアミノ酸と同一の候補配列中のアミノ酸のパーセントと定義される。配列同一性パーセントを求める目的で、当技術分野における技術の範囲内の様々なやり方で、例えば、公的利用可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、またはMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを用いて、アラインメントを実現することができる。比較されている配列の完全長にわたって最大アラインメントを実現するのに必要な、任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータは公知の方法によって決定することができる。

【0058】

II. 本発明の概略

本明細書に記載のように、本発明者らは尿細管腎臓病態の開始および疾患進行におけるレクチン経路の中心的な役割を突き止めた。このことは、IgA腎症、C3系球体症、および他の系球体腎炎を含む様々な腎疾患の病態生理におけるレクチン経路活性化の重要な役割を意味している。本明細書においてさらに説明されるように、本発明者らは、補体系のレクチン経路の重要な制御因子であるマンナン結合レクチン関連セリンプロテアーゼ-2(MASP-2)を阻害することによって、腎臓線維症の片側尿管結紮(UUO)モデル、タンパク質過負荷モデル、およびアドリアマイシン誘発性腎臓病モデルを含む線維性疾患の様々な動物モデルにおいて炎症および線維症が大幅に低減することを発見した。従って、本発明者らは、根底にある原因に関係なく、MASP-2媒介性レクチン経路活性化の阻害が、腎臓線維症、例えば、尿細管間質性線維症を寛解させる、処置する、または予防するための有効な治療アプローチとなることを証明した。本明細書においてさらに説明されるように、MASP-2阻害物質の使用は、SARS-CoV-2などのコロナウイルスに感染した対象において急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するのに有用である。

【0059】

レクチン(MBL、M-フィコリン、H-フィコリン、L-フィコリン、およびCL-11)は先天の補体系を誘発する特異的認識分子であり、この系は、レクチン開始経路、およびレクチンによって開始される終末補体エフェクター分子活性化を増幅する関連する終末経路増幅ループを含む。C1qは後天的補体系を誘発する特異的認識分子であり、この系は、古典的開始経路、およびC1qによって開始される終末補体エフェクター分子活性化を増幅する関連する終末経路増幅ループを含む。本発明者らは、これらの2つの主要な補体活性化系を、それぞれ、レクチン依存性補体系およびC1q依存性補体系と呼ぶ。

【0060】

補体系は、免疫防御における必須の役割に加えて、多くの臨床状態における組織損傷の一因となる。従って、これらの副作用を阻止するために治療上有効な補体阻害因子を開発する差し迫った必要性がある。古典経路を完全な状態のままにしておきながら、レクチン媒介MASP-2経路を阻害することが可能だという認識の下で、補体の免疫防御能力を完全に遮断することなく、ある特定の病態の原因となる補体活性化系のみを特異的に阻害することが極めて望ましいことに気がついた。例えば、補体活性化が主にレクチン依存性補体系によって媒介される疾患状態では、この系だけを特異的に阻害することが有利であると考えられる。このために、免疫複合体処理を取り扱い、かつ感染症に対する宿主防御を助

けるためにC1q依存性補体活性化系は完全な状態のままになると考えられる。

【0061】

レクチン依存性補体系を特異的に阻害する治療剤の開発において対象となる好ましいタンパク質成分はMASP-2である。レクチン依存性補体系の公知の全てのタンパク質成分(MBL、H-フィコリン、M-フィコリン、L-フィコリン、MASP-2、C2-C9、B因子、D因子、およびプロペルジン)のうち、レクチン依存性補体系に特有にあり、かつ系が機能するのに必要とされるものはMASP-2しかない。レクチン(MBL、H-フィコリン、M-フィコリン、L-フィコリン、およびCL-11)もレクチン依存性補体系において特有の成分である。しかしながら、これらのレクチン成分のいずれか1つが消失しても、レクチン重複性のために系の活性化は必ずしも阻害されるとは限らないと考えられる。レクチン依存性補体活性化系の阻害を保証するためには5種類全てのレクチンを阻害することが必要であると考えられる。さらに、MBLおよびフィコリンは補体とは無関係にオプソニン活性も有することが公知であるので、レクチン機能を阻害すると、感染症に対する、この有益な宿主防御機構が失われてしまうと考えられる。対照的に、MASP-2が阻害標的である場合には、この補体非依存的レクチンオプソニン活性は完全な状態のままであると考えられる。レクチン依存性補体活性化系を阻害する治療標的としてのMASP-2の付加的な利益は、補体タンパク質の最も低い血漿中濃度の中にMASP-2血漿中濃度(約500ng/ml)があることである。従って、完全な阻害を得るためには、それに応じた低い濃度の高親和性MASP-2阻害因子で十分である可能性がある(Moller-Kristensen, M., et al., J. Immunol Methods 282:159-167, 2003)。

【0062】

本明細書の実施例14に記載のように、線維性腎臓疾患の動物モデル(片側尿管結紮UUO)において、MASP-2遺伝子の無いマウス(MASP-2^{-/-})は、炎症細胞浸潤物(75%低下)および線維症の組織学的マーカー、例えば、コラーゲン沈着(1/3低下)によって示されるように野生型対照動物と比較して有意に少ない腎臓疾患を示すことが確かめられた。さらに実施例15に示したように、古典経路を完全な状態のままにしておきながらレクチン経路を選択的に遮断する抗MASP-2モノクローナル抗体で全身的に処置した野生型マウスは、アイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウスと比較して腎臓線維症から保護された。これらの結果から、レクチン経路は腎臓疾患の重要な一因であることが証明され、さらに、レクチン経路を遮断するMASP-2阻害因子、例えば、MASP-2抗体は抗線維形成剤として有効であることが証明される。さらに実施例16に示したように、タンパク質過負荷モデルでは、ウシ血清アルブミン(BSA)で処置した野生型マウスはタンパク尿性腎症(proteinuric nephropathy)を発症したのに対して、同じレベルのBSAで処置したMASP-2^{-/-}マウスは腎臓損傷が少なかった。実施例17に示したように、タンパク質過負荷モデルでは、古典経路を完全な状態のままにしておきながらレクチン経路を選択的に遮断する抗MASP-2モノクローナル抗体で全身的に処置した野生型マウスは腎臓損傷から保護された。実施例18に記載のように、腎臓線維症のアドリアマイシン誘発性腎臓病モデルでは、MASP-2^{-/-}マウスは野生型マウスと比較して腎臓炎症および尿細管間質損傷が少なかった。実施例19に記載のように、継続中の第2相非盲検腎臓試験では、抗MASP-2抗体で処置したIgA腎症患者は、試験全体を通して、臨床の上で意味があり、かつ統計的に有意な尿アルブミン/クレアチニン比(uACR)の減少を示し、ベースラインから処置の終わりまで24時間尿タンパク質レベルの低下を示した。さらに実施例19に記載のように、同じ第2相腎臓試験では、抗MASP-2抗体で処置した膜性腎症患者も処置の間にuACR低下を示した。

【0063】

前記に基づいて、本発明は、抗線維形成剤としてのMASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体の使用、線維性状態を処置するための医用薬剤を製造するためのMASP-2阻害物質の使用、および線維性状態の予防、処置、軽減、または逆転を必要とするヒト対象において線維性状態を予防する、処置する、軽減させる、または逆転させる方法であって、効率的な量のMASP-2阻害物質(例えば、抗MASP-2抗体)を前記患者に投与する工程を含む、方法に関する。実施例20、21、および22に記載のように、MASP-2およびレクチン経

路活性化を阻害するナルソプリマブ処置後に、COVID-19関連呼吸不全に罹患している患者において臨床的改善が観察された。実施例21に記載のように、ナルソプリマブで処置した6人のCOVID-19患者全員が臨床的改善を示した。どの症例でも、COVID-19肺傷害はナルソプリマブ処置前にARDSに進行しており、処置開始時に患者全員が非侵襲的機械的換気を受けていた。経過観察(5~6ヶ月)データが入手可能なナルソプリマブ処置COVID-19患者では長期後遺症の臨床証拠または臨床検査証拠は観察されなかった。さらに実施例22に記載のように、ナルソプリマブで処置した追加のCOVID-19患者も臨床的改善を示した。最初のコホートと同様に、本明細書に記載のナルソプリマブで処置した、これらの追加COVID-19患者のいずれにおいても長期後遺症は観察されなかった。実施例22においてさらに証明されるように、ナルソプリマブ処置患者は適切に高い力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じた。このことから、ナルソプリマブ処置は適応免疫応答のエフェクター機能を妨害しないことが分かる。

【0064】

従って、本発明の方法は、本明細書においてさらに説明されるように、コロナウイルスに罹患しているヒト対象、例えば、SARS-CoV-2、SARS、またはMERSが原因でCOVID-19に罹患しているヒト対象においてコロナウイルス誘発性肺炎または急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、軽減させる、予防する、または逆転させるのに使用することができる。本発明の方法はまた、インフルエンザウイルス、例えば、インフルエンザA型ウイルス血清型(H1N1(1918年に「スペイン風邪」および2009年に「ブタインフルエンザ」の原因となった);H2N2(1957年に「アジア風邪」の原因となった)、H3N2(1968年に香港風邪の原因となった)、H5N1(2004年に「鳥インフルエンザ」の原因となった)、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9、およびH6N1);またはインフルエンザB型ウイルス、またはインフルエンザC型ウイルスに罹患しているヒト対象においてインフルエンザウイルス誘発性肺炎または急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、軽減させる、予防する、または逆転させるのに使用することもできる。

【0065】

III.線維症によって引き起こされるまたは悪化する疾患および状態におけるMASP-2の役割

線維症とは、一般的に損傷または傷害に応答して臓器または組織において過剰な結合組織が形成または存在することである。線維症の顕著な特徴は傷害後に過剰な細胞外マトリックスが産生されることである。腎臓では、線維症は腎臓実質上への進行性の有害な結合組織沈着として特徴付けられ、この結合組織沈着は、元々の腎臓傷害の原因となった原発性腎疾患とは無関係に、腎機能低下を不可避免的にまねく。尿細管上皮細胞が間葉系線維芽細胞に変わる細胞特徴変化である、いわゆる、上皮間葉転換(EMT)が腎臓線維症の主な機構を構成する。線維症はほぼ全ての組織および臓器系に影響を及ぼし、組織傷害または炎症などの刺激に対する修復応答または交換応答として発生する場合がある。傷害に対する正常な生理学的応答は結合組織の沈着を引き起こすが、このプロセスが病気を起こすものであれば、高度に分化した細胞が癒痕結合組織に置き換えられると組織の構造および機能に変化する。細胞レベルでは上皮細胞および線維芽細胞が増殖し、筋線維芽細胞に分化し、その結果、マトリックスの収縮、硬直性の増加、微小血管の圧迫、および低酸素が起こる。現在、線維症に有効な治療法または治療剤は無いが、動物での研究およびヒトでの事例報告の両方から線維性組織損傷は逆転する可能性があること示唆されている(Tampe and Zeisberg, Nat Rev Nephrol, Vol 10:226-237, 2014)。

【0066】

腎臓の疾患(例えば、慢性腎臓疾患、IgA腎症、C3糸球体症、および他の糸球体腎炎)、肺(例えば、特発性肺線維症、嚢胞性線維症、気管支拡張症)、肝臓(例えば、硬変、非アルコール性脂肪性肝疾患)、心臓(例えば、心筋梗塞、心房線維症、心臓弁線維症、心内膜心筋線維症)、脳(例えば、脳卒中)、皮膚(例えば、過剰な創傷治癒、硬皮症、全身性硬化症、ケロイド)、脈管構造(例えば、アテローム動脈硬化性血管疾患)、腸(例えば、クローン病)、眼(例えば、前嚢下白内障、後嚢混濁)、筋骨格軟部組織構造(例えば、癒着性関節包炎、デュピュイトラン拘縮、骨髄線維症)、生殖器(例えば、子宮内膜症、ペーロニー病)、

および一部の感染症(例えば、コロナウイルス、アルファウイルス、C型肝炎、B型肝炎など)を含む多くの疾患が進行性臓器不全の原因となる線維症を引き起こす。

【0067】

線維症は多くの組織および疾患において起こるが、その病態には共通の分子機構および細胞機構がある。線維芽細胞による細胞外マトリックスの沈着には、免疫細胞浸潤物、主として単核細胞が伴う(本明細書に参照により組み入れられる、Wynn T., *Nat Rev Immunol* 4(8):583-594, 2004を参照されたい)。強い炎症応答によって、増殖因子(TGF- β 、VEGF、肝細胞増殖因子、結合組織増殖因子)、サイトカインおよびホルモン(エンドセリン、IL-4、IL-6、IL-13、ケモカイン)、消化酵素(エラスターゼ、マトリックスメタロプロテイナーゼ、カテプシン)、ならびに細胞外マトリックスタンパク質(コラーゲン、フィブロネクチン、インテグリン)が発現する。

10

【0068】

さらに、非常に多くの線維性疾患では補体系が活性化される。非常に多くの線維性組織標本において膜侵襲複合体を含む補体成分が特定されている。例えば、腎臓疾患(Satou et al., *Nephron* 92(3):702-4 (2002); Sato et al., *Lupus* 20(13):1378-86 (2011); Liu et al., *Clin Exp Immunol* 174(1):152-60 (2013)); 肝臓疾患(Rensen et al., *Hepatology* 50(6): 1809-17 (2009)); および肺疾患(Olesen et al., *Clin Immunol* 121(3):324-31 (2006))の線維性病変部においてレクチン経路の成分が発見されている。

【0069】

免疫複合体を介した糸球体腎炎ならびに抗体とは無関係の糸球体腎炎の重要な一因として補体活性化の行き過ぎが確認されている。しかしながら、インサイチューでの制御されていない補体活性化が非腎糸球体疾患におけるTI線維症の病態生理学的進行に本質的に関与することを証明する強力な証拠がある(Quigg R.J., *J Immunol* 171:3319-3324, 2003、Naik A. et al., *Semin Nephrol* 33:575-585, 2013、Mathern D.R. et al., *Clin J Am Soc Nephrol* 10:P1636-1650, 2015)。局所的補体活性化によって誘発される強力な炎症誘発性シグナルは、濾過によって近位尿細管に入り、その後、間質空間に進入した補体成分によって、または尿細管細胞もしくは他の常在細胞および浸潤細胞による補体成分の異常合成によって、または腎臓細胞上にある補体調節タンパク質の発現変化によって、または補体調節成分の機能変異の非存在もしくは喪失もしくは獲得によって引き起こされる可能性がある(Mathern D.R. et al., *Clin J Am Soc Nephrol* 10:P1636-1650, 2015、Sheerin N.S., et al., *FASEB J* 22: 1065-1072, 2008)。例えば、マウスでは、補体調節タンパク質であるCR1-related gene/protein y(Crry)が欠損すると、尿細管間質性(TI)補体活性化と、その結果として、ヒトTI疾患において見られる傷害の典型である炎症および線維症が起こる(Naik A. et al., *Semin Nephrol* 33:575-585, 2013、Baol et al., *J Am Soc Nephrol* 18:811-822, 2007)。尿細管上皮細胞がアナフィラトキシンC3aに暴露されると上皮間葉転換が起こる(Tsang Z. et al., *J Am Soc Nephrol* 20:593-603, 2009)。最近、C3a受容体のみでC3aシグナル伝達を遮断すると、タンパク尿動物および非タンパク尿動物の腎臓TI線維症が和らぐことが示されている(Tsang Z. et al., *J Am Soc Nephrol* 20:593-603, 2009、Baol et al., *Kidney Int.* 80: 524-534, 2011)。

20

30

40

【0070】

本明細書に記載のように、本発明者らは、尿細管腎臓病態の開始および疾患進行におけるレクチン経路の中心的な役割を突き止めた。このことは、IgA腎症、C3糸球体症、および他の糸球体腎炎を含む様々な腎疾患(Endo M. et al., *Nephrol Dialysis Transplant* 13: 1984-1990, 1998; Hisano S. et al., *Am J Kidney Dis* 45:295-302, 2005; Roos A. et al., *J Am Soc Nephrol* 17: 1724-1734, 2006; Liu L.L. et al., *Clin Exp Immunol* 174:152-160, 2013; Lhotta K. et al., *Nephrol Dialysis Transplant* 14:881-886, 1999; Pickering et al., *Kidney International* 84:1079-1089, 2013)、糖尿病性腎症(Hovind P. et al., *Diabetes* 54:1523-1527, 2005)、虚血性再灌流傷

50

害(Asgari E. et al., FASEB J 28:3996-4003, 2014)、ならびに移植拒絶反応(Berger S.P. et al., Am J Transplant 5:1361-1366, 2005)の病態生理におけるレクチン経路活性化の重要な役割を意味している。

【0071】

さらに本明細書に記載のように、本発明者らは、尿細管間質性疾患のマウスモデルにおいてMASP-2阻害が炎症および線維を低減させることを証明した。従って、MASP-2阻害物質は、尿細管間質の炎症および線維症、タンパク尿、IgA腎症、C3系球体症、ならびに他の系球体腎炎および腎臓虚血再灌流傷害を含む腎臓線維症の処置において有用だと予想される。

【0072】

肺疾患

肺線維症とは、肺において過剰な線維性結合組織が形成または発生することであり、この場合、正常な肺組織は線維性組織に取って代わられる。この瘢痕は、肺の硬直と肺構造および肺機能の障害につながる。ヒトでは、肺線維症は、肺の小さな気嚢(肺胞)の中にある組織、およびその間にある組織が繰り返し傷つけられることに起因すると考えられている。実験の場では、様々な動物モデルがヒト疾患の局面を再現してきた。例えば、ブレオマイシン、フルオレセインイソチオシアネート、シリカ、またはアスベストなどの外来因子が動物の気管に注入されることがある(Gharaee-Kermani et al., Animal Models of Pulmonary Fibrosis. Methods Mol. Med., 2005, 117:251-259)。

【0073】

従って、ある特定の態様では、本開示は、線維症および/または炎症、例えば、コロナウイルス誘発性ARDSによって引き起こされるまたは悪化する肺の疾患または障害に罹患している対象において肺線維症を阻害する方法であって、MASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体を、肺線維症の阻害を必要とする対象に投与する工程を含む、方法を提供する。この方法は、肺線維症を阻害する、肺線維症を軽減させる、および/または肺機能を改善するのに有効な量のMASP-2阻害因子を含む組成物を投与する工程を含む。肺機能の症状の改善には、肺機能および/または肺容量の改善、疲労の減少、ならびに酸素飽和度の改善が含まれる。

【0074】

MASP-2阻害組成物は線維症の領域に局所投与されてもよく、例えば、直接、または離れて、例えば、カテーテルによって、外科手術または局所注射の間に組成物を局所適用することによって線維症の領域に局所投与されてもよい。または、MASP-2阻害物質は、例えば、動脈内投与、静脈内投与、筋肉内投与、吸入投与、経鼻投与、皮下投与、または他の非経口投与によって対象に全身投与されてもよく、潜在的には非ペプチド性物質の場合には経口投与によって対象に全身投与されてもよい。投与は、前記状態が回復するまで、または管理されるまで医師によって決定されるように繰り返されてもよい。

【0075】

ある特定の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、基礎となる肺疾患または肺状態に適した1種類または複数種の薬剤または処置モダリティと組み合わせて投与される。

【0076】

感染症

コロナウイルスなどの感染症ならびにC型肝炎およびB型肝炎などの慢性感染症は組織炎症および線維症を引き起こし、高いレクチン経路活性が有害となる場合がある。このような疾患ではMASP-2阻害因子が有益になる可能性がある。例えば、MBLおよびMASP-1レベルはC型肝炎ウイルス(HCV)感染症における肝線維症重症度の重要な予測因子になることが見出されている(Brown et al., Clin Exp Immunol. 147(1):90-8, 2007; Saadany et al., Arab J Gastroenterol. 12(2):68-73, 2011; Saeed et al., Clin Exp Immunol. 174(2):265-73, 2013)。MASP-1は、以前に、MASP-2およびレクチン経路の強力なアクチベーターであることが示されている(Megyeri et al., J Biol Chem. 29: 288

10

20

30

40

50

(13)8922-34、2013)。チクングニアウイルスおよびロスリバーウイルスなどのアルファウイルスは、関節炎および筋炎の原因となる強力な宿主炎症応答を誘発し、この病態はMBLおよびレクチン経路によって媒介される(Gunn et al., PLoS Pathog. 8(3):e1002586, 2012)。

【0077】

従って、ある特定の態様では、本開示は、炎症および/または線維症を引き起こす、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスなどの感染症に罹患しているか、または以前に罹患したことのある対象において線維症および/または炎症を予防する、処置する、逆転させる、阻害する、および/または低減させる方法であって、MASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体を、線維症および/または炎症の予防、処置、逆転、阻害、および/または低減を必要とする対象に投与する工程を含む、方法を提供する。

10

【0078】

MASP-2阻害組成物は線維症の領域に局所投与されてもよく、例えば、直接、または離れて、例えば、カテーテルによって、外科手術または局所注射の間に組成物を局所適用することによって線維症の領域に局所投与されてもよい。または、MASP-2阻害物質は、例えば、動脈内投与、静脈内投与、筋肉内投与、吸入投与、経鼻投与、皮下投与、または他の非経口投与によって対象に全身投与されてもよく、潜在的には非ペプチド性物質の場合には経口投与によって対象に全身投与されてもよい。投与は、前記状態が回復するまで、または管理されるまで医師によって決定されるように繰り返されてもよい。

【0079】

20

ある特定の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、基礎となる感染症に適した1種類または複数種の薬剤または処置モダリティーと組み合わせて投与される。例えば、一部の態様において、COVID-19と診断された患者は、1種類または複数種のMASP-2阻害物質を含む薬剤の組み合わせ、例えば、抗ウイルス剤(例えば、レムデシビル)と1種類または複数種のMASP-2阻害物質を含む組み合わせによって処置することができる。前記薬剤は任意の適切な順序で、例えば、連続して、または同時に投与することができる。

【0080】

一部の態様において、炎症および/または線維症を引き起こす感染症は、コロナウイルス、アルファウイルス、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、結核、HIV、およびインフルエンザからなる群より選択される。

30

【0081】

ある特定の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体またはMASP-2阻害低分子化合物)は、基礎疾患または障害に適した1種類または複数種の薬剤または治療モダリティーと組み合わせて投与される。

【0082】

本明細書に記載の様々な方法および薬学的組成物のいずれかのある特定の態様において、MASP-2阻害抗体または低分子化合物は、古典経路を完全な状態のままにしておきながらレクチン経路を選択的に遮断する。

【0083】

40

IV. MASP-2阻害物質

様々な局面において、本発明は、線維症および/または炎症の副作用を阻害する方法であって、線維症および/または炎症の副作用の阻害を必要とする対象にMASP-2阻害物質を投与する工程を含む、方法を提供する。MASP-2阻害物質は、生きている対象においてMASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量で投与される。本発明のこの局面の実施において、代表的なMASP-2阻害物質には、MASP-2の生物学的活性を阻害する分子(例えば、低分子阻害因子、抗MASP-2抗体(例えば、MASP-2阻害抗体)、またはMASP-2と相互作用するか、もしくはタンパク質間相互作用を妨害する遮断ペプチド)、ならびにMASP-2発現を減らし、それによって、MASP-2がレクチン補体経路を活性化しないようにする分子(例えば、MASP-2アンチセンス核酸分子、MASP-2特異的RNAi分子、およびMASP-2

50

リボザイム)が含まれる。MASP-2阻害物質は主な療法として単独で用いられてもよく、他の医学的処置の治療利益を強化するアジュバント療法として他の治療剤と組み合わせて用いられてもよい。

【0084】

MASP-2依存性補体活性化の阻害は、本発明の方法に従うMASP-2阻害物質の投与の結果として生じる、以下の補体系成分の変化:MASP-2依存性補体活性化系産物C4b、C3a、C5a、および/もしくはC5b~9(MAC)の生成もしくは産生の阻害(例えば、実施例2に記載のように測定した)、C4切断およびC4b沈着の低下(例えば、実施例2に記載のように測定した)、またはC3切断およびC3b沈着の低下(例えば、実施例2に記載のように測定した)の少なくとも1つによって特徴付けられる。

10

【0085】

本発明によれば、SARS-CoV-2などのコロナウイルスに感染した対象において呼吸窮迫を阻害するのに(または言い換えると、呼吸機能を改善するのに)有効なMASP-2阻害物質が利用される。

【0086】

呼吸機能の評価は、定期的に、例えば、毎時、毎日、毎週、または毎月行われてもよい。この評価は、好ましくは、ある特定の対象については、いくつかの時点で行われるか、またはある特定の対象および健常対照については1つもしくはいくつかの時点で行われる。評価は、一定の時間間隔を開けて、例えば、毎時、毎日、毎週、または毎月行われてもよい。ある評価が呼吸窮迫の減少(すなわち、呼吸機能の増加)の発見につながった時に、MASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体は、コロナウイルス誘発性急性呼吸窮迫症候群に罹患している対象を処置するのに有効であるといわれる。

20

【0087】

本発明のこの局面の実施において有用なMASP-2阻害物質には、例えば、MASP-2抗体およびその断片、MASP-2阻害ペプチド、低分子、MASP-2可溶性受容体、ならびに発現阻害因子が含まれる。MASP-2阻害物質は、MASP-2の生物学的機能を遮断することによってMASP-2依存性補体活性化系を阻害してもよい。例えば、阻害物質は、MASP-2タンパク質間相互作用を効果的に遮断してもよく、MASP-2二量体化または集合を妨害してもよく、Ca²⁺結合を遮断してもよく、MASP-2セリンプロテアーゼ活性部位を妨害してもよく、MASP-2タンパク質発現を減少させてもよい。

30

【0088】

一部の態様において、MASP-2阻害物質は、C1q依存性補体活性化系の機能を損なわずにMASP-2補体活性化を選択的に阻害する。

【0089】

一態様において、本発明の方法において有用なMASP-2阻害物質は、補体系の他の抗原よりも少なくとも10倍高い親和性で、SEQ ID NO:6を含むポリペプチドに特異的に結合する特異的MASP-2阻害物質である。別の態様において、MASP-2阻害物質は、補体系の他の抗原よりも少なくとも100倍高い合親和性で、SEQ ID NO:6を含むポリペプチドに特異的に結合する。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2の(i)CCP1-CCP2ドメイン(SEQ ID NO:6のaa300~431)またはセリンプロテアーゼドメイン(SEQ ID NO:6のaa445~682)の少なくとも1つに特異的に結合し、MASP-2依存性補体活性化を阻害する。一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはMASP-2に特異的に結合するその断片である。MASP-2阻害物質の結合親和性は適切な結合アッセイを用いて確かめることができる。一態様において、MASP-2阻害物質は90%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する。

40

【0090】

MASP-2ポリペプチドは、C1補体系のプロテアーゼであるMASP-1、MASP-3、ならびにC1rおよびC1sに類似した分子構造を示す。SEQ ID NO:4に示されたcDNA分子は、MASP-2(SEQ ID NO:5に示されたアミノ酸配列からなる)の代表例をコードし、分泌後に切断されて成熟型ヒトMASP-2(SEQ ID NO:6)を生じる、リーダー配列(aa1~15)を有するヒ

50

トMASP-2ポリペプチドを提供する。図2に示したように、ヒトMASP2遺伝子は12個のエキソンを含む。ヒトMASP-2 cDNAは、エキソンB、C、D、F、G、H、I、J、K、およびLによってコードされる。図2に示したように、オルタナティブスプライスから、エキソンB、C、D、およびEから生じる(SEQ ID NO:1)によってコードされるMBL関連タンパク質19(「MAP19」、「sMAP」とも呼ばれる)(SEQ ID NO:2)と呼ばれる20kDaタンパク質が生じる。SEQ ID NO:50に示されたcDNA分子はマウスMASP-2(SEQ ID NO:51に示されたアミノ酸配列からなる)をコードし、分泌後に切断されて成熟型マウスMASP-2(SEQ ID NO:52)を生じる、リーダー配列を有するマウスMASP-2ポリペプチドを提供する。SEQ ID NO:53に示されたcDNA分子はラットMASP-2(SEQ ID NO:54に示されたアミノ酸配列からなる)をコードし、分泌後に切断されて成熟型ラットMASP-2(SEQ ID NO:55)を生じる、リーダー配列を有するラットMASP-2ポリペプチドを提供する。

10

【0091】

当業者であれば、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50、およびSEQ ID NO:53に開示される配列は、それぞれ、ヒトMASP-2、マウスMASP-2、およびラットMASP-2の単一の対立遺伝子であり、対立遺伝子変化およびオルタナティブスプライシングが生じると予想されることを認めると考えられる。サイレント変異を含有する対立遺伝子変種および変異によってアミノ酸配列が変化する対立遺伝子変種を含む、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50、およびSEQ ID NO:53に示したヌクレオチド配列の対立遺伝子変種は本発明の範囲内である。MASP-2配列の対立遺伝子変種は、標準的な手順に従って、異なる個体に由来するcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをプローブすることによってクローニングすることができる。

20

【0092】

ヒトMASP-2タンパク質(SEQ ID NO:6)のドメインが図1および図2Aに示され、N末端C1r/C1s/ウニVegf/骨形成タンパク質(CUBI)ドメイン(SEQ ID NO:6のaa1~121)、上皮細胞成長因子様ドメイン(aa122~166)、別のCUBIドメイン(aa167~293)、ならびに補体対照タンパク質ドメインの縦列配列およびセリンプロテアーゼドメインを含む。MASP2遺伝子のオルタナティブスプライシングから図1に示したMAP19が得られる。MAP19は、図1に示したように、MASP-2のN末端CUBI-EGF領域とエキソンEに由来する4個のさらなる残基(EQSL)を含有する非酵素タンパク質である。

【0093】

いくつかのタンパク質が、タンパク質間相互作用を介してMASP-2に結合するかまたはMASP-2と相互作用することが示されている。例えば、MASP-2は、レクチンタンパク質であるMBL、H-フィコリン、およびL-フィコリンに結合し、これらとCa²⁺依存性複合体を形成することが公知である。それぞれのMASP-2/レクチン複合体は、タンパク質C4およびC2のMASP-2依存性切断を介して補体を活性化することが示されている(Ikeda, K., et al., J. Biol Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med 176:197-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol.168:3502-3506, 2002)。研究により、MASP-2のCUBI-EGFドメインはMASP-2とMBLとの結合に不可欠ことが示されている(Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068, 2001)。CUBIEGF CUBIIDメインは、活性MBL複合体の形成に必要なMASP-2二量体化を媒介することも示されている(Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000)。従って、MASP-2依存性補体活性化に重要なことが公知であるMASP-2標的領域に結合するMASP-2阻害物質、または該MASP-2標的領域を妨害するMASP-2阻害物質を特定することができる。

30

40

【0094】

抗MASP-2抗体

本発明のこの局面の一部の態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化系を阻害する抗MASP-2抗体を含む。本発明のこの局面において有用な抗MASP-2抗体は、任意の抗体産生哺乳動物に由来するポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、または組換え抗体を含み、多重特異的、キメラ、ヒト化、抗イディオタイプ、および抗体断

50

片でもよい。抗体断片には、本明細書においてさらに説明されるように、Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv断片、scFv断片、および単鎖抗体が含まれる。

【0095】

MASP-2抗体のMASP-2依存性補体活性化系を阻害する能力および抗線維形成活性ならびに/またはタンパク尿もしくはアドリマイシン誘発性腎症に関連する腎臓損傷を阻害する能力を、本明細書に記載のアッセイを用いてスクリーニングすることができる。いくつかのMASP-2抗体が文献に記載されており、一部は新たに作製されており、このうちの一部は下記の表1に列挙される。例えば、本明細書中の実施例10および実施例11に記載のように、MASP-2依存性補体活性化を遮断する抗MASP-2 Fab2抗体が特定されている。実施例12に記載のように、また参照により本明細書に組み入れられるWO2012/151481にも記載のように、MASP-2依存性補体活性化を遮断する完全ヒトMASP-2 scFv抗体(例えば、OMS646)が特定されている。実施例13に記載のように、また参照により本明細書に組み入れられるWO2014/144542にも記載のように、SGMI-2ペプチドアミノ酸配列(SEQ ID NO:72、73、または74)をヒトMASP-2抗体の重鎖および/または軽鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端と融合させることで、MASP-2阻害活性を有する、SGMI-2ペプチドを含むMASP-2抗体およびその断片を作製した(例えば、OMS646-SGMI-2)。

【0096】

従って、一態様では、本発明の方法において使用するためのMASP-2阻害物質は、例えば、OMS646などのヒト抗体を含む。従って、一態様では、本発明の組成物および方法において使用するためのMASP-2阻害物質は、ヒトMASP-2(SEQ ID NO:6)からなるポリペプチドに結合するヒト抗体を含む。前記抗体は、(I)(a)i)SEQ ID NO:67の31-35からのアミノ酸配列を含む重鎖CDR-H1;およびii)SEQ ID NO:67の50-65からのアミノ酸配列を含む重鎖CDR-H2;およびiii)SEQ ID NO:67の95-107からのアミノ酸配列を含む重鎖CDR-H3を含む、重鎖可変領域、ならびにb)i)SEQ ID NO:69の24-34からのアミノ酸配列を含む軽鎖CDR-L1;およびii)SEQ ID NO:69の50-56からのアミノ酸配列を含む軽鎖CDR-L2;およびiii)SEQ ID NO:69の89-97からのアミノ酸配列を含む軽鎖CDR-L3を含む、軽鎖可変領域、あるいは(II)SEQ ID NO:67と少なくとも90%の同一性(例えば、SEQ ID NO:67と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性)を有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:69と少なくとも90%の同一性(例えば、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性)を有する軽鎖可変領域を含む、その変種を含む。

【0097】

一部の態様において、前記方法は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ある量のMASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を対象に投与する工程を含む。

【0098】

一部の態様において、前記方法は、SEQ ID NO:67に示した重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示した軽鎖可変領域を含む参照抗体OMS646が認識する、ヒトMASP-2上のエпитオプの少なくとも一部を特異的に認識する、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を対象に投与する工程を含む。一態様において、本発明の方法において使用するためのMASP-2阻害物質はヒト抗体OMS646を含む。

【0099】

(表1) 例示的なMASP-2特異的抗体

10

20

30

40

50

抗原	抗体タイプ	参考文献
組換え MASP-2	ラットポリクローナル	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
組換えヒト CCP1/2-SP 断片 (MoAb 8B5)	ラットMoAb (サブクラス IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
組換えヒト MAp19 (MoAb 6G12) (MASP-2と 交差反応する)	ラットMoAb (サブクラス IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
hMASP-2	マウス MoAb (S/P) マウス MoAb (N 末端)	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 35:409, April 1998
hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP ドメイン)	ラットMoAb:ハイブリドーマ 細胞株03050904 (ECACC) によって産生された、 Nimoab101	WO 2004/106384
hMASP-2 (完全長 hisタグ付き)	マウスMoAb: ハイブリドーマ細胞株 M0545YM035 (DSMZ) によって 産生された、NimoAb104 ハイブリドーマ細胞株 M0545YM029 (DSMZ) によって 産生された、NimoAb108 ハイブリドーマ細胞株 M0545YM046 (DSMZ) によって 産生された、NimoAb109 ハイブリドーマ細胞株 M0545YM048 (DSMZ) によって 産生された、NimoAb110	WO 2004/106384
ラットMASP-2 (完全長)	MASP-2 Fab2 抗体断片	実施例 10
hMASP-2 (完全長)	完全ヒトscFvクローン	実施例 12 および WO2012/151481
hMASP-2 (完全長)	SGMI-2ペプチドを有する MASP-2抗体	実施例 13 および WO2014/144542

【 0 1 0 0 】

低下したエフェクター機能を有する抗MASP-2抗体

本発明のこの局面の一部の態様では、古典的補体経路の活性化から生じ得る炎症を緩和するために、抗MASP-2抗体は低下したエフェクター機能を有する。IgG分子が古典的補体経路を誘発する能力は、この分子のFc部分内にあることが示されている(Duncan, A.R., et al., *Nature* 332:738-740 1988)。この分子のFc部分が酵素切断によって除去されているIgG分子には、このエフェクター機能がない(Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照されたい)。従って、エフェクター機能を最小化する遺伝子操作Fc配列を有することによって、またはヒトI

gG₂もしくはIgG₄アイソタイプにすることによって、この分子のFc部分を欠いた結果として、低下したエフェクター機能を有する抗体を作製することができる。

【0101】

低下したエフェクター機能を有する抗体は、本明細書に記載のように、ならびにJolliffe et al., *Int'l Rev. Immunol.* 10:241-250, 1993およびRodrigues et al., *J. Immunol.* 151:6954-6961, 1998にも記載のように、IgG重鎖のFc部分の標準的な分子生物学的操作によって作製することができる。低下したエフェクター機能を有する抗体はまた、補体を活性化しかつ/またはFc受容体と相互作用する能力が低下したヒトIgG₂およびIgG₄アイソタイプも含む(Ravetch, J. V., et al., *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Isaacs, J.D., et al., *J. Immunol.* 148:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., *Immunol Today* 14:215-221, 1993)。IgG₂またはIgG₄アイソタイプからなる、ヒトMASP-2に特異的なヒト化抗体または完全ヒト抗体は、Vaughan, T.J., et al., *Nature Biotechnical* 16:535-539, 1998に記載のように当業者に公知のいくつかの方法の1つによって作製することができる。

【0102】

抗MASP-2抗体の作製

抗MASP-2抗体は、MASP-2ポリペプチド(例えば、完全長MASP-2)または抗原性MASP-2エピトープ含有ペプチド(例えば、MASP-2ポリペプチドの一部)を用いて作製することができる。免疫原性ペプチドは5アミノ酸残基と小さくてもよい。例えば、本発明の方法において有用な抗MASP-2抗体を誘導するために、SEQ ID NO:6の全アミノ酸配列を含むMASP-2ポリペプチドが用いられてもよい。タンパク質間相互作用に關与することが公知である特定のMASP-2ドメイン、例えば、CUBIおよびCUBIEGFドメイン、ならびにセリン-プロテアーゼ活性部位を含む領域が、実施例3に記載のように組換えポリペプチドとして発現され、抗原として用いられてもよい。さらに、MASP-2ポリペプチド(SEQ ID NO:6)の少なくとも6アミノ酸の部分を含むペプチドもまた、MASP-2抗体を誘導するのに有用である。MASP-2抗体を誘導するのに有用なMASP-2由来抗原のさらなる例を以下の表2に示した。抗体を産生させるのに用いられるMASP-2ペプチドおよびポリペプチドは、本明細書においてさらに述べられるように、天然ポリペプチドまたは組換えペプチドもしくは合成ペプチドおよび触媒的に不活性な組換えポリペプチド、例えば、MASP-2Aとして単離されてもよい。本発明のこの局面の一部の態様において、抗MASP-2抗体は、本明細書に記載のように、トランスジェニックマウス系統を用いて得られる。

【0103】

抗MASP-2抗体の作製において有用な抗原はまた、融合ポリペプチド、例えば、MASP-2またはその一部と免疫グロブリンポリペプチドまたはマルトース結合タンパク質との融合物も含む。ポリペプチド免疫原は完全長分子またはその一部でもよい。ポリペプチド部分がハプテン様である場合には、このような部分は、免疫のために、都合よく、巨大分子担体(例えば、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)、または破傷風トキソイド)に接合または連結されてもよい。

【0104】

(表2) MASP-2由来抗原

10

20

30

40

50

SEQ ID NO:	アミノ酸配列
SEQ ID NO:6	ヒトMASP-2タンパク質
SEQ ID NO:51	マウスMASP-2タンパク質
SEQ ID NO:8	ヒトMASP-2のCUBI ドメイン (SEQ ID NO:6のaa1~121)
SEQ ID NO:9	ヒトMASP-2のCUBIEGFドメイン (SEQ ID NO:6のaa1~166)
SEQ ID NO:10	ヒトMASP-2のCUBIEGFCUBIIドメイン (SEQ ID NO:6のaa1~293)
SEQ ID NO:11	ヒトMASP-2のEGFドメイン (SEQ ID NO:6のaa122~166)
SEQ ID NO:12	ヒトMASP-2のセリンプロテアーゼドメイン (SEQ ID NO:6のaa429~671)
SEQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	セリンプロテアーゼ不活性化変異型 (変異Ser618を有するSEQ ID NO:6のaa610~625)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	ヒトCUBIペプチド
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVL ATLCGQ	ヒトCUBIペプチド
SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	ヒトCUBIドメイン中のMBL結合領域
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEK PFTGF	ヒトCUBIドメイン中のMBL結合領域
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	EGF ペプチド
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRG DSGGALV	セリンプロテアーゼ活性部位に由来するペプチド

【0105】

ポリクローナル抗体

MASP-2に対するポリクローナル抗体は、当業者に周知の方法を用いて、動物をMASP-2ポリペプチドまたはその免疫原性部分で免疫することによって調製することができる。例えば、Green et al., 「Production of Polyclonal Antisera」, Immunochemical Protocols(Manson, ed.), 105頁を参照されたい。MASP-2ポリペプチドの免疫原性は、ミネラルゲル、例えば、水酸化アルミニウムまたはフロイントアジュバント(完全もしくは不完全)、界面活性物質、例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、およびジニトロフェノールを含むアジュバントを用いて高まることができる。ポリクローナル抗体は、典型的には、動物、例えば、ウマ、ウシ、イヌ、ニワトリ、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、ヤギ、

またはヒツジにおいて産生される。または、本発明において有用な抗MASP-2抗体はまた、ヒトに近い霊長類に由来してもよい。ヒトにおいて診断および治療に有用な抗体を産生するための一般的な技法は、例えば、Goldenberg et al., 国際特許公報WO91/11465、およびLosman, M.J., et al., Int. J. Cancer 46:310, 1990において見られ得る。次いで、免疫学的に活性な抗体を含有する血清が、当技術分野において周知の標準的な手順を用いて、このような免疫動物の血液から生成される。

【0106】

モノクローナル抗体

一部の態様において、MASP-2阻害物質は抗MASP-2モノクローナル抗体である。抗MASP-2モノクローナル抗体は、単一のMASP-2エピトープに対して作製されているので高度に特異的である。本明細書で使用する「モノクローナル」という修飾語は、抗体が実質的に均一な抗体集団から得られているという特徴を示し、特定の手法による抗体の作製を必要とすると解釈してはならない。モノクローナル抗体は、連続培養細胞株による抗体分子の作製を提供する任意の技法、例えば、Kohler, G., et al., Nature 256:495, 1975に記載のハイブリドーマ法を用いて得ることができる。または、モノクローナル抗体は、組換えDNA法(例えば、Cabillyに対する米国特許第4,816,567号を参照されたい)によって作製されてもよい。モノクローナル抗体は、Clackson, T., et al., Nature 352:624-628, 1991、およびMarks, J.D., et al., J. Mol Biol. 222:581-597, 1991に記載の技法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含む任意の免疫グロブリンクラスおよびその任意のサブクラスの抗体でよい。

【0107】

例えば、モノクローナル抗体は、適切な哺乳動物(例えば、BALB/cマウス)に、MASP-2ポリペプチドまたはその一部を含む組成物を注射することによって得ることができる。予め決められた期間の後に、脾臓細胞をマウスから取り出し、細胞培地に懸濁する。次いで、脾臓細胞を不死細胞株と融合して、ハイブリドーマを形成する。形成されたハイブリドーマを細胞培養において増殖させ、MASP-2に対するモノクローナルを産生する能力についてスクリーニングする。抗MASP-2モノクローナル抗体の作製についてさらに述べている例を本明細書に示す(Current Protocols in Immunology, Vol.1., John Wiley & Sons, 2.5.1-2.6.7頁, 1991も参照されたい)。

【0108】

抗原曝露に反応して特異的ヒト抗体を産生するように操作されたトランスジェニックマウスを用いて、ヒトモノクローナル抗体を得ることができる。この技法では、ヒト免疫グロブリン重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の要素を、内因性免疫グロブリン重鎖遺伝子座および軽鎖遺伝子座の標的破壊を含有する胚性幹細胞株に由来するマウスの系統に導入する。このトランスジェニックマウスは、ヒト抗原、例えば、本明細書に記載のMASP-2抗原に特異的なヒト抗体を合成することができ、本明細書においてさらに述べられるように従来のケーラー・ミルステイン技術を用いて、このような動物に由来するB細胞を適切なミエローマ細胞株と融合することによってヒトMASP-2抗体分泌ハイブリドーマを作製するのに使用することができる。ヒト免疫グロブリンゲノムを有するトランスジェニックマウスは、(例えば、Abgenix, Inc., Fremont, CA.およびMedarex, Inc., Annandale, N. J.から)市販されている。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得るための方法は、例えば、Green, L.L., et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., Nature 368:856, 1994;およびTaylor, L.D., et al., Int. Immun. 6:579, 1994によって述べられている。

【0109】

モノクローナル抗体は、十分に確立した様々な技法によってハイブリドーマ培養物から単離および精製することができる。このような単離法には、プロテインA Sepharoseを用いたアフィニティクロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、およびイオン交換クロマトグラフィーが含まれる(例えば、Coliganの2.7.1-2.7.12頁および2.9.1-2.9.3

頁; Baines et al., 「Purification of Immunoglobulin G(IgG)」, Methods in Molecular Biology, The Humana Press, Inc., Vol.10, 79-104頁, 1992を参照されたい)。

【0110】

ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、またはファージ由来抗体が作製されたら、最初に特異的MASP-2結合について試験される。MASP-2に特異的に結合する抗体を検出するために、当業者に公知の様々なアッセイを使用することができる。例示的なアッセイには、標準的な方法によるウエスタンブロットまたは免疫沈降分析(例えば、Ausubel et al.,に記載)、免疫電気泳動、酵素結合免疫吸着測定法、ドットブロット、阻害アッセイまたは競合アッセイ、およびサンドイッチアッセイ(Harlow and Land, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988に記載)が含まれる。MASP-2に特異的に結合する抗体が特定されたら、抗MASP-2抗体は、いくつかのアッセイの1つ、例えば、レクチン特異的C4切断アッセイ(実施例2に記載)、C3b沈着アッセイ(実施例2に記載)、またはC4b沈着アッセイ(実施例2に記載)においてMASP-2阻害物質として機能する能力について試験される。

【0111】

抗MASP-2モノクローナル抗体の親和性は当業者によって容易に決定することができる(例えば、Scatchard, A., NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949を参照されたい)。一態様において、本発明の方法に有用な抗MASP-2モノクローナル抗体は、 $<100\text{nM}$ 、好ましくは、 $<10\text{nM}$ 、最も好ましくは $<2\text{nM}$ の結合親和性でMASP-2に結合する。

【0112】

キメラ/ヒト化抗体

本発明の方法において有用なモノクローナル抗体には、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同であるが、鎖の残りが、別の種に由来する抗体または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一または相同である、キメラ抗体、ならびに、このような抗体の断片が含まれる(Cabillyに対する米国特許第4,816,567号;およびMorrison, S.L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984)。

【0113】

本発明において有用なキメラ抗体の一形態は、ヒト化モノクローナル抗MASP-2抗体である。非ヒト(例えば、マウス)抗体のヒト化型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。ヒト化モノクローナル抗体は、マウス免疫グロブリンの可変重鎖および可変軽鎖に由来する非ヒト(例えば、マウス)相補性決定領域(CDR)をヒト可変ドメインに導入することによって作製される。次いで、典型的に、非ヒト対応物のフレームワーク領域においてヒト抗体残基が代用される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見られない残基を含んでもよい。これらの改変は、抗体の性能にさらに磨きをかけるためになされる。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、および典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含む。超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、Fvフレームワーク領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFvフレームワーク領域に対応する。ヒト化抗体はまた、任意で、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的には、ヒト免疫グロブリンの免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部を含む。さらなる詳細については、Jones, P.T., et al., Nature 321:522-525, 1986; Reichmann, L., et al., Nature 332:323-329, 1988;およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992を参照されたい。

【0114】

本発明において有用なヒト化抗体には、少なくともMASP-2結合CDRH3領域を含むヒトモノクローナル抗体が含まれる。さらに、IgA抗体またはIgM抗体ならびにヒトIgG抗体を作製するためにFc部分が交換されてもよい。このようなヒト化抗体は、ヒトMASP-2を特異的に認識するが、ヒトにおいて抗体それ自体に対する免疫応答を引き起こさないため特

に臨床において有用であると考えられる。その結果、このようなヒト化抗体は、ヒトでのインビボ投与に特に反復投与または長期投与が必要な場合にはより適している。

【0115】

マウス抗MASP-2モノクローナル抗体からヒト化抗MASP-2抗体の作製の一例が本明細書の実施例6において示される。ヒト化モノクローナル抗体を作製する技法は、例えば、Jones, P.T., et al., Nature 321:522, 1986; Carter, P., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992; Singer, I.I., et al., J. Immun. 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, 「Engineering Therapeutic Antibodies」, Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al.(eds.), John Wiley & Sons, Inc., 399-434頁, 1996;およびQueen, 1997に対する米国特許第5,693,762号にも記載されている。さらに、Protein Design Labs (Mountain View, CA)などの特定のマウス抗体領域からヒト化抗体を合成する商業的実体がある。

【0116】

組換え抗体

抗MASP-2抗体は組換え法を用いて作製することもできる。例えば、ヒト抗体断片(V_H 、 V_L 、Fv、Fd、Fab、または $F(ab')_2$)を作製するようにヒト免疫グロブリン発現ライブラリー(例えば、Stratagene, Corp., La Jolla, CAから入手可能)を用いてヒト抗体を作製することができる。次いで、キメラ抗体の作製法に類似した技法を用いて、これらの断片を用いてヒト抗体全体を構築する。

【0117】

抗イディオタイプ抗体

望ましい阻害活性を有する抗MASP-2抗体が特定されたら、これらの抗体を用いて、当技術分野において周知の技法を用いてMASP-2の一部に似ている抗イディオタイプ抗体を生成することができる。例えば、Greenspan, N.S., et al., FASEB J. 7:437, 1993を参照されたい。例えば、MASP-2に結合し、補体活性化に必要とされるMASP-2タンパク質相互作用を完全に阻害する抗体を用いて、MASP-2タンパク質上のMBL結合部位に似ている、従って、MASP-2の結合リガンド、例えば、MBLに結合し、これを中和する抗イディオタイプを生成することができる。

【0118】

免疫グロブリン断片

本発明の方法において有用なMASP-2阻害物質は、インタクトな免疫グロブリン分子だけでなく、抗体断片から形成された、Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 、およびFv断片、scFv断片、ダイアボディ、直鎖抗体、単鎖抗体分子、ならびに多重特異性抗体を含む周知の断片も包含する。

【0119】

抗体とそのエピトープの結合には抗体分子の小さな部分であるパラトープしか関与しないことは当技術分野において周知である(例えば、Clark, W.R., The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986を参照されたい)。抗体のpFc'およびFc領域は古典的補体経路のエフェクターであるが、抗原結合に関与しない。pFc'領域が酵素切断されている抗体、またはpFc'領域なしで作製されている抗体は $F(ab')_2$ 断片と呼ばれ、インタクトな抗体の抗原結合部位を両方とも保持する。単離された $F(ab')_2$ 断片は、その2つの抗原結合部位のために二価モノクローナル断片と呼ばれる。同様に、Fc領域が酵素切断されている抗体、またはFc領域なしで作製されている抗体はFab断片と呼ばれ、インタクトな抗体分子の抗原結合部位のうちの1つを保持する。

【0120】

抗体断片は、従来の方法による抗体全体のタンパク質加水分解、例えば、ペプシン消化またはパパイン消化によって得ることができる。例えば、抗体断片は、抗体をペプシンで酵素切断して、 $F(ab')_2$ と呼ばれる5S断片を得ることによって作製することができる。この断片は、3.5S Fab'一価断片を生じるチオール還元剤を用いてさらに切断することがで

10

20

30

40

50

きる。任意で、ジスルフィド結合を切断する、スルフヒドリル基のブロック基を用いて、切断反応を行うことができる。代替として、ペプシンを用いた酵素切断によって、2つの一価Fab断片および1つのFc断片が直接、生成される。これらの方法は、例えば、Goldenbergに対する米国特許第4,331,647号; Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman, et al., Methods in Enzymology 1:422, Academic Press, 1967;ならびにColiganの2.8.1~2.8.10頁および2.10.~2.10.4頁に記載されている。

【0121】

一部の態様において、FcとFc γ 受容体が結合すると開始する古典的補体経路の活性化を回避するためには、Fc領域の無い抗体断片を使用することが好ましい。Fc γ 受容体相互作用を回避するMoAbを作製することができる、いくつかの方法がある。例えば、モノクローナル抗体のFc領域をタンパク質分解酵素による部分消化(例えば、フィシン消化)を用いて化学的に除去し、それによって、例えば、抗原結合抗体断片、例えば、Fab断片またはF(ab)₂断片を生成することができる(Mariani, M., et al., Mol. Immunol. 28:69-71, 1991)。または、Fc γ 受容体に結合しないヒト γ 4 IgGアイソタイプを、本明細書に記載のようにヒト化抗体の構築中に使用することができる。Fcドメインの無い抗体、単鎖抗体、および抗原結合ドメインはまた、本明細書に記載の組換え法を用いて操作することもできる。

【0122】

単鎖抗体断片

代替的に、重鎖Fv領域および軽鎖Fv領域が接続されている、MASP-2に特異的なペプチド単鎖結合分子を作製することができる。Fv断片は、単鎖抗原結合タンパク質(scFv)を形成するようにペプチドリinkerで接続されてもよい。これらの単鎖抗原結合タンパク質は、オリゴヌクレオチドで接続されている、V_HおよびV_LドメインをコードするDNA配列を含む、構造遺伝子を構築することによって調製される。構造遺伝子は発現ベクターに挿入され、その後、大腸菌などの宿主細胞に導入される。組換え宿主細胞は、2つのVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する1本のポリペプチド鎖を合成する。scFvを作製するための方法は、例えば、Whitlow, et al., 「Methods:A Companion to Methods in Enzymology」2:97, 1991; Bird, et al., Science 242:423, 1988; Ladnerに対する米国特許第4,946,778号; Pack, P., et al., Bio/Technology 11:1271, 1993に記載されている。

【0123】

例示的な例として、MASP-2特異的scFvは、インビトロでリンパ球をMASP-2ポリペプチドに曝露し、(例えば、固定化または標識されたMASP-2タンパク質またはペプチドを使用することによって)ファージベクター中または類似ベクター中の抗体ディスプレイライブラリーを選択することによって得ることができる。潜在的なMASP-2ポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージまたは細菌、例えば、大腸菌にディスプレイされたランダムペプチドライブラリーをスクリーニングによって得ることができる。これらのランダムペプチドディスプレイライブラリーを用いて、MASP-2と相互作用するペプチドをスクリーニングすることができる。このようなランダムペプチドディスプレイライブラリーを作製およびスクリーニングするための技法は当技術分野において周知である(Ladnerに対する米国特許第5,223,409号; Ladnerに対する米国特許第4,946,778号; Ladnerに対する米国特許第5,403,484号; Ladnerに対する米国特許第5,571,698号;およびKay et al., Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press, Inc., 1996)。このようなライブラリーをスクリーニングするためのランダムペプチドディスプレイライブラリーおよびキットは、例えば、CLONTECH Laboratories, Inc.(Palo Alto, Calif.)、Invitrogen Inc.(San Diego, Calif.)、New England Biolabs, Inc.(Ipswich, Mass.)、およびPharmacia LKB Biotechnology Inc.(Piscataway, N.J.)から市販されている。

【0124】

本発明のこの局面において有用な抗MASP-2抗体断片の別の形態は、MASP-2抗原上のエピトープに結合し、MASP-2依存性補体活性化を阻害する、単一の相補性決定領域(CDR)をコードするペプチドである。CDRペプチド(「最小認識ユニット」)は、関心対象の抗体のCDRをコードする遺伝子を構築することによって得ることができる。このような遺伝子は、例えば、ポリメラーゼ鎖反応を用いて抗体産生細胞のRNAから可変領域を合成することによって調製される(例えば、Larrick et al., *Methods; A Companion to Methods in Enzymology* 2:106, 1991; Courtenay-Luck, 「Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies」, *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al., (eds.), 166頁, Cambridge University Press, 1995; およびWard et al., 「Genetic Manipulation and Expression of Antibodies」, *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al., (eds.), 137頁, Wiley-Liss, Inc., 1995を参照されたい)。

10

【0125】

MASP-2依存性補体活性化を阻害するために、本明細書に記載のMASP-2抗体は、それを必要とする対象に投与される。一部の態様において、MASP-2阻害物質は、低下したエフェクター機能を有する、高親和性ヒトまたはヒト化モノクローナル抗MASP-2抗体である。

【0126】

ペプチド阻害因子

本発明のこの局面の一部の態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化系を阻害する、単離された天然ペプチド阻害因子および合成ペプチド阻害因子を含む単離されたMASP-2ペプチド阻害因子を含む。本明細書で使用する「単離されたMASP-2ペプチド阻害因子」という用語は、MASP-2に結合することによって、レクチン経路の別の認識分子(例えば、MBL、H-フィコリン、M-フィコリン、もしくはL-フィコリン)への結合についてMASP-2と競合することによって、および/またはMASP-2と直接相互作用してMASP-2依存性補体活性化を阻害することによって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するペプチドを指し、該ペプチドは実質的に純粋であり、かつ天然で一緒に見出され得る他の物質を現実的かつ目的の用途に適した程度まで本質的に含まない。

20

【0127】

ペプチド阻害因子は、タンパク質間相互作用および触媒部位を妨害するためにインビボで首尾よく用いられてきた。例えば、最近、LFA-1と構造上関連する接着分子に対するペプチド阻害因子が凝固障害における臨床使用に認可された(Ohman, E.M., et al., *European Heart J.* 16:50-55, 1995)。インテグリン依存性接着を阻止または妨害する短い直鎖ペプチド(<30アミノ酸)が述べられている(Murayama, O., et al., *J. Biochem.* 120:445-51, 1996)。インテグリン依存性接着を遮断するために、長さが25~200アミノ酸残基に及ぶ長いペプチドも首尾よく用いられてきた(Zhang, L., et al., *J. Biol. Chem.* 271(47):29953-57, 1996)。一般的に、長いペプチド阻害因子は短いペプチドよりも高い親和性および/またはゆっくりとしたオフレート(off-rate)を有し、従って、強力な阻害因子になり得る。環式ペプチド阻害因子もまたヒト炎症疾患の処置のためのインビボで有効なインテグリン阻害因子であると示されている(Jackson, D.Y., et al., *J. Med. Chem.* 40:3359-68, 1997)。環式ペプチドを作製する方法の1つは、ペプチドの末端アミノ酸がシステインであり、それによって、末端アミノ酸間のジスルフィド結合によってペプチドが環状形態で存在することが可能になるペプチド合成を伴う。この環状形態は、造血性新生物の処置のためにインビボでの親和性および半減期を改善することが示されている(例えば、Larsonに対する米国特許第6,649,592号)。

30

40

【0128】

合成MASP-2ペプチド阻害因子

本発明のこの局面の方法において有用なMASP-2阻害ペプチドは、MASP-2機能に重要な標的領域を模倣するアミノ酸配列によって例示される。本発明の方法の実施において有用な阻害ペプチドはサイズが約5アミノ酸~約300アミノ酸に及ぶ。表3は、本発明のこの

50

局面の実施において有用であり得る例示的な阻害ペプチドのリストを提供する。例えば、レクチン特異的C4切断アッセイ(実施例2に記載)およびC3b沈着アッセイ(実施例2に記載)を含む、いくつかのアッセイの1つにおいて、候補MASP-2阻害ペプチドがMASP-2阻害物質として機能する能力を試験することができる。

【0129】

一部の態様において、MASP-2阻害ペプチドはMASP-2ポリペプチドに由来し、完全長成熟MASP-2タンパク質(SEQ ID NO:6)、またはMASP-2タンパク質の特定のドメイン、例えば、CUBIドメイン(SEQ ID NO:8)、CUBIEGFドメイン(SEQ ID NO:9)、EGFドメイン(SEQ ID NO:11)、およびセリンプロテアーゼドメイン(SEQ ID NO:12)より選択される。前記のように、CUBEGFCUBII領域は二量体化およびMBLとの結合に必要なことが示されている(Thielens et al., 前記)。特に、MASP-2のCUBIドメインにあるペプチド配列TFRSDYN(SEQ ID NO:16)は、Asp105からGly105へのホモ変異を有し、その結果、MBL複合体からMASP-2が失われるヒトを特定した研究においてMBLとの結合に参与することが示されている(Stengaard-Pedersen, K., et al., New England J. Med. 349:554-560, 2003)。

【0130】

一部の態様において、MASP-2阻害ペプチドは、MASP-2に結合し、レクチン補体経路に参与するレクチンタンパク質に由来する。マンナン結合レクチン(MBL)、L-フィコリン、M-フィコリン、およびH-フィコリンを含む、この経路に参与する、いくつかの異なるレクチンが特定されている(Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002)。これらのレクチンは、それぞれが炭水化物認識ドメインを有するN末端コラーゲン様繊維を有するホモ三量体サブユニットのオリゴマーとして血清中に存在する。これらの異なるレクチンはMASP-2に結合することが示されており、レクチン/MASP-2複合体はタンパク質C4およびC2を切断することによって補体を活性化する。H-フィコリンは、24アミノ酸のアミノ末端領域、11個のGly-Xaa-Yaaリピートを有するコラーゲン様ドメイン、12アミノ酸のネック(neck)ドメイン、および207アミノ酸のフィブリノゲン様ドメインを有する(Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002)。H-フィコリンはGlcNAcに結合し、ネズミチフス菌(*S.typhimurium*)、*S.ミネソタ*(*S.minnesota*)、および大腸菌に由来するLPSでコーティングされたヒト赤血球を凝集させる。H-フィコリンはMASP-2およびMAP19に結合し、レクチン経路を活性化することが示されている。すなわち、L-フィコリン/P35もまたGlcNAcに結合し、ヒト血清中のMASP-2およびMAP19に結合することが示されている。この複合体はレクチン経路を活性化することが示されている(Matsushita, M., et al., J. Immunol. 164:2281, 2000)。従って、本発明において有用なMASP-2阻害ペプチドは、MBLタンパク質(SEQ ID NO:21)、H-フィコリンタンパク質(GenBankアクセッション番号NM_173452)、M-フィコリンタンパク質(GenBankアクセッション番号O00602)、およびL-フィコリンタンパク質(GenBankアクセッション番号NM_015838)より選択される少なくとも5個のアミノ酸の領域を含んでもよい。

【0131】

より具体的には、科学者達は、MBL上のMASP-2結合部位が、MBPのコラーゲン様ドメインのC末端部分にあるヒンジとネックとの間にある12個のGly-X-Yトリプレット「GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG

KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS」(SEQ ID NO:26)

内にあることを特定した(Wallis, R. et al., J. Biol Chem. 279:14065, 2004)。このMASP-2結合部位領域はまたヒトH-フィコリンおよびヒトL-フィコリンにおいても高度に保存されている。アミノ酸配列「OGK-X-GP」(SEQ ID NO:22)を含む、3種類全てのレクチンタンパク質において存在し、文字「O」がヒドロキシプロリンを表しかつ文字「X」が

疎水残基である、コンセンサス結合部位が記載されている(Wallis et al., 2004, 前記)。従って、一部の態様において、本発明のこの局面において有用なMASP-2阻害ペプチドは長さが少なくとも6個のアミノ酸であり、SEQ ID NO:22を含む。アミノ酸配列「GLR GLQ GPO GKL GPO G」(SEQ ID NO:24)

を含む、MBLに由来するペプチドは、インビトロでMASP-2に結合することが示されている(Wallis, et al., 2004, 前記)。MASP-2との結合を増強するために、天然のMBLタンパク質において見られるような三重らせんの形成を増強する、各末端に2個のGPOトリプレットが隣接するペプチドを合成することができる
(「GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O」SEQ ID NO:25)

10

(Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004においてさらに説明される)。

【0132】

MASP-2阻害ペプチドはまた、H-フィコリンのコンセンサスMASP-2結合領域に由来する配列

「GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO」(SEQ ID NO:27)

を含む、ヒトH-フィコリンに由来してもよい。L-フィコリンのコンセンサスMASP-2結合領域に由来する配列

「GCO GLO GAO

20

GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO」(SEQ ID NO:28)

を含む、ヒトL-フィコリン由来ペプチドも含まれる。

【0133】

MASP-2阻害ペプチドはまた、抗トロンビンIIIのC末端部分と連結したC4切断部位である

「LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI」(SEQ ID NO:29)

などのC4切断部位に由来してもよい(Glover, G.I., et al., Mol. Immunol. 25:1261(1988))。

30

【0134】

(表3) 例示的なMASP-2阻害ペプチド

40

50

SEQ ID NO	供給源
SEQ ID NO:6	ヒトMASP-2タンパク質
SEQ ID NO:8	MASP-2のCUBIドメイン(SEQ ID NO:6のaa1~121)
SEQ ID NO:9	MASP-2のCUBIEGFドメイン(SEQ ID NO:6のaa1~166)
SEQ ID NO:10	MASP-2のCUBIEGFCUBIIドメイン (SEQ ID NO:6のaa1~293)
SEQ ID NO:11	MASP-2のEGFドメイン(aa122~166)
SEQ ID NO:12	MASP-2のセリンプロテアーゼドメイン(aa429~671)
SEQ ID NO:16	MASP-2におけるMBL結合領域
SEQ ID NO:3	ヒトMAp19
SEQ ID NO:21	ヒトMBLタンパク質

10

20

30

40

50

SEQ ID NO	供給源
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, 「0」は ヒドロキシプロリンであり、 かつ「X」は 疎水性アミノ酸残基である。	ヒトMBLおよびヒトフィコリンに由来する 合成ペプチドコンセンサス結合部位
SEQ ID NO:23 OGKLG	ヒトMBLコア結合部位
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	MASP-2に結合することを示したヒトMBPトリプレット6～10
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPO GKLGPOGGPOGPO	三重らせんの形成を増強するように 付加されたGPOを有するヒトMBPトリプレット
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEP GQGLRGLQGPOGKLG POGNOGPSGSOGPKG QKGDGKS	ヒトMBPトリプレット1～17
SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQ GPOGPOGKMGPKGEO GDO	ヒトH-フィコリン(Hakata)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGE AGTNGKRGERGPOGP OGKAGPOGPNGAOG E	ヒトL-フィコリンP35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKA NRPFLVFI	ヒトC4切断部位
SEQ ID NO:72 LEVTCPEGTTFKDKCNT CRCGSDGKSAVCTKLW CNQ	SGMI-2L (完全長)
SEQ ID NO:73 TCEPGTTFKDKCNTCRC GSDGKSAVCTKLWCNQ	SGMI-2M (ミディアム切断型バージョン)
SEQ ID NO:74 TCRCGSDGKSAVCTKL WCNQ	SGMI-2S (ショート切断型バージョン)

注:文字「0」はヒドロキシプロリンを表す。文字「X」は疎水残基である。

【0135】

C4切断部位に由来するペプチドならびにMASP-2セリンプロテアーゼ部位を阻害する他のペプチドは、不可逆的プロテアーゼインヒビターになるように化学的に改変することができる。例えば、適切な改変は、C末端、Asp、もしくはGluにおける、または官能側鎖に付加されるハロメチルケトン(Br、Cl、I、F);アミノ基または他の官能側鎖にあるハロアセチル(または他のαハロアセチル)基;アミノ末端もしくはカルボキシ末端または官能側鎖にあるエポキシド含有基またはイミン含有基;あるいはアミノ末端もしくはカルボキシ末端または官能側鎖にあるイミデートエステルを含んでもよいが、必ずしもこれに限定されない

。このような改変を行えば、ペプチドの共有結合によって酵素を永久に阻害するという利点を得られると考えられる。これによって有効量が少なくなる可能性があり、かつ/またはペプチド阻害因子の投与頻度の低下が必要になる可能性がある。

【0136】

前記の阻害ペプチドに加えて、本発明の方法において有用なMASP-2阻害ペプチドには、本明細書に記載のように得られた抗MASP-2 MoAbのMASP-2結合CDRH3領域を含有するペプチドが含まれる。ペプチド合成において使用するためのCDR領域の配列は、当技術分野において公知の方法によって決定することができる。重鎖可変領域は、一般的に長さが100～150アミノ酸のペプチドである。軽鎖可変領域は、一般的に長さが80～130アミノ酸のペプチドである。重鎖可変領域内および軽鎖可変領域内のCDR配列には、当業者によって容易に配列決定され得る、たった約3～25アミノ酸の配列が含まれる。

10

【0137】

当業者であれば、MASP-2阻害ペプチドの実質的に相同なバリエーションもMASP-2阻害活性を示すことを認めると考えられる。例示的なバリエーションには、本ペプチドのカルボキシ末端部分またはアミノ末端部分に挿入、欠失、交換、および/またはさらなるアミノ酸を有するペプチド、ならびにその混合物が含まれるが、必ずしもこれに限定されない。従って、MASP-2阻害活性を有する相同なペプチドは本発明の方法において有用だとみなされる。記載のペプチドはまた、重複モチーフおよび保存的置換による他の改変も含んでよい。保存的変種は本明細書の他の場所において説明され、あるアミノ酸を、類似した電荷、サイズ、または疎水性などのアミノ酸と交換することを含む。

20

【0138】

インタクトなタンパク質中のセグメントにさらによく似せるために、MASP-2阻害ペプチドは、溶解度を増加するように、および/または正電荷もしくは負電荷を最大にするように改変されてもよい。誘導体は、望ましいMASP-2阻害特性を機能的に保持する限り、本明細書において開示されたペプチドの正確な一次アミノ酸構造を有してもよく、有さなくてもよい。改変は、一般的に公知である20種類のアミノ酸の1つまたは別のアミノ酸を用いたアミノ酸置換、補助的な望ましい特徴、例えば、酵素分解に対する耐性を有する誘導体化アミノ酸もしくは置換アミノ酸またはDアミノ酸を用いたアミノ酸置換、あるいは天然コンフォメーションおよび1個のアミノ酸、複数のアミノ酸、またはペプチドの機能を模倣する別の分子もしくは化合物、例えば、炭水化物を用いた置換;アミノ酸欠失;一般的に公知である20種類のアミノ酸の1つまたは別のアミノ酸を用いたアミノ酸挿入、補助的な望ましい特徴、例えば、酵素分解に対する耐性を有する誘導体化アミノ酸もしくは置換アミノ酸またはDアミノ酸を用いたアミノ酸挿入、あるいは天然コンフォメーションおよび1個のアミノ酸、複数のアミノ酸、またはペプチドの機能を模倣する別の分子もしくは化合物、例えば、炭水化物を用いた置換;あるいは天然コンフォメーション、電荷分布、および親ペプチドの機能を模倣する別の分子または化合物、例えば、炭水化物または核酸モノマーを用いた置換を含んでもよい。ペプチドはまたアセチル化またはアミド化によって改変されてもよい。

30

【0139】

誘導体阻害ペプチドの合成は、ペプチド生合成、炭水化物生合成などの公知の技法に頼ってもよい。出発点として、当業者は、関心対象のペプチドのコンフォメーションを決定するために適切なコンピュータプログラムに頼ることがある。本明細書において開示されたペプチドのコンフォメーションが分かたら、当業者は、親ペプチドの基本コンフォメーションおよび電荷分布を保持するが、親ペプチドに存在しない特徴または親ペプチドに見られる特徴以上に強化された特徴を有し得る誘導体を作製するために、合理的設計のやり方で、1つまたは複数の部位に、どんな種類の置換を加えることができるかを決定することができる。候補誘導体分子が特定されたら、MASP-2阻害物質として機能するかどうか判定するために、本明細書に記載のアッセイを用いて誘導体を試験することができる。

40

【0140】

MASP-2阻害ペプチドのスクリーニング

50

MASP-2の重要な結合領域の分子構造を模倣し、MASP-2の補体活性を阻害するペプチドを生成およびスクリーニングするために、分子モデリングおよび合理的分子設計も使用することができる。以前に述べられたように、モデリングに用いられる分子構造には、抗MASP-2モノクローナル抗体のCDR領域、ならびに二量体化に必要な領域、MBLとの結合に関与する領域、およびセリンプロテアーゼ活性部位を含む、MASP-2機能に重要なことが公知の標的領域が含まれる。ある特定の標的に結合するペプチドを特定する方法は当技術分野において周知である。例えば、ある特定の分子に結合する巨大分子構造、例えば、ペプチドの新規構築のために分子インプリンティングを使用することができる。例えば、Shea, K.J., 「Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites」, TRIP 2(5) 1994を参照されたい。

10

【0141】

例示的な例として、MASP-2結合ペプチドの模倣物を調製する方法の1つは以下の通りである。公知のMASP-2結合ペプチド、またはMASP-2阻害を示す抗MASP-2抗体の結合領域の機能的モノマー(鋳型)が重合される。次いで、鋳型は取り出され、その後、鋳型によって残された空隙の中に別のクラスのモノマーが重合されて、鋳型に類似した、1つまたは複数の望ましい特性を示す新たな分子が得られる。このようにペプチドを調製することに加えて、MASP-2阻害物質である他のMASP-2結合分子、例えば、多糖、ヌクレオシド、薬物、核タンパク質、リポタンパク質、炭水化物、糖タンパク質、ステロイド、脂質、および他の生物学的に活性な材料も調製することができる。この方法は、天然対応物よりも安定性が高い多種多様な生物学的模倣物の設計に有用である。なぜなら、これらの生物学的模倣物は、典型的に、機能的モノマーのフリーラジカル重合によって調製され、その結果、非生分解性バックボーンを有する化合物が得られるからである。

20

【0142】

ペプチド合成

MASP-2阻害ペプチドは、当技術分野において周知の技法、例えば、J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963においてMerrifieldによって最初に述べられた固相合成技法を用いて調製することができる。自動合成は、例えば、Applied Biosystems 431 A Peptide Synthesizer(Foster City, Calif.)を用いて、製造業者により提供される説明書に従って実現することができる。他の技法は、例えば、Bodanszky, M., et al., Peptide Synthesis, 第二版, John Wiley & Sons, 1976ならびに当業者に公知の他の参考文献において見られ得る。

30

【0143】

ペプチドはまた、当業者に公知の標準的な遺伝子工学的技法を用いて調製することもできる。例えば、ペプチドは、ペプチドをコードする核酸を発現ベクターに挿入し、DNAを発現させ、必要とされるアミノ酸の存在下でDNAをペプチドに翻訳することによって酵素的に作製することができる。次いで、ペプチドを、クロマトグラフィー法もしくは電気泳動法を用いて精製するか、またはペプチドをコードする配列を、担体タンパク質をコードする核酸配列とインフレーム(in phase)で発現ベクターに挿入することによって、ペプチドと融合し、後で切断することができる担体タンパク質によって精製する。融合タンパク質ペプチドは、クロマトグラフィー法、電気泳動法、または免疫学的技法(例えば、抗体を介した樹脂と担体タンパク質との結合)を用いて単離されてもよい。ペプチドは、化学的方法論を用いて、または酵素的に、例えば、加水分解酵素によって切断することができる。

40

【0144】

本発明の方法において有用なMASP-2阻害ペプチドはまた、従来技法に従って組換え宿主細胞において産生することもできる。MASP-2阻害ペプチドをコードする配列を発現させるために、ペプチドをコードする核酸分子を、発現ベクター内で転写発現を制御する調節配列に機能的に連結し、次いで、宿主細胞に導入しなければならない。プロモーターおよびエンハンサーなどの転写調節配列に加えて、発現ベクターは、翻訳調節配列、および発現ベクターを有する細胞の選択に適したマーカー遺伝子を含んでもよい。

50

【0145】

MASP-2阻害ペプチドをコードする核酸分子は、「遺伝子合成機(gene machine)」によりホスホルアミダイト法などのプロトコルを用いて合成することができる。遺伝子または遺伝子断片の合成などの適用に化学合成二本鎖DNAが必要である場合には、それぞれの相補鎖が別々に作製される。短い遺伝子(60~80塩基対)の作製は技術的に簡単であり、相補鎖を合成し、次いで、これらをアニーリングすることによって達成することができる。さらに大きな遺伝子を作製するために、合成遺伝子(二本鎖)がモジュール形式で、長さが20~100ヌクレオチドの一本鎖断片から組み立てられる。ポリヌクレオチド合成に関する総説については、例えば、Glick and Pasternak, 「Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA」, ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; および Climie, S., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:633, 1990を参照されたい。

10

【0146】

低分子MASP-2阻害因子

一部の態様において、MASP-2阻害物質は、低分子量(例えば、50~1000Da)を有する天然物質、半合成物質、および合成物質を含む低分子阻害因子、例えば、ペプチド、ペプチドミメティック、および非ペプチド阻害因子(例えば、オリゴヌクレオチドおよび有機化合物)である。MASP-2低分子阻害因子は、抗MASP-2抗体の可変領域の分子構造に基づいて作製することができる。

【0147】

低分子阻害因子はまた、コンピュータ計算薬物設計(computational drug design)を用いて、MASP-2結晶構造に基づいて設計および生成されてもよい(Kuntz I.D., et al., Science 257:1078, 1992)。ラットMASP-2の結晶構造は説明されている(Feinberg, H., et al., EMBO J. 22:2348-2359, 2003)。Kuntzらに記載の方法を用いて、MASP-2に結合すると予想される低分子構造のリストを出力するコンピュータプログラム、例えば、DOCKの入力として、MASP-2結晶構造座標が用いられる。このようなコンピュータプログラムの使用は当業者に周知である。例えば、プログラムDOCKを用いて、Cambridge Crystallographicデータベースに見られる化合物と酵素結合部位とのフィット(fit)を評価することによってHIV-1プロテアーゼインヒビターである独特の非ペプチドリガンドを特定するために、HIV-1プロテアーゼインヒビターの結晶構造が用いられた(Kuntz, I.D., et al., J. Mol. Biol. 161:269-288, 1982; DesJarlais, R.L., et al., PNAS 87:6644-6648, 1990)。

20

【0148】

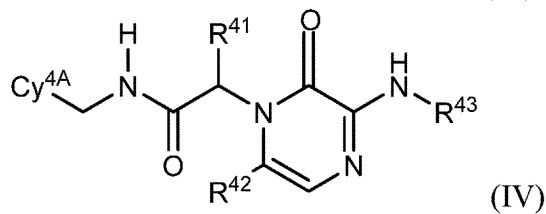
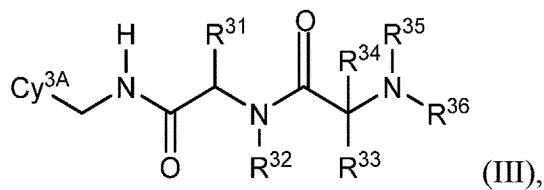
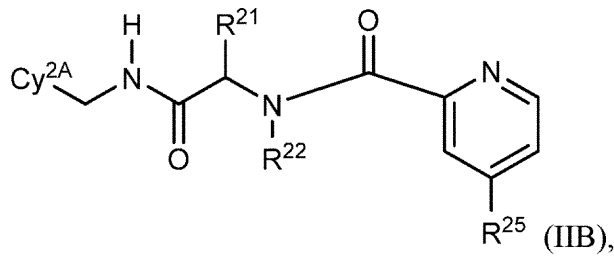
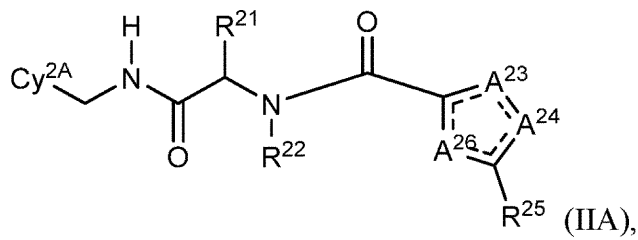
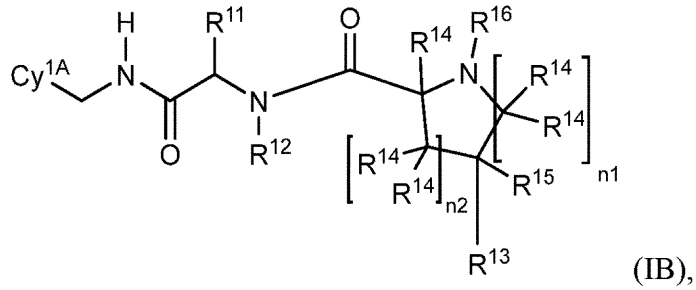
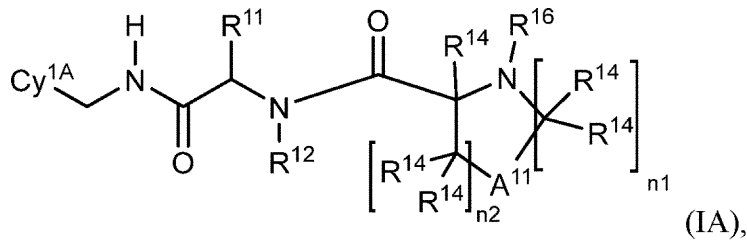
例示的なMASP-2阻害因子には、それぞれが、その全体が本明細書に参照により組み入れられる米国特許出願番号62/943,629、62/943,622、62/943,611、62/943,599、16/425,791、およびPCT出願番号PCT/US19/34220に開示される化合物が含まれるが、これに限定されない。

30

【0149】

一部の態様において、前記低分子は、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、または(IV):

40



の化合物、またはその塩であり、
式中、

Cy^{1A}は、非置換または置換C₆~10アリールまたは非置換または置換5~10員環ヘテロアリールであり、Cy^{1A}を形成する5~10員環ヘテロアリールの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、Cy^{1A}を形成する置換C₆~10アリールまたは置換5~10員環ヘテロアリールは、それぞれ独立して、R^{Cy1A}、ハロゲン、C₁~6ハロアルキル、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、C(O)R^{b11}、C(O)NR^{c11}R^{d11}、C(O)OR^{a11}、OC(O)R^{b11}、OC(O)NR^{c11}R^{d11}、NR^{c11}R^{d11}、NR^{c11}C(O)R^{b11}、NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}、NR^{c11}C(O)OR^{a11}、C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}、C(=NOR^{a11})NR^c

10

20

30

40

50

$^{11}R^{d11}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(=NRe^{11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $NR^{c11}C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

それぞれの R^{Cy1A} は、独立して、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキルより選択され、 R^{Cy1A} を形成する5～10員環ヘテロアリールまたは4～10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子からなり、 R^{Cy1A} を形成する、それぞれの $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、CN、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換され、 R^{Cy1A} を形成する、それぞれの $C_6\sim 10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換され、

R^{11} は、H、または $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 6$ アルキル、または5～10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 6$ アルキルであり、 R^{11} を形成する $C_1\sim 6$ アルキルは非置換であるか、または独立してハロゲン、CN、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換され、 R^{11} を形成する $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 6$ アルキルまたは5～10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 6$ アルキルは非置換であるか、または独立して $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換され、

R^{12} は、Hまたは $C_1\sim 6$ アルキルであるか、あるいは

R^{11} および R^{12} は、それらが結合している基と一緒にあって、4～6員環ヘテロシクロアルキル環を形成し、

A^{11} は、 $CR^{13}R^{15}$ またはNであり、

それぞれの R^{13} は、独立して、 Cy^{1B} 、 $(CR^{13}AR^{13B})_nCy^{1B}$ 、 $(C_1\sim 6$ アルキレン) Cy^{1B} 、 $(C_2\sim 6$ アルケニレン) Cy^{1B} 、 $(C_2\sim 6$ アルキニレン) Cy^{1B} 、または OCy^{1B} であり、 R^{13} の $C_1\sim 6$ アルキレン、 $C_2\sim 6$ アルケニレン、または $C_2\sim 6$ アルキニレン成分は非置換であるか、またはそれぞれ独立してハロゲン、CN、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NRe^{11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソからなる群より選択される1個、2個、3個、4個、もしくは5個の置換基で置換され、

それぞれの R^{14} は、独立して、Hおよび $C_1\sim 6$ アルキルより選択され、

R^{15} は、H、 R^{13} 、 $C_1\sim 6$ アルキル、およびOHより選択され、

R^{14} の他の出現とは独立して、隣接する炭素原子に結合している1対の R^{14} 基、または隣接する炭素原子に結合している R^{14} 基と R^{15} 基の対は、隣接する炭素原子が二重結合によって接続されるように、 R^{14} 基の対または R^{14} 基と R^{15} 基の対が結合している隣接する炭素原子を接続する結合によって一緒に置き換えられてもよく、あるいは

同じ炭素原子に結合している1対の R^{14} 基、または同じ炭素原子に結合している R^{13} 基と R^{15} 基の対は、 R^{14} の他の出現とは独立して、かつ R^{14} 基の対または R^{13} 基と R^{15} 基の対が結合している炭素原子と一緒にあって、スピロ縮合 $C_3\sim 10$ シクロアルキルまたは4~10員環ヘテロシクロアルキル環を形成してもよく、形成された4~10員環ヘテロシクロアルキル環の環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、形成されたスピロ縮合 $C_3\sim 10$ シクロアルキルまたは4~10員環ヘテロシクロアルキル環は、任意で、独立してハロゲン、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、ハロアルキル、CN、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基でさらに置換されるか、あるいは

隣接する炭素原子に結合している R^{14} 基の対、または隣接する炭素原子に結合している R^{14} 基と R^{15} 基の対は、 R^{14} の他の出現とは独立して、 R^{14} 基の対または R^{14} 基と R^{15} 基の対が結合している隣接する炭素原子と一緒にあって、縮合 $C_3\sim 10$ シクロアルキルまたは4~10員環ヘテロシクロアルキル環を形成してもよく、形成された4~10員環ヘテロシクロアルキル環の環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、形成された縮合 $C_3\sim 10$ シクロアルキルまたは4~10員環ヘテロシクロアルキル環は、任意で、独立してハロゲン、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、ハロアルキル、CN、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基でさらに置換されるか、あるいは

2個の隣接する炭素原子に結合している4個の R^{14} 基の集まり、または2個の隣接する炭素原子に結合している2個の R^{14} 基、1個の R^{13} 基、および1個の R^{15} 基の集まりは、 R^{14} の他の出現とは独立して、4個の R^{14} 基の集まり、または2個の R^{14} 基、1個の R^{13} 基、および1個の R^{15} 基の集まりが結合している2個の隣接する炭素原子と一緒にあって、縮合 $C_6\sim 10$ アリールまたは5~10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、または4~10員環ヘテロシクロアルキル環を形成してもよく、形成された5~10員環ヘテロアリールまたは4~10員環ヘテロシクロアルキル環の環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、形成された縮合 $C_6\sim 10$ アリールまたは5~10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、または4~10員環ヘテロシクロアルキル環は、任意で、独立してハロゲン、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、ハロアルキル、CN、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基でさらに置換され、

n_1 は、1または2であり、

n_2 は、0、1、または2であり、

但し、 n_1 と n_2 の和は1、2または3であり、

但し、 n_1 が1であるか、または n_2 が0であれば、 A^{11} は $CR^{13}R^{15}$ であり、 n_3 は、0、1、または2であり、
 それぞれの R^{13A} は、独立して、Hまたは $C_1\sim 6$ アルキルであり、
 それぞれの R^{13B} は、独立して、Hまたは $C_1\sim 6$ アルキルであるか、あるいは
 あるいは、同じ炭素原子に結合している R^{13A} および R^{13B} は、他の任意の R^{13A} 基および
 R^{13B} 基とは独立して、一緒になって、 $-(CH_2)_{2-5}$ を形成することで3～6員環シクロアル
 キル環を形成してもよく、

Cy^{1B} は、非置換もしくは置換 $C_6\sim 10$ アリール、非置換もしくは置換5～10員環ヘテロ
 アリール、非置換もしくは置換 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、または非置換もしくは置換4～10
 員環ヘテロシクロアルキルであり、 Cy^{1B} を形成する5～10員環ヘテロアリールまたは4～
 10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1
 個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、

Cy^{1B} を形成する置換 $C_6\sim 10$ アリール、置換5～10員環ヘテロアリール、置換 $C_3\sim 10$ シ
 クロアルキル、または置換4～10員環ヘテロシクロアルキルは、それぞれ独立して、 $R^{Cy^{1B}}$
 B 、ハロゲン、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$
 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(=NOR^{a11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換
 され、

それぞれの $R^{Cy^{1B}}$ は、独立して、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル
 $C_6\sim 10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4～10員
 環ヘテロシクロアルキルより選択され、 $R^{Cy^{1B}}$ を形成する5～10員環ヘテロアリールまた
 は4～10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択さ
 れる1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 $R^{Cy^{1B}}$ を形成する、それぞれの $C_1\sim 6$
 アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルは独立して非置換であるか、または
 独立してハロゲン、 CN 、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、
 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、および
 オキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、 $R^{Cy^{1B}}$ を形成する、
 それぞれの $C_6\sim 10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および
 4～10員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 C
 $1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a11}
 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$
 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、および
 オキソより選択される1個、2個、
 もしくは3個の置換基で置換され、

R^{16} は、H、 Cy^{1C} 、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルであり
 R^{16} を形成する、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルは非置換
 であるか、または Cy^{1C} 、ハロゲン、 CN 、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$
 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソからなる群より選択される1個、2個、3個、4個、もしくは5個の
 置換基で置換され、但し、 R^{16} の置換基の1個以下が Cy^{1C} であり、

Cy^{1C} は、非置換もしくは置換 $C_6\sim 10$ アリール、非置換もしくは置換5～10員環ヘテロ
 アリール、非置換もしくは置換 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、または非置換もしくは置換4～10

10

20

30

40

50

員環ヘテロシクロアルキルであり、 Cy^{1C} を形成する5～10員環ヘテロアリールまたは4～10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、

Cy^{1C} を形成する置換 $C_6\sim 10$ アリール、置換5～10員環ヘテロアリール、置換 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、または置換4～10員環ヘテロシクロアルキルは、それぞれ独立して、 $R^{Cy^{1C}}$ 、ハロゲン、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(=NOR^{a11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

それぞれの $R^{Cy^{1C}}$ は、独立して、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキルより選択され、 $R^{Cy^{1C}}$ を形成する5～10員環ヘテロアリールまたは4～10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 $R^{Cy^{1C}}$ を形成する、それぞれの $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 CN 、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、 $R^{Cy^{1C}}$ を形成する、それぞれの $C_6\sim 10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a11} 、 SR^{a11} 、 $C(O)R^{b11}$ 、 $C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $C(O)OR^{a11}$ 、 $OC(O)R^{b11}$ 、 $OC(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)R^{b11}$ 、 $NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(O)OR^{a11}$ 、 $C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)R^{b11}$ 、 $S(O)NR^{c11}R^{d11}$ 、 $S(O)_2R^{b11}$ 、 $NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$ 、 $S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{a11} 、 R^{b11} 、 R^{c11} 、および R^{d11} は、それぞれ独立して、H、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、5～10員環ヘテロアリール、4～10員環ヘテロシクロアルキル、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 3$ アルキル、5～10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルより選択され、 R^{a11} 、 R^{b11} 、 R^{c11} および R^{d11} を形成する、前記 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、5～10員環ヘテロアリール、4～10員環ヘテロシクロアルキル、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 3$ アルキル、5～10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルはそれぞれ、独立して、 $C_1\sim 6$ アルキル、ハロ、 CN 、 OR^{a12} 、 SR^{a12} 、 $C(O)R^{b12}$ 、 $C(O)NR^{c12}R^{d12}$ 、 $C(O)OR^{a12}$ 、 $OC(O)R^{b12}$ 、 $OC(O)NR^{c12}R^{d12}$ 、 $NR^{c12}R^{d12}$ 、 $NR^{c12}C(O)R^{b12}$ 、 $NR^{c12}C(O)NR^{c12}R^{d12}$ 、 $NR^{c12}C(O)OR^{a12}$ 、 $C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$ 、 $NR^{c12}C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$ 、 $S(O)R^{b12}$ 、 $S(O)NR^{c12}R^{d12}$ 、 $S(O)_2R^{b12}$ 、 $NR^{c12}S(O)_2R^{b12}$ 、 $S(O)_2NR^{c12}R^{d12}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換されていてもよく、

あるいは、同じN原子に結合している R^{c11} および R^{d11} は、それら両方が結合しているN原子と一緒にあって、4員環、5員環、6員環、もしくは7員環ヘテロシクロアルキル基または5員環ヘテロアリール基を形成し、それぞれが、独立して $C_1\sim 6$ アルキル、ハロ、 CN 、 OR^{a12} 、 SR^{a12} 、 $C(O)R^{b12}$ 、 $C(O)NR^{c12}R^{d12}$ 、 $C(O)OR^{a12}$ 、 $OC(O)R^{b12}$ 、 $OC(O)NR^{c12}R^{d12}$ 、

R^{a12}、R^{b12}、R^{c12}およびR^{d12}は、それぞれ独立して、H、C₁~₆アルキル、C₁~₆ハロアルキル、C₂~₆アルケニル、C₂~₆アルキニル、フェニル、C₃~₇シクロアルキル、5~6員環ヘテロアリール、4~7員環ヘテロシクロアルキル、フェニル-C₁~₃アルキル、5~6員環ヘテロアリール-C₁~₃アルキル、C₃~₇シクロアルキル-C₁~₃アルキル、および4~7員環ヘテロシクロアルキル-C₁~₃アルキルより選択され、R^{a12}、R^{b12}、R^{c12}、およびR^{d12}を形成する、前記C₁~₆アルキル、C₁~₆ハロアルキル、C₂~₆アルケニル、C₂~₆アルキニル、フェニル、C₃~₇シクロアルキル、5~6員環ヘテロアリール、4~7員環ヘテロシクロアルキル、フェニル-C₁~₃アルキル、5~6員環ヘテロアリール-C₁~₃アルキル、C₃~₇シクロアルキル-C₁~₃アルキル、および4~7員環ヘテロシクロアルキル-C₁~₃アルキルは、それぞれが、独立してOH、CN、アミノ、NH(C₁~₆アルキル)、N(C₁~₆アルキル)₂、ハロ、C₁~₆アルキル、C₁~₆アルコキシ、C₁~₆ハロアルキル、C₁~₆ハロアルコキシ、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換されていてもよく、

Re^{11} および Re^{12} はそれぞれが独立して、H、CN、または NO_2 であり、

それぞれのR^{Cy2A}は、独立して、C₁~6アルキル、C₂~6アルケニル、C₂~6アルキニル、C₆~10アリール、5~10員環ヘテロアリール、C₃~10シクロアルキル、および4~10員環ヘテロシクロアルキルより選択され、R^{Cy2A}を形成する5~10員環ヘテロアリールまたは4~10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子からなり、R^{Cy2A}を形成する、それぞれのC₁~6アルキル、C₂~6アルケニル、またはC₂~6アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、C(O)R^{b21}、C(O)NR^{c21}R^{d21}、C(O)OR^{a21}、OC(O)R^{b21}、OC(O)NR^{c21}R^{d21}、NR^{c21}R^{d21}、NR^{c21}C(O)R^{b21}、NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}、NR^{c21}C(O)OR^{a21}、C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}、NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}、S(O)R^{b21}、S(O)NR^{c21}R^{d21}、S(O)₂R^{b21}、NR^{c21}S(O)₂R^{b21}、S(O)₂NR^{c21}R^{d21}、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、R^{Cy2A}を形成する、それぞれのC₆~10アリール、5~10員環ヘテロアリール、C₃~10シクロアルキル、および4~10員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、C₁~6アルキル、C₂~6アルケニル、C₂~6アルキニル、C₁~6ハロアルキル、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、C(O)R^{b21}、C(O)NR^{c21}R^{d21}、C(O)OR^{a21}、OC(O)R^{b21}、OC(O)NR^{c21}

$^{21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)R^{b21}$ 、 $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$ 、 $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)R^{b21}$ 、 $S(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)_2R^{b21}$ 、 $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$ 、 $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{21} は、H、または $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 6$ アルキル、もしくは5~10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 6$ アルキルであり、 R^{21} を形成する、 $C_1\sim 6$ アルキルは非置換であるか、または独立してハロゲン、CN、 OR^{a21} 、 SR^{a21} 、 $C(O)R^{b21}$ 、 $C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(O)OR^{a21}$ 、 $OC(O)R^{b21}$ 、 $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)R^{b21}$ 、 $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$ 、 $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)R^{b21}$ 、 $S(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)_2R^{b21}$ 、 $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$ 、 $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、 R^{21} を形成する、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 6$ アルキルまたは5~10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 6$ アルキルは非置換であるか、または独立して $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a21} 、 SR^{a21} 、 $C(O)R^{b21}$ 、 $C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(O)OR^{a21}$ 、 $OC(O)R^{b21}$ 、 $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)R^{b21}$ 、 $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$ 、 $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)R^{b21}$ 、 $S(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)_2R^{b21}$ 、 $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$ 、 $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{22} は、Hまたは $C_1\sim 6$ アルキルであるか、あるいは

R^{21} および R^{22} は、それらが結合している基と一緒にあって、4~6員環ヘテロシクロアルキル環を形成し、

A^{23} は、Nまたは NR^{23} であり、

A^{24} は、 CR^{24} ;Nまたは NR^{24} であり、

A^{26} は、 CR^{26} またはSであり、

但し、

式(IIA)の A^{23} 、 A^{24} 、および A^{26} は、 A^{23} 、 A^{24} および A^{26} を含む環がヘテロアリール環になるように選択され、記号

は、芳香環(標準化された)結合を表し、

R^{23} は、Hまたは $C_1\sim 6$ アルキルであり、

R^{24} は、H; $C_1\sim 6$ アルキルまたはフェニルであり、

R^{25} は、 Cy^{2B} 、 $(CR^{25A}R^{25B})_{n25}Cy^{2B}$ 、 $(C_1\sim 6$ アルキレン) Cy^{2B} 、 $(C_2\sim 6$ アルケニレン) Cy^{2B} 、または $(C_2\sim 6$ アルキニレン) Cy^{2B} であり、 R^{25} の $C_1\sim 6$ アルキレン、 $C_2\sim 6$ アルケニレン、または $C_2\sim 6$ アルキニレン成分は非置換であるか、またはそれぞれが独立してハロゲン、CN、 OR^{a21} 、 SR^{a21} 、 $C(O)R^{b21}$ 、 $C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(O)OR^{a21}$ 、 $OC(O)R^{b21}$ 、 $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)R^{b21}$ 、 $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$ 、 $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)R^{b21}$ 、 $S(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)_2R^{b21}$ 、 $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$ 、 $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ 、およびオキソからなる群より選択される1個、2個、3個、4個、もしくは5個の置換基で置換され、

R^{26} は、Hまたは $C_1\sim 6$ アルキルであり、

それぞれの R^{25A} は、Hまたは $C_1\sim 6$ アルキルであり、

それぞれの R^{25B} は、Hまたは $C_1\sim 6$ アルキルであり、

$n25$ は、0、1、または2であり、

Cy^{2B} は、非置換もしくは置換 $C_6\sim 10$ アリール、非置換もしくは置換5~10員環ヘテロアリール、非置換もしくは置換 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、または非置換もしくは置換4~10員環ヘテロシクロアルキルであり、 Cy^{2B} を形成する5~10員環ヘテロアリールまたは4~10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、

Cy^{2B} を形成する、置換 $C_6\sim 10$ アリール、置換5~10員環ヘテロアリール、置換 $C_3\sim 10$

シクロアルキル、または置換4～10員環ヘテロシクロアルキルは、それぞれが独立して、 R^{Cy2B} 、ハロゲン、 $C_1\sim6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a21} 、 SR^{a21} 、 $C(O)R^{b21}$ 、 $C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(O)OR^{a21}$ 、 $OC(O)R^{b21}$ 、 $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)R^{b21}$ 、 $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$ 、 $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(=NOR^{a21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(=NR^{e21})NR^{c21}C(O)OR^{a21}$ 、 $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)R^{b21}$ 、 $S(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)_2R^{b21}$ 、 $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$ 、 $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

それぞれの R^{Cy2B} は、独立して、 $C_1\sim6$ アルキル、 $C_2\sim6$ アルケニル、 $C_2\sim6$ アルキニル、 $C_6\sim10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim10$ シクロアルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキルより選択され、 R^{Cy2B} を形成する5～10員環ヘテロアリールまたは4～10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 R^{Cy2B} を形成する、それぞれ $C_1\sim6$ アルキル、 $C_2\sim6$ アルケニル、または $C_2\sim6$ アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 CN 、 OR^{a21} 、 SR^{a21} 、 $C(O)R^{b21}$ 、 $C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(O)OR^{a21}$ 、 $OC(O)R^{b21}$ 、 $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)R^{b21}$ 、 $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$ 、 $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)R^{b21}$ 、 $S(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)_2R^{b21}$ 、 $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$ 、 $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、 R^{Cy2B} を形成する、それぞれの $C_6\sim10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim10$ シクロアルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 $C_1\sim6$ アルキル、 $C_2\sim6$ アルケニル、 $C_2\sim6$ アルキニル、 $C_1\sim6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a21} 、 SR^{a21} 、 $C(O)R^{b21}$ 、 $C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $C(O)OR^{a21}$ 、 $OC(O)R^{b21}$ 、 $OC(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)R^{b21}$ 、 $NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(O)OR^{a21}$ 、 $C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)R^{b21}$ 、 $S(O)NR^{c21}R^{d21}$ 、 $S(O)_2R^{b21}$ 、 $NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$ 、 $S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

それぞれが独立して、H、 $C_1\sim6$ アルキル、 $C_2\sim6$ アルケニル、 $C_2\sim6$ アルキニル、 $C_6\sim10$ アリール、 $C_3\sim7$ シクロアルキル、5～10員環ヘテロアリール、4～10員環ヘテロシクロアルキル、 $C_6\sim10$ アリール- $C_1\sim3$ アルキル、5～10員環ヘテロアリール- $C_1\sim3$ アルキル、 $C_3\sim7$ シクロアルキル- $C_1\sim3$ アルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim3$ アルキルより選択され、 R^{a21} 、 R^{b21} 、 R^{c21} 、および R^{d21} を形成する、前記 $C_1\sim6$ アルキル、 $C_2\sim6$ アルケニル、 $C_2\sim6$ アルキニル、 $C_6\sim10$ アリール、 $C_3\sim7$ シクロアルキル、5～10員環ヘテロアリール、4～10員環ヘテロシクロアルキル、 $C_6\sim10$ アリール- $C_1\sim3$ アルキル、5～10員環ヘテロアリール- $C_1\sim3$ アルキル、 $C_3\sim7$ シクロアルキル- $C_1\sim3$ アルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim3$ アルキルはそれぞれが、独立して $C_1\sim6$ アルキル、ハロ、 CN 、 OR^{a22} 、 SR^{a22} 、 $C(O)R^{b22}$ 、 $C(O)NR^{c22}R^{d22}$ 、 $C(O)OR^{a22}$ 、 $OC(O)R^{b22}$ 、 $OC(O)NR^{c22}R^{d22}$ 、 $NR^{c22}R^{d22}$ 、 $NR^{c22}C(O)R^{b22}$ 、 $NR^{c22}C(O)NR^{c22}R^{d22}$ 、 $NR^{c22}C(O)OR^{a22}$ 、 $C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$ 、 $NR^{c22}C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$ 、 $S(O)R^{b22}$ 、 $S(O)NR^{c22}R^{d22}$ 、 $S(O)_2R^{b22}$ 、 $NR^{c22}S(O)_2R^{b22}$ 、 $S(O)_2NR^{c22}R^{d22}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換されていてもよく、

あるいは、同じN原子に結合している R^{c21} および R^{d21} は、それら両方が結合しているN原子と一緒に、4員環、5員環、6員環、もしくは7員環ヘテロシクロアルキル基または5員環ヘテロアリール基を形成し、それぞれが、独立して $C_1\sim6$ アルキル、ハロ、 CN 、 OR^{a22} 、 SR^{a22} 、 $C(O)R^{b22}$ 、 $C(O)NR^{c22}R^{d22}$ 、 $C(O)OR^{a22}$ 、 $OC(O)R^{b22}$ 、 $OC(O)NR^{c22}R^{d22}$ 、 $NR^{c22}R^{d22}$ 、 $NR^{c22}C(O)R^{b22}$ 、 $NR^{c22}C(O)NR^{c22}R^{d22}$ 、 $NR^{c22}C(O)OR^{a22}$ 、 $C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$ 、 $NR^{c22}C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$ 、 $S(O)R^{b22}$ 、 $S(O)NR^{c22}R^{d22}$ 、 $S(O)_2R^{b22}$ 、 $NR^{c22}S(O)_2R^{b22}$ 、 $S(O)_2NR^{c22}R^{d22}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換されていてもよく、

R^{a22} 、 R^{b22} 、 R^{c22} 、および R^{d22} は、それぞれが独立して、H、 $C_1\sim6$ アルキル、 $C_1\sim6$

10

20

30

40

50

ハロアルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、フェニル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、 $5\sim 6$ 員環ヘテロアリール、 $4\sim 7$ 員環ヘテロシクロアルキル、フェニル- $C_1\sim 3$ アルキル、 $5\sim 6$ 員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および $4\sim 7$ 員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルより選択され、 R^{a22} 、 R^{b22} 、 R^{c22} 、および R^{d22} を形成する、前記 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、フェニル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、 $5\sim 6$ 員環ヘテロアリール、 $4\sim 7$ 員環ヘテロシクロアルキル、フェニル- $C_1\sim 3$ アルキル、 $5\sim 6$ 員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および $4\sim 7$ 員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルはそれぞれが、独立してOH、CN、アミノ、 $NH(C_1\sim 6$ アルキル)、 $N(C_1\sim 6$ アルキル)₂、ハロ、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ アルコキシ、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルコキシ、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換されていてもよく、

10

あるいは、同じN原子に結合している R^{c22} および R^{d22} は、それら両方が結合しているN原子と一緒にあって、4員環、5員環、6員環、もしくは7員環ヘテロシクロアルキル基または5員環ヘテロアリール基を形成し、これらのそれぞれが非置換であるか、またはOH、CN、アミノ、 $NH(C_1\sim 6$ アルキル)、 $N(C_1\sim 6$ アルキル)₂、ハロ、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ アルコキシ、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルコキシ、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{e21} および R^{e22} はそれぞれが独立して、H、CN、または NO_2 であり、

Cy^{3A} は、非置換もしくは置換 $C_6\sim 10$ アリールまたは非置換もしくは置換 $5\sim 10$ 員環ヘテロアリールであり、 Cy^{3A} を形成する $5\sim 10$ 員環ヘテロアリールの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 Cy^{3A} を形成する置換 $C_6\sim 10$ アリールまたは置換 $5\sim 10$ 員環ヘテロアリールは、それぞれ独立して R^{Cy3A} 、ハロゲン、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a31} 、 SR^{a31} 、 $C(O)R^{b31}$ 、 $C(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $C(O)OR^{a31}$ 、 $OC(O)R^{b31}$ 、 $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(O)R^{b31}$ 、 $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$ 、 $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $C(=NOR^{a31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $C(=NR^{e31})NR^{c31}C(O)OR^{a31}$ 、 $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $S(O)R^{b31}$ 、 $S(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $S(O)_2R^{b31}$ 、 $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$ 、 $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

20

それぞれの R^{Cy3A} は、独立して、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、 $5\sim 10$ 員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および $4\sim 10$ 員環ヘテロシクロアルキルより選択され、 R^{Cy3A} を形成する $5\sim 10$ 員環ヘテロアリールまたは $4\sim 10$ 員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子からなり、 R^{Cy3A} を形成する、それぞれの $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、CN、 OR^{a31} 、 SR^{a31} 、 $C(O)R^{b31}$ 、 $C(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $C(O)OR^{a31}$ 、 $OC(O)R^{b31}$ 、 $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(O)R^{b31}$ 、 $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$ 、 $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $S(O)R^{b31}$ 、 $S(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $S(O)_2R^{b31}$ 、 $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$ 、 $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、 R^{Cy3A} を形成する、それぞれの $C_6\sim 10$ アリール、 $5\sim 10$ 員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および $4\sim 10$ 員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a31} 、 SR^{a31} 、 $C(O)R^{b31}$ 、 $C(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $C(O)OR^{a31}$ 、 $OC(O)R^{b31}$ 、 $OC(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(O)R^{b31}$ 、 $NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(O)OR^{a31}$ 、 $C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $S(O)R^{b31}$ 、 $S(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $S(O)_2R^{b31}$ 、 $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$ 、 $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

30

40

R^{31} は、H、または $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 6$ アルキル、もしくは $5\sim 10$ 員環ヘテロアリール- $C_1\sim 6$ アルキルであり、 R^{31} を形成する $C_1\sim 6$ アルキルは非置換であ

50

るか、または独立してハロゲン、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、C(O)R^{b31}、C(O)NR^{c31}R^{d31}、C(O)OR^{a31}、OC(O)R^{b31}、OC(O)NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(O)R^{b31}、NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(O)OR^{a31}、C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}、S(O)R^{b31}、S(O)NR^{c31}R^{d31}、S(O)₂R^{b31}、NR^{c31}S(O)₂R^{b31}、S(O)₂NR^{c31}R^{d31}、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、R³¹を形成する、C₆~10アリール-C₁~6アルキルまたは5~10員環ヘテロアリール-C₁~6アルキルは非置換であるか、または独立してC₁~6アルキル、C₂~6アルケニル、C₂~6アルキニル、C₁~6ハロアルキル、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、C(O)R^{b31}、C(O)NR^{c31}R^{d31}、C(O)OR^{a31}、OC(O)R^{b31}、OC(O)NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(O)R^{b31}、NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(O)OR^{a31}、C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}、S(O)R^{b31}、S(O)NR^{c31}R^{d31}、S(O)₂R^{b31}、NR^{c31}S(O)₂R^{b31}、S(O)₂NR^{c31}R^{d31}、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R³²は、HまたはC₁~6アルキルであるか、あるいは

R³¹およびR³²は、それらが結合している基と一緒に、4~6員環ヘテロシクロアルキル環を形成し、

R³³は、Cy^{3B}、(CR^{33A}R^{33B})_{n33}Cy^{3B}、(C₁~6アルキレン)Cy^{3B}、(C₂~6アルケニレン)Cy^{3B}、または(C₂~6アルキニレン)Cy^{3B}であり、R³⁵のC₁~6アルキレン、C₂~6アルケニレン、またはC₂~6アルキニレン成分は非置換であるか、またはそれぞれ独立してハロゲン、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、C(O)R^{b31}、C(O)NR^{c31}R^{d31}、C(O)OR^{a31}、OC(O)R^{b31}、OC(O)NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(O)R^{b31}、NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(O)OR^{a31}、C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}、S(O)R^{b31}、S(O)NR^{c31}R^{d31}、S(O)₂R^{b31}、NR^{c31}S(O)₂R^{b31}、S(O)₂NR^{c31}R^{d31}、およびオキソからなる群より選択される1個、2個、3個、4個、もしくは5個の置換基で置換され、

それぞれのR^{33A}は、独立して、HまたはC₁~6アルキルであり、

それぞれのR^{33B}は、独立して、HまたはC₁~6アルキルであるか、あるいは

あるいは、同じ炭素原子に結合しているR^{33A}およびR^{33B}は、他の任意のR^{33A}およびR^{33B}基とは独立して、一緒になって-(CH₂)₂₋₅を形成し、それによって、3~6員環シクロアルキル環を形成してもよく、

n₃₃は、0、1、2、または3であり、

Cy^{3B}は、非置換もしくは置換C₆~10アリール、非置換もしくは置換5~10員環ヘテロアリール、非置換もしくは置換C₃~10シクロアルキル、または非置換もしくは置換4~10員環ヘテロシクロアルキルであり、Cy^{3B}を形成する5~10員環ヘテロアリールまたは4~10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、

Cy^{3B}を形成する、置換C₆~10アリール、置換5~10員環ヘテロアリール、置換C₃~10シクロアルキル、または置換4~10員環ヘテロシクロアルキルは、それぞれ独立して、R^CY^{3B}、ハロゲン、C₁~6ハロアルキル、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、C(O)R^{b31}、C(O)NR^{c31}R^{d31}、C(O)OR^{a31}、OC(O)R^{b31}、OC(O)NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(O)R^{b31}、NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}、NR^{c31}C(O)OR^{a31}、C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}、C(=NOR^{a31})NR^{c31}R^{d31}、C(=NOC(O)R^{b31})NR^{c31}R^{d31}、C(=NR^{e31})NR^{c31}C(O)OR^{a31}、NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}、S(O)R^{b31}、S(O)NR^{c31}R^{d31}、S(O)₂R^{b31}、NR^{c31}S(O)₂R^{b31}、S(O)₂NR^{c31}R^{d31}、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

それぞれのR^{CY3B}は、独立して、C₁~6アルキル、C₂~6アルケニル、C₂~6アルキニル、C₆~10アリール、5~10員環ヘテロアリール、C₃~10シクロアルキル、および4~10員環ヘテロシクロアルキルより選択され、R^{CY3B}を形成する5~10員環ヘテロアリールまたは4~10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、R^{CY3B}を形成する、それぞれのC₁~6アルキル、C₂~6アルケニル、またはC₂~6アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、C(O)R^{b31}、C(O)NR^{c31}R^{d31}、C(O)OR^{a31}、

10

20

30

40

50

10

20

20

20

30

40

50

$e^{31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $NR^{c31}C(=NRe^{31})NR^{c31}R^{d31}$ 、 $S(O)R^{b31}$ 、 $S(O)NR^{c31}R^{d31}$ 、 $S(O)_2R^{b31}$ 、 $NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$ 、 $S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{36} は、Hおよび $C_1\sim 6$ アルキルより選択され、

R^{a31} 、 R^{b31} 、 R^{c31} および R^{d31} は、それぞれが独立して、H、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、5～10員環ヘテロアリール、4～10員環ヘテロシクロアルキル、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 3$ アルキル、5～10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルより選択され、 R^{a31} 、 R^{b31} 、 R^{c31} 、および R^{d31} を形成する、前記 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、5～10員環ヘテロアリール、4～10員環ヘテロシクロアルキル、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 3$ アルキル、5～10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルはそれぞれが、独立して $C_1\sim 6$ アルキル、ハロ、CN、 OR^{a32} 、 SR^{a32} 、 $C(O)R^{b32}$ 、 $C(O)NR^{c32}R^{d32}$ 、 $C(O)OR^{a32}$ 、 $OC(O)R^{b32}$ 、 $OC(O)NR^{c32}R^{d32}$ 、 $NR^{c32}R^{d32}$ 、 $NR^{c32}C(O)R^{b32}$ 、 $NR^{c32}C(O)NR^{c32}R^{d32}$ 、 $NR^{c32}C(O)OR^{a32}$ 、 $C(=NRe^{32})NR^{c32}R^{d32}$ 、 $NR^{c32}C(=NRe^{32})NR^{c32}R^{d32}$ 、 $S(O)R^{b32}$ 、 $S(O)NR^{c32}R^{d32}$ 、 $S(O)_2R^{b32}$ 、 $NR^{c32}S(O)_2R^{b32}$ 、 $S(O)_2NR^{c32}R^{d32}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

あるいは、同じN原子に結合している R^{c31} および R^{d31} は、それら両方が結合しているN原子と一緒にあって、4員環、5員環、6員環、もしくは7員環ヘテロシクロアルキル基または5員環ヘテロアリール基を形成し、それぞれが、独立して $C_1\sim 6$ アルキル、ハロ、CN、 OR^{a32} 、 SR^{a32} 、 $C(O)R^{b32}$ 、 $C(O)NR^{c32}R^{d32}$ 、 $C(O)OR^{a32}$ 、 $OC(O)R^{b32}$ 、 $OC(O)NR^{c32}R^{d32}$ 、 $NR^{c32}R^{d32}$ 、 $NR^{c32}C(O)R^{b32}$ 、 $NR^{c32}C(O)NR^{c32}R^{d32}$ 、 $NR^{c32}C(O)OR^{a32}$ 、 $C(=NRe^{32})NR^{c32}R^{d32}$ 、 $NR^{c32}C(=NRe^{32})NR^{c32}R^{d32}$ 、 $S(O)R^{b32}$ 、 $S(O)NR^{c32}R^{d32}$ 、 $S(O)_2R^{b32}$ 、 $NR^{c32}S(O)_2R^{b32}$ 、 $S(O)_2NR^{c32}R^{d32}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換されていてもよく、

R^{a32} 、 R^{b32} 、 R^{c32} 、および R^{d32} はそれぞれが独立して、H、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、フェニル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、5～6員環ヘテロアリール、4～7員環ヘテロシクロアルキル、フェニル- $C_1\sim 3$ アルキル、5～6員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および4～7員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルより選択され、 R^{a32} 、 R^{b32} 、 R^{c32} 、および R^{d32} を形成する、前記 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、フェニル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、5～6員環ヘテロアリール、4～7員環ヘテロシクロアルキル、フェニル- $C_1\sim 3$ アルキル、5～6員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および4～7員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルはそれぞれが、独立してOH、CN、アミノ、 $NH(C_1\sim 6$ アルキル)、 $N(C_1\sim 6$ アルキル)₂、ハロ、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ アルコキシ、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルコキシ、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換され、

あるいは、同じN原子に結合している R^{c32} および R^{d32} は、それら両方が結合しているN原子と一緒にあって、4員環、5員環、6員環、もしくは7員環ヘテロシクロアルキル基または5員環ヘテロアリール基を形成し、これらのそれぞれが非置換であるか、または独立してOH、CN、アミノ、 $NH(C_1\sim 6$ アルキル)、 $N(C_1\sim 6$ アルキル)₂、ハロ、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ アルコキシ、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルコキシ、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

Re^{31} および Re^{32} はそれぞれが独立して、H、CN、または NO_2 であり、

Cy^{4A} は、非置換もしくは置換 $C_6\sim 10$ アリールまたは非置換もしくは置換5～10員環ヘテロアリールであり、 Cy^{4A} を形成する5～10員環ヘテロアリールの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 Cy^{4A} を形成する置換 $C_6\sim 10$ アリールまたは置換5～10員環ヘテロアリールは、それぞれ独立して、

R^{Cy4A} 、ハロゲン、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NRe^{41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $NR^{c41}C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

それぞれの R^{Cy4A} は、独立して、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、5~10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4~10員環ヘテロシクロアルキルより選択され、 R^{Cy4A} を形成する5~10員環ヘテロアリールまたは4~10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子からなり、 R^{Cy4A} を形成する、それぞれの $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 CN 、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、 R^{Cy4A} を形成する、それぞれの $C_6\sim 10$ アリール、5~10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4~10員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{41} は、H、または $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 6$ アルキル、もしくは5~10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 6$ アルキルであり、 R^{41} を形成する $C_1\sim 6$ アルキルは非置換であるか、または独立してハロゲン、 CN 、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、 R^{41} を形成する $C_6\sim 10$ アリール- $C_1\sim 6$ アルキルまたは5~10員環ヘテロアリール- $C_1\sim 6$ アルキルは非置換であるか、または独立して $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 CN 、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{42} は、H、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、または Cy^{4B} であり、 R^{42} を形成する、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルのそれぞれが非置換であるか、または Cy^{4B} 、ハロゲン、 CN 、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NRe^{41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソからなる群より選択される1個、2個、3個、4個、もしくは5個の置換基で置換され、但し、置換基の1個以下は Cy^{4B} であり、

Cy^{4B} は、非置換もしくは置換 $C_6\sim 10$ アリール、非置換もしくは置換5~10員環ヘテロアリール、非置換もしくは置換 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、または非置換もしくは置換4~10

10

20

30

40

50

員環ヘテロシクロアルキルであり、 Cy^{4B} を形成する5～10員環ヘテロアリールまたは非置換または置換4～10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 Cy^{4B} を形成する、置換 $C_6\sim 10$ アリール、置換5～10員環ヘテロアリール置換 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、または4～10員環ヘテロシクロアルキルは、それぞれ独立して $R^{Cy^{4B}}$ 、ハロゲン、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

10

それぞれの $R^{Cy^{4B}}$ は、独立して、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_6\sim 10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキルより選択され、 $R^{Cy^{4B}}$ を形成する5～10員環ヘテロアリールまたは4～10員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 $R^{Cy^{4B}}$ を形成する、それぞれの $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、CN、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、それぞれの $R^{Cy^{4B}}$ を形成する、それぞれの $C_6\sim 10$ アリール、5～10員環ヘテロアリール、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、および4～10員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

20

30

あるいは、 R^{41} および R^{42} は、それらが結合している原子と、 R^{41} および R^{42} が結合している原子に連結している窒素原子と一緒にあって、4～7員環ヘテロシクロアルキル環を形成し、それぞれ独立して $R^{Cy^{4B}}$ 、ハロゲン、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基でさらに置換されていてもよく、

40

R^{43} は、H、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、または Cy^{4C} であり、 R^{43} を形成する、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルのそれぞれが非置換であるか、またはそれぞれ独立して Cy^{4C} 、ハロゲン、CN、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソからなる群より選択される0、1個、2個、3個、4個、または5個の置換基よりそれぞれ独立に選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、但し、 R^{43} を形成する、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、または $C_2\sim 6$ アルキニルの1個以下の置換基は Cy^{4C} であり、

Cy^{4C} は、非置換もしくは置換 $C_6\sim 10$ アリール、非置換もしくは置換5～10員環ヘテロ

50

アリール、非置換もしくは置換 $C_3\sim_{10}$ シクロアルキル、または非置換もしくは置換 $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキルであり、 Cy^{4B} を形成する $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリールまたは非置換もしくは置換 $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 Cy^{4C} を形成する置換 $C_6\sim_{10}$ アリール、置換 $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリール置換 $C_3\sim_{10}$ シクロアルキル、または $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキルは、それぞれ独立して、 R^{Cy4C} 、ハロゲン、 $C_1\sim_6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換され、

それぞれの R^{Cy4C} は、独立して、 $C_1\sim_6$ アルキル、 $C_2\sim_6$ アルケニル、 $C_2\sim_6$ アルキニル、 $C_6\sim_{10}$ アリール、 $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリール、 $C_3\sim_{10}$ シクロアルキル、および $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキルより選択され、 R^{Cy4C} を形成する $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリールまたは $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキルの環原子は、炭素原子と、O、N、およびSより選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子からなり、 R^{Cy4C} を形成する、それぞれの $C_1\sim_6$ アルキル、 $C_2\sim_6$ アルケニル、または $C_2\sim_6$ アルキニルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、CN、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、それぞれの R^{Cy4A} を形成する、それぞれの $C_6\sim_{10}$ アリール、 $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリール、 $C_3\sim_{10}$ シクロアルキル、および $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキルは独立して非置換であるか、または独立してハロゲン、 $C_1\sim_6$ アルキル、 $C_2\sim_6$ アルケニル、 $C_2\sim_6$ アルキニル、 $C_1\sim_6$ ハロアルキル、CN、 OR^{a41} 、 SR^{a41} 、 $C(O)R^{b41}$ 、 $C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $C(O)OR^{a41}$ 、 $OC(O)R^{b41}$ 、 $OC(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)R^{b41}$ 、 $NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(O)OR^{a41}$ 、 $C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)R^{b41}$ 、 $S(O)NR^{c41}R^{d41}$ 、 $S(O)_2R^{b41}$ 、 $NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$ 、 $S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{a41} 、 R^{b41} 、 R^{c41} 、および R^{d41} は、それぞれ独立して、H、 $C_1\sim_6$ アルキル、 $C_2\sim_6$ アルケニル、 $C_2\sim_6$ アルキニル、 $C_6\sim_{10}$ アリール、 $C_3\sim_7$ シクロアルキル、 $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリール、 $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキル、 $C_6\sim_{10}$ アリール- $C_1\sim_3$ アルキル、 $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリール- $C_1\sim_3$ アルキル、 $C_3\sim_7$ シクロアルキル- $C_1\sim_3$ アルキル、および $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim_3$ アルキルより選択され、 R^{a41} 、 R^{b41} 、 R^{c41} 、および R^{d41} を形成する前記 $C_1\sim_6$ アルキル、 $C_2\sim_6$ アルケニル、 $C_2\sim_6$ アルキニル、 $C_6\sim_{10}$ アリール、 $C_3\sim_7$ シクロアルキル、 $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリール、 $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキル、 $C_6\sim_{10}$ アリール- $C_1\sim_3$ アルキル、 $5\sim_{10}$ 員環ヘテロアリール- $C_1\sim_3$ アルキル、 $C_3\sim_7$ シクロアルキル- $C_1\sim_3$ アルキル、および $4\sim_{10}$ 員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim_3$ アルキルはそれぞれが、独立して、 $C_1\sim_6$ アルキル、ハロ、CN、 OR^{a42} 、 SR^{a42} 、 $C(O)R^{b42}$ 、 $C(O)NR^{c42}R^{d42}$ 、 $C(O)OR^{a42}$ 、 $OC(O)R^{b42}$ 、 $OC(O)NR^{c42}R^{d42}$ 、 $NR^{c42}R^{d42}$ 、 $NR^{c42}C(O)R^{b42}$ 、 $NR^{c42}C(O)NR^{c42}R^{d42}$ 、 $NR^{c42}C(O)OR^{a42}$ 、 $C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$ 、 $NR^{c42}C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$ 、 $S(O)R^{b42}$ 、 $S(O)NR^{c42}R^{d42}$ 、 $S(O)_2R^{b42}$ 、 $NR^{c42}S(O)_2R^{b42}$ 、 $S(O)_2NR^{c42}R^{d42}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、3個、4個、または5個の置換基で置換されていてもよく、

あるいは、同じN原子に結合している R^{c41} および R^{d41} は、それら両方が結合しているN原子と一緒にあって、4員環、5員環、6員環、または7員環ヘテロシクロアルキル基または5員環ヘテロアリール基を形成し、それぞれが、独立して $C_1\sim_6$ アルキル、ハロ、CN、 OR^{a42} 、 SR^{a42} 、 $C(O)R^{b42}$ 、 $C(O)NR^{c42}R^{d42}$ 、 $C(O)OR^{a42}$ 、 $OC(O)R^{b42}$ 、 $OC(O)NR^{c42}$

10

20

30

40

50

R^{d42} 、 $NR^{c42}R^{d42}$ 、 $NR^{c42}C(O)R^{b42}$ 、 $NR^{c42}C(O)NR^{c42}R^{d42}$ 、 $NR^{c42}C(O)OR^{a42}$ 、 $C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$ 、 $NR^{c42}C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$ 、 $S(O)R^{b42}$ 、 $S(O)NR^{c42}R^{d42}$ 、 $S(O)_2R^{b42}$ 、 $NR^{c42}S(O)_2R^{b42}$ 、 $S(O)_2NR^{c42}R^{d42}$ 、およびオキソより選択される1個、2個、または3個の置換基で置換されていてもよく、

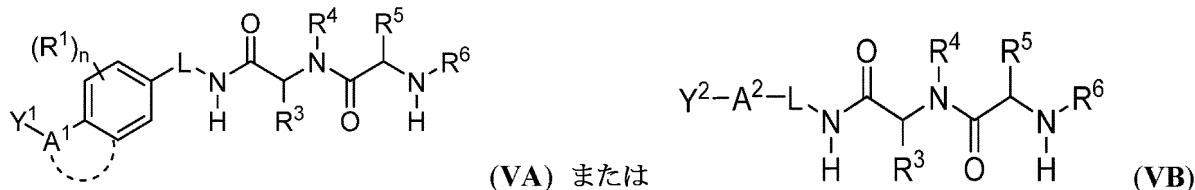
R^{a42} 、 R^{b42} 、 R^{c42} 、および R^{d42} は、それぞれ独立して、H、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、フェニル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、5~6員環ヘテロアリール、4~7員環ヘテロシクロアルキル、フェニル- $C_1\sim 3$ アルキル、5~6員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および4~7員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルより選択され、 R^{a42} 、 R^{b42} 、 R^{c42} 、および R^{d42} を形成する、前記 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_2\sim 6$ アルケニル、 $C_2\sim 6$ アルキニル、フェニル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル、5~6員環ヘテロアリール、4~7員環ヘテロシクロアルキル、フェニル- $C_1\sim 3$ アルキル、5~6員環ヘテロアリール- $C_1\sim 3$ アルキル、 $C_3\sim 7$ シクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキル、および4~7員環ヘテロシクロアルキル- $C_1\sim 3$ アルキルはそれぞれが、独立して、OH、CN、アミノ、 $NH(C_1\sim 6$ アルキル)、 $N(C_1\sim 6$ アルキル) $_2$ 、ハロ、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ アルコキシ、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルコキシ、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換されていてもよく、

あるいは、同じN原子に結合している R^{c42} および R^{d42} は、それら両方が結合しているN原子と一緒にあって、4員環、5員環、6員環、または7員環ヘテロシクロアルキル基または5員環ヘテロアリール基を形成し、これらのそれぞれが非置換であるか、またはOH、CN、アミノ、 $NH(C_1\sim 6$ アルキル)、 $N(C_1\sim 6$ アルキル) $_2$ 、ハロ、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_1\sim 6$ アルコキシ、 $C_1\sim 6$ ハロアルキル、 $C_1\sim 6$ ハロアルコキシ、およびオキソより選択される1個、2個、もしくは3個の置換基で置換され、

R^{e41} および R^{e42} はそれぞれが独立して、H、CN、または NO_2 である。

【0150】

一部の態様において、前記低分子は、式(VA)または(VB)



の化合物、その立体異性体、互変異性体、または薬学的に許容される塩であり、式中、

A^1 は、 $-(C=NH)-$ 、 $-(C=NOR^a)-$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]-$ 、 $-[C=N[O(C=O)ZR^b]]-$ 、縮合5員環または6員環ヘテロシクリル、および縮合5員環または6員環ヘテロアリールからなる群より選択されるメンバーであり、

A^1 が $-(C=NH)-$ である場合に、 Y^1 は、 $-NH_2$ 、 $-NH(C=O)R^a$ 、および $-NH(C=O)ZR^b$ からなる群より選択され、

A^1 が $-(C=NOR^a)-$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]-$ 、または $-[C=N[O(C=O)ZR^b]]-$ である場合に、 Y^1 は $-NH_2$ であり、

A^1 が縮合ヘテロシクリルまたはヘテロアリールである場合に、 Y^1 は $-NH_2$ またはハロであり、 A^1 はm個のさらなる R^1 基で置換され、

それぞれの R^a および R^b は、独立して、 $C_1\sim 6$ アルキル、 $C_3\sim 10$ シクロアルキル、 $C_6\sim 10$ アリール、および $C_7\sim 12$ アリールアルキルからなる群より選択され、 R^a は、 $C_1\sim 6$ アルキル、ヒドロキシル、ヒドロキシル($C_1\sim 6$ アルキル)、 $C_1\sim 6$ アルコキシ、 $C_2\sim 9$ アルコシアルキル、アミノ、 $C_1\sim 6$ アルキルアミノ、およびハロからなる群より選択されるm個の置換基を有するか、あるいは、その代わりに、 R^a および R^b は結合してヘテロシクリル環を形成し、m個の置換基は、 $C_1\sim 6$ アルキル、ヒドロキシル、 $C_1\sim 6$ アルコキシ、およびハロからなる群より選択され、

それぞれのZは、独立して、OおよびSからなる群より選択され、

A^2 は、 $C_3 \sim C_6$ ヘテロアリール、 C_6 アリール、および $C_2 \sim C_6$ アルキルからなる群より選択されるメンバーであり、

A^2 が $C_3 \sim C_6$ ヘテロアリールである場合に、 Y^2 は、 $-NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、クロロ、 $-(C=NH)NH_2$ 、 $-(C=NH)NH(C=O)R^a$ 、 $-(C=NH)NH(C=O)ZR^b$ 、 $-(C=NOR^a)NH_2$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]NH_2$ 、および $\{C=N[O(C=O)ZR^b]\}NH_2$ からなる群より選択され、 A^2 はm個のさらなる R^1 基で置換され、

A^2 が C_6 アリールである場合に、 Y^2 はアミノメチル、ヒドロキシ、およびハロからなる群より選択され、 A^2 はm個のさらなる R^1 基で置換され、

A^2 が $C_2 \sim C_6$ アルキルである場合に、 Y^2 は、 $-NH(C=NH)NH_2$ 、 $-NH(C=NH)NH(C=O)R^a$ 、および $-NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b$ からなる群より選択され、

それぞれの R^1 は、独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、およびハロからなる群より選択されるメンバーであり、

それぞれのmおよびnは、0～3から独立して選択される整数であり、

Lは、 $-(O)_p-(C(R^{2a})(R^{2b}))_q-$ であり、

それぞれの R^{2a} または R^{2b} は、独立して水素およびフルオロからなる群より選択されるメンバーであり、

pは、0～1の整数であり、

qは、1～2の整数であり、

R^3 は、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_1 \sim C_6$ フルオロアルキル、およびカルボキシ($C_1 \sim C_6$ アルキル)からなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、 R^3 および R^4 は結合してアゼチジン、ピロリジン、またはピペリジン環を形成し、

R^4 は、水素および $C_1 \sim C_6$ アルキルからなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、 R^4 および R^3 は結合して、アゼチジン、ピロリジン、またはピペリジン環を形成し、

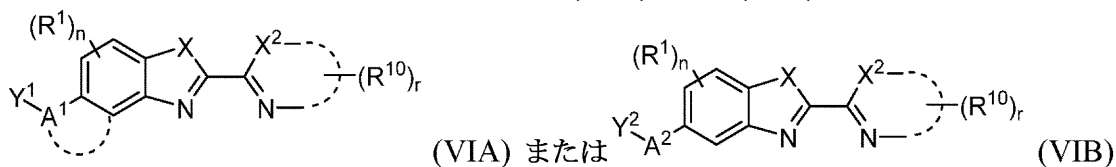
R^5 は、 $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、 $C_4 \sim C_8$ シクロアルキルアルキル、ヘテロアリール、および $C_7 \sim C_{12}$ アリールアルキル、または0～3個の R^{13} 置換基があるヘテロアリールアルキルからなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、 R^5 および R^6 は結合して、0～3個の R^{13} 置換基がある複素環を形成し、

R^6 は、水素、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_7$ シクロアルキル、カルボキシ($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_7 \sim C_{12}$ アリールアルキル、または0～3個の R^{13} 置換基があるヘテロアリールアルキル、アミノ($C_1 \sim C_8$ アルキル);およびアミド($C_1 \sim C_8$ アルキル)からなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、 R^6 および R^5 は結合して、0～3個の R^{13} 置換基がある複素環を形成し、

それぞれの R^{13} は、独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、($C_6 \sim C_{10}$ アリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、カルボキシ($C_1 \sim C_6$ アルキルオキシ)、ヘテロアリール、($C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール) $C_1 \sim C_6$ アルキル、ヘテロシクリル、ヒドロキシル、ヒドロキシル($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_2 \sim C_9$ アルコキシアルキル、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アミド、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、およびハロからなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、2個の R^{13} 基は結合して縮合 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、または $C_5 \sim C_7$ シクロアルキル環を形成する。

【0151】

一部の態様において、前記低分子は、式(VIA)または(VIB)



の化合物、その立体異性体、互変異性体、または薬学的に許容される塩であり、

式中、

A^1 は、 $-(C=NH)-$ 、 $-(C=NOR^a)-$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]-$ 、 $-[C=N[O(C=O)ZR^b]-$ 、縮合5員環または6員環ヘテロシクリル、および縮合5員環または6員環ヘテロアリールからなる群より選択されるメンバーであり、

A^1 が $-(C=NH)-$ である場合に、 Y^1 は、 $-NH_2$ 、 $-NH(C=O)R^a$ 、および $-NH(C=O)ZR^b$ からなる群より選択され、

A^1 が $-(C=NOR^a)-$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]-$ 、または $-[C=N[O(C=O)ZR^b]-$ である場合に、 Y^1 は $-NH_2$ であり、

A^1 が縮合ヘテロシクリルまたはヘテロアリールである場合に、 Y^1 は $-NH_2$ またはハロであり、 A^1 は、 m 個のさらなる R^1 基で置換され、

それぞれの R^a および R^b は、独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_3 \sim C_{10}$ シクロアルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、および $C_7 \sim C_{12}$ アリールアルキルからなる群より選択され、 R^a は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、ヒドロキシル($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_2 \sim C_9$ アルコキシアルキル、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、およびハロからなる群より選択される m 個の置換基を有するか、あるいは、その代わりに、 R^a および R^b は結合してヘテロシクリル環を形成し、 m 個の置換基は、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、およびハロからなる群より選択され、

それぞれの Z は、独立して、 O および S からなる群より選択され、

A^2 は、 $C_3 \sim C_6$ ヘテロアリールおよび $C_2 \sim C_6$ アルキルからなる群より選択されるメンバーであり、

A^2 が $C_3 \sim C_6$ ヘテロアリールである場合に、 Y^2 は、 $-NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、クロロ、 $-(C=NH)NH_2$ 、 $-(C=NH)NH(C=O)R^a$ 、 $-(C=NH)NH(C=O)ZR^b$ 、 $-(C=NOR^a)NH_2$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]NH_2$ 、および $-[C=N[O(C=O)ZR^b]]NH_2$ からなる群より選択され、 A^2 は、 m 個のさらなる R^1 基で置換され、

A^2 が $C_2 \sim C_6$ アルキルである場合に、 Y^2 は、 $-NH(C=NH)NH_2$ 、 $-NH(C=NH)NH(C=O)R^a$ 、および $-NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b$ からなる群より選択され、

それぞれの R^1 は、独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、およびハロからなる群より選択されるメンバーであり、

それぞれの m および n は、独立して $0 \sim 3$ より選択される整数であり、

X および X^2 はそれぞれが、 NR^8 、 CH 、および CR^{10} からなる群より選択されるメンバーであり、

それぞれの R^8 は、独立して、水素および $C_1 \sim C_6$ アルキルからなる群より選択されるメンバーであり、

それぞれの R^{10} は、独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $0 \sim 3$ 個の R^{13} 置換基があるヘテロアリールまたは $C_6 \sim C_{10}$ アリール、ヒドロキシル、ヒドロキシル($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_2 \sim C_9$ アルコキシアルキル、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、およびハロからなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、2つの R^{10} 基は結合して、縮合 C_6 アリール、ヘテロアリール、または $0 \sim 3$ 個の R^{13} 置換基がある $C_5 \sim C_7$ シクロアルキル環を形成し、

r は、 $0 \sim 4$ の整数であり、

それぞれの R^{13} は、独立して、 $C_1 \sim C_6$ アルキル、 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、カルボキシ($C_1 \sim C_6$ アルキルオキシ)、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、ヒドロキシル、ヒドロキシル($C_1 \sim C_6$ アルキル)、 $C_1 \sim C_6$ アルコキシ、 $C_2 \sim C_9$ アルコキシアルキル、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ アミド、 $C_1 \sim C_6$ アルキルアミノ、およびハロからなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、2個の R^{13} 基は結合して、縮合 $C_6 \sim C_{10}$ アリール、 $C_6 \sim C_{10}$ ヘテロアリール、または $C_5 \sim C_7$ シクロアルキル環を形成する。

【0152】

ある特定の態様において、前記低分子は、式(VIIA)または(VIIB)

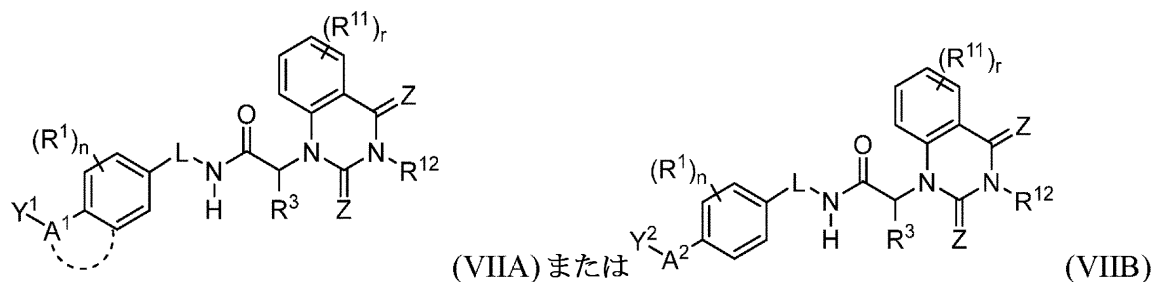
10

20

30

40

50



の化合物、その立体異性体、互変異性体、または薬学的に許容される塩であり、
式中、

A^1 は、 $-(C=NH)-$ 、 $-(C=NOR^a)-$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]-$ 、 $-[C=N[O(C=O)ZR^b]]-$ 、縮合5員環または6員環ヘテロシクリル、および縮合5員環または6員環ヘテロアリールからなる群より選択されるメンバーであり、

A^1 が $-(C=NH)-$ である場合に、 Y^1 は、 $-NH_2$ 、 $-NH(C=O)R^a$ 、および $-NH(C=O)ZR^b$ からなる群より選択され、

A^1 が $-(C=NOR^a)-$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]-$ 、または $-[C=N[O(C=O)ZR^b]]-$ である場合に、 Y^1 は $-NH_2$ であり、

A^1 が縮合ヘテロシクリルまたはヘテロアリールである場合に、 Y^1 は $-NH_2$ またはハ口であり、 A^1 は、 m 個のさらなる R^1 基で置換され、

それぞれの R^a および R^b は、独立して、 $C_1\sim C_6$ アルキル、 $C_3\sim C_{10}$ シクロアルキル、 $C_6\sim C_{10}$ アリール、および $C_7\sim C_{12}$ アリールアルキルからなる群より選択され、 R^a は、 $C_1\sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、ヒドロキシル($C_1\sim C_6$ アルキル)、 $C_1\sim C_6$ アルコキシ、 $C_2\sim C_9$ アルコシアルキル、アミノ、 $C_1\sim C_6$ アルキルアミノ、およびハ口からなる群より選択される m 個の置換基を有するか、あるいは、その代わりに、 R^a および R^b は結合してヘテロシクリル環を形成し、 m 個の置換基は、 $C_1\sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、 $C_1\sim C_6$ アルコキシ、およびハ口からなる群より選択され、

それぞれの Z は、独立して、 O および S からなる群より選択され、

A^2 は、 $C_3\sim C_6$ ヘテロアリールおよび $C_2\sim C_6$ アルキルからなる群より選択されるメンバーであり、

A^2 が $C_3\sim C_6$ ヘテロアリールである場合に、 Y^2 は、 $-NH_2$ 、 $-CH_2NH_2$ 、クロロ、 $-(C=NH)NH_2$ 、 $-(C=NH)NH(C=O)R^a$ 、 $-(C=NH)NH(C=O)ZR^b$ 、 $-(C=NOR^a)NH_2$ 、 $-[C=NO(C=O)R^a]NH_2$ 、および $-[C=N[O(C=O)ZR^b]]NH_2$ からなる群より選択され、 A^2 は、 m 個のさらなる R^1 基で置換され、

A^2 が $C_2\sim C_6$ アルキルである場合に、 Y^2 は、 $-NH(C=NH)NH_2$ 、 $-NH(C=NH)NH(C=O)R^a$ 、および $-NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b$ からなる群より選択され、

それぞれの R^1 は、独立して、 $C_1\sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、 $C_1\sim C_6$ アルコキシ、アミノ、 $C_1\sim C_6$ アルキルアミノ、およびハ口からなる群より選択されるメンバーであり、

それぞれの m および n は、独立して $0\sim 3$ より選択される整数であり、

L は、 $-(O)_p-(C(R^{2a})(R^{2b}))_q-$ であり、

それぞれの R^{2a} または R^{2b} は、独立して水素およびフルオロからなる群より選択されるメンバーであり、

p は、 $0\sim 1$ の整数であり、

q は、 $1\sim 2$ の整数であり、

R^3 は、水素、 $C_1\sim C_6$ アルキル、およびカルボキシ($C_1\sim C_6$ アルキル)からなる群より選択されるメンバーであり、

それぞれの R^{11} は、独立して、 $C_1\sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、 $C_1\sim C_6$ アルコキシ、アミノ、 $C_1\sim C_6$ アルキルアミノ、ハ口、および $(R^{14})(R^{14})N(CO)-$ からなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、2つの R^{11} 基は結合して、縮合 C_6 アリール、ヘテロアリール、または $0\sim 3$ 個の R^{13} 置換基がある $C_5\sim C_7$ シクロアルキル環を形

成し、

r は、0～4の整数であり、

それぞれの Z は、独立して、0および NR^8 からなる群より選択されるメンバーであり、

それぞれの R^8 は、独立して、水素および $C_1\sim C_6$ アルキルからなる群より選択されるメンバーであり、

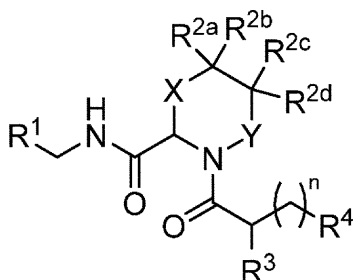
それぞれの R^{12} は、独立して、水素、 $C_1\sim C_6$ アルキル、および0～3個の R^{13} 置換基がある $C_7\sim C_{14}$ アリールアルキルからなる群より選択されるメンバーであり、

それぞれの R^{13} は、独立して、 $C_1\sim C_6$ アルキル、ヒドロキシル、ヒドロキシル($C_1\sim C_6$ アルキル)、 $C_1\sim C_6$ アルコキシ、 $C_2\sim C_9$ アルコキシアルキル、アミノ、 $C_1\sim C_6$ アルキルアミノ、およびハロからなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、2個の R^{13} 基は結合して、縮合 C_6 アリール、ヘテロアリール、または $C_5\sim C_7$ シクロアルキル環を形成し、

それぞれの R^{14} は、独立して、水素、 $C_1\sim C_6$ アルキル、 $C_3\sim C_7$ シクロアルキル、 $C_4\sim C_8$ シクロアルキルアルキル、 $C_7\sim C_{14}$ アリールアルキル、およびヘテロアリール($C_1\sim C_6$ アルキル)からなる群より選択されるメンバーであるか、あるいは、その代わりに、2個の R^{13} 基は結合して縮合ヘテロシクリル環を形成する。

【0153】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^1 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、および R^{2d} は、独立して、水素、ハロ、 $C(=O)OR^5$ 、 $OC(=O)R^5$ 、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、アミノアルキル、カルボキシアルキル、 NR^5R^6 、 $C(=O)NR^5R^6$ 、 $N(R^5)C(=O)R^6$ 、 $NR^5C(=O)NR^6$ 、 $S(O)_t$ 、 SR^5 、ニトロ、 $N(R^5)C(O)OR^6$ 、 $C(=NR^5)NR^6R^7$ 、 $N(R^5)C(=NR^6)NR^7R^8$ 、 $S(O)R^5$ 、 $S(O)NR^5R^6$ 、 $S(O)_2R^5$ 、 $N(R^5)S(O)_2R^6$ 、 $S(O)_2NR^5R^6$ 、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、およびオキソからなる群より選択され、但し、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、または R^{2d} の少なくとも1つの出現は水素でなく、

R^3 は、 $NR^{3a}R^{3b}$ であり、

R^{3a} および R^{3b} は、それぞれ独立して、水素、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルコキシアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリールアルキル、シクロアルキル、 $(CH_2)_nC(=O)OR^6$ 、または $(CH_2)_nP(=O)(OR^6)_2$ であり、

あるいは、 R^{3a} および R^{3b} は、それらが結合している窒素と一緒に、置換されていてもよい4～7員環ヘテロアリールまたは置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

あるいは、 R^{3a} および R^4 は、それぞれ、それらが結合している窒素および炭素と一緒に、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^4 は、 n が2、3、4、5、または6である場合に、置換もしくは非置換アリール、置換も

しくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであるか、あるいは、

R^4 は、 n が0または1である場合に、置換もしくは非置換の単環式ヘテロアリールまたは置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^5 、 R^6 、 R^7 、および R^8 は、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、またはシクロアルキルであり、

X は、直接結合、 $-CR^{2e}R^{2f}-$ 、または $-CR^{2e}R^{2f}-CR^{2g}R^{2h}-$ であり、

Y は、直接結合または $-CR^{2i}R^{2j}-$ であり、

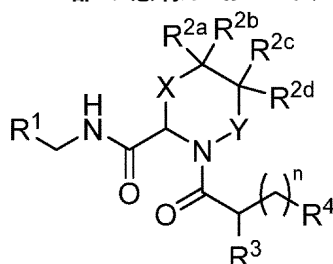
n は、0～6の整数であり、

t は、1～3である。

10

【0154】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



20

を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^1 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} は、独立して、水素、ハロ、 OR^5 、 $C(=O)OR^5$ 、 $OC(=O)R^5$ 、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、アミノアルキル、カルボキシアルキル、 NR^5R^6 、 $C(=O)NR^5R^6$ 、 $N(R^5)C(=O)R^6$ 、 $NR^5C(=O)NR^6$ 、 $S(O)_t$ 、 SR^5 、ニトロ、 $N(R^5)C(O)OR^6$ 、 $C(=NR^5)NR^6R^7$ 、 $N(R^5)C(=NR^6)NR^7R^8$ 、 $S(O)R^5$ 、 $S(O)NR^5R^6$ 、 $S(O)_2R^5$ 、 $N(R^5)S(O)_2R^6$ 、 $S(O)_2NR^5R^6$ 、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、およびオキソからなる群より選択され、但し、 R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} の少なくとも1つの出現は水素でなく、

30

R^3 は、 $NR^{3a}R^{3b}$ であり、

R^{3a} および R^{3b} は、それぞれ独立して、水素、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルコキシアルキル、 $-CH_2C(=O)OH$ 、 $-CH_2C(=O)O$ アルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリールアルキル、またはシクロアルキルであるか、

あるいは、 R^{3a} および R^{3b} は、それらが結合している窒素と一緒に、置換されていてもよい4～7員環ヘテロアリールまたは置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

40

R^4 は、 n が2、3、4、5、または6である場合に、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであるか、あるいは

R^4 は、 n が0または1である場合に、置換もしくは非置換の単環式ヘテロアリールまたは置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^5 、 R^6 、 R^7 、および R^8 は、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、またはシクロアルキルであり、

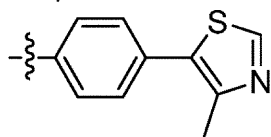
X は、直接結合、 $-[C(R^{2e})R^{2f}]$ 、または $-[C(R^{2e})R^{2f}]-[C(R^{2g})R^{2h}]$ であり、

50

Yは、直接結合または $-[C(R^{2i})R^{2j}]$ -であり、
 nは、0～6の整数であり、
 tは、1～3であり、

但し、

a) R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} の1つの出現がOHである場合に、 R^1 は、以下の構造:

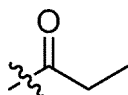


10

を有さず、

b) R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} の1つの出現が-OHである場合に、nは2～6の整数であり、

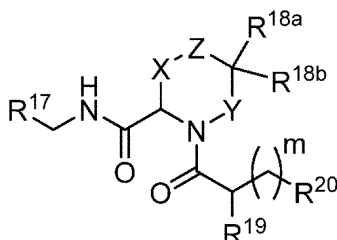
c) R^{2a} 、 R^{2b} 、 R^{2c} 、 R^{2d} の1つの出現が非置換フェニルである場合に、 R^{3a} も R^{3b} も、以下の構造:



を有さない。

【0155】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



20

を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^{17} は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{18a} 、 R^{18b} は、独立して、水素、ハロ、 $-OR^{21}$ 、 $C(=O)OR^{21}$ 、 $OC(=O)R^{21}$ 、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、アミノアルキル、カルボキシアルキル、 $NR^{21}R^{22}$ 、 $C(=O)NR^{21}R^{22}$ 、 $N(R^{21})C(=O)R^{22}$ 、 $NR^{21}C(=O)NR^{22}$ 、 $S(O)_t$ 、 SR^{21} 、ニトロ、 $N(R^{21})C(O)OR^{22}$ 、 $C(=NR^{21})NR^{22}R^{23}$ 、 $N(R^{21})C(=NR^{22})NR^{23}R^{24}$ 、 $S(O)R^{21}$ 、 $S(O)NR^{21}R^{22}$ 、 $S(O)_2R^{21}$ 、 $N(R^{21})S(O)_2R^{22}$ 、 $S(O)_2NR^{21}R^{22}$ 、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、およびオキソからなる群より選択され、但し、 R^{18a} 、 R^{18b} の少なくとも1つの出現は水素でなく、

R^{19} は、 $NR^{19a}R^{19b}$ であり、

R^{19a} および R^{19b} は、それぞれが独立して、水素、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルコキシアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリールアルキル、シクロアルキル、 $(CH_2)_nC(=O)OR^5$ 、または $(CH_2)_nP(=O)(OR^5)_2$ であるか、

あるいは、 R^{19a} および R^{19b} は、それらが結合している窒素と一緒に、置換されていてもよい4～7員環ヘテロアリールまたは置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^{20} は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もし

30

40

50

くは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{21} 、 R^{22} 、 R^{23} 、および R^{24} は、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、またはシクロアルキルであり、

Xは、直接結合、 $-CR^{2e}R^{2f}-$ 、または $-CR^{2e}R^{2f}-CR^{2g}R^{2h}-$ であり、

Yは、直接結合または $-CR^{2i}R^{2j}-$ であり、

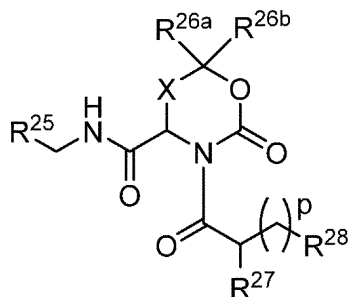
Zは、OまたはSであり、

mは、0～6の整数であり、

tは、1～3である。

【0156】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^{25} は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{26a} 、 R^{26b} は、独立して、水素、ハロ、 $-OR^{29}$ 、 $C(=O)OR^{29}$ 、 $OC(=O)R^{29}$ 、ヒドロキシアルキル、アルコキシ、アルコキシアルキル、ハロアルコキシ、シアノ、アミノアルキル、カルボキシアルキル、 $NR^{29}R^{30}$ 、 $C(=O)NR^{29}R^{30}$ 、 $N(R^{29})C(=O)R^{30}$ 、 $NR^{29}C(=O)NR^{30}$ 、 $S(O)_t$ 、 SR^{29} 、ニトロ、 $N(R^{29})C(O)OR^{30}$ 、 $C(=NR^{29})NR^{30}R^{31}$ 、 $N(R^{29})C(=NR^{30})NR^{31}R^{32}$ 、 $S(O)R^{29}$ 、 $S(O)NR^{29}R^{30}$ 、 $S(O)_2R^{30}$ 、 $N(R^{29})S(O)_2R^{30}$ 、 $S(O)_2NR^{29}R^{30}$ 、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクリル、シクロアルキル、およびオキソからなる群より選択され、但し、 R^{26a} 、 R^{26b} の少なくとも1つの出現は水素でなく、

R^{27} は、 $NR^{27a}R^{27b}$ であり、

R^{27a} および R^{27b} は、それぞれ独立して、水素、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルコキシアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、ヘテロシクリルアルキル、ヘテロアリールアルキル、シクロアルキル、 $(CH_2)_nC(=O)OR^{29}$ 、または $(CH_2)_nP(=O)(OR^{29})_2$ であるか、

あるいは、 R^{27a} および R^{27b} は、それらが結合している窒素と一緒に、置換されていてもよい4～7員環ヘテロアリールまたは置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^{28} は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{29} 、 R^{30} 、 R^{31} 、および R^{32} は、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルキル、アルコキシアルキル、カルボキシアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール、またはシクロアルキルであり、

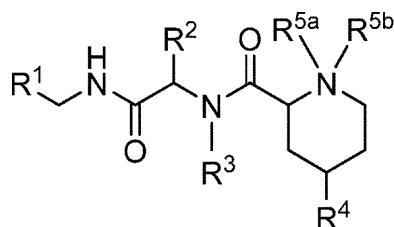
Xは、直接結合または $-CR^{26c}R^{26d}-$ であり、

pは、0～6の整数であり、

tは、1～3である。

【0157】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^1 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^2 は、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R^3 は、水素、アルキル、ハロアルキル、またはシクロアルキルであるか、

あるいは、 R^2 および R^3 は、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒にあって、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^4 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{5a} は、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、 $(CH_2)_n C(=O)OR^6$ 、 $C(=O)R^6$ 、 $C(=O)OR^6$ 、または $C(=O)NR^6R^7$ であり、

R^{5b} は、電子対またはアルキルであり、

R^6 および R^7 は、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルであり、

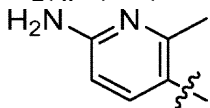
R^8 は、アルキル、ハロアルキル、アミノアルキル、置換または非置換アリールアルキルであり、

n は、1、2、3、4、5、6、7、または8であり、

但し、

A) R^{5a} は、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、 $(CH_2)_n C(=O)OR^6$ 、 $C(=O)R^6$ 、 $C(=O)OR^6$ 、または $C(=O)NR^6R^7$ であるか、あるいは、 R^1 は、置換ヘテロアリール、 $C(=NH)NHC(=O)OR^8$ 、 $C(=NOC(=O)R^8)NH_2$ 、 $C(=NOC(=O)OR^8)NH_2$ 、および $C(=NOH)NH_2$ からなる群より選択される1つまたは複数の置換基で置換され、

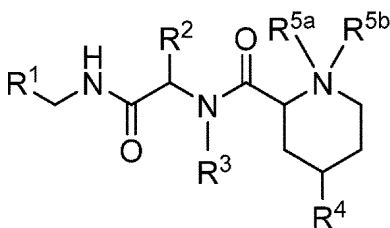
B) R^2 および R^3 が、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒にあって、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成しなければ、 R^{5a} がアルキルまたは $(CH_2)_n C(=O)OR^6$ である場合に、 R^1 は、以下の構造:



を有さない。

【0158】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩で

あり、

式中、

R^1 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^2 は、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R^3 は、水素、アルキル、ハロアルキル、またはシクロアルキルであるか、

あるいは、 R^2 および R^3 は、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒にあって、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^4 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{5a} は、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、 $(CH_2)_n C(=O)OR^6$ 、 $C(=O)R^6$ 、 $C(=O)OR^6$ 、または $C(=O)NR^6R^7$ であり、

R^{5b} は、電子対またはアルキルであり、

R^6 および R^7 は、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルであり、

R^8 は、アルキル、ハロアルキル、アミノアルキル、置換もしくは非置換アリールアルキルであり、

n は、1、2、3、4、5、6、7、または8であり、

但し、

A) R^{5a} は、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、 $(CH_2)_n C(=O)OR^6$ 、 $C(=O)R^6$ 、 $C(=O)OR^6$ 、または $C(=O)NR^6R^7$ であるか、あるいは R^1 は、置換ヘテロアリール、 $C(=NH)NHC(=O)OR^8$ 、 $C(=NOC(=O)R^8)NH_2$ 、 $C(=NOC(=O)OR^8)NH_2$ 、および $C(=NOH)NH_2$ からなる群より選択される1つまたは複数の置換基で置換され、

B) 前記化合物は、以下の構造:

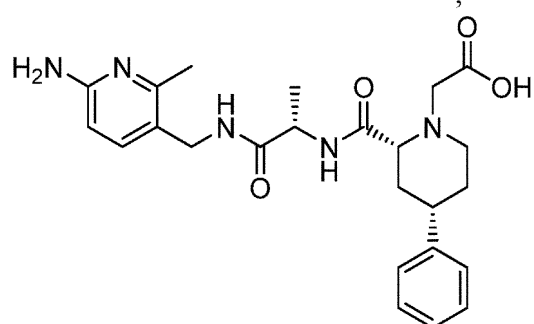
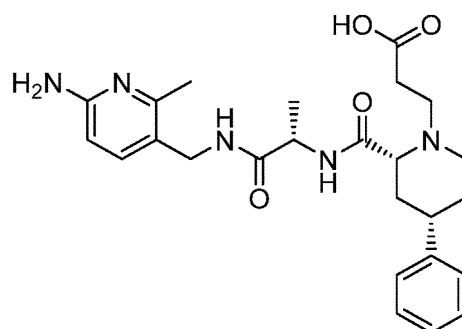
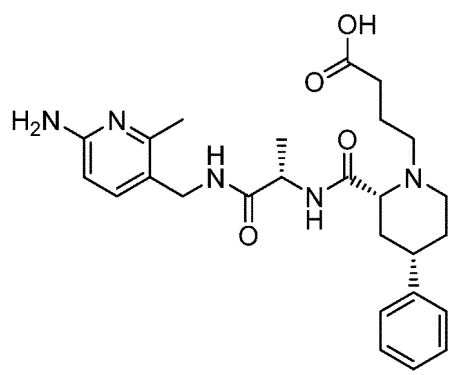
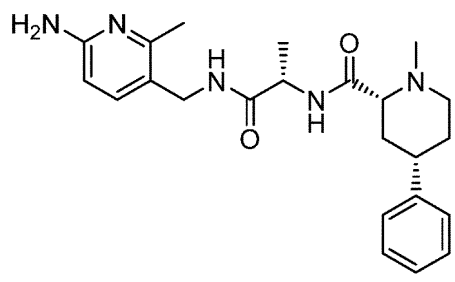
10

20

30

40

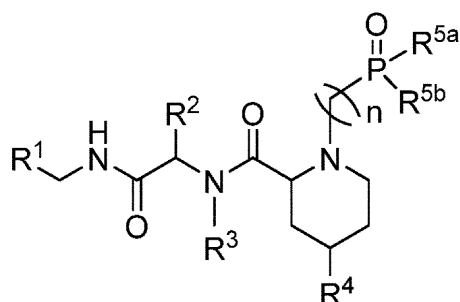
50



または

【 0 1 5 9 】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^1 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

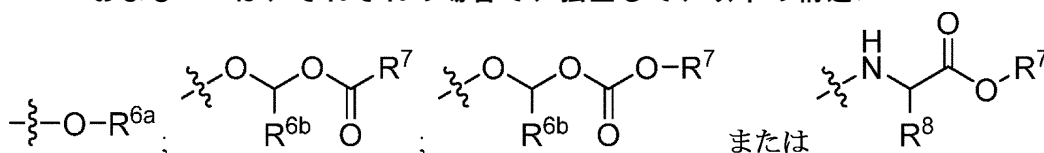
R^2 は、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R^3 は、水素、アルキル、ハロアルキル、またはシクロアルキルであるか、

あるいは、 R^2 および R^3 は、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒にあって、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^4 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^{5a} および R^{5b} は、それぞれの場合で、独立して、以下の構造:



のうちの1つを有するか、

あるいは、 R^{5a} および R^{5b} は、それらが結合しているリン原子と一緒にあって、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^{6a} は、アルキル、ハロアルキル、アリール、ヘテロアリール、シクロアルキル、またはヘテロシクリルであり、

R^{6b} は、それぞれの場合で、独立して、水素またはアルキルであり、

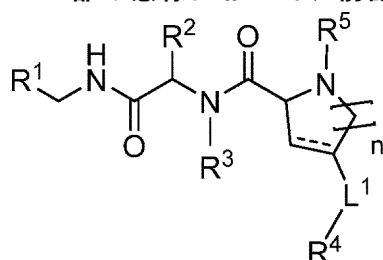
R^7 は、それぞれの場合で、独立して、アルキル、ハロアルキル、ヘテロアリール、シクロアルキル、ヘテロシクリル、アリールアルキル、ヘテロアリールアルキル、シクロアルキルアルキル、またはヘテロシクリルアルキルであり、

R^8 は、アミノ酸側鎖であり、

n は、1、2、3、4、5、6、7、または8である。

【0160】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

は、二重結合または単結合を表し、

R^1 は、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R^2 は、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R^3 は、水素、アルキル、ハロアルキル、もしくはシクロアルキルであるか、または R^2 および R^3 は、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒にあって、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^4 は、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^5 は、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、 $(CH_2)_mC(=O)OR^6$ 、 $C(=O)R^6$ 、 $C(=O)OR^6$ 、 $(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$ 、または $C(=O)NR^6R^7$ であり、

R^6 および R^7 は、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルであり、

L^1 は、直接結合、 $-CR^{8a}R^{8b}-$ 、 $-S(O)_t-$ 、 NR^{8c} 、または $-O-$ であり、

R^{8a} および R^{8b} はそれぞれ独立して、水素、アルキル、または R^{8a} および R^{8b} であり、それらが結合している炭素と一緒にあって、置換されていてもよい3～6員環シクロアルキルを形成する、

R^{8c} は、水素、アルキル、ハロアルキル、 $(C=O)$ アルキル、 $(C=O)O$ アルキル、 $(C=O)$ シクロアルキル、 $(C=O)O$ シクロアルキル、 $(C=O)$ アリール、 $(C=O)O$ アリール、 $(C=O)$ ヘテロアリール、 $(C=O)O$ ヘテロアリール、 $(C=O)$ ヘテロシクリル、 $(C=O)O$ ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルアルキルであり、

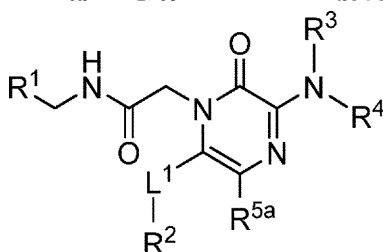
n は、1または2であり、

m は、1、2、3、4、5、または6であり、

t は、0、1、または2である。

【0161】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^1 は、置換または非置換ヘテロアリールであり、

R^2 は、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R^3 は、水素またはアルキルであり、

R^4 は、アルキル、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換フェニルまたは置換もしくは非置換ピリジニルからなる群より選択される置換基で置換されたヘテロシクリルであるか、あるいは R^3 および R^4 は、それぞれ、それらが結合している窒素および炭素と一緒にあって、置換されていてもよい4～10員環ヘテロシクリルを形成し、

R^{5a} は、水素またはハロであり、

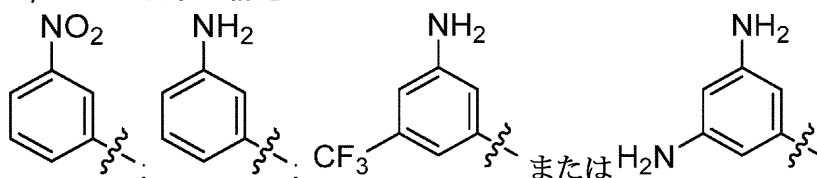
R^{5b} は、水素、アルキル、ハロアルキル、 $(C=O)$ アルキル、 $(C=O)O$ アルキル、 $(C=O)$ シクロアルキル、 $(C=O)O$ シクロアルキル、 $(C=O)$ アリール、 $(C=O)O$ アリール、 $(C=O)$ ヘテロアリール、 $(C=O)O$ ヘテロアリール、 $(C=O)$ ヘテロシクリル、 $(C=O)O$ ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルアルキルであり、

L^1 は、直接結合、 $-CH_2-$ 、 $-S(O)_t-$ 、 NR^{5b} 、 $-O-$ 、 $-C=C-$ 、または $-C\equiv C-$ であり、

t は、0、1、または2であり、

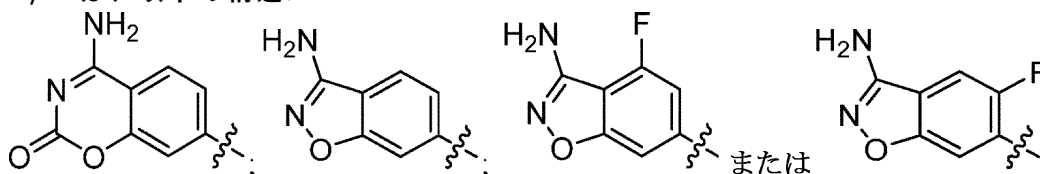
但し、

A) R^2 は、以下の構造:



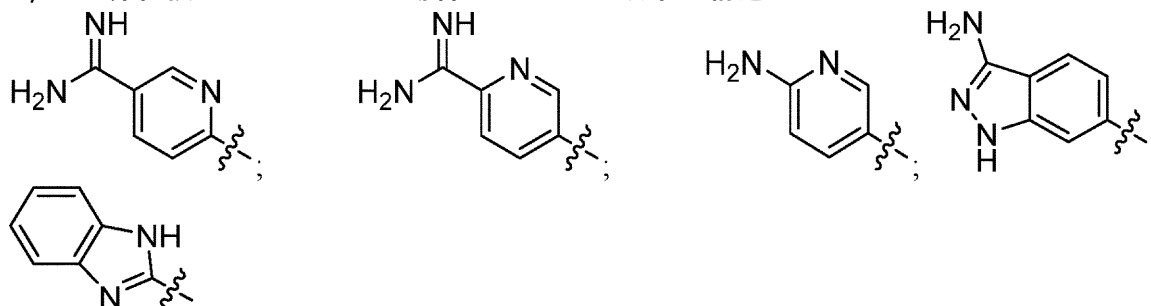
のうちの1つを有することはなく、

B) R^1 は、以下の構造:



のうちの1つを有することはなく、

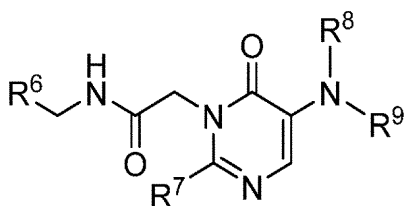
C) R^2 が非置換フェニルである場合に、 R^1 は、以下の構造:



のうちの1つを有することはない。

【0162】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

10

20

30

40

50

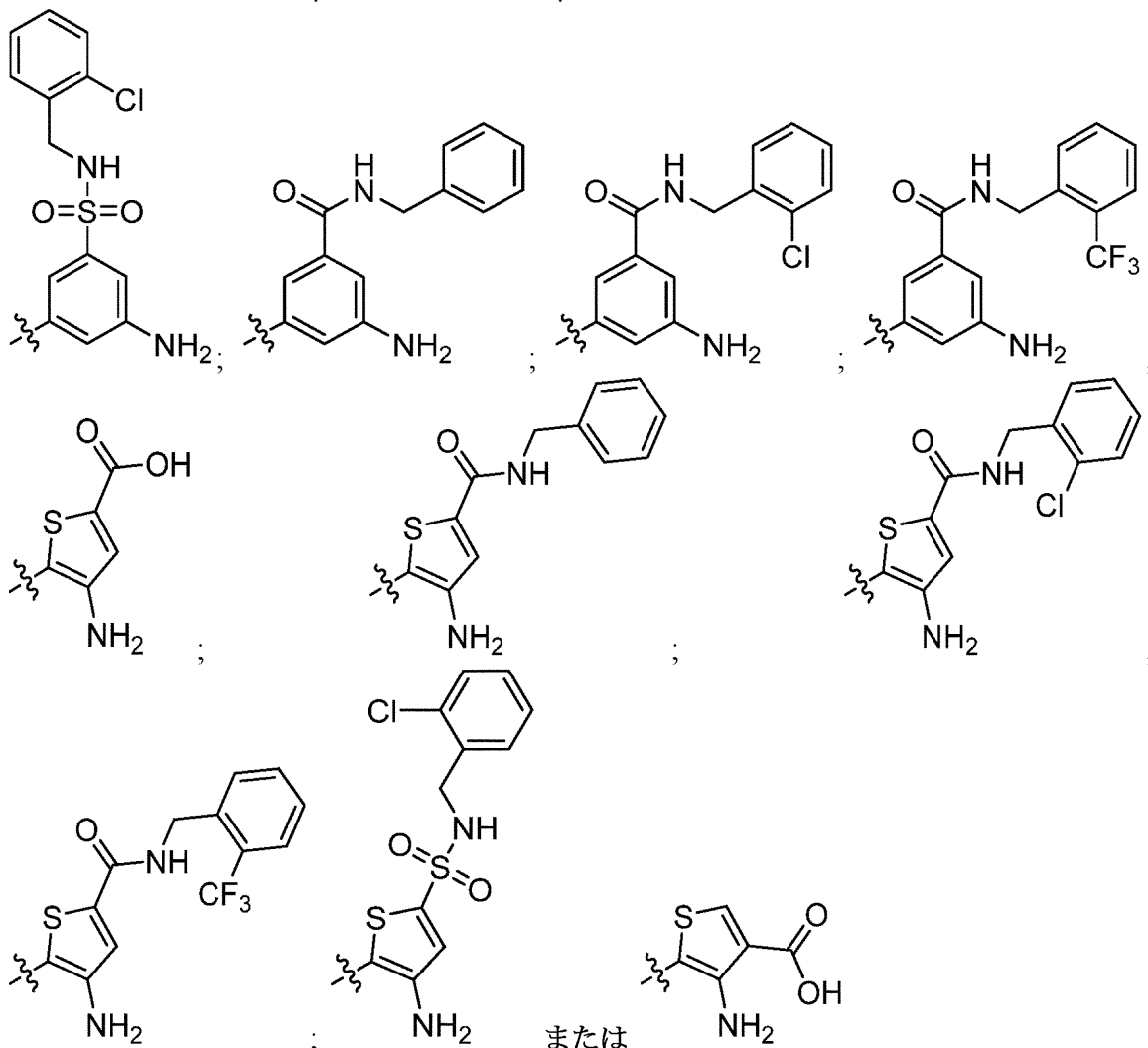
R^6 は、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、
 R^7 は、アルキル、 $-SR^{10}$ 、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R^8 は、水素、アルキル、ハロアルキル、またはシクロアルキルであり、

R^9 は、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキルであるか、あるいは R^8 および R^9 は、それらが結合している窒素と一緒に、置換されていてもよい4～10員環ヘテロシクリルを形成し、

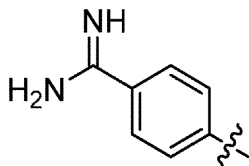
R^{10} は、水素、アルキル、ハロアルキル、またはシクロアルキルであり、
 但し、

A) R^7 が、非置換フェニル、3-((メチルスルホニル)アミノ)フェニル、2-メチルフェニル、3-(ジメチルアミノ)フェニル、3-(メチルアミノ)フェニル、3-メチルフェニル、3-アミノメチルフェニル、3-アミノフェニル、非置換ピリジニル、3-(メチルアミノ)-2-チエニル、3,4-ジアミノ-2-チエニル、3-((メチルスルホニル)アミノ)-2-チエニル、3-アミノ-2-チエニル、3-アミノ-5-5(アミノカルボニル)フェニルであるか、あるいは以下の構造:



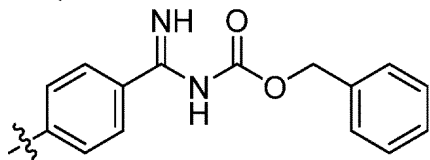
のうちの1つを有する場合に、

R^6 は、以下の構造:



を有さない、

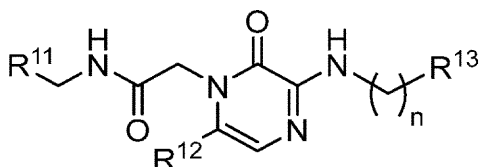
B) R^7 が非置換フェニルである場合に、 R^6 は、以下の構造:



を有さない。

【0163】

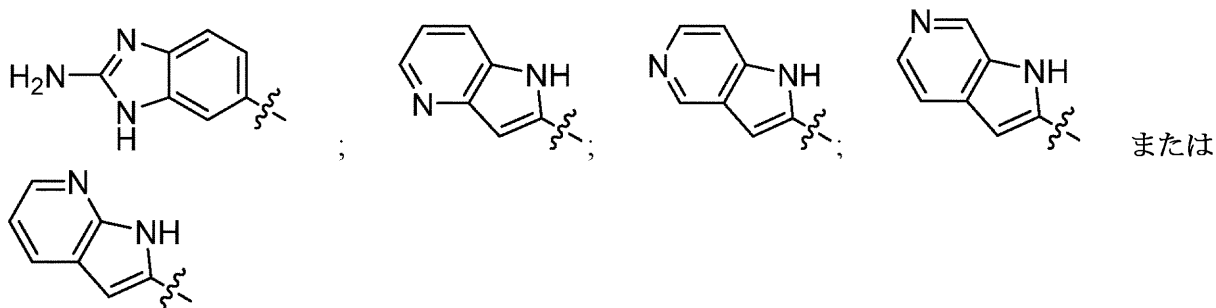
一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^{11} は、以下の構造:



の1つを有し、

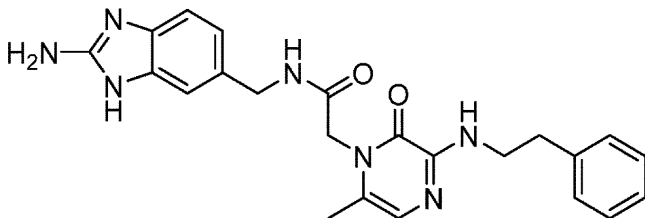
R^{12} は、メチルまたはハロゲンであり、

R^{13} は、置換または非置換アリールであり、

n は、1または2であり、

但し、

前記化合物は、以下の構造:



を有さない。

【0164】

一部の態様において、前記低分子は、以下の構造:

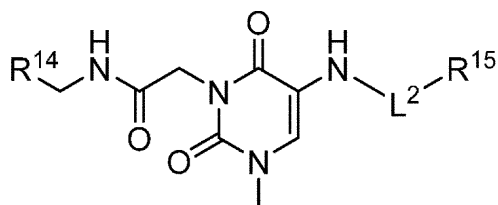
10

20

30

40

50



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

R^{14} は、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R^{15} は、置換もしくは非置換アリールアルキルまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキルであり、

L^2 は、直接結合、 $-C(=O)-$ 、または $-S(=O)_t-$ であり、

t は、0、1、または2である。

【0165】

一部の態様において、前記の化合物および/または式のある特定の特徴はグループまたは範囲で開示される。このような開示は、このようなグループおよび範囲のメンバーのどの単体のサブコンビネーションも含むことがはっきりと意図される。例えば、「 $C_1\sim 6$ アルキル」および「 $C_1\sim C_6$ アルキル」という用語は、メチル、エチル、 C_3 アルキル、 C_4 アルキル、 C_5 アルキル、および C_6 アルキルを個々に開示する(がそれに限定されるわけではない)ことがはっきりと意図される。

【0166】

本明細書中の様々な場所において、二価の連結基を定義する変数が説明される。それぞれの連結置換基は順方向型および逆方向型の連結置換基を両方とも含むことがはっきりと意図される。例えば、 $-NR(CR'R'')_n-$ は $-NR(CR'R'')_n-$ と $-(CR'R'')_nNR-$ を両方とも含み、これらの型をそれぞれ個々に開示することが意図される。この構造が連結基を必要とする場合、このグループについて列挙されたマーカッシュ変数は連結基であることが理解される。例えば、構造が連結基を必要とし、この変数のマーカッシュグループ定義が「アルキル」または「アリール」を列挙しているのであれば、「アルキル」または「アリール」は、それぞれ、アルキレン連結基またはアリーレン連結基を表していると理解される。

【0167】

「置換」という用語は、正式には、原子または原子の集団が、別の基と結合する「置換基」として水素に取って代わることを意味する。「置換」という用語は、特に定めのない限り、任意のレベルの置換、例えば、モノ、ジ、トリ、テトラ、またはペンタ置換が許される場合に、このような置換を指す。置換基は独立して選択され、置換は、任意の化学的に到達可能な位置にあってもよい。ある特定の原子における置換は結合価によって制限されることを理解しなければならない。「置換されていてよい」という句は置換または非置換を意味する。「置換」という用語は、正式には、水素原子が、置換基によって除去または置換されていることを意味する。1個の二価置換基、例えば、オキソは2個の水素原子に取って代わることができる。

【0168】

「 $C_n\sim m$ 」および「 $C_n\sim C_m$ 」という用語は、 n および m が整数である場合、 $n\sim m$ 個の炭素原子を含有する基を示している。例には、 $C_1\sim 4$ 、 $C_1\sim 6$ などが含まれる。この用語は、範囲内にある全てのメンバー、すなわち、 C_n 、 C_{n+1} 、 $C_{n+2}\cdots C_{m-2}$ 、 C_{m-1} 、 C_m をはっきりと開示することが意図される。例えば、 $C_1\sim 6$ は、 C_1 、 C_2 、 C_3 、 C_4 、 C_5 、および C_6 を開示することが意図される。「 $C_n\sim m$ 」は「 $C_n\sim C_m$ 」と同じことを意味する。

【0169】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「アルキル」という用語は、直鎖または分枝鎖でもよい飽和炭化水素基を指す。「 $C_n\sim m$ アルキル」および「 $C_n\sim C_m$ アルキル

」という用語は、 $n \sim m$ 個の炭素原子を有するアルキル基を指す。例えば、 $C_1 \sim C_{12}$ は、グループの中に1~12個(両端の値を含む)の炭素原子があってもよいことを示している。特に定めのない限り、アルキル基は約1~約20個の炭素原子。アルキル基は、正式には、化合物の残りの部分に対するアルキル基の結合点によって1つのC-H結合が置換されているアルカンに対応する。一部の態様において、アルキル基は、1~6個の炭素原子、1~4個の炭素原子、1~3個の炭素原子、または1~2個の炭素原子を含有する。アルキル部分の例には、化学基、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピル、*n*-ブチル、*tert*-ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル;さらに高級の同族列、例えば、2-メチル-1-ブチル、1,1-ジメチルプロピル、*n*-ペンチル、3-ペンチル、*n*-ヘキシル、1,2,2-トリメチルプロピル、ヘキシル、ヘプチル、オクチル、ノニル、デシル、ドデシルなどが含まれるが、これに限定されない。「低級アルキル」という用語は、鎖の中に1~6個の炭素原子があるアルキル基を指す。「置換アルキル」基とは、1個または複数個の置換基で置換されたアルキル基である。

【0170】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「アルケニル」という用語は、1つまたは複数の炭素-炭素二重結合を有するアルキル基に対応する直鎖または分枝鎖の炭化水素基を指す。アルケニル基は、正式には、化合物の残りの部分に対するアルケニル基の結合点によって1つのC-H結合が置換されているアルケンに対応する。「 $C_n \sim m$ アルケニル」および「 $C_n \sim m$ アルケニル」という用語は、 $n \sim m$ 個の炭素を有するアルケニル基を指す。一部の態様において、アルケニル部分は2~6個、2~4個、または2~3個の炭素原子を含有する。アルケニル基の例には、エテニル、*n*-プロペニル、イソプロペニル、*n*-ブテニル、*sec*-ブテニルなどが含まれるが、これに限定されない。

【0171】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「アルキニル」という用語は、1つまたは複数の炭素-炭素三重結合を有するアルキル基に対応する直鎖または分枝鎖の炭化水素基を指す。アルキニル基は、正式には、化合物の残りの部分に対するアルキル基の結合点によって1つのC-H結合が置換されているアルキンに対応する。「 $C_n \sim m$ アルキニル」および「 $C_n \sim m$ アルキニル」という用語は、 $n \sim m$ 個の炭素を有するアルキニル基を指す。アルキニル基の例には、エチニル、プロピニ-1-イル、プロピニ-2-イルなどが含まれるが、これに限定されない。一部の態様において、アルキニル部分は、2~6個、2~4個、または2~3個の炭素原子を含有する。

【0172】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「アルキレン」という用語は二価のアルキル連結基を指す。アルキレン基は、正式には、化合物の残りの部分に対するアルキレン基の結合点によって2個のC-H結合が置換されているアルカンに対応する。「 $C_n \sim m$ アルキレン」という用語は、 $n \sim m$ 個の炭素原子を有するアルキレン基を指す。アルキレン基の例には、メチレン、エタン-1,2-ジイル、プロパン-1,3-ジイル、プロパン-1,2-ジイル、ブタン-1,4-ジイル、ブタン-1,3-ジイル、ブタン-1,2-ジイル、2-メチル-プロパン-1,3-ジイルなどが含まれるが、これに限定されない。一部の態様において、「 $C_n \sim m$ アルキレン」は、 $n \sim m$ 個のメチレン(CH_2)基、 $-(CH_2)_{n \sim m}-$ 、例えば、 $-CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2-$ 、 $-CH_2CH_2CH_2-$ などの鎖を指すことがある。

【0173】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「アルコキシ」という用語は式-O-アルキルの基を指し、アルキル基は上記で定義された通りである。「 $C_n \sim m$ アルコキシ」という用語は、そのアルキル基が $n \sim m$ 個の炭素を有するアルコキシ基を指す。アルコキシ基の例には、メトキシ、エトキシ、プロポキシ(例えば、*n*-プロポキシおよびイソプロポキシ)、*t*-ブトキシなどが含まれる。一部の態様において、アルキル基は1~6、1~4、または1~3個の炭素原子を有する。

【0174】

「アルコシアルキル」という用語は、水素原子のうちの1個または複数個がアルコキ

10

20

30

40

50

シ基によって置換されているアルキル基を指す。「 $C_n \sim m$ アルコキシ- $C_p \sim q$ アルキル」という用語は、 $C_n \sim m$ アルコキシ基によって置換された $C_p \sim q$ アルキル基を指す。一部の態様において、ヒドロキシアルキル基は1個のアルコキシ基を有する。一部の態様において、アルコキシアルキル基は1個または2個のアルコキシ基を有し、それぞれのアルコキシ基は異なる炭素原子上にある。例には、メトキシメチル、エトキシメチル、3-エトキシエチル、および1-メトキシエチルが含まれ得るが、これに限定されない。

【0175】

「アミノ」という用語は、式- NH_2 の基を指す。

【0176】

「カルバミル」という用語は、式- $C(O)NH_2$ の基を指す。

10

【0177】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「カルボニル」という用語は- $C(=O)$ -基を指し、これは $C(O)$ と書かれることもある。

【0178】

「シアノ」または「ニトリル」という用語は、式- $C \equiv N$ の基を指し、これは-CNと書かれることもある。

【0179】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「ハロ」または「ハロゲン」という用語は、フルオロ、クロロ、ブロモ、およびヨードを指す。一部の態様において、「ハロ」は、F、Cl、またはBrより選択されるハロゲン原子10を指す。一部の態様において、ハロはFである。

20

【0180】

「ハロアルキル」という用語は、水素原子のうちの1個または複数個がハロゲン原子によって置換されているアルキル基を指す。「 $C_n \sim m$ ハロアルキル」という用語は、 $n \sim m$ 個の炭素原子と、同じでもよく、異なってもよい少なくとも1個から $\{2(n \sim m)+1\}$ 個までのハロゲン原子を有する $C_n \sim m$ アルキル基を指す。一部の態様において、ハロゲン原子はフルオロ原子である。一部の態様において、ハロアルキル基は1~6個または1~4個の炭素原子を有する。ハロアルキル基の例には、 CF_3 、 C_2F_5 、 CHF_2 、 CCl_3 、 $CHCl_2$ 、 C_2Cl_5 などが含まれる。一部の態様において、ハロアルキル基はフルオロアルキル基である。

【0181】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「ハロアルコキシ」という用語は式-O-ハロアルキルの基を指し、ハロアルキル基は上記で定義された通りである。「 $C_n \sim m$ ハロアルコキシ」という用語は、そのハロアルキル基が $n \sim m$ 個の炭素を有するハロアルコキシ基を指す。ハロアルコキシ基の例にはトリフルオロメトキシなどが含まれる。一部の態様において、ハロアルコキシ基は1~6個、1~4個、または1~3個の炭素原子を有する。

30

【0182】

「ヒドロキシアルキル」という用語は、水素原子の1つまたは複数個がヒドロキシによって置換されているアルキル基を指す。「 $C_n \sim m$ ヒドロキシアルキル」という用語は、 $n \sim m$ 個の炭素原子と少なくとも1個のヒドロキシ基を有する $C_n \sim m$ アルキル基を指す。一部の態様において、ヒドロキシアルキル基は1個のアルコール基を有する。ある特定の局面において、ヒドロキシアルキル基は1個または2個のアルコール基を有し、それぞれのアルコール基は異なる炭素原子上にある。ある特定の局面において、ヒドロキシアルキル基は、1個、2個、3個、4個、5個、または6個のアルコール基を有する。例には、ヒドロキシメチル、2-ヒドロキシエチル、および1-ヒドロキシエチルが含まれ得るが、これに限定されない。

40

【0183】

「オキシ」という用語は、炭素に結合した場合にカルボニル基を形成するか、あるいはヘテロ原子に結合した場合にスルホキシドもしくはスルホン基またはN-オキシド基を形成する二価置換基である酸素原子を指す。

【0184】

50

「スルフィド」という用語は、炭素に結合した場合にチオカルボニル基(C=S)を形成する二価置換基である硫黄原子を指す。

【0185】

「 n 員環」という用語は、 n が整数である場合、典型的には、環形成原子の数が n 個である部分における、環形成原子の数を表している。「 $n \sim m$ 員環」という用語は、 n および m が整数である場合、環形成原子の数が $n \sim m$ 個である範囲を表している。例えば、ピペリジニルは6員環ヘテロシクロアルキル環の一例であり、ピラゾリルは5員環ヘテロアリール環の一例であり、ピリジルは6員環ヘテロアリール環の一例であり、1,2,3,4-テトラヒドロ-ナフタレンは10員環シクロアルキル基の一例である。

【0186】

「芳香族」という用語は、芳香族特性(すなわち、 $(4n+2)$ 非局在化 π (パイ)電子を有し、 n は整数である)を有する1個または複数個の多価不飽和環を有する炭素環または複素環を指す。

【0187】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「アリール」という用語は、単環式でもよく多環式(例えば、2個、3個、もしくは4個の縮合環を有する)でもよい芳香族炭化水素基を指す。「 $C_n \sim m$ アリール」という用語は、 $n \sim m$ 個の環炭素原子を有するアリール基を指す。アリール基には、例えば、フェニル、ナフチル、アントラセニル、フェナントレニル、インダニル、インデニル、テトラセニルなどが含まれる。一部の態様において、アリール基は、6～約20個の炭素原子、6～約18個の炭素原子、6～約15個の炭素原子、または6～約10個の炭素原子を有する。一部の態様において、アリール基はフェニルである。

【0188】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「アリールアルキル」または「アラルキル」または「アルキルアリール」という用語は式-アルキレン-アリールの基を指しており、少なくとも1つの水素が、本明細書において定義されたアリール基によって置換されている、本明細書において定義されたアルキル基を指している。一部の態様において、アリールアルキルは $C_6 \sim 10$ アリール- $C_1 \sim 3$ アルキルである。一部の態様において、アリールアルキルは $C_6 \sim 10$ アリール- $C_1 \sim 4$ アルキルである。一部の態様において、アリールアルキルは $C_6 \sim 10$ アリール- $C_1 \sim 3$ アルキルである。一部の態様において、アリールアルキルはフェニル- $C_1 \sim 3$ アルキルである。例には、ベンジル、1-フェニルエチル、4-メチルベンジル、および1,1,-ジメチル-1-フェニルメチルが含まれるが、これに限定されない。一部の態様において、アリールアルキルはベンジルである。

【0189】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「ヘテロアリール」または「複素環式芳香族」という用語は、硫黄、酸素および窒素より選択される少なくとも1個のヘテロ原子環員を有する単環式または多環式の芳香族複素環を指す。 n が整数である、「 n 員環ヘテロアリール」または「 n 員環複素環式芳香族」は、 n 個の環形成原子を有するヘテロアリールを指す。 n および m が整数である、「 $n \sim m$ 員環ヘテロアリール」または「 $n \sim m$ 員環複素環式芳香族」は、 $n \sim m$ 個の環形成原子を有するヘテロアリールを指す。環の中にある炭素原子の数は、環形成原子の数よりヘテロ原子の数分だけ少ない。従って、一部の態様において、 n 員環ヘテロアリールは、 $n-1$ 、 $n-2$ 、 $n-3$ 、または $n-4$ 個の環炭素原子を有してもよく、 $n \sim m$ 員環ヘテロアリールは、 $n-1$ 、 $n-2$ 、 $n-3$ 、または $n-4$ 個の環炭素原子から $m-1$ 、 $m-2$ 、 $m-3$ 、または $m-4$ 個の環炭素原子を有してもよい。一部の態様において、 $n \sim m$ 員環ヘテロアリールは1～ $m-1$ 個の環炭素原子を有してもよい。一部の態様において、ヘテロアリール環は、独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子環員を有する。一部の態様において、ヘテロアリール部分の中にある任意の環形成NはN-オキシドでもよい。一部の態様において、ヘテロアリールは、炭素原子と、独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子環員を含む5～10個の環原子を有する。一部の態様において、ヘテロアリールは、

5～6個の環原子と、独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される1または2個のヘテロ原子環員を有する。一部の態様において、ヘテロアリールは5員環または6員環ヘテロアリール環である。他の態様において、ヘテロアリールは、8員環、9員環、または10員環縮合二環式ヘテロアリール環である。ヘテロアリール基の例には、ピリジン、ピリミジン、ピラジン、ピリダジン、ピロール、ピラゾール、アゾリル、オキサゾール、イソキサゾール、チアゾール、イソチアゾール、イミダゾール、フラン、チオフエン、キノリン、イソキノリン、ナフチリジン(1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, および 2,6-ナフチリジンを含む)、インドール、アザインドール、ベンゾチオフエン、ベンゾフラン、ベンズイソキサゾール、ベンズイミダゾール、イミダゾ[1,2-b]チアゾール、プリン、フラザン、トリアゾール、テトラゾール、1,2,4-チアジアゾール、キナゾリン、フタラジン、イミダゾ[1,2-a]ピリジン、イミダゾ[2,1-b]チアゾリルなどが含まれるが、これに限定されない。

【0190】

ヘテロアリール5員環は、5個の環原子を有し、1個または複数個の(例えば、1個、2個、または3個の)環原子が独立してN、O、およびSより選択されるヘテロアリール基である。例示的な五員環ヘテロアリールには、チエニル、フリル、ピロリル、イミダゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、ピラゾリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、1,2,3-トリアゾリル、テトラゾリル、1,2,3-チアジアゾリル、1,2,3-オキサジアゾリル、1,2,4-トリアゾリル、1,2,4-チアジアゾリル、1,2,4-オキサジアゾリル、1,3,4-トリアゾリル、1,3,4-チアジアゾリル、および1,3,4-オキサジアゾリルが含まれる。

【0191】

ヘテロアリール6員環は、6個の環原子を有し、1個または複数個の(例えば、1個、2個、または3個の)環原子が独立してN、O、およびSより選択されるヘテロアリール基である。例示的な六員環ヘテロアリールは、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、トリアジニル、およびピリダジニルである。

【0192】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「ヘテロアリールアルキル」という用語は、式-アルキレン-ヘテロアリールの基を指す。nが整数である「n員環ヘテロアリールアルキル」という用語は、中にあるヘテロアリールがn員環であるヘテロアリールアルキル基を指す。n、m、p、およびqが整数である、「n～m員環-C_{p～q}-アルキル」という用語は、中にあるヘテロアリールがn～m員環であり、アルキルがp～q個の炭素原子を有するヘテロアリールアルキル基を指す。一部の態様において、ヘテロアリールアルキルは、5～10員環ヘテロアリール-C_{1～3}アルキルまたはC_{1～9}ヘテロアリール-C_{1～3}アルキルであり、ヘテロアリール部分は単環式または二環式であり、独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される1個、2個、3個、4個、または5個のヘテロ原子環員を有する。一部の態様において、ヘテロアリールアルキルはC_{1～9}ヘテロアリール-C_{1～4}アルキルであり、ヘテロアリール部分は単環式または二環式であり、かつ独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される1個、2個、3個、または4個のヘテロ原子環員を有する。例には、ピリジルメチル、例えば、2-ピリジルメチル、3-ピリジルメチル、または4-ピリジルメチルが含まれる。

【0193】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「シクロアルキル」という用語は、非芳香族、飽和、単環式、二環式、または多環式の炭化水素環構造を指す。この用語は、環化したアルキル基およびアルケニル基を含む。「C_{n～m}シクロアルキル」という用語は、n～m個の環員炭素原子を有するシクロアルキルを指す。シクロアルキル基は、単環式または多環式の(例えば、2個、3個、または4個の縮合環を有する)基およびスピロ環を含んでもよい。シクロアルキル基は、3個、4個、5個、6個、または7個の環形成炭素(C_{3～7})を有してもよい。一部の態様において、シクロアルキル基は、3～6個の環員、3～5個の環員、または3～4個の環員を有する。一部の態様において、シクロアルキル基は単環式である。一部の態様において、シクロアルキル基は単環式または二環式である。一部の態様

において、シクロアルキル基は $C_3 \sim 6$ 単環式シクロアルキル基である。シクロアルキル基の環形成炭素原子を任意で酸化して、オキソまたはスルフィド基を形成することができる。シクロアルキル基はシクロアルキリデンも含む。一部の態様において、シクロアルキルは、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、またはシクロヘキシルである。シクロアルキルの定義には、シクロアルキル環と縮合した(すなわち、シクロアルキル環と共通する結合を有する)1つまたは複数の芳香環、例えば、シクロペンタン、シクロヘキサンなどのベンゾまたはチエニル誘導体を有する部分も含まれる。縮合芳香環を含有するシクロアルキル基は、縮合芳香環の環形成原子を含む任意の環形成原子を介して結合することができる。シクロアルキル基の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、4,4-ジメチルシクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロペンテニル、シクロヘキセニル、シクロヘキサジエニル、シクロヘプタトリエニル、ノルボルニル、ノルピニル、ノルカルニル、ビスクロ[1.1.1]ペンタニル、ビスクロ[2.1.1]ヘキサニルなどが含まれる。一部の態様において、シクロアルキル基は、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、またはシクロヘキシルである。

【0194】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「シクロアルキルアルキル」という用語は、式-アルキレン-シクロアルキルの基を指す。 n 、 m 、 p 、および q が整数である、 $C_{n \sim m}$ シクロアルキル- $C_{p \sim q}$ アルキルという用語は、 $p \sim q$ 個の炭素原子を有するアルキル基に結合している、 $n \sim m$ 個の炭素原子を有するシクロアルキル基を指す。一部の態様において、シクロアルキルアルキルは $C_3 \sim 7$ シクロアルキル- $C_1 \sim 3$ アルキルであり、シクロアルキル部分は単環式または二環式である。例には、シクロプロピルメチル、シクロブチルメチル、シクロペンタンメチル、およびシクロヘキシルメチルが含まれる。

【0195】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる「ヘテロシクロアルキル」という用語は、任意で、環構造の一部として1つまたは複数のアルケニレン基を含有してもよく、独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される少なくとも1つのヘテロ原子環員を有する非芳香環または環構造を指す。 n が整数である「 n 員環ヘテロシクロアルキル」とは、 n 個の環形成原子を有するヘテロアリールを指す。 n および m が整数である「 $n \sim m$ 員環ヘテロシクロアルキル」は、 $n \sim m$ 個の環形成原子を有するヘテロシクロアルキルを指す。環の中にある炭素原子の数は、環形成原子の数よりヘテロ原子の数分だけ少ない。従って、一部の態様において、 n 員環ヘテロシクロアルキルは、 $n-1$ 、 $n-2$ 、 $n-3$ 、または $n-4$ 個の環炭素原子を有してもよく、 $n \sim m$ 員環ヘテロシクロアルキルは、 $n-1$ 、 $n-2$ 、 $n-3$ 、または $n-4$ 個の環炭素原子 $\sim m-1$ 、 $m-2$ 、 $m-3$ 、または $m-4$ 個の環炭素原子を有してもよい。一部の態様において、 $n \sim m$ 員環ヘテロシクロアルキルは $1 \sim m-1$ 個の環炭素原子を有してもよい。一部の態様において、ヘテロシクロアルキルは、4 $\sim$ 12個の環員、4 $\sim$ 10個の環員、4 $\sim$ 7個の環員、または4 $\sim$ 6個の環員を有する。ヘテロシクロアルキル基には、単環式の4員環、5員環、6員環、および7員環ヘテロシクロアルキル基が含まれる。ヘテロシクロアルキル基は、単環式または二環式の(例えば、2つの縮合環または架橋環を有する)環構造を含んでもよい。一部の態様において、ヘテロシクロアルキル基は、独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される1個、2個、または3個のヘテロ原子を有する単環式基である。ヘテロシクロアルキル基の環を形成する炭素原子およびヘテロ原子を任意で酸化して、オキソもしくはスルフィド基または他の酸化結合(例えば、 $C(O)$ 、 $S(O)$ 、 $C(S)$ 、もしくは $S(O)_2$ 、 N -オキソなど)を形成することができるか、あるいは窒素原子を四級化することができる。ヘテロシクロアルキル基は、環を形成する炭素原子または環を形成するヘテロ原子を介して結合することができる。一部の態様において、ヘテロシクロアルキル基は0 $\sim$ 3個の二重結合を含有する。一部の態様において、ヘテロシクロアルキル基は0 $\sim$ 2個の二重結合を含有する。ヘテロシクロアルキルの定義には、ヘテロシクロアルキル環と縮合した(すなわち、ヘテロシクロアルキル環と共通する結合を有する)1つまたは複数の芳香環、例えば、ピペリジン、モルホリン、アゼピンなどのベンゾまたはチエニル誘導体も含まれる。縮合芳香環を含有するシクロアルキル基は、縮合芳香環の環形成原子を含む任意の環形

10

20

30

40

50

成原子を介して結合することができる。ヘテロシクロアルキル基の例には、アゼチジン、アゼパン、ジヒドロペンゾフラン、ジヒドロフラン、ジヒドロピラン、モルホリン、3-オキサ-9-アザスピロ[5.5]ウンデカン、1-オキサ-8-アザスピロ[4.5]デカン、ピペリジン、ピペラジン、ピラン、ピロリジン、キヌクリジン、テトラヒドロフラン、テトラヒドロピラン、1,2,3,4-テトラヒドロキノリン、トロパン、およびチオモルホリンが含まれる。

【0196】

単独で、または他の用語と組み合わせて用いられる、本明細書で使用する「ヘテロシクロアルキルアルキル」という用語は式-アルキレン-ヘテロシクロアルキルの基を指す。nが整数である「n員環ヘテロシクロアルキルアルキル」という用語は、ヘテロシクロアルキルがn員環であるヘテロアリールアルキルアルキル基を指す。n、m、p、およびqが整数である「n~m員環-C_{p~q}-アルキル」という用語は、ヘテロシクロアルキルがn~m員環であり、アルキルがp~q個の炭素原子を有するヘテロシクロアルキルアルキル基を指す。一部の態様において、ヘテロシクロアルキルアルキルは、ヘテロシクロアルキル部分が単環式または二環式であり、独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される1個、2個、3個、4個、または5個のヘテロ原子環員を有する、4~10員環ヘテロシクロアルキル-C_{1~3}アルキルまたはC_{1~9}ヘテロシクロアルキル-C_{1~3}アルキルである。一部の態様において、ヘテロシクロアルキルアルキルは、ヘテロシクロアルキル部分が単環式または二環式であり、独立して窒素、硫黄、および酸素より選択される1個、2個、3個、4個、または5個のヘテロ原子環員を有する、C_{2~9}ヘテロシクロアルキル-C_{1~4}アルキルまたはC_{2~9}ヘテロシクロアルキル-C_{1~3}アルキルである。

【0197】

ある特定の場所では、前記の定義または態様は特定の環(例えば、アゼチジン環、ピリジン環など)を指すことがある。特に定めのない限り、原子の原子価を超えなければ、これらの環は、どの環員にも結合することができる。例えば、アゼチジン環は環のどの位置にも結合することができるのに対して、アゼチジン-3-イル環は位置3位に結合する。

【0198】

同じ置換基の任意の2つの基または2つの実例が選択肢のリストから「独立して選択される」場合、これらの基は同じでもよく異なってもよい。例えば、R^aおよびR^bが独立してアルキル、フルオロ、アミノ、およびヒドロキシアルキルからなる群より選択される場合、2つのR^a基および2つのR^b基をもつ分子は全ての基がアルキル(例えば、4つの異なるアルキル基)になることも考えられる。または、第1のR^aがアルキルになることも考えられ、第2のR^aがフルオロになることも考えられ、第1のR^bがヒドロキシアルキルになることも考えられ、第2のR^bがアミノ(またはこの群から選ばれる他の任意の置換基)になることも考えられる。または、両方のR^aおよび第1のR^bはフルオロになることも考えられるのに対して、第2のR^bがアルキルになることも考えられる(すなわち、置換基の対の中には同じものがあってもよく、これに対して対の中には異なるものがあってもよい)。特に定めのない限り、同じ定義を有する2つ以上の基が存在するが、この定義が複数の選択肢を定める場合、同じ基のそれぞれの出現は、独立して、起こり得る選択肢より選択されることが理解されるはずである。例えば、化合物に2つ以上のR^a基が存在し、R^aの定義が、R^aがAでもよく、Bでもよく、Cでもよいことを定める場合、化合物に存在する、それぞれのR^a基は独立してA、B、およびCより選択され、そのため、化合物に存在するR^a基は同じでもよく、異なってもよいことが理解されるはずである。

【0199】

本明細書に記載の化合物は非対称でもよい(例えば、1つまたは複数の立体中心を有してもよい)。特に定めのない限り、鏡像異性体およびジアステレオマーなどの全ての立体異性体が意図される。非対称的に置換された炭素原子を含有する本明細書に記載の化合物は光学活性型またはラセミ型で単離することができる。光学的に不活性な出発物質から光学活性型を調製するやり方に関する方法は、ラセミ混合物の分割または立体選択的合成による方法など当技術分野において公知である。オレフィン、C=N二重結合などの多くの幾何異性体も本明細書に記載の化合物に存在することがあり、このような安定した異性体の全て

が本発明において意図される。本発明の化合物のシスおよびトランス幾何異性体が説明され、異性体の混合物として単離されてもよく、分離された異性体として単離されてもよい。

【0200】

化合物のラセミ混合物の分割は、当技術分野において公知の多数の方法のいずれでも行うことができる。方法の一つには、光学活性のある、塩を形成する有機酸であるキラル分割酸(chiral resolving acid)を用いた分別再結晶が含まれる。分別再結晶法に適した分割用薬剤は、例えば、光学活性のある酸、例えば、D型およびL型の酒石酸、ジアセチル酒石酸、ジベンゾイル酒石酸、マンデル酸、リンゴ酸、乳酸、または様々な光学活性のあるカンファースルホン酸、例えば、 β -カンファースルホン酸である。分別結晶化法に適した他の分割用薬剤には、 α -メチルベンジルアミン(例えば、S型およびR型、またはジアステレオマー的に純粋な型)、2-フェニルグリシノール、ノルエフェドリン、エフェドリン、N-メチルエフェドリン、シクロヘキシルエチルアミン、1,2-ジアミノシクロヘキサンなどの立体異性的に純粋な型が含まれる。

【0201】

ラセミ混合物の分割は、光学活性のある分割用薬剤(例えば、ジニトロベンゾイルフェニルグリシン)が充填されたカラムによる溶出でも行うことができる。適切な溶出用溶媒組成物は当業者によって決定することができる。

【0202】

一部の態様において、本発明の化合物は(R)-立体配置を有する。他の態様において、前記化合物は(S)-立体配置を有する。複数のキラル中心がある化合物では、特に定めのない限り、前記化合物にあるキラル中心のそれぞれが独立して(R)または(S)でもよい。

【0203】

本明細書に記載の化合物は互変異型も含むことがある。互変異型は、単結合と隣接する二重結合が入れ替わるのと同時にプロトンが移動することに起因する。互変異型には、実験式と全電荷が同じ、異性体プロトン付加状態であるプロトトロピー互変異性体が含まれる。プロトトロピー互変異性体の例には、ケトン-エノール対、アミド-イミド酸対、ラクタム-ラクチム対、エナミン-イミン対、およびプロトンが複素環式構造の2つ以上の位置を占めることがある環状型、例えば、1H-および3H-イミダゾール、1H-、2H-および4H-1,2,4-トリアゾール、1H-および2H-イソインドール、ならびに1H-および2H-ピラゾールが含まれる。互変異型は平衡状態にあってもよく、適切な置換によって、ある型に立体的に固定されてもよい。本開示は、説明された化合物の、このような全ての互変異性体を包含することが意図される。

【0204】

本明細書に記載の化合物はまた、中間体または最終化合物において生じる原子の全種類の同位体も含んでもよい。同位体には、原子数が同じであるが、質量数が異なる原子が含まれる。例えば、水素の同位体にはトリチウムおよびジューテリウムが含まれる。

【0205】

本明細書で使用する「化合物」という用語は、図示された構造の全ての立体異性体、幾何異性体、互変異性体、および同位体を含むことが意図される。

【0206】

本明細書に記載の化合物は酸性基および/または塩基性基を含んでもよく、塩を形成することができる。本開示は、塩の起こり得る存在が明確に説明されていなくても、化合物の酸性塩および塩基性塩を含む、塩を形成することができる化合物の全ての塩を含むことが意図されると理解されるはずである。さらに、塩である化合物が説明された場合に、この化合物の開示は、遊離塩基または遊離酸、ならびにその別の塩型を含む化合物の全種類の型を含むことが意図されると理解される。「塩」という用語は、親化合物が、既存の酸性部分または塩基性部分をその塩型に変換することによって改変されている、開示された化合物の誘導体を指す。塩の例には、塩基性残基、例えば、アミンの無機塩もしくは有機酸塩、酸性残基、例えば、カルボン酸などのアルカリ塩もしくは有機塩などが

含まれるが、これに限定されない。「その塩(a salt thereof)」、「その塩(salt thereof)」、または「その塩(salts thereof)」という用語は、関連するマーカッシュグループの任意の先行するメンバーに適用することができる。例えば、A、B、C、およびその塩からなるグループは、その範囲内に、Aの塩である態様、Bの塩である態様、およびCの塩である態様を含むだろう。

【0207】

本明細書において開示される化合物の塩は薬学的に許容される塩を含む。「薬学的に許容される塩」という用語は、形成された親化合物の無毒の塩、例えば、無毒の無機酸または有機酸から形成された親化合物の無毒の塩を指す。本発明の薬学的に許容される塩は、従来の化学的方法によって、塩基性部分または酸性部分を含有する親化合物かが合成することができる。一般的に、このような塩は、水もしくは有機溶媒、またはその2つの混合物の中で、これらの化合物の遊離酸型または遊離塩基型を化学量論的な量の適切な塩または酸と反応させることによって調製することができる。一般的に、エーテル、酢酸エチル、アルコール(例えば、メタノール、エタノール、イソプロパノール、もしくはブタノール)またはアセトニトリル(MeCN)のような非水性培地が好ましい。適切な塩のリストは、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Ed., (Mack Publishing Company, Easton, 1985), p. 1418, Berge et al., J. Pharm. Sci., 1977, 66(1), 1-19およびStahl et al., Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, (Wiley, 2002)で見つけられる。一部の態様において、本明細書に記載の化合物にはN-オキシド型が含まれる。適切な薬学的に許容される塩に関する、さらなる情報は、本明細書に参照により組み入れられる、Remington's, Pharmaceutical Sciences (最新版), Mack Publishing Co., Easton, PAにおいて見付けることができる。

【0208】

化合物および薬学的に許容される塩を含むその塩は、水および溶媒などの他の物質と一緒にになった状態で見出されてもよく(例えば、水和物および溶媒和化合物)、単離されてもよい。固体の場合に、本明細書に記載の化合物およびその塩は様々な形態で生じてもよく、例えば、水和物を含む溶媒和化合物の形態をとってもよい。前記化合物は、多形または溶媒和化合物などの任意の固体形態をとってもよい。そのため、特にはっきりとした定めのない限り、化合物およびその塩についての言及は、その化合物の任意の固体形態を包含すると理解されるはずである。

【0209】

一部の態様において、本明細書に記載の化合物またはその塩は実質的に単離される。「実質的に単離される」とは、前記化合物が形成または検出された環境から、少なくとも部分的または実質的に分離されることを意味する。部分的分離は、例えば、本発明の化合物が豊富にある組成物を含んでもよい。実質的分離は、少なくとも約50重量%、少なくとも約60重量%、少なくとも約70重量%、少なくとも約80重量%、少なくとも約90重量%、少なくとも約95重量%、少なくとも約97重量%、または少なくとも約99重量%の本発明の化合物またはその塩を含有する組成物を含んでもよい。

【0210】

本明細書に記載の化合物は、その塩、水和物、および/または溶媒和化合物を含めて、任意の適切な公知の有機合成法によって調製することができ、起こり得る非常に多くの合成経路、例えば、米国特許出願番号62/943,629、62/943,622、62/943,611、62/943,599、16/425,791、およびPCT出願番号PCT/US19/34220に記載の合成経路のいずれに従っても合成することができる。米国特許出願番号62/943,629、62/943,622、62/943,611、62/943,599、16/425,791、およびPCT出願番号PCT/US19/34220のそれぞれが、その全体が本明細書に参照により組み入れられる。

【0211】

本明細書に記載の化合物を調製する反応は、有機合成の当業者によって容易に選択することができる適切な溶媒中で行うことができる。適切な溶媒は、反応が行われる温度、例えば、溶媒の凝固温度から溶媒の沸騰温度に及ぶことがある温度で、出発物質(反応物)、

中間体、または生成物と実質的に非反応性であってもよい。ある特定の反応を1種類の溶媒中で行ってもよく、複数種の溶媒の混合物中に行ってもよい。特定の反応工程に応じて、特定の反応工程に適した溶媒を当業者は選択することができる。

【0212】

本開示の化合物の調製は様々な化学基の保護と脱保護を伴うことがある。保護と脱保護の必要および適切な保護基の選択は当業者によって容易に決定することができる。保護基の化学は、例えば、Kocienski, *Protecting Groups*, (Thieme, 2007); Robertson, *Protecting Group Chemistry*, (Oxford University Press, 2000); Smith et al., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 6th Ed. (Wiley, 2007); Petursson et al., 「Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry」, *J. Chem. Educ.*, 1997, 74(11), 1297; および Wuts et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., (Wiley, 2006) に記載されている。

10

【0213】

反応は、当技術分野において公知の任意の適切な方法に従ってモニタリングすることができる。例えば、生成物形成は、分光学的手段、例えば、核磁気共鳴分光法(例えば、 ^1H もしくは ^{13}C)、赤外線分光法、分光光度法(例えば、UV-可視光)、質量分析法によって、またはクロマトグラフィー法、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)もしくは薄層クロマトグラフィー(TLC)によってモニタリングすることができる。

【0214】

当業者であれば、本開示の範囲内で様々な化合物を調製するために有機化学の一般的な知識を用いて調製を変更または最適化できることを理解するだろう。

20

【0215】

合成が本明細書中で説明されていない出発物質、試薬、および中間体は市販されているか、文献において知られているか、または当業者に公知の方法によって調製することができる。

【0216】

説明されたプロセスは、本開示の化合物が合成される可能性のある唯一の手段ではなく、本開示の化合物の合成の際に合成有機反応の広範なレパートリーを潜在的に使用することができる。当業者は適切な合成経路を選択し、実行するやり方を知っている。出発物質、中間体、および生成物の適切な合成方法は、*Advances in Heterocyclic Chemistry*, Vols. 1-107 (Elsevier, 1963-2012); *Journal of Heterocyclic Chemistry*, Vols. 1-49 (Journal of Heterocyclic Chemistry, 1964-2012); Carreira, et al. (Ed.) *Science of Synthesis*, Vols. 1-48 (2001-2010) and *Knowledge Updates KU2010/1-4; 2011/1-4; 2012/1-2* (Thieme, 2001-2012); Katritzky, et al. (Ed.) *Comprehensive Organic Functional Group Transformations*, (Pergamon Press, 1996); Katritzky et al. (Ed.); *Comprehensive Organic Functional Group Transformations II* (Elsevier, 2nd Edition, 2004); Katritzky et al. (Ed.), *Comprehensive Heterocyclic Chemistry* (Pergamon Press, 1984); Katritzky et al., *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II* (Pergamon Press, 1996); Smith et al., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 6th Ed. (Wiley, 2007); Trost et al. (Ed.), *Comprehensive Organic Synthesis* (Pergamon Press, 1991) などの参考情報源を含む文献を参照することによって特定され得る。

30

40

【0217】

一部の態様において、本開示の化合物はトロンピンと比べてMASP-2を選択的に阻害する。一部の態様において、MASP-2:トロンピン阻害の選択性比は、少なくとも1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、または30:1である。一部の態様において、本開示の化合物は、MASP-2を阻害することに加えて、トロンピンなどの1種類または複数種の凝固プロテアーゼを阻害する

50

ことができる。

【0218】

本開示の低分子化合物のMASP-2阻害活性は、当技術分野において公知の方法、例えば、その全体が本明細書に参照により組み入れられるPCT出願番号PCT/US19/34220に開示されるように蛍光発生基質を利用した酵素MASP-2アッセイによって確かめることができる。同様に、本開示の化合物のトロンビン阻害活性は、当技術分野において公知の方法を用いて確かめることができる。代表的な低分子化合物の例示的なアッセイ方法およびMASP-2阻害活性は本明細書中の実施例23～25に記載されている。

【0219】

一部の態様において、本明細書において開示される化合物はレクチン経路の活性化を阻害する。本開示の化合物のレクチン経路阻害活性は、当技術分野において公知の方法によって、例えば、その全体が本明細書に参照により組み入れられる、PCT出願番号PCT/US19/34220に記載のヒト血清中でのレクチン経路活性化(LPA)アッセイを用いて確かめることができる。

10

【0220】

一部の態様において、前記化合物のMASP-2阻害 K_i 値は、例えば、上記の酵素MASP-2アッセイによって確かめられた場合に、約25 μ M未満、約10 μ M未満、約2.5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.1 μ M未満である。一部の態様において、前記化合物のレクチン経路阻害 IC_{50} は、例えば、上記のレクチン経路活性化(LPA)アッセイによって確かめられた場合に、約50 μ M未満、約5 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.05 μ M未満である。一部の態様において、前記化合物のMASP-2阻害対トロンビンの選択性は、(例えば、それぞれの K_i の比によって確かめられた場合に)約5.0倍超、約25倍超、約50倍超、または約100倍超である。

20

【0221】

一部の態様において、前記化合物は、以下の表4A～4Eの化合物である。

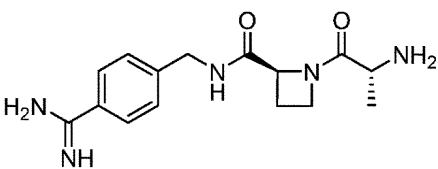
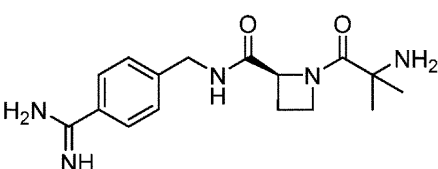
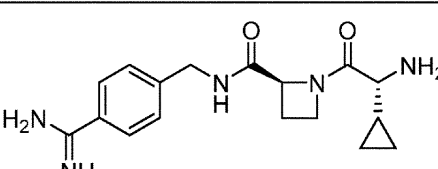
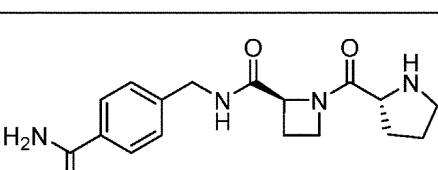
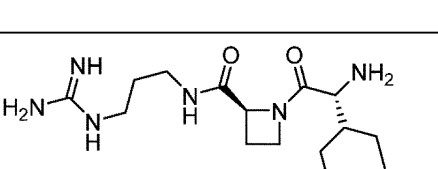
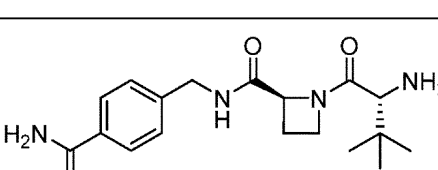
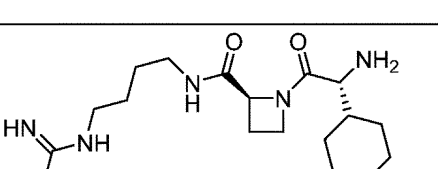
【0222】

(表4A) 例示的な化合物

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1000		NA
1001		NA
1002		NA
1003		NA
1004		2HCl
1005		NA
1006		2HCl

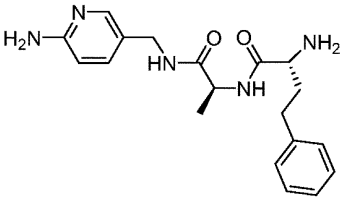
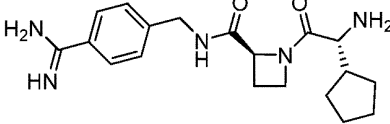
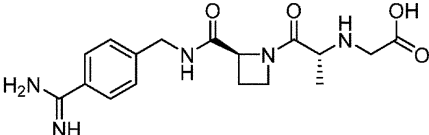
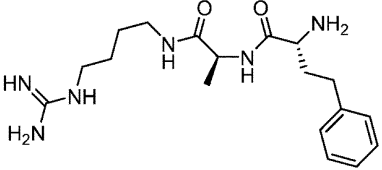
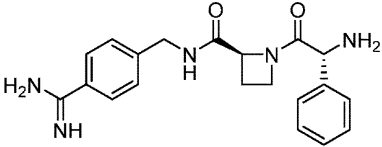
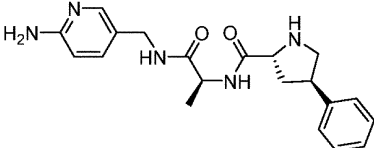
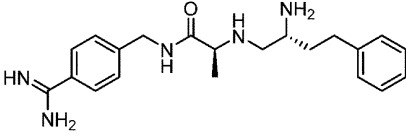
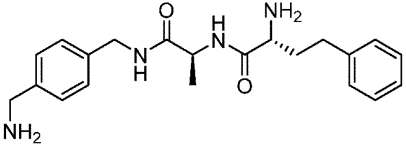
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1007		2HCl
1008		NA
1009		NA
1010		2HCl
1011		NA
1012		2HCl
1013		2HCl
1014		2HCl

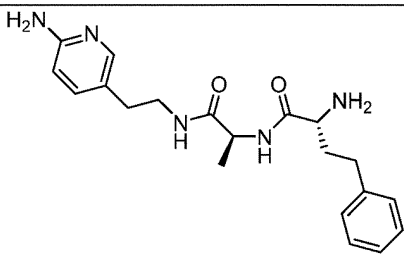
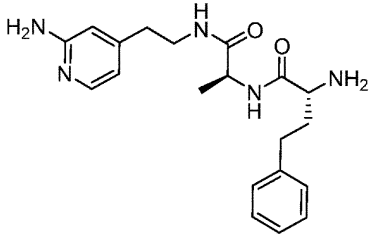
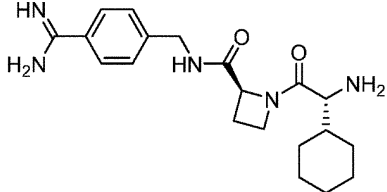
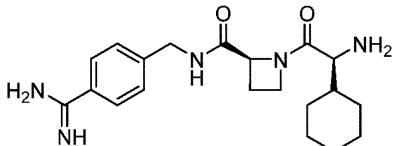
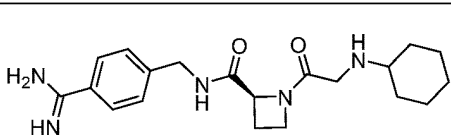
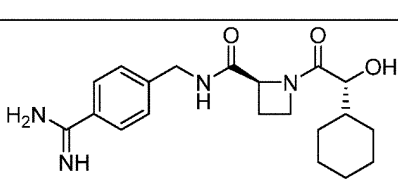
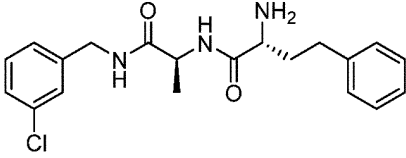
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1015		2HCl
1016		2HCl
1017		NA
1018		NA
1019		NA
1020		NA
1021		HCl

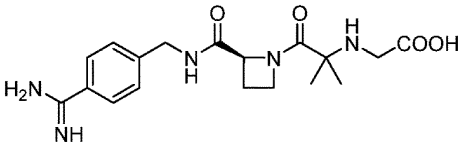
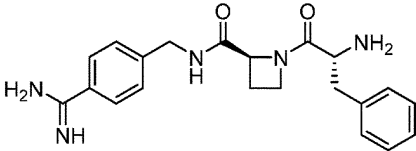
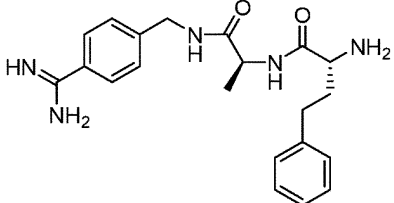
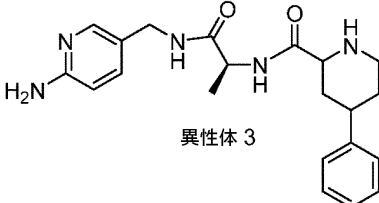
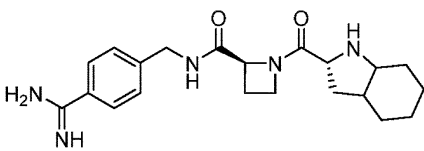
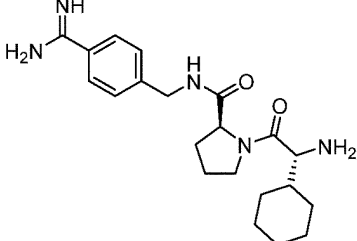
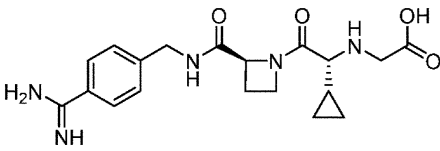
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1022		NA
1023		NA
1024		2HCl
1025	 異性体 3	2HCl
1026		NA
1027		2HCl
1028		NA

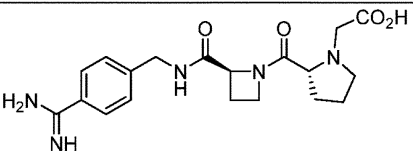
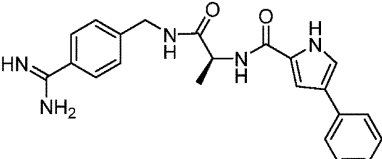
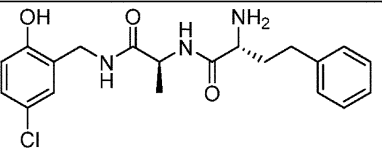
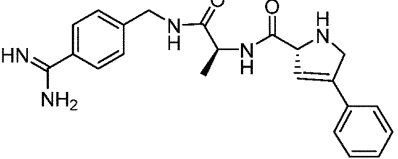
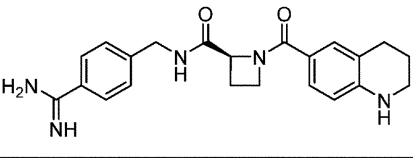
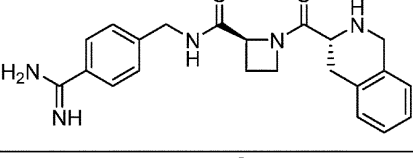
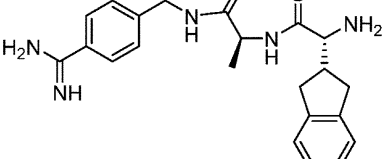
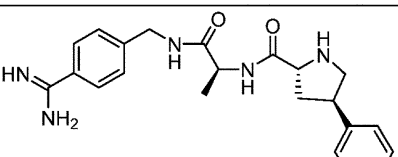
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1029		NA
1030		NA
1031		HCl
1032		2HCl
1033		NA
1034		NA
1035		2HCl
1036		2HCl

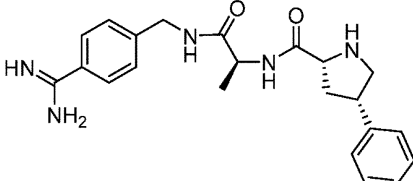
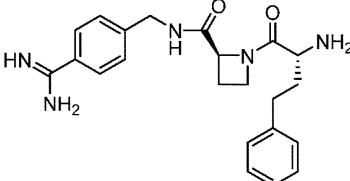
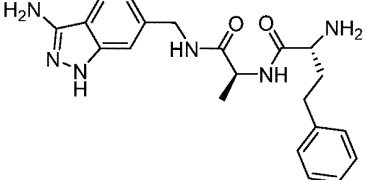
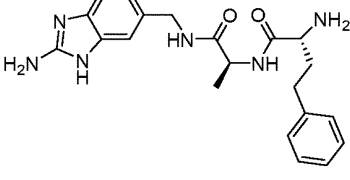
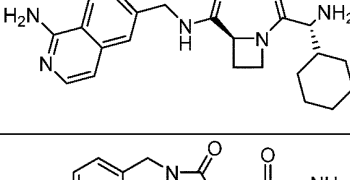
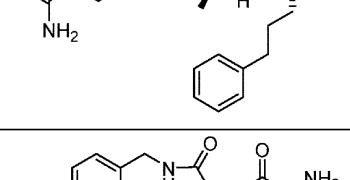
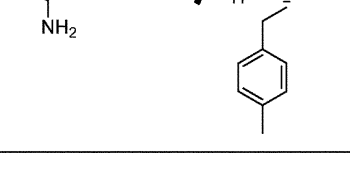
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1037		2HCl
1038		2HCl
1039		2HCl
1040		2HCl
1041		2HCl
1042		2HCl
1043		2HCl

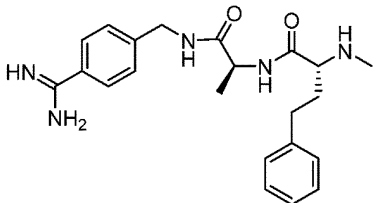
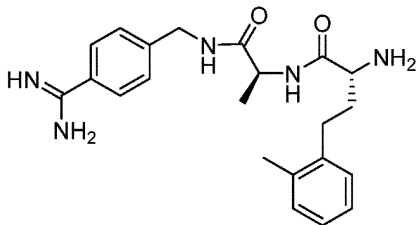
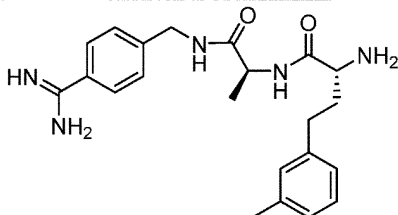
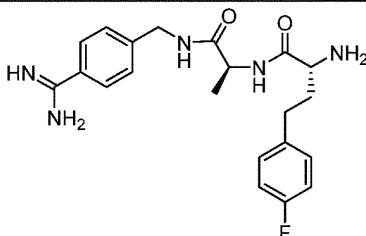
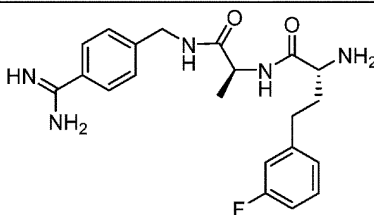
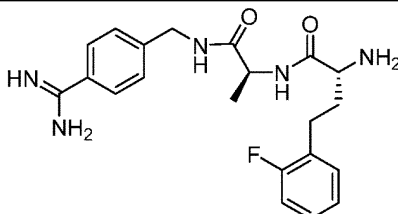
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1044		2HCl
1045		2HCl
1046		2HCl
1047		2HCl
1048		2HCl
1049		2HCl

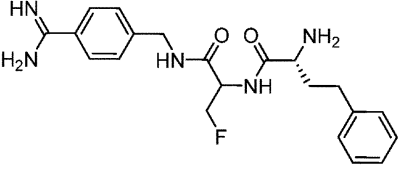
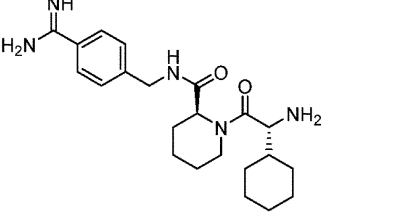
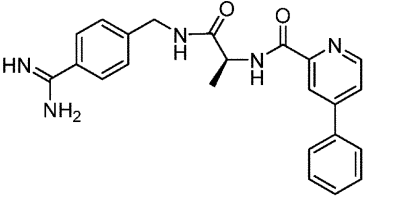
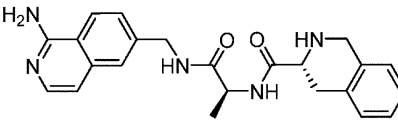
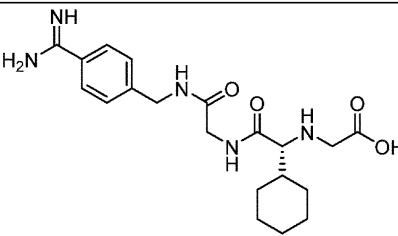
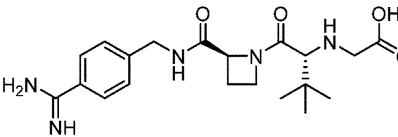
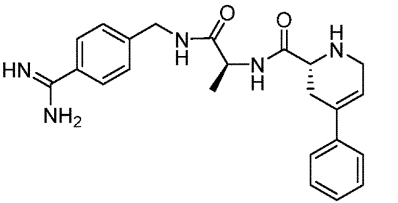
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1050		2HCl
1051		2HCl
1052		2HCl
1053		2 TFA
1054		2HCl
1055		NA
1056		2HCl

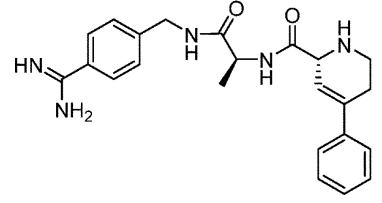
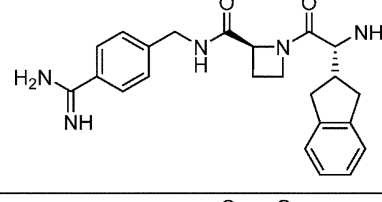
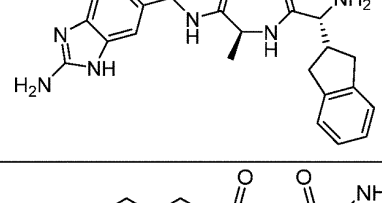
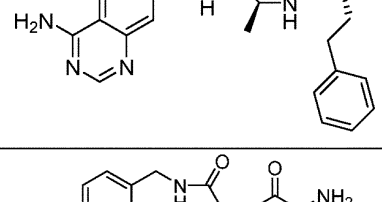
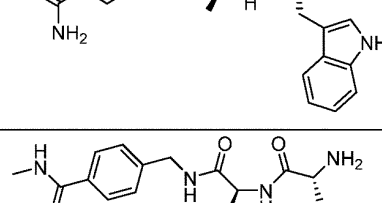
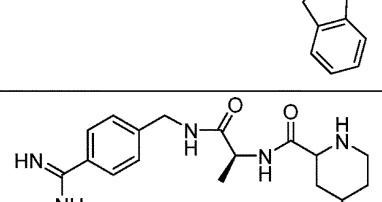
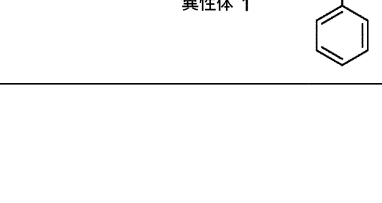
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1057		2HCl
1058		NA
1059		2HCl
1060		2HCl
1061		2HCl
1062		2HCl
1063	 異性体 1	2HCl

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1064	異性体 2	2HCl
1065	異性体 3	2HCl
1066	異性体 4	2HCl
1067	異性体 1	2HCl
1068	異性体 2	2HCl
1069	NA	NA
1070	2HCl	2HCl

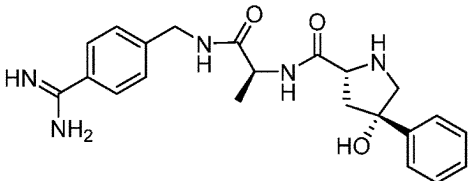
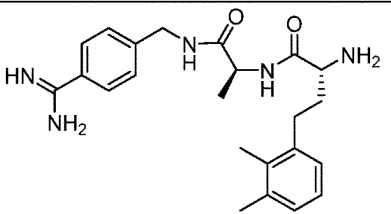
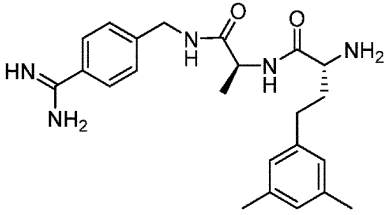
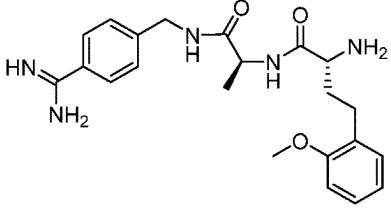
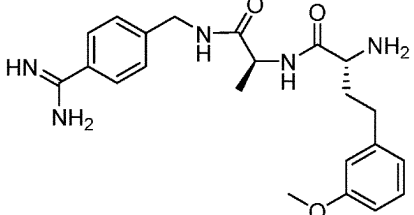
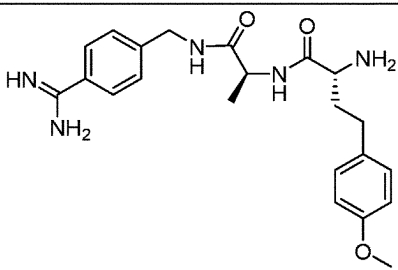
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1071		2HCl
1072		2HCl
1073		2HCl
1074		2HCl
1075		2HCl
1076		2HCl

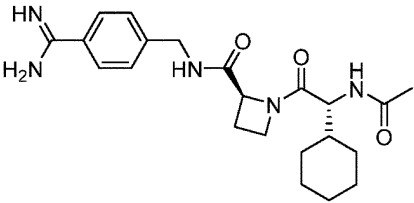
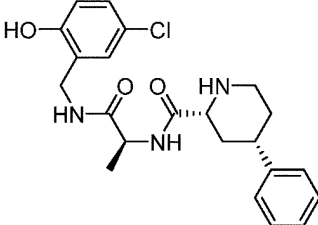
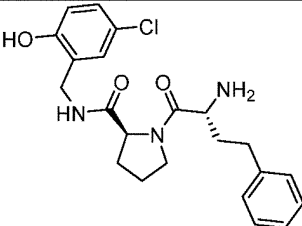
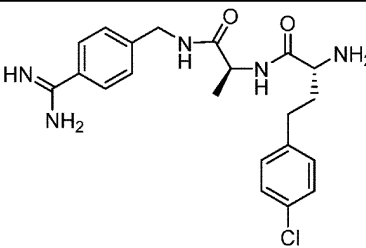
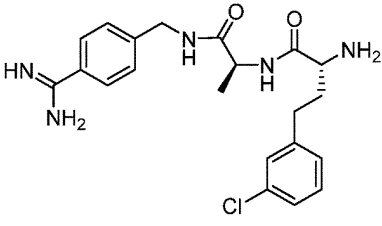
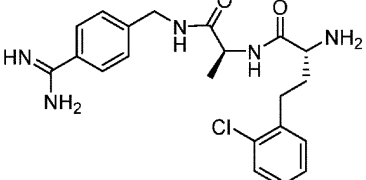
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1077		NA
1078		HCl
1079		HCl
1080		2HCl
1081		2HCl
1082		2HCl

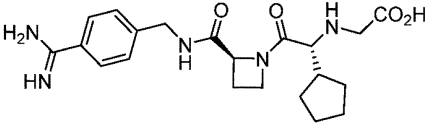
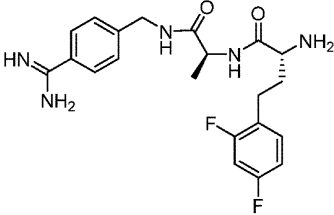
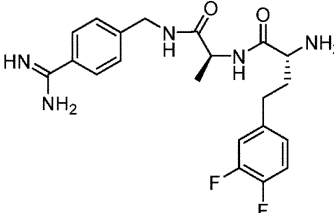
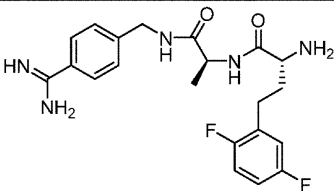
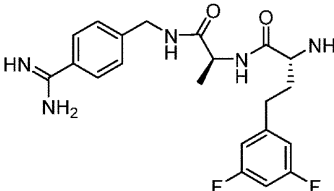
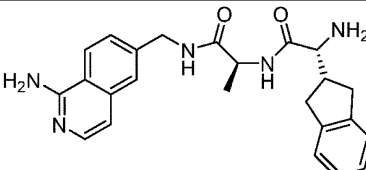
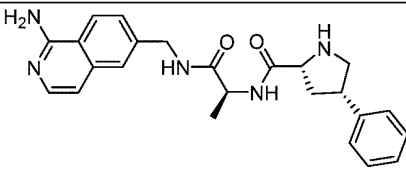
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1083		NA
1084		2HCl
1085		2HCl
1086		2HCl
1087		2HCl
1088		2HCl
1089		2HCl

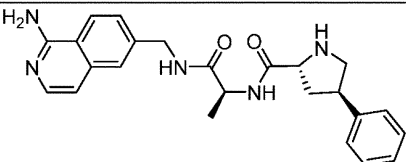
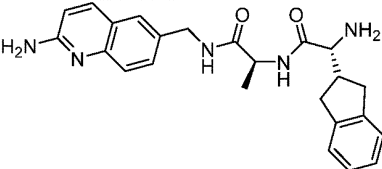
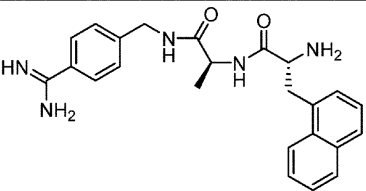
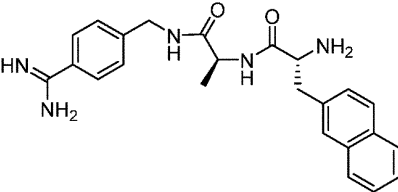
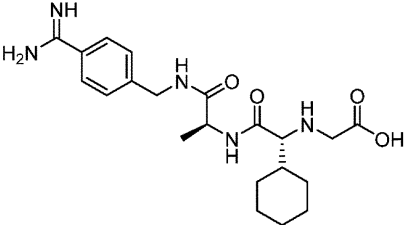
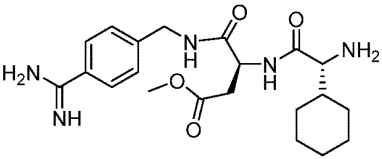
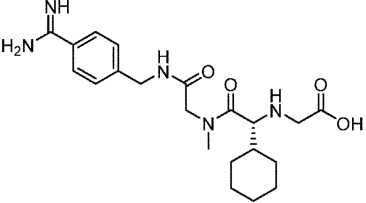
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1090		2HCl
1091		2HCl
1092		2HCl
1093		2HCl
1094		2HCl
1095		2HCl
1096		NA

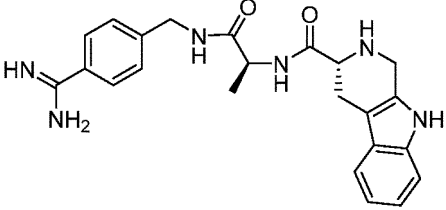
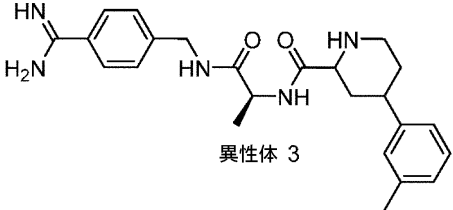
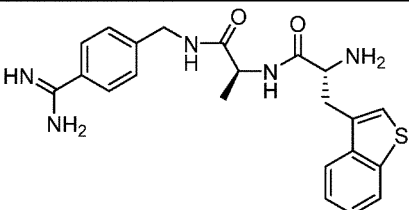
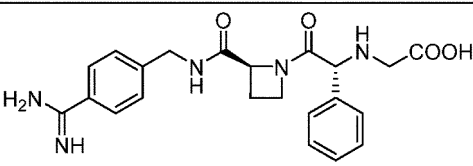
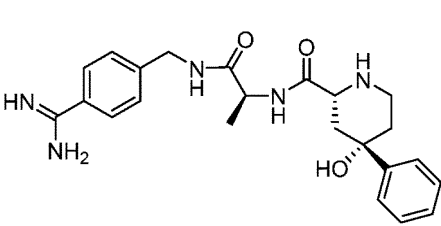
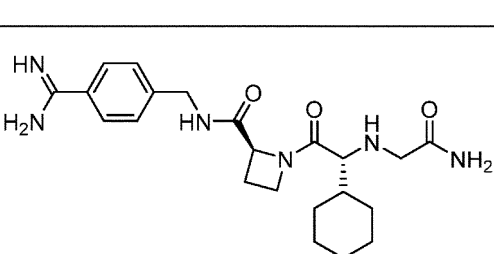
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1097		2HCl
1098		2HCl
1099		2HCl
1100		NA
1101		2HCl
1102		NA

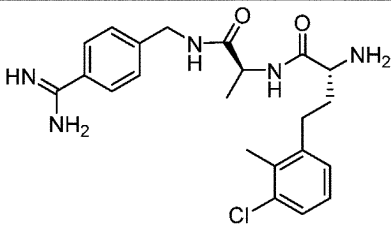
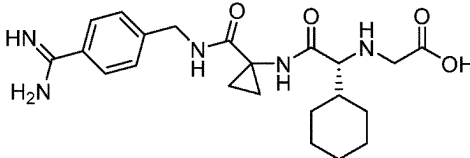
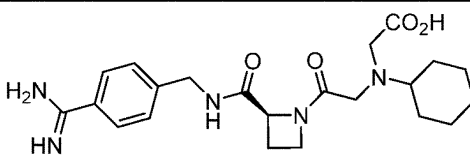
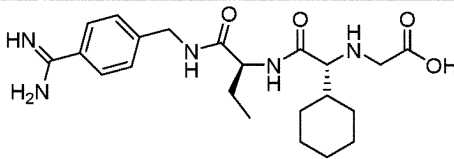
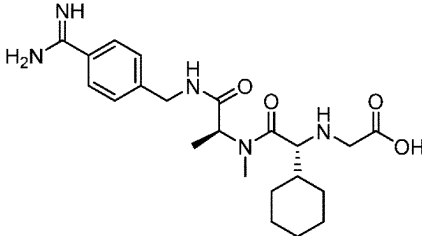
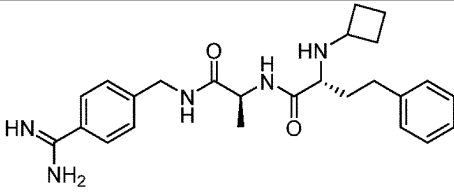
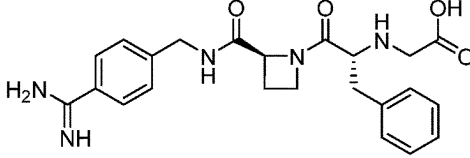
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1103		2HCl
1104		2HCl
1105		NA
1106		2HCl
1107		NA
1108		2HCl
1109		NA

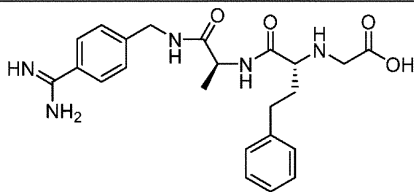
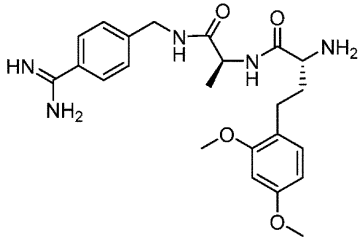
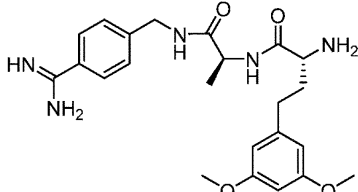
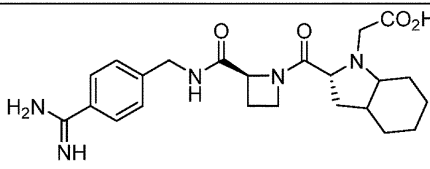
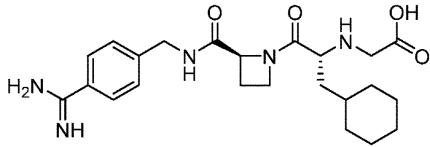
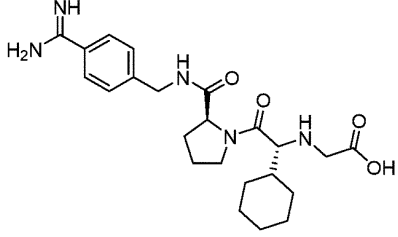
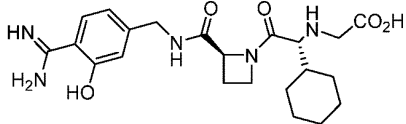
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1110		2HCl
1111		2HCl
1112		2HCl
1113		NA
1114		NA
1115		NA
1116		NA

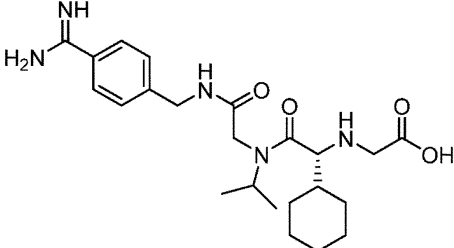
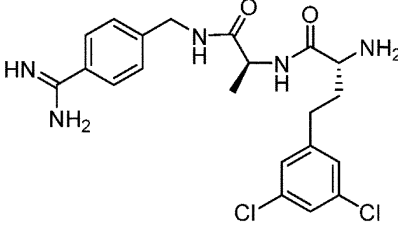
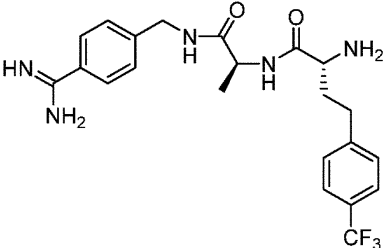
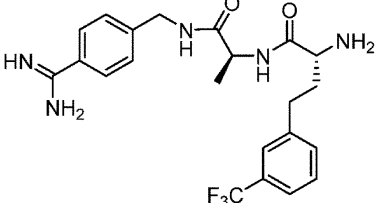
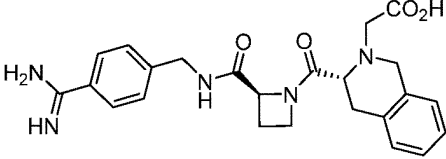
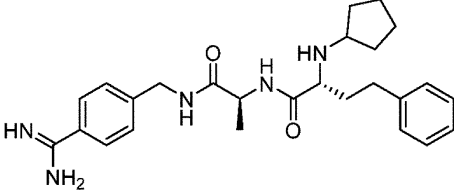
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1117		NA
1118		2HCl
1119		2HCl
1120		2HCl
1121		NA
1122		2HCl

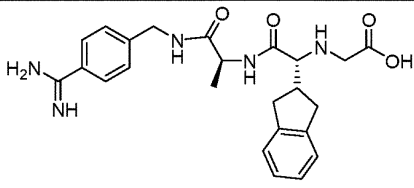
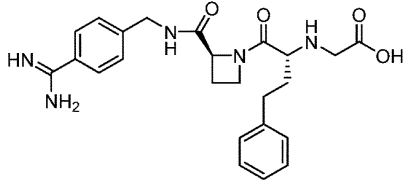
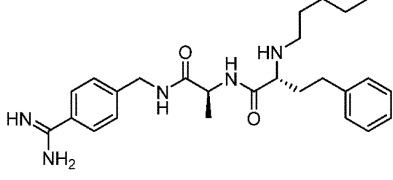
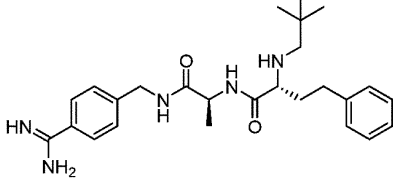
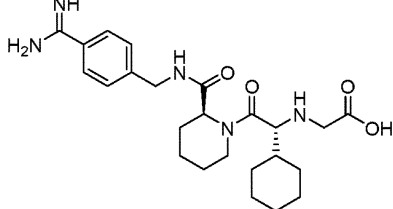
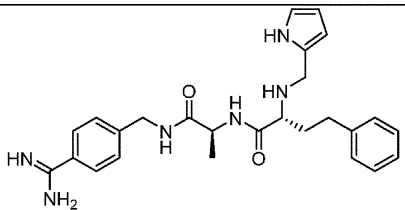
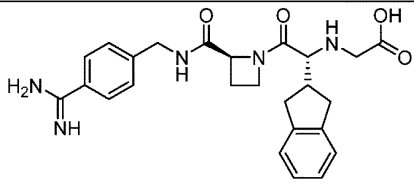
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1123		2HCl
1124		2HCl
1125		2HCl
1126		2HCl
1127		NA
1128		2HCl
1129		NA

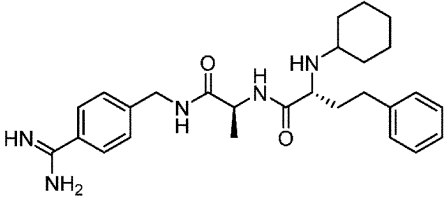
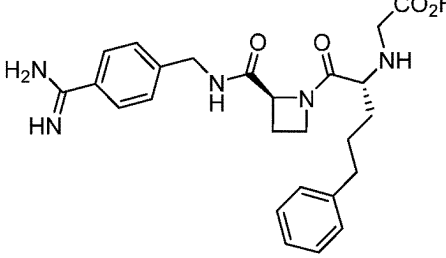
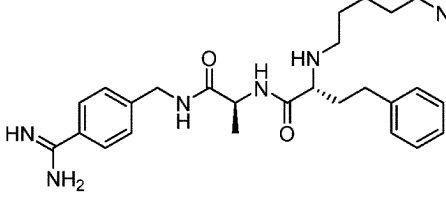
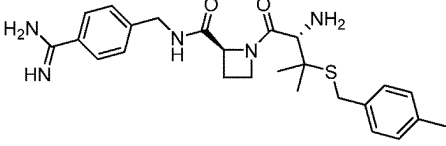
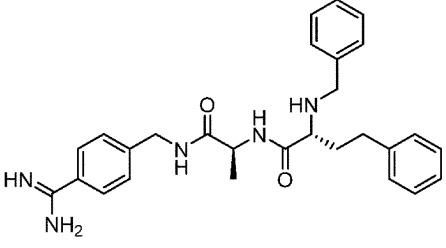
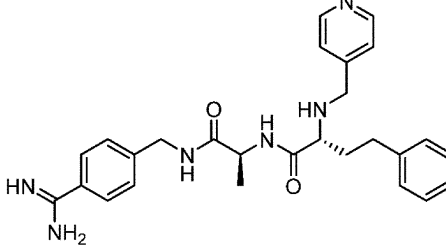
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1130		2 HCl
1131		NA
1132		3HCl
1133		NA
1134		2HCl
1135		3HCl

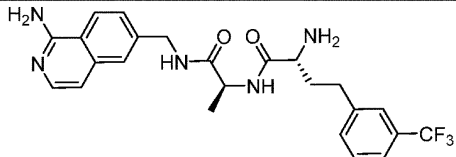
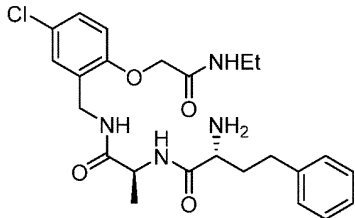
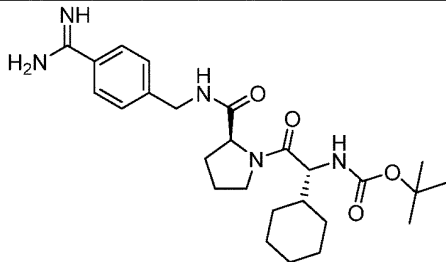
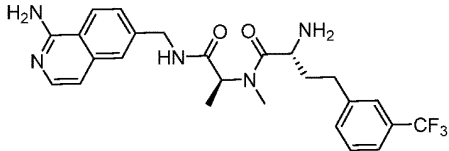
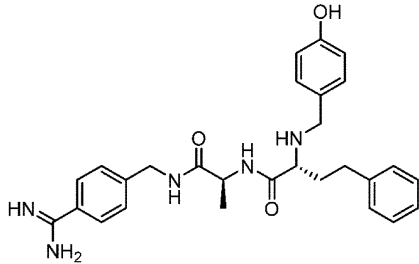
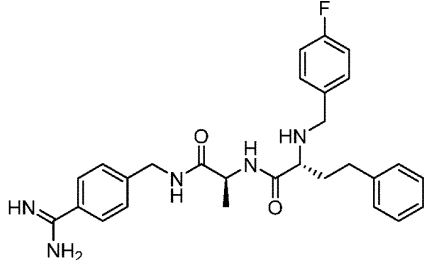
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1136		2HCl
1137		TFA
1138		NA
1139		2HCl
1140		2HCl
1141		2HCl

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1142		2HCl
1143		2HCl
1144		3TFA
1145		2HCl
1146		NA

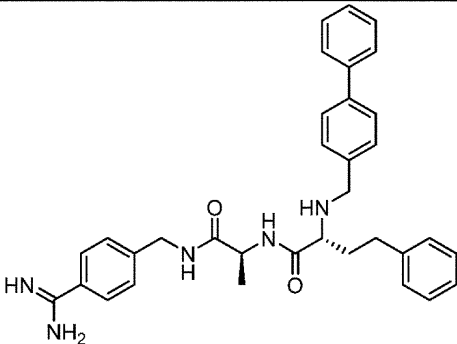
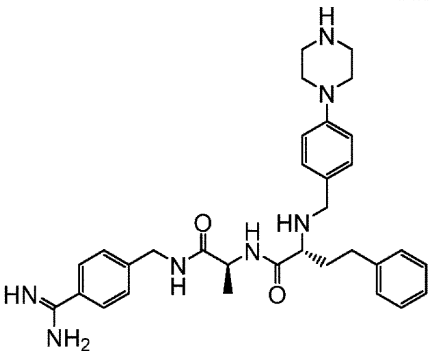
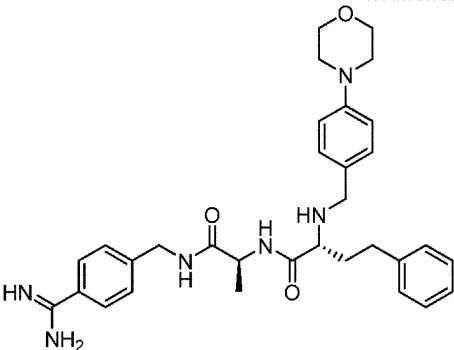
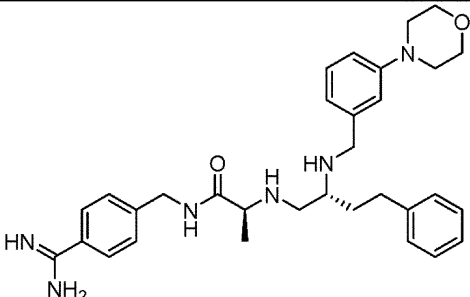
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1147		2HCl
1148		3TFA
1149		2HCl
1150		2HCl

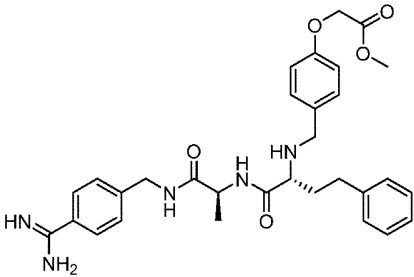
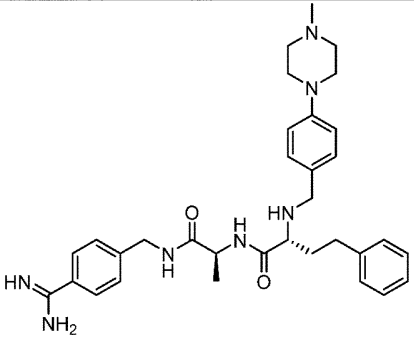
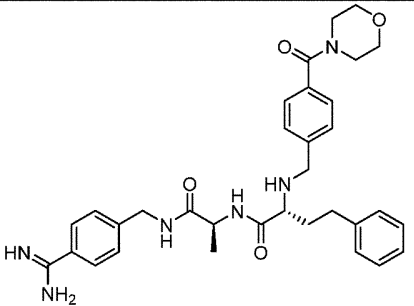
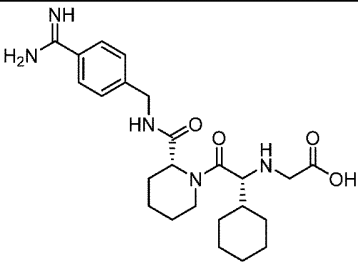
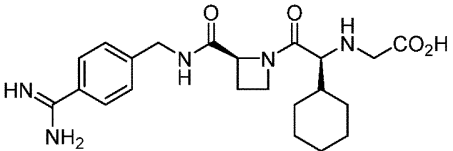
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1151		2HCl
1152		2HCl
1153		2HCl
1154		NA
1156		NA

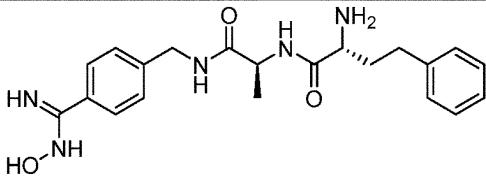
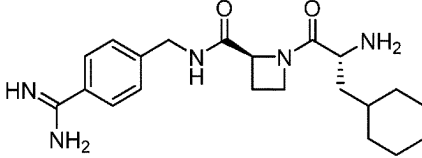
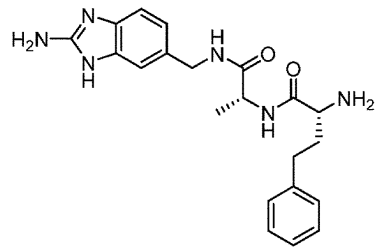
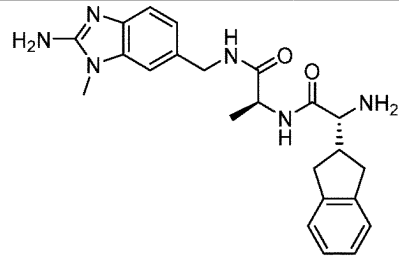
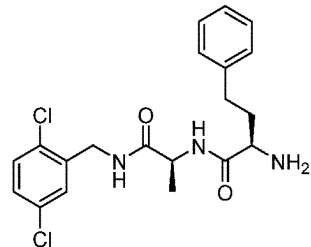
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1157		2HCl
1158		2HCl
1170		
1171		2HCl
1192		1HCl

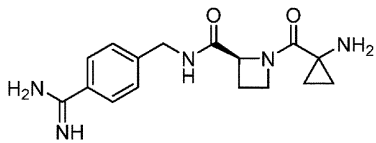
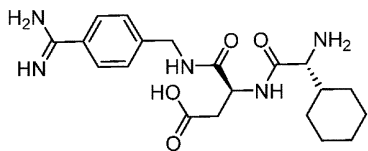
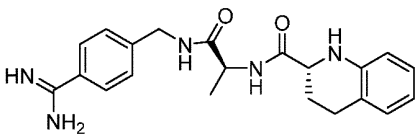
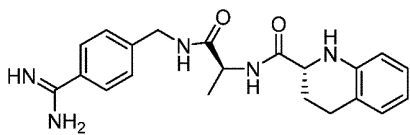
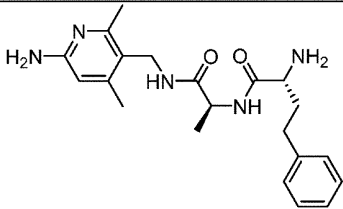
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1194		NA
1195		2HCl
1207		2HCl
1211		2HCl
1213		2HCl

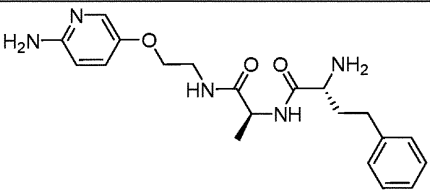
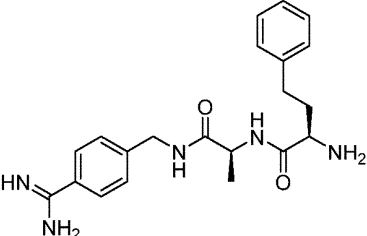
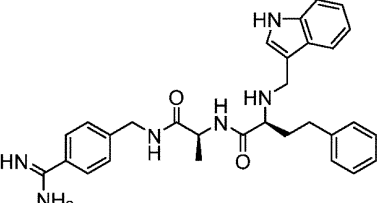
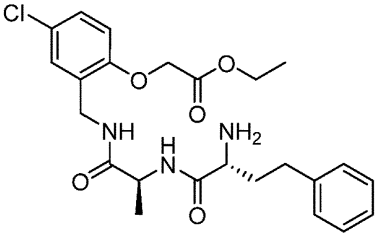
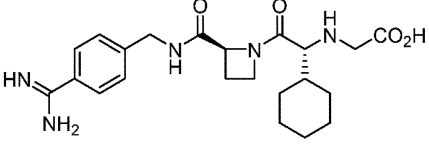
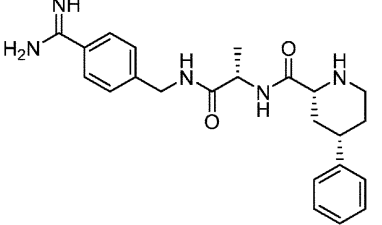
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1215		2HCl
1218		2HCl
1223		2HCl
1229		1HCl
999		
1230		2 HCl

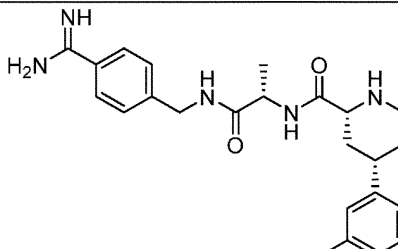
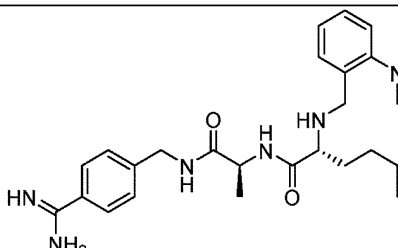
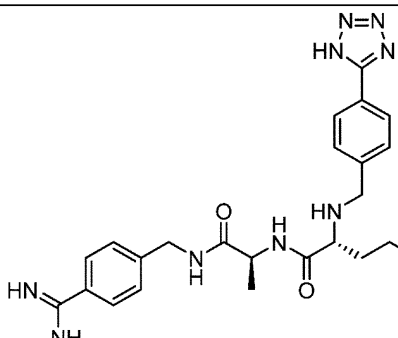
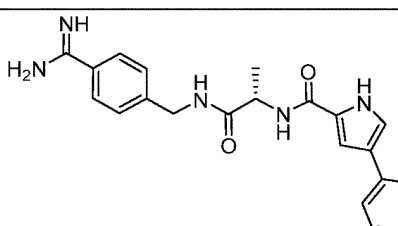
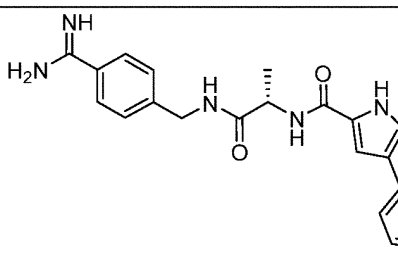
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1231		2 HCl
1232		2TFA
1233		2TFA
1234		NA
1235		NA

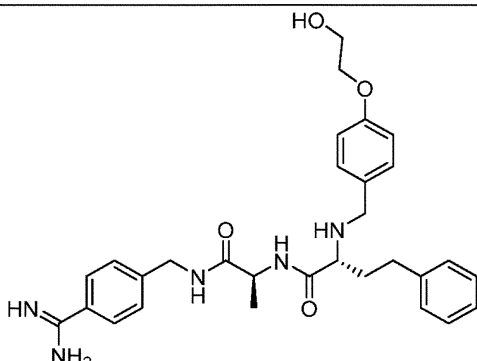
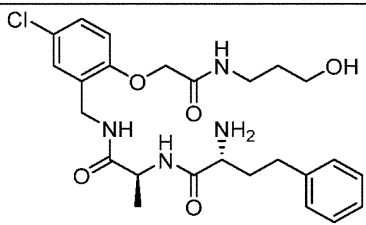
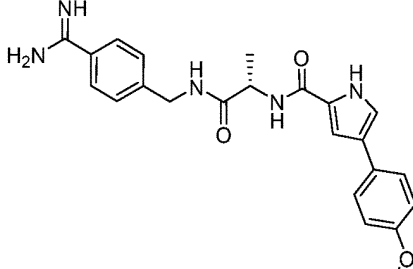
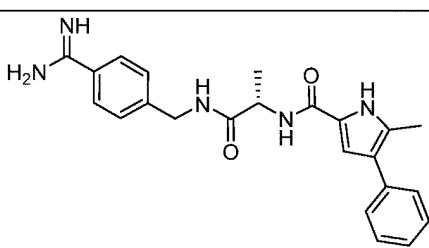
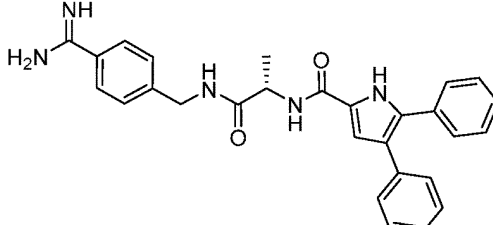
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1236		2TFA
1237		HCl
1238		TFA
1239		TFA
1240		NA

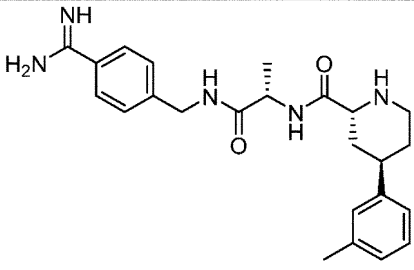
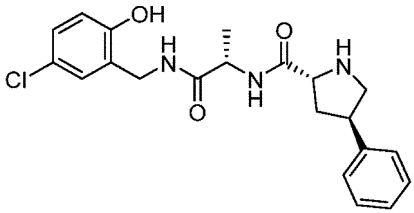
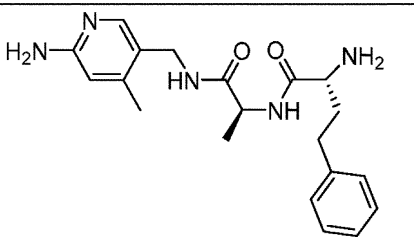
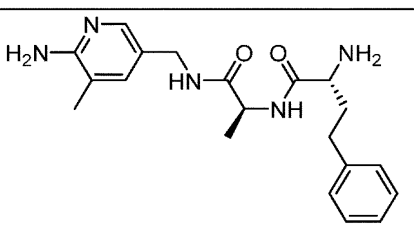
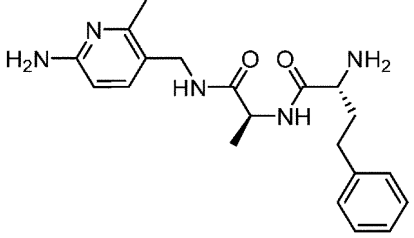
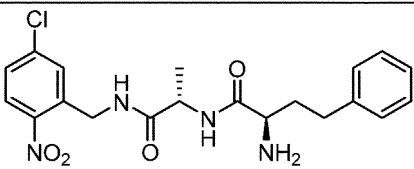
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1241		HCl
1242		N/A
1243		2HCl
1244		2HCl
1245		2HCl
1246		HCl

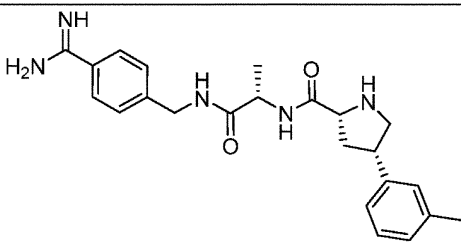
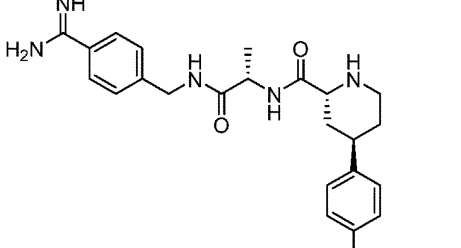
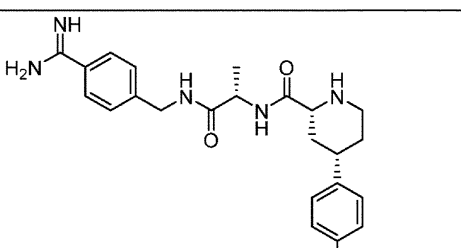
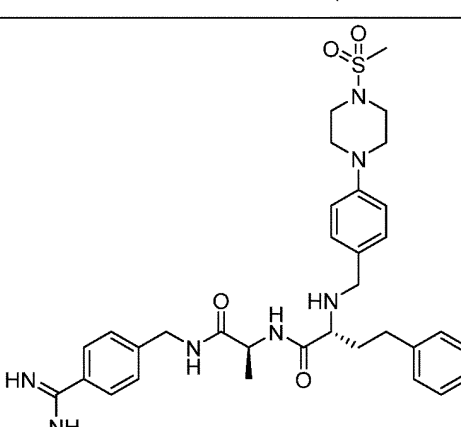
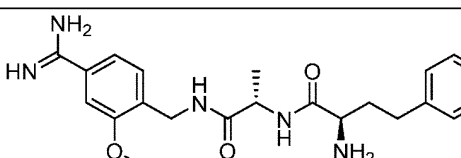
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1247		2HCl
1248		2 HCl
1249		2 HCl
1250		2TFA
1251		TFA

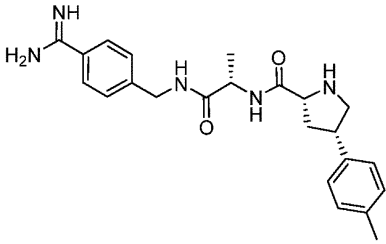
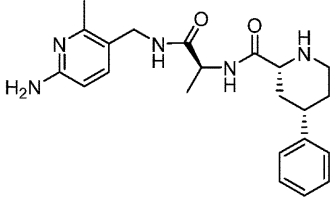
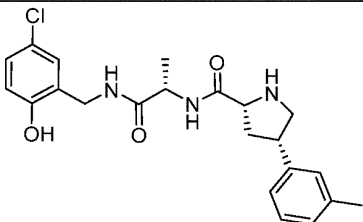
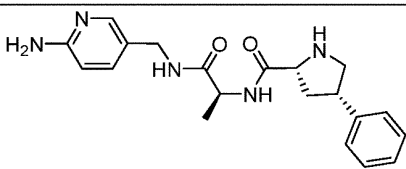
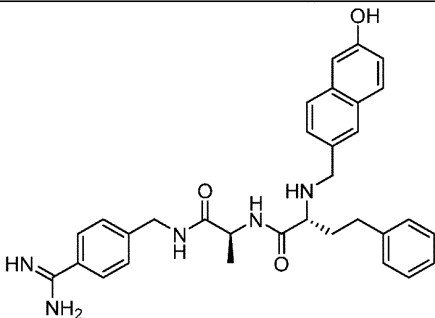
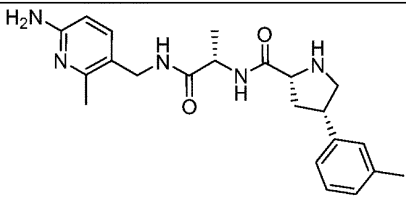
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1252		2HCl
1253		HCl
1254		HCl
1255		2HCl
1256		2TFA
1257		2HCl

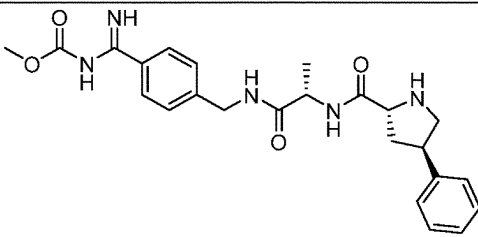
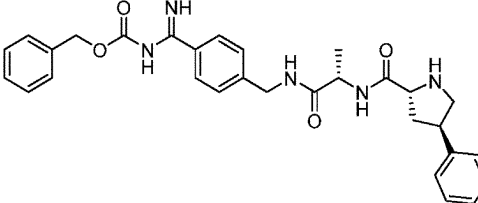
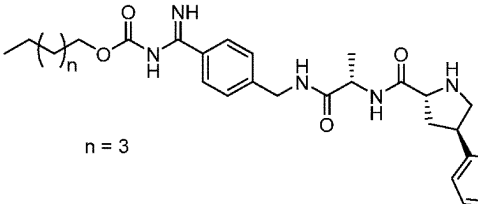
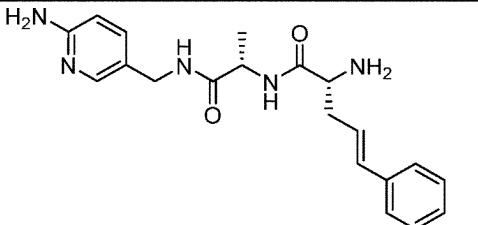
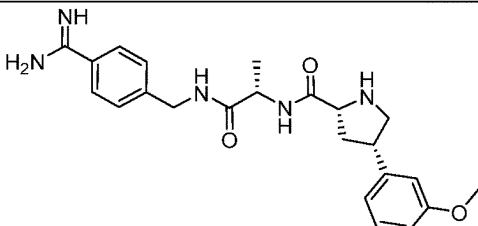
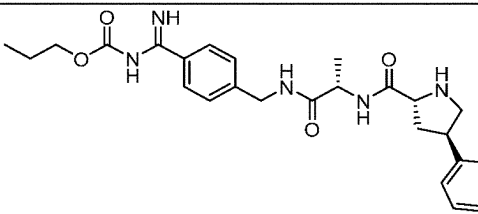
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1258		NA
1259		NA
1260	 n = 3	NA
1261		2HCl
1262		2HCl
1263		NA

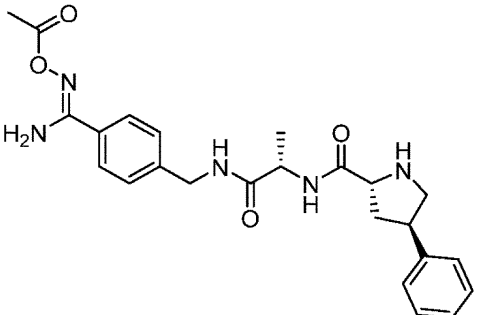
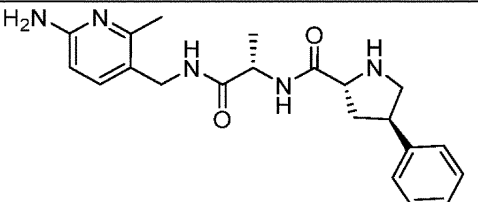
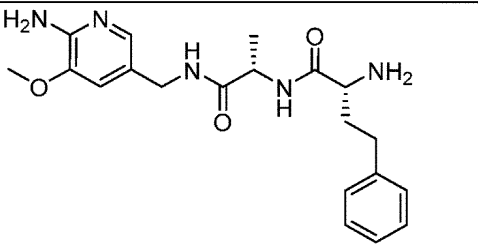
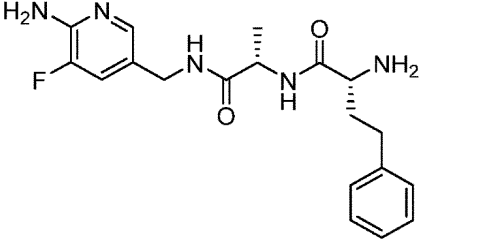
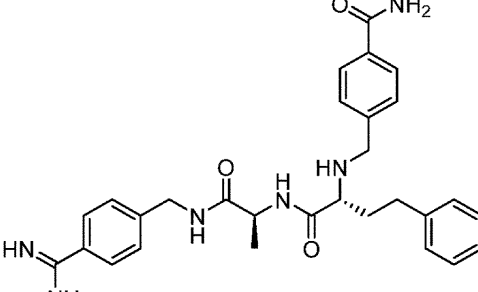
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1264		NA
1265		N/A
1266		2HCl
1267		2HCl
1268		2TFA

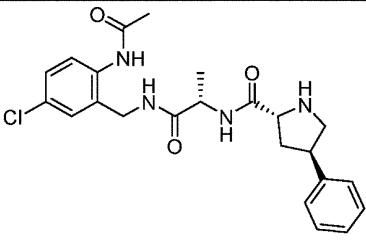
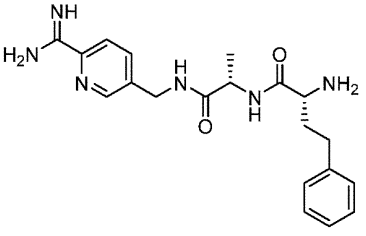
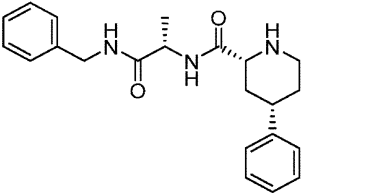
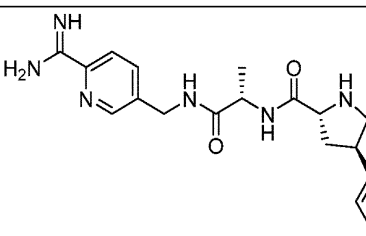
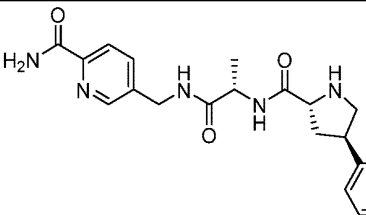
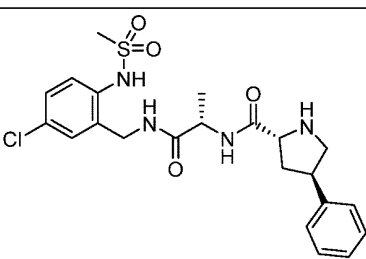
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1269		HCl
1270		2 HCl
1271		HCl
1272		2 HCl
1273		HCl
1274		HCl

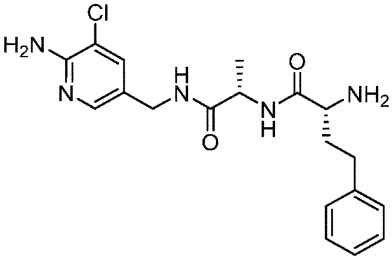
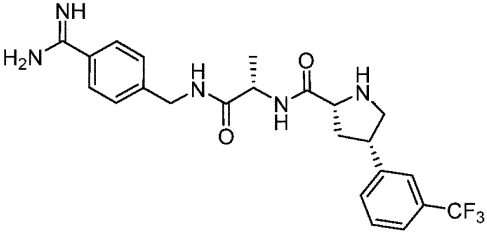
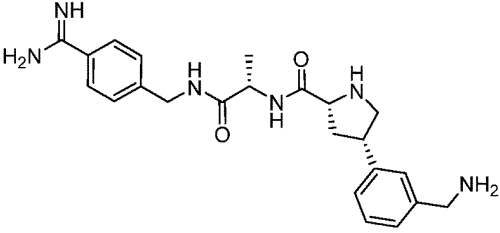
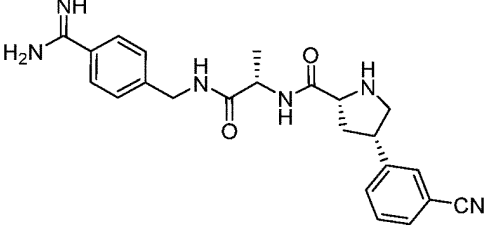
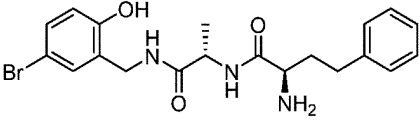
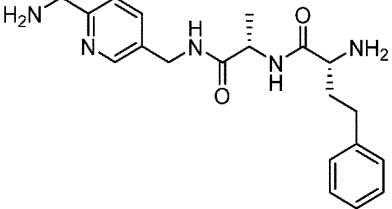
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1275		2HCl
1276		2HCl
1277		3HCl
1278		2HCl
1279		HCl
1280		2HCl

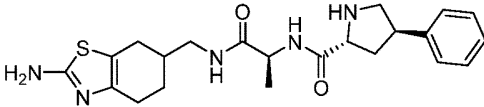
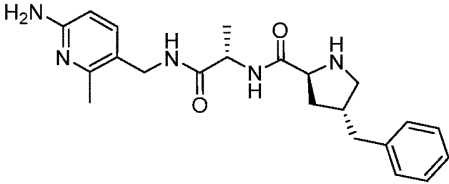
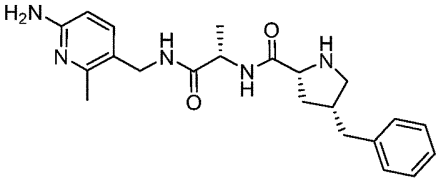
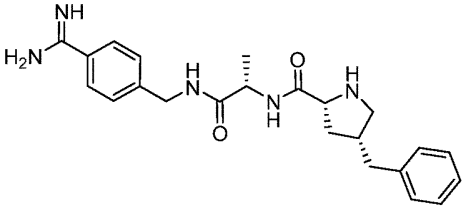
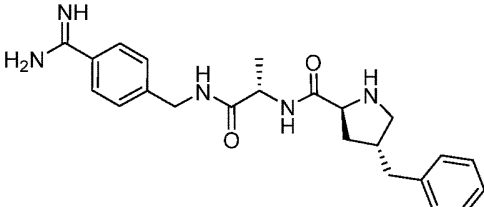
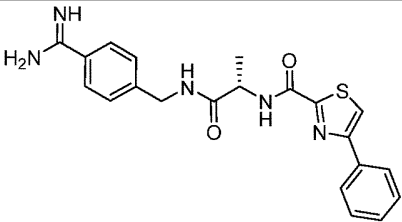
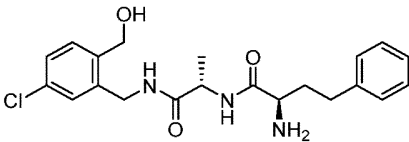
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1281		2TFA
1282		2HCl
1283		2HCl
1284		2TFA
1285		2HCl
1286		HCl
1287		HCl

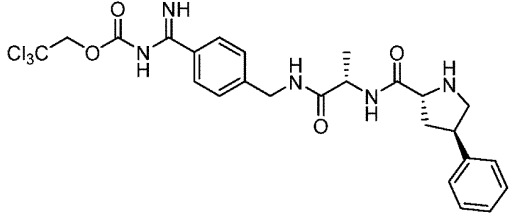
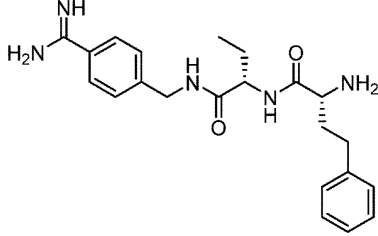
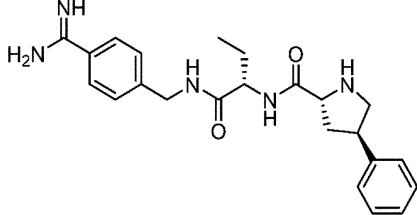
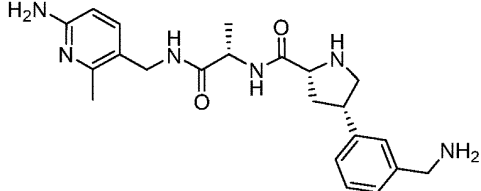
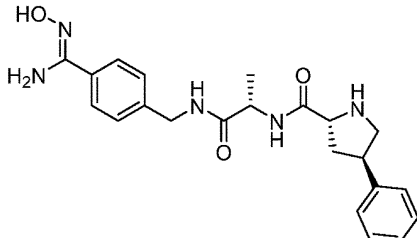
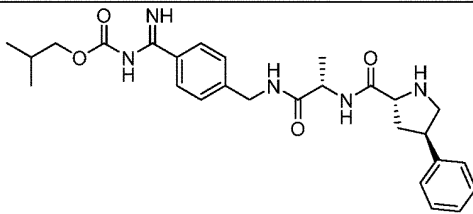
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1288		NA
1289		HCl
1290		HCl
1291		2HCl
1292		NA
1293		NA

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1294		NA
1295		NA
1296		2HCl
1297		2 HCl
1298		HCl
1299		HCl
1300		2TFA

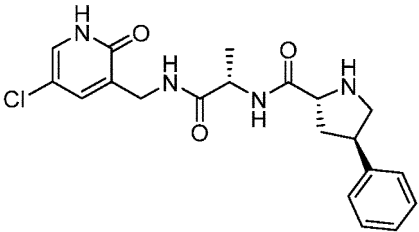
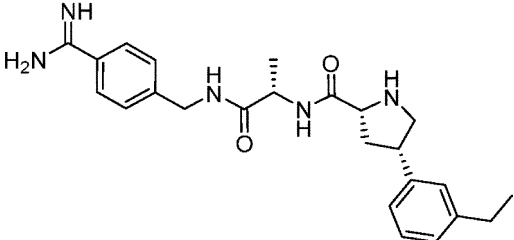
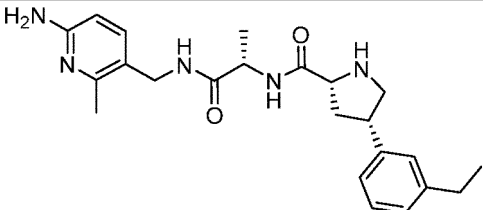
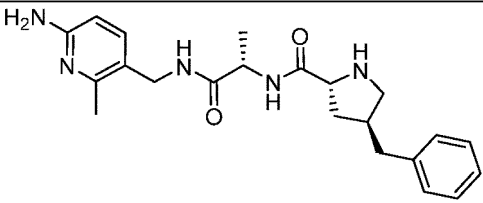
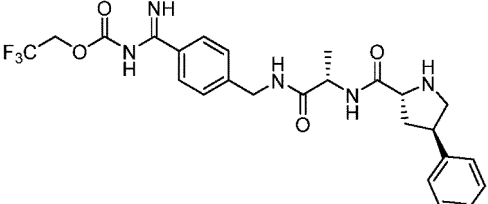
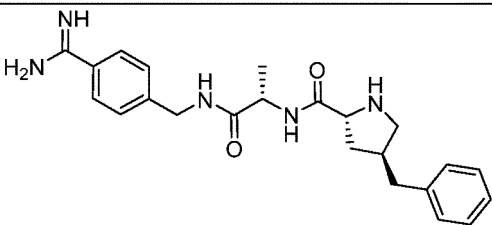
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1301		N/A
1302		2HCl
1303		2HCl
1304		2HCl
1305		NA
1306		2HCl

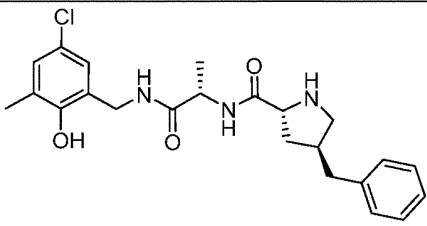
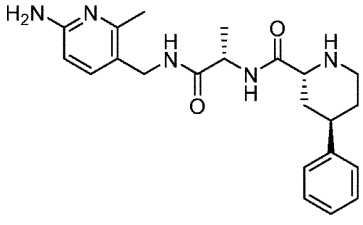
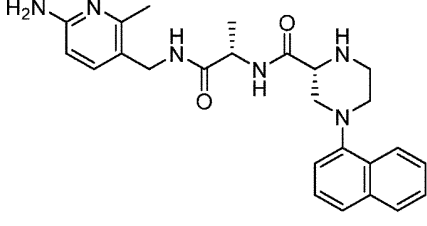
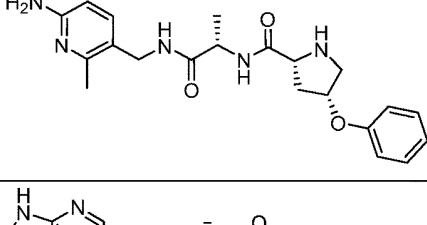
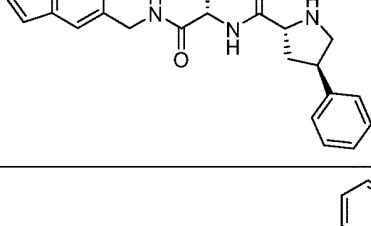
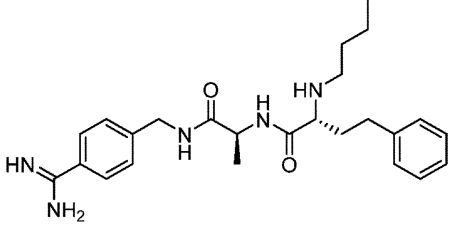
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1307		HCl
1308		2 HCl
1309		2 HCl
1310		2HCl
1311		2HCl
1312		2TFA

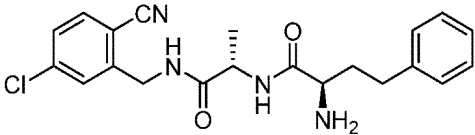
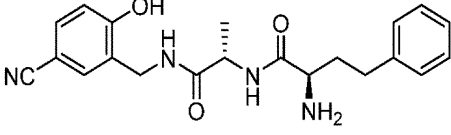
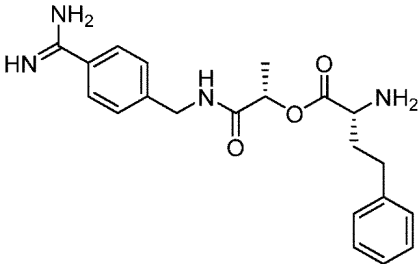
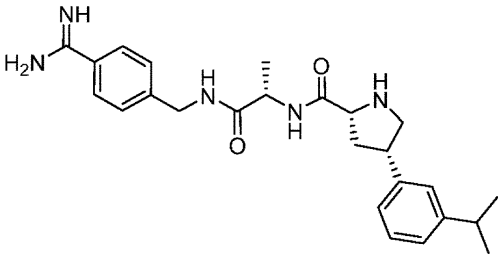
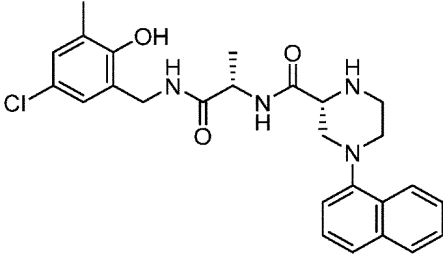
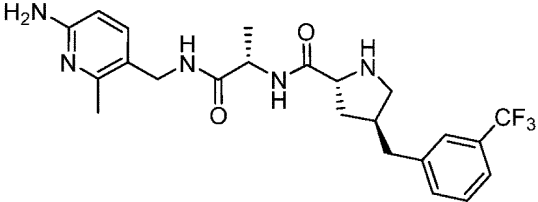
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1313		TFA
1314		TFA
1315		HCl
1316		2HCl
1317		HCl
1318		2HCl

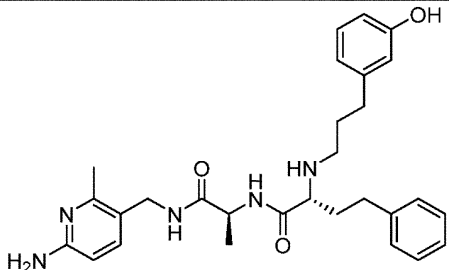
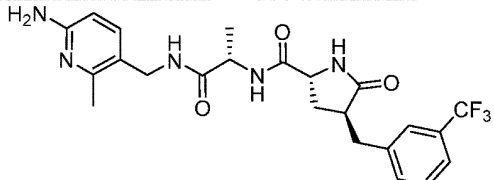
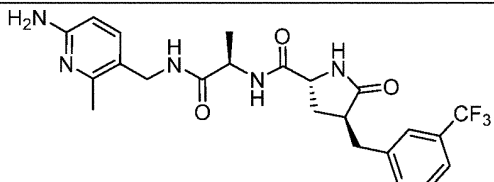
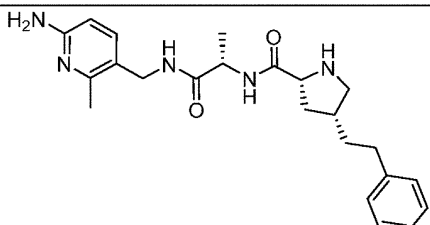
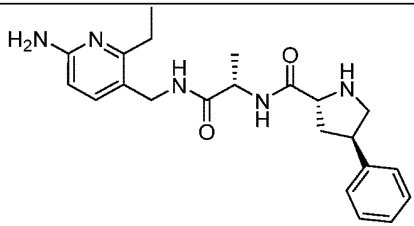
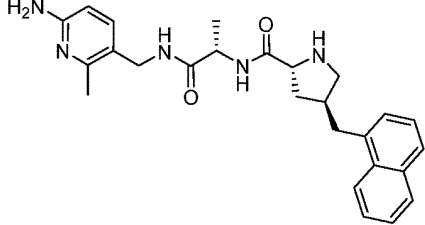
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1319		2HCl
1320		2TFA
1321		2TFA
1322		2HCl
1323		2HCl
1324		2TFA

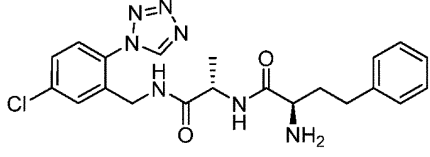
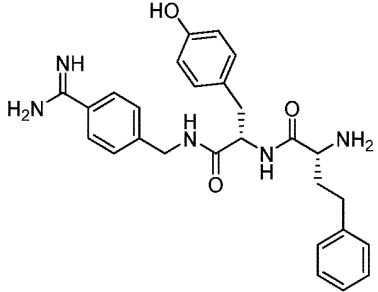
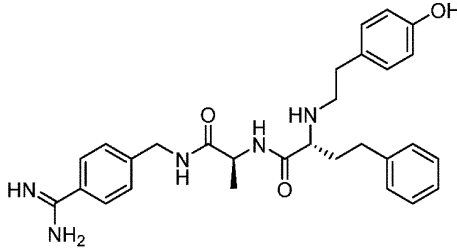
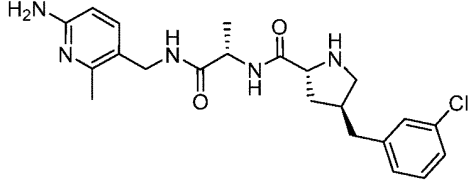
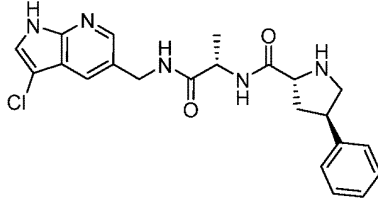
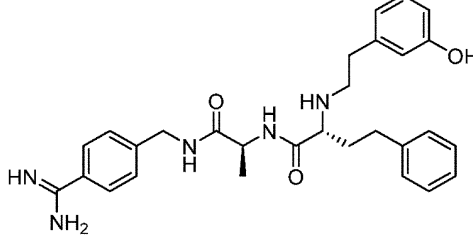
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1325		TFA
1326		2TFA
1327		2HCl
1328		2HCl
1329		2HCl
1330		2TFA

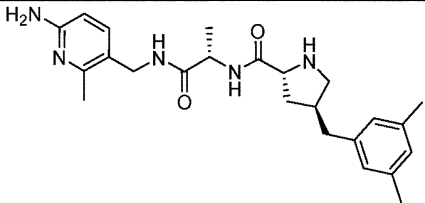
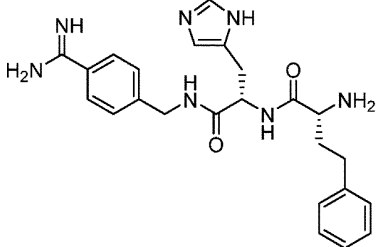
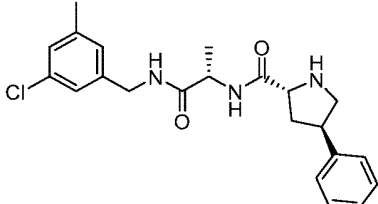
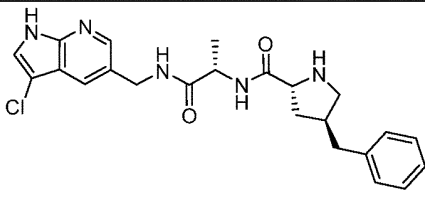
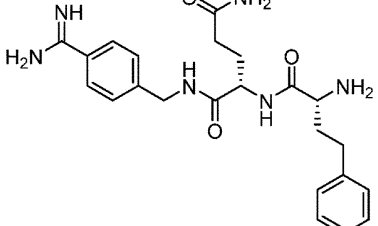
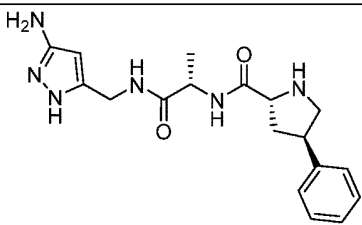
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1331		2HCl
1332		2TFA
1333		HCl
1334		2HCl
1335		2TFA
1336		2HCl

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1337		2HCl
1338		2HCl
1339		2TFA
1340		2HCl
1341		TFA
1342		2 HCl

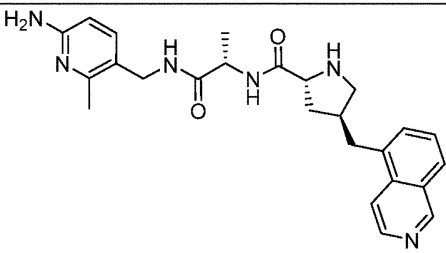
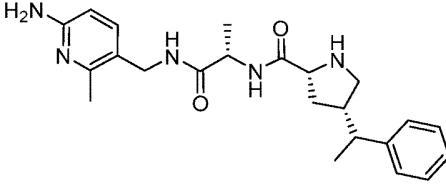
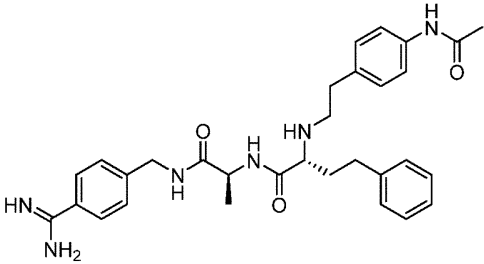
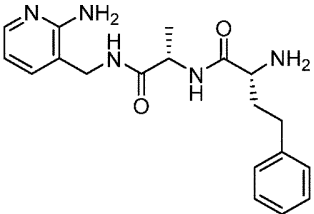
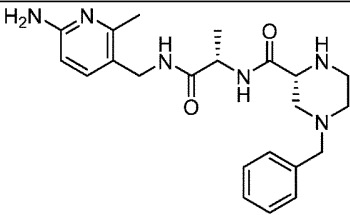
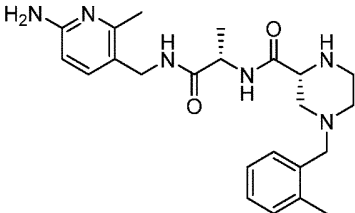
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1343		2TFA
1344		2HCl
1345		2HCl
1346		2HCl
1347		2 HCl
1348		2 HCl

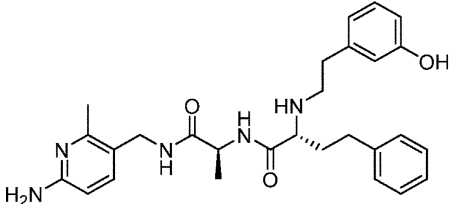
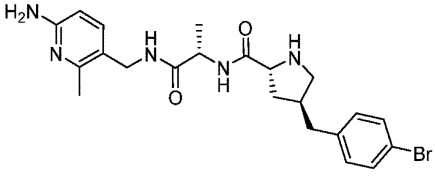
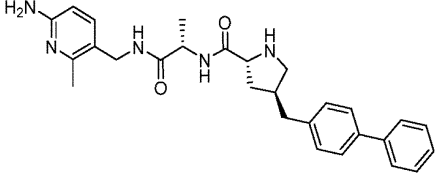
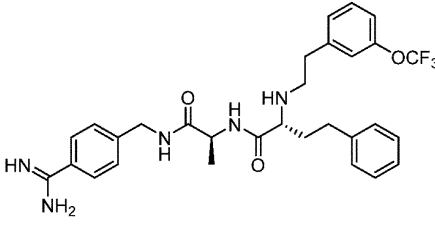
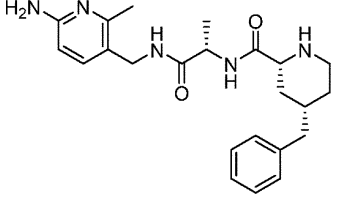
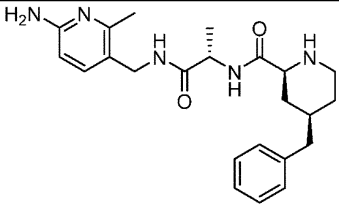
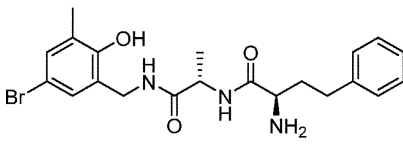
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1349		2HCl
1350		2HCl
1351		2HCl
1352		2TFA
1353		2 HCl
1354		2 HCl
1355		TFA

10

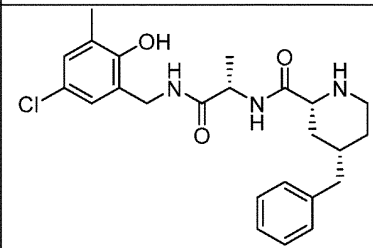
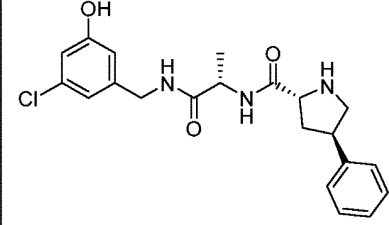
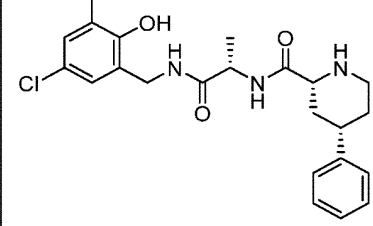
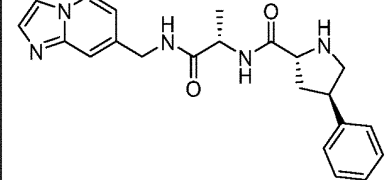
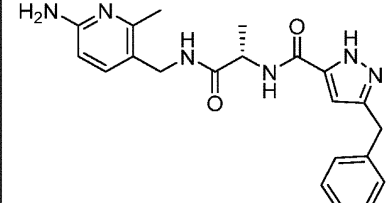
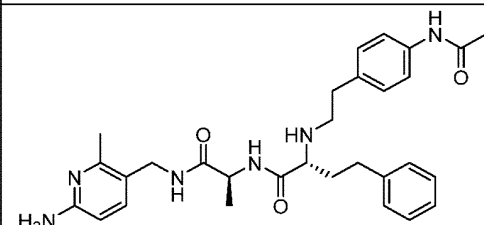
20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1356		TFA
1357		2TFA
1358		2TFA
1359		2TFA
1360		2TFA
1361		2TFA
1362		N/A

化合物番号	構造	塩
1363		HCl
1364		HCl
1365		HCl
1366		2HCl
1367		NA
1368		2HCl

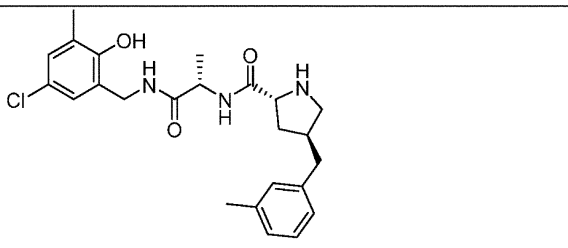
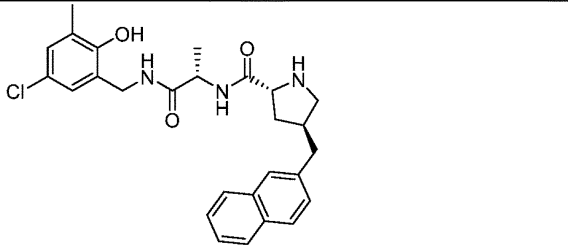
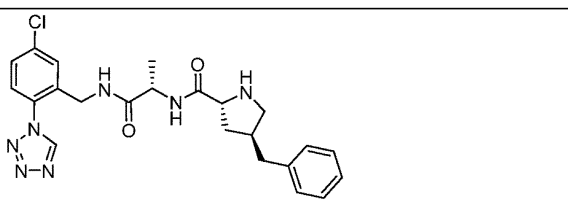
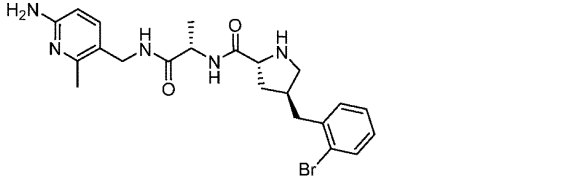
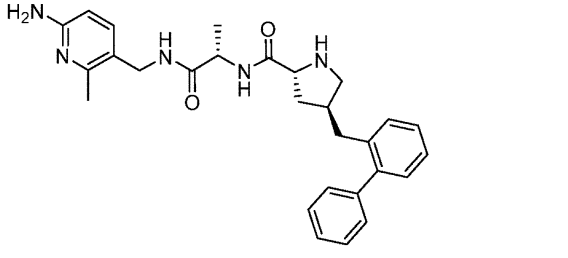
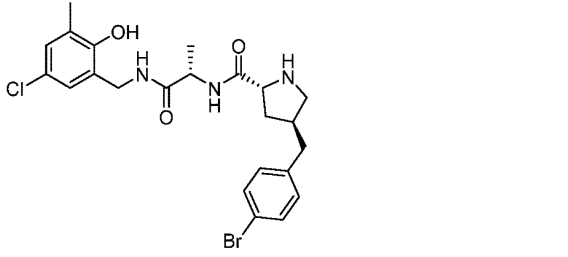
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1369		HCl
1370		TFA
1371		HCl
1372		2TFA
1373		2TFA
1374		HCl

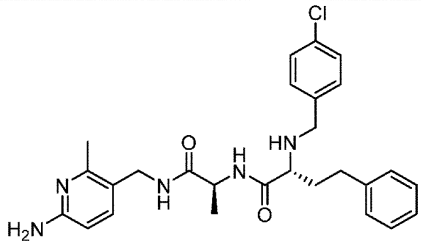
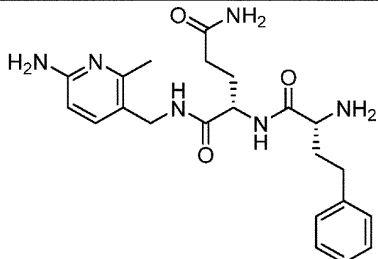
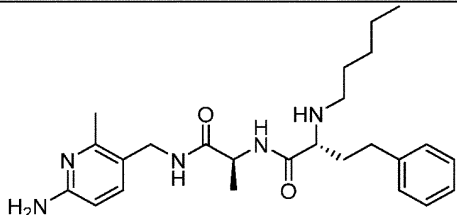
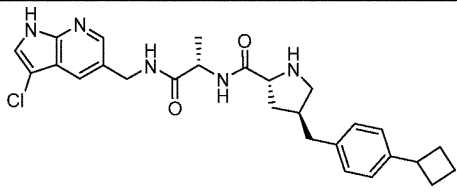
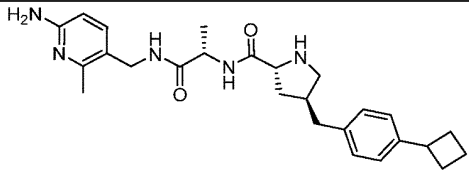
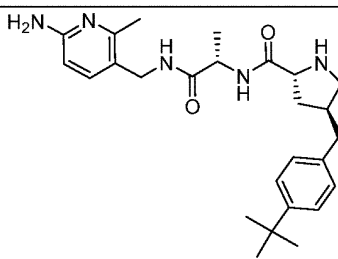
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1375		NA
1376		2TFA
1377		2TFA
1378		2TFA
1379		2TFA
1380		2 HCl

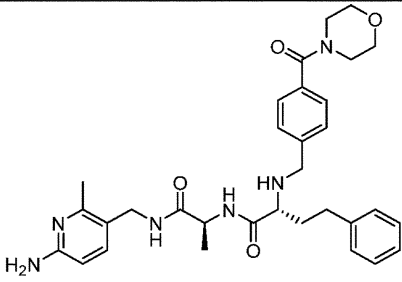
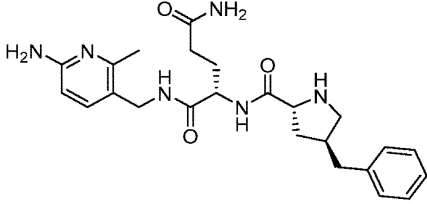
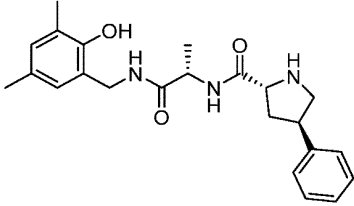
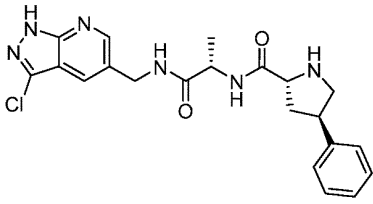
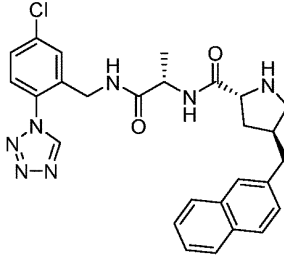
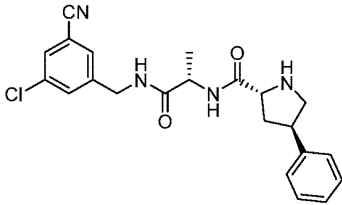
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1381		2TFA
1382		2TFA
1383		TFA
1384		2HCl
1385		TFA
1386		TFA

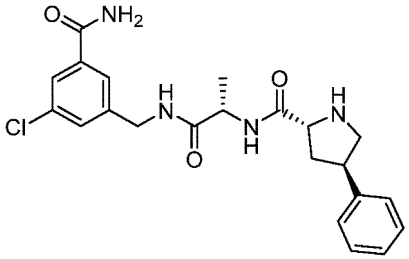
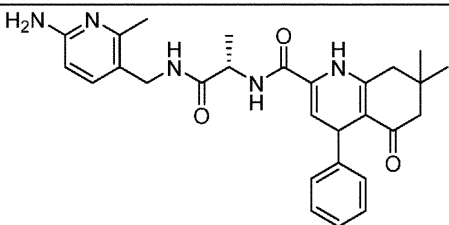
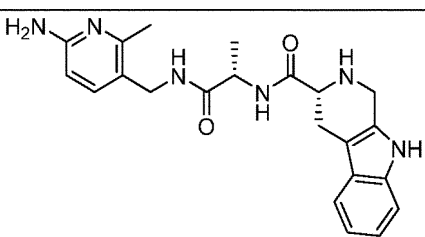
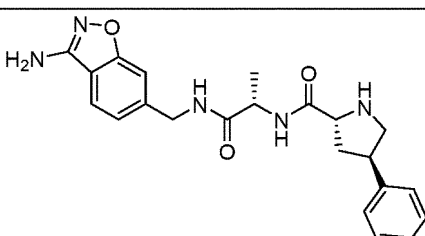
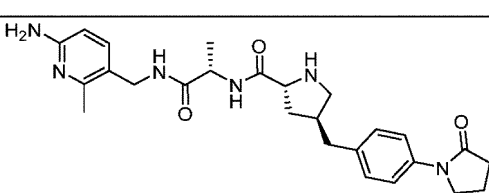
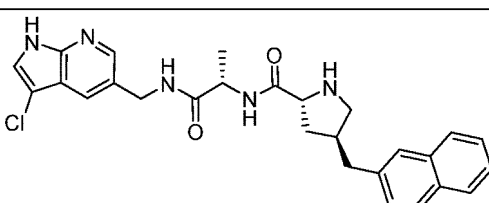
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1387		TFA
1388		NA
1389		2 HCl
1390		2TFA
1391		2TFA
1392		2TFA

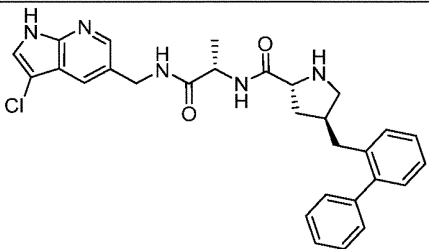
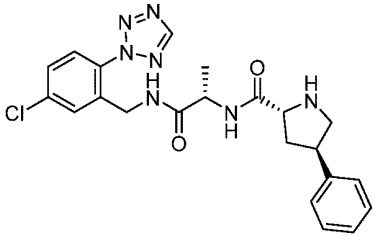
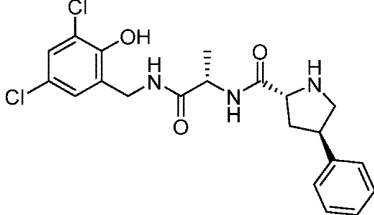
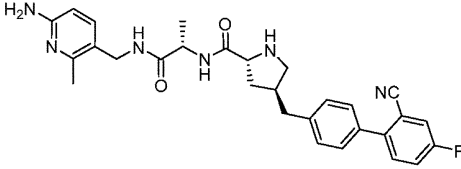
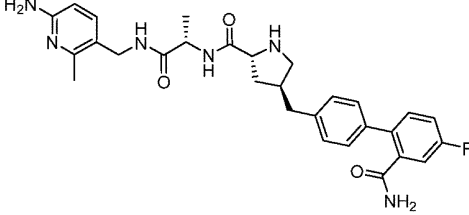
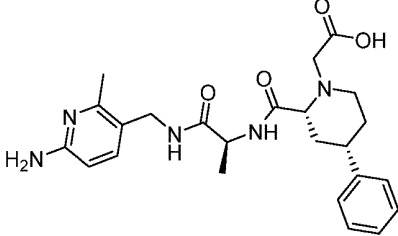
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1393		2TFA
1394		TFA
1395		TFA
1396		NA
1397		2TFA
1398		TFA

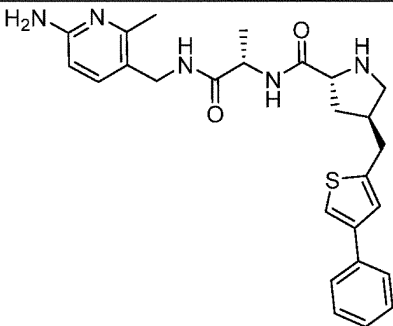
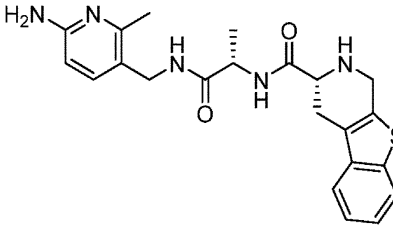
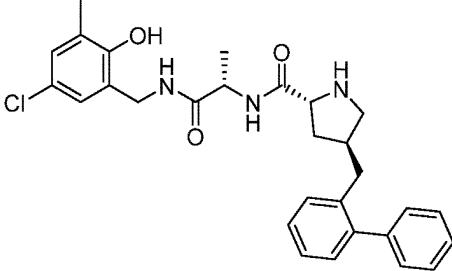
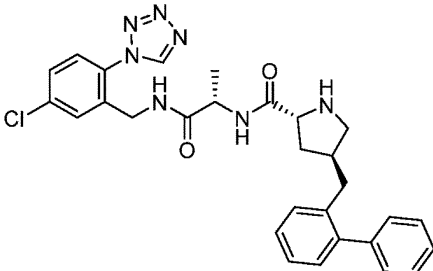
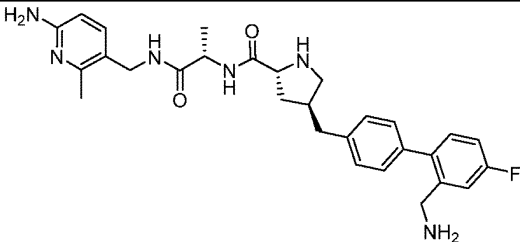
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1399		2 HCl
1400		2 HCl
1401		HCl
1402		TFA
1403		NA

10

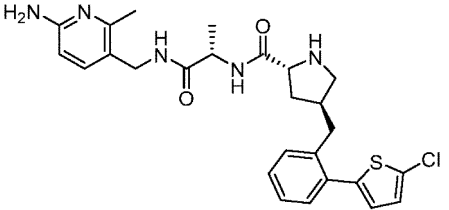
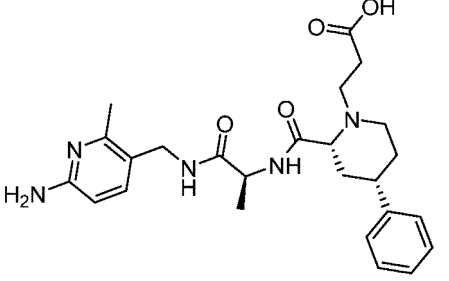
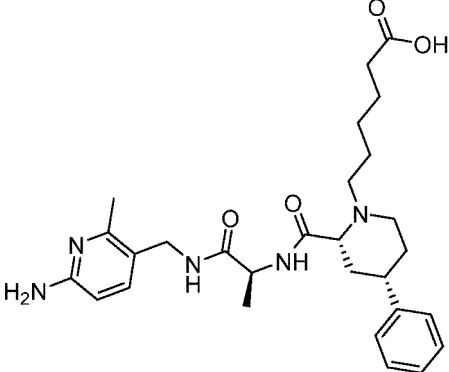
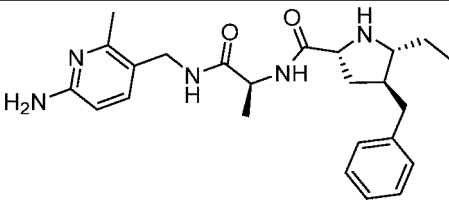
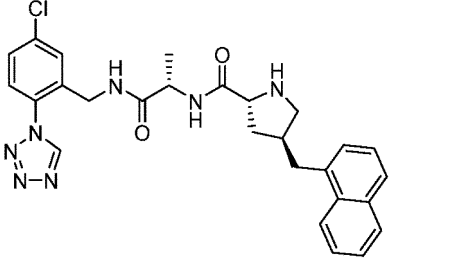
20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1404		HCl
1405		HCl
1406		2HCl
1407		2TFA
1408		HCl
1409		TFA

化合物番号	構造	塩
1410		TFA
1411		TFA
1412		TFA
1413		2TFA
1414		HCl

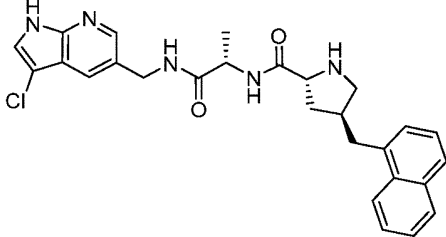
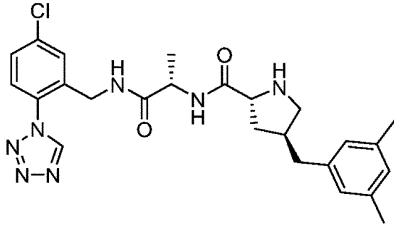
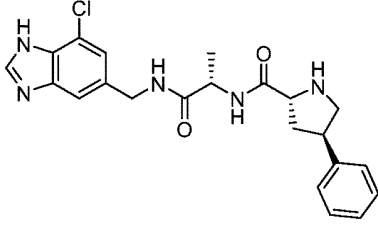
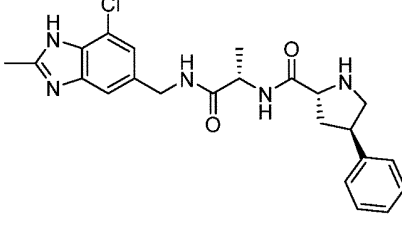
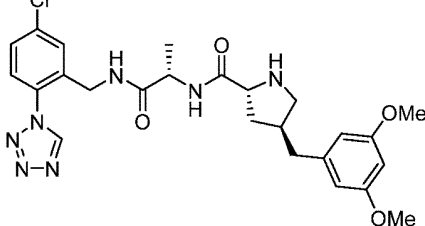
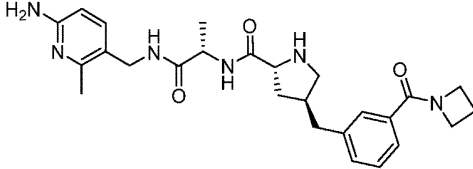
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1415		HCl
1416		HCl
1417		TFA
1418		TFA
1419		TFA
1420		2TFA

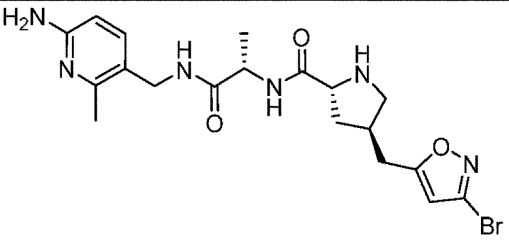
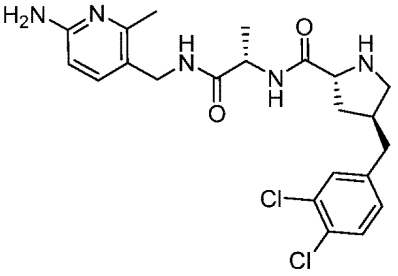
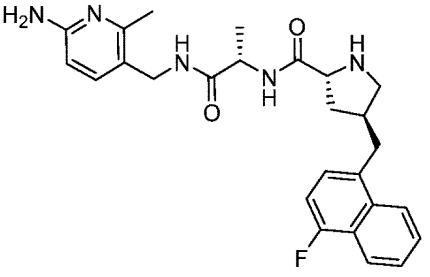
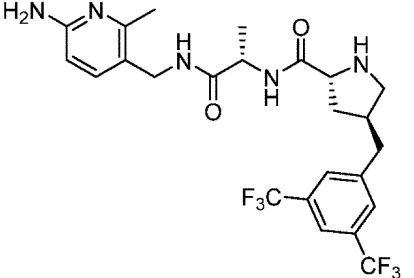
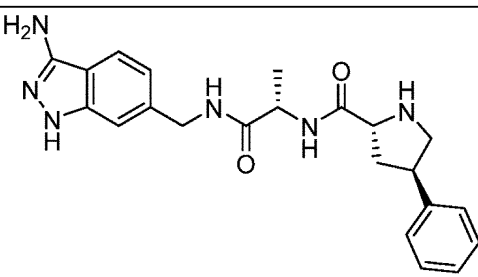
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1421		2TFA
1422		HCl
1423		HCl
1424		2TFA
1425		TFA

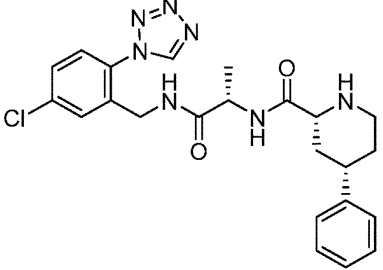
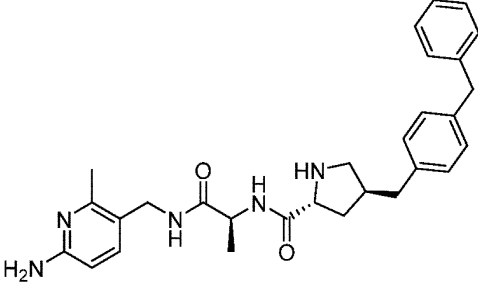
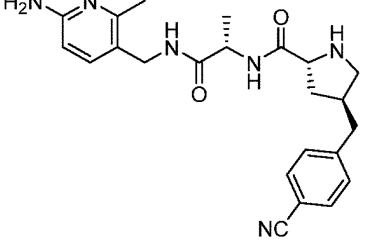
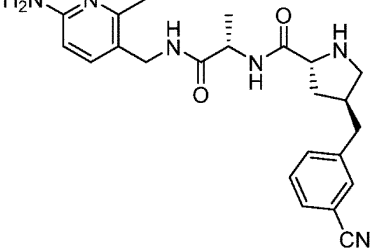
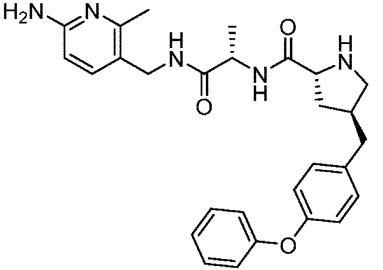
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1426		TFA
1427		2TFA
1428		2TFA
1429		2TFA
1430		2TFA

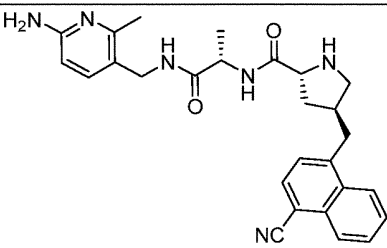
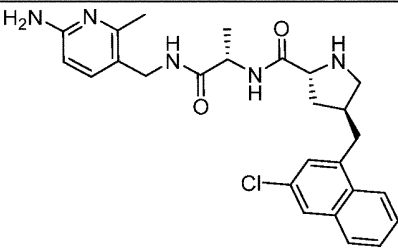
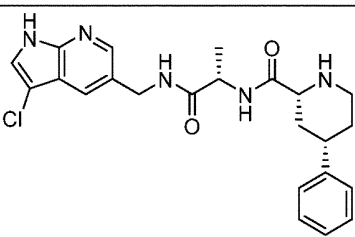
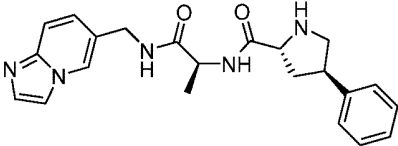
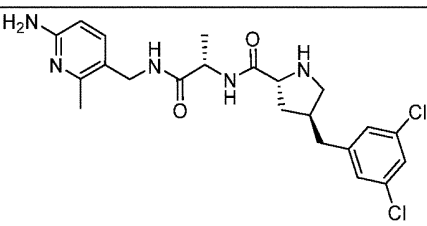
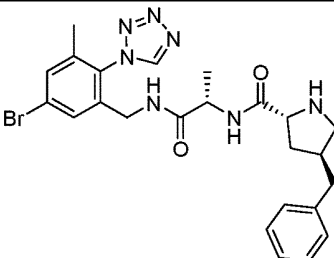
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1431		HCl
1432		HCl
1433		TFA
1434		2HCl
1435		2HCl
1436		TFA

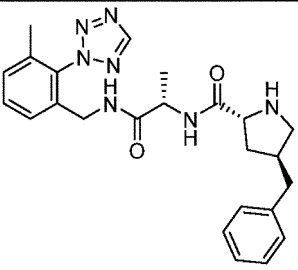
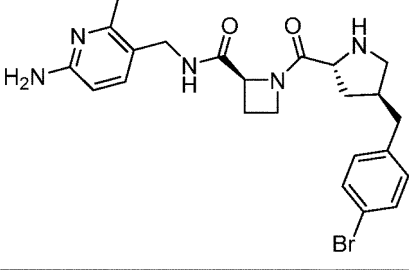
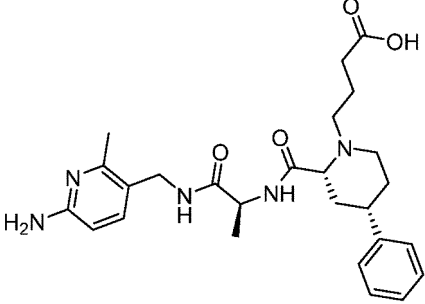
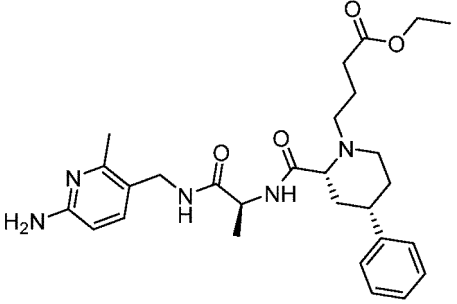
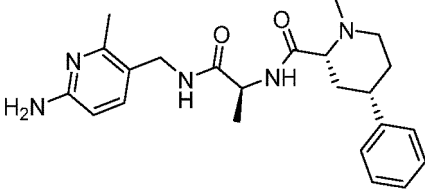
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1437		TFA
1438		2TFA
1439		TFA
1440		NA
1441		NA

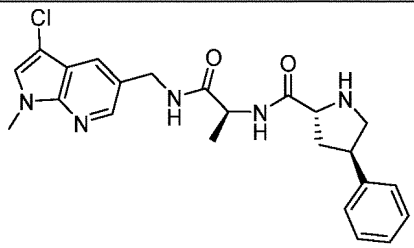
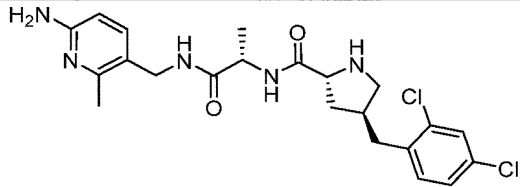
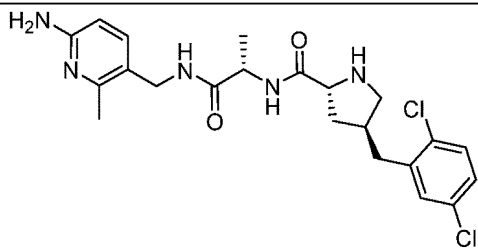
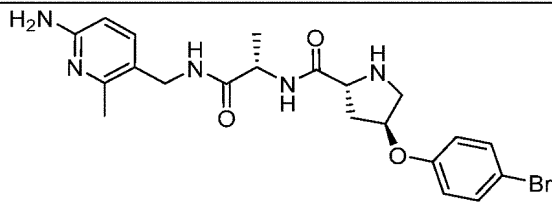
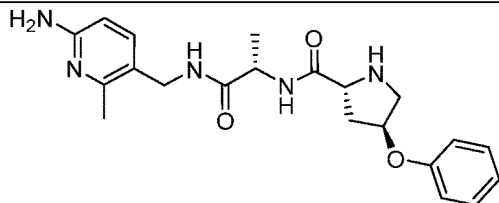
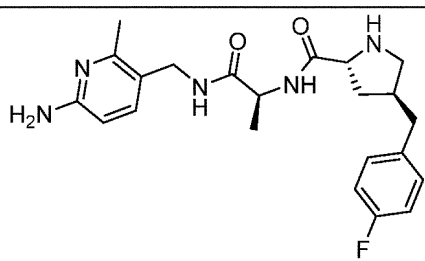
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1442		2HCl
1443		2HCl
1444		2HCl
1445		2HCl
1446		2HCl
1447		2TFA

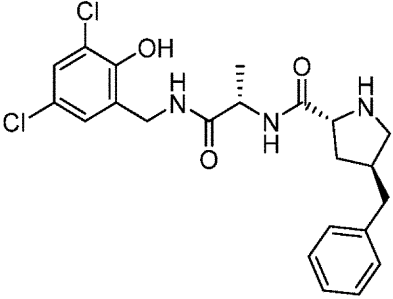
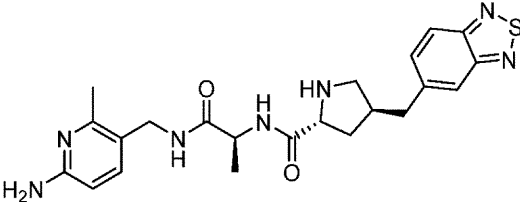
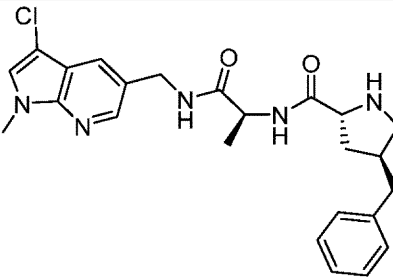
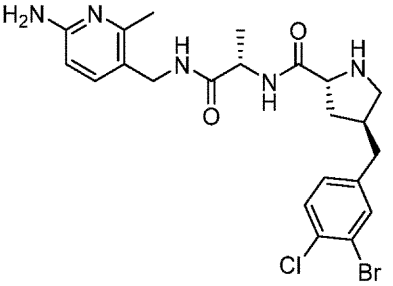
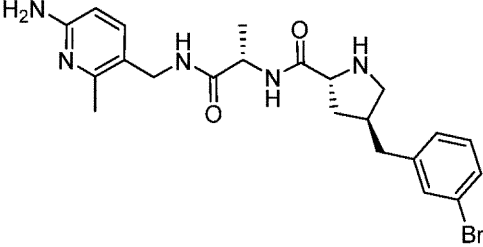
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1448		HCl
1449		2TFA
1450		2HCl
1451		2TFA
1452		2HCl

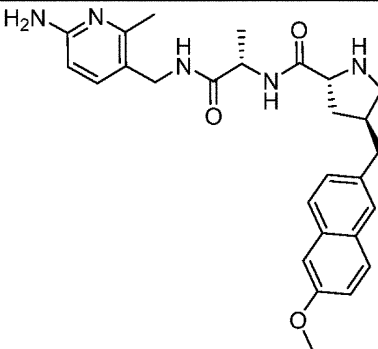
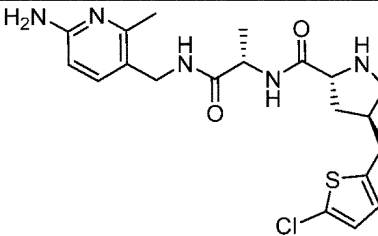
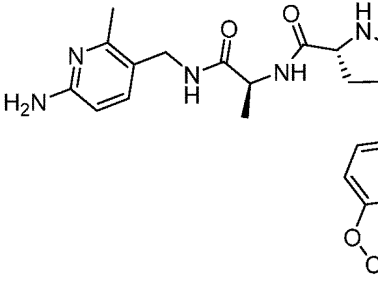
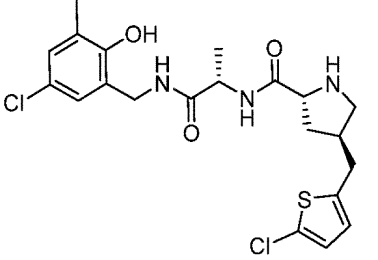
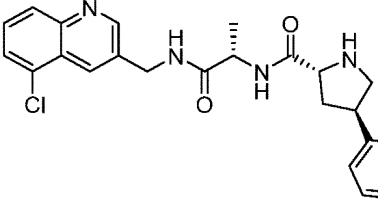
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1453		HCl
1454		HCl
1455		2TFA
1456		HCl
1457		HCl

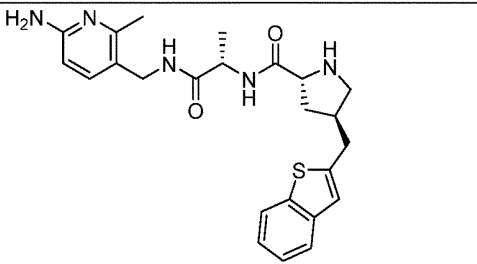
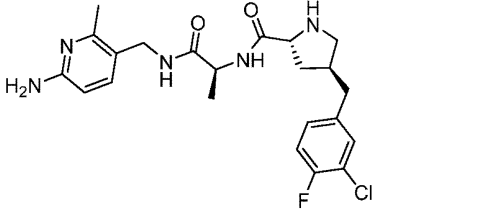
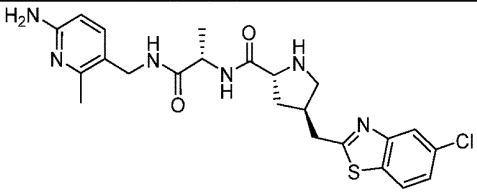
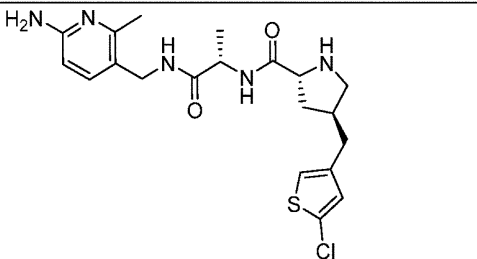
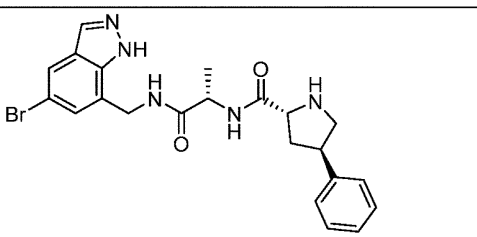
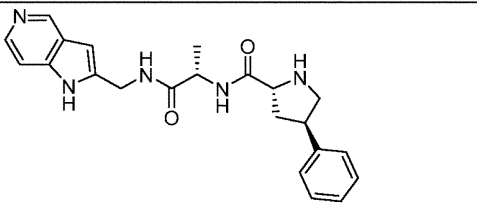
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1458		2TFA
1459		2TFA
1460		2TFA
1461		HCl
1462		TFA
1463		2TFA

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1464		NA
1465		2TFA
1466		2TFA
1467		TFA
1468		TFA
1469		HCl

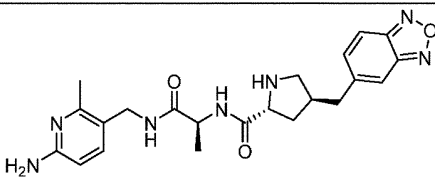
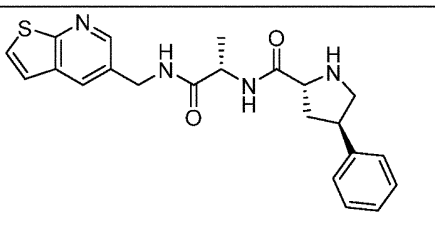
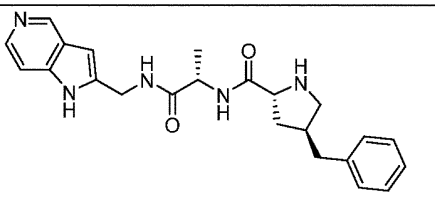
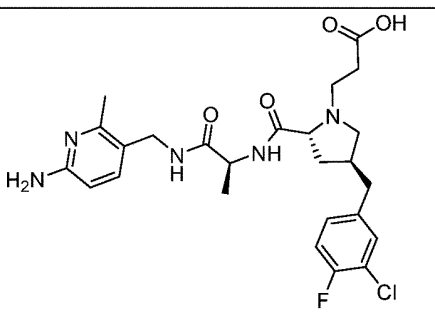
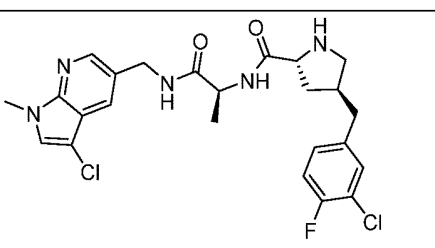
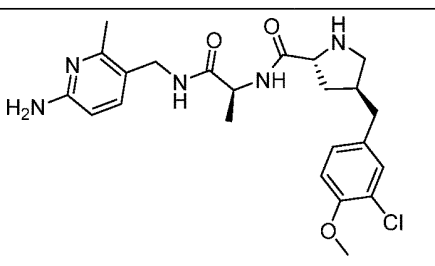
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1470		2TFA
1471		1TFA
1472		2TFA
1473		1TFA
1474		TFA
1475		2TFA

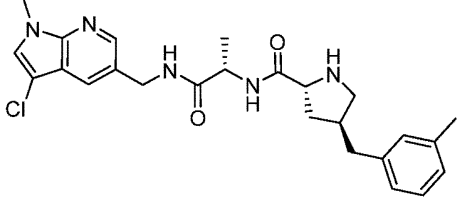
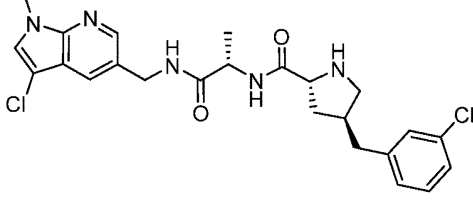
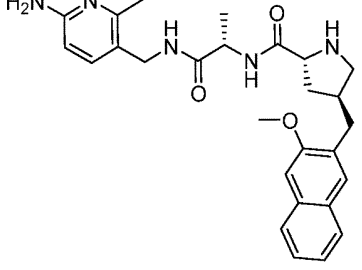
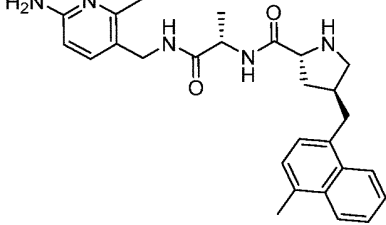
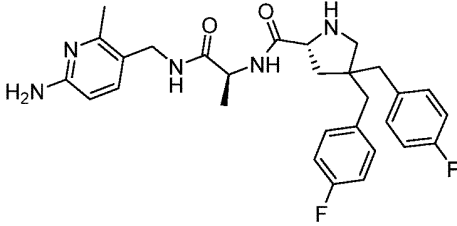
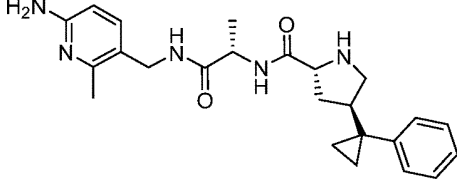
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1476		HCl
1477		TFA
1478		HCl
1479		HCl
1480		2TFA
1481		2TFA

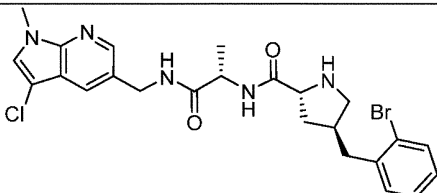
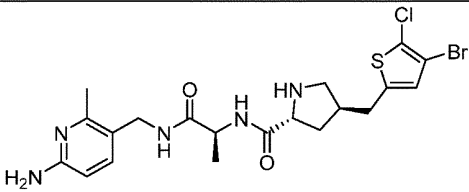
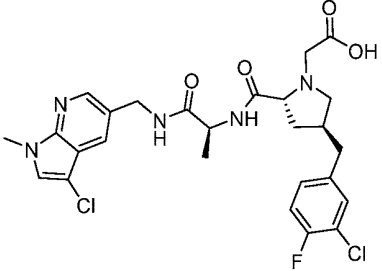
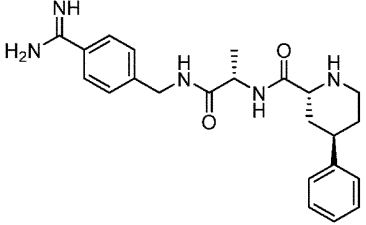
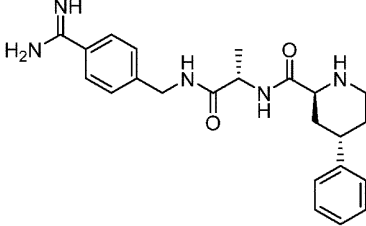
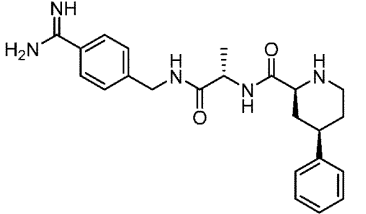
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1482		HCl
1483		2TFA
1484		1TFA
1485		2 HCl
1486		2 HCl
1487		2HCl

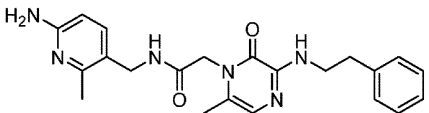
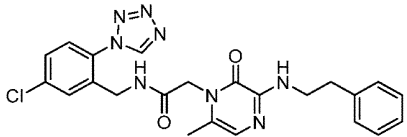
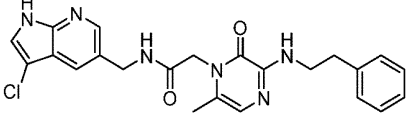
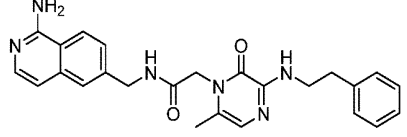
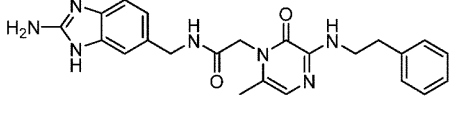
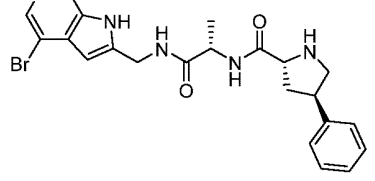
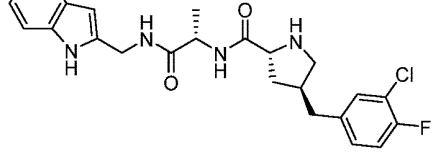
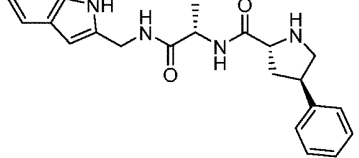
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
1488		NA
1489		NA
1490		AcOH
1491		TFA
1492		TFA
1493		2TFA
1494		2TFA
1495		2TFA

10

20

30

40

50

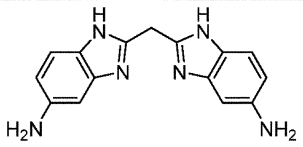
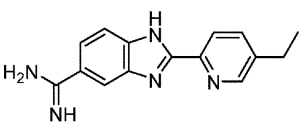
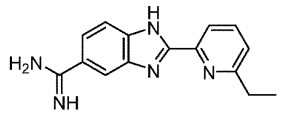
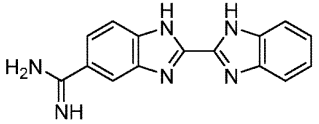
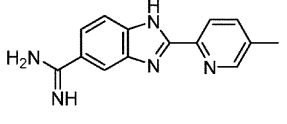
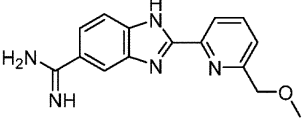
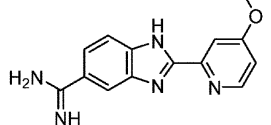
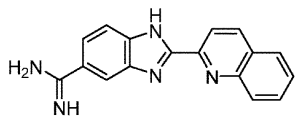
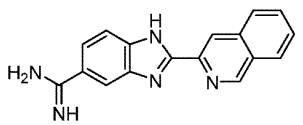
化合物番号	構造	塩
1496		NA
1497		2TFA
2000		2 HCl
2001		2 HCl
2002		2 HCl
2003		2 HCl
2004		2 HCl
2005		2 HCl

10

20

30

40

化合物番号	構造	塩
2006		
2007		2 HCl
2008		2 HCl
2009		2 HCl
2010		2 HCl
2011		2 HCl
2012		2 HCl
2013		2 HCl
2014		2 HCl

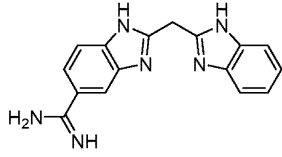
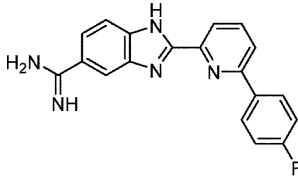
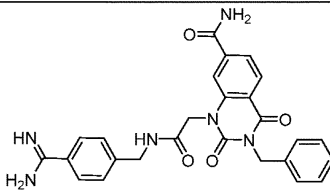
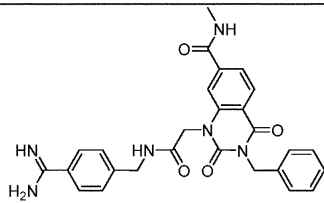
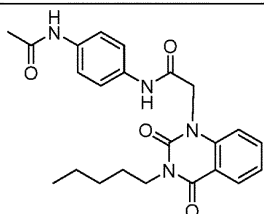
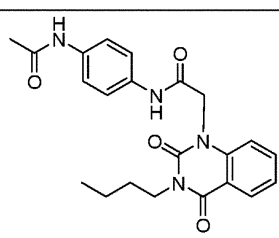
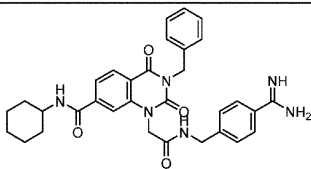
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
2015		2 HCl
2016		2 HCl
2017		HOAc
2018		HOAc
2019		N/A
2020		N/A
2021		N/A

【 0 2 2 3 】

(表 4 B) 例示的なMASP-2阻害化合物

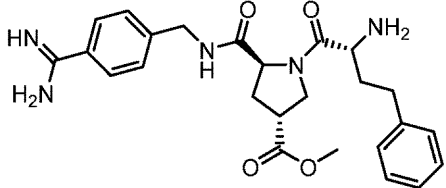
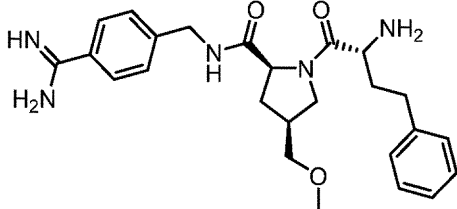
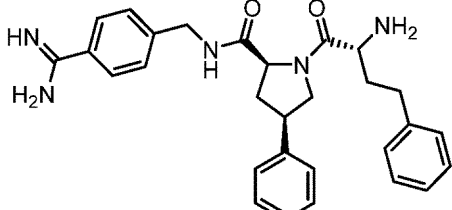
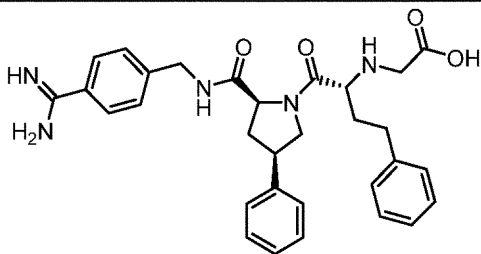
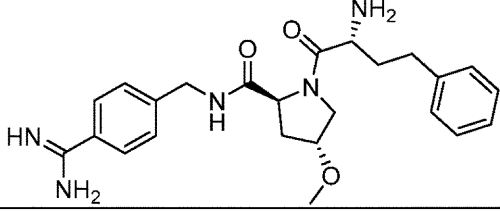
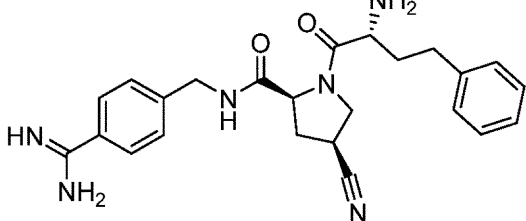
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
I-1		2TFA
I-2		2HCl
I-3		2HCl
I-4		-
I-5		-
I-6		2TFA

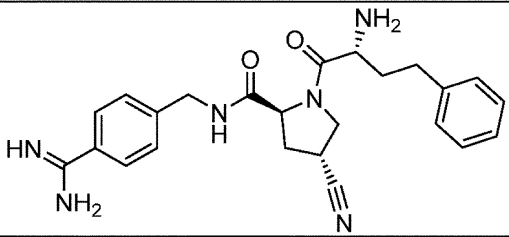
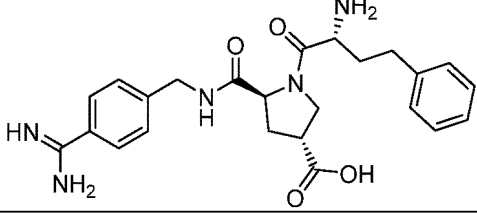
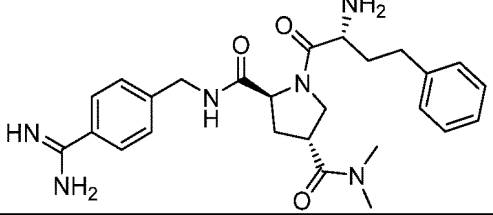
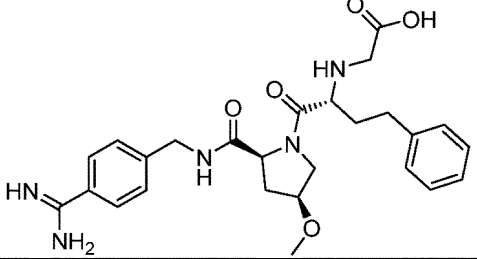
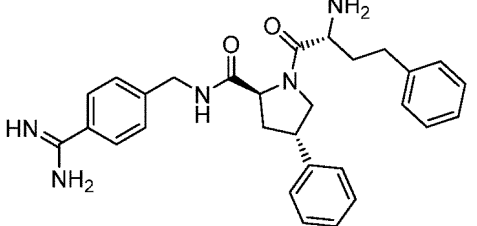
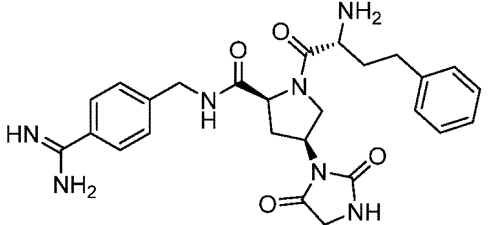
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
I-7		-
I-8		-
I-9		-
I-10		-
I-11		2HCl
I-12		-

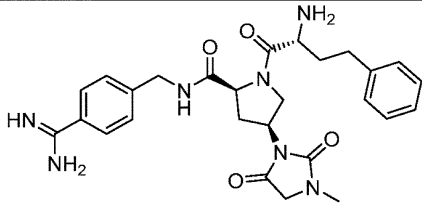
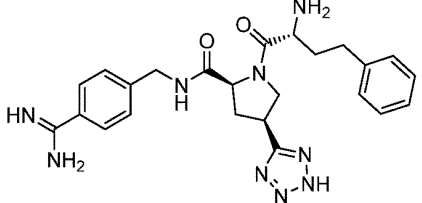
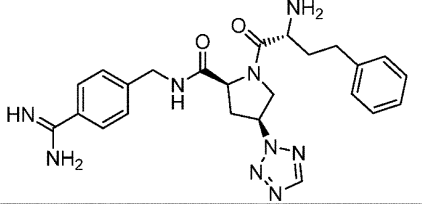
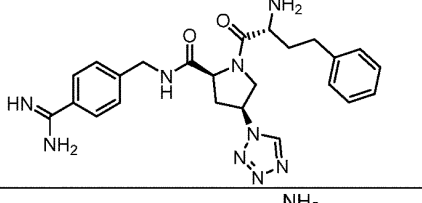
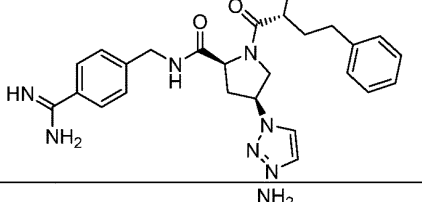
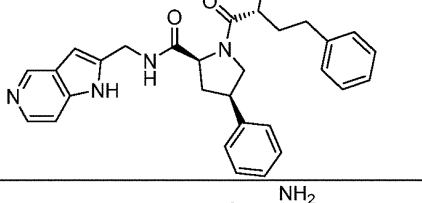
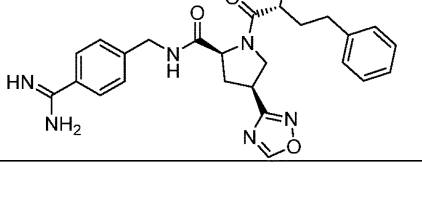
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
I-13		-
I-14		-
I-15		-
I-16		-
I-17		-
I-18		-
I-19		-

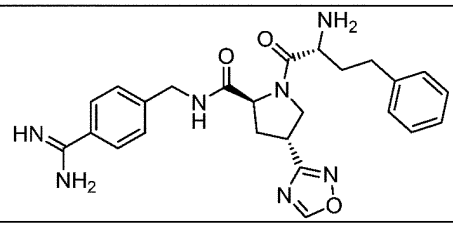
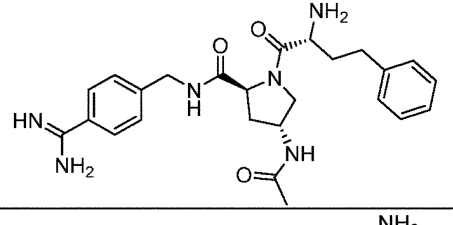
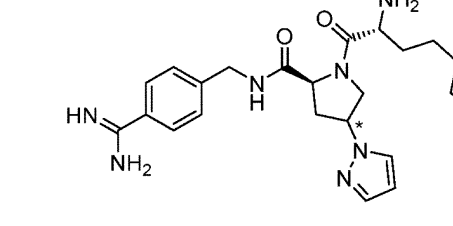
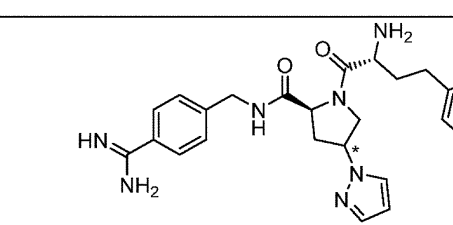
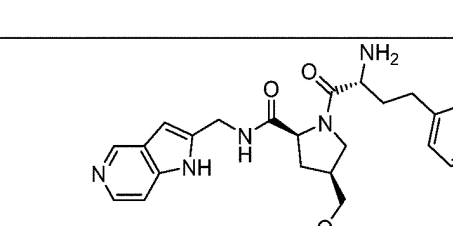
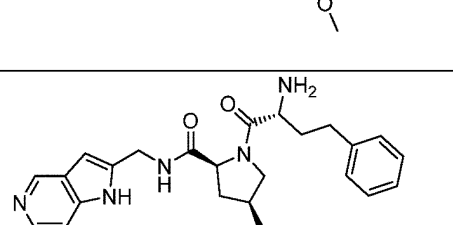
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
I-20		-
I-21		-
I-22		2HCl
I-23		2HCl
I-24		2TFA
I-25		2TFA

【 0 2 2 4 】

(表 4 C) 例示的なMASP-2阻害化合物

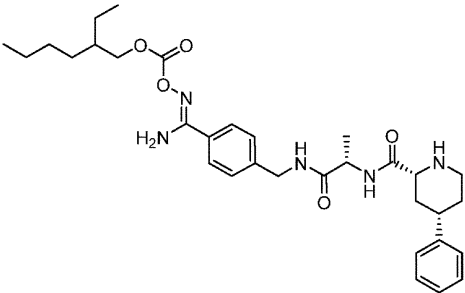
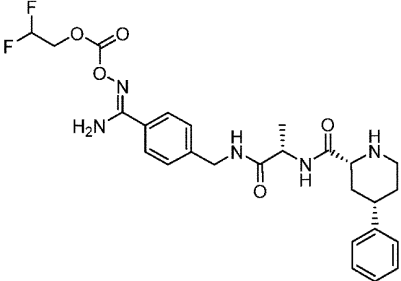
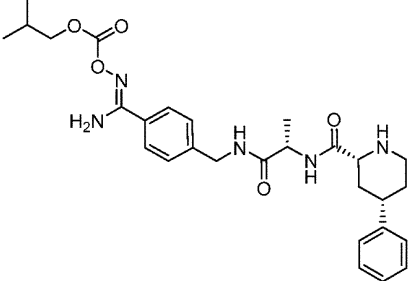
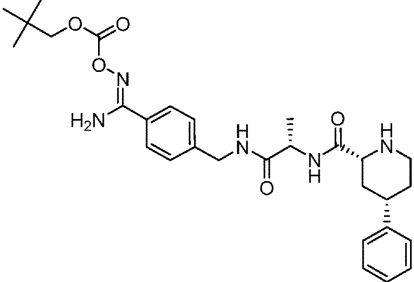
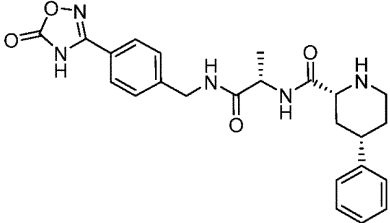
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
II-1		2TFA
II-2		2TFA
II-3		2TFA
II-4		2TFA
II-5		1TFA

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
II-6		2TFA
II-7		2HCl
II-8		1TFA
II-9		1TFA
II-10		2TFA

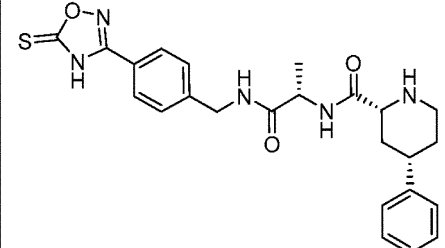
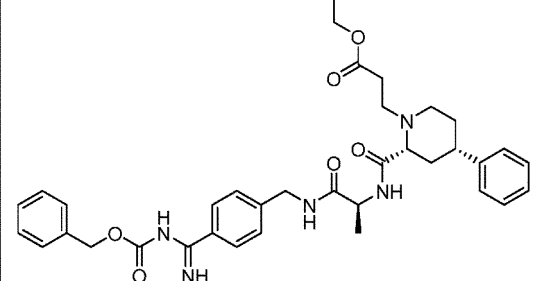
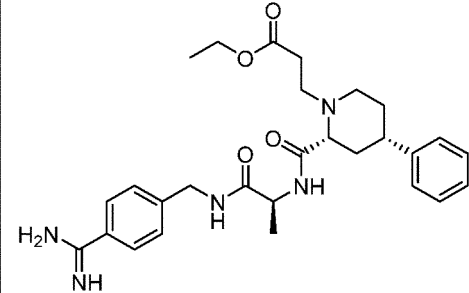
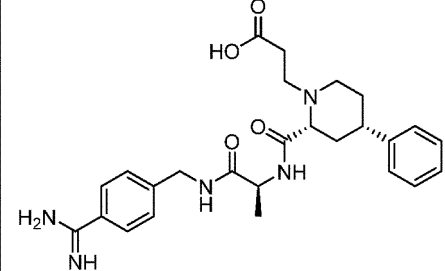
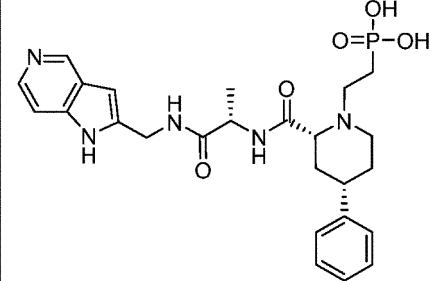
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
II-11		1TFA
II-12		-
II-13		-
II-14		2TFA
II-15		2TFA

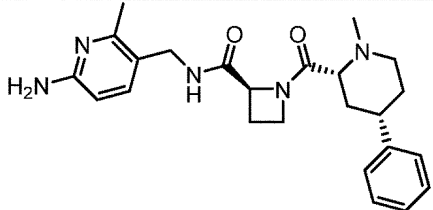
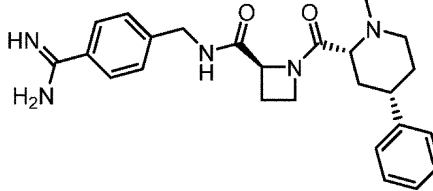
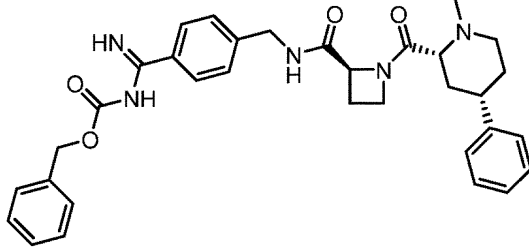
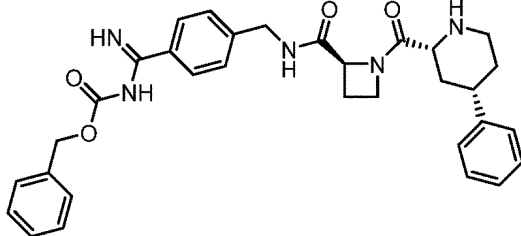
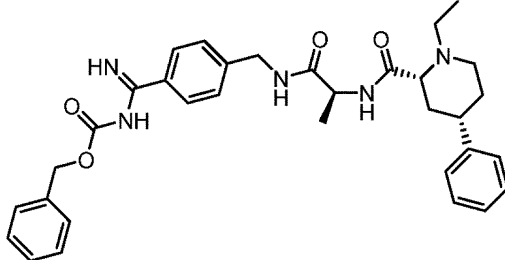
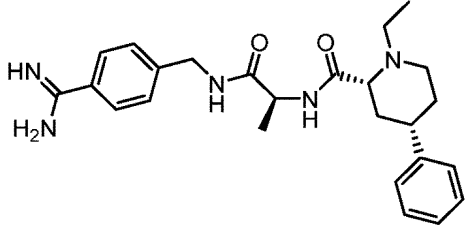
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
II-16		2TFA
II-17		2TFA
II-18		2TFA
II-19		2TFA
II-20		-
II-21		-

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
II-22		-
II-23		1HCl
II-24		1HCl
II-25		-
II-26		-
II-27		-

10

20

30

40

50

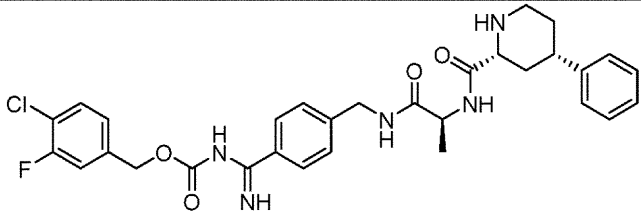
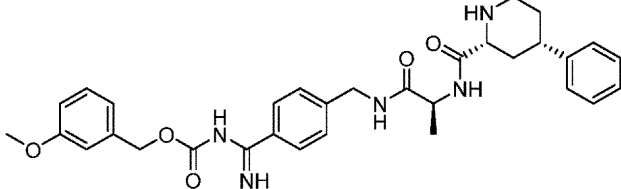
化合物番号	構造	塩
II-28		-
II-29		-
II-30		1TFA
II-31		2TFA
II-32		2TFA
II-33		2TFA
II-34		2TFA

10

20

30

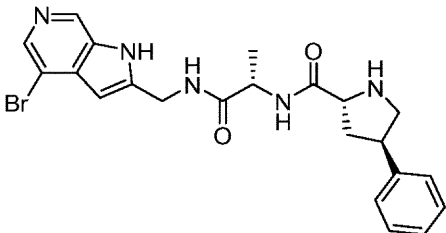
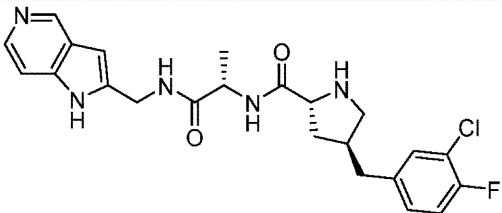
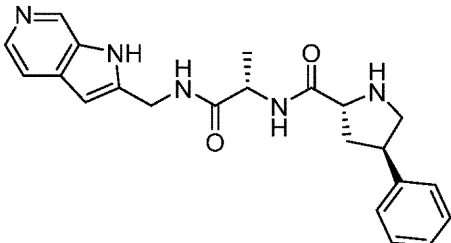
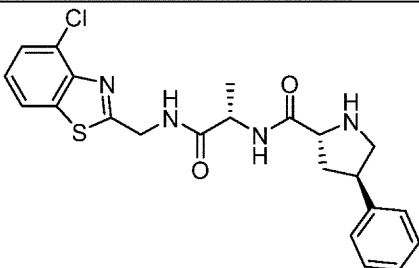
40

化合物番号	構造	塩
II-35		2TFA
II-36		2TFA

10

【 0 2 2 5 】

(表 4 D) 例示的なMASP-2阻害化合物

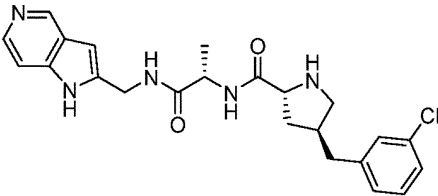
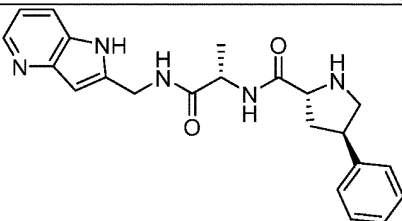
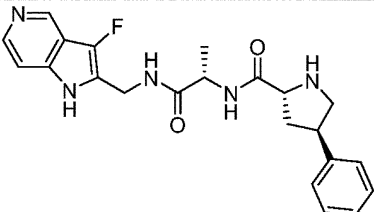
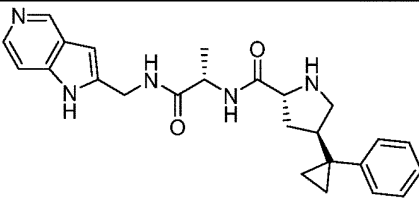
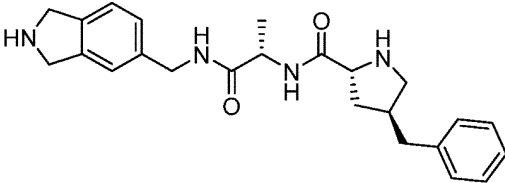
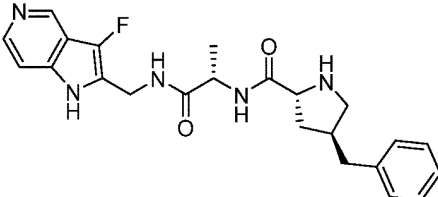
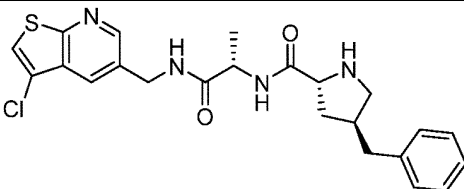
化合物番号	構造	塩
III-1		2TFA
III-2		2TFA
III-3		2TFA
III-4		TFA

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-5		2TFA
III-6		2TFA
III-7		2TFA
III-8		2TFA
III-9		2TFA
III-10		2TFA
III-11		TFA

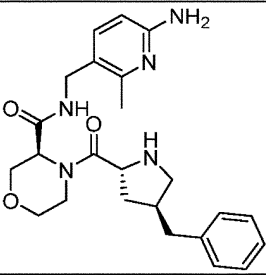
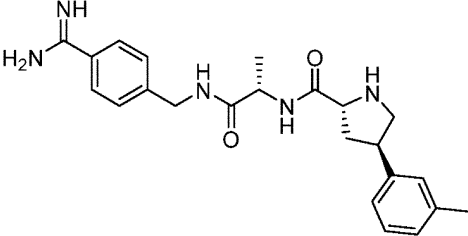
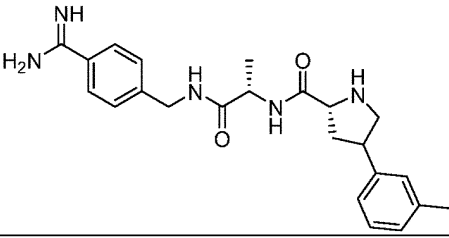
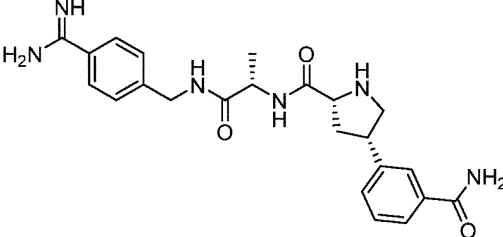
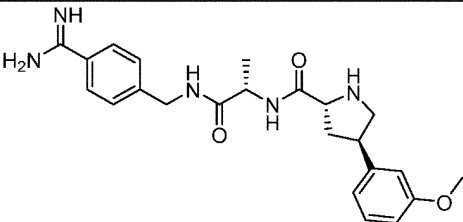
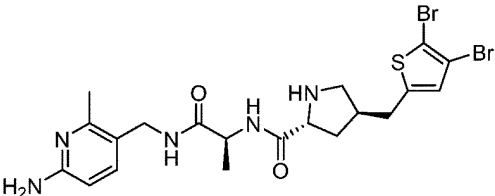
10

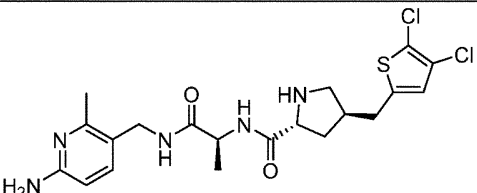
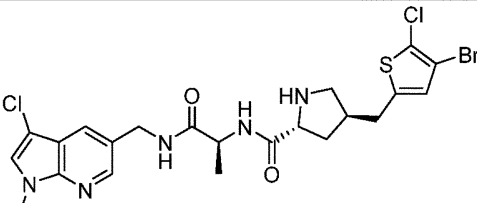
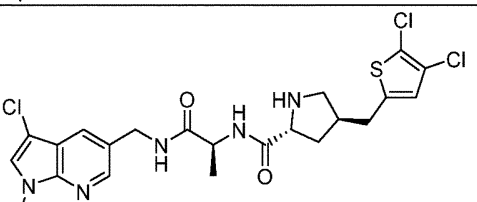
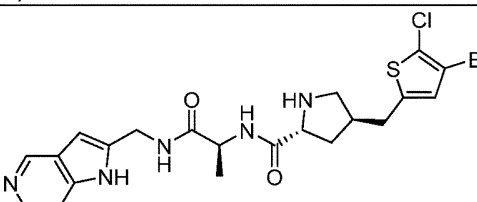
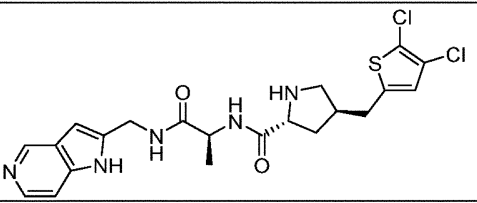
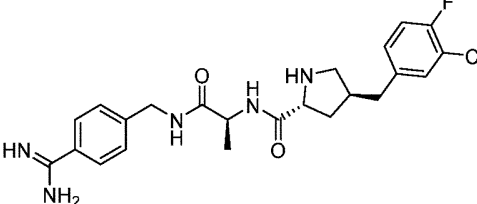
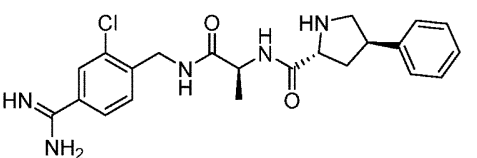
20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-12		2TFA
III-13		-
III-14		-
III-15		2TFA
III-16		2HCl
III-17		2TFA

化合物番号	構造	塩
III-18		2TFA
III-19		TFA
III-20		TFA
III-21		2TFA
III-22		2TFA
III-23		2TFA
III-24		2TFA

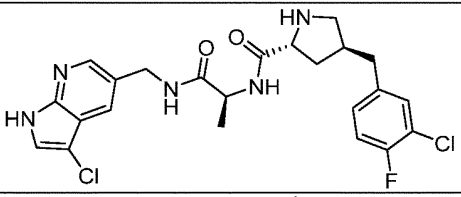
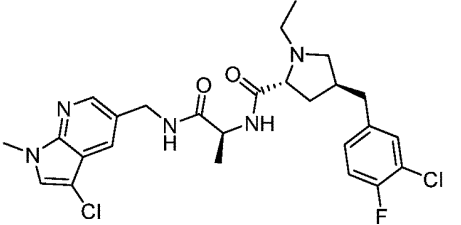
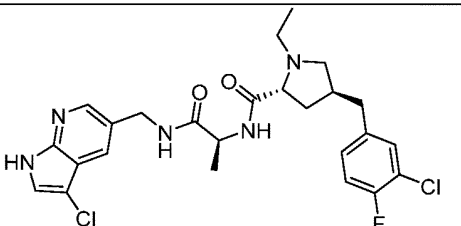
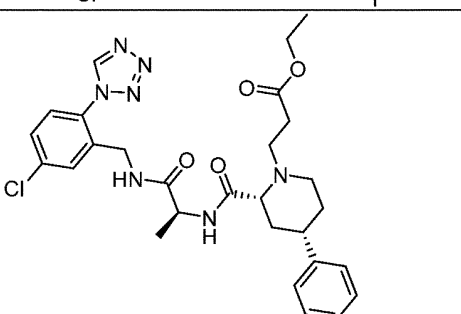
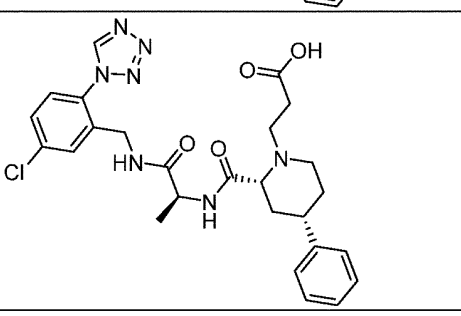
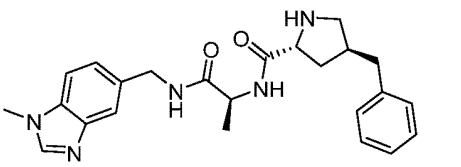
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-25		2TFA
III-26		-
III-27		-
III-28		-
III-29		TFA
III-30		TFA

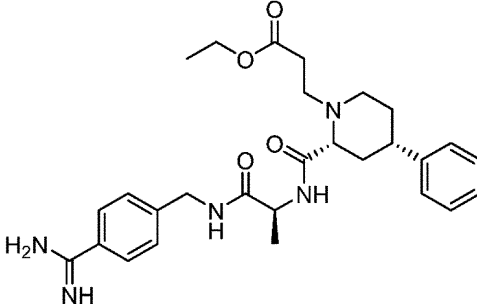
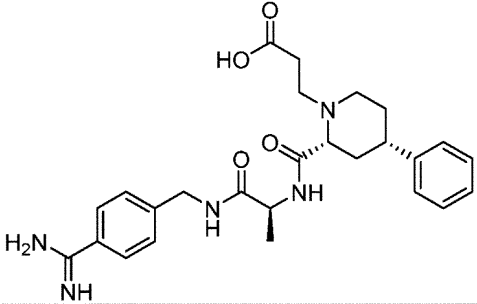
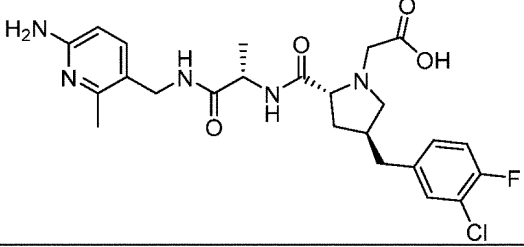
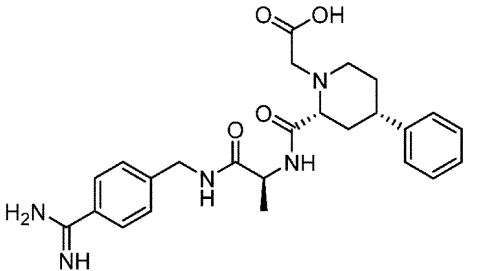
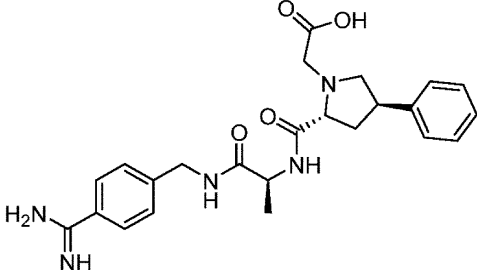
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-31		-
III-32		2TFA
III-33		2TFA
III-34		2TFA
III-35		2TFA

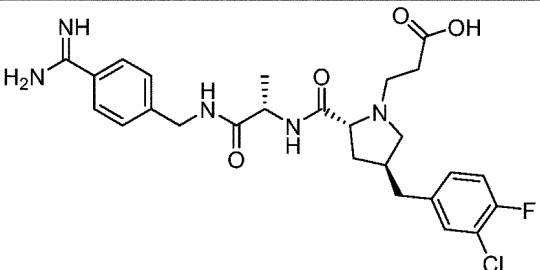
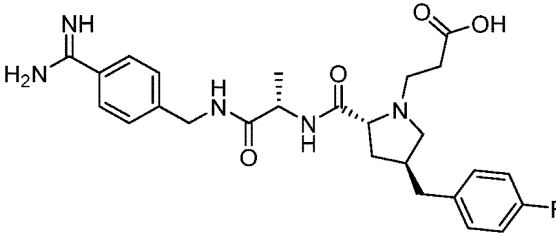
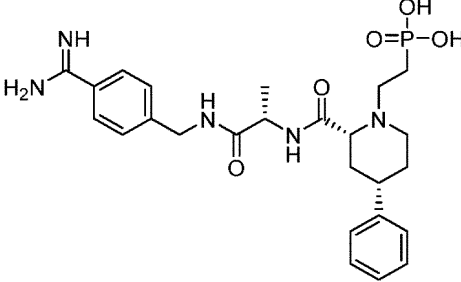
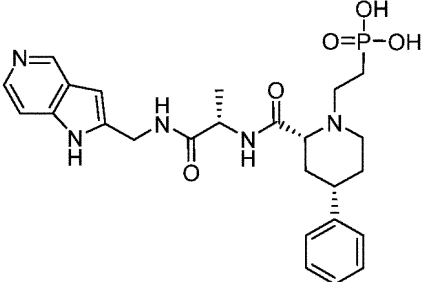
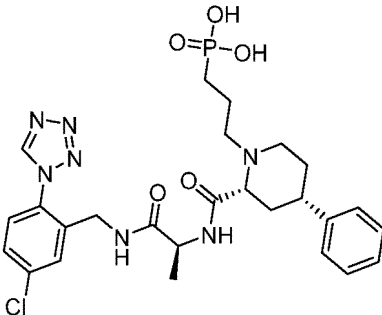
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-36		2TFA
III-37		2TFA
III-38		2TFA
III-39		2TFA
III-40		2TFA

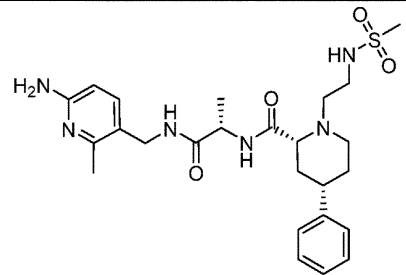
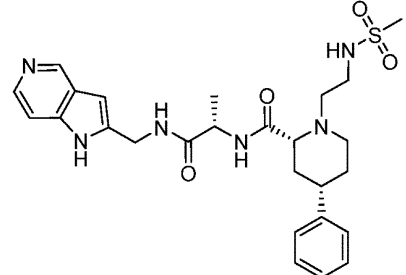
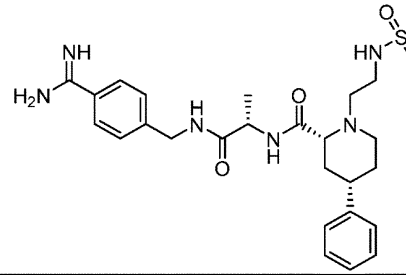
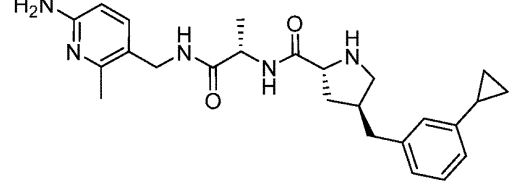
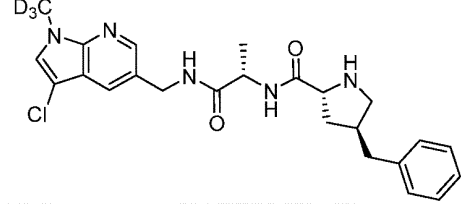
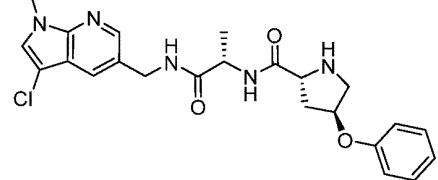
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-41		2TFA
III-42		2TFA
III-43		2TFA
III-44		2TFA
III-45		HCl
III-46		TFA

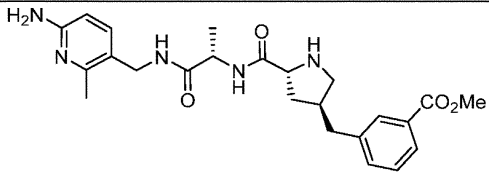
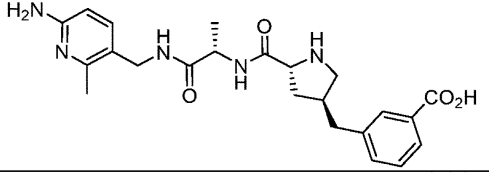
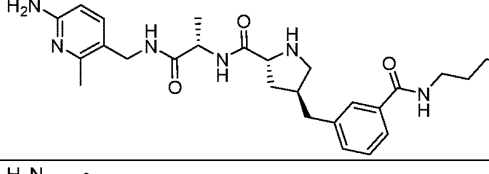
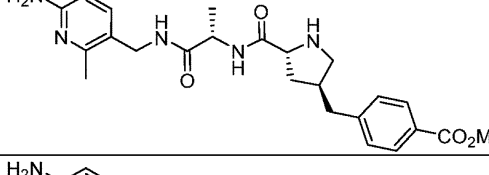
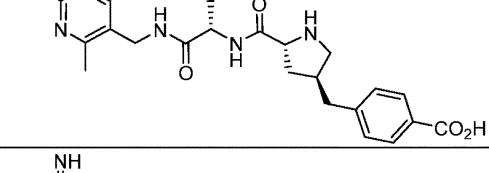
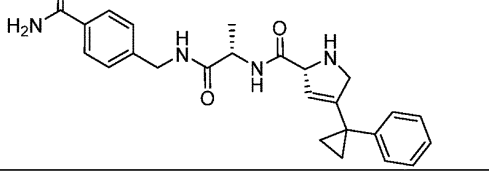
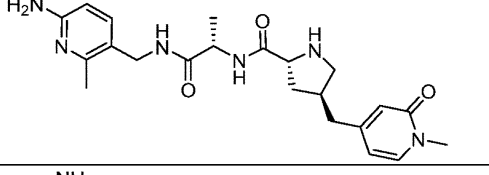
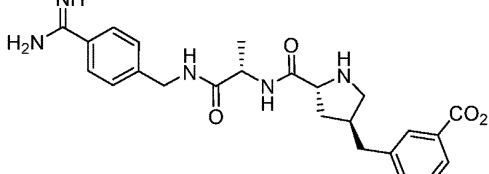
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-47		2HCl
III-48		2TFA
III-49		2TFA
III-50		2HCl
III-51		2TFA
III-52		2HCl
III-53		2TFA
III-54		2TFA

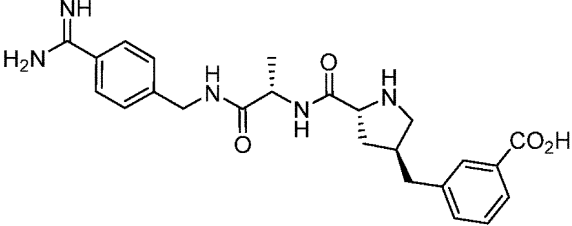
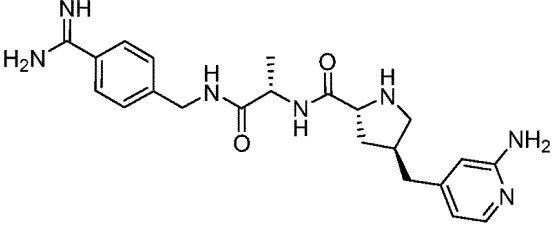
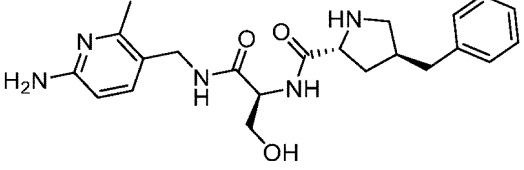
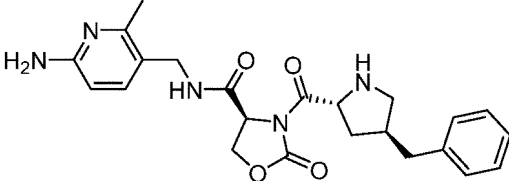
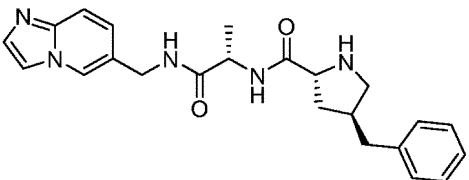
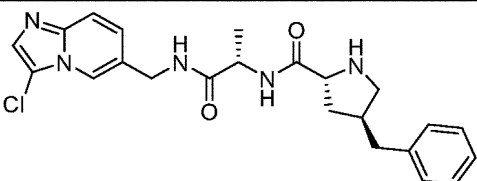
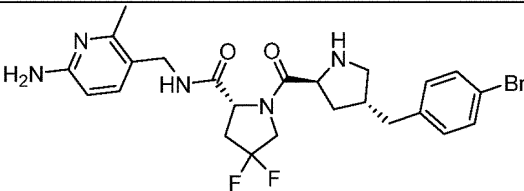
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-55		2TFA
III-56		2TFA
III-57		2HCl
III-58		2TFA
III-59		TFA
III-60		HCl
III-61		2HCl

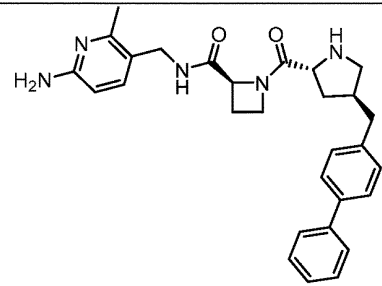
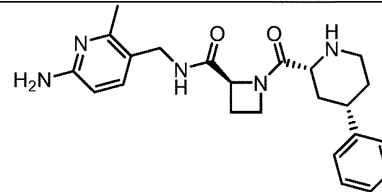
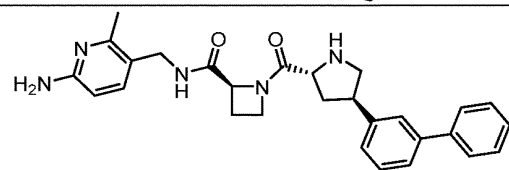
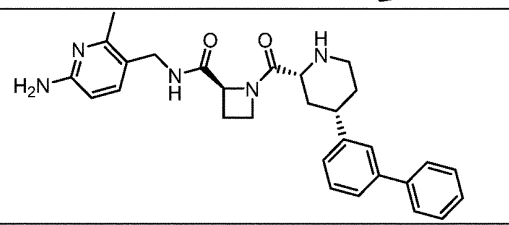
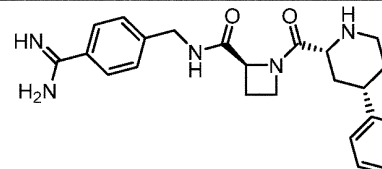
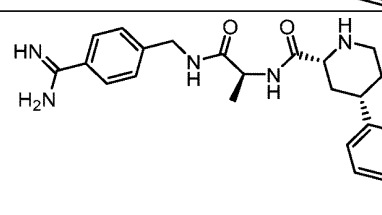
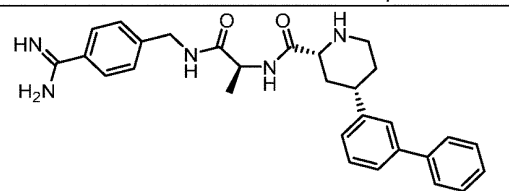
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-62		2TFA
III-63		2TFA
III-64		2TFA
III-65		2TFA
III-66		2TFA
III-67		2TFA
III-68		2TFA

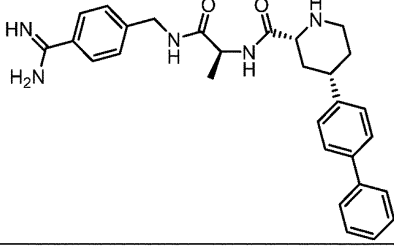
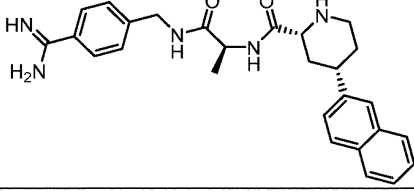
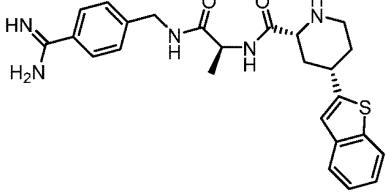
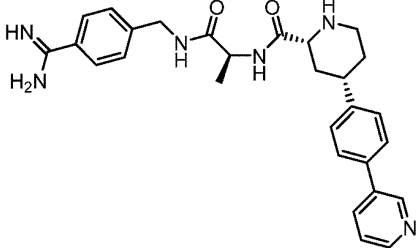
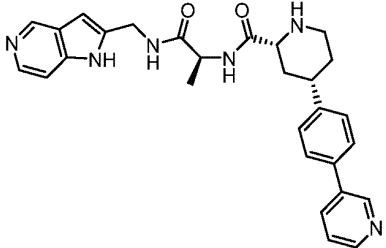
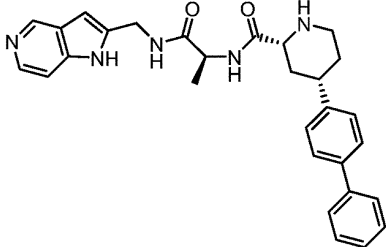
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-69		2TFA
III-70		2TFA
III-71		2TFA
III-72		2TFA
III-73		2TFA
III-74		2TFA

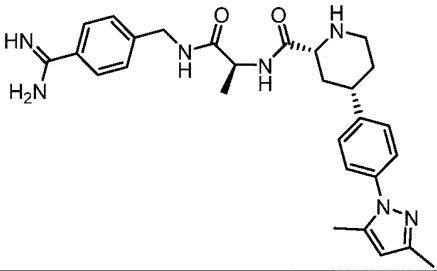
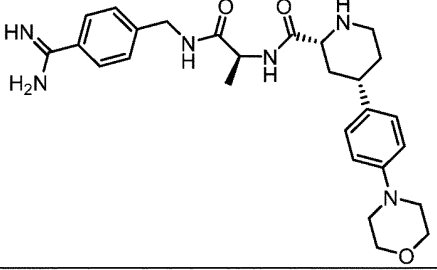
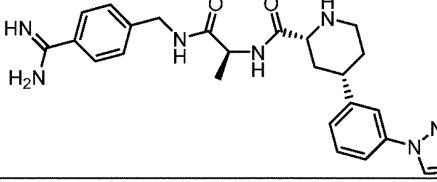
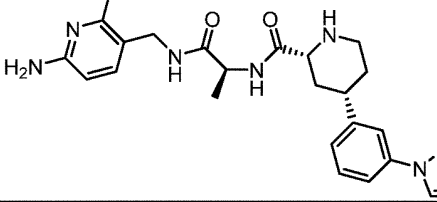
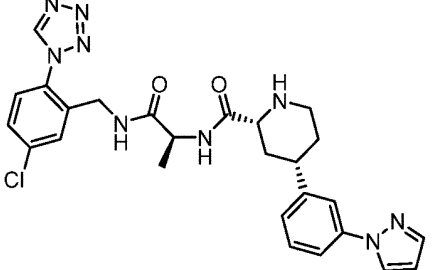
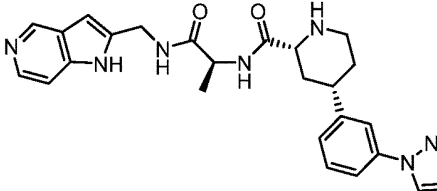
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-75		2HCl
III-76		2HCl
III-77		2HCl
III-78		2HCl
III-79		HCl
III-80		2HCl

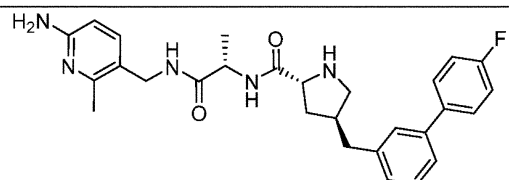
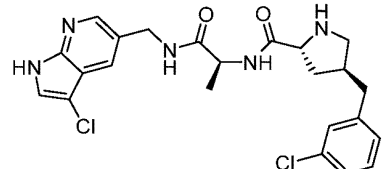
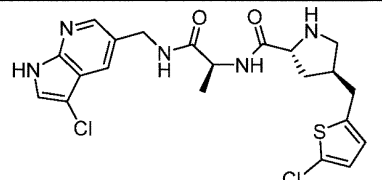
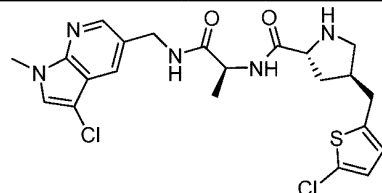
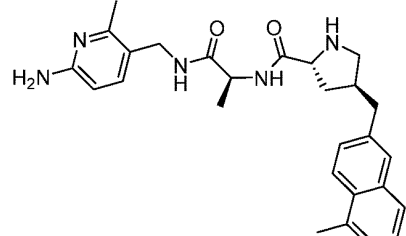
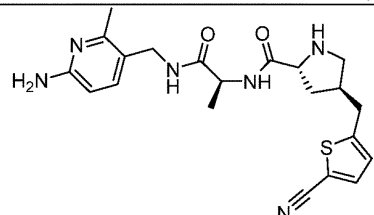
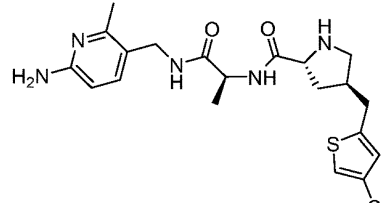
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-81		2TFA
III-82		2HCl
III-83		2HCl
III-84		2HCl
III-85		2HCl
III-86		2HCl
III-87		2HCl

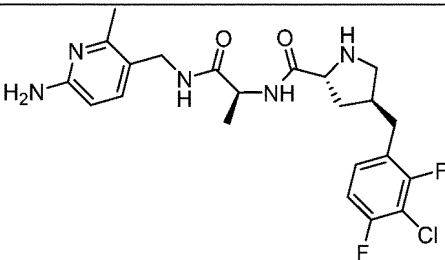
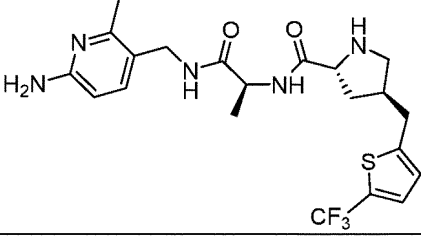
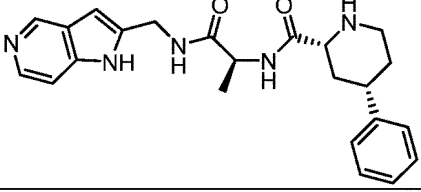
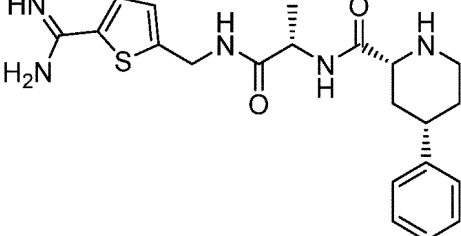
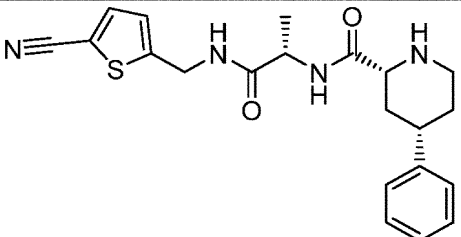
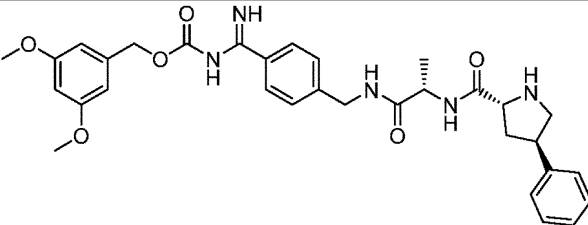
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-88		2HCl
III-89		2HCl
III-90		2TFA
III-91		2TFA
III-92		HCl
III-93		-

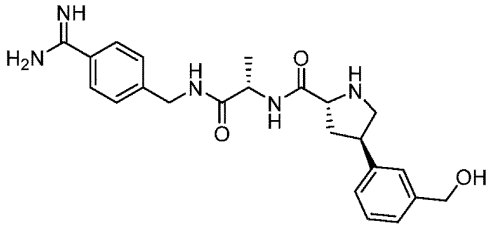
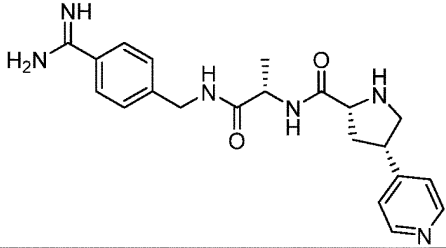
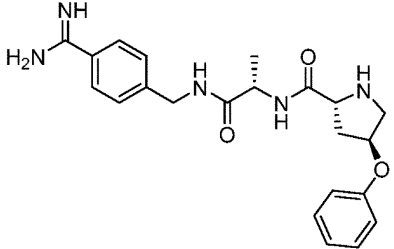
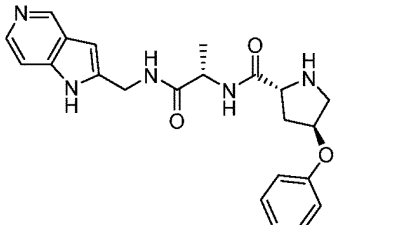
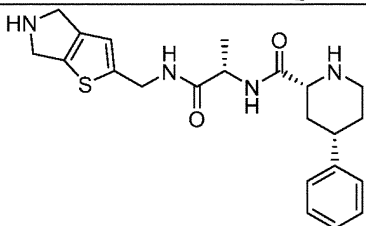
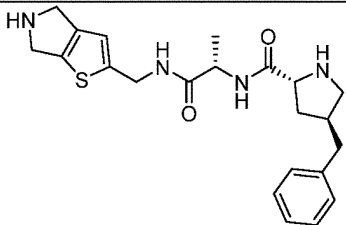
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-94		2TFA
III-95		2TFA
III-96		2TFA
III-97		2TFA
III-98		2TFA
III-99		2TFA

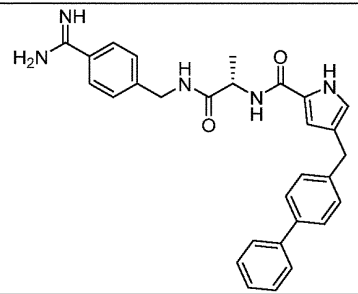
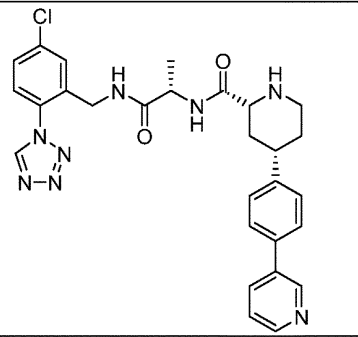
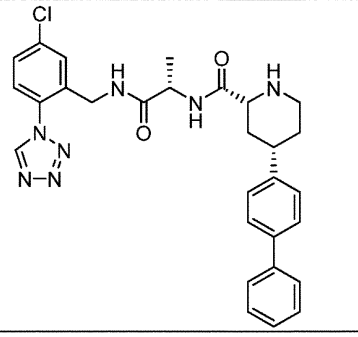
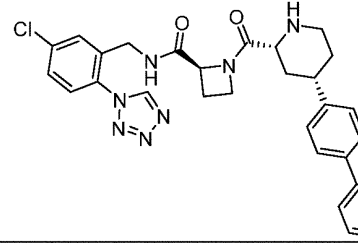
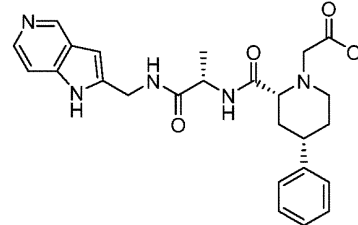
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
III-100		TFA
III-101		TFA
III-102		TFA
III-103		TFA
III-104		2TFA

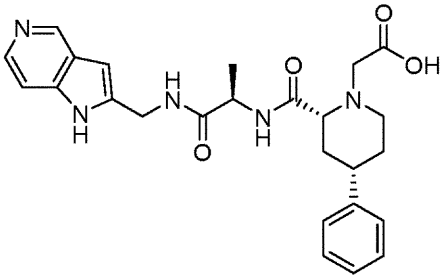
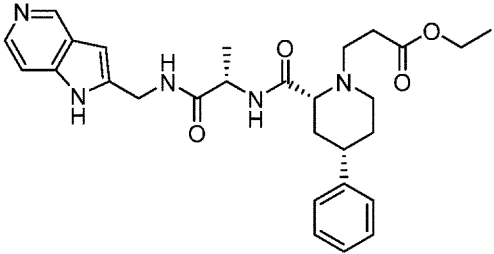
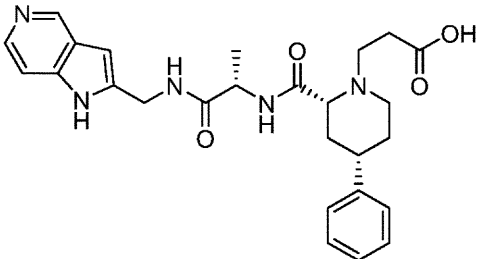
10

20

30

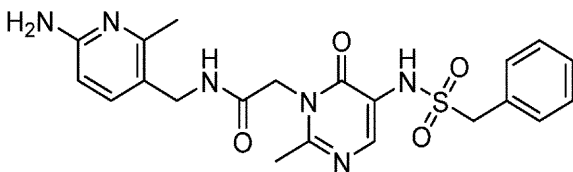
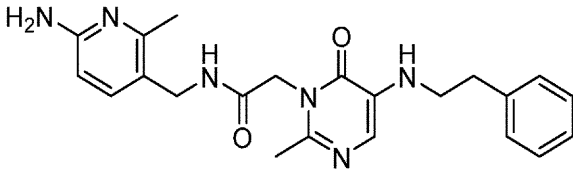
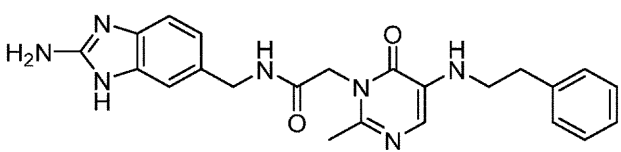
40

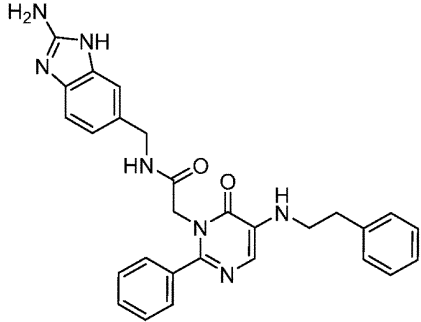
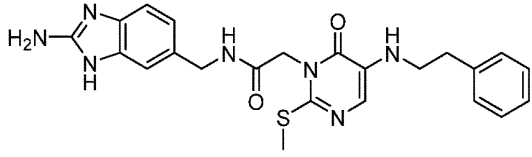
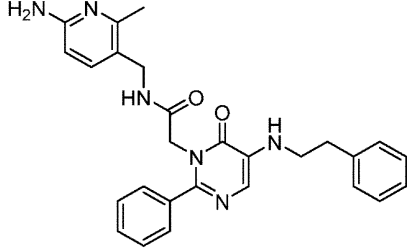
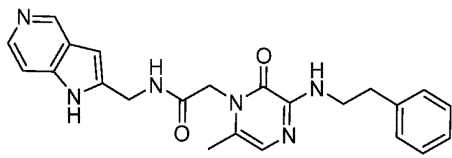
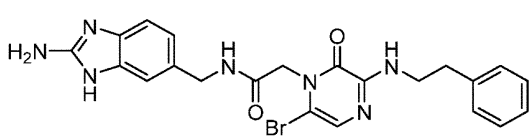
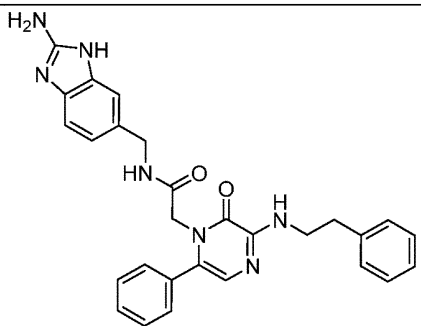
50

化合物番号	構造	塩
III-105		2TFA
III-106		-
III-107		2TFA

【 0 2 2 6 】

(表 4 E) 例示的なMASP-2阻害化合物

化合物番号	構造	塩
IV-1		TFA
IV-2		TFA
IV-3		TFA

化合物番号	構造	塩
IV-4		TFA
IV-5		-
IV-6		-
IV-7		-
IV-8		-
IV-9		-

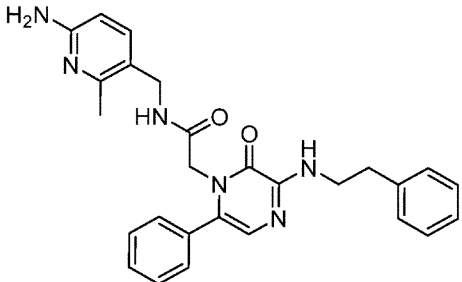
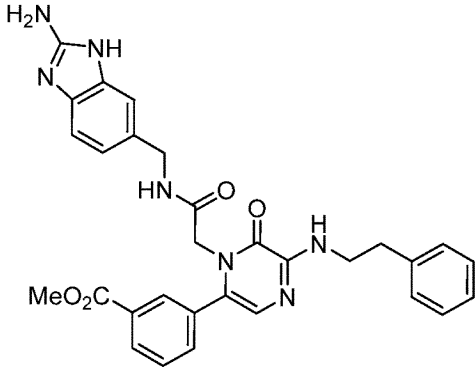
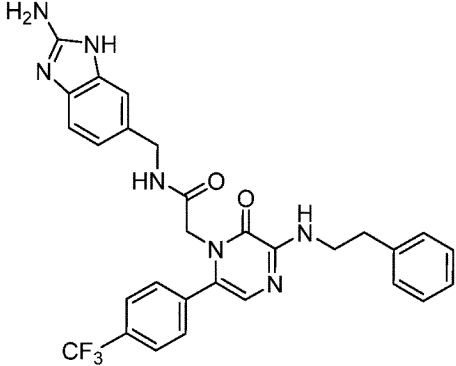
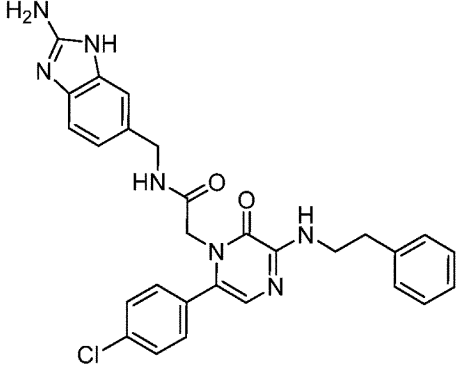
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-10		-
IV-11		-
IV-12		TFA
IV-13		TFA

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-14		-
IV-15		TFA
IV-16		TFA
IV-17		TFA

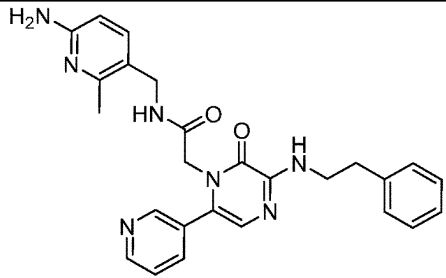
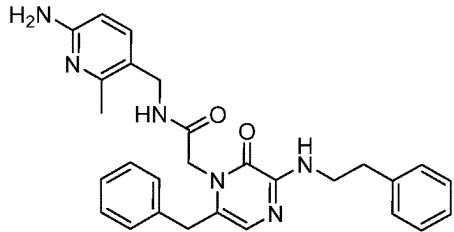
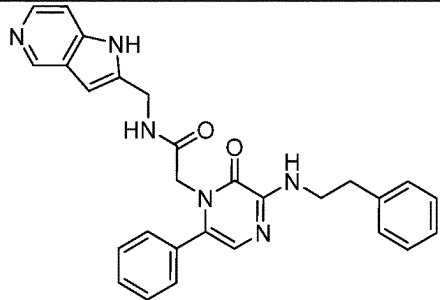
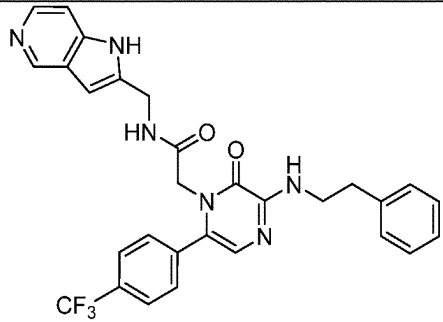
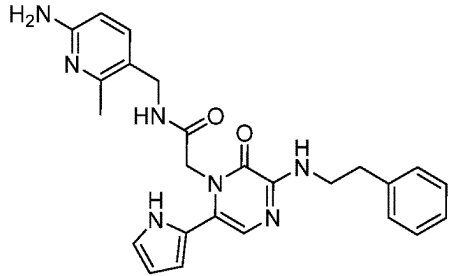
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-18		2TFA
IV-19		TFA
IV-20		TFA
IV-21		TFA
IV-22		-

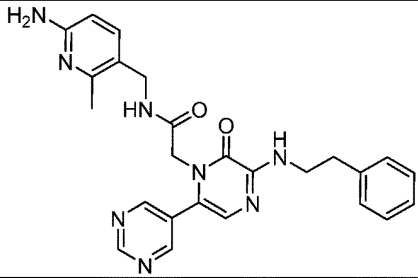
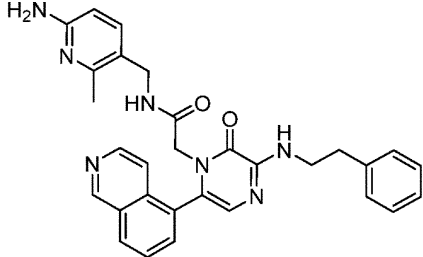
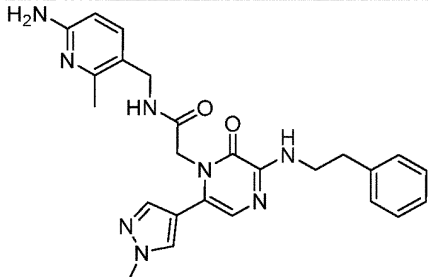
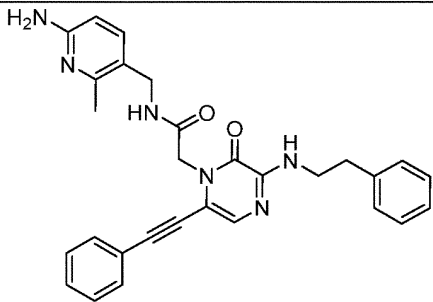
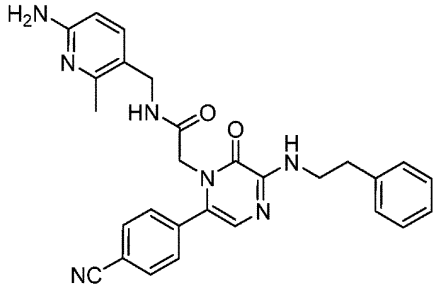
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-23		-
IV-24		-
IV-25		-
IV-26		-
IV-27		-

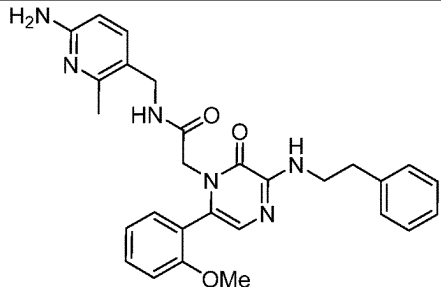
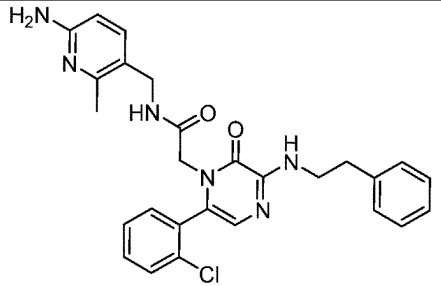
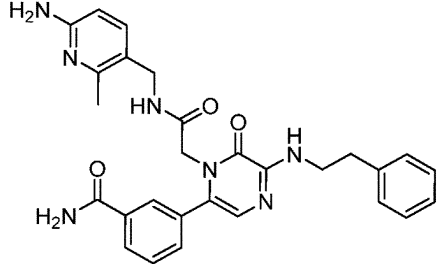
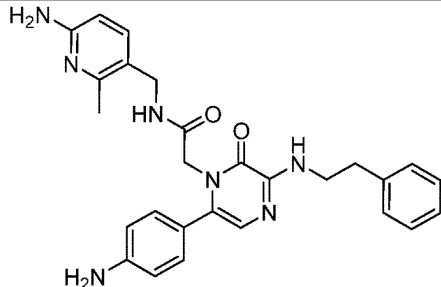
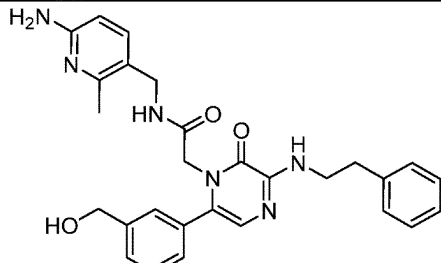
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-28		HCl
IV-29		-
IV-30		HCl
IV-31		-
IV-32		-

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-33		-
IV-34		-
IV-35		TFA
IV-36		TFA
IV-37		TFA
IV-38		-
IV-39		-

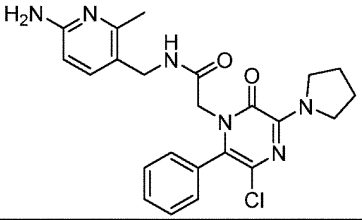
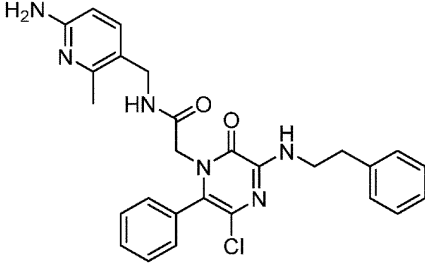
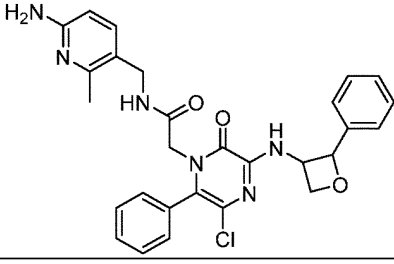
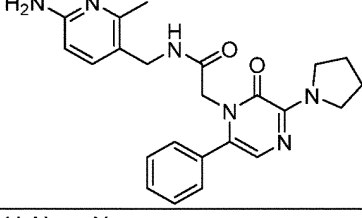
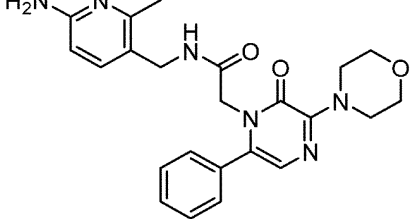
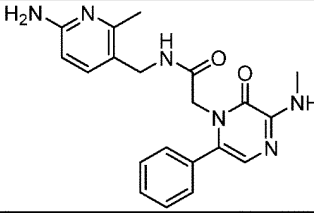
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-40		-
IV-41		-
IV-42		-
43		-
IV-44		-
IV-45		-

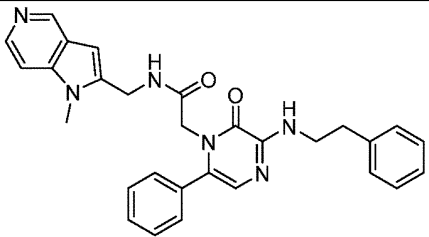
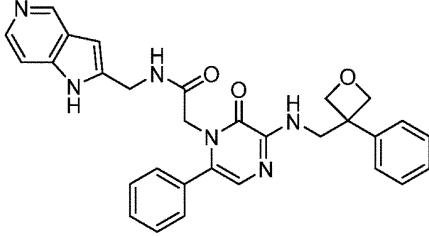
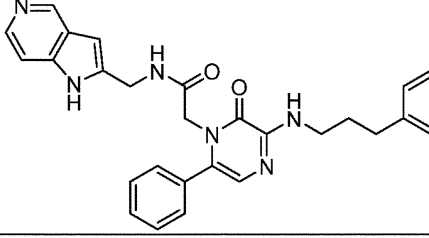
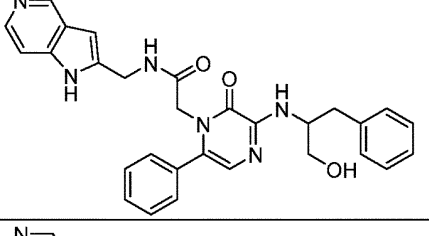
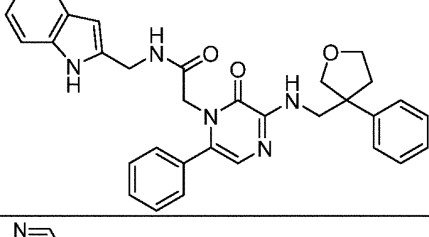
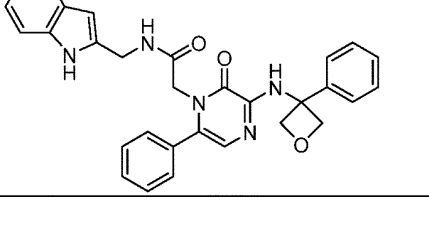
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-46		TFA
IV-47		TFA
IV-48		TFA
IV-49		TFA
IV-50		TFA
IV-51		TFA

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-52		TFA
IV-53		-
IV-54		2TFA
IV-55		TFA
IV-56		TFA
IV-57		TFA

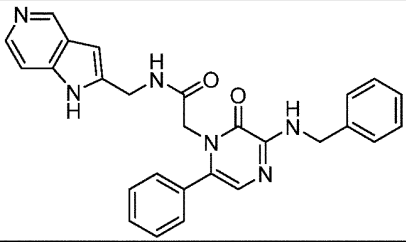
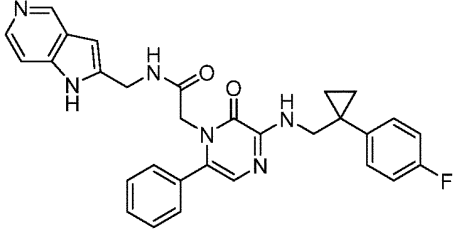
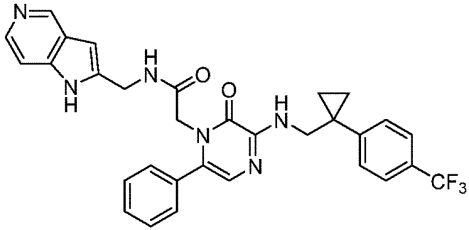
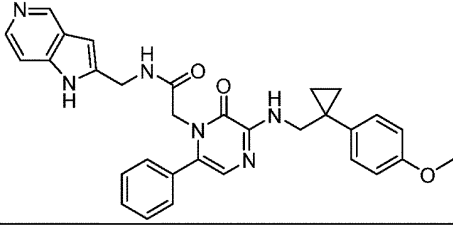
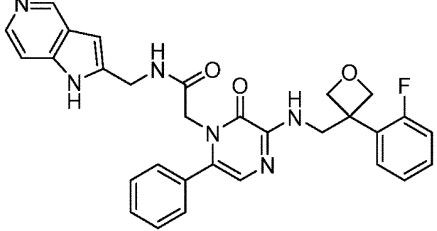
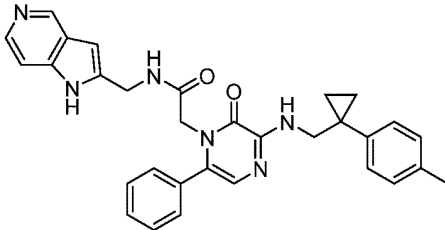
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-58		TFA
IV-59		TFA
IV-60		TFA
IV-61		TFA
IV-62		TFA
IV-63		TFA

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-64		-
IV-65		TFA
IV-66		TFA
IV-67		TFA
IV-68		TFA
IV-69		TFA

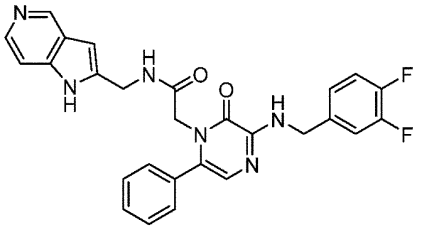
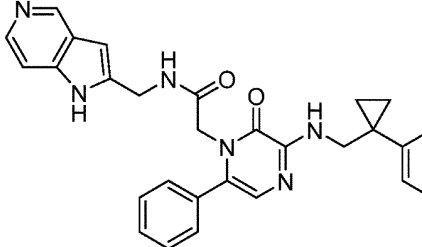
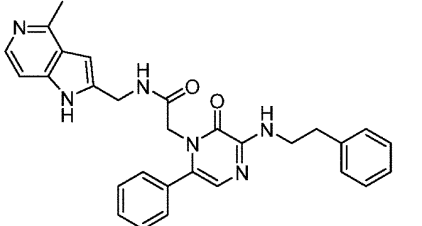
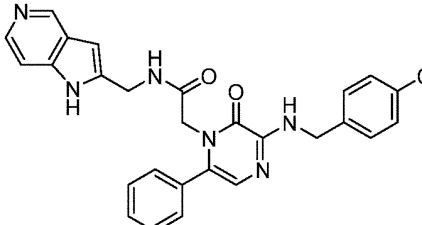
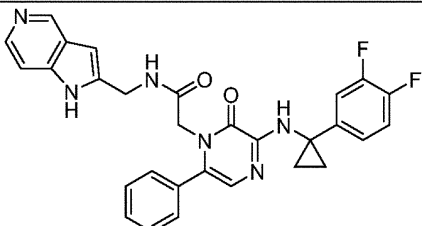
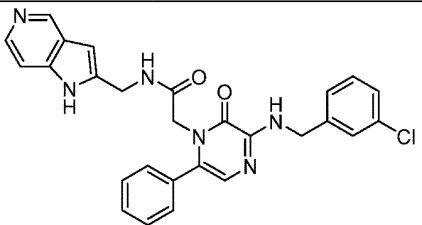
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-70		TFA
IV-71		TFA
IV-72		TFA
IV-73		TFA
IV-74		TFA
IV-75		TFA

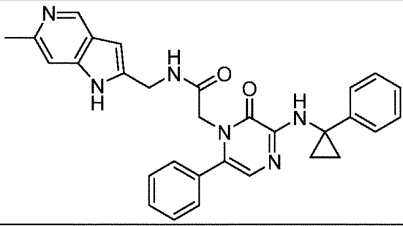
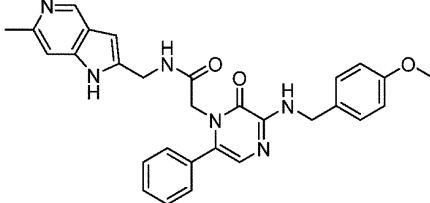
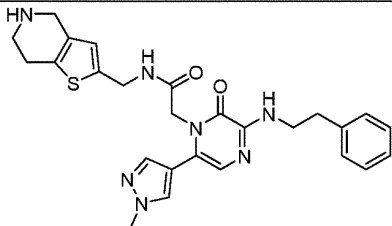
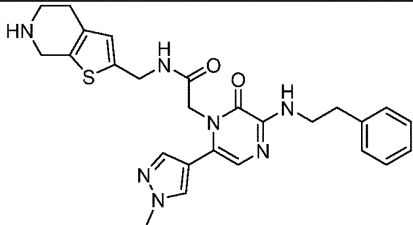
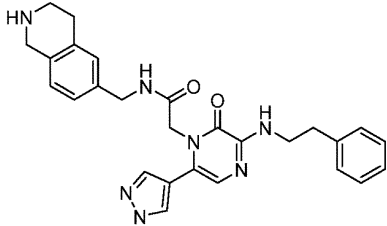
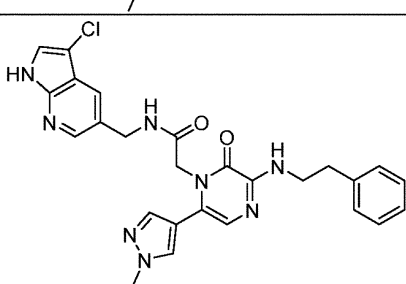
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-76		TFA
IV-77		TFA
IV-78		-
IV-79		-
IV-80		-
IV-81		-

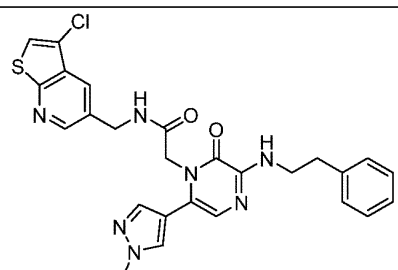
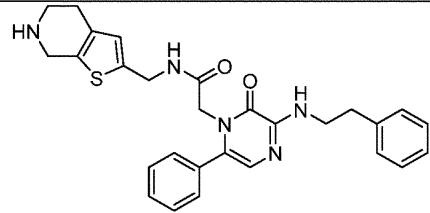
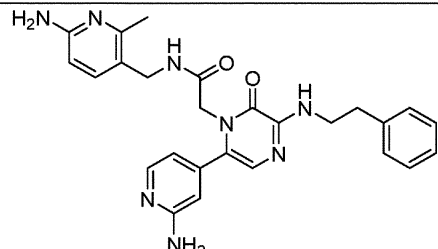
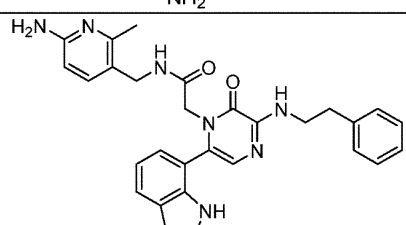
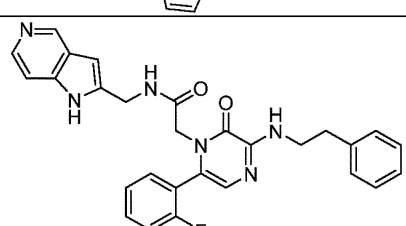
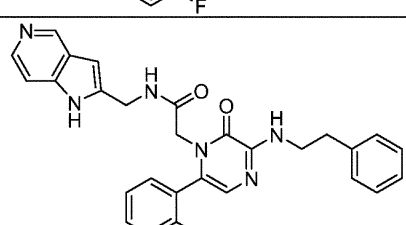
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-82		-
IV-83		-
IV-84		-
IV-85		TFA
IV-86		TFA
IV-87		TFA

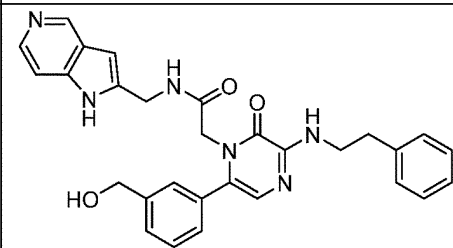
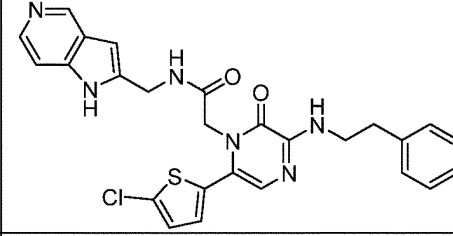
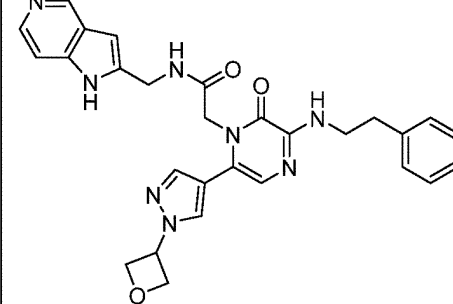
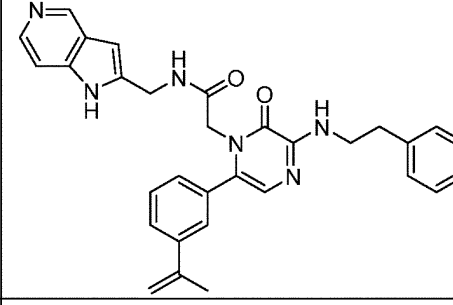
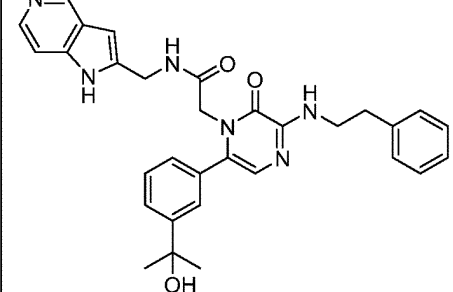
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-88		TFA
IV-89		-
IV-90		TFA
IV-91		-
IV-92		-

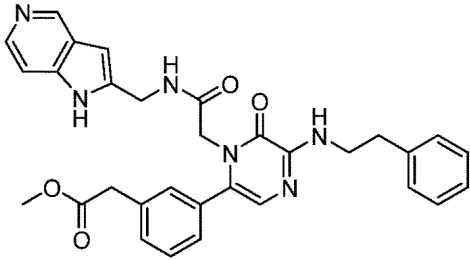
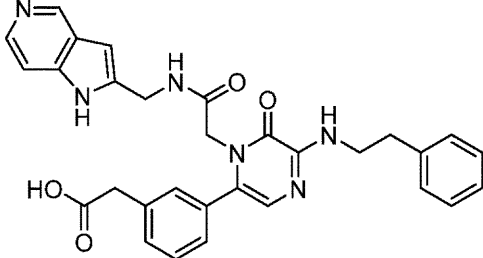
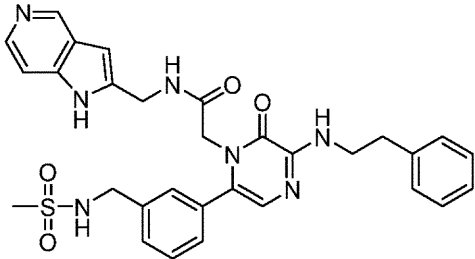
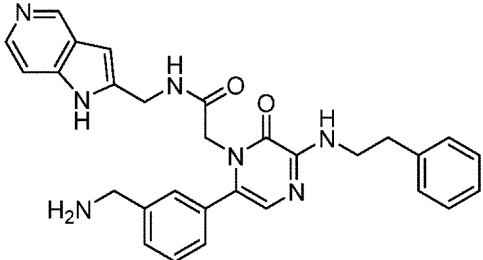
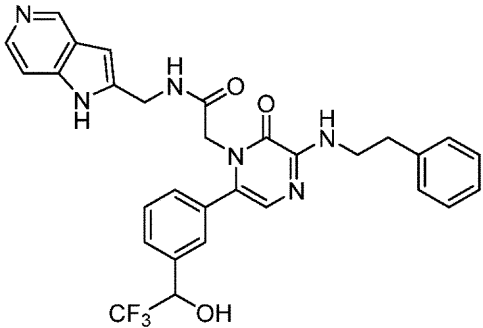
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-93		TFA
IV-94		TFA
IV-95		-
IV-96		-
IV-97		-

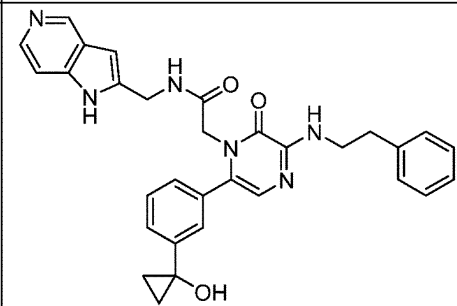
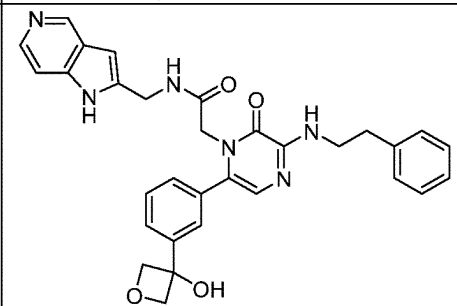
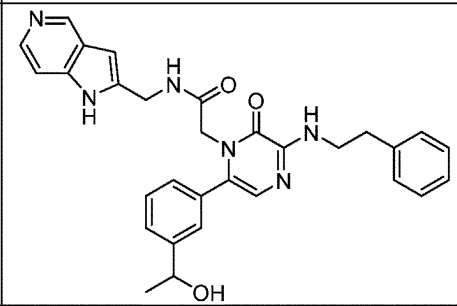
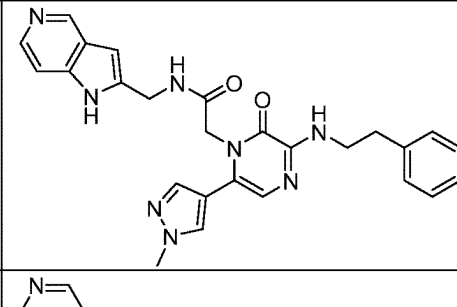
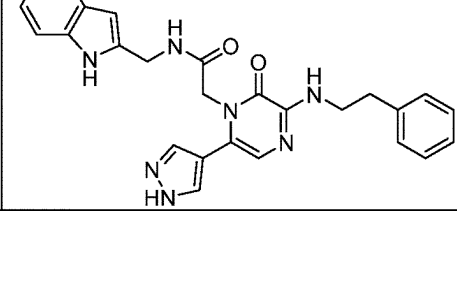
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-98		-
IV-99		-
IV-100		-
IV-101		-
IV-102		-

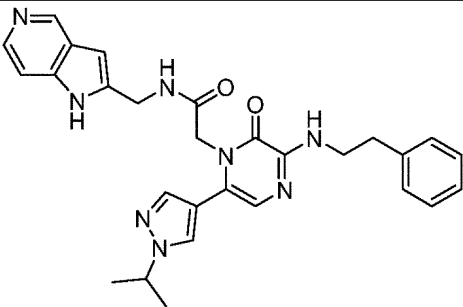
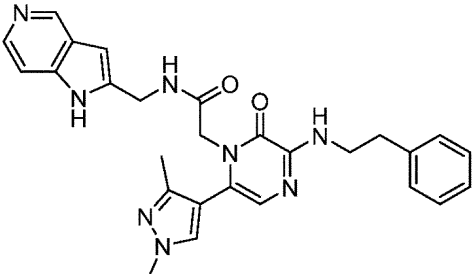
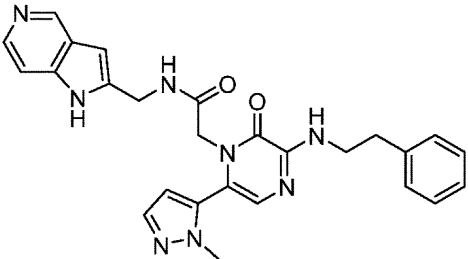
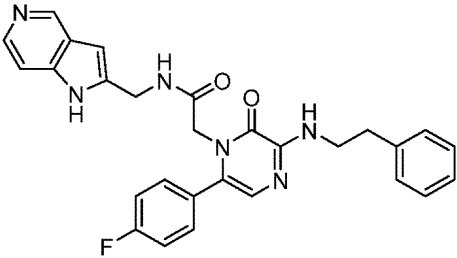
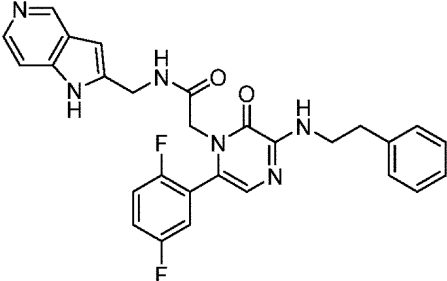
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-103		-
IV-104		-
IV-105		-
IV-106		-
IV-107		-

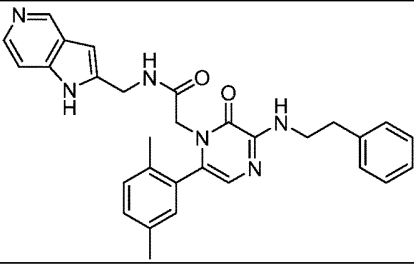
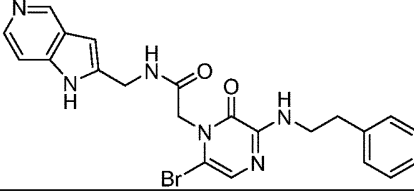
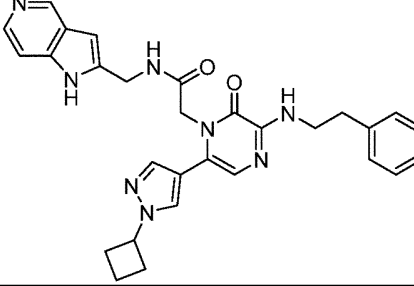
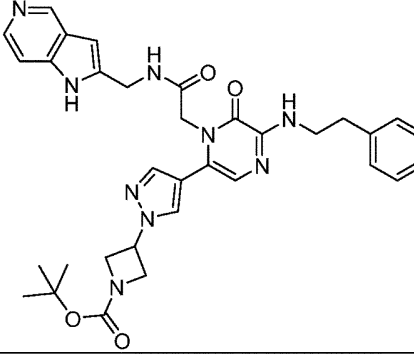
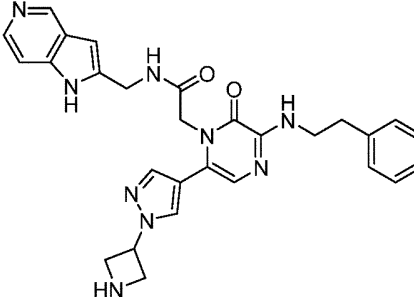
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-108		-
IV-109		-
IV-110		-
IV-111		-
IV-112		HCl

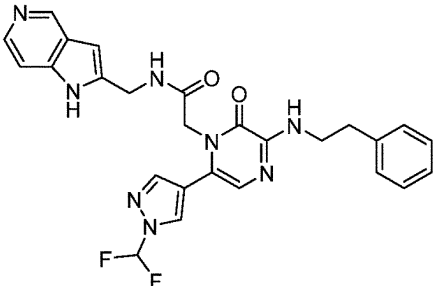
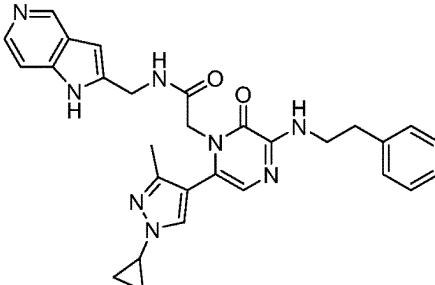
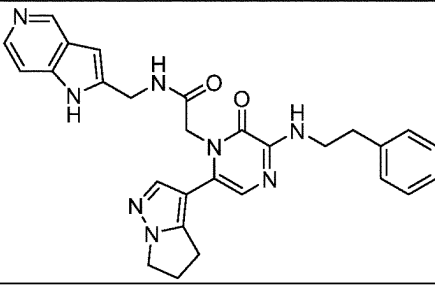
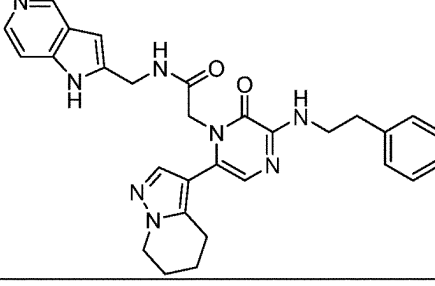
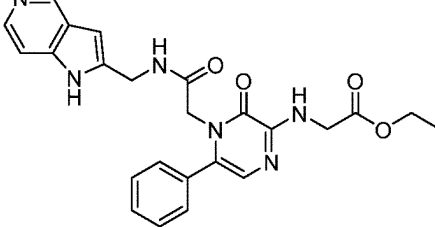
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-113		-
IV-114		-
IV-115		-
IV-116		-
IV-117		-

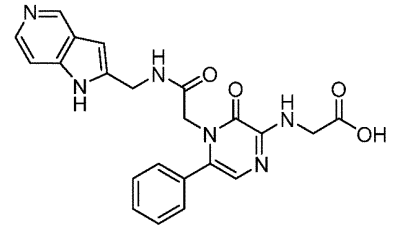
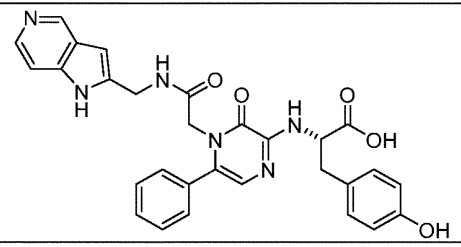
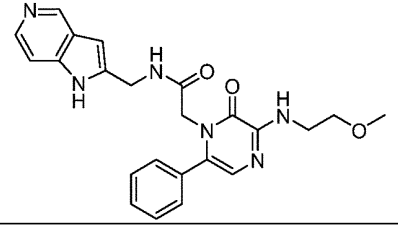
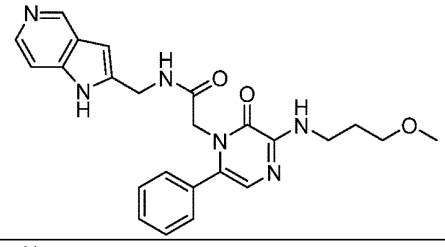
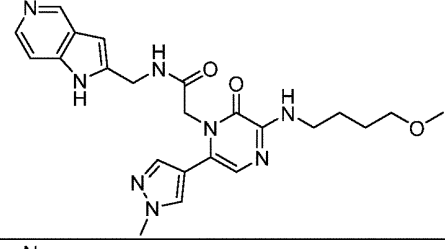
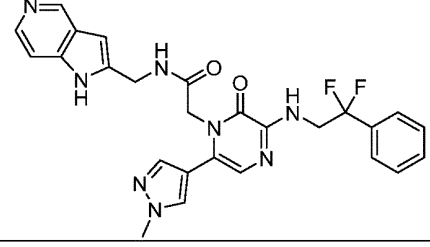
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-118		TFA
IV-119		TFA
IV-120		TFA
IV-121		TFA
IV-122		TFA
IV-123		TFA

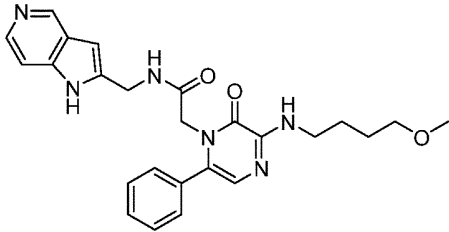
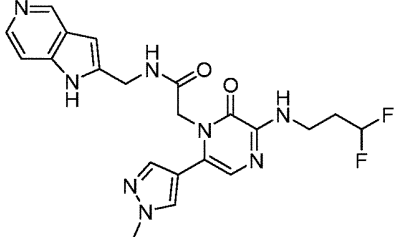
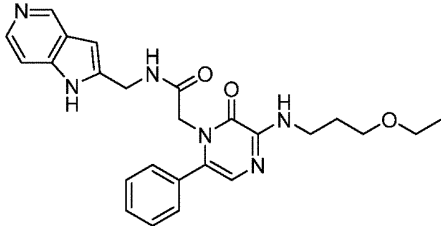
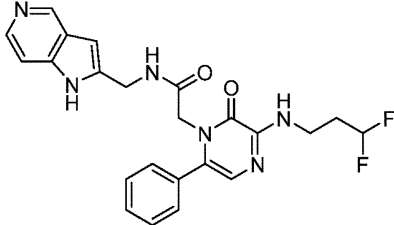
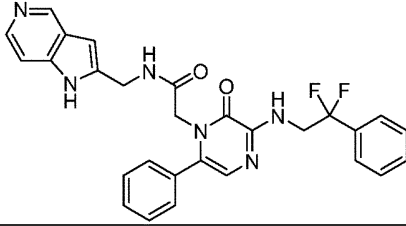
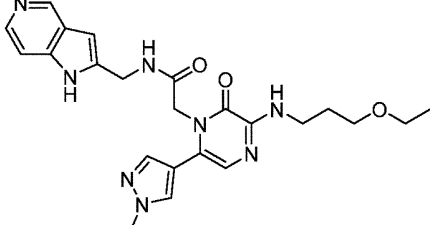
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-124		TFA
IV-125		TFA
IV-126		TFA
IV-127		TFA
IV-128		TFA
IV-129		TFA

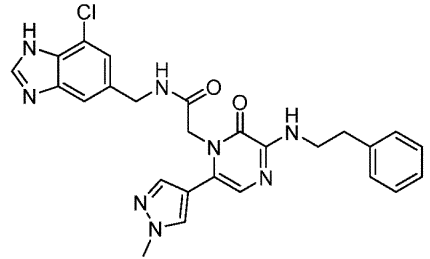
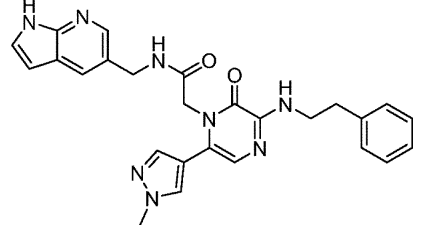
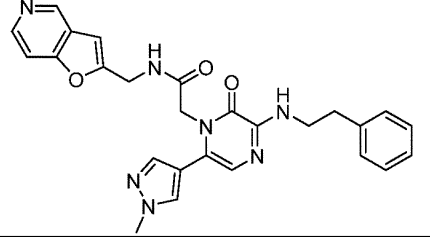
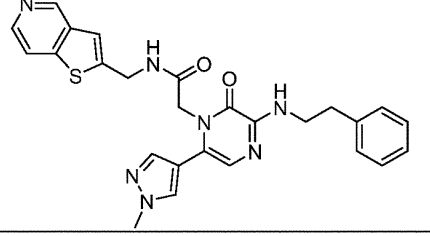
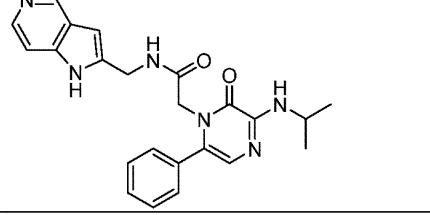
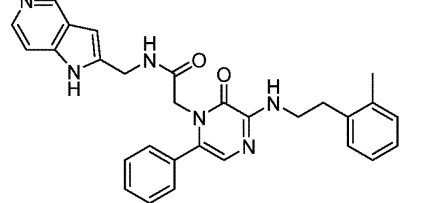
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-130		-
IV-131		-
IV-132		-
IV-133		-
IV-134		-
IV-135		-

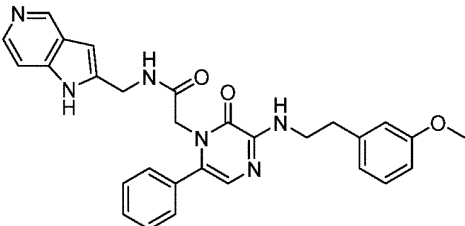
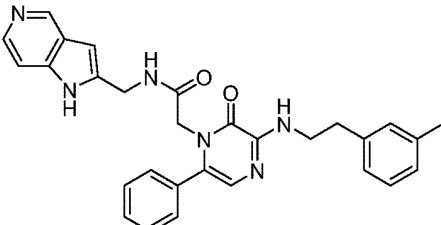
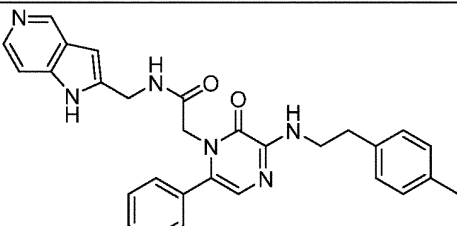
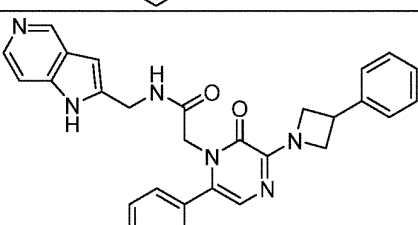
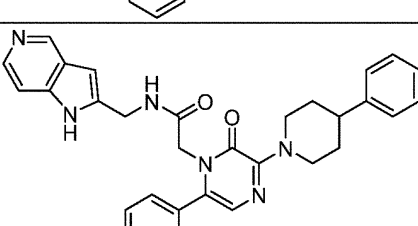
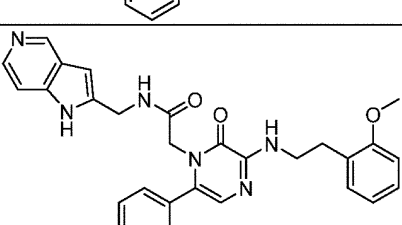
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-136		-
IV-137		-
IV-138		-
IV-139		-
IV-140		-
IV-141		-

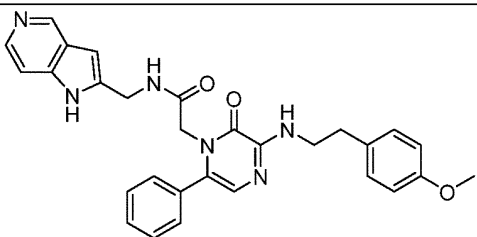
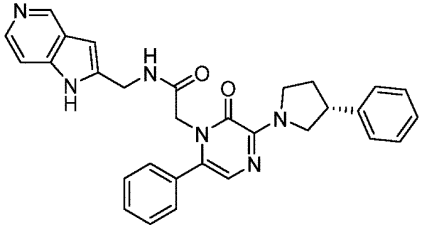
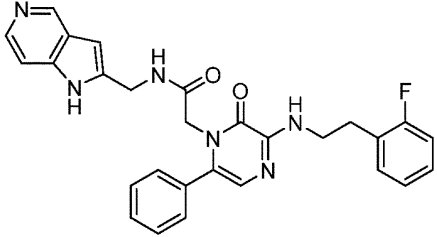
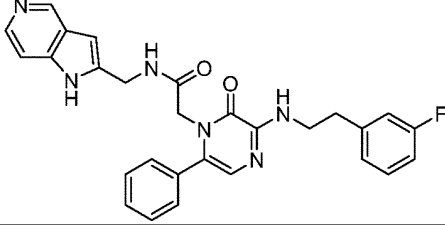
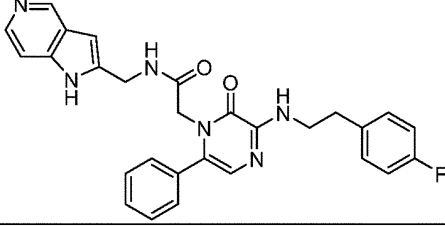
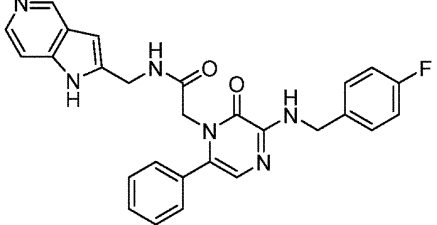
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-142		-
IV-143		-
IV-144		-
IV-145		-
IV-146		-
IV-147		-

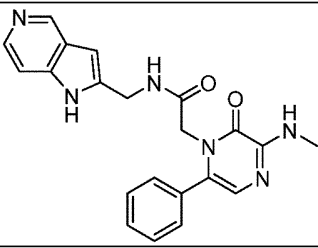
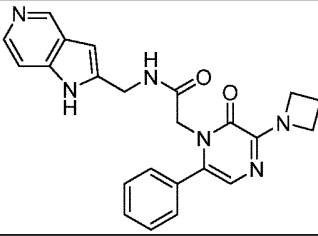
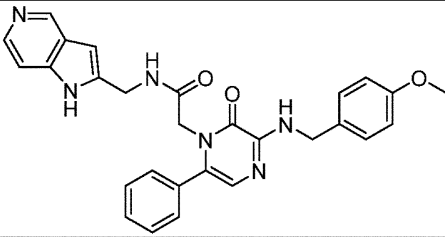
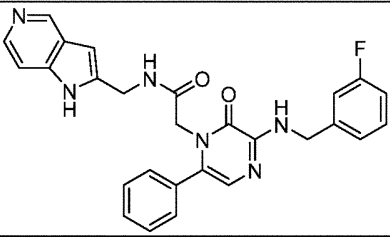
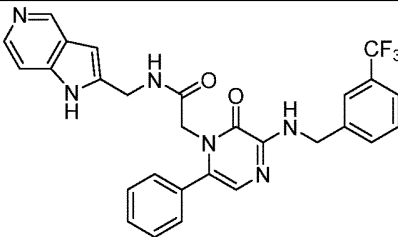
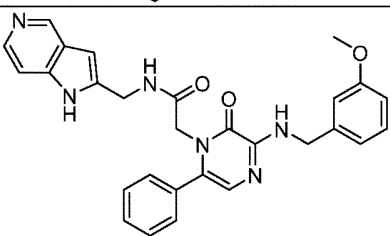
10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-148		-
IV-149		-
IV-150		-
IV-151		-
IV-152		-
IV-153		-

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-154		-
IV-155		-
IV-156		-
IV-157		2TFA
IV-158		-
IV-159		-

10

20

30

40

50

化合物番号	構造	塩
IV-160		-
IV-161		-
IV-162		-
IV-163		TFA

【0227】

一部の態様において、MASP-2阻害物質は、表4A、4B、4C、4D、および4Eのいずれか1つの化合物である。一部の態様において、MASP-2阻害物質は化合物1230、1231、I II-91、またはI-89である。一部の態様において、MASP-2阻害物質は、200Da～2,000 Daの分子量を有する低分子である。一部の態様において、MASP-2阻害物質は、250Da～2,000Daの分子量を有する低分子である。一部の態様において、MASP-2阻害物質は、350Da～2,000Daの分子量を有する低分子である。一部の態様において、MASP-2阻害物質は、350Da～1,500Daの分子量を有する低分子である。一部の態様において、MASP-2阻害物質は、350Da～1,200Daの分子量を有する低分子である。

【0228】

一部の態様において、MASP-2阻害物質は、グアニジン基およびベンズアミジン基より選択される塩基性基を1個しか有さない低分子である。一部の態様において、MASP-2阻害物質は、グアニジン基およびベンズアミジン基より選択される塩基性基を含まない低分子である。

【0229】

MASP-2の発現阻害因子

本発明のこの局面の別の態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性

化を阻害することができるMASP-2発現阻害因子である。本発明のこの局面の実施において、代表的なMASP-2発現阻害因子には、MASP-2アンチセンス核酸分子(例えば、アンチセンスmRNA、アンチセンスDNA、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド)、MASP-2リボザイム、およびMASP-2 RNAi分子が含まれる。

【0230】

アンチセンスRNA分子およびDNA分子は、MASP-2 mRNAにハイブリダイズし、MASP-2タンパク質の翻訳を阻止することによってMASP-2 mRNAの翻訳を直接遮断するように働く。アンチセンス核酸分子はMASP-2の発現を妨害することができるという条件で、多数の異なるやり方で構築されてもよい。例えば、アンチセンス核酸分子は、MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)のコード領域(またはその一部)の相補鎖を転写できるように、正常な転写方向に対して、MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)のコード領域(またはその一部)を逆にすることによって構築することができる。

【0231】

アンチセンス核酸分子は、通常、1つの標的遺伝子または複数の標的遺伝子の少なくとも一部と実質的に同一である。しかしながら、発現を阻害するために核酸は完全に同一である必要はない。一般的に、高い相同性を用いて、短いアンチセンス核酸分子の使用を補うことができる。最小同一性パーセントは典型的には約65%超であるが、さらに高い同一性パーセントによって、内因性配列の発現がより効果的に抑制される場合がある。約80%超のかなり高い同一性パーセントが典型的に好ましいが、約95%~完全同一性が典型的に最も好ましい。

【0232】

アンチセンス核酸分子は、標的遺伝子と同じイントロンパターンまたはエキソンパターンを有する必要はない。標的遺伝子の非コードセグメントが、標的遺伝子発現のアンチセンス抑制の実現の点でコードセグメントと等しく有効な場合がある。少なくとも約8個かそれくらいのヌクレオチドのDNA配列がアンチセンス核酸分子として用いられ得るが、さらに長い配列が好ましい。本発明において、有用なMASP-2阻害物質の代表例は、SEQ ID NO:4に示された核酸配列からなるMASP-2 cDNAの相補鎖と少なくとも90パーセント同一のアンチセンスMASP-2核酸分子である。SEQ ID NO:4に示された核酸配列は、SEQ ID NO:5に示されたアミノ酸配列からなるMASP-2タンパク質をコードする。

【0233】

MASP-2 mRNAに結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの標的化は、MASP-2タンパク質合成のレベルを低下させるのに用いられ得る別の機構である。例えば、ポリガラクトロナーゼおよびムスカリン2型アセチルコリン受容体の合成は、それぞれのmRNA配列に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドによって阻害される(Chengに対する米国特許第5,739,119号、およびShewmakerに対する米国特許第5,759,829号)。さらに、アンチセンス阻害の例は、核タンパク質サイクリン、多罪耐性遺伝子(MDG1)、ICAM-1、E-セレクチン、STK-1、線条体GABA_A受容体、およびヒトEGFを用いて証明されている(例えば、Baracchiniに対する米国特許第5,801,154号; Bakerに対する米国特許第5,789,573号; Considineに対する米国特許第5,718,709号;およびReubensteinに対する米国特許第5,610,288号を参照されたい)。

【0234】

どのオリゴヌクレオチドが本発明において有用であるか当業者が判断することができる系が述べられている。この系は、転写物内の配列の到達性の指標としてRnaseH切断を用いて標的mRNA内の適切な部位をプローブすることを伴う。Scherr, M., et al., Nucleic Acids Res. 25:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., Nucleic Acids Res. 29:3665-3673, 2001。RNAse Hに対して脆弱な部位を作製するために、MASP-2転写物のある特定の領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの混合物が、MASP-2を発現する細胞抽出物、例えば、肝細胞に添加され、ハイブリダイズされる。この方法は、宿主細胞内の標的mRNAとの特異的結合を減少させるかまたは防止する二量体、ヘアピン、または他の二次構造を形成する相対的な能力に基づいて、アンチセンス組成物の最適配列選択を予測

することができるコンピュータ支援配列選択と組み合わせることができる。これらの二次構造分析および標的部位選択の検討は、OLIGOプライマー分析ソフトウェア(Rychlik, I., 1997)およびBLASTN 2.0.5アルゴリズムソフトウェア(Altschul, S.F., et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1997)を用いて行うことができる。標的配列に対するアンチセンス化合物は好ましくは長さが約8〜約50のヌクレオチドを含む。約9〜約35などのヌクレオチドを含むアンチセンスオリゴヌクレオチドが特に好ましい。本発明者らは、アンチセンスオリゴヌクレオチドに基づく本発明の方法の実施のために、9〜35ヌクレオチド(すなわち、長さが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、または35塩基ほど)の範囲内の全てのオリゴヌクレオチド組成物が非常に好ましいことを意図する。MASP-2 mRNAの非常に好ましい標的領域は、AUG翻訳開始コドンにあるかまたはAUG翻訳開始コドンの近くにある標的領域、およびmRNAの5'領域に実質的に相補的なこれらの配列、例えば、MASP-2遺伝子ヌクレオチド配列(SEQ ID NO:4)の-10〜+10領域である。例示的なMASP-2発現阻害因子を以下に示す:

SEQ ID NO:30(SEQ ID NO:4のヌクレオチド22〜680): CUBIEGFをコードするMASP-2 cDNAの核酸配列(SEQ ID NO:4)

SEQ ID NO:31 (5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3')

: MASP-2翻訳開始部位を含むSEQ ID NO:4のヌクレオチド12〜45(センス)

SEQ ID NO:32 (5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3')

: MASP-2 MBL結合部位を含む領域をコードするSEQ ID NO:4のヌクレオチド361〜396(センス)

SEQ ID NO:33 (5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3')

: CUBIIDメインを含む領域をコードするSEQ ID NO:4のヌクレオチド610〜642
【0235】

前述のように、本明細書で使用する「オリゴヌクレオチド」という用語は、リボ核酸(RNA)もしくはデオキシリボ核酸(DNA)またはその模倣物のオリゴマーまたはポリマーを指す。この用語はまた、天然ヌクレオチド、糖、および共有結合のヌクレオシド間(バックボーン)結合からなるオリゴヌクレオ塩基、ならびに非天然の改変を有するオリゴヌクレオチドをカバーする。これらの改変があると、天然オリゴヌクレオチドでは提供されない、ある特定の望ましい特性、例えば、低い毒性、ヌクレアーゼ分解に対する高い安定性、および多量の細胞取り込みを導入することが可能になる。例示的な態様において、本発明のアンチセンス化合物は、リン酸置換基がホスホロチオエートによって置換されている、アンチセンスオリゴヌクレオチドの寿命を延ばすホスホジエステルバックボーン改変だけ天然DNAと異なる。同様に、オリゴヌクレオチドの一端または両端は、核酸鎖内の隣接する塩基対の間にインターカレートする1種類または複数種のアクリジン誘導体で置換されてもよい。

【0236】

アンチセンスに代わる別のものは「RNA干渉」(RNAi)の使用である。二本鎖RNA(dsRNA)はインビボで哺乳動物において遺伝子サイレンシングを誘発することができる。RNAiおよびコサプレッションの天然機能は、レトロトランスポゾンなどの可動遺伝要素、および活性化した場合に宿主細胞内で異常なRNAまたはdsRNAを産生するウイルスによる侵入からのゲノムの保護であるように思われる(例えば、Jensen, J., et al., Nat. Genet. 27: 209-12, 1999を参照されたい)。二本鎖RNA分子は、それぞれの長さが約19〜25(例えば、19〜23ヌクレオチド)である、二本鎖RNA分子を形成することができる2本のRNA鎖を合成することによって調製することができる。例えば、本発明の方法において有用なdsRNA分子は、本明細書に列挙された配列およびその相補鎖(例えば、SEQ ID NO:30〜SEQ ID NO:33)に対応するRNAを含んでもよい。好ましくは、少なくとも1本のRNA鎖は1

～5ヌクレオチドの3'オーバーハングを有する。合成されたRNA鎖は、二本鎖分子を形成する条件下で組み合わせられる。このRNA配列は、25ヌクレオチドまたはそれ未満の全長でSEQ ID NO:4の少なくとも8個のヌクレオチド部分を含んでもよい。ある特定の標的に対するsiRNA配列の設計は当技術分野における通常の技術の範囲内である。siRNA配列を設計し、少なくとも70%の発現ノックダウンを保証する商業サービスが利用可能である(Qiagen, Valencia, Calif)。

【0237】

dsRNAは薬学的組成物として投与され、核酸が望ましい標的細胞に導入される公知の方法によって実施することができる。一般的に用いられる遺伝子導入法には、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、およびウイルス法が含まれる。このような方法は、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993に開示される。

【0238】

MASP-2の量および/または生物学的活性を減少させるために、リボザイム、例えば、MASP-2 mRNAを標的とするリボザイムも利用することができる。リボザイムは、リボザイム配列に完全または部分的に相同な配列を有する核酸分子を切断することができる触媒RNA分子である。標的RNAと特異的に対になり、特定の位置のホスホジエステルバックボーンを切断し、それによって、標的RNAを機能的に不活化するRNAリボザイムをコードするリボザイムトランスジーンを設計することができる。この切断を実施する際に、リボザイムそのものは変化せず、従って、再利用し、他の分子を切断することができる。アンチセンスRNAの中にリボザイム配列を含めると、RNA切断活性がアンチセンスRNAに付与され、それによって、アンチセンス構築物の活性が増大する。

【0239】

本発明の実施において有用なリボザイムは、典型的には、標的MASP-2 mRNAの少なくとも一部とヌクレオチド配列において相補的な、少なくとも約9個のヌクレオチドのハイブリダイズ領域、および標的MASP-2 mRNAを切断するように適合された触媒領域を含む(一般的に、EPA No.0321201; WO88/04300; Haseloff, J., et al., Nature 534:585-591, 1988; Fedor, M.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al., Ann. Rev. Biochem. 55:599-629, 1986を参照されたい)。

【0240】

リボザイムは、リボザイム配列を組み込んだRNAオリゴヌクレオチドの形で細胞に直接、標的化されてもよく、望ましいリボザイムRNAをコードする発現ベクターとして細胞に導入されてもよい。リボザイムは、アンチセンスポリヌクレオチドについて述べられたやり方とほとんど同じやり方で使用および適用することができる。

【0241】

本発明の方法において有用なアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、ならびにRNA分子は、DNA分子およびRNA分子を合成するための当技術分野において公知の任意の方法によって調製することができる。これらには、当技術分野において周知のオリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学合成するための技法、例えば、固相ホスホルアミダイト化学合成が含まれる。または、RNA分子は、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列のインビトロ転写およびインビボ転写によって作製されてもよい。このようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼプロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼプロモーターを組み込んだ多種多様なベクターに組み込まれてもよい。または、使用されるプロモーターに応じて構成的または誘導的にアンチセンスRNAを合成するアンチセンスcDNA構築物を細胞株に安定して導入することができる。

【0242】

安定性を増大させかつ半減期を延長する手段として、DNA分子の様々な周知の改変を導入することができる。有用な改変には、分子の5'末端および/もしくは3'末端へのリボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドの隣接配列の付加、またはオリゴデオキシリボヌクレオチドバックボーン内のホスホジエステラーゼ結合ではなくホスホロチオエート

10

20

30

40

50

もしくは2'0-メチルの使用が含まれるが、これに限定されない。

【0243】

V.薬学的組成物および送達方法

投薬

別の局面において、本発明は、治療上有効な量のMASP-2阻害物質および薬学的に許容される担体を含む組成物を対象に投与することを含む、本明細書において開示された疾患または状態に罹患している対象におけるMASP-2依存性補体活性化の副作用を阻害するための組成物を提供する。MASP-2依存性補体活性化に関連した状態を処置するまたは寛解させるために、MASP-2阻害物質を、治療上有効な用量で、それを必要とする対象に投与することができる。治療上有効な用量は、疾患または状態に関連した症状を寛解させるのに十分なMASP-2阻害物質の量を指す。

10

【0244】

MASP-2阻害物質の毒性および治療有効性は、実験動物モデル、例えば、実施例1に記載のヒトMASP-2トランスジーンを発現するマウスMASP-2-/-マウスモデルを用いた標準的な薬学的手順によって求めることができる。このような動物モデルを用いて、NOAEL(無毒性量)およびMED(最小有効量)を標準的な方法を用いて求めることができる。NOAEL効果とMED効果との用量比が治療比であり、比NOAEL/MEDとして表される。大きな治療比または指数を示すMASP-2阻害物質が最も好ましい。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータを、ヒトでの使用のために、ある範囲の投与量の処方において使用することができる。MASP-2阻害物質の投与量は、好ましくは、毒性がほとんどない、または

20

【0245】

一部の態様において、線維症および/もしくは炎症によって引き起こされるもしくは悪化する疾患もしくは障害に罹患しているかまたはその発症リスクがある哺乳動物対象において、線維症を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するためのMASP-2阻害物質の治療有効性は、以下の1つまたは複数によって確かめられる:腎臓組織における炎症および瘢痕の1つまたは複数のマーカー(例えば、TGF β -1、CTFF、IL-6、アポトーシス、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、EMT、浸潤性マクロファージ)の低下;(例えば、腎臓排泄機能の測定による)尿および血漿への炎症可溶性マーカーおよび線維性腎疾患可溶性マーカーの放出の低下。

30

【0246】

任意の化合物製剤について、動物モデルを用いて、治療上有効な用量を評価することができる。例えば、MEDを含む循環血漿中濃度範囲に達する用量を動物モデルにおいて処方することができる。血漿中のMASP-2阻害物質の定量レベルはまた、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0247】

毒性研究に加えて、有効投与量はまた、生きている対象に存在するMASP-2タンパク質の量およびMASP-2阻害物質の結合親和性に基づいて評価されてもよい。正常ヒト対象におけるMASP-2レベルは500ng/mlの範囲内の低レベルで血清中に存在し、ある特定の対象におけるMASP-2レベルは、Moller-Kristensen M., et al., J. Immunol Methods 282:159-167, 2003に記載の定量MASP-2アッセイを用いて決定することができる。

40

【0248】

一般的に、MASP-2阻害物質を含む、投与される組成物の投与量は、対象の年齢、体重、身長、性別、全身状態(general medical condition)、および既往歴などの要因に応じて変化する。例示として、抗MASP-2抗体などのMASP-2阻害物質は、約0.010~10.0mg/kg対象体重、好ましくは0.010~1.0mg/kg対象体重、より好ましくは0.010~0.1mg/kg対象体重の投与量範囲内で投与することができる。一部の態様において、組成物は、抗MASP-2抗体およびMASP-2阻害ペプチドの組み合わせを含む。

【0249】

50

ある特定の対象における本発明のMASP-2阻害組成物および方法の治療有効性、ならびに適切な投与量は、当業者に周知の補体アッセイに従って決定することができる。補体は非常に多くの特異的産物を生成する。過去十年間に、小さな活性化断片C3a、C4a、およびC5a、ならびに大きな活性化断片iC3b、C4d、Bb、およびsC5b-9を含む、これらの活性化産物の大部分について高感度かつ特異的なアッセイが開発され、市販されている。これらのアッセイの大部分は、断片の上に露出しているが、新抗原(ネオ抗原)が形成される天然タンパク質の上には露出していない新抗原(ネオ抗原)と反応するモノクローナル抗体を利用する。このために、これらのアッセイは非常に簡単かつ特異的である。大部分はELISA技術に頼っているが、C3aおよびC5aの場合は、ラジオイムノアッセイが依然として用いられる場合もある。これらの後者のアッセイは、処理されていない断片、および循環中に見られる主な形態である、これらの「desArg」断片を両方とも測定する。処理されていない断片およびC5adesArgは細胞表面受容体と結合することによって迅速に切断され、従って、非常に低い濃度で存在する。これに対して、C3adesArgは細胞に結合せず、血漿中に蓄積する。C3a測定は、高感度の経路依存的な補体活性化指標を提供する。代替経路活性化はBb断片を測定することによって評価することができる。膜侵襲経路活性化の液相産物であるsC5b-9の検出は、補体が最後まで活性化されているという証拠を提供する。レクチン経路および古典経路はいずれも同じ活性化産物であるC4aおよびC4dを生成するので、これらの2つの断片を測定しても、これらの2つの経路のどちらが活性化産物を生成したかという情報は得られない。

【0250】

MASP-2依存性補体活性化の阻害は、本発明の方法によるMASP-2阻害物質の投与の結果として生じる補体系成分の以下の変化のうちの少なくとも1つを特徴とする:MASP-2依存性補体活性化系の産物C4b、C3a、C5a、および/もしくはC5b-9(MAC)の生成または産生の阻害(例えば、実施例2に記載のように測定される)、C4切断およびC4b沈着の減少(例えば、実施例10に記載のように測定される)、またはC3切断およびC3b沈着の減少(例えば、実施例10に記載のように測定される)。

【0251】

さらなる作用物質

ある特定の態様において、線維症および/または炎症を予防する、処置する、元に戻す、および/または阻害する方法は、線維症および/または炎症を阻害するのに適した1種類または複数種の他の薬物、生物製剤、または治療介入と一緒に治療レジメンの一部としてMASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)を投与する工程を含む。ある特定の態様において、さらなる薬物、生物製剤、または治療介入は、線維症および/もしくは炎症によって引き起こされるもしくは悪化する疾患もしくは障害に関連する特定の症状に適している。例として、MASP-2阻害抗体は、1種類または複数種の免疫抑制剤、例えば、メトトレキサート、シクロホスファミド、アザチオプリン、およびミコフェノール酸モフェチルと一緒に治療レジメンの一部として投与されてもよい。さらなる例として、MASP-2阻害抗体は、血流を増やすように設計された1種類または複数種の薬剤(例えば、ニフェジピン、アムロジピン、ジルチアゼム、フェロジピン、またはニカルジピン)と一緒に治療レジメンの一部として投与されてもよい。さらなる例として、MASP-2阻害抗体は、線維症を減少させることが意図される1種類または複数種の薬剤、例えば、d-ペニシラミン、コルヒチン、PUVA、リラキシン、シクロスポリン、TGF β 遮断薬、および/またはp38 MAPK遮断薬と一緒に治療レジメンの一部として投与されてもよい。さらなる例として、MASP-2阻害抗体は、ステロイドまたは気管支拡張剤と一緒に治療レジメンの一部として投与されてもよい。

【0252】

MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)を含む組成物および方法は、任意で、MASP-2阻害物質の活性を増強し得る、または関連する治療機能を相加的もしくは相乗的に提供し得る1種類または複数種のさらなる治療剤を含んでもよい。例えば、線維症および/もしくは炎症によって引き起こされるもしくは悪化する疾患もしくは障害に罹患している対象を処置する状況において、1種類または複数種のMASP-2阻害物質は、1種類もしくは複

数種のさらなる抗線維形成剤ならびに/または1種類もしくは複数種の抗ウイルス剤および/もしくは抗炎症剤およびもしくは免疫抑制剤と組み合わせて投与されてもよい(同時投与を含む)。

【0253】

MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、他の治療剤、例えば、一般的な抗ウイルス薬物または免疫抑制薬物、例えば、コルチコステロイド、免疫抑制剤もしくは細胞傷害薬剤、および/または抗線維形成剤と併用することができる。

【0254】

本明細書に記載の方法の一部の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体またはMASP-2の低分子阻害因子)は、コロナウイルスに罹患している対象、例えば、COVID-19またはインフルエンザウイルスに罹患している対象を処置するための単独療法として用いられる。本明細書に記載の方法の一部の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体またはMASP-2の低分子阻害因子)は、他の治療剤、例えば、抗ウイルス剤、治療用抗体、コルチコステロイド、および/またはコロナウイルスもしくはインフルエンザウイルスに罹患している対象の処置に有効なことが示されている他の薬剤と併用される。一部の態様において、薬学的組成物は、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体またはMASP-2の低分子阻害因子)と、少なくとも1種類のさらなる治療剤、例えば、抗ウイルス剤(例えば、レムデシビル)、MASP-2以外の標的に対する治療用抗体、コルチコステロイド、抗凝固剤、例えば、低分子量ヘパリン(例えば、エノキサパリン)、および抗生物質(例えば、アジスロマイシン)を含む。

【0255】

このような併用療法において、MASP-2阻害物質は、1種類または複数種の他の望ましいCOVID-19治療剤、例えば、抗ウイルス剤(例えば、レムデシビル)、MASP-2以外の標的に対する治療用抗体、コルチコステロイド、または抗凝固剤と共に処方されてもよく、これと同時に、その前に、またはその後に投与されてもよい。併用療法の各成分は、当技術分野において公知の様々なやり方で処方され得る。例えば、MASP-2阻害物質と併用療法の第2の薬剤は一緒に処方されてもよく、別々に処方されてもよい。MASP-2阻害物質とさらなる薬剤は、COVID-19患者に一度に、または一連の処置にわたって適切に投与され得る。

【0256】

例示的な抗ウイルス剤には、例えば、ダルナビル(ダルナビルレベルを増やすためにリトナビルまたはコビシスタットと共に用いられることがある)、ファビピラビル、ロピナビル、リトナビル、レムデシビル、ガリデシビル、エバスチン、ダノプレビル、ASC09、エムトリシタビン、テノフォビル、ウミフノビル、バロキサビルマルボキシール、アズブジン、および/またはISR-50が含まれる。例示的な治療用抗体には、例えば、血管増殖因子阻害因子(例えば、ベバシズマブ)、PD-1遮断抗体(例えば、サイモシン、カムレリズマブ(camrelizumab))、CCR5アンタゴニスト(例えば、レロンリマブ)、IL-6受容体アンタゴニスト(例えば、サリルマブ、トシリズマブ)、IL-6標的阻害因子(例えば、シルツキシマブ)、抗GM-CSF抗体(例えば、ジムシルマブ、TJM2)、GM-CSF受容体 α 遮断抗体(例えば、マブリリムマブ)、抗C5抗体(例えば、エクリズマブ、ラブリズマブ)、および/または抗C5a抗体(IFX-1)が含まれる。

【0257】

本明細書に記載の方法の一部の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体、例えば、OMS646、またはMASP-2の低分子阻害因子)は、COVID-19に罹患している対象を処置するためにレムデシビルなどの抗ウイルス剤と併用される。

【0258】

コロナウイルスおよび/またはインフルエンザウイルスを処置するのに有効な可能性がある他の薬剤には、例えば、クロロキン/ヒドロキシクロロキン、メシル酸カモスタット、ルクソリニブ、ペグインターフェロン α -2b、ノバフェロン、イフェンプロジル、組換えACE2、APN01、プリラシジン、BXT-25、BIO-11006、フィンゴリモド、WP1122、イン

10

20

30

40

50

ターフェロン β -1a、ナファモスタット、ロサルタン、および/またはアルテプラゼが含まれる。

【0259】

薬学的担体および送達ビヒクル

一般的に、他の任意の選択された治療剤と組み合わせられた本発明のMASP-2阻害物質組成物は、適宜、薬学的に許容される担体中に含まれる。担体は、無毒で、生体適合性があり、MASP-2阻害物質(およびそれと組み合わせられた他の任意の治療剤)の生物学的活性に悪影響を及ぼさないように選択される。ペプチド用の例示的な薬学的に許容される担体は、Yamadaに対する米国特許第5,211,657号に記載されている。本発明において有用な抗MASP-2抗体および阻害ペプチドは、経口投与、非経口投与、または外科的投与を可能にする、固体、半固体、ゲル、液体、または気体の形をした調製物、例えば、錠剤、カプセル、散剤、顆粒、軟膏、溶液、デポジトリ(depository)、吸入剤、および注射剤に処方されてもよい。本発明はまた、医療装置などをコーティングすることによる組成物の局所投与も意図する。

【0260】

注射、注入、または灌注、および局部送達を介した非経口送達に適した担体には、蒸留水、生理学的リン酸緩衝生理食塩水、通常のリンガー液もしくは乳酸加リンガー液、デキストロース液、ハanks液、またはプロパンジオールが含まれる。さらに、溶媒または分散媒として滅菌不揮発性油が使用されることもある。この目的のために、合成モノグリセリドまたはジグリセリドを含む、任意の生体適合性油を使用することができる。さらに、オレイン酸などの脂肪酸が注射液の調製において有用である。担体および作用物質は、液体、懸濁液、重合可能もしくは重合不可能なゲル、ペースト、または軟膏として配合されてもよい。

【0261】

担体はまた、作用物質の送達を持続(すなわち、延長、遅延、もしくは調節)するために、または治療剤の送達、取り込み、安定性、もしくは薬物動態を増強するために送達ビヒクルを含んでもよい。このような送達ビヒクルは、非限定的な例として、タンパク質、リポソーム、炭水化物、合成有機化合物、無機化合物、ポリマーまたはコポリマーのヒドロゲル、およびポリマーミセルからなる、微粒子、マイクロスフェア、ナノスフェア、またはナノ粒子を含んでもよい。適切なヒドロゲルおよびミセル送達系には、WO2004/009664A2に開示されるPEO:PHB:PEOコポリマーおよびコポリマー/シクロデキストリン複合体、ならびに米国特許出願公開第2002/0019369A1号に開示されるPEOおよびPEO/シクロデキストリン複合体が含まれる。このようなヒドロゲルは目的の作用部位に局所に注射されてもよく、持効性デポーを形成するように皮下または筋肉内に注射されてもよい。

【0262】

関節内送達の場合、MASP-2阻害物質は、注射可能な前記の液体担体もしくはゲル担体、注射可能な前記の持効性送達ビヒクル、またはヒアルロン酸もしくはヒアルロン酸誘導体の中に入れて運ばれてもよい。

【0263】

非ペプチド作用物質の経口投与の場合、MASP-2阻害物質は、スクロース、コーンスターチ、またはセルロースなどの不活性な増量剤または希釈剤の中に入れて運ばれてもよい。

【0264】

局部投与の場合、MASP-2阻害物質は、軟膏、ローション剤、クリーム、ゲル、点眼薬、坐剤、スプレー、液体もしくは粉末の中に入れて運ばれてもよく、ゲルまたはマイクロカプセル送達系の中に入れて経皮パッチを介して運ばれてもよい。

【0265】

エアゾール剤、定量吸入器、ドライパウダー吸入器、およびネブライザーを含む様々な鼻送達系および肺送達系が開発中であり、それぞれ、エアゾール剤、吸入剤、または噴霧送達ビヒクルの中に入れて本発明の送達に適切に合することができる。

【0266】

くも膜下腔内(IT)送達または脳室内(ICV)送達の場合、適切に滅菌した送達系(例えば、液体;ゲル、懸濁液など)を用いて、本発明の組成物を投与することができる。

【0267】

本発明の組成物はまた、生体適合性の賦形剤、例えば、分散剤または湿潤剤、懸濁剤、希釈剤、緩衝液、浸透促進剤、乳化剤、結合剤、増粘剤、調味料(経口投与の場合)を含んでもよい。

【0268】

抗体およびペプチドのための薬学的担体

抗MASP-2抗体および阻害ペプチドに関してより具体的には、例示的な製剤を、水、油、生理食塩水、グリセロール、またはエタノールなどの滅菌液体でもよい薬学的担体と共に、生理学的に許容される希釈剤に溶解した化合物の注射投与量の溶液または懸濁液として非経口投与することができる。さらに、抗MASP-2抗体および阻害ペプチドを含む組成物中には、補助物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、界面活性剤、pH緩衝物質などが存在してもよい。薬学的組成物のさらなる成分には、石油(例えば、動物由来、野菜由来、または合成由来の石油)、例えば、ダイズ油および鉱油が含まれる。一般的に、グリコール、例えば、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールが注射液に好ましい液体担体である。

【0269】

抗MASP-2抗体および阻害ペプチドはまた、活性物質を徐放または拍動放出(pulsatile release)するように処方することができるデポー注射剤または移植片調製物の形で投与することができる。

【0270】

発現阻害因子のための薬学的に許容される担体

本発明の方法において有用な発現阻害因子に関してより具体的には、前記の発現阻害因子および薬学的に許容される担体または希釈剤を含む組成物が提供される。該組成物はコロイド分散系をさらに含んでもよい。

【0271】

発現阻害因子を含む薬学的組成物には、溶液、エマルジョン、およびリポソーム含有製剤が含まれ得るが、これに限定されない。これらの組成物は、前もって形成された液体、自己乳化固体、および自己乳化半固体を含むが、これに限定されない様々な成分から生成することができる。このような組成物の調製は、典型的には、発現阻害因子を、以下のうちの1つまたは複数と組み合わせることを含む:緩衝液、酸化防止剤、低分子量ポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、グルコース、スクロース、またはデキストリンを含む炭水化物、EDTAなどのキレート剤、グルタチオン、ならびに他の安定剤および賦形剤。適切な希釈剤の例は、中性緩衝生理食塩水または非特異的血清アルブミンと混合された生理食塩水である。

【0272】

一部の態様において、前記組成物は、典型的には、ある液体を液滴の形で別の液体の中に分散させた不均一系であるエマルジョンとして調製および処方することができる(Idson, Pharmaceutical Dosage Forms, Vol.1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988を参照されたい)。エマルジョン製剤において用いられる天然乳化剤の例には、アラビアゴム、蜜ろう、ラノリン、レシチン、およびホスファチドが含まれる。

【0273】

一態様において、核酸を含む組成物をマイクロエマルジョンとして処方することができる。本明細書で使用するマイクロエマルジョンは、単一の、光学的に等方な、かつ熱力学的に安定した液体溶液である、水、油、および両親媒性物質の系を指す(Rosoff, Pharmaceutical Dosage Forms, Vol.1を参照されたい)。本発明の方法はまた、アンチセンスオリゴヌクレオチドを望ましい部位に導入および送達するためにリポソームを使用することがある。

【0274】

10

20

30

40

50

局部投与用の発現阻害因子の薬学的組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション剤、クリーム、ゲル、点眼薬、坐剤、スプレー、液体、および粉末を含んでもよい。従来の薬学的担体、ならびに水性、粉末、または油性の主剤および増粘剤などが用いられてもよい。

【0275】

投与の方法

MASP-2阻害物質を含む薬学的組成物は、局所投与方法または全身投与方法が、処置される状態に最も適しているかどうかに応じて多くのやり方で投与することができる。さらに、本発明の組成物を移植可能な医療装置の表面に、または移植可能な医療装置にコーティングするかまたは組み込むことによって、本発明の組成物を送達することができる。

10

【0276】

全身送達

本明細書で使用する「全身送達」および「全身投与」という用語は、筋肉内(IM)投与経路、皮下投与経路、静脈内(IV)投与経路、動脈内投与経路、吸入投与経路、舌下投与経路、頬投与経路、局部投与経路、経皮投与経路、鼻投与経路、直腸投与経路、腔投与経路、および送達作用物質を1つまたは複数の目的の治療作用部位に効果的に分散させる他の投与経路を含む、経口経路および非経口経路を含むが、これに限定されないことが意図される。本組成物の好ましい全身送達経路には、静脈内経路、筋肉内経路、皮下経路、および吸入経路が含まれる。本発明の特定の組成物において用いられる選択された作用物質の正確な全身投与経路は、部分的には、ある特定の投与経路に関連した代謝変換経路に対する作用物質感受性を説明するように決定されることが理解され则认为られる。例えば、ペプチド物質は、最も適切には、経口以外の経路によって投与することができる。

20

【0277】

MASP-2阻害抗体およびポリペプチドを、それを必要とする対象に任意の適切な手段によって送達することができる。MASP-2抗体およびポリペプチドの送達方法は、経口投与経路、肺投与経路、非経口投与経路(例えば、筋肉内投与経路、腹腔内投与経路、静脈内(IV)投与経路、もしくは皮下注射投与経路)、吸入投与経路(例えば、細粉製剤を介した吸入投与経路)、経皮投与経路、鼻投与経路、腔投与経路、直腸投与経路、または舌下投与経路を含み、それぞれの投与経路に適した剤形で処方することができる。

【0278】

代表的な例として、ポリペプチドを吸収することができる身体の膜、例えば、鼻、胃腸、および直腸の膜に適用することによって、MASP-2阻害抗体およびペプチドを生体内に導入することができる。ポリペプチドは典型的には浸透促進剤と共に吸収性の膜に適用される(例えば、Lee, V.H.L., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 5:69, 1988; Lee, V. H.L., J. Controlled Release 13:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York(1991); DeBoer, A.G., et al., J. Controlled Release 13:241, 1990を参照されたい)。例えば、STDHFは、胆汁塩と構造が類似し、鼻送達用の浸透促進剤として用いられてきたステロイド性界面活性剤であるフシジン酸合成誘導体である(Lee, W.A., Biopharm. 22, Nov./Dec. 1990)。

30

【0279】

酵素分解からポリペプチドを保護するために、MASP-2阻害抗体およびポリペプチドを脂質などの別の分子と結合させて導入することができる。例えば、ある特定のタンパク質を体内の酵素加水分解から保護し、従って、半減期を延長するために、ポリマー、特にポリエチレングリコール(PEG)の共有結合が用いられてきた(Fuertges, P., et al., J. Controlled Release 11:139, 1990)。タンパク質送達のための多くのポリマー系が報告されている(Bae, Y.H., et al., J. Controlled Release 9:271, 1989; Hori, R., et al., Pharm. Res. 6:813, 1989; Yamakawa, L, et al., J. Pharm. Sci. 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., Controlled Release 10:195, 1989; Asano, M., et al., J. Controlled Release 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., J. Controlled Release 9:195, 1989; Makino, K., J. Controlled Release 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., J. Ph

40

50

arm. Sci. 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:219, 1989)。

【0280】

最近、血清安定性および循環半減期が改善したリポソームが開発された(例えば、Webb に対する米国特許第5,741,516号を参照されたい)。さらに、潜在的な薬物担体としてのリポソームおよびリポソーム様調製の様々な方法が詳しく調べられている(例えば、Szoka に対する米国特許第5,567,434号;Yagiに対する米国特許第5,552,157号;Nakamoriに対する米国特許第5,565,213号;Shinkarenkoに対する米国特許第5,738,868号;およびGaoに対する米国特許第5,795,587号を参照されたい)。

【0281】

経皮適用の場合、MASP-2阻害抗体およびポリペプチドは担体および/またはアジュバントなどの他の適切な成分と組み合わされてもよい。このような他の成分が、目的の投与のために薬学的に許容される必要があり、かつ組成物の活性成分の活性を分解することができないことを除けば、該成分がこういったものには制限はない。適切なビヒクルの例には、精製コラーゲンを含む、または含まない、軟膏、クリーム、ゲル、または懸濁液が含まれる。MASP-2阻害抗体およびポリペプチドはまた、好ましくは、液体または半液体の形で、経皮パッチ、硬膏、および包帯に含浸されてもよい。

【0282】

本発明の組成物は、望ましいレベルの治療効果を維持するよう決定された間隔で定期的に全身投与されてもよい。例えば、組成物は、例えば、皮下注射によって2~4週間ごとにまたはそれより少ない頻度で投与されてもよい。投与計画は、作用物質の組み合わせの作用に影響を及ぼし得る様々な要因を考慮して医師によって決定されと考えられる。これらの要因は、処置される状態の進行の程度、患者の年齢、性別、および体重、ならびに他の臨床要因を含むと考えられる。それぞれの個々の作用物質の投与量は、組成物に含まれるMASP-2阻害物質、ならびに任意の薬物送達ビヒクル(例えば、持続性送達ビヒクル)の存在および内容の関数として変化すると考えられる。さらに、送達作用物質の投与頻度および薬物動態学的挙動の変動の原因となるように投与量を調節することができる。

【0283】

局所送達

本明細書で使用する「局所」という用語は、目的の限局作用の部位の中に、または目的の限局作用の部位の周囲に薬物を適用することを包含し、例えば、皮膚または他の患部組織への局所送達、眼送達、くも膜下腔内(IT)、脳室内(ICV)、関節内、洞内、頭蓋内、もしくは小胞内の投与、留置、または灌注を含んでもよい。局所投与は、低用量の投与が全身副作用を回避するために、ならびに局所送達部位に活性物質を送達および濃縮するタイミングをより正確に制御するために好ましい場合がある。局所投与は、代謝、血流などの患者間のばらつきに関係なく標的部位において既知濃度を供給する。改善された投与量制御は直接的な送達方法によっても提供される。

【0284】

MASP-2阻害物質の局所送達は、線維症および/または炎症によって引き起こされるまたは悪化する疾患または障害を処置するための外科的方法の状況において、例えば、外科手術などの処置中に実現することができる。

【0285】

治療レジメン

予防用途では、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体またはMASP-2阻害低分子化合物)を含む薬学的組成物は、コロナウイルス誘発性急性呼吸窮迫症候群もしくはインフルエンザウイルス誘発性急性呼吸窮迫症候群にかかりやすい対象、またはそうでなければその発症リスクがある対象に、MASP-2依存性補体活性化を阻害し、それによって、呼吸症候群の症状を低減させるか、排除するか、またはその症状の発症リスクを低減させるのに十分な量で投与される。予防レジメンおよび治療レジメンの両方において、MASP-2阻害物質を含む組成物は、対象において十分な治療アウトカムが得られるまで、いくつかの投与量に分けて投与されてもよい。本発明のMASP-2阻害組成物の適用は、線維症および/

10

20

30

40

50

または炎症に関連する急性状態の処置の場合は組成物の単回投与によって、または限定された一連の投与によって行われてもよい。または、前記組成物は、線維症および/または炎症に関連する慢性状態の処置の場合は長期間にわたって定期的な間隔で投与されてもよい。

【0286】

予防レジメンおよび治療レジメンの両方において、MASP-2阻害物質を含む組成物は、対象において十分な治療アウトカムが得られるまで、いくつかの投与量に分けて投与されてもよい。本発明の一態様において、MASP-2阻害物質はMASP-2抗体を含み、MASP-2抗体は、適切には、0.1mg~10,000mg、より適切には1.0mg~5,000mg、より適切には10.0mg~2,000mg、より適切には10.0mg~1,000mg、さらにより適切には50.0mg~500mgの投与量で成人患者(例えば、70kgの平均成人体重)に投与されてもよい。小児患者の場合、投与量は患者の体重に比例して調整することができる。本発明のMASP-2阻害組成物の適用は、線維症および/もしくは炎症によって引き起こされるもしくは悪化する疾患もしくは障害に罹患しているかまたはその発症リスクがある対象の処置の場合は、組成物の単回投与によって、または限定された一連の投与によって行われてもよい。または、前記組成物は、線維症および/もしくは炎症によって引き起こされるもしくは悪化する疾患もしくは障害に罹患しているかまたはその発症リスクがある対象の処置の場合は、長期間にわたって、定期的な間隔で、例えば、毎日、週2回、毎週、隔週、毎月、または隔月投与されてもよい。

10

【0287】

予防レジメンおよび治療レジメンの両方において、MASP-2阻害物質を含む組成物は、対象において十分な治療アウトカムが得られるまで、いくつかの投与量に分けて投与されてもよい。

20

【実施例】

【0288】

VI. 実施例

以下の実施例は、本発明の実施について意図された最良の形態の単なる例示であり、本発明を限定すると解釈してはならない。本明細書中の全ての文献引用が明確に参照により組み入れられる。

【0289】

実施例1

30

本実施例は、MASP-2が欠損しているが(MASP-2-/-)MAP19は十分な(MAP19+/+)マウスシステムの生成について述べる。

【0290】

材料および方法: 図3に示したように、セリンプロテアーゼドメインをコードするエキソンを含む、マウスMASP-2のC末端をコードする3つのエキソンを破壊するために、ターゲティングベクターpKO-NTKV1901を設計した。pKO-NTKV1901を用いて、マウスES細胞株E14.1a(SV129Ola)をトランスフェクトした。ネオマイシン耐性およびチミジンキナーゼ感受性のクローンを選択した。600個のESクローンをスクリーニングした。このうち4個の異なるクローンが特定され、図3に示したように、サザンブロットによって、予想された選択的標的化および組換え事象を含むことが立証された。胚移植によって、これら4個の陽性クローンからキメラを生成した。次いで、キメラを遺伝的バックグラウンドC57/BL6において戻し交配して、トランスジェニック雄を作製した。トランスジェニック雄を雌と交配させてF1を得た。子孫の50%は、破壊されたMASP-2遺伝子についてヘテロ接合性を示した。ヘテロマウスを交雑させて、ホモMASP-2欠損子孫、ヘテロマウス、および野生型マウスをそれぞれ1:2:1の比で得た。

40

【0291】

結果および表現型: 結果として生じたホモMASP-2-/-欠損マウスは生存可能であり、生殖能力があることが見出され、正しい標的化事象を確認するためにサザンブロットによって、MASP-2 mRNAの非存在を確認するためにノザンブロットによって、MASP-2タンパク質の非存在を確認するためにウエスタンブロットによって、MASP-2欠損であることが

50

立証された(データ示さず)。LightCycler装置による時間分解型RT-PCRを用いて、MAP19 mRNAの存在およびMASP-2 mRNAの非存在がさらに確認された。MASP-2^{-/-}マウスは、予想通り、MAP19、MASP-1、およびMASP-3のmRNAおよびタンパク質を発現し続ける(データ示さず)。MASP-2^{-/-}マウスにおけるプロペルジン、B因子、D因子、C4、C2、およびC3のmRNAの存在および量をLightCycler分析によって評価し、野生型同腹仔対照のものと同一であることが見出された(データ示さず)。ホモMASP-2^{-/-}マウスに由来する血漿は、実施例2にさらに記載のように、レクチン経路を介した補体活性化が完全に欠損している。

【0292】

純粋なC57BL6バックグラウンドのMASP-2^{-/-}系統の生成: MASP-2^{-/-}マウスをC57BL6純系と9世代にわたって戻し交配した後に、MASP-2^{-/-}系統を実験動物モデルとして使用した。

【0293】

マウスMASP-2^{-/-}, MAP19^{+/+}であり、ヒトMASP-2トランスジェニック(マウスMASP-2ノックアウトおよびヒトMASP-2ノックイン)を発現するトランスジェニックマウス系統も以下のように生成した。

【0294】

材料および方法: 図4に示したように、最初の3つのエキソン(エキソン1~エキソン3)を含むヒトMASP2遺伝子のプロモーター領域の後に、次の8つのエキソンからなるコード配列に相当するcDNA配列を含み、それによって、その内因性プロモーターによって駆動される完全長MASP-2タンパク質をコードする「ミニhMASP-2」と呼ばれるヒトMASP-2をコードするミニ遺伝子(SEQ ID NO:49)を構築した。欠損マウスMASP2遺伝子を、遺伝子導入により発現されるヒトMASP-2で置換するために、ミニhMASP-2構築物をMASP-2^{-/-}受精卵に注入した。

【0295】

実施例2

本実施例はレクチン経路を介した補体活性化にはMASP-2が必要であることを証明する。

【0296】

方法および材料:

レクチン経路特異的C4切断アッセイ: C4切断アッセイは、Petersen, S.V., et al., J. Immunol Methods 257:107(2001)によって述べられており、L-フィコリンに結合する黄色ブドウ球菌由来リポテイコ酸(LTA)に起因するレクチン経路活性化を測定する。下記のようにプレートをLPSおよびマンナンまたはザイモサンでコーティングした後に、MASP-2^{-/-}マウスに由来する血清を添加することによって、Petersen et al., (2001)に記載のアッセイがMBLを介したレクチン経路活性化を測定するように適合化された。このアッセイを、古典経路によるC4切断の可能性を取り除くようにも変更した。これは、レクチン経路認識成分とそのリガンドとの高親和性結合を可能にするが、内因性C4の活性化を阻止し、それによって、C1複合体を解離することによって古典経路の関与を排除する、1M NaClを含有する試料希釈緩衝液を使用することによって達成された。簡単に述べると、変更されたアッセイでは、血清試料(高塩(1M NaCl)緩衝液で希釈した)をリガンドコーティングプレートに添加した後に、生理学的濃度の塩を含む緩衝液に溶解した一定量の精製C4を添加した。MASP-2を含有する結合した認識複合体はC4を切断し、その結果、C4bが沈着する。

【0297】

アッセイ方法:

(1)Nunc Maxisorbマイクロタイタープレート(Maxisorb(登録商標), Nunc, カタログ番号442404, Fisher Scientific)を、コーティング緩衝液(15mM Na₂CO₃, 35mM NaHCO₃, pH9.6)で希釈した1μg/mlマンナン(M7504 Sigma)または他の任意のリガンド(例えば、以下の列挙したリガンド)でコーティングした。

【0298】

10

20

30

40

50

以下の試薬をアッセイにおいて使用した:

- a. マンナン(100 μ l コーティング緩衝液中に1 μ g/ウェルのマンナン(M7504 Sigma));
- b. ザイモサン(100 μ l コーティング緩衝液中に1 μ g/ウェルのザイモサン(Sigma));
- c. LTA(100 μ l コーティング緩衝液中に1 μ g/ウェルまたは20 μ l メタノール中に2 μ g/ウェル);
- d. コーティング緩衝液中に1 μ gのH-フィコリン特異的Mab 4H5;
- e. エロコッカス・ビリダンス(*Aerococcus viridans*)に由来するPSA(100 μ l コーティング緩衝液中に2 μ g/ウェル);
- f. コーティング緩衝液中に100 μ l/ウェルのホルマリン固定黄色ブドウ球菌DSM20233(OD₅₅₀=0.5)。

10

【0299】

(2) プレートを4°Cで一晩インキュベートした。

【0300】

(3) 一晩のインキュベーション後、プレートを0.1% HSA-TBSブロッキング緩衝液(0.1%(w/v) HSAを含む10mM Tris-CL、140mM NaCl、1.5mM NaN₃、pH7.4)とともに1~3時間インキュベートし、次いで、プレートをTBS/tween/Ca²⁺(0.05% Tween20および5mM CaCl₂、1mM MgCl₂、pH7.4を含むTBS)で3回洗浄することによって、残存するタンパク質結合部位を飽和させた。

【0301】

(4) 試験しようとする血清試料をMBL結合緩衝液(1M NaCl)で希釈し、希釈試料をプレートに添加し、4°Cで一晩インキュベートした。緩衝液だけが入っているウェルを陰性対照として使用した。

20

【0302】

(5) 4°Cで一晩のインキュベーション後、プレートをTBS/tween/Ca²⁺で3回洗浄した。次いで、ヒトC4(100 μ l/ウェル、1 μ g/ml、BBS(4mM バルビタール、145mM NaCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、pH7.4)で希釈した)をプレートに添加し、37°Cで90分間インキュベートした。プレートをTBS/tween/Ca²⁺で3回、再洗浄した。

【0303】

(6) C4b沈着を、アルカリホスファターゼ結合ニワトリ抗ヒトC4c(TBS/tween/Ca²⁺で1:1000に希釈した)で検出し、アルカリホスファターゼ結合ニワトリ抗ヒトC4cをプレートに添加し、室温で90分間インキュベートした。次いで、プレートをTBS/tween/Ca²⁺で3回、再洗浄した。

30

【0304】

(7) 100 μ lのp-ニトロフェニルリン酸基質溶液を添加し、室温で20分間インキュベートし、マイクロタイタープレートリーダーにおいてOD₄₀₅を読み取ることによって、アルカリホスファターゼを検出した。

【0305】

結果: 図5AおよびBは、MASP-2+/+(十字)、MASP-2+/- (黒丸)、およびMASP-2-/- (黒三角)の血清希釈液中のマンナン(図5A)およびザイモサン(図5B)におけるC4b沈着の量を示す。図5Cは、野生型血清に対して正規化されたC4b沈着量の測定に基づく、野生型マウス(n=5)と比較した、MASP-2-/+マウス(n=5)およびMASP-2-/-マウス(n=4)の、ザイモサン(白色の棒)またはマンナン(影付きの棒)でコーティングされたプレート上での相対的C4コンバーターゼ活性を示す。エラーバーは標準偏差を示す。図5A~Cに示したように、MASP-2-/-マウスに由来する血漿は、マンナンコーティングプレート上およびザイモサンコーティングプレート上でのレクチン経路を介した補体活性化が完全に欠損している。これらの結果から、MASP-2はレクチン経路のエフェクター成分であることがはっきりと証明される。

40

【0306】

組換えMASP-2はMASP-2-/-マウスに由来する血清中でレクチン経路依存性C4活性化を再構成する

50

MASP-2の非存在がMASP-2-/-マウスにおけるレクチン経路依存性C4活性化消失の直接の原因であることを証明するために、血清試料への組換えMASP-2タンパク質の添加の効果を前記のC4切断アッセイにおいて調べた。機能的に活性なマウスMASP-2組換えタンパク質および触媒不活性マウスMASP-2A(セリンプロテアーゼドメイン中の活性部位セリン残基がアラニン残基で置換された)組換えタンパク質を以下の実施例3に記載のように産生および精製した。4匹のMASP-2-/-マウスからプールされた血清を、漸増タンパク質濃度の組換えマウスMASP-2または不活性組換えマウスMASP-2Aとプレインキュベートし、C4コンバーターゼ活性を前記のようにアッセイした。

【0307】

結果: 図6に示したように、機能的に活性なマウス組換えMASP-2タンパク質(白三角として示した)をMASP-2-/-マウスから得られた血清に添加すると、レクチン経路依存性C4活性化がタンパク質濃度依存的に回復したのに対して、触媒不活性マウスMASP-2Aタンパク質(星として示した)はC4活性化を回復しなかった。図6に示した結果は、プールされた野生型マウス血清を用いて観察されたC4活性化(点線として示した)に対して正規化されている。

【0308】

実施例3

本実施例は、組換え完全長ヒトMASP-2、ラットおよびマウスのMASP-2、MASP-2に由来するポリペプチド、ならびに触媒不活性化変異型MASP-2の組換え発現およびタンパク質産生について述べる。

【0309】

完全長ヒトMASP-2、マウスMASP-2、およびラットMASP-2の発現:

ヒトMASP-2の完全長cDNA配列(SEQ ID NO:4)を、CMVエンハンサー/プロモーター領域の制御下で真核生物発現を駆動する哺乳動物発現ベクターpCI-Neo(Promega)にもサブクローニングした(Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537-66(1991)に記載)。完全長マウスcDNA(SEQ ID NO:50)およびラットMASP-2 cDNA(SEQ ID NO:53)をそれぞれpED発現ベクターにサブクローニングした。次いで、Maniatis et al., 1989に記載の標準的なリン酸カルシウムトランスフェクション手順を用いて、MASP-2発現ベクターを、付着性のチャイニーズハムスター卵巣細胞株DXB1にトランスフェクトした。これらの構築物でトランスフェクトされた細胞は非常にゆっくりと増殖した。このことは、コードされたプロテアーゼが細胞傷害性であることを意味する。

【0310】

別のアプローチでは、MASP-2の内因性プロモーターによって駆動されるヒトMASP-2 cDNAを含有するミニ遺伝子構築物(SEQ ID NO:49)をチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)に一過的にトランスフェクトした。ヒトMASP-2タンパク質を培養培地に分泌させ、下記のように単離した。

【0311】

完全長触媒不活性MASP-2の発現:

原理: 認識小成分MBLまたはフィコリン(L-フィコリン、H-フィコリン、もしくはM-フィコリンのいずれか)がそれぞれの炭水化物パターンに結合した後に、MASP-2は自己触媒切断によって活性化される。血清からのMASP-2の単離手順中に、または組換え発現後の精製中に、MASP-2を活性化する自己触媒切断が起こることが多い。抗原として使用するための、より安定したタンパク質調製物を得るために、ラットではプロテアーゼドメインの触媒三残基(catalytic triad)に存在するセリン残基をアラニン残基で(SEQ ID NO:55 Ser617からAla617)、またはマウスでは(SEQ ID NO:52 Ser617からAla617)で;ヒトでは(SEQ ID NO:6 Ser618からAla618)で置換することによって、MASP-2Aと呼ばれる触媒不活性型MASP-2を作製した。

【0312】

触媒不活性なヒトMASP-2Aタンパク質およびマウスMASP-2Aタンパク質を生成するた

10

20

30

40

50

めに、表5に示したオリゴヌクレオチドを用いて部位特異的変異誘発を行った。酵素的に活性なセリンをコードするヒトcDNAおよびマウスcDNAの領域にアニーリングするように表5のオリゴヌクレオチドを設計した。セリンコドンアラニンコドンに変えるためにオリゴヌクレオチドはミスマッチを含有する。例えば、開始コドンから酵素的に活性なセリンまで、このセリンから停止コドンまでの領域を増幅して、Ser618からAla618への変異を含有する変異MASP-2Aからの完全オープンリーディングフレームを生成するために、PCRオリゴヌクレオチドSEQ ID NO:56～59をヒトMASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)と組み合わせ使用した。アガロースゲル電気泳動およびバンド調製の後にPCR産物を精製し、標準的なテーリング手順を用いて単一アデノシン重複を作製した。次いで、アデノシン尾部のあるMASP-2AをpGEM-T easyベクターにクローニングし、形質転換によって大腸菌に導入した。

10

【0313】

SEQ ID NO:64およびSEQ ID NO:65をキナーゼ処理し、これらの2つのオリゴヌクレオチドを等モル量で組み合わせ、100℃で2分間、加熱し、室温までゆっくりと冷却することによってアニーリングすることによって、触媒不活性ラットMASP-2Aタンパク質を生成した。結果として生じたアニーリング断片はPst1およびXba1適合末端を有し、野生型ラットMASP-2 cDNA(SEQ ID NO:53)のPst1-Xba1断片の代わりに挿入して、ラットMASP-2Aを生成した。

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

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

20

【0314】

下記のように、ヒトMASP-2A、マウスMASP-2A、およびラットMASP-2Aをそれぞれ哺乳動物発現ベクターpEDまたはpCI-Neoにさらにサブクローニングし、チャイニーズハムスター卵巣細胞株DxB1にトランスフェクトした。

【0315】

別のアプローチでは、Chen et al., J. Biol. Chem., 276(28):25894-25902, 2001に記載の方法を用いて触媒不活性型MASP-2を構築する。簡単に述べると、完全長ヒトMASP-2 cDNAを含有するプラスミド(Thiel et al., Nature 386:506, 1997に記載)をXho1およびEcoR1で消化し、MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4として本明細書に記載)をpFastBac1バキュロウイルストランスファベクター(Life Technologies, NY)の対応する制限部位にクローニングする。次いで、ペプチド領域アミノ酸610～625をコードする二本鎖オリゴヌクレオチド(SEQ ID NO:13)を天然領域アミノ酸610～625で置換して、不活性プロテアーゼドメインを有するMASP-2完全長ポリペプチドを作製することによって、Ser618にあるMASP-2セリンプロテアーゼ活性部位をAla618に変える。

30

【0316】

ヒトMasp-2に由来するポリペプチド領域を含有する発現プラスミドの構築

MASP-2の様々なドメインを分泌させるために、MASP-2シグナルペプチド(SEQ ID NO:5の残基1-15)を用いて以下の構築物を作製する。MASP-2(SEQ ID NO:6)の残基1～121をコードする領域(N末端CUBIドメインに対応する)を増幅するPCRによって、ヒトMASP-2 CUBIドメイン(SEQ ID NO:8)を発現する構築物を作製する。MASP-2(SEQ ID NO:6)の残基1～166をコードする領域(N末端CUBIEGFドメインに対応する)を増幅するPCRによって、ヒトMASP-2 CUBIEGFドメイン(SEQ ID NO:9)を発現する構築物を作製する。MASP-2(SEQ ID NO:6)の残基1～293をコードする領域(N末端CUBIEGFCUBIIドメインに対応する)を増幅するPCRによって、ヒトMASP-2 CUBIEGFCUBIIドメイン(SEQ ID NO:10)を発現する構築物を作製する。確立されたPCR法に従って、VentRポリメラーゼおよび鋳型としてpBS-MASP-2を用いたPCRによって前述のドメインを増幅する。センスプライマーの5'プライマー配列

40

50

(5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO:34)

は、PCR産物の5'末端にBamHI制限部位(下線)を導入する。以下の表5に示した、それぞれのMASP-2ドメインのアンチセンスプライマーは、それぞれのPCR産物の末端に停止コドン(太字体)の後にEcoRI部位(下線)を導入するように設計されている。DNA断片を増幅したら、BamHIおよびEcoRIで消化し、pFastBac1ベクターの対応する部位にクローニングする。結果として生じた構築物を制限酵素マッピングによって特徴決定し、dsDNA配列決定によって確認する。

【0317】

(表5) MASP-2 PCRプライマー

MASP-2ドメイン	5' PCR プライマー	3' PCR プライマー
SEQ ID NO:8 CUBI (SEQ ID NO:6の aa1~121)	5'CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCA TA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (SEQ ID NO:6 のaa1~166)	5'CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCG CT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (SEQ ID NO:6のaa1~293)	5'CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGG AT 3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 ヒトMASP-2	5'ATGAGGCTGCTGA CCCTCCTGGGCCTTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2 フォワード	5'TTAAAATCACTAATTAT GTTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_リバース
SEQ ID NO:4 ヒトMASP-2 cDNA	5'CAGAGGTGACGCA GGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_ フォワード	5'GTGCCCCTCCTGCGTCA CCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_リバース
SEQ ID NO:50 マウス MASP-2 cDNA	5'ATGAGGCTACTCA TCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2 フォワード	5'TTAGAAATTACTTATTAT GTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_リバース
SEQ ID NO:50 マウス MASP-2 cDNA	5'CCCCCCTGCGTC ACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_ フォワード	5'CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_リバース

【0318】

MASP-2の組換え真核生物発現、ならびに酵素的に不活性なマウスMASP-2A、ラットMASP-2A、およびヒトMASP-2Aのタンパク質産生

標準的なリン酸カルシウムトランスフェクション手順(Maniatis et al., 1989)を用いて、前記のMASP-2発現構築物およびMASP-2A発現構築物をDXB1細胞にトランスフェク

トした。調製物が他の血清タンパク質で確実に汚染されないようにするために、MASP-2Aを無血清培地中で産生させた。1日おきに(計4回)、培地をコンフルエント細胞から回収した。組換えMASP-2Aレベルの平均は、3種類の種それぞれについて培地1リットルにつき約1.5mgであった。

【0319】

MASP-2Aタンパク質の精製: MASP-2A(前記のSer-Ala変異体)を、MBP-A-アガロースカラムでのアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。この戦略によって、外部タグを使用することなく迅速な精製が可能になった。MASP-2A(等量のローディングバッファー(150mM NaClおよび25mM CaCl₂を含有する50mM Tris-Cl, pH7.5で希釈した培地100~200ml)を、10mlのローディングバッファーで予め平衡状態にしたMBP-アガロースアフィニティカラム(4ml)にロードした。さらに10mlのローディングバッファーで洗浄した後に、1.25M NaClおよび10mM EDTAを含有する50mM Tris-Cl, pH7.5を用いて、タンパク質を1ml画分中に溶出させた。MASP-2Aを含有する画分をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって特定した。必要に応じて、MASP-2Aを、MonoQカラム(HR5/5)でのイオン交換クロマトグラフィーによってさらに精製した。タンパク質を、50mM NaClを含有する50mM Tris-Cl pH7.5を用いて透析し、同じ緩衝液で平衡状態にしたカラムにロードした。洗浄後、結合しているMASP-2Aを、10mlにわたって0.05~1MのNaCl勾配で溶出させた。

【0320】

結果: 収量0.25~0.5mgのMASP-2Aタンパク質を培地200mlから得た。MALDI-MSによって求められた分子量77.5kDaは、グリコシル化のために非修飾ポリペプチドの算出値(73.5kDa)よりも大きい。それぞれのN-グリコシル化部位におけるグリカンの付着が、観察された質量の原因となっている。MASP-2AはSDS-ポリアクリルアミドゲル上でシングルバンドとして移動し、このことから、MASP-2Aは生合成中にタンパク質分解処理されないことが証明される。平衡超遠心分離によって求められた重量平均分子量はグリコシル化ポリペプチドのホモ二量体の算出値と一致する。

【0321】

組換えヒトMASP-2ポリペプチドの産生

組換えMASP-2およびMASP2A由来ポリペプチドを産生するための別の方法は、Thiele ns, N.M., et al., J. Immunol 166:5068-5077, 2001に記載されている。簡単に述べると、ヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*)昆虫細胞(Novagen, Madison, WIから得たReady-Plaque Sf9細胞)を、50IU/mlペニシリンおよび50mg/mlストレプトマイシン(Life Technologies)を添加したSf900II無血清培地(Life Technologies)中で増殖および維持する。イラクサギンウワバ(*Trichoplusia ni*)(High Five)昆虫細胞(Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, Franceにより提供された)を、50IU/mlペニシリンおよび50mg/mlストレプトマイシンで添加した、10%FCS(Dominique Dutscher, Brumath, France)を含有するTC100培地(Life Technologies)中で維持する。組換えバキュロウイルスを、Bac-to-Bac system(登録商標)(Life Technologies)を用いて生成する。バクミドDNAを、Qiagen midiprep精製系(Qiagen)を用いて精製し、製造業者のプロトコールに記載のようにSf900 II SFM培地(Life Technologies)に溶解したセルフエクシジョン(cellfectin)を用いてSf9昆虫細胞をトランスフェクトするのに使用する。組換えウイルス粒子を4日後に収集し、ウイルスプラークアッセイによって滴定し、King and Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman and Hall Ltd., London, pp.111-114, 1992に記載のように増幅する。

【0322】

High Five細胞(1.75×10^7 細胞/175cm²組織培養フラスコ)に、Sf900 II SFM培地中、感染効率2で、MASP-2ポリペプチドを含有する組換えウイルスを28℃で96時間、感染させる。上清を遠心分離によって収集し、ジイソプロピルホスホロフルオリデートを1mMの最終濃度まで添加する。

【0323】

MASP-2ポリペプチドを培地中に分泌させる。培養上清を、50mM NaCl、1mM CaCl₂、50mM塩酸トリエタノールアミン、pH8.1に対して透析し、同じ緩衝液で平衡状態にしたQ-Sepharose Fast Flowカラム(Amersham Pharmacia Biotech)(2.8×12cm)に1.5ml/minでロードする。溶出は、同じ緩衝液に溶解した350mM NaClまでの1.2リットル直線勾配を適用することによって行う。組換えMASP-2ポリペプチドを含有する画分をウエスタンブロット分析によって特定し、60%(w/v)まで(NH₄)₂SO₄を添加することによって沈降させ、4℃で一晩静置する。ペレットを、145mM NaCl、1mM CaCl₂、50mM塩酸トリエタノールアミン、pH7.4に再懸濁し、同じ緩衝液で平衡状態にしたTSK G3000 SWGカラム(7.5×600mm)(Tosohas, Montgomeryville, PA)に適用する。次いで、精製されたポリペプチドを、Microsepマイクロコンセントレーター(microconcentrator)(m.w.カットオフ=10,000)(Filtron, Karlstein, Germany)での限外濾過によって0.3mg/mlまで濃縮する。

10

【0324】

実施例4

本実施例はMASP-2ポリペプチドに対するポリクローナル抗体を作製する方法について述べる。

【0325】

材料および方法:

MASP-2抗原: 以下の単離されたMASP-2ポリペプチドを用いてウサギを免疫することによって、ポリクローナル抗ヒトMASP-2抗血清を作製する:血清から単離されたヒトMASP-2(SEQ ID NO:6);実施例3に記載の組換えヒトMASP-2(SEQ ID NO:6)、不活性プロテアーゼドメイン(SEQ ID NO:13)を含有するMASP-2A;ならびに前記の実施例3に記載のように発現された、組換えCUBI(SEQ ID NO:8)、CUBEGFI(SEQ ID NO:9)、およびCUBEGFCUBII(SEQ ID NO:10)。

20

【0326】

ポリクローナル抗体: BCG(カルメット・ゲラン杆菌ワクチン)で初回刺激を受けた6週齢ウサギを、滅菌生理食塩水に溶解した100μgのMASP-2ポリペプチド100μg/mlの注射によって免疫する。注射を4週間ごとに行い、実施例5に記載のようにELISAアッセイによって抗体価をモニタリングする。プロテインAアフィニティクロマトグラフィーによる抗体精製のために、培養上清を収集する。

30

【0327】

実施例5

本実施例は、ラットMASP-2ポリペプチドまたはヒトMASP-2ポリペプチドに対するマウスモノクローナル抗体を作製するための方法について述べる。

【0328】

材料および方法:

雄A/Jマウス(Harlan, Houston, Tex.)、8~12週齢に、完全フロイントアジュバント(Difco Laboratories, Detroit, Mich.)を含む200μlのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)pH7.4に溶解したヒトまたはラットのrMASP-2またはrMASP-2Aポリペプチド(実施例3に記載のように作った)100μgを皮下注射する。2週間の間隔で2回、マウスに、不完全フロイントアジュバントに溶解したヒトまたはラットのrMASP-2またはrMASP-2Aポリペプチド50μgを皮下注射する。4週目に、マウスに、PBSに溶解したヒトまたはラットのrMASP-2またはrMASP-2Aポリペプチド50μgを注射し、4日後に融合する。

40

【0329】

それぞれの融合について、免疫したマウスの脾臓からシングルセル懸濁液を調製し、Sp2/0ミエローマ細胞との融合に使用する。50%ポリエチレングリコール(M.W.1450)(Kodak, Rochester, N.Y.)および5%ジメチルスルホキシド(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)を含有する培地中で、 5×10^8 個のSp2/0および 5×10^8 個の脾臓細胞を融合する。次いで、10%胎仔ウシ血清、100単位/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、0.1mMヒポキサンチン、0.4μMアミノプテリン、および16μMチミジンを添加し

50

たIscove培地(Gibco, Grand Island, N.Y.)に溶解して、細胞を 1.5×10^5 個の脾臓細胞/懸濁液200 μ lの濃度まで調節する。200マイクロリットルの細胞懸濁液を、約20個の96ウェルマイクロカルチャープレートの各ウェルに添加する。約10日後に、ELISAアッセイにおける精製因子MASP-2との反応性についてスクリーニングするために培養上清を取り出す。

【0330】

ELISAアッセイ: 50ng/mlの精製hMASP-2 50 μ lまたはラットrMASP-2(もしくはrMASP-2A)を室温で一晩、添加することによって、Immulon(登録商標)2(Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.)マイクロテストプレートのウェルをコーティングする。コーティング用のMASP-2濃度が低いので、高親和性抗体の選択が可能である。プレートをパチンとはじくことによって、コーティング溶液を除去した後に、非特異的部位をブロックするために、PBSに溶解した200 μ lのBLOTTO(無脂肪ドライミルク)を各ウェルに1時間、添加する。次いで、1時間後、ウェルを緩衝液PBST(0.05% Tween20を含有するPBS)で洗浄する。それぞれの融合ウェルから50マイクロリットルの培養上清を収集し、50 μ lのBLOTTOと混合し、次いで、マイクロテストプレートの個々のウェルに添加する。1時間のインキュベーション後に、ウェルをPBSTで洗浄する。次いで、結合したマウス抗体を、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合ヤギ抗マウスIgG(Fc特異的)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.)との反応によって検出し、BLOTTOで1:2,000に希釈する。発色させるために、0.1% 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(Sigma, St. Louis, Mo.)および0.0003%過酸化水素(Sigma)を含有するペルオキシダーゼ基質溶液をウェルに30分間、添加する。反応を50 μ lの2M H_2SO_4 /ウェルを添加することによって止める。反応混合物の450nmでの光学密度をBioTek(登録商標)ELISA Reader(BioTek(登録商標)Instruments, Winooski, Vt.)で読み取る。

【0331】

MASP-2結合アッセイ:

前記のMASP-2 ELISAアッセイの試験において陽性と判定された培養上清を、MASP-2に対するMASP-2阻害物質の結合親和性を決定するために結合アッセイにおいて試験することができる。阻害物質が補体系の他の抗原に結合するかどうか判定するために類似アッセイも使用することができる。

【0332】

ポリスチレンマイクロタイタープレートウェル(96ウェル培地結合プレート, Corning Costar, Cambridge, MA)を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)pH7.4に溶解したMASP-2(20 ng/100 μ l/ウェル, Advanced Research Technology, San Diego, CA)で4°Cにおいて一晩コーティングする。MASP-2溶液を吸引した後に、ウェルを、1%ウシ血清アルブミン(BSA; Sigma Chemical)を含有するPBSで室温において2時間ブロックする。MASP-2コーティングのないウェルはバックグラウンド対照として役立つ。ブロッキング溶液に溶解した様々な濃度のハイブリドーマ上清または精製抗MASP-2 MoAbのアリコートウェルに添加する。室温で2時間のインキュベーション後に、ウェルをPBSで大規模にリンスする。ブロッキング溶液に溶解したペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG(Sigma Chemical)を添加し、室温で1時間インキュベートすることによって、MASP-2に結合した抗MASP-2 MoAbを検出する。プレートをPBSで徹底的に再度リンスし、100 μ lの3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)基質(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を添加する。TMBの反応を、100 μ lの1Mリン酸を添加することによってクエンチし、プレートをマイクロプレートリーダー(SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)において450nmで読み取る。

【0333】

次いで、陽性ウェル由来の培養上清を、機能アッセイ、例えば、実施例2に記載のC4切断アッセイにおいて補体活性化を阻害する能力について試験する。次いで、陽性ウェル中の細胞を限界希釈によってクローニングする。MoAbを、前記のようにELISAアッセイにおいてhMASP-2との反応性について再試験する。選択されたハイブリドーマをスピナーフ

10

20

30

40

50

ラスコの中で増殖させ、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによる抗体精製のために、使用済みの培養上清を収集する。

【0334】

実施例6

本実施例は、ヒト化マウス抗MASP-2抗体および抗体断片の生成および作製について述べる。

【0335】

実施例5に記載のように、雄A/Jマウスにおいてマウス抗MASP-2モノクローナル抗体を生成する。次いで、マウス抗体は、マウス抗体の免疫原性を弱めるために、マウス定常領域をそのヒト対応物で置換して抗体のキメラIgGおよびFab断片を生成することによって、下記のようにヒト化され、該抗体のキメラIgGおよびFab断片は、本発明によるヒト対象におけるMASP-2依存性補体活性化の副作用を阻害するのに有用である。

【0336】

1. マウスハイブリドーマ細胞に由来する抗MASP-2可変領域遺伝子のクローニング

RNAzolを用いて製造業者のプロトコール(Biotech, Houston, Tex.)に従って、総RNAを、抗MASP-2 MoAbを分泌するハイブリドーマ細胞(実施例7に記載のように得た)から単離する。プライマーとしてオリゴdTを用いて第一鎖cDNAを総RNAから合成する。免疫グロブリン定常C領域に由来する3'プライマー、および5'プライマーとしてリーダーペプチドまたはマウスV_H遺伝子もしくはV_K遺伝子の最初のフレームワーク領域に由来する縮重プライマーセットを用いてPCRを行う。アンカーPCRは、Chen and Platsucas(Chen, P.F., Scand. J. Immunol. 35:539-549, 1992)に記載のように行う。V_K遺伝子をクローニングするために、Not1-MAK1プライマー

(5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO:38)

を用いて二本鎖cDNAを調製する。アニーリングされたアダプターAD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3'

SEQ ID NO:39)およびAD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO:40)

を二本鎖cDNAの5'末端および3'末端の両方に連結する。3'末端にあるアダプターをNot1消化によって除去する。次いで、消化産物を、5'プライマーとしてAD1オリゴヌクレオチドおよび3'プライマーとしてMAK2

(5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO:41)

を使用するPCRにおける鑄型として使用する。約500bpのDNA断片をpUC19にクローニングする。クローニングされた配列が、予想されたマウス免疫グロブリン定常領域を含むことを確認するために、配列分析用に、いくつかのクローンを選択する。Not1-MAK1およびMAK2オリゴヌクレオチドはV_K領域に由来し、それぞれ、C_K遺伝子の最初の塩基対から182bpおよび84bp下流にある。完全なV_Kおよびリーダーペプチドを含むクローンを選択する。

【0337】

V_H遺伝子をクローニングするために、Not1 MAG1プライマー

(5'-CGCGGCCGCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO:42)

を用いて二本鎖cDNAを調製する。アニーリングされたアダプターAD1およびAD2を、二本鎖cDNAの5'末端および3'末端の両方に連結する。3'末端にあるアダプターをNot1消化によって除去する。消化産物を、プライマーとしてAD1オリゴヌクレオチドおよびMAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO:43)

を使用するPCRにおける鑄型として使用する。長さが500~600bpのDNA断片をpUC19

にクローニングする。NotI-MAG1およびMAG2オリゴヌクレオチドはマウスC γ .7.1領域に由来し、それぞれ、マウスC γ .7.1遺伝子の最初の塩基対から180bp下流および93bp下流にある。完全なV_Hおよびリーダーペプチドを含むクローンを選択する。

【0338】

2.キメラMASP-2 IgGおよびFab用の発現ベクターの構築

Kozakコンセンサス配列をヌクレオチド配列の5'末端に付加し、スプライスドナーを3'末端に添加するためのPCR反応の鋳型として、前記のクローニングされたV_H遺伝子およびV_K遺伝子を使用する。PCRエラーが存在しないことを確認するために配列を分析した後に、V_H遺伝子およびV_K遺伝子を、それぞれ、ヒトC γ 1を含有する発現ベクターカセットおよびヒトC κ を含有する発現ベクターカセットに挿入して、pSV2neoV_H-huC γ 1およびpSV2neoV_K-huC γ を得る。重鎖ベクターおよび軽鎖ベクターのCsCl勾配精製プラスミドDNAを用いて、エレクトロポレーションによってCOS細胞をトランスフェクトする。48時間後に、約200ng/mlのキメラIgGの存在を確認するために、培養上清をELISAによって試験する。細胞を回収し、総RNAを調製する。プライマーとしてオリゴdTを用いて、総RNAから第一鎖cDNAを合成する。Fd DNA断片および κ DNA断片を生成するために、このcDNAをPCRにおける鋳型として使用する。Fd遺伝子の場合、5'プライマーとして5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3'

(SEQ ID NO:44)

およびCH1由来3'プライマー

(5'-CGGGATCCTCAAACCTTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO:45)

を用いてPCRを行う。DNA配列は、ヒトIgG1の完全なV_HドメインおよびヒトCH1ドメインを含有することが確認される。適切な酵素で消化した後に、Fd DNA断片を、発現ベクターカセットpSV2dhfr-TUSのHindIII制限部位およびBamHI制限部位に挿入して、pSV2dhfrFdを得る。pSV2プラスミドは市販されており、様々な供給源に由来するDNAセグメントからなる。pBR322DNA(薄い線)は、pBR322のDNA複製起点(pBRori)およびラクタマーゼアンピシリン耐性遺伝子(Amp)を含有する。幅広のハッチングによって表され、印が付けられているSV40 DNAは、SV40 DNA複製起点(SV40ori)、初期プロモーター(dhfr遺伝子およびneo遺伝子の5'側)、ならびにポリアデニル化シグナル(dhfr遺伝子およびneo遺伝子の3'側)を含有する。SV40由来ポリアデニル化シグナル(pA)もFd遺伝子の3'末端に配置される。

【0339】

κ 遺伝子の場合、5'プライマーとして

5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO:46)

およびC κ 由来3'プライマー

(5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO:47)

を用いてPCRを行う。DNA配列は、完全なV_K領域およびヒトC κ 領域を含有することが確認される。適切な制限酵素を用いた消化後に、 κ DNA断片を発現ベクターカセットpSV2neo-TUSのHindIII制限部位およびBamHI制限部位に挿入して、pSV2neoKを得る。Fd遺伝子および κ 遺伝子の発現は、HCMV由来エンハンサーおよびプロモーターエレメントによって駆動される。Fd遺伝子は、鎖間ジスルフィド結合に関与するシステインアミノ酸残基を含まないので、この組換えキメラFabは、非共有結合により連結された重鎖および軽鎖を含有する。このキメラFabはcFabと呼ばれる。

【0340】

重鎖と軽鎖の間のジスルフィド結合を有する組換えFabを得るために、ヒトIgG1のヒンジ領域に由来する9個のさらなるアミノ酸(EPKSCDKTH SEQ ID NO:48)のコード配列を

含むように、前記のFd遺伝子を延長することができる。Fd遺伝子の3'末端にある30アミノ酸をコードするBstEII-BamHI DNAセグメントを、延長したFdをコードするDNAセグメントと取り替えて、pSV2dhfrFd/9aaを得ることができる。

【0341】

3.キメラ抗MASP-2 IgGの発現および精製

キメラ抗MASP-2 IgGを分泌する細胞株を生成するために、NSO細胞を、エレクトロポレーションによってpSV2neoV_H-huC_γ1およびpSV2neoV-huC_κの精製プラスミドDNAでトランスフェクトする。トランスフェクト細胞を、0.7mg/ml G418の存在下で選択する。細胞を、血清含有培地を用いて250mlスピナーフラスコ中で増殖させる。

【0342】

100mlスピナー培養物の培養上清を、10ml PROSEP-Aカラム(Bioprocessing, Inc., Princeton, NJ.)にロードする。カラムを10ベッド体積のPBSで洗浄する。結合している抗体を50mMクエン酸緩衝液、pH3.0で溶出させる。pHを7.0に調節するために、等量の1M Hepes, pH8.0を、精製抗体を含有する画分に添加する。残留塩を、Millipore膜限外濾過(M.W.カットオフ:3,000)によるPBSを用いた緩衝液交換によって除去する。精製抗体のタンパク質濃度をBCA法(Pierce)によって求める。

【0343】

4.キメラ抗MASP-2 Fabの発現および精製

キメラ抗MASP-2 Fabを分泌する細胞株を生成するために、CHO細胞を、エレクトロポレーションによってpSV2dhfrFd(またはpSV2dhfrFd/9aa)およびpSV2neo_κの精製プラスミドDNAでトランスフェクトする。トランスフェクト細胞をG418およびメトトレキサートの存在下で選択する。選択された細胞株を漸増濃度のメトトレキサートの中で増幅する。細胞を限界希釈によってシングルセルサブクローニングする。次いで、高産生シングルセルサブクローニング細胞株を、無血清培地を用いて100mlスピナーフラスコ中で増殖させる。

【0344】

キメラ抗MASP-2 Fabを、MASP-2 MoAbに対するマウス抗イディオタイプMoAbを用いたアフィニティクロマトグラフィーによって精製する。抗イディオタイプMASP-2 MoAbは、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)と結合したマウス抗MASP-2 MoAbでマウスを免疫し、ヒトMASP-2と競合することができる特異的MoAb結合をスクリーニングすることによって作製することができる。精製のために、cFabまたはcFab/9aaを産生するCHO細胞のスピナー培養物由来の上清100mlを、抗イディオタイプMASP-2 MoAbと結合したアフィニティカラムにロードする。次いで、カラムをPBSで徹底的に洗浄した後、結合しているFabを50mMジエチルアミン、pH11.5で溶出させる。残留塩を前記のように緩衝液交換によって除去する。精製Fabのタンパク質濃度をBCA法(Pierce)によって求める。

【0345】

キメラMASP-2 IgG、cFab、およびcFab/9aaがMASP-2依存性補体経路を阻害する能力は実施例2または実施例7に記載の阻害アッセイを用いることによって求めることができる。

【0346】

実施例7

本実施例は、L-フィコリン/P35、H-フィコリン、M-フィコリン、またはマンナンを介したMASP-2依存性補体活性化を遮断することができるMASP-2阻害物質を特定するための機能スクリーニングとして用いられるインビトロC4切断アッセイについて述べる。

【0347】

C4切断アッセイ: C4切断アッセイは、Petersen, S.V., et al., J. Immunol. Methods 257:107, 2001によって述べられており、L-フィコリンに結合する黄色ブドウ球菌由来リポテイコ酸(LTA)に起因するレクチン経路活性化を測定する。

【0348】

10

20

30

40

50

試薬: ホルマリン固定黄色ブドウ球菌(DSM20233)を以下のように調製する。細菌をトリプティックソイ血液培地中で37℃において一晚増殖させ、PBSで3回洗浄し、次いで、PBS/0.5%ホルマリン中で室温において1時間固定し、PBSでさらに3回洗浄した後に、コーティング緩衝液(15mM Na₂CO₃、35mM NaHCO₃、pH9.6)に再懸濁する。

【0349】

アッセイ: Nunc MaxiSorb(登録商標)マイクロタイタープレート(Nalgene Nunc International, Rochester, NY)のウェルを、コーティング緩衝液に溶解した1μgのL-フィコリンと共に、コーティング緩衝液に溶解した100μlのホルマリン固定黄色ブドウ球菌DSM20233(OD₅₅₀=0.5)でコーティングする。一晚のインキュベーション後、ウェルを、TBS(10mM Tris-HCl、140mM NaCl pH7.4)に溶解した0.1%ヒト血清アルブミン(HSA)でブロックし、次いで、0.05%Tween20および5mM CaCl₂を含有するTBS(洗浄緩衝液)で洗浄する。ヒト血清試料を、内因性C4の活性化を阻止し、C1複合体(C1q、C1r、およびC1sからなる)を解離する、20mM Tris-HCl、1M NaCl、10mM CaCl₂、0.05%Triton X-100、0.1%HSA、pH7.4で希釈する。抗MASP-2 MoAbおよび阻害ペプチドを含むMASP-2阻害物質を様々な濃度で血清試料に添加する。希釈試料をプレートに添加し、4℃で一晩インキュベートする。24時間後、プレートを洗浄緩衝液で徹底的に洗浄する。次いで、100μlの4mMバルビタール、145mM NaCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、pH7.4に溶解した、0.1μgの精製ヒトC4(Dodds, A.W., Methods Enzymol. 223:46, 1993に記載のように得た)を各ウェルに添加する。37℃で1.5時間後に、プレートを再洗浄し、C4b沈着をアルカリホスファターゼ結合ニワトリ抗ヒトC4c(Immunsystem, Uppsala, Swedenから得た)を用いて検出し、比色分析基質p-ニトロフェニルリン酸を用いて測定する。

【0350】

マンナン上でのC4アッセイ: MBLを介したレクチン経路活性化を測定するために、プレートをLSPおよびマンナンでコーティングした後に、様々なMASP-2阻害物質と混合した血清を添加することによって、前記のアッセイを適合理化させる。

【0351】

H-フィコリン(Hakata Ag)上でのC4アッセイ: H-フィコリンを介したレクチン経路活性化を測定するために、プレートをLPSおよびH-フィコリンでコーティングした後に、様々なMASP-2阻害物質と混合した血清を添加することによって、前記のアッセイを適合理化させる。

【0352】

実施例8

以下のアッセイは、野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスにおける古典経路活性化の存在を証明する。

【0353】

方法: マイクロタイタープレート(Maxisorb(登録商標), Nunc, カタログ番号442404, Fisher Scientific)を、10mM Tris、140mM NaCl、pH7.4に溶解した0.1%ヒト血清アルブミンで室温において1時間コーティングした後に、TBS/tween/Ca²⁺で1:1000に希釈したヒツジ抗全血清(whole serum)抗血清(Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Scotland)と4℃で一晩インキュベートすることによって、免疫複合体をインサイチューで生成した。血清試料を野生型およびMASP-2-/-マウスから得て、コーティングされたプレートに添加した。野生型血清試料およびMASP-2-/-血清試料からC1qを枯渇させた対照試料を調製した。C1q枯渇マウス血清は、ウサギ抗ヒトC1q IgG(Dako, Glostrup, Denmark)でコーティングされたプロテインA結合Dynabeads(登録商標)(Dynal Biotech, Oslo, Norway)を用いて供給業者の説明書に従って調製した。プレートを37℃で90分間インキュベートした。結合しているC3bを、TBS/tw/Ca⁺⁺で1:1000に希釈したポリクローナル抗ヒトC3c抗体(DakoA062)を用いて検出した。二次抗体はヤギ抗ウサギIgGである。

【0354】

結果: 図7は、野生型血清、MASP-2-/-血清、C1q枯渇野生型血清、およびC1q枯渇MASP-2-/-血清中のIgGでコーティングされたプレート上の相対的C3b沈着レベルを示す。これらの結果からMASP-2-/-マウス系統において古典経路は損なわれていないことが証明される。

【0355】

実施例9

以下のアッセイを用いて、免疫複合体によって古典経路が開始する条件下でMASP-2阻害物質の効果を分析することによって、MASP-2阻害物質が古典経路を遮断するかどうか試験する。

【0356】

方法: 免疫複合体によって古典経路が開始する補体活性化の状態に対するMASP-2阻害物質の効果を試験するために、90%NHSを含有する3つ組の試料50 μ lを、10 μ g/ml免疫複合体(IC)またはPBSの存在下で37°Cにおいてインキュベートする。37°Cでのインキュベーション中に、200nM抗プロペルジンモノクローナル抗体を含有する3つ組の対応する試料(+/-IC)も含める。37°Cで2時間のインキュベーション後に、さらなる補体活性化を止めるために、13mM EDTAを全ての試料に添加し、すぐに、試料を5°Cまで冷却する。次いで、試料を-70°Cで保管した後に、ELISAキット(Quidelカタログ番号A015およびA009)を用いて製造業者の説明書に従って補体活性化産物(C3aおよびsC5b-9)をアッセイする。

【0357】

実施例10

本実施例はMASP-2活性を遮断する高親和性抗MASP-2 Fab2抗体断片の特定について述べる。

【0358】

背景および原理: MASP-2は、MBLおよびフィコリンの結合部位、セリンプロテアーゼ触媒部位、タンパク質分解基質C2の結合部位、タンパク質分解基質C4の結合部位、MASP-2酵素前駆体自己活性化のためのMASP-2切断部位、ならびに2つのCa⁺⁺結合部位を含む、多くの別個の機能ドメインを有する複合タンパク質である。高親和性でMASP-2に結合するFab2抗体断片を特定し、特定されたFab2断片がMASP-2機能活性を遮断できるかどうか判定するために機能アッセイにおいて試験した。

【0359】

MASP-2機能活性を遮断するためには、抗体またはFab2抗体断片は、MASP-2機能活性に必要とされるMASP-2上の構造エピトープに結合し、これを妨害しなければならない。従って、高親和性結合抗MASP-2 Fab2の多くまたは全ては、それらが、MASP-2機能活性に直接関与するMASP-2上の構造エピトープに結合する場合を除いて、MASP-2機能活性を阻害しないことがある。

【0360】

レクチン経路C3コンバーターゼ形成の阻害を測定する機能アッセイを用いて、抗MASP-2 Fab2の「遮断活性」を評価した。レクチン経路におけるMASP-2の最も重要な生理学的役割は、レクチン媒介補体経路の次の機能成分、すなわち、レクチン経路C3コンバーターゼを生成することであることが公知である。レクチン経路C3コンバーターゼは、C3をC3aおよびC3bにタンパク分解によって切断する重要な酵素複合体(C4bC2a)である。MASP-2はレクチン経路C3コンバーターゼ(C4bC2a)の構成成分ではない。しかしながら、レクチン経路C3コンバーターゼを構成する2つのタンパク質成分(C4b、C2a)を生成するために、MASP-2の機能活性が必要とされる。さらに、MASP-2がレクチン経路C3コンバーターゼを生成するためには、前記で列挙されたMASP-2の別個の機能活性の全てが必要であるように見える。これらの理由で、抗MASP-2 Fab2の「遮断活性」の評価において使用するための好ましいアッセイは、レクチン経路C3コンバーターゼ形成の阻害を測定する機能アッセイだと考えられる。

【0361】

高親和性Fab2の生成: ヒト軽鎖抗体可変配列および重鎖抗体可変配列のファージディスプレイ

10

20

30

40

50

プレイライブラリー、ならびに関心対象の選択されたリガンドと反応するFab2を特定するための自動抗体選択技術を用いて、ラットMASP-2タンパク質(SEQ ID NO:55)に対する高親和性Fab2を作製した。抗体スクリーニングのために、既知量のラットMASP-2(約1mg、>85%純粋)タンパク質を利用した。親和性が最も高い抗体を選択するために3回の増幅を利用した。ELISAスクリーニングのために、抗体断片を発現する約250個の異なるヒットを選んだ。この後に、異なる抗体のユニークさ(uniqueness)を決定するために高親和性ヒットを配列決定した。

【0362】

50個のユニークな抗MASP-2抗体を精製し、以下でさらに詳述するように、それぞれの精製Fab2抗体250 µgをMASP-2結合親和性の特徴決定および補体経路の機能試験に使用した。

【0363】

抗MASP-2 Fab2の阻害(遮断)活性の評価に用いられるアッセイ

1. レクチン経路C3コンバーターゼ形成の阻害を測定するためのアッセイ:

背景: レクチン経路C3コンバーターゼは、C3を2つの強力な炎症誘発断片であるアナフィラトキシンC3aおよびオプソニンC3bにタンパク分解によって切断する酵素複合体(C4bC2a)である。C3コンバーターゼの形成は、炎症を媒介する点でレクチン経路の重要な段階であるように思われる。MASP-2はレクチン経路C3コンバーターゼ(C4bC2a)の構成成分ではない。従って、抗MASP-2抗体(またはFab2)は、既にあるC3コンバーターゼの活性を直接阻害しない。しかしながら、レクチン経路C3コンバーターゼを構成する2つのタンパク質成分(C4b、C2a)を生成するために、MASP-2セリンプロテアーゼ活性が必要とされる。従って、MASP-2機能活性を阻害する抗MASP-2 Fab2(すなわち、遮断抗MASP-2 Fab2)はレクチン経路C3コンバーターゼの新規形成を阻害する。C3は、その構造の一部として、珍しく、かつ高反応性のチオエステル基を含有する。このアッセイではC3がC3コンバーターゼによって切断されると、C3b上のチオエステル基は、エステル結合またはアミド結合を介してプラスチックウェルの底に固定化された巨大分子上のヒドロキシル基またはアミノ基と共有結合を形成することができ、従って、ELISAアッセイにおけるC3bの検出が容易になる。

【0364】

酵母マンナンはレクチン経路の公知の活性化因子である。C3コンバーターゼ形成を測定する以下の方法では、マンナンでコーティングされたプラスチックウェルを希釈ラット血清と37°Cで30分間インキュベートして、レクチン経路を活性化した。次いで、ウェルを洗浄し、標準的なELISA法を用いて、ウェル上に固定化されたC3bについてアッセイした。このアッセイにおいて生成されたC3bの量は、レクチン経路C3コンバーターゼの新規形成を直接反映するものである。このアッセイでは、選択された濃度の抗MASP-2 Fab2がC3コンバーターゼ形成を阻害し、その結果として起きるC3b生成を阻害する能力を試験した。

【0365】

方法:

96ウェルCostar Medium Bindingプレートを、1 µg/50 µL/ウェルで、50mM炭酸緩衝液、pH9.5で希釈したマンナンと5°Cで一晩インキュベートした。一晩のインキュベーション後、200 µL PBSで各ウェルを3回洗浄した。次いで、ウェルを、PBSに溶解した100 µL/ウェルの1%ウシ血清アルブミンでブロックし、穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。次いで、各ウェルを200 µLのPBSで3回洗浄した。抗MASP-2 Fab2試料を、5°Cで、Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を含有するGVB緩衝液(4.0mMバルビタール、141mM NaCl、1.0mM MgCl₂、2.0mM CaCl₂、0.1%ゼラチン、pH7.4)で選択された濃度まで希釈した。0.5%ラット血清を5°Cで前記の試料に添加し、100 µLを各ウェルに移した。プレートに蓋をし、補体活性化を可能にするために37°C水浴中で30分間インキュベートした。37°C水浴から、氷と水の混合物を含む容器にプレートを移すことによって、反応を止めた。各ウェルを、PBS-Tween20(0.05% Tween20を含むPBS)で200 µLで5回洗浄し、次いで、200 µLのPBSで2回洗浄した。2.0mg/mlウシ血清アルブミンを含有す

るPBSに溶解した100 μ L/ウェルの一次抗体(ウサギ抗ヒトC3c、DAKO A0062)1:10,000希釈液を添加し、穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。各ウェルを5 $\times$ 200 μ LのPBSで洗浄した。2.0mg/mlウシ血清アルブミンを含有するPBSに溶解した、100 μ L/ウェルの二次抗体(ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgG, American Qualex A102PU)1:10,000希釈液を添加し、シェーカーに載せて穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。各ウェルをPBSで200 μ Lで5回洗浄した。100 μ L/ウェルのペルオキシダーゼ基質TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)を添加し、室温で10分間インキュベートした。100 μ L/ウェルの1.0M H_3PO_4 を添加することによってペルオキシダーゼ反応を止め、OD₄₅₀を測定した。

【0366】

2. MASP-2依存性C4切断の阻害を測定するためのアッセイ:

背景: MASP-2のセリンプロテアーゼ活性は高度に特異的であり、MASP-2のタンパク質基質はC2およびC4の2種類しか特定されていない。C4の切断によってC4aおよびC4bが生成される。抗MASP-2 Fab2は、C4切断に直接関与するMASP-2上の構造エпитープ(例えば、C4のMASP-2結合部位;MASP-2セリンプロテアーゼ触媒部位)に結合し、それによって、MASP-2のC4切断機能活性を阻害する可能性がある。

【0367】

酵母マンナンはレクチン経路の公知の活性化因子である。MASP-2のC4切断活性を測定する以下の方法では、マンナンでコーティングされたプラスチックウェルを希釈ラット血清と37°Cで30分間インキュベートして、レクチン経路を活性化した。このELISA法において用いられる一次抗体はヒトC4しか認識しないので、希釈ラット血清にヒトC4(1.0 μ g/ml)も添加した。次いで、ウェルを洗浄し、標準的なELISA方法を用いて、ウェルに固定化されたヒトC4bについてアッセイした。このアッセイにおいて生成されたC4bの量はMASP-2依存性C4切断活性の尺度である。このアッセイでは、選択された濃度の抗MASP-2 Fab2がC4切断を阻害する能力を試験した。

【0368】

方法: 96ウェルCostar Medium Bindingプレートを、1.0 μ g/50 μ L/ウェルで、50mM炭酸緩衝液、pH9.5で希釈したマンナンと5°Cで一晩インキュベートした。200 μ L PBSで各ウェルを3回洗浄した。次いで、ウェルを、PBSに溶解した100 μ L/ウェルの1%ウシ血清アルブミンでブロックし、穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。各ウェルを200 μ LのPBSで3回洗浄した。抗MASP-2 Fab2試料を、5°Cで、Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を含有するGVB緩衝液(4.0mMバルビタール、141mM NaCl、1.0mM MgCl₂、2.0mM CaCl₂、0.1%ゼラチン、pH7.4)で選択された濃度まで希釈した。これらの試料に1.0 μ g/ml/ヒトC4(Quidel)も含めた。前記の試料に0.5%ラット血清を5°Cで添加し、100 μ Lを各ウェルに移した。プレートに蓋をし、補体を活性化するために37°C水浴中で30分間インキュベートした。37°C水浴から、氷と水の混合物を含む容器にプレートを移すことによって、反応を止めた。各ウェルを、PBS-Tween20(0.05%Tween20を含むPBS)で200 μ Lで5回洗浄した。次いで、各ウェルを200 μ LのPBSで2回洗浄した。2.0mg/mlウシ血清アルブミン(BSA)を含有するPBSに溶解した、100 μ L/ウェルのビオチン結合ニワトリ抗ヒトC4c(Immunsystem AB, Uppsala, Sweden)1:700希釈液を添加し、穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。各ウェルを200 μ LのPBSで5回洗浄した。2.0mg/ml BSAを含有するPBSに溶解した、100 μ L/ウェルの0.1 μ g/mlのペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジン(Pierce Chemical#21126)を添加し、シェーカーに載せて穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。各ウェルを200 μ LのPBSで5回洗浄した。100 μ L/ウェルのペルオキシダーゼ基質TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)を添加し、室温で16分間インキュベートした。100 μ L/ウェルの1.0M H_3PO_4 を添加することによってペルオキシダーゼ反応を止め、OD₄₅₀を測定した。

【0369】

3. 抗ラットMASP-2 Fab2と「天然」ラットMASP-2との結合アッセイ

背景: MASP-2は、通常、特異的レクチン分子(マンノース結合タンパク質(MBL)および

10

20

30

40

50

フィコリン)も含むMASP-2二量体複合体として血漿中に存在する。従って、抗MASP-2 Fab2と生理学的に関連する形態のMASP-2との結合の研究に興味があるのであれば、精製組換えMASP-2ではなく、Fab2と血漿中の「天然」MASP-2との相互作用が用いられる結合アッセイを開発することが重要である。この結合アッセイでは、最初に、10%ラット血清に由来する「天然」MASP-2-MBL複合体をマンナンコーティングウェルに固定化した。次いで、標準的なELISA法を用いて、固定化「天然」MASP-2に対する様々な抗MASP-2 Fab2の結合親和性を研究した。

【0370】

方法: 96ウェルCostar High Bindingプレートを、1 μ g/50 μ L/ウェルで、50mM炭酸緩衝液、pH9.5で希釈したマンナンと5°Cで一晩インキュベートした。200 μ LのPBSで各ウェルを3回洗浄した。ウェルを100 μ L/ウェルの、PBST(0.05%Tween20を含むPBS)に溶解した0.5%無脂肪ドライミルクでブロックし、穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。各ウェルを200 μ LのTBS/Tween/ Ca^{++} 洗浄緩衝液(5.0mM CaCl_2 を含有するTris緩衝生理食塩水、0.05%Tween20、pH7.4)で3回洗浄した。High Salt Binding Buffer(20mM Tris、1.0M NaCl、10mM CaCl_2 、0.05%Triton-X100、0.1%(w/v)ウシ血清アルブミン、pH7.4)に溶解した10%ラット血清を氷上で調製した。100 μ L/ウェルを添加し、5°Cで一晩インキュベートした。ウェルを200 μ LのTBS/Tween/ Ca^{++} 洗浄緩衝液で3回洗浄した。次いで、ウェルを200 μ LのPBSで2回洗浄した。 Ca^{++} および Mg^{++} を含有するGVB緩衝液(4.0mMバルビタール、141mM NaCl、1.0mM MgCl_2 、2.0mM CaCl_2 、0.1%ゼラチン、pH7.4)で希釈した100 μ L/ウェルの選択された濃度の抗MASP-2 Fab2を添加し、穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。各ウェルを200 μ LのPBSで5回洗浄した。2.0mg/mlウシ血清アルブミンを含むPBSで1:5000に希釈した100 μ L/ウェルのHRP結合ヤギ抗Fab2(Biogenesisカタログ番号0500-0099)を添加し、穏やかに混合しながら室温で1時間インキュベートした。各ウェルを200 μ LのPBSで5回洗浄した。100 μ L/ウェルのペルオキシダーゼ基質TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)を添加し、室温で70分間インキュベートした。100 μ L/ウェルの1.0M H_3PO_4 を添加することによってペルオキシダーゼ反応を止め、OD₄₅₀を測定した。

【0371】

結果:

ELISAスクリーニングのために、高親和性でラットMASP-2タンパク質と反応した約250個の異なるFab2を選んだ。異なる抗体のユニークさを決定するために、これらの高親和性Fab2を配列決定した。さらなる分析のために、50個のユニークな抗MASP-2抗体を精製した。それぞれの精製Fab2抗体250 μ gを、MASP-2結合親和性の特徴決定および補体経路の機能試験に使用した。この分析の結果を以下の表6に示した。

【0372】

(表6) レクチン経路補体活性化を遮断する抗MASP-2 Fab2

10

20

30

40

50

Fab2 抗体 #	C3 コンバーターゼ (IC ₅₀ (nM))	K _d	C4 切断 IC ₅₀ (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

【0373】

表6に示したように、試験した50個の抗MASP-2 Fab2のうち17個のFab2が、10nM Fab2に等しい、または10nM Fab2未満のIC₅₀でC3コンバーターゼ形成を強力に阻害するMASP-2遮断Fab2であると特定された(34%の陽性ヒット率)。17個のFab2のうち8個のIC₅₀はnM以下の範囲である。さらに、表6に示したMASP-2遮断Fab2のうち17個全てが、レクチン経路C3コンバーターゼアッセイにおいてC3コンバーターゼ形成の本質的に完全な阻害を示した。図8Aは、試験された他のFab2抗体を代表するFab2抗体#11についてのC3コンバーターゼ形成アッセイの結果を図示する。この結果を表6に示した。それぞれのMASP-2分子がFab2に結合している場合でも、「遮断」Fab2がMASP-2機能をほんのわずかにしか阻害しない場合があるのは理論上可能なので、これは重要な考慮事項である。

【0374】

マンナンはレクチン経路の公知の活性化因子であるが、ラット血清中に抗マンナン抗体が存在することでも古典経路が活性化し、古典経路C3コンバーターゼを介してC3bが生成され得ることも理論上可能である。しかしながら、本実施例において列挙された17個の遮断抗MASP-2 Fab2はそれぞれC3b生成を強力に阻害する(>95%)。従って、このことから、レクチン経路C3コンバーターゼに対する、このアッセイの特異性が証明される。

【0375】

それぞれの遮断Fab2の見かけのK_dを算出するために、17個全ての遮断Fab2を用いて結合アッセイも行った。遮断Fab2のうちの6個についての、天然ラットMASP-2に対する抗ラットMASP-2 Fab2の結合アッセイの結果も表6に示した。図8Bは、Fab2抗体#11を用いた結合アッセイの結果を図示する。他のFab2についても同様の結合アッセイを行った。この結果を表6に示した。一般的に、6個のFab2のそれぞれと「天然」MASP-2の結合について得られた見かけのK_dは、C3コンバーターゼ機能アッセイにおけるFab2のIC₅₀と妥当によく一致する。MASP-2はそのプロテアーゼ活性が活性化されると「不活性」型から「

活性」型へとコンフォメーション変化を受けるという証拠がある(Feinberg et al., EMBO J 22:2348-59(2003); Gal et al., J. Biol.Chem. 250:33435-44(2005))。C3コンバーターゼ形成アッセイにおいて用いられる正常ラット血漿中には、MASP-2は主に「不活性な」酵素前駆体コンフォメーションの状態が存在する。対照的に、結合アッセイでは、MASP-2は、固定化マンナンと結合したMBLとの複合体の一部として存在する。従って、MASP-2は「活性」コンフォメーション状態にあると考えられる(Petersen et al., J. Immunol Methods 257:107-16, 2001)。その結果、これらの2つの機能アッセイにおいて試験された17個の遮断Fab2のそれぞれについて IC_{50} と K_d の間に厳密な対応関係が予想されるとは限らないと考えられる。なぜなら、それぞれのアッセイにおいて、Fab2は異なるコンフォメーション型のMASP-2を結合するからである。にもかかわらず、Fab2#88を除いて、2つのアッセイにおいて試験された他の16個のFab2のそれぞれについて IC_{50} と見かけの K_d の間に妥当に密接な対応関係があるように思われる(表6を参照されたい)。

【0376】

MASP-2によって媒介されるC4切断の阻害について遮断Fab2のいくつかを評価した。図8Cは、Fab2#41による阻害、 $IC_{50}=0.81nM$ を示すC4切断アッセイの結果を図示する(表6を参照されたい)。図9に示したように、試験されたFab2の全てが、C3コンバーターゼアッセイにおいて得られた IC_{50} とほぼ同じ IC_{50} でC4切断を阻害することが見出された(表6を参照されたい)。

【0377】

マンナンはレクチン経路の公知の活性化因子であるが、ラット血清中に抗マンナン抗体が存在することでも古典経路が活性化し、それによって、C1sを介したC4切断によってC4bが生成され得ることも理論上可能である。しかしながら、C4b生成を強力に阻害する(>95%)、いくつかの抗MASP-2 Fab2が特定されている。従って、このことから、MASP-2によって媒介されるC4切断に対する、このアッセイの特異性が証明される。C4はC3と同様に、その構造の一部として、珍しく、かつ高反応性のチオエステル基を含有する。このアッセイにおいてC4がMASP-2によって切断されると、C4b上のチオエステル基は、エステル結合またはアミド結合を介してプラスチックウェルの底に固定化された巨大分子上のヒドロキシル基またはアミノ基と共有結合を形成することができ、従って、ELISA法におけるC4bの検出が容易になる。

【0378】

これらの研究から、C4およびC3コンバーターゼ活性を両方とも機能的に遮断する、ラットMASP-2タンパク質に対する高親和性Fab2が作製され、それによって、レクチン経路活性化が阻止されることがはっきりと証明される。

【0379】

実施例11

本実施例は、実施例10に記載のように生成された遮断抗ラットMASP-2 Fab2抗体のいくつかのエピトープマッピングについて述べる。

【0380】

方法:

図10に示したように、全てN末端6×Hisタグを有する以下のタンパク質を、pED4ベクターを用いてCHO細胞において発現させた:

ラットMASP-2A、活性中心にあるセリンをアラニンに変えることによって不活性化された完全長MASP-2タンパク質(S613A);

ラットMASP-2K、自己活性化を低下させるように変えられた完全長MASP-2タンパク質(R424K);

CUBI-II、CUBIドメイン、EGF様ドメイン、およびCUBIIDメインしか含まないラットMASP-2 N末端断片;ならびに

CUBI/EGF様、CUBIドメインおよびEGF様ドメインしか含まないラットMASP-2 N末端断片。

【0381】

10

20

30

40

50

以前に述べられたように(Chen et al., J. Biol. Chem. 276:25894-02(2001))、これらのタンパク質をニッケル-アフィニティークロマトグラフィーによって培養上清から精製した。

【0382】

ラットMASP-2のCCPIIおよびセリンプロテアーゼドメインを含有するC末端ポリペプチド(CCPII-SP)を、pTrxFus(Invitrogen)を用いてチオレドキシン融合タンパク質として大腸菌において発現させた。タンパク質を、Thiobondアフィニティ樹脂を用いて細胞溶解産物から精製した。チオレドキシン融合パートナーを陰性対照として空のpTrxFusから発現させた。

【0383】

全ての組換えタンパク質をTBS緩衝液で透析し、280nmのODを測定することによって濃度を求めた。

【0384】

ドットブロット分析:

前述したおよび図10に示した5個の組換えMASP-2ポリペプチドの段階希釈液(ならびにCCPII-セリンプロテアーゼポリペプチドの陰性対照としてチオレドキシンポリペプチド)をニトロセルロース膜上にスポットした。スポットされたタンパク質の量は5倍段階で100ng~6.4pgであった。後の実験において、スポットされたタンパク質の量は、再度、5倍段階で50ng~16pgであった。膜を、TBS(ブロッキング緩衝液)に溶解した5%スキムミルク粉末でブロックし、次いで、ブロッキング緩衝液(5.0mM Ca^{2+} を含有する)に溶解した1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗MASP-2 Fab2とインキュベートした。結合しているFab2を、HRP結合抗ヒトFab(AbD/Serotec; 1/10,000に希釈した)およびECL検出キット(Amersham)を用いて検出した。1枚の膜を、陽性対照としてポリクローナルウサギ抗ヒトMASP-2 Ab(Stover et al., J Immunol 163:6848-59(1999)に記載)とインキュベートした。この場合、結合しているAbを、HRP結合ヤギ抗ウサギIgG(Dako; 1/2,000に希釈した)を用いて検出した。

【0385】

MASP-2結合アッセイ

ELISAプレートを、炭酸緩衝液(pH9.0)に溶解した1.0 $\mu\text{g}/\text{well}$ の組換えMASP-2AまたはCUBI-IIポリペプチドで4℃において一晚コーティングした。ウェルを、TBSに溶解した1%BSAでブロックし、次いで、5.0mM Ca^{2+} を含有するTBSに溶解した抗MASP-2 Fab2の段階希釈液を添加した。プレートをRTで1時間インキュベートした。TBS/tween/ Ca^{2+} で3回洗浄した後、TBS/ Ca^{2+} で1/10,000に希釈したHRP結合抗ヒトFab(AbD/Serotec)を添加し、プレートをRTでさらに1時間インキュベートした。結合している抗体を、TMBペルオキシダーゼ基質キット(Biorad)を用いて検出した。

【0386】

結果:

Fab2と様々なMASP-2ポリペプチドとの反応性を証明したドットブロット分析の結果を以下の表7に示した。表7に示した数値は、ほぼ最大半量のシグナル強度を得るのに必要とされる、スポットされたタンパク質の量を示す。示したように、(チオレドキシン融合パートナー単独を除く)全てのポリペプチドが、陽性対照Ab(ポリクローナル抗ヒトMASP-2血清、ウサギにおいて産生された)によって認識された。

【0387】

(表7) ドットブロットにおける様々な組換えラットMASP-2ポリペプチドとの反応性

10

20

30

40

50

Fab2 抗体 #	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF 様	CCPII-SP	チオレドキシン
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
陽性対照	<0.032 ng	0.16 ng	0.16 ng	<0.032 ng	NR

NR=反応なし。陽性対照抗体は、ウサギにおいて産生されたポリクローナル抗ヒトMASP-2血清である。

【0388】

全てのFab2がMASP-2AならびにMASP-2Kと反応した(データ示さず)。Fab2の大半はCCPII-SPポリペプチドを認識したが、N末端断片を認識しなかった。2つの例外はFab2#60およびFab2#57である。Fab2#60はMASP-2AおよびCUBI-II断片を認識するが、CUBI/EGF様ポリペプチドもCCPII-SPポリペプチドも認識しない。このことから、Fab2#60は、CUBI中のエピトープまたはCUBIとEGF様ドメインにまたがるエピトープに結合することが示唆される。Fab2#57は、MASP-2Aを認識するが、試験されたいかなるMASP-2断片も認識することはない、このFab2がCCP1中のエピトープを認識することを示す。Fab2#40および#49は完全なMASP-2Aにしか結合しなかった。図11に示したELISA結合アッセイにおいて、Fab2#60は、わずかに低い見かけの親和性ではあるがCUBI-IIポリペ

【0389】

これらの知見から、MASP-2タンパク質の複数の領域に対するユニークな遮断Fab2が特定されたことが証明される。

【0390】

実施例12

本実施例は、免疫系の古典的(C1q依存的)経路成分を完全な状態のままにしておきながら、MASP-2に結合し、かつレクチンを介した補体活性化を阻害する完全ヒトscFv抗体をファージディスプレイを用いて特定することについて述べる。

【0391】

概略:

ファージディスプレイライブラリーをスクリーニングすることによって完全ヒト高親和性MASP-2抗体を特定した。抗体の可変軽鎖断片および可変重鎖断片をscFv形式および完全長IgG形式で単離した。ヒトMASP-2抗体は、免疫系の古典的(C1q依存的)経路成分を完全な状態のままにしておきながら、レクチン経路を介した補体経路活性化に関連する細胞損傷を阻害するのに有用である。一部の態様において、このMASP-2阻害抗体は、以下の特徴を有する:(a)ヒトMASP-2に対する親和性が高い(例えば、10nMまたはそれ未満の K_D)、および(b)30nMまたはそれ未満の IC_{50} で90%ヒト血清中でMASP-2依存性補体活性を阻害すること。

【0392】

方法:

完全長触媒不活性MASP-2の発現:

ヒトMASP-2ポリペプチドをコードするヒトMASP-2完全長cDNA配列(SEQ ID NO:4)とリーダー配列(SEQ ID NO:5)を哺乳動物発現ベクターpCI-Neo(Promega)にサブクローニングした。哺乳動物発現ベクターpCI-Neo(Promega)は、CMVエンハンサー/プロモーター領域の制御下で真核生物において発現を駆動する(Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537-66 (1991)に記載)。

【0393】

触媒不活性ヒトMASP-2Aタンパク質を作製するために、本明細書に参照により組み入れられるUS2007/0172483に記載のように部位特異的変異誘発を行った。アガロースゲル電気泳動後にPCR産物を精製し、バンド調製物および1アデノシンオーバーラップを標準的なテーリング法を用いて作製した。次いで、アデノシンテールMASP-2AをpGEM-T easyベクターにクローニングし、形質転換によって大腸菌(E.coli)に導入した。ヒトMASP-2Aを哺乳動物発現ベクターpEDまたはpCI-Neoのいずれかにさらにサブクローニングした。

【0394】

標準的なリン酸カルシウムトランスフェクション法(Maniatis et al., 1989)を用いて、前記のMASP-2A発現構築物をDXB1細胞に導入した。確実に調製物が他の血清タンパク質で汚染されないように、MASP-2Aを無血清培地中で産生させた。培地をコンフルエント細胞から一日おきに収集した(合計4回)。組換えMASP-2Aレベルの平均は培養培地1リットルあたり約1.5mgであった。MBP-A-アガロースカラムを用いたアフィニティクロマトグラフィーによってMASP-2A(前記のSer-Ala変異体)を精製した。

【0395】

パニング/scFv変換およびフィルタースクリーニングによって特定したScFv候補クローンに対するMASP-2A ELISA

ヒト免疫グロブリン軽鎖可変領域配列および重鎖可変領域配列のファージディスプレイライブラリーを抗原パニングに供し、その後、ヒトMASP-2タンパク質に対する高親和性scFv抗体を特定するために自動抗体スクリーニングおよび選択を行った。HIS-タグ化MASP-2Aまたはビオチン-タグ化MASP-2Aに対するscFvファージライブラリーパニングを3回行った。3回目のパニングを最初にMBLで溶出させ、次いでTEA(アルカリ性)で溶出させた。標的MASP-2Aに対するscFv断片を示すファージの特異的濃縮をモニタリングするために、固定化MASP-2Aに対するポリクローナルファージELISAを行った。3回目のパニングからのscFv遺伝子をpHOG発現ベクターにクローニングし、MASP-2Aに対する特異的クローンを探すためにスモールスケールフィルタースクリーニングに供した。

【0396】

3回目のパニングからのscFv断片をコードするプラスミドを含有する細菌コロニーをつつき、ニトロセルロース膜上で格子状にし(grid)、非誘導培地上で一晩増殖させてマスタープレートを作製した。3回目のパニングから合計18,000個のコロニーをつつき、分析した。半分は競合的溶出由来であり、半分は、その後のTEA溶出由来であった。MASP-2Aに

10

20

30

40

50

対するscFvファージミドライブラリーのパニングとそれに続くscFv変換およびフィルタースクリーニングによって137個の陽性クローンが得られた。137個のうち108個のクローンは、MASP-2結合についてのELISAアッセイにおいて陽性であった(データは示さず)。このうち45個のクローンを、正常ヒト血清中でMASP-2活性を妨げる能力についてさらに分析した。

【0397】

レクチン経路C3コンバーターゼ形成の阻害を測定するためのアッセイ

レクチン経路C3コンバーターゼ形成の阻害を測定する機能アッセイを用いて、MASP-2 scFv候補クローンの「ブロッキング活性」を評価した。レクチン経路C3コンバーターゼを構成する2つのタンパク質成分(C4b、C2a)を生成するためにはMASP-2セリンプロテアーゼ活性が必要とされる。従って、MASP-2機能活性を阻害するMASP-2 scFv(すなわち、ブロッキングMASP-2 scFv)はレクチン経路C3コンバーターゼの新規形成を阻害する。C3は、その構造の一部として珍しい高反応性のチオエステル基を含有する。このアッセイにおいてC3コンバーターゼによりC3が切断されると、C3b上にあるチオエステル基は、エステル結合またはアミド結合を介して、プラスチックウェルの底に固定化された高分子上にあるヒドロキシル基またはアミノ基と共有結合を形成することができ、従って、ELISAアッセイにおけるC3b検出が容易になる。

【0398】

酵母マンナンは公知のレクチン経路アクチベーターである。C3コンバーターゼの形成を測定する以下の方法では、マンナンでコーティングしたプラスチックウェルを希釈ヒト血清とインキュベートして、レクチン経路を活性化した。次いで、ウェルを洗浄し、標準的なELISA法を用いてウェル上に固定化したC3bについてアッセイした。このアッセイにおいて生成したC3bの量は、レクチン経路C3コンバーターゼの新規形成を直接反映したものである。このアッセイでは、選択された濃度のMASP-2 scFvクローンが、C3コンバーターゼ形成およびその結果として起きるC3b生成を阻害する能力を試験した。

【0399】

方法:

前記のように特定した45個の候補クローンを発現させ、精製し、同じストック濃度まで希釈し、確実に全クローンに等量の緩衝液があるように、Ca⁺⁺およびMg⁺⁺を含有するGV B緩衝液(4.0mM バルビタール、141mM NaCl、1.0mM MgCl₂、2.0mM CaCl₂、0.1%ゼラチン、pH7.4)で再希釈した。scFvクローンをそれぞれ、2 μg/mLの濃度で3つ組で試験した。陽性対照はOMS100 Fab2であり、0.4 μg/mLで試験した。scFv/IgGクローンの存在下および非存在下でC3c形成をモニタリングした。

【0400】

マンナンを、50mM炭酸緩衝液(15mM Na₂CO₃+35mM NaHCO₃+1.5mM NaN₃)、pH9.5で20 μg/mL(1 μg/ウェル)の濃度まで希釈し、ELISAプレートに4°Cで一晩コーティングした。翌日、マンナンコーティングプレートをPBS 200 μlで3回洗浄した。次いで、1%HSAブロッキング溶液100 μlをウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートはPBS 200 μlで3回洗浄され、かつ、試料の添加までPBS 200 μlを加えて氷上で保管された。

【0401】

正常ヒト血清をCaMgGV B緩衝液で0.5%まで希釈し、この緩衝液に、scFvクローンまたはOMS100 Fab2陽性対照を0.01 μg/mL;1 μg/mL(OMS100対照のみ)および10 μg/mLにおいて3つ組で添加し、氷上で45分間ブレインキュベートした後に、ブロックされたELISAプレートに添加した。37°Cで1時間インキュベートすることによって反応を開始した。プレートを氷浴に移すことによって反応を止めた。ウサギα-マウスC3c抗体の後にヤギα-ウサギHRPを用いてC3b沈着が検出された。陰性対照は、抗体を含まない緩衝液(抗体なし=最大C3b沈着)であった。陽性対照は、EDTAを含む緩衝液(C3b沈着なし)であった。バックグラウンドは、ウェルがマンナンを含まないこと以外は同じアッセイを行うことによって決定された。マンナンを含有するウェルのシグナルから、マンナンを含まないプ

レートに対するバックグラウンドシグナルを差し引いた。カットオフ基準は、関連のない scFv クローン (VZV) および緩衝液のみの活性の半分に設定した。

【0402】

結果:

カットオフ基準に基づいて、合計13個のクローンが MASP-2 活性を妨げることが見出された。>50%の経路抑制を生じた13個全てのクローンを選択および配列決定して、10個のユニークなクローンを得た。10個全てのクローンが同じ軽鎖サブクラス、 $\lambda 3$ を有することが見出されたが、3つの異なる重鎖サブクラス: VH2、VH3、およびVH6を有することが見出された。機能アッセイにおいて、10個の候補 scFv クローンから5個が、0.5% ヒト血清を用いて、25 nM 目標基準よりも少ない IC_{50} nM 値を示した。

【0403】

効力が向上した抗体を特定するために、前記のように特定した3個の母 scFv クローンを軽鎖シャッフリングに供した。このプロセスには、6人の健常ドナーに由来するナীবヒト λ 軽鎖 (VL) ライブラリーと対になった、母クローンそれぞれの VH からなるコンビナトリアルライブラリーの作製を伴った。次いで、結合親和性および/または機能が改善された scFv クローンがあるかどうか、このライブラリーをスクリーニングした。

【0404】

(表8) 主要な娘クローンおよびそれらのそれぞれの母クローン(全て scFv 形式)の IC_{50} (nM) で表した機能的効力の比較

scFv クローン	1% ヒト血清 C3 アッセイ (IC_{50} nM)	90% ヒト血清 C3 アッセイ (IC_{50} nM)	90% ヒト血清 C4 アッセイ (IC_{50} nM)
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

【0405】

上記の表8に示した母クローンおよび娘クローンの重鎖可変領域 (VH) 配列を以下に示した。

【0406】

Kabat CDR(31-35(H1)、50-65(H2)、および95-107(H3))を太字で示した。Chothia CDR(26-32(H1)、52-56(H2)、および95-101(H3))に下線を引いた。

【0407】

17D20_35VH-21N11VL 重鎖可変領域 (VH) (SEQ ID NO:66によってコードされる、SEQ ID NO:67)

QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSL**SRGKMGV**SWIRQPPGKALEW
LAHIFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVD**TATYYCAR**IRRG
GIDYWGQGTLLTVSS

【0408】

d17N9 重鎖可変領域 (VH) (SEQ ID NO:68)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSTSAAWNWRQSPSRGLEWLGRTY
YRSKWYNNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARDPFGVPF
DIWGQGTMTVSS

【0409】

上記の表8に示した母クローンおよび娘クローンの軽鎖可変領域(VL)配列を以下に示した。

【0410】

Kabat CDR(24~34(L1);50~56(L2);および89~97(L3))を太字で示した。Chothia CDR(24~34(L1);50~56(L2);および89~97(L3))に下線を引いた。KabatシステムでナンバリングしてもChothiaシステムでナンバリングしても、これらの領域は同一である。

【0411】

17D20m_d3521N11軽鎖可変領域(VL)(SEQ ID NO:70によってコードされる、SEQ ID NO:69)

QPVLTPPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQ
DKQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKL
TVL

【0412】

17N16m_d17N9軽鎖可変領域(VL)(SEQ ID NO:71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCAGDNLGKKRVHWYQQRPGQAPVLVIYD
DSDRPSGIPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQVWDIATDHVVFGGGT
KLTVLAAAGSEQKLISE

【0413】

MASP-2抗体であるOMS100およびMoAb_d3521N11VL(SEQ ID NO:67に示した重鎖可変領域とSEQ ID NO:69に示した軽鎖可変領域を含む。「OMS646」および「mAb6」とも呼ぶ)はいずれも高い親和性でヒトMASP-2に結合し、機能的補体活性を妨げる能力を有することが証明されており、これらをドットプロット分析によってエпитープ結合について分析した。これらの結果により、OMS646抗体およびOMS100抗体はMASP-2に対して高度に特異的であり、MASP-1/3に結合しないことが示される。どちらの抗体も、MAp19にも、MASP-2のCCP1ドメインを含有しないMASP-2断片にも結合しなかった。このことから結合部位はCCP1を含むと結論付けられた。

【0414】

MASP-2抗体OMS646は、C1s、C1r、またはMASP-1と比較して5000倍超の選択性で組換えMASP-2に強く結合することが決定された(Kd60~250pM)(以下の表9を参照されたい)。

【0415】

(表9) 固相ELISA研究によって評価した場合のOMS646 MASP-2抗体-MASP-2相互作用の親和性および特異性

10

20

30

40

50

抗原	K _D (pM)
MASP-1	>500,000
MASP-2	62±23*
MASP-3	>500,000
精製ヒト C1r	>500,000
精製ヒト C1s	約500,000

* 平均±SD; n=12。

【0416】

OMS646はレクチン依存的な終末補体成分活性化を特異的に遮断する

方法:

膜侵襲複合体(MAC)沈着に及ぼすOMS646の影響を、レクチン経路、古典経路、および代替経路の経路特異的条件を用いて分析した。この目的のために、Wieslab Comp300補体スクリーニングキット(Wieslab, Lund, Sweden)を製造業者の説明書に従って使用した。

【0417】

結果:

図12Aは、レクチン経路特異的アッセイ条件下、抗MASP-2抗体(OMS646)の存在下または非存在下でのMAC沈着レベルを図示する。図12Bは、古典経路特異的アッセイ条件下、抗MASP-2抗体(OMS646)の存在下または非存在下でのMAC沈着レベルを図示する。図12Cは、代替経路特異的アッセイ条件下、抗MASP-2抗体(OMS646)の存在下または非存在下でのMAC沈着レベルを図示する。

【0418】

図12Aに示したように、OMS646は、レクチン経路を介したMAC沈着活性化を約1nMのIC₅₀値で遮断する。しかしながら、OMS646は、古典経路を介した活性化から生じたMAC沈着(図12B)にも代替経路を介した活性化から生じたMAC沈着(図12C)にも影響を及ぼさなかった。

【0419】

マウスに静脈内(IV)投与または皮下(SC)投与した後のOMS646の薬物動態学および薬物動力学

マウスにおける28日間の単回投与PK/PD研究においてOMS646の薬物動態学(PK)および薬物動力学(PD)を評価した。この研究では、5mg/kgおよび15mg/kgの用量レベルの皮下(SC)投与OMS646ならびに5mg/kgの用量レベルの静脈内(IV)投与OMS646を試験した。

【0420】

OMS646のPKプロファイルに関して、図13は、示された用量のOMS646を投与した後の時間の関数としてのOMS646濃度(n=3動物/群の平均)を図示する。図13に示したように、5mg/kg SCのOMS646は、投与してから約1~2日後に5~6 µg/mLの最大血漿中濃度に達した。5mg/kg SCのOMS646のバイオアベイラビリティは約60%であった。図13にさらに示したように、15mg/kg SCのOMS646は、投与してから約1~2日後に10~12 µg/mLの最大血漿中濃度に達した。全群について、OMS646は体循環からゆっくりと除去され、終末相半減期(terminal half-life)は約8~10日であった。OMS646のプロファイルはマウスにおけるヒト抗体に典型的である。

【0421】

OMS646のPD活性を図14Aおよび図14Bに図示した。図14Aおよび14Bは、5mg/kg IV(図14A)群および5mg/kg SC(図14B)群における、それぞれのマウスのPD応答(全身レクチン経路活性の低下)を示す。破線はアッセイのベースラインを示す(最大阻害;アッセイ

10

20

30

40

50

前に、インビトロで過剰なOMS646が添加されたナイーブマウス血清)。図14Aに示したように、5mg/kgのOMS646をIV投与した後に全身レクチン経路活性はすぐに、ほぼ検出不可能なレベルまで低下した。レクチン経路活性は28日間の観察期間にわたってわずかな回復しか示さなかった。図14Bに示したように、5mg/kgのOMS646 SCが投与されたマウスでは、時間依存的なレクチン経路活性阻害が観察された。薬物を投与してから24時間以内にレクチン経路活性はほぼ検出不可能なレベルまで低下し、少なくとも7日間、低いレベルのままであった。レクチン経路活性は時間と共に徐々に増加したが、28日間の観察期間内に投与前のレベルに戻らなかった。15mg/kg SCを投与した後に観察されたレクチン経路活性対時間プロファイルは5mg/kg SC用量とほぼ同じであった(データは示さず)。これはPDエンドポイントの飽和を示している。さらに、データから、IVまたはSCのいずれかで投与された5mg/kgのOMS646の毎週用量が、マウスにおける全身レクチン経路活性の連続的な抑制を達成するのに十分であることが示された。

【0422】

実施例13

本実施例は、MASP-2に特異的に結合する1つまたは複数のCDRを含む重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域と少なくとも1つのSGMIコアペプチド配列を含む、MASP-2を阻害する組換え抗体(SGMI-ペプチドを有するMASP-2抗体またはその抗原結合断片とも呼ばれる)の作製について説明する。

【0423】

背景/基本原理:

SGMI-2と呼ばれるMASP-2特異的阻害因子の作製は、Heja et al., J Biol Chem 287:20290 (2012)およびHeja et al., PNAS 109:10498 (2012)に記載されている。これらはそれぞれ参照により本明細書に組み入れられる。SGMI-2は、プロテアーゼ結合ループの8つの位置のうち6つが完全にランダム化されたサバクトビバッタ(*Schistocerca gregaria*)プロテアーゼ阻害因子2変種のファージライブラリーから選択された36アミノ酸ペプチドである。それに続くインビトロ進化によって、 K_i 値が一桁のnMである単一特異的阻害因子が得られた(Heja et al., J. Biol. Chem. 287:20290, 2012)。構造研究から、最適化されたプロテアーゼ結合ループは、2つの阻害因子の特異性を規定する一次結合部位を形成することが明らかになった。拡大された二次結合領域および内部結合領域のアミノ酸配列は2つの阻害因子に共通して見られ、接触境界面に寄与する(Heja et al., 2012. J. Biol. Chem. 287:20290)。機構的に、SGMI-2は古典経路に影響を及ぼすことなく補体活性化のレクチン経路を遮断する(Heja et al., 2012. Proc. Natl. Acad. Sci. 109:10498)。

【0424】

SGMI-2阻害因子のアミノ酸配列を以下に示した。

SGMI-2-完全長:

LEVTCPEPTTFKDKCNTCRGSDGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO:72)

SGMI-2-メディアム:

TCEPTTFKDKCNTCRGSDGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO:73)

SGMI-2-ショート:

.....TCRGS DGKSAVCTKLWCNQ (SEQ ID NO:74)

【0425】

本実施例に記載のように、またWO2014/144542に記載のように、SGMI-2ペプチドアミノ酸配列(例えば、SEQ ID NO:72、73、または74)をヒトMASP-2抗体の重鎖および/または軽鎖のアミノ末端またはカルボキシ末端と融合することによって、SGMI-2ペプチドを有するMASP-2抗体およびその断片を作製した。SGMI-2ペプチドを有するMASP-2抗体および断片には、WO2014/144542に記載のようにヒト血清を用いるC3bまたはC4b

沈着アッセイで測定した場合に、SGMI-2ペプチド配列を含有しない裸のMASP-2スキヤフォールド抗体と比較して強い阻害活性があり、マウスモデルにおいてインビボで測定した場合にも裸のMASP-2スキヤフォールド抗体と比較して強い阻害活性がある。SGMI-2ペプチドを有するMASP-2抗体を作製する方法を以下で説明する。

【0426】

方法:

4種類の例示的なSGMI-2ペプチドを有するMASP-2抗体をコードするように発現構築物を作製した。ここでは、SGMI-2ペプチドを、代表的なMASP-2阻害抗体OMS646の重鎖または軽鎖のN末端またはC末端と融合した(実施例12に記載のように作製した)。

【0427】

(表10) MASP-2抗体/SGMI-2融合物

抗体参照	抗体上でのペプチドの位置				SEQ ID NO:
	H-N	H-C	L-N	L-C	
HL-M2 (裸のMASP-2 OMS646)	-	-	-	-	67 + 70
H-M2-SGMI-2-N	SGMI-2	-	-	-	75 + 70
H-M2-SGMI-2-C	-	SGMI-2	-	-	76 + 70
L-M2-SGMI-2-N	-	-	SGMI-2	-	67 + 77
L-M2-SGMI-2-C	-	-	-	SGMI-2	67 + 78

表10の略語:

「H-N」=重鎖のアミノ末端

「H-C」=重鎖のカルボキシル末端

「L-N」=軽鎖のアミノ末端

「L-C」=軽鎖のカルボキシル末端

「M2」=MASP-2 abスキヤフォールド(代表的なOMS646)

【0428】

表10に示したN末端融合については、ペプチドリinker(「GTGGGSGSSS」SEQ ID NO:79)をSGMI-2ペプチドと可変領域との間に加えた。

【0429】

表10に示したC末端融合については、ペプチドリinker(「AAGGSG」SEQ ID NO:80)を定常領域とSGMI-2ペプチドとの間に加え、C末端のSGMI-2ペプチドを分解から守るために第2のペプチド「GSGA」(SEQ ID NO:81)を融合ポリペプチドのC末端に加えた。

【0430】

以下の代表的なMASP-2抗体/SGMI-2融合物のアミノ酸配列を下記に示した。

【0431】

H-M2ab6-SGMI-2-N(SEQ ID NO:75。SEQ ID NO:82によってコードされる):

10

20

30

40

50

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQVTLKESG
PVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRT
SLKSRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVD TATYYCARIRRGGIDYWGQGT LVTVS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSV VTPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCP
APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSL SLG
K

10

[491aaタンパク質、aa1~36=SGMI-2(下線)、aa37~46=リンカー(イタリック体);aa47~164=MASP-2 ab#6の重鎖可変領域(下線);aa165~491=ヒンジ変異を有するIgG4定常領域]

【0432】

H-M2ab6-SGMI-2-C(SEQ ID NO:76。SEQ ID NO:83によってコードされる):
QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFS
SDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVL TMTNMDPVD TATYYCARIRRGGIDYWG
QGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLG TKTYTCNVDHKPSNTK VDKRVESK
YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK
SLSLSLGKAAGGSGLEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

20

30

[491aaタンパク質、aa1~118=MASP-2 ab#6の重鎖可変領域(下線);aa119~445=ヒンジ変異を有するIgG4定常領域;aa446~451=1番目のリンカー(イタリック体);aa452~487=SGMI-2;aa488~491=2番目のリンカー(イタリック体)]

【0433】

L-M2ab6-SGMI-2-N(SEQ ID NO:77。SEQ ID NO:84によってコードされる):
LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQPVL TQPPS
LSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVL VMYQDKQRPSGIPERFSG
SNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL
FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKY
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

40

[258aaタンパク質、aa1~36=SGMI-2(下線);aa37~46=リンカー(イタリック体);aa47~152=MASP-2 ab#6の軽鎖可変領域(下線);aa153~258=ヒトIgλ定常領域]

【0434】

50

L-M2ab6-SGMI-2-C(SEQ ID NO:78。SEQ ID NO:85によってコードされる):
QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQRP
SGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQ
 PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTT
 PSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSAAGGSG
LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

[258aaタンパク質、aa1~106=MASP-2 ab#6の軽鎖可変領域(下線);aa107~212=ヒトIgλ定常領域;aa213~218=1番目のリンカー;aa219~254=SGMI-2;aa255~258=2番目のリンカー]

【0435】

機能アッセイ:

4種類のMASP-2-SGMI-2融合抗体構築物をExpi293F細胞(Invitrogen)において一過的に発現させ、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、下記で説明するように、C3b沈着を阻害するかどうかマンナンコーティングビーズアッセイにおいて10%正常ヒト血清中で試験した。

【0436】

C3b沈着があるかどうかMASP-2-SGMI-2融合物をマンナンコーティングビーズアッセイにおいて試験する

MASP-2-SGMI-2融合抗体がレクチン経路を阻害するかどうか、マンナンコーティングビーズ上でのC3b沈着アッセイにおいて評価した。このアッセイは、フローサイトメトリーによって活性の程度を求め、Wieslab(登録商標)アッセイよりも高い分解能を提供する。レクチン経路ビーズアッセイを以下の通りに行った。マンナンを炭酸-重炭酸緩衝液(pH 9.6)中で7μM直径のポリスチレンビーズ(Bangs Laboratories; Fishers, IN, USA)に4℃で一晩吸着させた。ビーズをPBSで洗浄し、10%ヒト血清、または抗体もしくは阻害因子とプレインキュベートした10%血清に曝露した。血清-ビーズ混合物を攪拌しながら室温で1時間インキュベートした。血清インキュベーション後に、ビーズを洗浄し、抗C3cウサギポリクローナル抗体(Dako North America; Carpinteria, CA, USA)およびPE-Cy5結合ヤギ抗ウサギ二次抗体(Southern Biotech; Birmingham, AL, USA)を用いた検出によってビーズ上でのC3b沈着を測定した。染色手順後に、FACSCaliburフローサイトメーターを用いてビーズを分析した。前方散乱光および側方散乱光を用いてビーズを均一な集団としてゲーティングした。C3b沈着はFL3陽性粒子として明らかであった(FL-3または「FL-3チャンネル」はサイトメーターにある3番目のチャンネルまたは赤色チャンネルを示す)。レクチン経路阻害を評価するために、各実験条件について集団の幾何平均蛍光強度(MFI)を抗体/阻害因子濃度に対してプロットした。

【0437】

IC₅₀値を、GraphPad PRISMソフトウェアを用いて計算した。具体的には、可変勾配(4パラメータ)非線形フィットを、サイトメトリーアッセイから得たlog(抗体)対平均蛍光強度曲線に適用することによってIC₅₀値を得た。

【0438】

結果を表11に示した。

【0439】

(表11) 10%ヒト血清中でのC3b沈着(マンナンコーティングビーズアッセイ)

10

20

30

40

50

構築物	IC ₅₀ (nM)
裸の N2 ab (mAb#6)	≥ 3.63 nM
H-M2-SGMI-2-N	2.11 nM
L-M2-SGMI-2-C	1.99 nM
H-M2-SGMI-2-N	2.24 nM
L-M2-SGMI-2-N	3.71 nM

【0440】

結果:

対照である、SGMIを含有しない「裸の」MASP-2スキファールド抗体(mAb#6)は、このアッセイでは阻害性であり、IC₅₀値は≥3.63nMであった。これは、実施例12において観察された阻害結果と合致する。注目すべきことに、表11に示したように、試験したSGMI-2-MASP-2抗体融合物は全て、このアッセイではMASP-2スキファールド抗体の効力を改善した。このことから、結合価の増加もC3b沈着阻害に有益であり得ることが示唆される。

【0441】

10%ヒト血清を用いたC4b沈着アッセイのためにマンナンコーティングビーズアッセイにおいてMASP-2-SGMI-2融合物を試験する

10%ヒト血清と、C3b沈着アッセイについて前述したものと同一アッセイ条件を使用し、以下の変更を加えてC4b沈着アッセイを行った。C4b検出およびフローサイトメトリー分析は、沈着反応を抗C4bマウスモノクローナル抗体(1:500, Quidel)で染色し、PE Cy5結合二次ヤギ抗マウスF(ab')₂(1:200, Southern Biotech)で染色した後に、フローサイトメトリーで分析することによって行った。

【0442】

結果:

SGMI-2を有するMASP-2-N末端抗体融合物(H-M2-SGMI-2-N:IC₅₀=0.34nM)、L-M2-SGMI-2-N:IC₅₀=0.41nM))は両方ともMASP-2スキファールド抗体(HL-M2:IC₅₀=0.78nM)と比較して効力が高かった。

【0443】

同様に、1つのSGMI-2を有するC末端MASP-2抗体融合物(H-M2-SGMI-2-C:IC₅₀=0.45nMおよびL-M2-SGMI-2-C:IC₅₀=0.47nM)は両方ともMASP-2スキファールド抗体(HL-M2:IC₅₀=1.2nM)と比較して効力が高かった。

【0444】

10%マウス血清を用いてC3bが沈着するかどうかマンナンコーティングビーズアッセイにおいてMASP-2-SGMI-2融合物を試験する

C3bが沈着するかどうか、10%マウス血清を用いてマンナンコーティングビーズアッセイを前記のように行った。ヒト血清において観察された結果と同様に、マウス血清中で、SGMI-2を有するMASP-2融合物はMASP-2スキファールド抗体と比較して効力が高いことが確かめられた。

【0445】

結果の概要: 本実施例の結果から、試験したSGMI-2-MASP-2抗体融合物は全てMASP-2スキファールド抗体の効力を改善したことが証明される。

【0446】

実施例14

本実施例は、腎臓線維症におけるレクチン経路の役割を評価するために、MASP-2-/-欠

損マウスおよびMASP-2+/+十分マウスにおける腎臓線維症の片側尿管結紮(UUO)モデルを用いて得られた結果を示す。

【0447】

背景/基本原理:

腎臓の線維症および炎症は後期腎臓疾患の顕著な特徴である。腎臓尿細管間質性線維症は、持続的な細胞傷害、異常な治癒、常在性腎臓細胞および浸潤腎臓細胞の活性化、サイトカイン放出、炎症、ならびに細胞外マトリックスを産生する腎臓細胞の表現型活性化を伴う進行性のプロセスである。腎臓尿細管間質性(TI)線維症は複数の腎臓病態の共通エンドポイントであり、慢性腎臓疾患(CKD)における進行性の腎機能障害を予防することを目的とする、可能性のある療法の重要な標的である。腎臓TI傷害は腎糸球体疾患における腎機能低下と密接な関係があり(Risdon R.A. et al., Lancet 1: 363-366, 1968; Schainuck L.I. et al, Hum Pathol 1: 631-640, 1970; Nath K.A., Am J Kid Dis 20:1-17, 1992)、CKDを特徴とする。この場合、筋線維芽細胞が蓄積し、尿細管と、管周囲の毛細血管との間にある潜在的な空間は、コラーゲンと他のプロテオグリカンで構成されるマトリックスによって占有されるようになる。TI筋線維芽細胞の起源は激しい議論の余地が残されているが、一般的に、線維症の前には、最初のうちはTリンパ球のTI蓄積を特徴とし、次いで後になってマクロファージのTI蓄積を特徴とする炎症が生じる(Liu Y. et al., Nat Rev Nephrol 7:684-696, 2011; Duffield J.S., J Clin Invest 124:2299-2306, 2014)。

【0448】

UUOのげっ歯類モデルは、ほぼ全ての原因の進行性腎疾患の顕著な特徴である進行性腎臓線維症を生じる(Chevalier et al., Kidney International 75:1145-1152, 2009)。UUO後の野生型マウスではC3遺伝子発現が増加し、UUO後のC3-/-ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較してコラーゲン沈着が有意に低下したと報告されている。このことから、腎臓線維症における補体活性化の役割が示唆される(Fearn et al., Mol Immunol 48:1666-1733, 2011)。C5欠損が尿細管間質傷害モデルにおける腎臓線維症の主な成分の有意な寛解につながったことも報告されている(Boor P. et al., J of Am Soc of Nephrol 18:1508-1515, 2007)。しかしながら、本発明者らが行った本明細書に記載の研究の前には、腎臓線維症に関与する特定の補体成分は詳細に明らかにされていなかった。従って、片側尿管結紮(UUO)モデルにおいてMASP-2(-/-)雄マウスおよびMASP-2(+/-)雄マウスを評価するために以下の研究を行った。

【0449】

方法:

実施例1に記載のようにMASP-2-/-マウスを作製し、C57BL/6と10世代にわたって戻し交配した。雄の野生型(WT)C57BL/6マウス、およびC57BL/6背景のホモ接合性MASP-2欠損(MASP-2-/-)マウスを12/12昼/夜サイクルの標準化された条件下で飼育し、標準的なフードペレットを与え、食物および水を自由にとれるようにした。1群につき6匹の10週齢マウスに、1.5L/min酸素で、2.5%イソフルランで麻酔をかけた。10週齢の雄C57BL/6マウスの2つの野生型群およびMASP-2-/-群の右尿管を外科手術により結紮した。1cm側腹部切開により右腎臓を露出させた。6/0ポリグラクチン縫合糸を用いて右尿管を2箇所ですべて完全に結紮した。手術前後に、疼痛スコアリングに応じて12時間ごとに5回までブプレノルフィン無痛法を行った。外科手術中に局所ブピバカイン麻酔薬を1回与えた。

【0450】

外科手術の7日後にマウスを殺し、腎臓組織を収集し、固定し、パラフィンブロックに包埋した。麻酔下で心臓穿刺によってマウスから血液を収集し、腎摘出後にマウスを失血させて選別した。血液を氷上で2時間凝固させ、血清を遠心分離によって分離し、アリコートとして-80°Cで凍結した。

【0451】

腎臓組織の免疫組織化学

コラーゲン沈着によって示されるような腎臓線維症の程度を測定するために、Whittak

10

20

30

40

50

er P. et al., Basic Res Cardiol 89:397-410, 1994に記載のように、5ミクロンのパラフィン包埋腎臓切片を、コラーゲン特異的染料であるピクロシリウスレッドで染色した。簡単に述べると、腎臓切片を脱パラフィンし、再水和し、ピクリン酸の飽和水溶液500 mLに溶解したピクロシリウスレッド水溶液(0.5 gmシリウスレッド, Sigma, Dorset UK)で1時間、コラーゲン染色した。スライドを酸性化水(蒸留水に溶解した0.5%氷酢酸)で2回、それぞれ5分間洗浄し、次いで、脱水およびマウントした。

【0452】

マクロファージ浸潤によって示されるような炎症の程度を測定するために、腎臓切片を以下の通りにマクロファージ特異的抗体F4/80で染色した。ホルマリン固定し、パラフィン包埋した5ミクロン腎臓切片を脱パラフィンおよび再水和した。抗原賦活化をクエン酸緩衝液中で95℃で20分間行い、その後に、3% H_2O_2 中で10分間インキュベートすることによって内因性ペルオキシダーゼ活性を止めた。組織切片を、ブロッキング緩衝液(10%熱失活正常ヤギ血清と1%ウシ血清アルブミンを溶解したリン酸緩衝生理食塩水(PBS))の中で室温で1時間インキュベートし、その後に、アビジン/ビオチンブロッキングを行った。各工程の後に、組織切片をPBSで3回、5分間にわたって洗浄した。ブロッキング緩衝液で1:100に希釈したF4/80マクロファージ一次抗体(Santa Cruz, Dallas, TX, USA)を1時間適用した。次いで、1:200に希釈したビオチン化ヤギ抗ラット二次抗体を30分間適用し、その後に、セイヨウワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合酵素を30分間適用した。ジアミノベンジジン(DAB)基質(Vector Labs, Peterborough UK)を用いて染料を10分間発色させ、スライドを水で洗浄し、脱水し、コンピュータによる分析を容易にするために対比染色することなくマウントした。

【0453】

画像解析

腎皮質染色のパーセントを、Furness P. N. et al., J Clin Pathol 50:118-122, 1997に記載のように確かめた。簡単に述べると、24ビットカラー画像を、腎臓切片の周辺部全体を取り囲んでいる腎被膜の真下にある腎皮質の重複しない連続視野から取り込んだ。画像を取り込むごとに、NIH Imageを用いて8ビットモノクロ画像として赤色チャンネルを抽出した。切片が所定の位置に置かれていない、光を当てた顕微鏡視野の予め記録した画像を用いて、背景照明のばらつきを取り去った。染色陽性に対応する画像の領域を特定するために、画像を、ある決まった閾値にかけた。次いで、黒い画素のパーセントを計算した。このように、腎臓の周囲にある画像を全て測定した後に平均パーセントを記録して、腎臓切片にある染色領域のパーセントに対応する値を得た。

【0454】

遺伝子発現分析

マウス腎臓における腎臓炎症および線維症に関連する、いくつかの遺伝子の発現を以下の通りに定量PCT(qPCR)によって測定した。Trizol(登録商標)(ThermoFisher Scientific, Paisley, UK)を使用し、製造業者の説明書に従って全RNAを腎皮質から単離した。DNA汚染を無くすために、Turbo DNA-free kit(ThermoFisher Scientific)を用いて抽出RNAを処理し、次いで、AMV Reverse Transcription System(Promega, Madison, WI, USA)を用いて第1鎖cDNAを合成した。TaqMan GAPDH Assay(Applied Biosystems, Paisley UK)を用いた1回のqPCR反応と、それに続くCustom TaqMan Array 96-well Plates(Life Technologies, Paisley, UK)を用いたqPCR反応によってcDNA完全性を確認した。

【0455】

本分析では12の遺伝子を研究した:

コラーゲンIV型 $\alpha 1$ (col4 $\alpha 1$; アッセイID: Mm01210125_m1)

トランスフォーミング成長因子 $\beta -1$ (TGF $\beta -1$; アッセイID: Mm01178820_m1);

カドヘリン1(Cdh1; アッセイID: Mm01247357_m1);

フィブロネクチン1(Fn1; アッセイID: Mm01256744_m1);

インターロイキン6(IL6; アッセイID: Mm00446191_m1);

インターロイキン10(IL10; アッセイID Mm00439614_m1);
インターロイキン12a(IL12a; アッセイID Mm00434165_m1);
ビメンチン(Vim; アッセイID Mm01333430_m1);
アクチニン α 1(Actn1; アッセイID Mm01304398_m1);
腫瘍壊死因子- α (TNF- α ; アッセイID Mm00443260_g1)
補体成分3(C3; アッセイID Mm00437838_m1);
インターフェロン γ (Ifn- γ ; アッセイID Mm01168134)

【0456】

以下のハウスキーピング対照遺伝子を使用した:

グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH; アッセイID Mm99999915_g1);

グルクロニダーゼ β (Gus β ; アッセイID Mm00446953_m1);

真核生物18S rRNA(18S; アッセイID Hs99999901_s1);

ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT; アッセイID Mm00446968_m1)

【0457】

20 μ Lの反応物を、TaqMan Fast Universal Master Mix(Applied Biosystems)を用いて40サイクルにわたって増幅した。リアルタイムPCR増幅データを、Applied Biosystems 7000 SDS v1.4ソフトウェアを用いて分析した。

【0458】

結果:

片側尿管結紮(UUO)後に、結紮された腎臓には炎症細胞、特にマクロファージが流入し、その後すぐに、尿細管が膨張し、近位尿細管上皮が薄くなることと並行してコラーゲンが蓄積することにより証明されるように線維症が発症した(Chevalier R. L. et al., Kidney Int 75:1145-1152, 2009を参照されたい)。

【0459】

図15は、シリウスレッドで染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。ここで、組織切片は、尿管結紮(UUO)を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスまたは偽手術した対照マウスから入手した。図15に示したように、尿管結紮を7日間行った後の野生型マウスの腎臓切片はMASP-2-/-マウスと比較して有意に多いコラーゲン沈着を示した(p値=0.0096)。野生型群のUUO手術マウスの平均値 $\pm$ 平均の標準誤差は24.79 $\pm$ 1.908(n=6)であり、MASP-2-/-群のUUO手術マウスの平均値 $\pm$ 平均の標準誤差は16.58 $\pm$ 1.3(n=6)であった。さらに図15に示したように、偽手術した対照野生型マウスおよび偽手術した対照MASP-2-/-マウスからの組織切片は、予想した通り、非常に低いレベルのコラーゲン染色を示した。

【0460】

図16は、F4/80マクロファージ特異的抗体で染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。ここで、組織切片は、尿管結紮を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスまたは偽手術した対照マウスから入手した。図16に示したように、野生型マウスと比較して、MASP-2-/-マウスに由来するUUO腎臓から入手した組織は、尿管結紮を7日間行った後に、有意に少ないマクロファージ浸潤を示した(WTにおいて染色された%マクロファージ領域:2.23 $\pm$ 0.4対MASP-2-/-において染色された%マクロファージ領域:0.53 $\pm$ 0.06、p=0.0035)。さらに図16に示したように、偽手術した野生型マウスおよび偽手術したMASP-2-/-マウスに由来する組織切片は、検出可能なマクロファージ染色を示さなかった。

【0461】

尿管結紮を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスから入手した腎臓組織切片において、腎臓の炎症および線維症と結び付けられた様々な遺伝子の遺伝子発現分析を行った。図17～図20に示したデータは、偽手術した野生型試料に対する相対的定量のLog10であり、バーは平均の

10

20

30

40

50

標準誤差を表す。線維症関連遺伝子の遺伝子発現分析の結果について、図17は、尿管結紮を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した対照マウスから入手した腎臓組織切片においてqPCRによって測定した時のコラーゲンIV型 $\alpha 1$ (コラーゲン-4)の相対mRNA発現レベルを図示する。図18は、尿管結紮を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した対照マウスから入手した腎臓組織切片においてqPCRによって測定した時のトランスフォーミング成長因子 β -1(TGF β -1)の相対mRNA発現レベルを図示する。図17および図18に示したように、野生型マウスに由来する、結紮された腎臓は、野生型マウスの偽手術した腎臓と比較して線維症関連遺伝子コラーゲンIV型(図17)およびTGF β -1(図18)の有意な発現増加を示した。このことから、これらの線維症関連遺伝子は、予想した通り野生型マウスではUUO損傷後に誘発されることが証明される。対照的に、さらに図17および図18に示したように、UUO損傷に供されたMASP-2-/-に由来する、結紮された腎臓は、UUO損傷に供された野生型マウスと比較して、コラーゲンIV型の有意な発現低下(図17、 $p=0.0388$)およびTGF β -1の有意な発現低下(図18、 $p=0.0174$)を示した。

【0462】

炎症関連遺伝子の遺伝子発現分析の結果について、図19は、尿管結紮を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した対照マウスから入手した腎臓組織切片においてqPCRによって測定した時のインターロイキン-6(IL-6)の相対mRNA発現レベルを図示する。図20は、尿管結紮を7日間行った後の野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスならびに偽手術した対照マウスから入手した腎臓組織切片においてqPCRによって測定した時のインターフェロン- γ の相対mRNA発現レベルを図示する。図19および図20に示したように、野生型マウスに由来する、結紮された腎臓は、野生型マウスにおける偽手術した腎臓と比較して炎症関連遺伝子インターロイキン-6(図19)およびインターフェロン- γ (図20)の有意な発現増加を示した。このことから、これらの炎症関連遺伝子は、野生型マウスではUUO損傷後に誘発されることが証明される。対照的に、さらに図19および図20に示したように、UUO損傷に供されたMASP-2-/-に由来する、結紮された腎臓は、UUO損傷に供された野生型マウスと比較してインターロイキン-6の有意な発現低下(図19、 $p=0.0109$)およびインターフェロン- γ の有意な発現低下(図20、 $p=0.0182$)を示した。

【0463】

Vim、Actn-1、TNF α 、C3、およびIL-10の遺伝子発現は全て、野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスから入手したUUO腎臓において有意にアップレギュレートされることが見出され、これらの特定の遺伝子の発現レベルには野生型マウスとMASP-2-/-マウスとの間で有意差が無かったことに注目する(データ示さず)。Cdh-1およびIL-12aの遺伝子発現レベルは、どの群の動物に由来する、結紮された腎臓でも変化しなかった(データ示さず)。

【0464】

考察:

げっ歯類におけるUUOモデルは、結紮後、1~2週間以内に、結紮された腎臓において、腎臓血流の低下、間質炎症、および急速な線維症を伴う早期の、活発な、かつ重度の損傷を誘発すると認識され、腎臓における炎症および線維症の共通の機構およびメディエーターを理解するために広範に用いられてきた(例えば、Chevalier R.L., *Kidney Int* 75:1145-1152, 2009; Yang H. et al., *Drug Discov Today Dis Models* 7:13-19, 2010を参照されたい)。

【0465】

本実施例に記載の結果から、野生型(+/+)対照マウスと比べてMASP-2(-/-)マウスにおけるUUO手術した腎臓ではコラーゲン沈着およびマクロファージ浸潤が有意に低下することが証明される。MASP-2-/-動物では組織学的発現レベルおよび遺伝子発現レベル両方で腎臓損傷の有意な低下が示されたという予想外の結果から、結紮された腎臓における炎症および線維症の発症には補体活性化のレクチン経路が大いに寄与することが証明される。特定の理論に拘束されるものではないが、レクチン経路は、細胞損傷が炎症の原動力となり、炎症の結果として、さらなる細胞損傷、瘢痕、および組織喪失が起こる悪循環を永続さ

せる炎症促進刺激を誘発および維持することで線維性疾患の病態生理に決定的に寄与すると考えられている。これらの結果を考えると、阻害因子を用いたMASP-2の阻害または遮断には、腎臓線維症の阻害または予防において予防効果および/または治療効果があり、それに加えて、線維症全般を(すなわち、組織または臓器とは無関係に)阻害または予防するための予防効果および/または治療効果があると予想される。

【0466】

実施例15

本実施例は、腎臓線維症のマウスモデルである片側尿管結紮(UUO)モデルにおける効力についてのモノクローナルMASP-2阻害抗体の分析について説明する。

【0467】

背景/基本原理:

複数の腎臓病態の共通エンドポイントである腎臓尿細管間質性線維症の寛解は、進行性腎疾患を予防することを目的とする治療方針の重要な目標である。腎疾患における炎症性線維促進経路を標的とする新たな治療法および既存の治療法がほとんど無いことを考慮すると、新たな療法を開発する差し迫った必要性がある。多くのタンパク尿性腎疾患患者が、尿細管間質性炎症と、腎機能の低下と密接に対応する進行性線維症を示す。タンパク尿そのものが、尿細管間質性炎症と、タンパク尿性腎症の発症を誘発する(Brunskill N.J. et al., J Am Soc Nephrol 15:504-505, 2004)。原発性腎疾患に関係なく、尿細管間質の炎症および線維症は進行性の腎機能低下がある患者において必ず認められ、排泄機能の低下と密接な相関関係がある(Risdon R.A. et al., Lancet 1:363-366, 1968; Schainuck L.I., et al., Hum Pathol 1: 631-640, 1970)。線維症につながる重要な共通する細胞経路を妨げる可能性のある療法には、腎臓障害において広い適用可能性があると期待される。

【0468】

実施例14に記載のように、非タンパク尿性腎臓線維症のUUOモデルでは、MASP-2-/-マウスは、炎症細胞浸潤(75%低下)および線維症の組織学的マーカー、例えば、コラーゲン(1/3低下)によって示されるように野生型対照動物と比較して有意に少ない腎臓の線維症および炎症を示すことが確かめられ、それによって、腎臓線維症におけるレクチン経路の重要な役割が実証された。

【0469】

実施例13に記載のように、ヒトレクチン経路の機能を特異的に遮断する、モノクローナルMASP-2抗体(SGMI-2ペプチドがOMS646の重鎖のC末端と融合しているOMS646-SGMI-2融合物)を作製した。これはマウスでもレクチン経路を遮断することが示されている。本実施例では、特異的なMASP-2阻害因子が腎臓線維症を阻害できるかどうか確かめるために、OMS646-SGMI-2を野生型マウスにおける腎臓線維症のUUOマウスモデルにおいて分析した。

【0470】

方法:

本研究では、雄WT C57BL/6マウスにおけるMASP-2阻害抗体(10mg/kg OMS646-SGMI-2)の効果をヒトIgG4アイソタイプ対照抗体(10mg/kg ET904)およびビヒクル対照と比較して評価した。UUO外科手術の7日前、4日前、および1日前に、そして再度、外科手術の2日後に抗体(10mg/kg)を9匹のマウスの群に腹腔内(ip)注射によって投与した。レクチン経路の機能活性を評価するために、抗体投与前と、実験が終わった時に血液試料を採取した。

【0471】

実施例14に記載の方法を用いて、UUO外科手術、組織収集、ならびにシリウスレッドおよびマクロファージ特異的抗体F4/80を用いた染色を行った。

【0472】

特定の比色アッセイ試験キット(Sigma)を使用し、製造業者の説明書に従って、マウス腎臓のヒドロキシプロリン含有量を測定した。

10

20

30

40

50

【0473】

マウスにおけるMASP-2阻害mAbの薬力学的作用を評価するために、MASP-2 mAbまたは対照mAbをマウスに腹腔内投与した後、示された時間に収集した最小限に希釈した血清試料の中でレクチン誘発性C3活性化を定量することによって全身レクチン経路活性を評価した。簡単に述べると、重炭酸ナトリウム緩衝液(pH9.6)に溶解した30 µg/mLマンナン(Sigma)と一晚インキュベートすることによって、7 µM直径ポリスチレンマイクロスフェア(Bangs Laboratories, Fisher IN, USA)をマンナンでコーティングし、次いで、洗浄し、PBSに溶解した1%胎仔ウシ血清でブロックし、 1×10^8 ビーズ/mLの最終濃度でPBSに再懸濁した。2.5 µLのマンナンコーティングビーズ(約250,000個のビーズ)を50 µLの最小限に希釈したマウス血清試料(90%最終血清濃度)に添加し、その後に、4°Cで40分間インキュベートすることによって補体沈着反応を開始した。250 µLの氷冷フローサイトメトリー緩衝液(FB: 0.1%胎仔ウシ血清を含有するPBS)を添加することによって沈着反応を終わらせた後に、ビーズを遠心分離によって収集し、300 µLの氷冷FBを用いて、もう2回洗浄した。

10

【0474】

レクチン誘発性C3活性化を定量するために、ビーズを、FBで希釈したウサギ抗ヒトC3c抗体(Dako, Carpinteria, CA, USA)50 µLと4°Cで1時間インキュベートした。結合しなかった材料を除去するためにFBで2回洗浄した後に、ビーズを、FBで希釈したPE-Cy5結合ヤギ抗ウサギ抗体(Southern Biotech, Birmingham, AL, USA)50 µLと4°Cで30分間インキュベートした。結合しなかった材料を除去するためにFBで2回洗浄した後に、ビーズをFBに再懸濁し、FACS Caliburサイトメーターによって分析した。前方散乱光および側方散乱光を用いてビーズを均一な集団としてゲーティングし、各試料におけるC3b沈着を平均蛍光強度(MFI)として定量した。

20

【0475】

結果:

コラーゲン沈着の評価:

図21は、シリウスレッドで染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。ここで、組織切片は、MASP-2阻害抗体で処置した野生型マウスおよびアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウスから、尿管結紮を7日間行った後に入手した。図21に示したように、MASP-2阻害抗体で処置した野生型マウスから入手した、結紮(UUO)して7日後に採取した腎臓からの組織切片は、IgG4アイソタイプ対照で処置した野生型マウスから入手した結紮された腎臓からの組織切片におけるコラーゲン沈着量と比較してコラーゲン沈着の有意な低下を示した($p=0.0477$)。

30

【0476】

ヒドロキシプロリン含有量の評価:

コラーゲン含有量の指標として腎臓組織においてヒドロキシプロリンを測定した。ヒドロキシプロリンは、このモデルにおいて誘発される疾患の病態生理学的進行を高度に示すパラメータである。

【0477】

図22は、MASP-2阻害抗体またはアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウスから入手した、結紮(UUO)して7日後に採取した腎臓からのヒドロキシプロリン含有量を図示する。図22に示したように、MASP-2阻害抗体で処置したマウスに由来する、結紮された腎臓組織は、IgG4アイソタイプ対照mAbで処置したマウスに由来する腎臓よりも有意に少ない、コラーゲン含有量の指標であるヒドロキシプロリンを示した($p=0.0439$)。

40

【0478】

炎症の評価:

アイソタイプ対照抗体で処置した野生型動物およびMASP-2阻害抗体で処置した野生型動物からの結紮された腎臓は活発なマクロファージ浸潤物を示した。注意深く定量しても、これらの2つの群間でマクロファージ染色領域のパーセントには有意差が無いことが明らかになった(データ示さず)。しかしながら、同じ数の浸潤マクロファージがあったのに

50

もかわらず、MASP-2阻害抗体を注射した動物に由来する、結紮された腎臓は、シリウスレッド染色によって判断されるように、アイソタイプ対照を注射した動物に由来する、結紮された腎臓と比較して有意に少ない線維症を示した。この結果は、MASP-2阻害抗体で処置したマウスに由来する、結紮された腎臓組織のヒドロキシシルプロリンが、IgG4アイソタイプ対照mAbで処置した腎臓よりも有意に少なかったという結果と合致する。

【0479】

考察

本実施例に記載の結果から、MASP-2阻害抗体を使用すると、UUOモデルにおいて腎臓線維症からの保護が得られることが証明される。これは、MASP-2^{-/-}マウスは野生型マウスと比較してUUOモデルの腎臓の線維症および炎症が有意に少ないことを証明した実施例14に記載の結果と合致する。本実施例の結果から、MASP-2阻害抗体で処置したマウスでは線維症が低減したことが分かる。MASP-2依存性レクチン経路活性が低下したか、または遮断された動物ではUUO腎臓の線維症が低減したという発見は極めて重要な新規の発見である。まとめると、実施例14および本実施例に示した結果から、腎臓尿細管間質性炎症、尿細管細胞損傷、線維形成促進性サイトカイン放出、および瘢痕に対するMASP-2阻害の有益な効果が証明される。腎臓線維症の緩和は依然として腎臓治療の重要な目標である。UUOモデルは進行性腎臓線維症の重大なモデルであり、MASP-2阻害抗体を使用するなど、このモデルにおいて線維症を低減させる介入は、腎臓線維症を阻害または予防するのに用いられる可能性が高い。UUOモデルからの結果は、腎糸球体損傷および/またはタンパク尿性尿細管損傷を特徴とする腎疾患に移すことができる可能性が高い。

【0480】

実施例16

本実施例は、タンパク尿性腎症におけるレクチン経路の役割を評価するために、MASP-2^{-/-}マウスおよび野生型マウスにおいて、腎臓線維症、炎症、および尿細管間質損傷のタンパク質過負荷タンパク尿モデルを用いて得られた結果を示す。

【0481】

背景/基本原理:

タンパク尿は、原発性腎疾患に関係なく、腎臓線維症の発症と腎臓排泄性機能の喪失の危険因子である(Tryggvason K. et al., J Intern Med 254:216-224, 2003; Williams M., Am J. Nephrol 25:77-94, 2005)。タンパク尿性腎症という考えは、腎糸球体の選択透過性(permeability)が損なわれた結果として生じる、近位尿細管に入る過剰なタンパク質の毒性作用を表している(Brunskill N.J., J Am Soc Nephrol 15:504-505, 2004; Baines R.J., Nature Rev Nephrol 7:177-180, 2011)。この現象は多くの腎糸球体疾患に共通して見られ、腎臓において炎症促進性の瘢痕環境をもたらし、タンパク尿性の尿細管液体によって刺激されたシグナル伝達経路調節不全の結果として、近位尿細管細胞の増殖、アポトーシス、遺伝子転写、および炎症性サイトカイン産生が変化することを特徴とする。タンパク尿性腎症は、多種多様な原発性腎臓病態に共通する進行性腎臓損傷の重要な一因だと一般に認められている。

【0482】

慢性腎臓疾患は米国では成人集団の15%以上に罹患し、世界中で毎年、約750,000件の死亡の原因となる(Lozano R. et al., Lancet vol 380, Issue 9859:2095-2128, 2012)。タンパク尿は慢性腎臓疾患の指標であり、疾患進行を促進する因子でもある。多くのタンパク尿性腎疾患患者が、尿細管間質性炎症と、腎機能の低下と密接に対応する進行性線維症を示す。タンパク尿そのものが尿細管間質性炎症と、タンパク尿性腎症の発症を誘発する(Brunskill N.J. et al., J Am Soc Nephrol 15:504-505, 2004)。タンパク尿性腎臓疾患では、過剰量のアルブミンと他の高分子が糸球体で濾過され、近位尿細管上皮細胞によって再吸収される。これは、サイトカインおよび白血球の浸潤につながる補体活性化によって媒介される炎症性の悪循環を引き起こす。この悪循環は尿細管間質の損傷および線維症の原因となり、それによってタンパク尿が悪化し、腎機能が失われ、最終的には末期腎不全への進行が起こる(例えば、Clark et al., Canadian Medical Association J

ournal 178:173-175, 2008を参照されたい)。この有害な炎症とタンパク尿の循環を調整する療法が慢性腎臓疾患におけるアウトカムを改善すると予想される。

【0483】

尿細管間質性損傷のUUOモデルにおけるMASP-2阻害の有益な効果を考慮して、MASP-2阻害がタンパク質過負荷モデルにおいて腎損傷を低減させるかどうか確かめるために以下の実験を行った。本研究では、タンパク尿性腎臓疾患を誘発するためにIshola et al., European Renal Association 21:591-597, 2006に記載のようにタンパク質過負荷を用いた。

【0484】

方法:

実施例1に記載のようにMASP-2-/-マウスを作製し、BALB/cと10世代にわたって戻し交配した。本研究では、以下の通りにタンパク質過負荷タンパク尿モデルにおける野生型マウスおよびMASP-2-/-BALB/cマウスの結果を比較した。

【0485】

最適な応答を見るために、実験の1週間前にマウスに片側腎摘出を行った後に、タンパク質過負荷曝露を行った。使用したタンパク尿誘発剤は、以下の用量で:15日間にわたって合計15回腹腔内投与するために、2mg BSA/gm、4mg BSA/gm、6mg BSA/gm、8mg BSA/gm、10mg BSA/gm、および12mg BSA/gm体重をそれぞれ1回投薬し、15mg BSA/gm体重を9回投薬して、通常生理食塩水に溶解してWT(n=7)およびMASP-2-/-マウス(n=7)に腹腔内投与する低エンドトキシンウシ血清アルブミン(BSA,Sigma)であった。対照のWT(n=4)マウスおよびMASP-2-/(n=4)マウスには生理食塩水だけ腹腔内投与した。最後に投薬した後に、尿を収集するために、動物を代謝ケージ(metabolic cage)に別々に24時間入れた。麻酔下での心臓穿刺によって血液を収集し、血液を氷上で2時間凝固させ、血清を遠心分離によって分離した。15日目に実験が終わった時に血清試料および尿試料を収集し、分析のために保管および凍結した。

【0486】

15日目にBSAを最後に投与して24時間後にマウスを 殺し、分析のために様々な組織を収集した。腎臓を採取し、H&Eおよび免疫染色のために処理した。免疫組織化学染色を以下の通りに行った。各マウスに由来する、ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋した5ミクロン腎臓組織切片を脱パラフィンし、再水和した。抗原賦活化をクエン酸緩衝液中で95℃で20分間行い、その後に、組織を3% H₂O₂中で10分間インキュベートした。次いで、組織を、10%アビジン溶液を含むブロッキング緩衝液(二次抗体を作製した種に由来する10%血清と、1%BSAを含むPBS)の中で室温で1時間インキュベートした。各工程の後に切片をPBSで3回、それぞれ5分間洗浄した。次いで、一次抗体を、抗体F4/80(Santa Cruzカタログ番号sc-25830)、TGFβ(Santa Cruzカタログ番号sc-7892)、IL-6(Santa Cruzカタログ番号sc-1265)については1:100の濃度で、TNFα抗体(Santa Cruzカタログ番号sc-1348)については1:50で、10%ビオチン溶液を含むブロッキング緩衝液に溶解して1時間適用した。次いで、ビオチン化二次抗体を、F4/80切片、TGFβ切片、およびIL-6切片については1:200の濃度で、TNFα切片については1:100の濃度で30分間適用し、その後にHRP結合酵素をもう30分間適用した。ジアミノベンジジン(DAB)基質キット(Vector labs)を用いて10分間、発色を行い、スライドを水で洗浄し、脱水し、コンピュータによる画像解析を容易にするために対比染色することなくマウントした。デジタル画像を取り込み、その後に自動画像解析ソフトウェアを用いて定量することによって、染色された腎皮質組織切片を解析した。

【0487】

以下の通りにターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼdUTPニックアンドラベリング(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling)(TUNEL)を用いた染色によって組織切片におけるアポトーシスを評価した。腎臓切片の中にあるアポトーシス細胞を以下の通りにApopTag(登録商標)Peroxidase kit(Millipore)を用いて染色した。各マウスに由来する、パラフィン包埋し、ホルマリンで固定した腎臓切

10

20

30

40

50

片を脱パラフィンし、再水和し、次いで、プロテイナーゼK(20 µg/mL)を用いてタンパク質透過処理した。プロテイナーゼKは、室温で15分間、各標本に適用した。工程間に標本をPBSで洗浄した。組織を3% H₂O₂中で10分間インキュベートすることによって内因性ペルオキシダーゼ活性を止めた。次いで、組織を平衡化緩衝液中でインキュベートし、その後に、TdT酵素と37℃で1時間インキュベートした。停止/洗浄緩衝液で10分間洗浄した後に、抗ジゴキシゲニン結合体を室温で30分間適用した後に、洗浄を行った。DAB基質キットで4分間、発色を行った後に、水で洗浄を行った。組織をヘマトキシリンで対比染色し、DBXにマウントした。皮質から連続して選択した20個の高倍率視野において、TUNELで染色された(茶色の)アポトーシス細胞の頻度をLeica DBXM光学顕微鏡を用いて手作業で数えた。

10

【0488】

結果:

タンパク尿の評価

マウスにタンパク尿が存在することを確認するために、血清中にある総タンパク質を15日目に分析し、尿中総排泄タンパク質を、研究の15日目に24時間にわたって収集した尿試料中で測定した。

【0489】

図23は、生理食塩水だけ与えた野生型対照マウス(n=2)、BSAを与えた野生型マウス(n=6)、およびBSAを与えたMASP-2-/-マウス(n=6)において15日目に測定した血清タンパク質の総量(mg/ml)を図示する。図23に示したように、BSAを投与すると、野生型群およびMASP-2-/-群の両方で血清総タンパク質レベルが、生理食塩水しか与えなかった対照群の濃度の2倍超まで増加した。処置群間で有意差は無かった。

20

【0490】

図24は、生理食塩水だけ与えた野生型対照マウス(n=2)、BSAを与えた野生型マウス(n=6)、およびBSAを与えたMASP-2-/-マウス(n=6)からの、研究の15日目に24時間にわたって収集した尿中の排泄タンパク質の総量(mg)を図示する。図24に示したように、本研究の15日目に、生理食塩水だけを与えた偽処置対照群と比較して、BSA処置群では尿中総排泄タンパク質が約6倍増加した。図23および図24に示した結果から、タンパク尿モデルが予想通り機能したことが証明される。

【0491】

30

腎臓における組織学的変化の評価

図25は、タンパク質過負荷研究の15日目に、以下のマウス群:(パネルA)野生型対照マウス;(パネルB)MASP-2-/-対照マウス;(パネルC)BSAで処置した野生型マウス;および(パネルD)BSAで処置したMASP-2-/-マウスから採集した代表的なH&E染色腎臓組織切片を示す。図25に示したように、同じタンパク質過負荷曝露レベルでは、MASP-2-/-過負荷群(パネルD)の組織保存の程度は、野生型過負荷群(パネルC)と比較してかなり高い。例えば、野生型対照群にあるボーマン嚢(パネルA)と比較して、BSAで処置した野生型マウス(過負荷)にあるボーマン嚢(パネルC)は大きく拡大していることが観察された。対照的に、同じレベルのBSAで処置したMASP-2-/-マウス(過負荷)にあるボーマン嚢(パネルD)はMASP-2-/-対照マウス(パネルB)および野生型対照マウス(パネルA)と同様の形態を保持した。さらに図25に示したように、大きなタンパク質キャスト構造(cast structure)が野生型腎臓切片の近位尿細管および遠位尿細管に蓄積した(パネルC)。これは、MASP-2-/-マウス(パネルD)と比較して大きく、豊富にある。

40

【0492】

透過型電子顕微鏡による本研究からの腎臓切片の解析から、BSAで処置したマウスには、全体的に、遠位尿細管細胞および近位尿細管細胞の繊毛縁に対する損傷があり、細胞内容物および核が飛び出て尿細管管腔の中にあることにも注目する。対照的に、BSAで処置したMASP-2-/-マウスでは組織は保存されていた。

【0493】

腎臓におけるマクロファージ浸潤の評価

50

マクロファージ浸潤によって示されるような炎症の程度を測定するために、採取した腎臓の組織切片を、Boor et al., J of Am Soc of Nephrology 18:1508-1515, 2007に記載の方法を用いてマクロファージ特異的抗体F4/80でも染色した。

【0494】

図26は、マクロファージ平均染色領域(%)を示す、マクロファージ特異的抗体F4/80で染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。ここで、組織切片は、タンパク質過負荷研究の15日目に、野生型対照マウス(n=2)、BSAで処置した野生型マウス(n=6)、およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=5)から入手した。図26に示したように、F4/80抗マクロファージ抗体で染色された腎臓組織切片から、野生型偽対照と比較してBSAで処置した群は両方とも腎臓マクロファージ浸潤(%F4/80抗体染色領域として測定した)の有意な増加を示したが、BSAで処置した野生型マウスに由来する組織切片のマクロファージ浸潤と比較して、BSAで処置したMASP-2-/-マウスに由来する組織切片ではマクロファージ浸潤の有意な低下が観察されたことが分かった(p値=0.0345)。

【0495】

図27Aは、24時間試料に由来する尿中で測定した総排泄タンパク質対マクロファージ浸潤(平均染色領域%)をプロットすることによって、BSAで処置した、それぞれの野生型マウス(n=6)においてマクロファージ-タンパク尿の相関が存在するかどうかの分析を図示する。図27Aに示したように、野生型腎臓からの試料のほとんどが、存在するタンパク尿のレベルとマクロファージ浸潤の程度との間で正の相関関係を示した。

【0496】

図27Bは、24時間試料中の尿中総排泄タンパク質対マクロファージ浸潤(平均染色領域%)をプロットすることによって、BSAで処置した、それぞれのMASP-2-/-マウス(n=5)においてマクロファージ-タンパク尿の相関が存在するかどうかの分析を図示する。図27Bに示したように、野生型マウスにおいてタンパク尿レベルとマクロファージ浸潤の程度との間で観察された正の相関関係(図27Aに示した)がMASP-2-/-マウスでは観察されなかった。特定の理論に拘束されるものではないが、これらの結果は、MASP-2-/-マウスには、高レベルのタンパク尿での炎症クリアランス機構が存在することを示しているのかもしれない。

【0497】

サイトカイン浸潤の評価

インターロイキン6(IL-6)、トランスフォーミング成長因子 β (TGF β)、および腫瘍壊死因子 α (TNF α)はタンパク尿モデルでは野生型マウスの近位尿細管においてアップレギュレートされることが知られている炎症促進性サイトカインである(Abbate M. et al., Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 17: 2974-2984, 2006; David S. et al., Nephrology, Didalysis, Transplantation, Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association- European Renal Association 12: 51-56, 1997)。腎臓組織切片を前記のようにサイトカイン特異的抗体で染色した。

【0498】

図28は、BSAで処置した野生型マウス(n=4)およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=5)における、抗TGF β 抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%TGF β 抗体染色領域として測定した)を図示する。図28に示したように、MASP-2-/-BSA処置(過負荷)群と比較して、野生型BSA処置(過負荷)群ではTGF β 染色の有意な増加が観察された(p=0.026)。

【0499】

図29は、BSAで処置した野生型マウス(n=4)およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=5)における、抗TNF α 抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%TNF α 抗体染色領域として測定した)を図示する。図29に示したように、MASP-2-/-BSA処置(過負荷)群と比較して、野生型BSA処置(過負荷)群ではTNF α 染色の有意な増加が観察された(p=0.0303)。

【0500】

10

20

30

40

50

図30は、野生型対照マウス、MASP-2-/-対照マウス、BSAで処置した野生型マウス(n=7)、およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=7)における、抗IL-6抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%IL-6抗体染色領域として測定した)を図示する。図30に示したように、MASP-2-/-BSA処置群と比較して野生型BSA処置群においてIL-6染色の極めて有意な増加が観察された(p=0.0016)。

【0501】

アポトーシスの評価

アポトーシスをターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼdUTPニックエンドラベリング(TUNEL)染色によって組織切片において評価し、TUNEL染色アポトーシス細胞の頻度を、皮質から連続して選択した20個の高倍率視野(HPF)において計数した。

【0502】

図31は、野生型対照マウス(n=1)、MASP-2-/-対照マウス(n=1)、BSAで処置した野生型マウス(n=6)、およびBSAで処置したMASP-2-/-マウス(n=7)の腎皮質に由来する組織切片から連続して選択した20個の高倍率視野(HPF)において計数したTUNELアポトーシス細胞の頻度を図示する。図31に示したように、BSAで処置した野生型マウスから入手した腎臓では、BSAで処置したMASP-2-/-マウスから入手した腎臓と比較して皮質において有意に速いアポトーシス速度が観察された(p=0.0001)。

【0503】

結果の全体の概要および結論:

本実施例の結果から、タンパク質過負荷モデルにおいてMASP-2-/-マウスは腎損傷が少ないことが証明される。従って、MASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体は、有害な炎症およびタンパク尿の循環を阻害または予防し、慢性腎臓疾患におけるアウトカムを改善すると予想されるだろう。

【0504】

実施例17

本実施例は、マウスタンパク質過負荷タンパク尿モデルでの野生型マウスにおける腎臓炎症および尿細管間質損傷の低減および/または予防において効力があるかどうかについてのモノクローナルMASP-2阻害抗体の分析について説明する。

【0505】

背景/基本原理:

実施例16に記載のように、タンパク質過負荷タンパク尿モデルにおいてMASP-2-/-マウスは野生型マウスよりも有意に良いアウトカム(例えば、尿細管間質損傷が少なく、腎臓炎症が少ない)を示すことが確かめられた。このことは、タンパク尿性腎臓疾患においてレクチン経路には病気を起こす役割があることを意味している。

【0506】

実施例13に記載のように、ヒトレクチン経路の機能を特異的に遮断し、マウスでもレクチン経路を遮断することが示されているモノクローナルMASP-2阻害抗体(OMS646-SGM I-2)を作製した。本実施例では、野生型マウスにおいて腎臓炎症および尿細管間質損傷を低減させるおよび/または予防する効力があるかどうか、MASP-2阻害抗体OMS646-SGM I-2をマウスタンパク質過負荷タンパク尿モデルにおいて分析した。

【0507】

方法:

本研究では、MASP-2阻害抗体(10mg/kg OMS646-SGM I-2)の効果をヒトIgG4アイソタイプ対照抗体であるET904(10mg/kg)および生理食塩水対照と比較して評価した。

【0508】

実施例16に記載の研究と同様に、本研究では、タンパク尿性腎臓疾患を誘発するためにタンパク質過負荷を使用した(Ishola et al., European Renal Association 21:591-597, 2006)。実施例16に記載のように漸増用量(2g/kg~15g/kg)の低エンドトキシンウシ血清アルブミン(BSA)を合計15日にわたって毎日、腹腔内注射することによって、片側腎摘出したBalb/cマウスにおいてタンパク尿を誘発した。

10

20

30

40

50

【0509】

抗体処置を、タンパク尿誘発の7日前から始めて隔週で腹腔内注射することによって投与し、本研究全体を通して続けた。この投薬計画は、持続的なレクチン経路抑制を証明した以前のPK/PD研究および薬理学研究に基づいて選択された(データ示さず)。マウスを15日目に 殺し、腎臓を採取し、H&Eおよび免疫染色のために処理した。デジタル画像を取り込み、その後に自動画像解析ソフトウェアを用いて定量することによって、染色された腎皮質組織切片を解析した。

【0510】

免疫組織化学染色およびアポトーシス評価を実施例16に記載のように行った。

【0511】

結果:

タンパク尿の評価

マウスにおけるタンパク尿の存在を確かめるために、尿中総排泄タンパク質を、15日目(実験の終わり)に24時間にわたって収集した尿試料中で測定した。BSAで処置した群では尿試料中の総タンパク質レベルは、BSAで処置していない対照群と比較して平均してほぼ6倍増加することが確かめられた(データ示さず)。このことから、BSAで処置したマウスにはタンパク尿が存在することが確かめられた。BSA処置群間のタンパク質レベルに有意差は観察されなかった。

【0512】

組織学的変化の評価

図32は、以下のBSAで処置した後、15日目のマウス群:(パネルA)生理食塩水で処置した野生型対照マウス、(パネルB)アイソタイプ抗体で処置した対照マウス、および(パネルC)MASP-2阻害抗体で処置した野生型マウスからの代表的なH&E染色組織切片を示す。

【0513】

図32に示したように、同じタンパク質過負荷曝露レベルでは、MASP-2阻害抗体処置群(パネルC)の組織保存の程度は、生理食塩水で処置した野生型群(パネルA)またはアイソタイプ対照で処置した野生型群(パネルB)と比較してかなり高い。

【0514】

アポトーシスの評価

アポトーシスをターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼdUTPニックエンドラベリング(TUNEL)染色によって組織切片において評価し、TUNEL染色アポトーシス細胞の頻度を、皮質から連続して選択した20個の高倍率視野(HPF)において計数した。図33は、生理食塩水対照およびBSAで処置した野生型マウス(n=8)、アイソタイプ対照抗体およびBSAで処置した野生型マウス(n=8)、ならびにMASP-2阻害抗体およびBSAで処置した野生型マウス(n=7)の腎皮質に由来する組織切片から連続して選択した20個の高倍率視野(HPF)において計数したTUNELアポトーシス細胞の頻度を図示する。図33に示したように、生理食塩水およびアイソタイプ対照で処置した群と比較して、MASP-2阻害抗体処置群から入手した腎臓では、皮質におけるアポトーシス速度の非常に有意な減少が観察された(生理食塩水対照対MASP-2阻害抗体については $p=0.0002$;アイソタイプ対照対MASP-2阻害抗体については $p=0.0052$)。

【0515】

サイトカイン浸潤の評価

タンパク尿モデルでは野生型マウスの近位尿細管においてアップレギュレートされることが知られている炎症促進性サイトカインであるインターロイキン6(IL-6)、トランスフォーミング成長因子 β (TGF β)、および腫瘍壊死因子 α (TNF α)を、本研究において入手した腎臓組織切片において評価した。

【0516】

図34は、BSAおよび生理食塩水で処置した野生型マウス(n=8)、BSAおよびアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウス(n=7)、ならびにBSAおよびMASP-2阻害抗体で処置した野生型マウス(n=8)における、抗TGF β 抗体で染色された組織切片のコンピュータに

10

20

30

40

50

よる画像解析の結果(%TGF β 抗体染色領域として測定した)を図示する。図34に示したように、TGF β 染色領域の定量から、MASP-2阻害抗体で処置したマウスではTGF β レベルが、生理食塩水で処置した対照群およびアイソタイプ対照抗体で処置した対照群(それぞれ、 p 値=0.0324および p 値=0.0349)と比較して有意に低下したことが分かった。

【0517】

図35は、BSAおよび生理食塩水で処置した野生型マウス($n=8$)、BSAおよびアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウス($n=7$)、ならびにBSAおよびMASP-2阻害抗体で処置した野生型マウス($n=8$)における、抗TNF α 抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%TNF α 抗体染色領域として測定した)を図示する。図35に示したように、染色された切片の解析から、MASP-2阻害抗体処置群ではTNF α レベルが生理食塩水対照群($p=0.011$)ならびにアイソタイプ対照群($p=0.0285$)と比較して有意に低下したことが分かった。

10

【0518】

図36は、BSAおよび生理食塩水で処置した野生型マウス($n=8$)、BSAおよびアイソタイプ対照抗体で処置した野生型マウス($n=7$)、ならびにBSAおよびMASP-2阻害抗体で処置した野生型マウス($n=8$)における、抗IL-6抗体で染色された組織切片のコンピュータによる画像解析の結果(%IL-6抗体染色領域として測定した)を図示する。図36に示したように、染色された切片の解析から、MASP-2阻害抗体処置群ではIL-6レベルが生理食塩水対照群($p=0.0269$)ならびにアイソタイプ対照群($p=0.0445$)と比較して有意に低下したことが分かった。

20

【0519】

結果の全体の概要および結論:

本実施例の結果から、MASP-2阻害抗体を使用すると、タンパク質過負荷モデルにおいて腎損傷からの保護が得られることが証明される。これは、タンパク尿モデルにおいてMASP-2-/-マウスの腎損傷が少ないことを証明した実施例16に記載の結果と合致する。

【0520】

実施例18

本実施例は、アドリマイシン誘発性腎症におけるレクチン経路の役割を評価するために、MASP-2-/-マウスおよび野生型マウスにおける腎臓線維症、炎症、および尿細管間質損傷のアドリマイシン誘発性腎臓病モデルを用いて得られた結果を示す。

30

【0521】

背景/基本原理:

アドリマイシンは、血液悪性腫瘍、軟部組織肉腫、および多くのタイプの癌腫を含む広範囲の癌の処置において用いられるアントラサイクリン抗腫瘍性抗生物質である。アドリマイシン誘発性腎症は、慢性タンパク尿の進行をより深く理解することを可能にしてきた、慢性腎臓疾患の十分に確立したげっ歯類モデルである(Lee and Harris, Nephrology, 16:30-38, 2011)。アドリマイシン誘発性腎症における構造的損傷および機能的損傷のタイプは、ヒトにおける慢性タンパク尿性腎疾患のものとよく似ている(Pippin et al., American Journal of Renal Physiology 296:F213-29, 2009)。

【0522】

40

アドリマイシン誘発性腎症は、糸球体上皮細胞への損傷と、それに続く糸球体硬化症、尿細管間質の炎症および線維症を特徴とする。アドリマイシン誘発性腎症は、免疫に由来する機構と、免疫に由来しない機構の両方によって調整されることが多くの研究において示されている(Lee and Harris, Nephrology, 16:30-38, 2011)。アドリマイシン誘発性腎症には腎臓疾患モデルとして、いくつかの強みがある。第1に、アドリマイシン誘発性腎症は高度に再現性があり、かつ断定しうる腎損傷モデルである。これは、このモデルが薬物投与の数日以内に腎損傷が誘導されることを特徴とし、このため、損傷のタイミングが変わらないので実験デザインを簡単にすることができるからである。アドリマイシン誘発性腎症はまた、許容可能な死亡率(<5%)と罹患率(体重減少)に関連すると同時に組織損傷の程度が重度になるモデルでもある。従って、アドリマイシン誘発性腎

50

症における腎損傷の重症度とタイミングという理由から、これは、腎損傷から保護する介入を試験するのに適したモデルである。

【0523】

実施例16および17に記載のように、タンパク尿のタンパク質過負荷モデルでは、MASP-2-/-マウスと、MASP-2阻害抗体で処置したマウスは野生型マウスよりも有意に良好なアウトカムを示した(例えば、尿細管間質損傷が少なく、腎臓炎症が少ない)ことが確かめられた。このことは、タンパク尿性腎臓疾患においてレクチン経路には病気を起こす役割があることを意味している。

【0524】

本実施例では、MASP-2欠損が、アドリアマイシンによって誘発される腎臓炎症および尿細管間質損傷を低減させるおよび/または予防するかどうか確かめるために、アドリアマイシン誘発性腎臓病モデル(AN)においてMASP-2-/-マウスを野生型マウスと比較して分析した。

【0525】

方法:

1.投与量および時点の最適化

治療介入を試験するのに適したレベルの腎臓炎症をBALB/cマウスが発症するアドリアマイシンの用量と時点を決めるために、初回実験を行った。

【0526】

3つの野生型BALB/cマウス群(n=8)に単一用量の静脈内投与アドリアマイシン(10.5mg/kg)を注射した。3つの時点:アドリアマイシン投与の1週間後、2週間後、および4週間後にマウスを選別した。対照マウスには生理食塩水だけを注射した。

【0527】

結果: 3つの群にいるマウスは全てH&E染色によって確かめられた時には糸球体硬化症およびタンパク尿の徴候を示し、腎臓におけるマクロファージ浸潤によって測定された時には組織炎症の程度は徐々に増加した(データ示さず)。組織傷害の程度は1週間群では軽度であり、2週間群では中等度であり、4週間群では重度であった(データ示さず)。本研究の残りについては2週間の時点を選択した。

【0528】

2.野生型マウスおよびMASP-2-/-マウスにおけるアドリアマイシン誘発性腎臓病の分析

アドリアマイシン誘発性腎臓病における補体レクチン経路の役割を解明するために、同じ用量のアドリアマイシンでMASP-2-/-マウス(BALB/c)群を野生型マウス(BALB/c)と比較した。MASP-2-/-マウスをBALB/cマウスと10世代にわたって戻し交配した。

【0529】

野生型(n=8)およびMASP-2-/(n=8)にアドリアマイシン(10.5mg/kg)を静脈内注射し、各系統の3匹のマウスには対照として生理食塩水だけ与えた。処置して2週間後に全てのマウスを選別し、組織を収集した。組織病理学的傷害の程度をH&E染色によって評価した。

【0530】

結果:

図37は、以下のアドリアマイシンまたは生理食塩水だけ(対照)で処置した後、14日目のマウス群:(パネルA-1、A-2、A-3)生理食塩水だけで処置した野生型対照マウス;(パネルB-1、B-2、B-3)アドリアマイシンで処置した野生型マウス;および(パネルC-1、C-2、C-3)アドリアマイシンで処置したMASP-2-/-マウスからの代表的なH&E染色組織切片を示す。それぞれの写真は(例えば、パネルA-1、A-2、A-3)は異なるマウスを表している。

【0531】

図37に示したように、アドリアマイシンで処置したMASP-2-/-群の組織保存の程度は、同じ用量のアドリアマイシンで処置した野生型群と比較してかなり高い。

【0532】

図38は、以下のアドリアマイシンまたは生理食塩水だけ(野生型対照)で処置した後、14

10

20

30

40

50

日目のマウス群:生理食塩水だけで処置した野生型対照マウス;アドリアマイシンで処置した野生型マウス;生理食塩水だけで処置したMASP-2-/-マウス、およびアドリアマイシンで処置したMASP-2-/-マウスからのマクロファージ平均染色領域(%)を示した、マクロファージ特異的抗体F4/80で染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。図38に示したように、アドリアマイシンで処置したMASP-2-/-マウスは、アドリアマイシンで処置した野生型マウスと比較してマクロファージ浸潤が少ない(**p=0.007)。

【0533】

図39は、以下のアドリアマイシンまたは生理食塩水だけ(野生型対照)で処置した後、14日目のマウス群:生理食塩水だけで処置した野生型対照マウス;アドリアマイシンで処置した野生型マウス;生理食塩水だけで処置したMASP-2-/-マウス、およびアドリアマイシンで処置したMASP-2-/-マウスからの、コラーゲン沈着染色領域(%)を示す、シリウスレッドで染色された腎臓組織切片のコンピュータによる画像解析の結果を図示する。図39に示したように、アドリアマイシンで処置したMASP-2-/-マウスは、アドリアマイシンで処置した野生型マウスと比較してコラーゲン沈着が少ない(**p=0.005)。

【0534】

全体の概要および結論:

腎臓尿細管間質性炎症の寛解は腎臓疾患処置の重要な目標である。本明細書において示した結果から、腎臓尿細管間質性炎症の発症には補体活性化のレクチン経路が大いに寄与することが分かる。本明細書においてさらに証明されるように、MASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体は、タンパク尿性腎症、アドリアマイシン腎症の処置および腎臓尿細管間質性炎症の寛解における新規の治療アプローチとして用いられる可能性がある。

【0535】

実施例19

本実施例は、ステロイド依存性免疫グロブリンA腎症(IgAN)にかかっている成人およびステロイド依存性膜性腎症(MN)にかかっている成人における完全ヒトモノクローナルMASP-2阻害抗体の安全性および臨床的有效性を評価するための、継続中の第2相臨床試験の初期結果について説明する。

【0536】

背景:

米国では2000万超の人が慢性腎臓疾患に罹患している(Drawz P. et al., Ann Intern Med 162(11); ITC1-16, 2015)。IgANおよびMNを含む糸球体腎症(GN)は、糸球体が損なわれ、しばしば末期腎疾患および透析につながる腎臓疾患である。いくつかのタイプの原因性GNが存在し、最もよく見られるものがIgANである。これらの患者の多くには持続的な腎臓炎症および進行性の悪化がある。多くの場合、これらの患者は、多くの重篤な長期有害事象を有するコルチコステロイドまたは免疫抑制剤で処置される。これらの処置を受けていても多くの患者は悪化し続ける。IgANまたはMNの処置のために承認されている治療法は無い。

【0537】

IgA腎症

免疫グロブリンA腎症(IgAN)は、腎臓内炎症および腎臓損傷をもたらす自己免疫性腎臓疾患である。IgANは、世界的に最もよく見られる原因性腎糸球体疾患である。年間発生率は100,000人あたり約2.5人であり、米国では1400人に1人がIgANを発症すると見積もられている。IgAN患者のうち40%と多くの患者が末期腎疾患(ESRD)を発症する。患者は、典型的には、軽度から中等度のタンパク尿を伴う顕微鏡的血尿と様々なレベルの腎機能不全を呈する(Wyatt R.J. et al., N Engl J Med 368(25):2402-14, 2013)。腎機能障害、持続的な高血圧、および重いタンパク尿(1日に1g以上)などの臨床マーカーが予後不良と関連する(Goto M et al., Nephrol Dial Transplant 24(10):3068-74, 2009; Berthouix F. et al., J Am Soc Nephrol 22(4):752-61, 2011)。複数の大規模な観察研究および前向き試験では、タンパク尿は他の危険因子とは独立した最も強力な予後因子で

ある(Coppo R. et al., J Nephrol 18(5):503-12, 2005; Reich H. N., et al., J Am Soc Nephrol 18(12):3177-83, 2007)。治療しないままであれば疾患が発症して10年以内に患者のうち15～20%がESRDに達すると見積もられている(D'Amico G., Am J Kidney Dis 36(2):227-37, 2000)。

【0538】

IgANの診断上の顕著な特徴は、腎糸球体メサンギウムにIgA沈着が単独で、IgG、IgM、またはその両方と一緒に圧倒的な数で存在することである。IgANでは、補体系のレクチン経路のエフェクター酵素であるMASP-2が活性化するための重要な認識分子であるマンナン結合レクチン(MBL)が腎糸球体に沈着することが腎臓生検から明らかになっている。腎糸球体へのMBL沈着は、通常、IgAと共存しており、かつ補体活性化と、高レベルの尿中MBLを示すものであり、IgANにおいて予後が悪いことと関連付けられている。これらの患者は、MBL沈着も高レベルの尿中MBLも無い患者よりも重篤な組織学的変化および糸球体間質増殖を示す(Matsuda M. et al., Nephron 80(4):408-13, 1998; Liu LL et al., Clin Exp Immunol 169(2):148-155, 2012; Roos A. et al., J Am Soc Nephrol 17(6):1724-34, 2006; Liu LL et al., Clin Exp Immunol 174(1):152-60, 2013)。MBL沈着のある患者については寛解率もかなり低い(Liu LL et al., Clin Exp Immunol 174(1):152-60, 2013)。

【0539】

現行のIgAN療法には血圧調節が含まれ、しばしば、重度の疾患(例えば、半月体形成性IgAN)の場合にはコルチコステロイドおよび/または他の免疫抑制剤、例えば、シクロホスファミド、アザチオプリン、またはミコフェノール酸モフェチルが含まれる。The Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) Guidelines for Glomerulonephritis (Int. Soc of Nephrol 2(2):139-274, 2012)では、1g/day以上のタンパク尿患者にはコルチコステロイドを6ヶ月の通常治療期間で投与すべきであると推奨している。しかしながら、重篤な長期後遺症と関連する積極的な免疫抑制処置を用いても、一部の患者には進行性の腎機能悪化がある。承認されたIgAN治療法は無く、血圧調節のためにアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害因子またはアンジオテンシン受容体遮断薬(ARB)を用いても、一部の患者ではタンパク尿の増加が持続する。これらの治療法はどれも、この疾患が急速に進行するリスクがある患者ではIgANを止めることが示されておらず、IgANの進行を遅らせることさえ示されていない。

【0540】

膜性腎症

膜性腎症(MN)の年間発生率は1,000,000人あたり約10～12人である。MN患者には、一定しない臨床経過が起こる可能性があるが、約25%は末期腎疾患を発症する。

【0541】

膜性腎症は、免疫を介した腎糸球体疾患であり、成人におけるネフローゼ症候群の最もよく見られる原因の1つである。この疾患は、腎糸球体基底膜の外側の側面に、糸球体上皮細胞抗原と、この抗原に特異的な抗体を含有する免疫沈着物、主としてIgG4が形成し、その結果、補体が活性化されることを特徴とする。MNの初期の症状発現は、ネフローゼ症候群:タンパク尿、低アルブミン血症、高脂血症、および浮腫と関連する。

【0542】

MNは処置なしで自然治癒する場合があるが、1/3もの患者が進行性の腎機能喪失を示し、診断後、5年の中央値でESRDに進行する。多くの場合、MNを処置するのにコルチコステロイドが用いられ、代替療法を開発する必要性がある。さらに、タンパク尿の重症度に基づいて中等度の進行リスクがあると確かめられた患者はシクロホスファミドまたはカルシニューリン阻害因子と一緒にプレドニゾンで処置され、これらの2種類の処置は共に重度の全身副作用と関連することが多い。

【0543】

方法:

健常人において行った2つの第1相臨床試験から、MASP-2阻害抗体であるOMS646を静

10

20

30

40

50

脈内投薬および皮下投薬すると持続的なレクチン経路阻害が起こることが証明されている。

【0544】

本実施例は、IgANおよびMNにかかっている対象におけるMASP-2阻害抗体OMS646の継続中の第2相無対照多施設研究からの中間結果について説明する。組み入れ規準は、腎疾患サブタイプに関係なく、本研究の患者全員が、研究登録前に少なくとも12週間にわたって安定用量のコルチコステロイドで維持されていたこと(すなわち、患者がステロイド依存性であること)を必要とする。本研究は、12週間の処置期間と6週間の経過観察期間のあるシングルアームパイロット研究である。

【0545】

1つの疾患につき約4人の対象が登録する計画を立てる。本研究は、IgANおよびMNにかかっている対象においてOMS646が腎機能を改善し(例えば、タンパク尿を改善し)、コルチコステロイドの必要を減らす可能性があるかどうか評価するようにデザインされた。現在までに、本研究において2人のIgA腎症患者および2人の膜性腎症患者が処置を完了している。

【0546】

治験登録時には、安定コルチコステロイド用量を用いた処置が継続しているのにもかかわらず、各対象の尿中タンパク質値は高くなければならない。これらの基準によって、研究期間中に自然に改善する可能性が低い患者が選択される。

【0547】

対象はスクリーニング時に18歳以上であり、以下のうちの1つが診断された場合にのみ本研究に組み入れられた:腎臓生検時に診断されるIgANまたは腎臓生検時に診断される原発性MN。登録した患者は、以下の組み入れ規準も全て満たさなければならなかった。

(1)スクリーニング期間中、2回の各来診の前に、連続して、かつ毎日収集した3つの試料からの平均尿アルブミン/クレアチニン比が >0.6 である;

(2)スクリーニング来診1の前に少なくとも12週間にわたって $\geq 10\text{mg}$ のプレドニゾンまたは同等の用量が与えられていた;

(3)免疫抑制処置(例えば、シクロホスファミド、ミコフェノール酸モフェチル)が与えられていたら、スクリーニング来診1の前に少なくとも2ヶ月にわたって安定用量が与えられており、研究期間にわたって用量の予想された変化は無い;

(4)MDRD式¹によって計算される推算糸球体濾過量(eGFR)が $\geq 30\text{mL/min/1.73m}^2$ である;

(5)アンジオテンシン変換酵素阻害因子(ACEI)および/またはアンジオテンシン受容体遮断薬(ARB)を用いた、医師によって指導され、安定し、最適化された処置を受けており、安静時に収縮期血圧 $<150\text{mmHg}$ 、拡張期血圧 $<90\text{mmHg}$ である;

(6)スクリーニング来診1の6ヶ月以内にベリムマブ、エクリズマブ、またはリツジマブが用いられたことがない;

(7)腎臓移植の病歴がない。

¹MDRD式: $\text{eGFR}(\text{mL/min/1.73m}^2)=175 \times (\text{SCr})^{-1.154} \times (\text{年齢})^{-0.203} \times (\text{女性の場合、} 0.742) \times (\text{アフリカ系アメリカ人の場合、} 1.212)$ 。注:SCr=血清クレアチニン測定値は mg/dL でなければならない。

【0548】

本研究で使用したモノクローナル抗体であるOMS646は、ヒトMASP-2に結合し、これを阻害する完全ヒトIgG4モノクローナル抗体である。MASP-2はレクチン経路のエフェクター酵素である。実施例12において証明されたように、OMS646は組換えMASP-2に強く結合し(見かけの平衡解離定数は 100pM の範囲である)、相同タンパク質C1s、C1r、およびMASP-1を上回る5,000倍超の選択性を示す。機能アッセイではOMS646はナノモル効力でヒトレクチン経路を阻害するが(50%阻害する濃度 $[\text{IC}_{50}]$ は約 3nM である)、古典経路には有意な影響を及ぼさない。マウス、非ヒト霊長類、およびヒトへの静脈内(IV)注射または皮下(SC)注射によって投与したOMS646は、エクスピボアッセイでのレクチン経路活性化の抑制に関連する高い血漿中濃度をもたらした。

10

20

30

40

50

【0549】

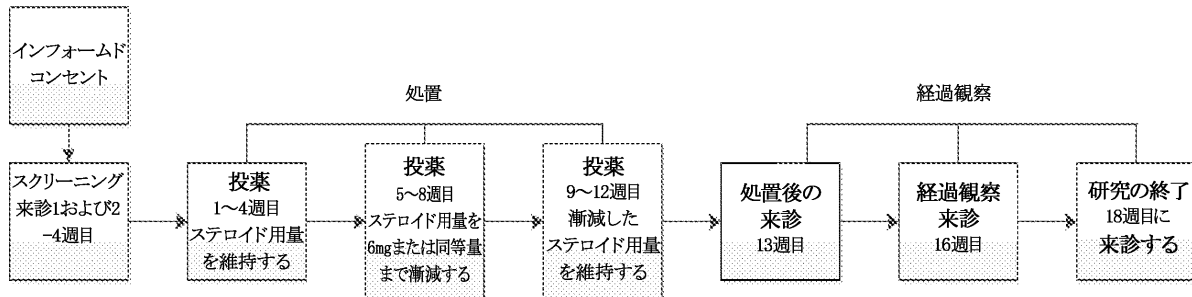
本研究では、OMS646原薬は100mg/mLの濃度で供給され、これをIV投与用にさらに希釈した。用量調製のために、OMS646 100mg/mL注射溶液の計算された適切量を注射器を用いてバイアルから引き抜いた。調製して4時間以内に注入バックを投与した。

【0550】

本研究は、以下の研究デザインの概略図に示したように、スクリーニング(28日間)、処置(12週間)、および経過観察(6週間)の期間からなる。

【0551】

研究デザインの概略図



10

【0552】

尿アルブミン/クレアチニン比のベースライン値を確立するためにスクリーニング期間内と1回目のOMS646投薬の前に、同意が得られた対象から、3日間連続した2つの期間のそれぞれにおいて3つの尿試料を得た(1日1回、収集した)。スクリーニング期間後に、資格がある対象に、OMS646 4mg/kg IVを12週間(処置期間)にわたって週1回与えた。OMS646を最後に投薬した後に6週間の経過観察期間があった。

20

【0553】

OMS646を用いた最初の4週間の処置の間に、安定した研究前用量のコルチコステロイドを与えて対象を維持した。12週間の処置期間のうち最初の4週間が終わったら、忍容性が認められる場合は4週間にわたって、対象のコルチコステロイドを漸減させ(すなわち、コルチコステロイド用量を低減させ)、その後に4週間にわたって、結果として生じたコルチコステロイド用量を維持した。この目標は、1日に ≤ 6 mgのプレドニゾン(または同等の用量)まで漸減させることであった。この期間の間に、試験責任者によって決定されるように、腎機能が悪化した対象では漸減を中断した。コルチコステロイド漸減を通じて、および全12週間の処置を通じて対象をOMS646で処置した。次いで、最後に処置した後、さらに6週間にわたって患者を追跡した。コルチコステロイド漸減とOMS646処置によって、安定した腎機能を維持するのに必要なコルチコステロイド用量をOMS646は減らすかどうか評価することが可能になった。

30

【0554】

本研究における重要な効力尺度は、ベースラインから12週間までの尿アルブミン/クレアチニン比(uACR)と24時間タンパク質レベルの変化である。尿中タンパク質またはアルブミンの測定は腎臓合併症を評価するために日常的に用いられ、持続的な高レベルの尿中タンパク質は腎疾患の進行と相関関係にある。uACRはタンパク尿を評価するために臨床で用いられる。

40

【0555】

効力分析

uACRの分析値は、ある時点で得られた全ての値の平均と定義された。計画されたuACR値は、予定された各時点では3である。ベースラインuACR値は、2回のスクリーニング来診時の分析値の平均と定義された。

【0556】

結果:

図40は、12週間の研究中に、4mg/kg MASP-2阻害抗体(OMS646)を用いて毎週処置

50

した2人のIgAN患者におけるuACRを図示する。図40に示したように、ベースラインからの変化は、未変換分析によって時点「a」($p=0.003$)、時点「b」($p=0.007$)、および時点「c」($p=0.033$)では統計的に有意である。表12は、OMS646で処置した2人のIgAN患者の24時間尿タンパク質データを示す。

【0557】

(表12) OMS646で処置したIgAN患者における24時間尿タンパク質(mg/day)

試料の時間	患者 #1 (mg/24時間)	患者 #2 (mg/24時間)	平均
ベースライン	3876	2437	3156
85日目	1783	455	1119
$p=0.017$			

【0558】

図40および表12に示したように、IgAN患者は研究中に臨床的かつ統計的に有意な腎機能改善を示した。uACR(図40を参照されたい)と24時間尿タンパク質濃度(表12を参照されたい)は両方とも統計的に有意に減少した。図40のuACRデータに示したように、平均ベースラインuACRは1264mg/gであり、処置終了時には525mg/gに達し($p=0.011$)、経過観察期間の終了時には128mg/gまで減少した。さらに図40に示したように、処置効果は経過観察期間全体を通して維持された。24時間尿タンパク質排泄の測定はuACRを追従し、平均して3156mg/24時間から1119mg/24時間に低下した($p=0.017$)。2人の患者間で処置効果はかなり一致していた。両患者とも約2000mg/dayの低下を経験し、部分寛解(24時間尿タンパク質排泄が50パーセント超低下する、および/またはその結果としてタンパク質排泄が1000mg/day未満になると定義される);完全寛解(タンパク質排泄が300mg/day未満だと定義される)に達した。両IgA腎症患者における24時間タンパク尿低下の大きさは腎臓生存の有意な改善と関連する。両IgA腎症患者ともステロイドを大幅に漸減させることもでき、それぞれが、一日量を ≤ 5 mgまで(60mgから0mgまで;30mgから5mgまで)低減させることができた。

【0559】

2人のMN患者も、OMS646を用いた処置の間にuACRの低下を示した。一方のMN患者はuACRが1003mg/gから69mg/gまで減少し、経過観察期間全体を通して、この低いレベルを維持した。他方のMN患者は、処置後、一定しない経過を伴って、uACRが1323mg/gから673mg/gまで減少した。第1のMN患者は24時間尿タンパク質レベルが著しく低下し(ベースラインでは10,771mg/24時間から、85日目には325mg/24時間)、部分寛解およびほぼ完全な寛解に達した。これに対して、他方の患者は本質的に変化しないままであった(ベースラインでは4272mg/24時間から、85日目には4502mg/24)。2人のMN患者ではステロイドが30mgから15mgまでと、10mgから5mgまで漸減した。

【0560】

まとめると、MASP-2阻害抗体OMS646で処置したIgAN対象およびMN対象において首尾一貫した腎機能改善が観察された。IgAN患者におけるOMS646処置の効果は力強く、かつ首尾一貫していた。このことから強力な効力シグナルが示唆される。これらの効果は、MN患者における結果によって裏付けられる。処置中のuACR変化の時間経過と大きさは4人全てのIgAN患者およびMN患者間で首尾一貫していた。有意な安全問題は観察されなかった。本研究の患者は、処置するのが難しい群であり、これらの患者での治療効果は、末期腎疾患に急速に進行するリスクのある患者を含む、IgAN患者およびMN患者、例えば、ステロイド依存性IgANおよびMNに罹患している患者(すなわち、MASP-2阻害抗体を用いた処置の前に、安定したコルチコステロイド用量を用いた処置を受けている患者)におけるOMS646などのMASP-2阻害抗体を用いた効力を予測するものだと考えられる。

【0561】

前述に従って、一態様では、本発明は、IgANまたはMNに罹患しているヒト対象を処置する方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害抗体を含む組成物を対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一態様において、前記方法は、腎機能を改善する(例えば、タンパク尿を改善する)のに十分な量のMASP-2阻害抗体を、IgANまたはMNに罹患しているヒト対象に投与する工程を含む。一態様において、対象はステロイド依存性IgANに罹患している。一態様において、対象はステロイド依存性MNに罹患している。一態様において、MASP-2阻害抗体は、ステロイド依存性IgANまたはステロイド依存性MNに罹患している対象において腎機能を改善する、および/またはコルチコステロイド投与量を減らすのに十分な量で前記対象に投与される。

10

【0562】

一態様において、前記方法は、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害抗体を含む組成物を対象に投与する工程の前に、ステロイド依存性IgANに罹患しているヒト対象を特定する工程をさらに含む。

【0563】

一態様において、前記方法は、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害抗体を含む組成物を対象に投与する工程の前に、ステロイド依存性MNに罹患しているヒト対象を特定する工程をさらに含む。

【0564】

本明細書中の開示されたどの態様でも、MASP-2阻害抗体は、以下の特徴:前記抗体は10 nM以下の K_D でヒトMASP-2に結合する、前記抗体はMASP-2のCCP1ドメイン内にあるエピトープに結合する、前記抗体はインビトロアッセイにおいて1%ヒト血清中でのC3b沈着を10 nM以下の IC_{50} で阻害する、前記抗体は90%ヒト血清中でのC3b沈着を30 nM以下の IC_{50} で阻害する、前記抗体は、Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂、およびF(ab')₂からなる群より選択される抗体断片である、前記抗体は単鎖分子である、前記抗体はIgG2分子である、前記抗体はIgG1分子である、前記抗体はIgG4分子である、IgG4分子はS228P変異を含む、の少なくとも1つまたは複数を示す。一態様において、前記抗体はMASP-2に結合し、レクチン経路を選択的に阻害し、古典経路を実質的に阻害しない(すなわち、古典的補体経路を完全な状態のままにしておきながらレクチン経路を阻害する)。

20

【0565】

一態様において、MASP-2阻害抗体は、腎機能に関連する少なくとも1つまたは複数の臨床パラメータを改善するのに有効な量で、例えば、タンパク尿の改善(例えば、uACRの減少、および/または24時間尿タンパク質濃度の減少、例えば、20パーセント超の24時間尿タンパク質排泄低下、もしくは、例えば、30パーセント超の24時間尿タンパク質排泄低下、もしくは、例えば、40パーセント超の24時間尿タンパク質排泄低下、もしくは、例えば、50パーセント超の24時間尿タンパク質排泄低下)に有効な量で投与される。

30

【0566】

一部の態様において、前記方法は、第1の期間(例えば、少なくとも1日~1週間もしくは2週間もしくは3週間もしくは4週間またはそれより長く)にわたってカテーテルを介して(例えば、静脈内に)、IgAN(例えば、ステロイド依存性IgAN)に罹患している対象にMASP-2阻害抗体を投与する工程を含み、その後、第2の期間(例えば、少なくとも2週間またはそれより長い慢性期)にわたって対象にMASP-2阻害抗体を皮下投与する工程を含む。

40

【0567】

一部の態様において、前記方法は、第1の期間(例えば、少なくとも1日~1週間もしくは2週間もしくは3週間もしくは4週間またはそれより長く)にわたってカテーテルを介して(例えば、静脈内に)、MN(例えば、ステロイド依存性MN)に罹患している対象にMASP-2阻害物質を投与する工程を含み、その後、第2の期間(例えば、少なくとも2週間またはそれより長い慢性期)にわたって対象にMASP-2阻害抗体を皮下投与する工程を含む。

【0568】

一部の態様において、前記方法は、MASP-2阻害抗体を、IgAN(例えば、ステロイド依

50

存性IgAN)またはMN(例えば、ステロイド依存性MN)に罹患している対象に静脈内投与、筋肉内投与、または皮下投与する工程を含む。処置は長期にわたってもよく、毎日～毎月投与されてもよいが、好ましくは、少なくとも2週間ごとに、または少なくとも週1回、例えば、週2回もしくは週3回投与される。

【0569】

一態様において、前記方法は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、ある量のMASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を対象に投与する工程を含む、IgAN(例えば、ステロイド依存性IgAN)またはMN(例えば、ステロイド依存性MN)に罹患している対象を処置する工程を含む。一部の態様において、前記組成物は、(a)i)SEQ ID NO:67の31-35のアミノ酸配列を含む重鎖CDR-H1;およびii)SEQ ID NO:67の50-65のアミノ酸配列を含む重鎖CDR-H2;およびiii)SEQ ID NO:67の95-107のアミノ酸配列を含む重鎖CDR-H3を含む、重鎖可変領域、ならびに(b)i)SEQ ID NO:69の24-34のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR-L1;およびii)SEQ ID NO:69の50-56のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR-L2;およびiii)SEQ ID NO:69の89-97のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR-L3を含む、軽鎖可変領域を含む、MASP-2阻害抗体、あるいは(ii)SEQ ID NO:67と少なくとも90%の同一性(例えば、SEQ ID NO:67と少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性)を有する重鎖可変領域、およびSEQ ID NO:69と少なくとも90%の同一性(例えば、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の同一性)を有する軽鎖可変領域を含む、その変種を含む。

【0570】

一部の態様において、前記方法は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、ある量のMASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を対象に投与する工程を含む。

【0571】

一部の態様において、前記方法は、SEQ ID NO:67に示した重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示した軽鎖可変領域を含む参照抗体OMS646が認識する、ヒトMASP-2上のエピトープの少なくとも一部を特異的に認識する、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を対象に投与する工程を含む。

【0572】

一部の態様において、前記方法は、IgAN(例えば、ステロイド依存性IgAN)もしくはMN(例えば、ステロイド依存性MN)に罹患しているかまたはその発症リスクがある対象に、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むMASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を、1mg/kg～10mg/kg(すなわち、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、または10mg/kg)の投与量で、少なくとも3週間、または少なくとも4週間、または少なくとも5週間、または少なくとも6週間、または少なくとも7週間、または少なくとも8週間、または少なくとも9週間、または少なくとも10週間、または少なくとも11週間、または少なくとも12週間の期間にわたって少なくとも週1回(例えば、少なくとも週2回または少なくとも週3回)投与する工程を含む。

【0573】

実施例20

本実施例は、コロナウイルス誘発性急性呼吸窮迫症候群に罹患しているかまたはその発症リスクがある対象の処置における、MASP-2阻害抗体であるOMS646を用いた研究について説明する。

【0574】

背景/基本原理:

急性呼吸窮迫症候群はコロナウイルス感染症の重度の合併症である。SARS-CoVは、2002年と2003年に、中国の動物市場で出回っていたコロナウイルスから現れ、呼吸器疾患の世界的な大流行を招き、人間での症例は8,000件を超え、死亡率は10%であった(Rota P.A. et al., Science 300:1394-1999, 2003)。2012年に、新たな関連するコロナウイルスが中東で特定され、中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)と命名され、重度の呼吸器疾患の原因となり、死亡率は35%を超えた(Zaki A.M. et al., N Engl J Med 367:1814-1820, 2012)。コロナウイルス疾患2019(COVID-19)は、2019年に現れ、SARSウイルスと密接に関連している重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARSコロナウイルス2またはSARS-CoV-2)によって引き起こされる感染症である(World Health Organization, 2/11/2020, Novel Coronavirus Situation Report 22)。COVID-19、SARS-CoV、およびMERS-CoVは全て、無症候性の症例から重症急性呼吸窮迫症候群(コロナウイルス誘発性ARDS)および呼吸不全まで及ぶ広範囲の疾患を引き起こす。COVID-19に冒されている人は発熱、乾性咳、疲労、および息切れを発症することがある。コンピュータ断層撮影法による所見から肺のスリガラス陰影と両側の斑状の陰影が分かる。症例は、肺炎、多臓器不全と敗血症ショックにつながり得る重症急性呼吸窮迫症候群を含む呼吸機能低下に進行することがあり、最も脆弱な人では死亡に進行することがある(例えば、Hui D.S. et al., Int J Infect Dis 91:264-266, Jan 14, 2020およびGuan et al. *Ol*:10.1056/NEJMoa2002032を参照されたい)。ワクチンも特異的な抗ウイルス治療もなく、管理は症状の処置と支持的治療を伴う。従って、コロナウイルス誘発性急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、および/または予防するための治療上有効な薬剤を開発することが緊急に必要されている。

【0575】

補体活性化がコロナウイルス誘発性の重症急性呼吸器症候群の発病に寄与することが観察されている。SARS-CoVに感染した補体成分3欠損マウス(C3-/-マウス)は、肺中のウイルス量が同じであったにもかかわらず、SARS-CoV感染C57BL/6J対照マウスと比較して有意に少ない体重減少と有意に少ない呼吸機能低下を示すことが見出された(Gralinski L.E. et al., mBio 9:e01753-18, 2018)。感染対照マウスよりもSARS-CoV感染C3-/-マウスの肺中にある好中球および炎症性単球は有意に少なく、感染対照マウスと比較してSARS-CoV感染C3-/-マウスの肺における肺病態は低減し、サイトカインおよびケモカインレベル(例えば、IL-5、IL-6)は低いことがさらに観察された(Gralinski L.E. et al., mBio 9:e01753-18, 2018)。

【0576】

研究から、SARS-CoV感染症の多くの生存者は肺線維症を発症し、高齢患者の方が有病率が高くなることも分かっている(Hui D.S. et al., Chest 128:2247-2261, 2005)。コロナウイルス誘発性線維症などの肺線維症を処置する選択肢は限られている。従来より、ARDSおよび肺線維症の処置にはコルチコステロイドが用いられる。しかしながら、ウイルス感染症中に、このように処置すると免疫応答が弱まり、疾患が悪化することがある(Gross T.J. et al., N Engl J Med 345:517-525, 2001)。

【0577】

以前に述べられたようにCOVID-19に対する有効な治療法は知られておらず、この疾患は急速に広がっている。死亡率の評価はまだ早いですが、世界保健機関は2020年3月上旬では死亡率が3.4%になると報告した(worldwideweb.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---3-march-2020)。重度のCOVID-19感染症にかかった患者に対する有効な治療法が必要とされている。

【0578】

本明細書に記載のように、レクチン経路は3つの補体活性化経路のうちの1つである。他の経路は古典経路と代替経路である。全ての活性化経路によってアナフィラトキシンであるC3aとC5aが作り出され、標的細胞上にC5b-9または膜侵襲複合体(MAC)が作り出される。

【0579】

レクチン経路は自然免疫系の一部であり、微生物または傷つけられた細胞によって活性化される。微生物は、炭水化物をベースとする病原体関連分子パターン(PAMP)を提示し、傷つけられた宿主細胞は損傷関連分子パターン(DAMP)を提示する。健常細胞上にDAMPは提示されないが、細胞が傷つけられると露出するようになる。

【0580】

マンノース結合レクチン(MBL)、フィコリン、およびコレクチンなどの循環レクチンはPAMPおよびDAMPを認識し、これらに結合する。レクチンがPAMPまたはDAMPに結合すると、補体活性化は細胞膜の近傍に局在するようになる。これらのレクチンはマンナン結合レクチン関連セリンプロテアーゼ2(MASP-2)を運んでおり、マンナン結合レクチン関連セリンプロテアーゼ2(MASP-2)は補体因子2および4を切断してC3コンバーターを作り出し、C3コンバーターそのものはC3を切断してC5コンバーターを形成する。レクチン経路活性化に加えて、代替経路も活性化されることがあり、補体活性化を増幅する。この全てによって、損傷した細胞の膜にMACが挿入され、もっと多くのDAMPが露出することで細胞がさらに傷つけられる。MASP-2を運んでいる循環レクチンがDAMPを認識し、これに結合すると、レクチン経路はさらに活性化され、さらに細胞が傷つけられる。このように、レクチン経路は、初期補体活性化によって引き起こされる細胞傷害を拡大し、悪化させる可能性がある。

【0581】

本明細書に記載のように、OMS646(OMS721またはナルソプリマブとしても知られる)は、MASP-2に対して作られた治験用ヒトIgG4モノクローナル抗体である。本明細書においてさらに説明されるように、MASP-2を遮断することでレクチン経路活性化が阻害される。これにより、上記の補体媒介性細胞傷害サイクルが壊れる可能性がある。現在まで、OMS646は約230人の健常人、血栓性微小血管症(TMA)患者、および糸球体腎症(例えば、免疫グロブリンA[IgA]腎症)患者に投与されている。

【0582】

レクチン経路はコロナウイルス誘発性ARDSにおける補体活性化の開始および永続化において重要な役割を果たしている可能性がある。MASP-2阻害抗体OMS646などのMASP-2阻害物質を介してレクチン経路が阻害されると、コロナウイルス感染症に関連する、補体を介した肺傷害が対処される可能性がある。本明細書に記載のように、本発明者らは、線維性疾患の様々な動物モデルにおいて、補体系レクチン経路の重要な制御因子であるマンナン結合レクチン関連セリンプロテアーゼ-2(MASP-2)を阻害すると炎症および線維症が有意に低減することを発見した。例えば、本明細書中の実施例14および15に示した結果から、腎臓尿細管間質性炎症、尿細管細胞傷害、線維化促進性サイトカイン放出、および癒痕に対するMASP-2阻害の有益な効果が証明される。実施例17に記載のように野生型マウスのマウスタンパク質-過負荷タンパク尿モデルにおいて腎臓炎症および尿細管間質傷害を低減させるおよび/または予防する効力があるかどうかモノクローナルMASP-2阻害抗体を分析する際に、図36に示したように、MASP-2阻害抗体処置群のIL-6レベルは生理食塩水対照群($p=0.0269$)ならびにアイソタイプ対照群($p=0.0445$)と比較して有意に低減することが確かめられた。

【0583】

方法:

コロナウイルス(例えば、COVID-19-ウイルス)感染症に罹患している1人または複数人の患者における急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するOMS646の効力を測定する目的で、前記患者の処置におけるOMS646の使用を分析するために以下の研究を行う。

【0584】

前記方法は、SARS-CoV-2、MERS-CoV、またはSARS-CoVなどのコロナウイルスに感染した対象を特定することを伴う。コロナウイルスに感染した対象は、分子検査(例えば、rRT-PCR)もしくは血清学検査などの診断検査を行うことによって、またはこのような情

報を収めているデータベースを参照することによって確かめることができる。SARS-CoV-2、MERS-CoV、およびSARS-CoVの例示的な検査は疾病対策センターのウェブサイト(world-wide-web.cdc.gov/coronavirus/mers/lab/lab-testing.html#molecular)で見られる。

【0585】

対象は、COVID-19誘発性ARDSに罹患していてもよく、肺炎に罹患している対象など、ARDSを発症するリスクがあってもよい。肺炎は、ARDSを発症する最もよく見られる危険因子である(Sweeney R.M. and McAuley, D.F., Lancet vol 388:2416-30, 2016)。

【0586】

COVID-19誘発性ARDSは、ベルリン定義(JAMA 307:2526, 2012)に基づいて、SARS-CoV-2に感染した後に発症し、かつ、以下のARDS基準のうちの1つまたは複数を満たす臨床症候群と定義されている(Sweeney R.M. and McAuley, D.F., Lancet vol 388:2416-30, 2016)。

●酸素投与(mmHg):軽度($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 200~300);中等度($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 100~199);重度($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$)

●呼気終末陽圧(PEEP)(cmH_2O):5の最低PEEPが必要とされる

●胸部X線写真にある浸潤物:正面胸部X線写真またはCTに2つ以上の四半分が関与する両側浸潤物

●心不全:臨床状態を単独で説明するには不十分な左心室不全

●重症度:酸素投与基準に基づく

【0587】

処置投与

COVID-19に罹患しており、かつ上記で列挙した基準などの1つまたは複数の呼吸症状を経験している対象に静脈内注入によって4mg/kgのOMS646を投薬する。処置を週2回投与する。投薬頻度は療法に対する患者応答に左右される。患者が、4週間維持される臨床的改善を示したら、用量を4mg/kg週1回に減らすことがある。患者が4週間にわたって4mg/kg週1回を受けている間に処置応答を維持したら、処置を中断することがある。

【0588】

呼吸機能、例えば、1つまたは複数の呼吸症状、例えば、ARDSの1つまたは複数の基準に改善が観察された時に、処置に対するプラスの応答が確かめられる。

【0589】

前記に基づいて、一局面において、本発明は、コロナウイルスに感染した哺乳動物対象において急性呼吸窮迫症候群または疾患の他の症状発現を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害する(すなわち、レクチン経路活性化を阻害する)のに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一部の態様において、前記対象は1つまたは複数の呼吸症状に罹患しており、前記方法は、少なくとも1つの呼吸症状を改善する(すなわち、呼吸機能を改善する)のに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む。

【0590】

一態様において、前記方法は、SARS-CoV-2に感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、SARS-CoVに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、MERS-CoVに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記対象は、MASP-2阻害物質の投与前に、コロナウイルス(すなわち、SARS-CoV-2、SARS-CoV、またはMERS-CoV)を有すると特定されている。

【0591】

一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化を阻害する低分子である。

【0592】

一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2の発現阻害因子である。

10

20

30

40

50

【0593】

一態様において、MASP-2阻害抗体は、ヒトMASP-2に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片である。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその断片は、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される。一態様において、MASP-2阻害抗体は古典経路を実質的に阻害しない。一態様において、MASP-2阻害抗体は90%ヒト血清中でのC3b沈着を30 nM以下のIC₅₀で阻害する。

【0594】

一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0595】

一部の態様において、前記方法は、コロナウイルスに感染した対象に、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むMASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を、1mg/kg~10mg/kg(すなわち、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、または10mg/kg)の投与量で、少なくとも2週間(例えば、少なくとも3週間、または少なくとも4週間、または少なくとも5週間、または少なくとも6週間、または少なくとも7週間、または少なくとも8週間、または少なくとも9週間、または少なくとも10週間、または少なくとも11週間、または少なくとも12週間)の期間にわたって少なくとも週1回(例えば、少なくとも週2回または少なくとも週3回)投与する工程を含む。

20

【0596】

一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は約4mg/kg(すなわち、3.6mg/kg~4.4mg/kg)である。

【0597】

一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は、約300mg~約450mg(すなわち、約300mg~約400mg、または約350mg~約400mg)、例えば、約300mg、約305mg、約310mg、約315mg、約320mg、約325mg、約330mg、約335mg、約340mg、約345mg、約350mg、約355mg、約360mg、約365mg、約370mg、約375mg、約380mg、約385mg、約390mg、約395mg、約400mg、約405mg、約410mg、約415mg、約420mg、約425mg、約430mg、約435mg、約440mg、約445mg、または約450mg)の一定用量である。一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は約370mg(±10%)の一定用量である。

30

【0598】

一態様において、前記方法は、コロナウイルスに感染した対象に、約370mg(±10%)の一定の投与量のMASP-2阻害抗体を、少なくとも8週間の処置期間にわたって週2回、静脈内投与する工程を含む。

40

【0599】

一態様において、MASP-2阻害物質は対象に全身送達される。一態様において、MASP-2阻害物質は、経口投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与されるか、または吸入剤として投与される。

【0600】

実施例21

COVID-19患者におけるOMS646(ナルソプリマブ)処置

本実施例は、実施例20に記載の方法を用いたCOVID-19患者の処置におけるナルソプリマブ(OMS646)の使用について説明する。本実施例に記載の結果は、実施例20に記載のC

50

OVID-19患者におけるナルソプリマブの効力を裏付ける。

【0601】

背景/基本原理:

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(SARS-CoV-2; COVID-19)は、2019年12月に中国湖北省において臨床症候群として特定され、急速に広まった(Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet, 395: 1054-62, 2020)。2020年2月後半に、急成長している数のCOVID-19症例がイタリア北部ロンバルディア地方において診断された(Remuzzi A, Remuzzi G. COVID-19 and Italy: what next? The Lancet)。COVID-19の主な死因の1つは重度の呼吸機能低下である。COVID-19で死亡した患者の肺組織は、高濃度のSARS-CoV RNA(Wichmann D. et al., Ann Intern Med, 2020)と、以前に報告されたコロナウイルスSARS-CoV(SARS)およびMERS-CoV (MERS)において認められた同じ激しい炎症変化を示しており、COVID-19処置のために抗炎症戦略が評価されている(Xu Z. et al., Lancet Respir Med, 8(4)420-2, 2020; Horby P. et al., medRxiv 2020: 2020.06.22.20137273; Gritti G. et al., medRxiv 2020: 2020.04.01.20048561)。SARSおよびSARS-CoV-2感染症では血栓症も報告されている(Wichmann D. et al., Ann Intern Med 2020; Magro C. et al., Transl Res 2020; Ding Y. et al., J Pathol 200(3):28209, 2003)。SARSおよびMERSと同様に、COVID-19は命にかかわる急性呼吸窮迫症候群(ARDS)の原因となり得る(Guan W.J, Ni Z.Y, Hu Y, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N Engl J Med 2020 [Epub ahead of print])。

【0602】

COVID-19および滲出期のARDSの中心的な病理学的成分は内皮傷害および活性化である(Varga Z. et al., Lancet 2020; Ackermann M. et al., N Engl J Med 2020; Green S. J. et al., Microbes Infect 22(4-5):149-50, 2020; Teuwen L.A. et al., Nat Rev Immunol 20(7):389-91, 2020; Goshua G. et al., Lancet Haematol 2020; Thompson B.T. et al., N Engl J Med 377(19):1904-5, 2017)。ARDSにおける毛細血管透過性および肺浮腫の増大の根本的な原因である内皮傷害は微小血管アンギオパチー(microvascular angiopathy)と血栓症の原因ともなり得る。内皮傷害は微小血管アンギオパチーと血栓症の原因ともなり得る。内皮活性化は局所炎症環境をさらに強化する。重要なことに、ヒトインビトロ試験および動物試験において証明されたように、内皮傷害は内皮細胞表面で補体レクチン経路を特異的に活性化する(Collard CD, Vakeva A, Morrissey MA, et al. Complement Activation after Oxidative Stress: Role of the Lectin Complement Pathway. Am J Pathol 2000;156(5):1549-1556)。

【0603】

実施例20に記載のように、MASP-2に結合し、かつレクチン経路活性化を遮断する高親和性モノクローナル抗体であるOMS646(ナルソプリマブとしても知られる)はCOVID-19患者を処置する効果があると予想された。実施例20での説明と一致して、MASP-2は動物モデルにおけるコロナウイルス感染症の肺傷害と直接関連付けられてきた。Gao et al., medRxiv 3/30/2020を参照されたい。MASP-2はまた凝固カスケードと接触系にも直接作用して、プロトロンビンをトロンビンに切断し、フィブリン凝固を形成する。ナルソプリマブはレクチン経路活性化を阻害するだけでなく、微小血管傷害に関連する血栓形成ならびにMASP-2によって媒介される、カリクレインおよび第XII因子の活性化も遮断する。

【0604】

COVID-19処置のために疾患特異的療法は有効であると示されていなかった。イタリアでの疾患の重い負担を考慮して、本発明者らは、ベルガモにある教皇ヨハネ23世病院(Papa Giovanni XXIII Hospital)において重度のCOVID-19感染症とARDSにかかっている患者をコンパッショネート・ユースプログラムの下でナルソプリマブによって処置した。COVID-19患者を処置するためにレクチン経路阻害因子が用いられたのは、これが初めてのことである。ここで、本発明者らは、この初めての臨床経験を報告する。

【0605】

方法

研究の監督

本実施例に記載の研究はイタリア、ベルガモにあるAzienda Socio-Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIIIで行われ、施設内倫理委員会およびイタリア医薬品庁(Agenzia Italiana del Farmaco)によって承認された。血液数、LDH、C反応性タンパク質(CRP)を含む臨床検査値が標準的な診療に従って収集された。ナルソプリマブ(OMS646)で処置した患者全員がインフォームドコンセントに同意した。本研究は、さらに以下で説明するように実施例20に記載の方法を用いて実施された。

【0606】

組織病理学

標準的なヘマトキシリン・エオシン染色(H&E)と免疫組織化学を、COVID-19患者の病理学的剖検から入手したホルマリン固定パラフィン包埋試料に対して行った。2人の病理学者がH&E染色切片をよく調べた。診断を確定するために、ヒト内皮細胞マーカー(CD34)の免疫組織化学的分析を、Bond Polymer Refine Detectionと使用するために特別に最適化された、すぐに使える製品であるBond Ready-to-Use Antibody CD34(Clone QBEnd/10, Leica Biosystems, Germany)を用いて行った。このアッセイは、製造業者によって推奨されるように(Bond Epitope Retrieval solution 2を20分間)、熱に基づく抗原賦活化法を用いる自動染色プラットフォーム(Leica Bond-3, Leica, Germany)によって行われた。肺胞の毛細血管内にある内皮細胞質染色は陽性結果を示した。

【0607】

循環内皮細胞(CEC)の特定および数

EDTAを用いて収集した末梢血試料に対して行ったフローサイトメトリー分析によってCECを分析した。赤血球溶解工程後に、試料を、以下のモノクローナル抗体:抗CD45 V500(clone 2D1, Becton Dickinson, San Jose, CA)、抗CD34 PerCP-CY5.5(クローン8G12, Becton Dickinson, San Jose, CA)、抗CD146 PE(クローンP1H12BD, Pharmingen, CA)によって室温で20分間標識した。完全な白血球形態がある少なくとも 1×10^6 の事象/試料をフローサイトメトリー(FACSLytic, BD Biosciences)によって取得した。作業員によって引き起こされるばらつきを減らすために、この研究の試料を全て、常に、同じ臨床検査技師が分析した。CEC/mlの数値は、以前に報告されたように(Almici C. et al., Bone Marrow Transplant 52:1637-42, 2017)、参照集団としてリンパ球サブセットを用いるデュアルプラットフォーム計数法によって計算した。

【0608】

血清中サイトカインレベル

1つの血清試料中で、インターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-10(IL-10)、腫瘍壊死因子(TNF)、およびインターロイキン-12p70(IL-12p70)のレベルをフローサイトメトリー(BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, Becton Dickinson, San Jose, CA)によって分析した。

【0609】

患者

ナルソプリマブ処置患者全員が2020年3月11日から3月23日の間に入院した。この13日の期間にわたって、病棟に入院したCOVID-19患者の1日の総数は405~542人であった。この同じ期間に、平均140のHelmet-持続陽圧気道圧(CPAP)装置を毎日利用した。中央値82人の患者(範囲66~91人)をICUで毎日管理した。これらのICU患者のうち、61人が2020年3月11日にARDSのベルリン基準($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 比 <100 が重度ARDSである; $100 \sim 200$ が中等度である; >200 かつ ≤ 300 が軽度である)(Ferguson N.D et al., Intensive Care Med 38(10): 1573-82, 2012; Fagiuoli S. et al., N Engl J Med 382(21):e71, 2020)を満たし、2020年3月23日に80人が満たした。

【0610】

この研究において処置した患者全員に、定量的逆転写酵素-ポリメラーゼ連鎖反応アッセ

10

20

30

40

50

イによって診断された検査確定SARS-CoV-2感染症があった。鼻試料および呼吸試料に由来するSARS-CoV-2ゲノムが、GeneFinder(商標)Covid-19 Plus RealAmp Kit (ELITech Group, 92800 Puteaux, France)およびAllplex(商標)2019-nCoV Assay (Seegene Inc, Arrow Diagnostics S.r.l., Italy)を含む様々な分子的方法によって検出された。臨床試料からウイルスRNAを精製した後に、世界保健機関プロトコル(Corman V.M. et al., Euro Surveill 25, 2020)に従ってRdRp、E、およびNウイルス遺伝子がリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応によって検出された。ナルソプリマブ処置の適格基準を満たすために、COVID-19確定患者は成人(>18歳)しており、ベルリン基準に従ってARDSがあり(Ferguson ND, et al. Intensive Care 38(10):1573-1582, 2012; Sweeney R.M. and McAuley, D.F., Lancet vol 388:2416-30, 2016; JAMA 307:2526, 2012も参照されたい)、呼吸補助のための施設ガイドラインに従って持続陽圧気道圧(CPAP)による非侵襲的機械的換気を必要としていることが求められた。経験的に、登録患者全員にアジスロマイシン500mgが1日1回与えられたのに対して、抗菌療法を必要とする活発な全身細菌感染症または真菌感染症がある患者はナルソプリマブ処置の適格基準を満たさなかった。

【0611】

ナルソプリマブ処置、支持療法、およびアウトカム評価

実施例20に記載のように、ナルソプリマブ(OMS646)は、免疫グロブリン γ 4(IgG4)重鎖および入軽鎖定常領域で構成される完全ヒトモノクローナル抗体である。ナルソプリマブ(OMS646)はnM以下の親和性でMASP-2に結合し、MASP-2を阻害する。実施例20に記載の方法に従って、6人のCOVID-19感染患者にナルソプリマブを4mg/kgの投与量で、2~4週間にわたって週2回、最大で6~8回投薬して(2週間、3週間、または4週間)静脈内投与した。研究開始時に投薬期間は2週間に設定されたが、2週間で処置が中止した後にナルソプリマブで処置した最初の患者が臨床マーカーおよび臨床検査マーカーの再発を経験した時には経験的に延長され、その後にもう1週間の投薬によって消散された。患者全員に研究時に病院のガイドラインに従って予防的エノキサパリン(Clexane, Sanofi Aventis)4,000IU/0.4mL、アジスロマイシン(Zitromax, Pfizer SpA, Italy)500mg 1日1回、ヒドロキシクロロキン(Plaquenil, Sanofi Aventis)200mg 1日2回、ならびにダルナビルおよびコビシスタット(Rezolsta, Janssen-Cilag S.p.A., Italy)800/150mg 1日1回を含む標準的な支持的治療を与えた。3月27日から最新の施設ガイドラインに従って、病院にいるCOVID-19患者全員にメチルプレドニゾロン1mg/kgを与えた。従って、ナルソプリマブ処置開始後に、6人のナルソプリマブ処置患者うち合計5人に全身コルチコステロイド(メチルプレドニゾロン1mg/kg)も与えた。施設治療アルゴリズムに従って全呼吸補助を与えた。これらの6人の患者の臨床的特徴を以下の表13にまとめた。

【0612】

標準的な診療に従ってナルソプリマブ処置患者全員に対して、CEC数およびサイトカインレベルの他に、血液数、LDH、およびC反応性タンパク質(CRP)レベルを含む臨床測定値および臨床検査測定値を収集した。それぞれのナルソプリマブ投薬の前に、次いで週2回、日常的な血液検査を収集した。呼吸機能を毎日評価した。典型的な間質性肺炎を記録するために、临床上必要であれば肺塞栓症を記録するために、入院時に患者全員に対して胸部コンピュータ断層撮影(CT)スキャンを行った。临床上の必要性に従って処置の経過中に胸部X線撮影を行った。

【0613】

統計解析

人口統計学データおよび臨床患者データを、カテゴリー変数のパーセントによる頻度と、中央値と連続した変数の範囲として示した。正常患者とCOVID-19患者との間のCEC値の差をマンホイットニーU検定によって評価した。ナルソプリマブ処置中の適切な時点でのCECおよびサイトカインレベルの差を検定するために反復測定分析を行った。ノンパラメトリックフリードマン検定を使用し、ペアワイズ比較を、対応ウィルコクソン符号順位検定(paired Wilcoxon signed-rank test)を用いて行った。処置中のLDHおよびCRPレ

10

20

30

40

50

ベルの減少傾向を、観察と時間との間のノンパラメトリックスピアマン検定によって評価した。5%で有意であると設定した。分析はRソフトウェア(バージョン3.6.2)を用いて行った。

【0614】

表13は、6人のナルソプリマブ処置患者の臨床的特徴をまとめたものである。

【0615】

(表13) ナルソプリマブで処置したCOVID-19患者の人口統計

臨床的特徴	全員の患者 (N=6)
年齢 - 歳、中央値(範囲)	56.5 歳 (47-63)
性別 - 人数(%)	
....女性	1 (17%)
....男性	5 (83%)
体重 - キログラム、中央値(範囲)	86 (82-100)
BMI - キログラム/m ² 、中央値(範囲)	28 (26.8-32)
発病から入院までの期間 - 日数、中央値(範囲)	8.5 (3-12)
入院時の発熱 ^{##} - 人数(%)	6 (100%)
他の症状 - 人数(%)	
.....咳	1 (17%)
.....食欲不振	2 (33%)
.....疲労	4 (67%)
.....息切れ	5 (83%)
.....悪心または嘔吐	1 (17%)
.....下痢	2 (33%)
.....頭痛	1 (17%)
併発障害 - 人数(%)	
.....糖尿病	1 (17%) [#]
.....高血圧	1 (17%)
.....脂質異常症	2 (33%)
.....肥満 (BMI) ≥30 kg/m ²	2 (33%)
.....過体重 ≥25 kg/m ²	4 (66%)
登録時のARDS重症度 - 人数(%)	
.....軽度	3 (50%)
.....中等度	2 (33%)
.....重度	1 (17%)

10

20

30

40

50

入院から処置開始までの期間 - 日数、中央値(範囲)	2 日 (1-4)
CPAP留置から処置開始までの期間 - 人数(%)	
.....0-24 時間	4 (67%)
.....24-48 時間	2 (33%)
放射線学的所見	
胸部放射線学における異常 - 人数(%)	
.....両側間質性異常	6 (100%)
臨床検査所見	
PaO ₂ :FiO ₂ 比 - 中央値(範囲)	175 (57.5-288)
循環内皮細胞の数 - 中央値(範囲)	334 (0-9315)
白血球の数 -- 1mm ³ あたりの中央値(範囲)	8335 (6420-10,120)
.....>10,000 /mm ³ - 人数(%)	2 (33%)
.....<4000 /mm ³ - 人数(%)	0 (0)
リンパ球の数 - 1mm ³ あたりの中央値(範囲)	875 (410-1290)
血小板の数×10 ³ 1mm ³ あたりの中央値(範囲)	282 (199-390)
ヘモグロビン - g/dL、中央値(範囲)	13.4 (13.2-14.1)
他の所見の分布(臨床検査参照範囲)	
C反応性タンパク質 (0.0-1.0 mg/dL)	14 (9.5-31.3)
乳酸デヒドロゲナーゼ (120/246 U/L)	518.5 (238-841)
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (13-40 U/L)	78.5 (51-141)
アラニンアミノトランスフェラーゼ (7-40 U/L)	73 (37-183)
クレアチニン (0.3-1.3 mg/dL)	0.85 (0.38-1.33)
D-ダイマー* (<500 ng/mL)	1250.5 (943-1454)
ハプトグロビン (36-195 mg/dL)	368.5 (270-561)
補体 C3** (79-152 mg/dL)	101 (60-126)
補体 C4** (16-38 mg/dL)	21 (2-37)
併用処置	
抗レトロウイルス療法 - 人数(%)	
.....ダルナビル+コビシスタット	6 (100%)
全身ステロイド療法 - 人数(%)	5 (83%)
.....ナルソプリマブの1回目の投薬の後	2 (33%)

.....ナルソプリマブの2回目の投薬の後	1 (17%)
.....ナルソプリマブの3回目の投薬の後	1 (17%)
.....ナルソプリマブの4回目の投薬の後	1 (17%)

ARDS:急性呼吸窮迫症候群;ICU:集中治療室;CPAP:持続陽圧気道圧。

*:4人の患者のデータしか入手できなかった。

** :5人の患者のデータしか入手できなかった。

10

20

30

40

50

#数人の患者は初め糖尿病があると分類されたが、後になって過体重であるが糖尿病ではないと再分類された。

##体温>37.5℃と規定された。

【0616】

結果:

COVID-19患者における血栓症および内皮細胞損傷

ベルガモ地域でCOVID-19大流行が劇的に始まった直後の3月13日から3月16日にかけて、病院の病理学部門は20人の死亡患者からなる初回群において剖検を行い始めた。これらの患者が死亡する前に全員が、最新の研究においてナルソプリマブで処置した患者と同様にCPAPまたは侵襲的機械的換気による高度な呼吸補助を必要とした。往々にして死を招くことがある肺血栓塞栓症の臨床像と一致して、多くの患者の肺と肝臓が、下記で説明するように血栓事象に広範囲にわたって冒されていることが見出された。

【0617】

破壊的炎症プロセスに冒されていない領域も含めて、COVID-19患者における肺の中隔血管において病理組織学的レベルで血栓プロセスが動脈に關与することは明らかであった。図41A～Dに示したように、CD34(内皮マーカー)に対する免疫組織化学染色から、細胞収縮がある重度の内皮損傷、変性した水腫細胞質、および内皮表面へのリンパ球付着が証明された。

【0618】

図41A～Dは、COVID-19患者から採取した組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像を示す。これらの患者に血管損傷があることが示される。

【0619】

図41Aは、COVID-19患者の肺に由来する中隔血管の組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像を示す。図41Aに示したように、肺の中隔血管において血栓プロセスが動脈に關与している。動脈内腔にある初期の血栓組織化に注目する(H&E, 400x)。

【0620】

図41Bは、COVID-19患者肺に由来する中隔血管の組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像を示す。図41Bに示したように、図41Aに示したものと同様の病理学的特徴が、破壊的炎症プロセスに冒されていない肺領域にあるほとんどの中隔血管において広範囲にわたって目に留まった(H&E, 400x)。

【0621】

図41Cは、COVID-19患者に由来する中間直径肺中隔血管の組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像を示す。図41Cに示したように、完全な内腔血栓症; CD34(内皮マーカー)に対する茶色の免疫組織化学的染色がある中間直径肺中隔血管(丸で囲った)から、細胞収縮がある重度の内皮損傷、変性した水腫細胞質(右側にある矢印を参照されたい)、および内皮表面へのリンパ球付着(左側にある矢印を参照されたい)が証明された。

【0622】

図41Dは、COVID-19患者に由来する肝実質の組織切片の免疫組織化学分析の代表的な画像を示す。図41Dに示したように、肝実質において大型血管の部分的な内腔血栓症を伴う血管変化も観察された(H&E, 400x)。

【0623】

循環内皮細胞(CEC)の特定および数

循環内皮細胞(CEC)は内皮細胞機能不全のバイオマーカーとして用いられてきており(Farinacci M et al., Res Pract Thromb Haemost 3:49-58, 2019を参照されたい)、敗血症関連ARDS患者のCEC数はARDSのない敗血症患者と比較して多いことが示されている(Moussa M et al., Intensive Care Med 41(2):231-8, 2015)。免疫を介した血管内皮細胞攻撃によって血管壁から血管内皮細胞が剥離し、血流に動員される急性移植片対宿主病(GvHD)の状況での結果も発表されている(例えば、Almici et al., Bone Marrow Transplant 52:1637-1642, 2017を参照されたい)。

【0624】

10

20

30

40

50

急性移植片対宿主病(GvHD)におけるこれらの初期の観察と発表された知見に基づいて、本発明者らは、ナルソプリマブを用いて研究を開始する前に本発明者らの病院において無作為に選択された分子的に確定されたCOVID-19患者からなる非研究コホートにおいてCEC数の測定に取りかかった。図42Aに示したように、33人のCOVID-19患者からなる、この非研究コホートにおいて、本発明者らは末梢血のCEC/mL(中央値110、範囲38~877)が健常対照(中央値7、範囲0~37($P=0.0004$))と比較して有意に増加したことを発見した。

【0625】

この研究では、COVID-19患者においてナルソプリマブ処置前と処置後にCEC/mlの数値を測定した。上記のように、興味深いことに、正常健常対照(中央値7、範囲0~37)と比較した時に、独立したCOVID-19患者コホートにおける末梢血のCEC/mlの数値(中央値110、範囲38~877)は有意に増加したことが確かめられた(図42Aを参照されたい)。ナルソプリマブ処置のために選択された6人の患者でもCEC/mlの数値の増加(中央値334、範囲0~9315)が確認された。図42Bに示したように、ナルソプリマブ処置後、CEC/mlの数値の迅速な減少が最初の2回の投薬の後に記録され(中央値92CEC/mL、範囲18~460)、4回目の投薬の後に確認された(中央値73、範囲0~593)。CEC/mlの数値は6回目のナルソプリマブ投薬の後も減少することがさらに確認された(中央値59、範囲15~276)(図42Bにデータを示さず)。

【0626】

図42Aは、この研究の一部でないCOVID-19患者($n=33$)におけるCEC/ml数と比較した時の正常健常対照($n=6$)のCEC/ml数を図示する。図42Aに示したように、正常健常対照と比較した時に、この独立したCOVID-19患者コホートにおいてCEC/ml数は有意に増加することが確かめられた。

【0627】

図42Bは、ナルソプリマブ処置前(ベースライン)とナルソプリマブ処置後に、この研究のために選択された6人の患者におけるCEC/ml数を図示する。箱は第1四分位数から第3四分位数までの値を表し、横線は中央値を示し、ひげは最小値と最大値を示している。図42Bに示したように、ナルソプリマブ処置のために選択された6人の患者でもCEC/mlの増加が確認され、CEC/mlはナルソプリマブ処置後に急速に減少した。

【0628】

本発明者らの病院は、本研究を開始して16日後にCOVID-19患者に対して標準的なステロイド使用を実施するガイドラインを定めたので、6人の患者のうち5人に、ナルソプリマブを開始して2~10日後から支持療法の一環としてステロイド処置を与えた。この理由から、ステロイドしか与えていない4人の患者(全員女性、62~90歳の範囲で年齢の中央値83歳、3人がマスクによる酸素を必要とし、1人がCPAPを受けていた)からなる別の群でもCEC/mlの数値を評価した。これらの4人の患者では、48時間後に評価したCEC数はステロイド投与の影響を受けないことが見出された($p=0.38$)。ステロイドしか与えなかった2人の追加患者において、ベースライン時およびステロイドを含む支持的処置の4週間後にCEC数を評価した。臨床経過が進行して悪化した第1の患者ではCEC数は相変わらず影響を受けなかった(271/mL対247/mL)。これに対して、第2の患者では、臨床的改善と同時にCECが減少した(165対65/mL)。

【0629】

6人のナルソプリマブ処置患者において、ベースライン時にCEC/mLは著しく増加していた(中央値334、範囲0~9315)。ナルソプリマブを用いると、2回目(中央値92CEC/mL、範囲18~460)、4回目(中央値72.5、範囲0~593)、および6回目(中央値59、範囲15~276)投薬の処置の後にCEC数は急速に減少した($p=0.01$)。下記でさらに説明するように、IL-6、IL-8、CRP、およびLDHの血清濃度もナルソプリマブ処置によって著しく減少した。

【0630】

C反応性タンパク質(CRP)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、およびサイトカインの血清レベ

10

20

30

40

50

ル

図43は、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、6人のCOVID-19患者におけるC反応性タンパク質(CRP)の血清レベル(中央値;四分位数間範囲(IQR))を図示する。表13に示したように、健常対象におけるCRPの血清レベルは(0.0~1.0mg/dl)の範囲にあり、処置開始前の6人のCOVID-19患者におけるCRPの中央値レベルは14mg/dlであった。図43に示したように、2週間のナルソプリマブ処置後に6人のCOVID-19患者におけるCRPのレベルは、健常対象の正常範囲内にある、ほぼ0.0mg/dlの中央値レベルに低下した。

【0631】

図44は、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、6人のCOVID-19患者における乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の血清レベル(中央値;IQR)を図示する。表13に示したように、健常対象におけるLDHの血清レベルは(120~246U/l)の範囲にあり、処置開始前の6人のCOVID-19患者におけるLDHの中央値レベルは518U/lであった。図44に示したように、2週間のナルソプリマブ処置後にCOVID-19患者におけるLDHのレベルは、健常対象の正常範囲内にある約200U/lの中央値レベルに低下した。

【0632】

図45は、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、6人のCOVID-19患者におけるインターロイキン6(IL-6)の血清レベルpg/mL(中央値;四分位数間範囲(IQR))を図示する。図45に示したように、処置前ベースライン時のCOVID-19患者におけるIL-6の中央値レベルは約180pg/mLであった。ナルソプリマブを1回投薬した後(2回目の投薬の前)、COVID-19患者におけるIL-6の中央値レベルは約40pg/mLに低下し、ナルソプリマブを2回投薬した後(3回目の投薬の前)、COVID-19患者におけるIL-6の中央値レベルは約10pg/mLにさらに低下した。

【0633】

図46は、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、6人のCOVID-19患者におけるインターロイキン8(IL-8)の血清レベルpg/mL(中央値;四分位数間範囲(IQR))を図示する。1日目、4日目、7日目、11日目、および14日目にナルソプリマブで処置した。図46に示したように、処置前ベースライン時のCOVID-19患者におけるIL-8の中央値レベルは約30pg/mLであった。ナルソプリマブを1回投薬した後(2回目の投薬の前)、COVID-19患者におけるIL-8の中央値レベルは約20pg/mLに低下し、ナルソプリマブを2回投薬した後(3回目の投薬の前)、COVID-19患者におけるIL-8の中央値レベルは約15pg/mLにさらに低下した。

【0634】

ナルソプリマブ処置後の臨床アウトカム

ナルソプリマブ処置のために選択された6人の患者の臨床的特徴を表13にまとめた。年齢の中央値は56.5歳であり、患者の大半が男性であった(83%)。患者全員が、 ≥ 25 の肥満度指数(BMI)に基づいて過体重または ≥ 30 の肥満度指数(BMI)に基づいて肥満であった。登録時に、患者全員に、CPAPを必要とする肺炎/ARDSがあり、2人の患者は登録直後に急速に悪化しており、挿管を必要としていた。ナルソプリマブ処置は非侵襲的換気とCPAPの開始から48時間以内に開始した。ナルソプリマブで処置した、これらの患者において観察された臨床アウトカムの概要を以下の表14に示した。表14は、処置後の患者の状態を反映するように更新されている。患者にナルソプリマブを週2回投与した。処置後に4人の患者(67%)の呼吸窮迫が改善し、中央値3回のナルソプリマブ投薬(範囲2~3回)後に換気補助をCPAPから高流量酸素に減らした。次いで、3人の患者では酸素補助を減らし、退院まで止めた。造影CTスキャンによって記録されたように、患者#4は処置開始後4日目に広範囲の肺塞栓症を発症した。この理由から、進行中のナルソプリマブの他に低分子量ヘパリンを加えた。7日後に臨床像およびCTスキャン画像の迅速な改善が記録された。最後の2人の患者(#5および#6)では登録直後に重度ARDSの迅速な、かつ進行性の悪化が記録された。症例#5では、重度ARDS(PiO_2/FiO_2 値57)により4日目に患者に挿管がなされた。それにもかかわらず、その後の臨床アウトカムは急速に良好になり、3日後に患者はICU

10

20

30

40

50

から出た。2日間のCPAPの後に、彼は今のところ低流量酸素補助によって安定している。症例#6では登録の4日後に重度ARDSが発症し、患者は挿管を必要とした。先の症例と同様に彼女はCPAPに戻され、その後に迅速な臨床的改善により高流量酸素に戻され、後ほど退院した。

【0635】

この研究では処置関連有害事象は報告されなかった。

【0636】

(表14) 現在までの患者アウトカム

患者	ナルソプリマブの投薬	現在までのアウトカム
1	6回の投薬	処置開始の1週間以内にCPAP中止、18日目に退院、ステロイドなし
2	5回の投薬	処置開始の1週間以内にCPAP中止、10日目にステロイド開始、16日目に退院
3	5回の投薬 *更新:7回の投薬	入院前に急速に進行する呼吸窮迫があり、1週間超自宅にいた;処置開始後11日以内にCPAP中止、10日目にステロイド開始、22日目に退院*
4	今までに4回の投薬。 投薬は継続している ** 更新: 8回の投薬	ナルソプリマブ処置以前から、複数の肺塞栓を併発する経過があることが確かめられた;1日目にステロイド開始、4日目に肺塞栓症の発症、7日目までに改善とCTスキャンの改善、12日以内にCPAP中止、ナルソプリマブによって安定化、今もなお改善しており、投薬は継続している。 **更新:26日目に鼻カニューレ、28日目に室内空気、33日目に退院
5	今までに3回の投薬。 投薬は継続している ***更新: 8回の投薬	3日目にステロイド開始、4日目に挿管を必要としICUに移動する前にナルソプリマブを2回しか投薬できなかった;ナルソプリマブによって安定化し、改善し、7日目に抜管され、ステップダウンユニットに移動してCPAPに戻り、9日目にCPAPを中止した。今もなお改善しており、投薬は継続している。***更新:25日目に鼻カニューレ、27日目に室内空気、33日目に退院

10

20

30

40

50

6	今までに3回の投薬。 投薬は継続している。 ****更新: 8回の投薬	1日目にステロイド開始、3日目に挿管を必要としICUに移動する前にナルソプリマブを1回しか投薬することができなかった。ナルソプリマブによって安定化し、挿管されたままである;改善しており、投薬は継続している。 ****更新:20日目に抜管され、CPAPに移動し、82日目にCPAPを中止し、鼻カニューレに移った。85日目に室内空気、90日目に退院。

10

*、**、***、**** 下記で説明した患者3～6に関する最新情報を参照されたい。

【0637】

考察

この研究の知見から、内皮傷害および血栓症はCOVID-19関連肺傷害の病態生理の中心にあることが分かる。重度の呼吸不全がある患者は、CRP、LDH、IL-6、およびIL-8のレベルの著しい上昇だけでなく、循環内皮細胞(CEC)の著しい上昇も示した。この新規の観察は、COVID-19患者において著しい内皮傷害と血栓症を示した肺と肝臓において検出された病理組織学的所見と一致する。多臓器微小血管の病理組織学的変化、特に、微小血管血栓の形成はHSC-TMAのものと似ている。これから、COVID-19関連肺傷害における内皮傷害の役割がさらに裏付けられる。内皮傷害は、ARDSに存在する補体活性化の病態生理の中心的な成分であることが知られている(Thompson BT, et al., N Engl J Med, 377(6)562-572, 2017)。補体活性化はまたSARSおよびMERSのモデルでも報告されており、内皮傷害を特徴とする他の状態において重要である。ARDSにおける毛細血管透過性の増大と肺浮腫の根底にある原因である内皮傷害は微小血管アンジオパチーと血栓症も引き起こす可能性がある。

20

【0638】

補体系は免疫系の重要な部分である。3つの経路:古典経路、レクチン経路、および代替経路が別個の開始事象に応答して補体を活性化する。補体レクチン経路は自然免疫応答の一部である。パターン認識システムであるレクチン経路の活性化はMASP酵素ファミリーのメンバー(MASP-1、MASP-2、およびMASP-3)によって開始される。これらのプロテアーゼは、血中でレクチン、特に、マンナン結合レクチン(MBL)、フィコリン、およびコレクチンと複合体を形成するプロ酵素として合成される。これらのレクチンは、病原性の微生物または損傷した宿主細胞の表面に見出される炭水化物パターンを認識し、これに結合して、MASPを、これらの作用部位に標的化し、活性化させる。このようにしてレクチン経路活性化は、傷ついた内皮細胞の表面に生じる。実施例20に記載のように、レクチン経路活性化はCOVID-19関連内皮傷害の状況で生じると予想された。

30

【0639】

MASP-2はレクチン経路の活性化を担う重要な酵素である。MASP-2は活性化されると、補体成分2(C2)およびC4を切断し、C3およびC5を活性化する一連の酵素段階を開始して、アナフィラトキシンC3aおよびC5aが生じ、C5b-9(膜侵襲複合体)が形成される。前臨床的にC3aおよびC5aは、内皮傷害および炎症促進性変化、白血球動員、ならびに内皮アポトーシスと関連する内皮活性化を誘導した。膜結合C5b-9はまた細胞溶解を引き起こすこともある。溶解を引き起こすのに十分でなくても、C5b-9は、血栓形成促進性因子の分泌、血小板活性化、接着分子のアップレギュレーション、および内皮における機能障害性の形態学的変化を誘導する、さらなる細胞傷害を引き起こす(Kerr H, Richards A. Immunobiology 217(2)195-203, 2012)。これらの補体媒介性活性は内皮傷害および機能不全を増幅して、臨床状態を引き起こすか、または悪化することがある。Gao et al. m

40

50

edRxiv 2020による最近の刊行物では、動物モデルでのSARSおよびMERSの病態生理におけるMASP-2およびレクチン経路の中心的な関与を報告している。しかしながら、Gaoらに記載のLPS誘発性肺傷害のマウスモデル(ARDSモデルでなく、むしろ敗血症モデルである)に関して、マウスには最初にAd-SARS Nが注射され、次いで6日目に200 μ g/kg 抗MASP-2抗体が注射され、30分後にLPSによって誘導がなされ、マウス生存が測定された。Gaoらに記載の、この動物モデルにおいて用いられた抗MASP-2抗体(200 μ g/kg)(すなわち、HyCult Biotech(HBT)抗MASP-2抗体クローン8B5またはクローン6G12)はC3b阻害活性があるかどうかアッセイされたことにもさらに注目する。mAb 8B5も6G12も正常なヒト血清中でもマウス血清中でもC3b沈着を阻害できなかったのに対して、正の対照抗体OMS646は同じアッセイで正常なヒト血清中およびマウス血清中の両方でC3b沈着を阻害できたことが確かめられた。

10

【0640】

レクチン経路活性化を担う重要な酵素であるMASP-2はCOVID-19 Nタンパク質に結合し、COVID-19 Nタンパク質によって活性化され(Gao et al., medRxiv 2020, 2020.03.29.20041962)、重度のCOVID-19がある患者の肺組織の微小血管系において見出されている(Magro C., et al., Transl Res 2020; doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.007)。活性化されたMASP-2は、アナフィラトキシンC3aおよびC5aを産生し、炎症誘発応答を誘導し、細胞溶解と細胞死を引き起こすことができる膜侵襲複合体C5b-9を形成する一連の酵素段階を開始する(Dobo et al., Front Immunol 9:1851, 2018)。MASP-2はまたC4バイパスを介してC3を直接切断することもできる(Yaseen S. et al., FASEB J 31(5)2210-9, 2017)。重要なことに、MASP-2はレクチン経路の上流に位置し、そのため、MASP-2を阻害しても、古典経路(すなわち、C1r/C1sによって推進される、C3およびC5コンバーターゼの形成)の溶解部門は妨害されず、感染症と戦うのに必要な適応免疫応答が阻止されない(Schwaebble et al., Proc Natl Acad Sci 108(18)7523-8, 2011)。

20

【0641】

補体での役割に加えて、MASP-2は凝固カスケードと接触系に直接作用して、プロトロンビンをトロンビンに切断し、フィブリン凝固を形成する(Gulla K.C., Immunology 129(4):482-95, 2010; Krarup A. et al., PLoS One 2(7):e623, 2007)。ナルソプリマブはレクチン経路活性化を阻害するだけでなく、本明細書に参照により組み入れられるWO2019246367に記載のように、微小血管傷害関連血栓形成とカリクレインおよび第XII因子のMASP-2媒介性活性化も遮断する。これらの活性は微小血管血栓症を阻害することによって有益な効果に寄与することができるかもしれない。これは、ナルソプリマブ処置患者、特に、広範囲の肺血栓症に罹患した患者において重要な治療上の役割を果たしたかもしれない。ナルソプリマブは出血時間を延長せず、プロトロンビン時間にも活性化部分トロンボプラスチン時間にも影響を及ぼさず、ナルソプリマブ処置患者では出血は観察されなかった。どの特定の理論に拘束されるつもりはないが、ナルソプリマブは(第XII因子活性化と関連する)内皮損傷に起因する凝固を遮断する可能性があるが、細胞外マトリックスに関連する(第VII因子によって引き起こされる)凝固を遮断しないと考えられる。

30

【0642】

レクチン経路阻害はCOVID-19治療法として以前に調べられたことがない。この研究の患者全員にCOVID-19関連呼吸不全があった。最新の研究では、ナルソプリマブによるMASP-2およびレクチン経路の阻害は、この薬物で処置したCOVID-19患者全員における臨床的改善および生存と関連付けられた。MASP-2阻害因子ナルソプリマブで処置した後に6人患者全員が回復し、病院から退院することができた。MASP-2およびレクチン経路活性化を阻害するナルソプリマブで処置した後にCOVID-19関連呼吸不全に罹患している患者において観察された臨床的改善から、COVID-19病態生理におけるレクチン経路の重要な役割がさらに裏付けられる。本実施例に記載のように、6人のCOVID-19患者全員がナルソプリマブ処置後に臨床的改善を示した。いずれの場合にも、COVID-19肺傷害はナルソプリマブ処置前にARDSに進行しており、患者全員が、入院時に各々について開始した非侵襲的機械的換気を受けていた。1回目のナルソプリマブ投薬の後に2人の患者が引き続き

40

50

悪化し、侵襲的機械的換気を必要とした。その後で、これらの患者はどちらも、ナルソプリマブ処置を継続することで機械的換気を完全に止めることができた。2人の患者(一方は挿管され、他方はCPAPを受けていた)は広範囲の両側肺血栓症を経験し、両患者ともナルソプリマブによって完全に回復し、おそらく、この薬物の抗凝固効果から利益を得た。臨床検査マーカー(CEC、IL-6、IL-8、CRP、およびLDH)の時間パターンは、観察された臨床的改善と一致し、ナルソプリマブの提唱された作用機序と一致した。特に、CEC数は、この疾患における内皮損傷および処置応答を評価するための信頼性の高いツールであるように思われる。特に、IL-6レベルおよびIL-8レベルの改善もナルソプリマブ処置と時間的に相関した。このことから、レクチン経路活性化はCOVID-19におけるサイトカインストーム上昇に先行する可能性があり、レクチン経路阻害は、COVID-19感染患者で説明されるサイトカインストームに潜在的に有益に影響を及ぼすことが示唆される(Xiong Y, et al., Emerg Microbes Infect 9(1):761-770, 2020)。当初、2週間のナルソプリマブ投薬が計画されたが、投薬が最初に中断された患者#1のCEC上昇後に3~4週間に延長された。3~4週間のナルソプリマブ処置後に、ぶり返しの肺徴候と症状は観察されなかった。本発明者らは、ナルソプリマブ処置患者においてウイルス防御が損なわれた証拠を認めず、ナルソプリマブ関連有害事象は観察されなかった。注目すべきことに、ナルソプリマブは補体の代替経路も古典的経路も阻害せず、適応免疫応答も抗原-抗体複合体化も妨害しない。ナルソプリマブ関連感染リスクの証拠は臨床試験において観察されなかった。レクチン経路活性化を阻害することに加えて、ナルソプリマブは、プロトロンビンからトロンビンへのMASP-2媒介性の切断(Krarpur A, et al., PLoS One ;2(7)e623, 2007)、カリクレイン活性化、および第XII因子から第XIIa因子への自己活性化を遮断することが証明されている。これらの活性は微小血管血栓症を阻害することによって有益な効果に寄与することができるかもしれない。ナルソプリマブは出血時間を延長せず、プロトロンビン時間にも活性化部分トロンボプラスチン時間にも影響を及ぼさない(Krarpur PLoS One 2007)。

【0643】

本実施例に記載の結果は、COVID-19関連肺傷害の病態生理における内皮傷害によって引き起こされるMASP-2媒介性レクチン経路活性化を強く示している。ナルソプリマブ処置後の臨床状態と臨床検査所見の改善は注目に値する。これらの知見から、意味のある臨床的有効性と、薬物の作用機構と疾患の病態生理に関連する裏付けになる証拠が強く示唆される。ナルソプリマブによるレクチン経路阻害はCOVID-19関連肺傷害の有望な、可能性のある治療法であるように思われる。

【0644】

本実施例に記載の臨床研究からの追加データ

上記の本実施例に記載のように、検査確定COVID-19およびARDS(ベルリン基準に従う)がある6人の患者をナルソプリマブで処置した(4mg/kg 静脈内(IV)、3~4週間にわたって週2回)。患者全員に、予防的エノキサパリン(Clexane, Sanofi Aventis)4,000IU/0.4mL、アジスロマイシン(Zitromax, Pfizer SpA, Italy)500mg 1日1回、ヒドロキシクロロキン(Plaquenil, Sanofi Aventis)200mg 1日2回、ならびにダルナビルおよびコビシスタット(Rezolsta, Janssen-Cilag S.p.A., Italy)800/150mg 1日1回を含む標準的な支持的治療を与えた。3月27日から最新の施設ガイドラインに従って、本発明者らの病院にいるCOVID-19患者全員にメチルプレドニゾロン(1mg/kg)を与えた。メチルプレドニゾロンは6人のナルソプリマブ処置患者のうち5人に投与した。

【0645】

ナルソプリマブで処置しなかった死亡したCOVID-19患者に対して病理組織学的評価を行った。ナルソプリマブで処置した患者とナルソプリマブで処置しなかった患者に対して、血液数、LDH、およびCRPレベルを含む臨床測定値および臨床検査測定値を標準的な診療に従って収集した。それぞれのナルソプリマブ投薬の前に、次いで週2回、日常的な血液検査を収集した。循環内皮細胞の数ならびにIL-6およびIL-8レベルをフローサイトメトリーによって連続して評価した。呼吸機能を毎日評価した。入院時に間質性肺炎を記録するために、入院中に临床上必要であれば肺塞栓症を記録するために、患者全員に胸部コン

ピュータ断層撮影法(CT)を行った。临床上必要な時に胸部X線撮影も行った。

【0646】

データを、カテゴリー変数のパーセントによる頻度と、中央値と連続した変数の範囲として示した。時点間の臨床測定値と臨床検査測定値との間の差をノンパラメトリックフリードマン検定によって評価した。対応ウィルコクソン符号順位検定を用いてペアワイズ比較を行った。5%で有意であると設定した。分析はRソフトウェア(バージョン3.6.2)を用いて行った。

【0647】

本実施例に記載のように、20人のCOVID-19死亡患者の初回群に対して剖検を行った。頻繁に死に至る肺血栓塞栓症の臨床像と一致して、ほとんどの患者の肺と肝臓は広範囲にわたって血栓症に冒されていることが見出された。組織学的に、破壊的炎症プロセスの影響を受けていない領域を含めて、動脈血栓症は肺の中隔血管において明らかであった。図41A〜Dに示したように、CD34(内皮細胞マーカー)の免疫組織化学染色から、細胞収縮がある重度の内皮損傷、変性した水腫細胞質、および内皮細胞へのリンパ球付着が証明された。

【0648】

本実施例に記載のように、この研究においてナルソプリマブによる補体レクチン経路の阻害は臨床的改善と関連付けられた。ナルソプリマブ処置は、迅速かつ持続的なCEC低減と、それと同時に起こる血清中IL-6、IL-8、CRP、およびLDHの低減と関連付けられた。特に、CEC数は、この疾患における内皮損傷および処置応答を評価するための信頼性の高いツールであるように思われる。ナルソプリマブ処置によるIL-6およびIL-8の時間的改善から、COVID-19感染患者で説明されるサイトカインストームに潜在的に有益に影響を及ぼすことが示唆される(Xiong Y, et al., Emerg Microbes Infect 9(1):761-770, 2020)。本研究の知見から、内皮傷害はCOVID-19関連肺傷害の病態生理の中心にあることが分かる。重度の呼吸不全がある患者は、C反応性タンパク質(CRP)および乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)のレベルの著しい上昇だけでなく、IL-6、IL-8、および循環内皮細胞(CEC)のレベルの著しい上昇も示した。この新規の観察は、COVID-19患者において著しい内皮傷害と血栓症を示した肺と肝臓における病理組織学的所見と一致する。微小血管の病理組織学的変化は内皮傷害症候群HSCT-TMAの病理組織学的変化とよく似ている。このことから、COVID-19関連肺傷害における内皮傷害の役割がさらに裏付けられる。

【0649】

当初、2週間の投薬が計画されたが、投薬が最初に中断された患者#1のCEC上昇後に3〜4週間に延長された。投薬の3週目と同時に、患者のCEC数は再び改善した。4週間のナルソプリマブ処置後に、ぶり返しの肺徴候および症状は観察されなかった。本発明者らは、ナルソプリマブ処置患者においてウイルス防御が損なわれた証拠を認めなかった。注目すべきことに、ナルソプリマブは補体の古典経路も代替経路も阻害せず、適応免疫応答も抗原-抗体複合体化も妨害しない。ナルソプリマブ関連感染リスクの証拠は臨床試験において観察されなかった。レクチン経路活性化を阻害することに加えて、ナルソプリマブは、プロトロンビンからトロンビンへのMASP-2媒介性の切断、カリクレイン活性化、および第XII因子から第XIIa因子への自己活性化を遮断することが示されている。これらの活性は微小血管血栓症を阻害することによって有益な効果に寄与することができるかもしれない。これは、特に、広範囲の肺血栓症に罹患した患者において重要な治療上の役割を果たしたかもしれない。ナルソプリマブは出血時間を延長せず、プロトロンビン時間にも活性化部分トロンボプラスチン時間にも影響を及ぼさず、本発明者らが処置した患者では出血は観察されなかった。

【0650】

本発明者らの知見から、Covid-19関連肺傷害の病態生理において内皮傷害によって引き起こされるレクチン経路活性化が強く関連付けられる。この研究における患者全員の臨床的改善と、ナルソプリマブによる補体レクチン経路の阻害が関連付けられた。ナルソプリマブは忍容性が良好であり、薬物有害反応は報告されなかった。患者全員が処置中に改

10

20

30

40

50

善し、生存した。ナルソプリマブ処置後の臨床状態の改善と臨床検査所見は注目に値する。これらの知見から、意味のある臨床的有効性が強く示唆され、薬物の作用機構と疾患の病態生理に関連する裏付けになる証拠が提供される。ナルソプリマブによるレクチン経路阻害はCOVID-19関連肺傷害の有望な、可能性のある治療法であるように思われる。

【0651】

本実施例に記載の臨床研究から追加データが提供される

6人のナルソプリマブ処置患者の臨床的特徴を表13にまとめた。4mg/kgのナルソプリマブを3～4週間にわたって週2回静脈内投与した。処置後に患者全員が臨床的に改善した。

【0652】

4人の患者では、CTスキャンによって記録された肺塞栓症(患者#4および#6)、医療判断(患者#3)、ならびに挿管を必要とする呼吸機能の迅速な悪化(患者#5)が原因で治療量(100IU/kg1日2回)のエノキサパリンが与えられた。経過観察の中央値は27日(16～90日)であった。患者に中央値8回の全ナルソプリマブ投薬(範囲5～8回)のナルソプリマブを週2回投与した。処置後に患者全員が臨床的に改善した。4人の患者(67%)は、中央値3投薬のナルソプリマブ投薬(範囲2～3投薬)の後に、換気補助をCPAPから高流量酸素(非レブリーザーまたはベンチュリー酸素マスク)に下げた。

【0653】

図50は、ナルソプリマブで処置した6人のCOVID-19患者の臨床アウトカムを図示する。

【0654】

図50に示したように、これらの患者のうち3人では酸素補助を切り離し、次いで中断した。患者は中央値6回(5～8回)の全ナルソプリマブ投薬の後に退院した。

【0655】

患者#4では、登録して4日後に広範囲の両側肺塞栓が造影CTスキャンによって記録された。進行中のナルソプリマブ投薬にエノキサパリンが加えられ、11日後に迅速な臨床的改善およびX線撮影(反復CTスキャン)改善が記録され(図47Aおよび図47B)、その後に退院した。

【0656】

残りの2人の患者(#5および#6)では、登録直後に、迅速な、かつ進行性に悪化している重度ARDSが記録された。

【0657】

患者#5では、重度ARDS($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 55)により4日目に挿管がなされた。それにもかかわらず、後の臨床アウトカムは急速に好ましいものになり、患者は3日後に集中治療室から退院した。CPAPの2日後に彼は低流量酸素補助によって安定した。その後に彼は酸素を必要とせず、退院した。

【0658】

患者#6は登録時に $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 60と重度ARDSがあり、2日後に挿管を必要とした。彼女の経過は広範囲の両側肺血栓症と院内メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)感染症によって複雑になった。彼女の状態は改善し、18日後には彼女は抜管され、(閉所恐怖が原因で)気管切開され、低流量酸素により支援された。彼女の状態は改善し、酸素補助が取り除かれた。90日目に彼女は退院した(33日目から90日目は図50に示していない)。

【0659】

この研究では処置関連有害事象は報告されなかった。

【0660】

上記のように、患者#4では、登録の4日後に広範囲の両側肺塞栓が造影CTスキャンによって証明された。進行中のナルソプリマブ投薬にエノキサパリンが追加され、図47A、Bに示したように、11日後に迅速な臨床的改善およびX線撮影(反復CTスキャン)改善が記録された。

【0661】

10

20

30

40

50

図47Aおよび図47Bは、ナルソプリマブで処置した、COVID-19肺炎がある患者#4の肺を撮影したCTスキャンからの画像である。

【0662】

図47Aは、登録から(すなわち、ナルソプリマブ処置後)5日目の患者#4のCTスキャンを示す。このCTスキャンで、患者は、重度の間質性肺炎と、末梢領域と中心領域の両方が関与する広汎性のスリガラス陰影を有することが観察された。下肺葉、特に、左肺の下肺葉の硬化。広範囲の両側肺塞栓症と葉間動脈および分節動脈における陰影欠損(示さず)。

【0663】

図47Bは、スリガラス陰影が有意に少なくなり、実質硬化がほぼ完全に消散した、登録から(すなわち、ナルソプリマブ処置後)16日目の患者#4のCTスキャンを図示する。「乱れ敷(crazy-paving)」の模様と、特に下肺葉での末梢分布が観察された。明らかな気縦隔症。右肺の分節下動脈における最小限の陰影欠損(示さず)。

【0664】

図48は、ナルソプリマブで処置した患者におけるベースライン時およびナルソプリマブ処置後の異なる時点(2回の投薬の後、4回の投薬の後)でのIL-6の血清レベル(pg/mL)を図示する。箱は第1四分位数から第3四分位数までの値を表し、横線は中央値を示し、点は患者全員の値を図示する。図48は、図45に示したIL-6データの最新版を提供する。

【0665】

図49は、ナルソプリマブで処置した患者におけるベースライン時およびナルソプリマブ処置後の異なる時点(2回の投薬の後、4回の投薬の後)でのIL-8の血清レベル(pg/mL)を図示する。箱は第1四分位数から第3四分位数までの値を表し、横線は中央値を示し、点は患者全員の値を図示する。図49は、図46に示したIL-8データの最新版を提供する。

【0666】

図50は、ナルソプリマブで処置した6人のCOVID-19患者の臨床アウトカムを図示する。棒の色は、異なる酸素補助(CPAP:黄色;挿管がある機械的換気:赤色;非レブリーザー酸素マスク:緑色;鼻カニューレによる低流量酸素:薄緑色;室内空気:青色)を示している。ナルソプリマブ投薬は青色の矢印で印を付けた。黒色の丸はステロイド処置の開始を示している。ダイヤモンド記号はTEPを示している。星印(*)は、病院から退院したことを示している。CPAP=持続陽圧気道圧。NRM=非レブリーザー酸素マスク。VM=ベンチュリーマスク。TEP=肺血栓塞栓症。

【0667】

図51Aは、ナルソプリマブ処置前と処置後のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の血清レベル(ユニット/リットル、U/L)値を図示する。黒色の線は中央値と四分位数間範囲(IQR)を表している。赤色の線は正規性レベルを表し、点は患者全員の値を示している。

【0668】

図51Bは、4人の患者におけるD-ダイマーの血清レベル値(ng/ml)を図示する。ベースライン値は、ナルソプリマブ処置開始前に入手することができた。黒色の丸はステロイド処置開始時を示している。赤色の線は正規性レベルを表している。

【0669】

まとめると、この研究では、COVID-19を処置するために初めてレクチン経路阻害因子を使用し、持続陽圧気道圧(CPAP)または挿管を必要とするARDSがある6人のCOVID-19患者にナルソプリマブを与えた。患者の年齢の中央値は57歳(範囲47~63歳)であり、83パーセントが男性であり、全員に併存症があった。ベースライン時に循環内皮細胞(CEC)数と、内皮/細胞の損傷および/または炎症の全マーカーであるインターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-8(IL-8)、C反応性タンパク質(CRP)、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)、D-ダイマー、およびアスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)の血清レベルが有意に上昇していた。機械的換気を開始して48時間以内にナルソプリマブ処置を始めた。投薬は2~4週間にわたって週2回であった。

【0670】

10

20

30

40

50

研究結果

●ナルソプリマブ処置患者全員が完全に回復し、生存し、病院から退院した。
●ナルソプリマブ処置は、内皮/細胞の損傷および/または炎症の評価された全てのマーカー、CEC、IL-6、IL-8、CRPLDH、D-ダイマー、およびASTにわたって迅速かつ持続的な低減/正常化と関連付けられた。

○臨床検査マーカーの時間パターンは、観察された臨床的改善と一致した。

○特に、CEC数は、この疾患における内皮損傷および処置応答を評価するための信頼性の高いツールであるように思われる。

○ナルソプリマブ処置によるIL-6およびIL-8の時間的改善から、レクチン経路活性化はCOVID-19におけるサイトカイン上昇に先行する可能性があり、レクチン経路阻害は、COVID-19感染患者で説明されるサイトカインストームに有益に影響を及ぼすことが示唆される。

●2人の患者(一方は挿管され、他方はCPAPを受けていた)の経過は広範囲の両側肺血栓症によってさらに複雑になり、両患者ともナルソプリマブによって完全に回復し、おそらく、この薬物の抗凝固効果から利益を得た。

●ナルソプリマブは、この研究において忍容性が良好であり、薬物有害反応は報告されなかった。

●類似する参加基準とベースライン特徴をもつ2つの対照群を後向き比較に使用した。両方とも32パーセントおよび53パーセントとかなりの死亡率を示した。

【0671】

結論

本実施例において証明されたように、ナルソプリマブによる補体レクチン経路の阻害は、Covid-19関連内皮細胞損傷、従って、炎症状態と血栓リスクを低減させることによるCovid-19患者に対する有効な治療法であるかもしれない。レクチン経路阻害はCOVID-19治療法として以前に調べられたことがない。この研究の患者全員にCOVID-19関連呼吸不全があった。MASP-2阻害因子ナルソプリマブで処置した後に患者全員が回復し、病院から退院することができた。このことから、COVID-19病態生理におけるレクチン経路の重要性がさらに裏付けられる。

【0672】

COVID-19における他の補体阻害因子の使用が報告されている。1人の患者にコンブスタチンベースのC3阻害因子であるAMY-101(Mastaglio S. et al., Clin Immunol 215: 108450, 2020)を使用し、4人の患者にエクリズマブと抗ウイルス療法および抗凝固療法を投与した(Diurno F. et al., Eur Rev Med Pharmacol Sci 24(7)4040-7, 2020)。これらの5人の患者はCPAPを受け、生存した。経鼻高流量酸素を受けている2人のCOVID-19患者に、ステロイド処置後にC5a抗体と、抗ウイルス療法を含む支持療法を与えた。これらの2人の患者も生存した。まとめると、これらの報告は、ナルソプリマブを用いた本発明者らの知見を裏付けている。しかしながら、C3阻害因子およびC5阻害因子とは異なり、MASP-2抗体ナルソプリマブは古典的補体経路機能を完全に維持しており、適応免疫応答または抗原-抗体複合体を介した溶解応答を妨害しない(Schwaebble W. et al., Proc Natl Acad Sci 108(18)7523-8, 2011)。ナルソプリマブ臨床試験においてナルソプリマブ関連感染リスクの証拠は観察されることがない。

【0673】

これはコンパッショネート・ユースのシングルアーム研究であったが、2つの異なる対照群が後向き比較を提供する。第1の対照群は、COVID-19患者においてIL-6阻害因子であるシルツキシマブの使用を評価した、Gritti et al(MedRxiv 2020:2020.04.01.20048561)による最近発表された論文で述べられた。シルツキシマブ研究と、本発明者らのナルソプリマブ研究は、共通の同じ治験責任医師(lead investigator)(G.G.およびA.R.)、参加基準および患者特徴(すなわち、登録時の人口統計、症状、併存症、ARDS重症度、臨床検査値、および呼吸補助)をもつ。この研究では、シルツキシマブ処置群および対照群の死亡率は、それぞれ、33%および53%であった。第2の後向き比較群は、COVID-19患者

10

20

30

40

50

におけるCEC測定の実行可能性を評価するために、本発明者らの病院内にいる無作為に選択された33人の患者によって表される。これらの33人の患者のうち22人が同じ参加基準を満たし、ナルソプリマブ処置患者と同様のベースライン特徴があった。しかしながら、対照群におけるベースラインCEC数の中央値は、ナルソプリマブ処置群のものと比較して、それぞれ、101/mL対334/mLであった。興味深いことに、これらの22人の患者のうち20人(91%)がIL-6阻害因子(トシリズマブもしくはシルツキシマブ)および/またはステロイドによって処置された。この群の全30日死亡率は32%であった。アウトカム分析を、ナルソプリマブ処置患者(中央値58歳、範囲51~65歳)と年齢を一致させた16人の患者に制限した時でも死亡率は依然として31%であった。この後者の群では94%にIL-6および/またはステロイド療法が与えられ、55/mLでのベースラインCEC数の中央値はナルソプリマブ処置患者の1/6であった。

【0674】

COVID-19においてステロイドを使用することで、入り混じったアウトカムが報告されている(Veronese N. et al., Front Med (Lausanne) 7:170, 2020)。直近で、COVID-19療法(回復)試験の無作為化評価から、デキサメタゾン、28日死亡率を侵襲的機械的換気を受けている患者では28.7%(29.0%対40.7%通常治療)下げ、侵襲的機械的換気のない酸素補助を受けている患者では14%(21.5%対25.0%通常治療)下げ、無作為化時に呼吸補助を受けていない患者では死亡率に影響を及ぼさなかった(17.0%対13.2%通常治療)ことが証明された(Horby P. et al., medRxiv 2020:2020.06.22.20137273)。これらのデータと、本発明者らの病院での経験に基づいて、本発明者らは、ステロイドが、呼吸機能低下があるCOVID-19患者の処置において役割を果たし、炎症応答を抑えつけるように作用すると考えている。ナルソプリマブ処置群では、6人の患者のうちの1人(患者#1)にステロイドを与えなかった。その後、3月下旬に施設ガイドラインを更新し、本発明者らの病院にいる患者全員にステロイドを与えることが求められた。ステロイドを与えた5人のナルソプリマブ処置患者のうち2人(患者#2および#3)は、CPAPがもはや必要とされないか、または次の日に中断されるように既に改善した後にステロイドを開始した。以前に説明したように、本発明者らは、短時間の間にステロイドしか与えなかった4人の患者からなる別の群でCEC数を評価した。この数はステロイド投与の影響を受けないことが見出された。このことから、COVID-19関連内皮損傷に対するステロイドの有益な効果は遅延した可能性があり、患者#2および#3の回復経過にほとんど影響を及ぼさなかったことが示唆される。

【0675】

結論として、本発明者らの知見から、内皮傷害誘発性のMASP-2活性化およびレクチン経路活性化はCOVID-19関連肺傷害の病態生理において中心的な役割を果たすことが強く示唆される。ナルソプリマブ処置後の臨床状態と臨床検査所見の改善は注目に値する。これらの知見から、意味のある臨床的有効性が強く示唆され、薬物の作用機構と疾患の病態生理に関連する裏付けになる証拠が得られる。ナルソプリマブによるレクチン経路阻害は、COVID-19関連肺傷害と内皮損傷関連血栓症の有望な治療法であるように思われる。

【0676】

本実施例に記載の臨床研究からのさらなる追加データ

上記の本実施例に記載のように、検査確定COVID-19およびARDS(ベルリン基準に従う)がある6人の患者をナルソプリマブで処置した(4mg/kg 静脈内(IV)3~4週間にわたって週2回)。本実施例に記載のように、この研究の6人の患者全員にCOVID-19関連呼吸不全があった。MASP-2阻害因子ナルソプリマブで処置した後に患者全員が回復し、病院から退院することができた。これらの患者は病院から退院してからモニタリングされている。2020年10月22日時点で(ナルソプリマブで処置して5~6ヶ月後)、6人の患者全員が臨床正常であり、ナルソプリマブで処置しなかったCOVID-19患者で報告されてきた長期後遺症の証拠は全くなかった。2020年10月22日時点で、6人の患者全員の、血清D-ダイマーレベルを含む臨床検査計測値も正常であり、全てが正常範囲であると見出された(以下の表15を参照されたい)。

【0677】

表15は、ナルソプリマブ処置前の入院時(ベースライン)に6人のCOVID-19患者から得たベースライン臨床検査測定値と、その5～6ヶ月後の2020年10月に得た臨床検査測定値との比較を示す。

【0678】

表15は、ベースライン時(処置前、表13も参照されたい)と、処置して5～6ヶ月後の2020年10月に測定した時の6人のナルソプリマブ処置患者の臨床的特徴をまとめたものである。

【0679】

(表15) ナルソプリマブで処置したCOVID-19患者(#1～6)の臨床検査測定値

臨床検査所見	ベースライン: 全員の患者 ナルソプリマブ処置前 (2020年3月～6月) (N=6)	最後の評価 (2020年10月) (N=6) (退院して 5～6ヶ月後)
白血球の数 - 1mm ³ あたりの中央値(範囲)	8335 (6420-10,120)	7320 (3200-8770)
.....>10,000 /mm ³ - 人数(%)	2 (33)	0 (0)
.....<4000 /mm ³ - 人数(%)	0 (0)	1 (17)
リンパ球の数 - 1mm ³ あたりの中央値(範囲)	875 (410-1290)	2815 (810-3780)
血小板の数×10 ³ 1mm ³ あたりの中央値(範囲)	282 (199-390)	238 (170-354)
ヘモグロビン - g/dL、中央値(範囲)	13.4 (13.2-14.1)	14.8 (13.4-15.8)
他の所見の分布(臨床検査基準範囲)		
C反応性タンパク質 (0.0-1.0 mg/dL)	14 (9.5-31.3)	0.15 (0-0.5)
乳酸デヒドロゲナーゼ (120/246 U/L)	518.5 (238-841)	212 (119-249)
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(13-40 U/L)	78.5 (51-141)	18 (12-29)
アラニンアミノトランスフェラーゼ(7-40 U/L)	73 (37-183)	22.5 (20-67)
クレアチニン (0.3-1.3 mg/dL)	0.85 (0.38-1.33)	0.94 (0.51-1.07)
D-ダイマー (<500 ng/mL)		
<190 - 人数(%)	0 (0)	3 (50)
>190 - 中央値(範囲)	1250.5 (943-1454)	324 (202-390)

【0680】

これらの結果から、これらの6人の患者においてCOVID-19患者をナルソプリマブで処置することで、これらの患者は改善に回復し、長期COVID後遺症の証拠は全く無かったことが証明される。

【0681】

広く報告されているように、軽度の症状にかかったCOVID-19患者ならびにARDSおよび/または血栓症などの重度のCOVID-19関連肺傷害にかかったCOVID-19患者を含めて多くのCOVID-19患者はCOVID-19感染症による即時合併症に苦しみ、初感染から回復した後でも「ロングホーラー(long-hauler)」とも呼ばれる長期後遺症に苦しんでいる。Mars

hall M.,(「The lasting misery of coronavirus long-haulers」, Nature Vol 585, 9/17/2020, page 339-341)に記載のように、もっと重度のCOVID-19感染症にかかった人は肺、心臓、免疫系、脳、中枢神経系、腎臓、消化管、および他の場所の長期損傷を経験することがあり、COVID-19感染症の軽度症例でも、慢性疲労症候群に似た、なかなか消えない倦怠感が生じることがある。Marshall(2020)でさらに説明されたように、COVID-19感染症による即時後遺症および長期後遺症には、心血管合併症(心筋損傷、心筋症、心筋炎、血管内凝固、脳卒中、静脈および動脈合併症、ならびに肺血栓症を含む); 神経学的合併症(認知困難、混乱状態、記憶喪失、「ブレインフォグ」とも呼ばれるもの、頭痛、脳卒中、めまい、失神、発作、食欲不振、不眠、嗅覚脱失、味覚脱失、ミオクローヌス、神経因性疼痛、筋肉痛; 例えばアルツハイマー病、ギランバレー症候群、ミラー・フィッシャー症候群、パーキンソン病等の神経学的疾患の発症を含む); 腎臓損傷(例えば、急性腎障害(AKI)、肺線維症、呼吸困難、肺塞栓症を含む肺合併症); 炎症状態、例えば、川崎病、川崎病様疾患、小児多系統炎症性症候群;ならびに多系統臓器不全が含まれる。Troyer A. et al., Brain, Behavior and Immunity 87:43-39, 2020; Babapoor-Farrokhram S. et al., Life Sciences 253:117723, 2020;およびHeneka M. et al., Alzheimer's Research & Therapy, vol 12:69, 2020も参照されたい。Yelin D. et al., Lancet Infect Dis 2020, 9/1/2020でさらに説明されたように、急性COVID-19から回復している人の長期愁訴には、極度の疲労、筋力低下、微熱、集中力の欠如、記憶の欠落、気分変化、睡眠困難、腕および脚における針で刺されるような痛み(needle pain)、下痢および嘔吐、味覚および嗅覚の喪失、咽頭痛および嚥下困難、糖尿病および高血圧の新規発症、皮膚発疹、息切れ、胸痛、ならびに動悸が含まれる。

10

20

【0682】

本実施例に記載のように、これらの6人の患者においてCOVID-19患者をナルソプリマブで処置したところ、これらの患者は完全に回復し、COVID-19感染症による長期後遺症の証拠が全く無かった。

【0683】

実施例22

COVID-19患者#7におけるOMS646(ナルソプリマブ)処置

本実施例は、実施例20および実施例21に記載の方法を用いた7人目のCOVID-19患者(患者#7)の処置におけるナルソプリマブ(OMS646)の使用について説明する。本実施例に記載の結果は、実施例21の6人のCOVID-19患者において観察された結果と一致し、COVID-19感染患者の処置におけるナルソプリマブの効力をさらに裏付ける。

30

【0684】

方法および結果:

患者#7は、SARS-CoV-2に感染した76歳の肥満の糖尿病男性であり、喫煙とCOPDの長い病歴があり、前立腺癌手術の受けたこともあった(すなわち、COVID-19関連合併症について「ハイリスク」と分類される患者)。患者はベルガモにある病院に入院し、当初、鼻カニューレによって酸素を必要としていた。彼の呼吸の状態は急速に悪化し、最初にマスクによる酸素投与、その後に機械的換気と持続陽圧気道圧、次いで挿管を必要とした。挿管後、免疫グロブリンγ4(IgG4)重鎖とλ軽鎖定常領域で構成される完全ヒトモノクローナル抗体であるナルソプリマブ(OMS646)を用いて処置を開始した。ナルソプリマブはMAS P-2にnM以下の親和性で結合し、これを阻害する。ナルソプリマブによる患者#7の処置は、実施例20および実施例21に記載の方法に従って、2~4週間にわたって週2回静脈内投与される4mg/kgの投与量で、最大で6~8回投薬して(すなわち、2週間、3週間、または4週間の投薬期間)行われた。現在まで、患者#7には4回のナルソプリマブ投薬が与えられている。ナルソプリマブ処置後の患者#7は急速に改善し、彼は2回目の投薬の後に抜管された。下記の図52A~Eに彼の臨床検査所見を示した。投薬を各グラフ上に縦の矢印で示した。

40

【0685】

図52Aは、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、

50

COVID-19により危篤状態の患者#7におけるD-ダイマー血清レベル(ng/mL)の値を図示する。ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印によって示した。赤色の横線は正規性レベルを表している。

【0686】

図52Bは、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、COVID-19で危篤状態の患者#7におけるC反応性タンパク質(CRP)の血清レベルを図示する。ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印によって示した。赤色の横線は正規性レベルを表している。

【0687】

図52Cは、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、COVID-19で危篤状態の患者#7におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)の血清レベル(ユニット/リットル、U/L)を図示する。ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印によって示した。赤色の横線は正規性レベルを表している。

【0688】

図52Dは、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、COVID-19で危篤状態の患者#7におけるアラントランスアミナーゼ(ALT)の血清レベル(ユニット/リットル、U/L)を図示する。ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印によって示した。赤色の横線は正規性レベルを表している。

【0689】

図52Eは、処置前のベースライン時(0日目)とナルソプリマブ処置後の異なる時点での、重度COVID-19がある患者#7における乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)の血清レベルを図示する。ナルソプリマブによる投薬を縦の矢印によって示した。赤色の横線は正規性レベルを表している。

【0690】

結果の概要:

図52A~52Eに示したように、入院時およびナルソプリマブ処置前に、患者#7には、D-ダイマー(COVID-19における第1位の凝固性マーカーとみなされる)の高い血清レベル、C反応性タンパク質(炎症マーカー)の高い血清レベル、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(COVID-19における危篤の酵素マーカー)の高い血清レベル、アラントランスアミナーゼ(肝機能マーカー)の高い血清レベル、および乳酸デヒドロゲナーゼ(細胞死マーカー)の高い血清レベルがあった。さらに図52A~52Eに示したように、患者#7は1回目のナルソプリマブ投薬の後に改善し、上記の臨床検査測定値の全てが4回目の投薬の後に正常レベル付近に低下したか、または正常レベルに低下した。彼は2回目のナルソプリマブ投薬の後に抜管された。ICUスタッフはナルソプリマブ処置後の彼の迅速な改善に驚嘆した。本実施例で報告された患者#7の迅速な改善は、実施例21に記載のナルソプリマブ処置後のCOVID-19患者#1~6の回復と一致している。

【0691】

本実施例に記載の臨床研究から追加データが提供される

本実施例に記載のように、患者#7は1回目のナルソプリマブ投薬の後に改善し、彼は2回目の投薬の後に抜管され、上記の臨床検査測定値の全てが4回目の投薬の後に正常レベル付近に低下したか、または正常レベルに低下した。最新情報として、患者#7は合計6回のナルソプリマブ投薬が与えられ、病院から退院した。図53に示したように、患者#7からの経時的な血清学データから、ナルソプリマブ処置中に適切に高い力価の抗SARS-CoV-2抗体が生じたことが分かる。このことから、ナルソプリマブは適応免疫応答のエフェクター機能を妨害しないことが分かる。

【0692】

本明細書に記載の患者#1~7の他に、ARDSに罹患している非常に多くのさらなるCOVID-19患者(合計n=19)が、コンパッションेट・ユースの下、実施例20および実施例21に記載の方法に従って2週間~4週間または5週間にわたって週2回静脈内投与される4mg/kgの投与量で、最大で4~10回の投薬(2週間、3週間、4週間、または5週間)でナルソプリマ

10

20

30

40

50

ブで処置された。本実施例に記載のさらなる患者全員が処置前にCOVID-19関連ARDSにより重症であり、全員が挿管され、挿管して何日も経った後に大多数がナルソプリマブを開始し、ナルソプリマブを開始する前に全員が他の療法を失敗していた。本明細書に記載の患者#1～7で観察されたものと同様に、ナルソプリマブで処置した大部分の患者において著しく陽性のアウトカムが観察された。ナルソプリマブで処置した大部分のCOVID-19患者は臨床症状と臨床検査値の迅速な、かつ著しい改善を示し、その後に病院から退院した。重要なことに、経過観察データ(ナルソプリマブ処置を中止して5～6ヶ月後)が入手可能なナルソプリマブ処置COVID-19患者では長期後遺症の臨床証拠も臨床検査証拠も観察されなかった。生存した、ナルソプリマブで処置したCOVID-19患者は、患者#7について上記で述べたように適切に高い抗SARS-CoV-2抗体を生じることも観察された。これらの結果から、レクチン経路を特異的に阻害し、補体の代替経路と古典経路を完全に機能できる状態のままにしておくナルソプリマブ処置は、感染症と戦う、適応免疫応答のエフェクター機能を保持し、ウイルス感染細胞の死滅において重要な役割を果たす抗原-抗体複合体媒介性の溶解応答を維持することが証明される。

10

【0693】

イタリア、ベルガモにてナルソプリマブで処置した危篤状態のCOVID-19患者#8～15と、米国にてナルソプリマブで処置した患者#1～4の処置経過の簡単な説明を以下に示す。

【0694】

患者#8(イタリア、ベルガモ)

20

患者#8は、うっ血性心不全と高血圧と脂質異常症と重度のCOVID-19がある76歳の肥満男性であった。彼は挿管の3日後にナルソプリマブ処置を始め、3回目の投薬の後に既存の心筋症の合併症で死亡した。彼のD-ダイマーレベルおよびLDHレベルは1～2回のナルソプリマブ投薬の後に改善した。血清学データから、彼は高力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じなかったことが分かる。

【0695】

患者#9(イタリア、ベルガモ)

患者#9は、重度のCOVID-19がある41歳の過体重男性である。彼は挿管の2日後にナルソプリマブ処置を始め、3回目の投薬の後に抜管された。彼は合計6回の投薬を受け、病院から退院した。彼のD-ダイマーレベルおよびLDHレベルは1～2回のナルソプリマブ投薬の後に改善した。血清学データから、彼はナルソプリマブ処置の経過中に適切に高い力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じたことが分かる。

30

【0696】

患者#10(イタリア、ベルガモ)

患者#10は、重度のCOVID-19がある65歳の過体重男性である。彼は挿管の3日後にナルソプリマブ処置を始め、4回目の投薬の後に抜管された。彼は合計8回のナルソプリマブ投薬を受け、病院から退院した。彼のD-ダイマーレベルおよびLDHレベルは1～2回のナルソプリマブ投薬の後に改善した。血清学データから、彼はナルソプリマブ処置の経過中に適切に高い力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じたことが分かる。

【0697】

患者#11(イタリア、ベルガモ)

40

患者#11は、高血圧と脂質異常症と重度のCOVID-19がある68歳の過体重男性であった。彼は挿管の13日後にナルソプリマブ処置を始めた。彼は合計7回の投薬を受け、多臓器不全で死亡した。血清学データから、彼は高力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じなかったことが分かる。

【0698】

患者#12(イタリア、ベルガモ)

患者#12は、糖尿病と高血圧と脂質異常症と重度のCOVID-19がある62歳の過体重男性である。彼は挿管の2日後にナルソプリマブ処置を始め、5回の投薬の後に抜管された。彼は合計6回のナルソプリマブ投薬を受け、次いで、院内感染を発症し、再挿管と気管切開

50

を必要とした。再挿管と気管切開は9日後に取り除かれた。彼は病院から退院して、低流量酸素が与えられてリハビリテーション施設に移った。血清学データから、彼はナルソプリマブ処置中に適切に高い力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じたことが分かる。

【0699】

患者#13(イタリア、ベルガモ)

患者#13は、高血圧と重度のCOVID-19がある62歳の過体重男性である。彼は挿管の3日後にナルソプリマブ処置を始め、6回目の投薬の後に気管切開された。彼は合計8回のナルソプリマブ投薬を受けた。その後、気管切開が取り除かれ、彼は室内空気が与えられて病院から退院した。血清学データから、彼はナルソプリマブ処置中に適切に高い力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じたことが分かる。

【0700】

患者#14(イタリア、ベルガモ)

患者#14は、高血圧と重度のCOVID-19がある、SARS-CoV-2に感染した64歳の過体重男性である。彼は挿管の6日後にナルソプリマブ処置を始めた。彼は7回目の投薬の後に気管切開された。彼は合計8回のナルソプリマブ投薬を受け、その後、気管切開が取り除かれ、室内空気が与えられて病院から退院した。血清学データから、彼はナルソプリマブ処置中に適切に高い力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じたことが分かる。

【0701】

患者#15(イタリア、ベルガモ)

患者#15は、高血圧と重度のCOVID-19がある79歳の過体重男性である。彼は挿管の3日後にナルソプリマブ処置を始めた。彼は3回のナルソプリマブ投薬の後に抜管された。彼は合計6回のナルソプリマブ投薬を受け、病院から退院した。血清学データから、彼はナルソプリマブ処置中に適切に高い力価の抗SARS-CoV-2抗体を生じたことが分かる。

【0702】

患者#1(米国)

患者#1は、レムデシビル、トシリズマブ、初期ステロイド療法、および回復期血漿を含む他の療法レジメンに失敗した後に約2週間挿管されていた重度のCOVID-19がある53歳の男性である。彼はナルソプリマブ処置を始め、同時にエノキサパリンとメチルプレドニゾロンを受けた。彼は素早く応答し、5回目のナルソプリマブ投薬の後すぐに抜管された。彼は退院して理学療法のためにリハビリテーション施設に移り、改善し続け、先月、職場に復帰した。伝えられるところによると、彼にはCOVID-19の長期後遺症がない。

【0703】

患者#2(米国)

患者#2は、重度のCOVID-19の結果として呼吸機能が急速に悪化していた55歳のアフリカ系アメリカ人女性である。彼女は挿管の数日後にナルソプリマブ処置を始めた。彼女の酸素需要は首尾良くなかったが、マスクに対する不寛容が原因で低レベル酸素補助のために気管切開が行われ、栄養管が挿入された。彼女は退院して急性疾患治療施設に移り、次いで自宅に戻った。気管切開と栄養管が取り外された。伝えられるところによると、彼女は長期臨床後遺症の証拠なく病後の経過が良好である。

【0704】

患者#3(米国)

患者#3は重度のCOVID-19がある80歳の男性であった。彼は挿管の数日後にナルソプリマブ処置を始めた。彼は3回目または4回目のナルソプリマブ投薬の後に死亡した。彼の死は伝えられるところによると、気圧障害と、機械的換気に続発する関連合併症に関連していた。彼の家族は宗教上の理由により体外式膜型人工肺(ECMO)処置の申し出を断った。

【0705】

患者#4(米国)

患者#4は、高血圧および重度のCOVID-19がある61歳の男性であった。ナルソプリマブ処置を開始する前に、彼は8日間挿管されており、ECMOを受けていた。彼はレムデシビル、バリシチニブ、および高用量ステロイドによる処置に失敗していた。彼は3回のナ

10

20

30

40

50

ルソプリマブ投薬を受け、死亡した。

【0706】

まとめると、ナルソプリマブは本明細書に記載の19人の患者を処置するのに用いられ、著しい結果を収めた。ナルソプリマブで処置したCOVID-19患者全員が、機械的換気-CPAP(4)または挿管(14)を必要とするARDSがあった。患者全員にハイリスク特徴/併存症があった。ナルソプリマブで処置した大部分のCOVID-19患者は症状と臨床検査値の迅速な、かつ著しい改善を示し(すなわち、もはや酸素補給を必要としない)、その後に病院から退院した。本明細書においてさらに説明されるように、経過観察(5~6ヶ月)データが入手可能なナルソプリマブ処置COVID-19患者では、長期のCOVID続発症の臨床証拠または臨床検査証拠は観察されなかった。ナルソプリマブ処置COVID-19患者は適切に高い力価のSARS-CoV-2抗体を生じる。このことから、他の補体阻害因子による処置とは異なり、ナルソプリマブは適応免疫応答のエフェクター機能を妨害しないことが分かる。

10

【0707】

(表16) 患者#7~#15(イタリア、ベルガモ)の臨床的特徴

20

30

40

50

臨床的特徴	患者 #7	患者 t #8	患者 #9	患者 #10	患者 t #11	患者 #12	患者 #13	患者 #14	患者 #15
年齢(歳)	76	76	41	65	68	62	62	64	79
男性/女性	M	M	M	M	M	M	M	M	M
体重 (kg)	90	100	90	90	85	85	90	105	75
BMI (kg/m2)	32	>30	29	27.8	29	n/a	27.8	32.5	26.0
発病から入院までの期間 (日数)	10	n/a	4	7	4	2	5	7	1
入院から集中治療までの 期間(日数)	6	0	2	2	1	1	13	5	2
入院時の発熱	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	なし
登録時のARDS重症度	中等度	重度	中等度	中等度	重度	中等度	中等度	中等度	軽度
入院からナルソプリマブ での処置開始までの期間	6	3	4	5	14	3	16	11	5
挿管からナルソプリマブ での処置開始までの期間	0-24時間	0- 24時間	0-24時間	>48時間	>48時間	>48時間	>48時間	>48時間	24- 48時間
胸部放射線学における 両側間質性異常	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり

臨床検査所見

PaO2:FiO2 比	130	45	186	110	95	119	160	162	250
白血球の数 - 1mm ³ あたり	7480	7410	10270	10620	19640	8190	21520	8810	8470
リンパ球の数 - 1mm ³ あたり	550	480	1320	700	390	500	1940	490	350
血小板の数×10 ³ 1mm ³ あたり	181	192	313	268	307	154	247	205	210
ヘモグロビン - g/dL	13.3	11.4	13.0	12.0	10.9	15.4	12.4	12.7	11.3
C反応性タンパク質 (0.0-1.0 mg/dL)	16	16.4	6	17.3	12	6.1	6.8	16.3	14.5
乳酸デヒドロゲナーゼ (120/246 U/L)	496	623	582	491	354	513	315	360	350
アスパラギン酸アミノ トランスフェラーゼ (13-40 U/L)	81	149	19	55	52	69	89	37	71

アラニンアミノトランスフェラーゼ (7-40 U/L)	70	68	24	22	86	30	252	44	54
クレアチニン (0.3-1.3 mg/dL)	0.82	1.4	0.48	0.71	0.35	0.79	0.79	0.88	1.13
D-ダイマー (<500 ng/mL)	3949	2026	4299	4471	1126	808	429	2410	354

ナルソプリマブでの処置の結果

ナルソプリマブの投薬の 総数	6	3	5	8	8	6	8	8	6
退院した	はい	いいえ、 死亡	はい	はい	いいえ、 死亡	はい	はい	はい	はい

10

20

30

40

50

【0708】

インフルエンザウイルス

実施例20、21、および22に記載のように、COVID-19感染症ではレクチン経路は肺傷害に寄与し、代表的なMASP-2阻害抗体であるナルソプリマブはCOVID-19患者の肺症状を軽減させるのに有効なことが証明されている。補体活性化はまたインフルエンザH5N1ウイルス感染症モデルでも肺傷害に寄与することが証明されている。H5N1感染患者とSARS-CoV感染患者の肺病理組織学的変化はよく似ている。H5N1マウスモデルにおいて、感染後1日目までにMASP-2RNA、C3a受容体RNA、およびC5a受容体RNAの発現が全て増加した。C3aRアンタゴニストまたはコブラ毒因子の使用による補体阻害は肺傷害および臨床徴候を減弱した。生存時間も増加した(Sun et al., Am J Respir Cell Mol Biol 49(2) 221-30, 2013を参照されたい)。従って、MASP-2阻害物質は、インフルエンザウイルスに感染した哺乳動物対象において急性呼吸窮迫症候群または疾患の他の症状発現を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法において使用するのにも有効だと予想される。

10

【0709】

実施例23

MASP-2に対する酵素アッセイ

MASP-2アッセイは、その天然基質C2の切断部位に基づいて蛍光発生基質を利用する。アッセイは、20mM Hepes、pH7.4、140mM NaCl、および0.1% Tween20を含有するアッセイ緩衝液中で室温で行われた。アッセイが時間、酵素、および基質濃度に対して直線的になるようにアッセイパラメータを調節した。これらの最適化されたアッセイ条件下では、IC₅₀値は、「タイトバインディング」阻害因子のいくつかの例を除いてKi値に等しかった。「タイトバインディング」、または起こり得る「スローバインディング(slow binding)」阻害因子の事例は、Copeland R.A. (2013) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. 2nd Ed., John Wiley and Sons, Inc., Chapters 5-7に記載の方法によって取り扱われた。

20

【0710】

MASP-2アッセイプロトコールを以下の通りに行った。試験化合物をDMSOで連続希釈し、次いで、100nlの各希釈液をアッセイプレートに移した。10μLのアッセイ緩衝液を添加し、その後に、アッセイ緩衝液に溶解した15μLの酵素MASP-2(CCP1-CCP2-SP)を添加した。次いで、アッセイ緩衝液に溶解した15μLの基質を添加し、混合して反応を開始した。室温で20分後に、15μLの停止溶液(0.1M 酢酸)を添加し、混合し、プレートをSpectraMax i3x Microplate Readerで読み取り、Excelファイルとしてエクスポートした。それぞれのアッセイプレートは、「阻害因子なし」(DMSOのみ)対照、「酵素なし」対照、および参照阻害因子対照を含んだ。活性値% = $100 \times (\text{試験組成物の蛍光の平均} - \text{「酵素なし」蛍光の平均}) / (\text{「DMSOのみ」蛍光の平均} - \text{「酵素なし」蛍光の平均})$ 。IC₅₀およびKi値は非常に再現性があり、十分に±2倍の範囲内にあった。

30

【0711】

実施例24

低分子化合物で処理したヒト血清におけるレクチン経路活性化アッセイ

マイクロタイターELISAプレートを、コーティング緩衝液[15mM Na₂CO₃、35mM NaHCO₃]に溶解したサッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)に由来するマンナン(Sigma-Aldrich, M7504)で4℃で一晩コーティングした。プレートを、Tris-緩衝生理食塩水(TBS)[10mM Tris-HCl、140mM NaCl]に溶解した1%ウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma-Aldrich, A3294)で室温で2時間ブロックした。1%ヒト血清を、GVB++[4mM バルビタール、145mM NaCl、0.2mM MgCl₂、0.2mM CaCl₂、1%ゼラチン]に溶解した低分子化合物の段階希釈液とインキュベートし、室温で15分間インキュベートした。次いで、この混合物100μLをプレートに添加し、200rpmで穏やかに振盪しながらプレートを37℃で1時間までインキュベートした。この後、プレートを洗浄用緩衝液[5mM CaCl₂および0.05% Tween-20を含有するTBS]で3回洗浄し、洗浄用緩衝液で1:500

40

50

0希釈したウサギ抗ヒトC3c(Dako, A0062)100 μ Lを添加し、37°Cで30分間インキュベートした。プレートを洗浄し、洗浄用緩衝液で1:8000に希釈したHRPヤギ抗ウサギIgG(Southern Biotech, 4050-05)100 μ Lを添加し、室温で30分間インキュベートした。この後に、プレートを3回洗浄し、100 μ L/ウェルのTMB比色基質(Thermo Scientific, 34029)を添加し、室温で5分間インキュベートし、100 μ L/ウェルの0.1N硫酸(BDH7230)を添加することで反応を止め、吸光度を450nmで測定した。

【0712】

実施例25. トロンビンに対する酵素アッセイ

トロンビンアッセイは蛍光発生ペプチド基質(Boc-VPR-AMC(R&D Systems))を利用し、20mM Hepes、pH7.4、140mM NaCl、および0.1% Tween20を含有するアッセイ緩衝液中で室温で行われた。アッセイが時間、酵素、および基質濃度に対して直線的になるようにアッセイパラメータを調節した。これらの最適化されたアッセイ条件下では、IC₅₀値は、「タイトバインディング」阻害因子のいくつかの例を除いてKi値に等しかった。「タイトバインディング」、または起こり得る「スローバインディング」阻害因子の事例は、Copeland R.A. (2013) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. 2nd Ed., John Wiley and Sons, Inc., Chapters 5-7に記載の方法によって取り扱われた。

【0713】

トロンビンアッセイプロトコールを以下の通りに行った。試験化合物をDMSOで連続希釈し、次いで、100nlの各希釈液をアッセイプレートに移した。10 μ Lのアッセイ緩衝液を添加し、その後に、アッセイ緩衝液に15 μ Lの酵素(ヒト α -トロンビン(BioPharm Lab.))を添加した。次いで、アッセイ緩衝液に溶解した15 μ Lの基質を添加し、混合して反応を開始した。室温で20分後に15 μ Lの停止溶液(0.1M酢酸)を添加し、混合し、プレートをSpectraMax i3x Microplate Readerで読み取り、Excelファイルとしてエクスポートした。それぞれのアッセイプレートは、「阻害因子なし」(DMSOのみ)対照、「酵素なし」対照、および参照阻害因子対照を含んだ。活性値% = $100 \times (\text{試験組成物の蛍光の平均} - \text{「酵素なし」蛍光の平均}) / (\text{「DMSOのみ」蛍光の平均} - \text{「酵素なし」蛍光の平均})$ 。IC₅₀およびKi値は非常に再現性があり、十分に ± 2 倍の範囲内にあった。

【0714】

表4A~4Eに列挙した化合物に対する生物学的アッセイの結果を以下の表17A、17B、および17Cに列挙した。

【0715】

(表17A) 化合物1000~1229のMASP-2/トロンビン/レクチン経路阻害

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP-2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1000	***	ND	***	ND	+
1001	**	ND	***	ND	--
1002	**	ND	****	ND	ND
1003	***	ND	****	ND	--
1004	***	ND	****	ND	--
1005	**	ND	****	ND	--
1006	****	****	****	ND	--
1007	****	**	*	ND	***
1008	***	ND	****	+	--
1009	**	ND	***	ND	--
1010	****	ND	--	ND	****
1011	****	ND	****	++	--
1012	***	ND	--	ND	***
1013	**	ND	*	ND	**
1014	**	ND	--	ND	**
1015	***	*	--	+	*
1016	***	*	--	+	**
1017	****	ND	****	ND	--
1018	**	ND	**/**	--	--
1019	***	ND	***	ND	--
1020	****	ND	****	ND	--
1021	**	--	--	--	***
1022	*	ND	***	ND	--
1023	***	ND	****	+	--
1024	****	ND	****	+++ /++++	**

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP-2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1025	****	ND	--	++	****
1026	***	ND	****	ND	**
1027	****	ND	****	++/+++	--
1028	**	ND	****	ND	--
1029	**	ND	***	ND	--
1030	****	****	**	++	***
1031	***	ND	*	ND	**
1032	****	ND	**	ND	****
1033	**	ND	**	ND	--
1034	****	ND	***	+ / ++	*
1035	****	ND	****	++++	**
1036	****	****	*** / **	+++ / +++++	****
1037	****	ND	***	ND	***
1038	****	ND	****	+++ / +++++	*
1039	**	*	--	ND	***
1040	****	****	--	++	****
1041	***	ND	****	+	--
1042	****	ND	****	++++	**
1043	****	****	***	++ / +++	**
1044	****	****	****	ND	**
1045	****	****	****	ND	**
1046	****	****	****	ND	**
1047	****	****	****	++ / +++	**
1048	****	****	****	++ / +++	**
1049	****	ND	****	ND	**

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP-2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1050	****	ND	**	ND	ND
1051	**	ND	****	+	--
1053	****	ND	**	++	**
1054	***	ND	**	+	*
1055	***	ND	****	+	--
1056	****	ND	***	ND	****
1057	****	ND	***	ND	****
1058	****	ND	****	++/+++	--
1059	****	****	--	++/+++	****
1060	****/***	--	--	--	***
1061	****	ND	***	ND	*
1062	***	ND	*	ND	***
1063	****	ND	***	ND	**
1064	***	ND	**	ND	**
1065	****	****	*	++++	****
1066	****	ND	--	ND	***
1067	****	****	**	ND	****
1068	***	ND	*	ND	**
1069	****	ND	****	++	--
1070	**	ND	--	ND	*
1071	****	****	**	ND	***
1072	****	****	****	ND	**
1073	****	****	****	ND	**
1074	****	****	****	ND	**
1075	****	****	****	ND	**

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP-2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1076	****	ND	****	ND	**
1077	**	ND	****	ND	--
1078	****	ND	ND	++	ND
1079	****	ND	ND	+	ND
1080	****	****	****	++/+++	**
1081	****	****	****	++/+++	**
1082	****	ND	****	ND	*
1083	****	ND	****	+	--
1084	****	ND	****	ND	**
1085	****	ND	****	ND	**
1086	****	ND	****	ND	**
1087	****	ND	****	ND	**
1088	****	****	***	+++	**
1089	****	ND	**	ND	***
1090	****	****	**/*	++	***
1091	***	****	--	+	***
1092	****	****	****	++/+++	--
1093	****	ND	****	ND	--
1094	****	ND	****	+	--
1095	**	ND	**	ND	*
1096	***	ND	****	+/++	--
1097	****	****	****	ND	***
1098	****	ND	ND	++++	ND
1099	****	ND	****	+++	--
1100	***	ND	****	ND	--

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP-2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1101	****	****	***	ND	*
1102	***	ND	****	ND	--
1103	****	****	****	+++	**
1104	*	ND	***	ND	--
1105	**	ND	***	ND	--
1106	***	ND	****	ND	--
1107	****	ND	****	++/+	--
1108	****	****	****	ND	*
1109	**	ND	****	--	--
1110	****	ND	****	+++/>++++	*
1111	****	ND	****	ND	*
1112	****	ND	****	ND	**
1113	**	ND	***	ND	--
1114	****	ND	****	++	--
1115	****	ND	****	++	--
1116	***	ND	****	+	--
1117	**	ND	****	ND	--
1118	****	****	****	ND	**
1119	****	ND	***	ND	**
1120	****	ND	****	ND	**
1121	**	ND	***	ND	--
1122	****	ND	****	ND	--
1123	****	ND	***	++	**
1124	****	ND	****	+++/>++++	--
1125	****	****	****	ND	--

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP-2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1126	****	ND	****	ND	--
1127	***	ND	****	+	--
1128	****	****	****	ND	*
1129	****	ND	****	++	--
1130	****	ND	****	ND	--
1131	****	ND	****	++	--
1132	***	ND	ND	ND	ND
1133	****	ND	****	+	--
1134	****	****	****	ND	--
1135	****	ND	***	ND	*
1136	****	ND	***	ND	***
1137	***	ND	ND	--	ND
1138	**	ND	****	ND	--
1139	****	**	***	+	*
1140	****	ND	****	ND	--
1141	****	ND	****	ND	--
1142	****	ND	****	ND	*
1143	****	****	****	ND	--
1144	***	ND	ND	ND	ND
1145	****	ND	ND	+++	ND
1146	****	ND	***	ND	*
1147	***	ND	***	ND	*
1148	****	ND	ND	ND	ND
1149	****	****	****	ND	**
1151	****	ND	****	ND	--

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP-2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1152	****	ND	****	ND	*
1153	****	ND	****	ND	****
1154	****	ND	****	ND	--
1156	*	ND	***/*	ND	--
1157	*	ND	--	ND	*
1158	*	ND	****	ND	--
1170	****	*	--	ND	****
1171	*	*	--	--	*
1192	*	ND	--	ND	*
1194	*	ND	**	ND	--
1195	*	ND	*	ND	--
1207	**	ND	***	ND	--
1211	****	ND	****	ND	--
1213	*	ND	--	ND	*
1215	**	*	--	ND	*
1218	****	ND	****	ND	--
1223	****	****	****	ND	***
1229	**	ND	**	ND	*
999 (メラガトラン 対照)	****	****	****	+ / ++	--

MASP-2阻害およびトロンビン阻害のK_i値:

* 25 μM未満のK_i値

** 10 μM未満のK_i値

*** 2.5 μM未満のK_i値

**** 0.5 μM未満のK_i値

-- > 25 μMのK_i値

レクチン経路阻害:

-- > 50 μMのIC₅₀値

+ 5 μM～50 μMの範囲にあるIC₅₀値

10

20

30

40

50

++ 0.5 μ M ~ 5 μ M の範囲にある IC_{50} 値

+++ 0.05 μ M ~ 0.5 μ M の範囲にある IC_{50} 値

++++ < 0.05 μ M の IC_{50} 値

MASP-2阻害対トロンビンについての化合物の選択性:

-- 1.0倍未満

* 1.0 ~ 5.0倍

** 5.0 ~ 25倍

*** 25 ~ 100倍

**** > 100倍

ND 未確定

【 0 7 1 6 】

(表 1 7 B) 化合物1230~1497のMASP-2/トロンビン/レクチン経路の阻害

化合物	MASP-2 K_i (μ M)	mMASP- 2 K_i (μ M)	トロンビン K_i (μ M)	レクチン経路 IC_{50} (μ M)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1230	****	****	*	++++	****
1231	****	****	**	ND	****
1232	***	ND	****	ND	--
1233	****	****	***	ND	*
1234	****	****	*	ND	***
1235	****	ND	*	ND	***
1236	****	****	****	ND	*
1237	*	ND	***	ND	--
1238	****	****	**	ND	***
1239	****	****	**	++	**
1240	***	ND	*	++	**

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP- 2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1241	****	****	****	ND	*
1242	***	**	**	ND	**
1243	*	ND	--	ND	ND
1244	***	ND	--	ND	**
1245	****	*	*	ND	****
1246	*	ND	*	ND	*
1247	****	****	***	ND	***
1248	****	****	***	ND	**
1249	****	****	*	ND	****
1250	****	****	****	ND	*
1251	***	ND	****	ND	--
1252	****	ND	**	ND	***
1253	****	***	--	+++	ND
1254	****	ND	*	ND	***
1255	***	ND	--	ND	ND
1256	****	ND	****	ND	*
1257	****	*	--	ND	***
1258	**	ND	--	ND	ND
1259	**	ND	--	ND	ND
1260	**	ND	--	ND	ND
1261	*	*	--	ND	*
1262	****	ND	***	ND	***
1263	**	**	--	ND	ND
1264	**	*	--	ND	ND
1265	****	**	--	ND	****
1266	***	--	--	ND	**
1267	**	--	--	ND	ND
1268	****	****	****	ND	*
1269	***	*	--	ND	**

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K_i (μ M)	mMASP- 2 K_i (μ M)	トロンビン K_i (μ M)	レクチン経路 IC_{50} (μ M)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1270	****	****	****	ND	**
1271	**	--	--	ND	ND
1272	****	****	***	ND	***
1273	*	*	--	ND	ND
1274	**	*	--	ND	**
1275	***	--	--	ND	***
1276	****	****	***	ND	***
1277	****	****	****	ND	**
1278	****	****	**	ND	***
1279	***	--	**	ND	**
1280	**	*	--	ND	ND
1281	**	--	--	ND	ND
1282	*	--	--	ND	ND
1283	****	***	**	ND	***
1284	****	****	****	ND	*
1285	***	***	**	ND	**
1286	**	****	***	ND	--
1287	*	--	--	ND	ND
1288	**	**	--	ND	ND
1289	****	****	****	ND	--
1290	****	****	***	ND	**
1291	***	*	--	ND	ND
1292	**	*	--	ND	ND
1293	**	**	--	ND	*
1294	**	**	--	ND	ND
1295	****	****	**	ND	***
1296	**	--	--	ND	**
1297	****	****	*	ND	****
1298	****	**	--	ND	ND

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP- 2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1299	****	*	--	ND	****
1300	****	****	**	ND	***
1301	**	--	--	ND	ND
1302	****	****	***	ND	***
1303	****	**	--	ND	***
1304	****	***	***	+++	***
1305	***	****	--	ND	**
1306	****	****	****	ND	*
1307	****	****	--	+++	****
1308	***	***	*	ND	**
1309	****	****	--	ND	****
1310	***	--	--	ND	***
1311	**	**	--	ND	*
1312	****	****	****	ND	*
1313	**	--	*	ND	*
1314	*	--	--	ND	*
1315	***	****	**	ND	*
1316	****	****	***	ND	***
1317	****	***	--	ND	ND
1318	****	****	**	ND	****
1319	****	*	**	ND	**
1320	****	***	***	ND	**
1321	*	--	--	ND	ND
1322	****	***	*	ND	***
1323	--	*	--	ND	ND
1324	****	****	***	+++	***
1325	***	*	****	ND	--
1326	****	****	*	ND	***
1327	****	****	****	ND	***

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K_i (μ M)	mMASP- 2 K_i (μ M)	トロンビン K_i (μ M)	レクチン経路 IC_{50} (μ M)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1328	****	****	***	+++	****
1329	****	****	***	ND	*
1330	****	****	****	ND	***
1331	****	****	--	+++	****
1332	*	**	--	ND	ND
1333	**	*	--	ND	ND
1334	****	****	****	+++	--
1335	****	****	**	ND	***
1336	*	--	--	ND	ND
1337	****	****	***	++	****
1338	****	****	--	+++	****
1339	****	****	****	++++	**
1340	****	****	****	ND	**
1341	*	--	***	ND	--
1342	****	***	*	ND	****
1343	****	****	**	+++	****
1344	****	****	**	ND	****
1345	****	****	****	++++	****
1346	*	--	--	ND	ND
1347	****	****	***	++++	***
1348	****	****	****	++++	***
1349	***	**	--	ND	**
1350	****	****	**	++	****
1351	****	****	--	++++	****
1352	****	****	***	+++	***
1353	****	****	****	++++	***
1354	****	***	**	ND	***
1355	****	*	--	ND	ND
1356	****	****	--	+++	****

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP- 2 K _i (μM)	トロロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロロンビン 選択性
1357	****	****	--	++++	****
1358	***	--	--	ND	ND
1359	***	*	--	ND	**
1360	****	****	--	+++	****
1361	****	****	--	++++	****
1362	***	***	***	ND	*
1363	****	****	**	+++	****
1364	***	*	--	ND	ND
1365	****	****	--	++++	****
1366	**	**	--	ND	ND
1367	****	*	--	ND	ND
1368	***	*	--	+++	**
1369	****	****	--	ND	****
1370	****	***	--	+++	ND
1371	****	***	****	+++	--
1372	****	****	****	+++	**
1373	****	****	***	+++	***
1374	****	****	--	ND	ND
1375	***	*	*	++	**
1376	***	--	--	ND	ND
1377	***	--	*	+++	**
1378	****	****	***	++	*
1379	****	****	--	++	****
1380	***	****	--	--	***
1381	***	*	*	++	**
1382	****	**	--	+	***
1383	***	**	--	+	ND
1384	*	--	--	ND	*
1385	****	****	****	+++	**

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP- 2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1386	*	--	--	ND	ND
1387	**	*	--	ND	ND
1388	****	****	--	++++	****
1389	****	**	--	++	****
1390	**	--	--	ND	ND
1391	****	****	--	++	****
1392	****	****	***	++	***
1393	****	****	****	+++	*
1394	**	--	*	ND	*
1395	***	**	--	+	ND
1396	****	****	--	++	****
1397	****	****	--	+++	****
1398	****	***	--	+++	ND
1399	****	****	*	+++	****
1400	****	**	--	++	ND
1401	****	***	--	ND	ND
1402	****	***	****	ND	*
1403	****	***	--	ND	ND
1404	****	****	****	ND	**
1405	****	***	***	ND	**
1406	****	****	**	+++	****
1407	****	****	**	+++	****
1408	****	**	**	ND	**
1409	****	**	****	++	*
1410	****	***	***	++	***
1411	****	****	--	+++	ND
1412	****	**	--	ND	ND
1413	***	**	--	ND	***
1414	****	****	****	+++	--

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K_i (μ M)	mMASP- 2 K_i (μ M)	トロンビン K_i (μ M)	レクチン経路 IC_{50} (μ M)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1415	****	****	****	+++	*
1416	****	****	****	+++	**
1417	***	**	--	ND	ND
1418	**	*	--	ND	ND
1419	****	****	****	++++	*
1420	****	****	**	+++	****
1421	****	***	*	ND	****
1422	****	****	**	++	****
1423	****	****	**	+++	****
1424	***	***	****	ND	ND
1425	**	***	--	ND	ND
1426	****	***	***	++++	***
1427	****	****	--	ND	****
1428	****	***	*	++	****
1429	****	****	**	++	****
1430	****	****	--	++	****
1431	****	****	*	+++	****
1432	****	****	*	++	****
1433	****	****	***	+++	****
1434	*	*	--	ND	ND
1435	****	****	*	++	****
1436	***	--	*	ND	**
1437	***	**	--	ND	**
1438	****	***	****	++	**
1439	****	**	--	ND	ND
1440	****	**	--	ND	ND
1441	****	****	--	+++	ND
1442	****	****	--	++	ND
1443	****	****	***	++	***

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K _i (μM)	mMASP- 2 K _i (μM)	トロンビン K _i (μM)	レクチン経路 IC ₅₀ (μM)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1444	****	****	****	++	**
1445	****	***	--	+	****
1446	****	***	--	+	****
1447	****	****	**	++	****
1448	****	**	--	ND	****
1449	****	****	**	++	****
1450	****	****	**	+++	****
1451	****	****	*	++	****
1452	****	****	***	++	****
1453	****	****	*	++++	****
1454	****	****	***	++	***
1455	****	****	--	ND	****
1456	****	***	--	+	ND
1457	*	**	--	ND	ND
1458	****	****	--	ND	****
1459	****	****	**	ND	****
1460	****	****	--	ND	****
1461	****	****	***	ND	****
1462	***	**	*	ND	**
1463	****	****	--	ND	ND
1464	****	****	--	ND	ND
1465	****	***	****	ND	*
1466	****	****	*	ND	****
1467	****	***	--	ND	****
1468	****	****	--	ND	****
1469	****	****	**	ND	****
1470	****	****	**	ND	****
1471	**	**	--	ND	ND
1472	****	****	**	ND	****

10

20

30

40

50

化合物	MASP-2 K_i (μ M)	mMASP- 2 K_i (μ M)	トロンビン K_i (μ M)	レクチン経路 IC_{50} (μ M)	MASP-2 対 トロンビン 選択性
1473	****	****	--	ND	ND
1474	****	****	--	ND	****
1475	****	****	*	ND	****
1476	****	****	**	ND	****
1477	****	****	*	ND	****
1478	****	****	*	ND	****
1479	****	****	*	ND	****
1480	****	***	--	ND	****
1481	****	****	**	ND	****
1482	****	****	***	ND	***
1483	****	****	*	ND	****
1484	***	***	--	ND	ND
1485	****	****	***	ND	**
1486	***	****	**	ND	**
1487	****	ND	--	ND	***
1488	****	**	****	++	--
1489	****	***	****	ND	--
1490	****	**	****	+	--
1491	***	****	****	+	--
1492	****	****	****	+++	**
1493	*	--	*	ND	*
1494	****	****	**	ND	****
1495	**	***	--	ND	**
1496	****	***	--	ND	ND
1497	****	**	**	ND	**

MASP-2阻害およびトロンビン阻害の K_i 値:

* $10 \mu M < K_i \leq 25 \mu M$

** $2.5 \mu M \leq K_i < 10 \mu M$

*** $0.5 \mu M \leq K_i < 2.5 \mu M$

**** $K_i < 0.5 \mu M$

-- $> 25 \mu M$ の K_i

ND 未確定

レクチン経路阻害:

+ $5 \mu M < IC_{50} \leq 50 \mu M$

10

20

30

40

50

++ $0.5 \mu\text{M} \leq \text{IC}_{50} < 5 \mu\text{M}$
 +++ $0.05 \mu\text{M} \leq \text{K}_i < 0.5 \mu\text{M}$
 ++++ $\text{K}_i < 0.05 \mu\text{M}$
 -- $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$

MASP-2阻害対トロンビンについての化合物の選択性:

-- < 1.0 倍
 * $\geq 1.0 \sim < 5.0$ 倍
 ** $\geq 5.0 \sim < 25$ 倍
 *** $\geq 25 \sim < 100$ 倍
 **** ≥ 100 倍

ND 未確定

【0717】

(表17C) MASP-2/トロンビン/レクチン経路の阻害

化合物番号	MASP-2 K_i (μM)	トロンビン K_i (μM)	レクチン K_i	MASP-2 対 トロンビン 選択性
2000	**** (+Zn) -- (+EDTA)	** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	++ (+Zn)
2001	**** (+Zn) -- (+EDTA)	*** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	++ (+Zn)
2002	*** (+Zn) -- (+EDTA)	* (+Zn) -- (+EDTA)	ND	++ (+Zn)
2003	***** (+Zn) -- (+EDTA)	*** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	+++ (+Zn)
2004	**** (+Zn) -- (+EDTA)	**** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	+ (+Zn)

10

20

30

40

50

化合物番号	MASP-2 K_i (μ M)	トロンビン K_i (μ M)	レクチン K_i	MASP-2 対 トロンビン 選択性
2005	***** (+Zn) -- (+EDTA)	***** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	+ (+Zn)
2006	** (+Zn) -- (+EDTA)	-- (+Zn) -- (+EDTA)	ND	+ (+Zn)
2007	**** (+Zn) -- (+EDTA)	*** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	++ (+Zn)
2008	**** (+Zn) -- (+EDTA)	** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	+++ (+Zn)
2009	**** (+Zn) -- (+EDTA)	*** (+Zn) * (+EDTA)	ND	++ (+Zn)
2010	***** (+Zn) -- (+EDTA)	*** (+Zn) * (+EDTA)	ND	++ (+Zn)
2011	**** (+Zn) -- (+EDTA)	*** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	++ (+Zn)
2012	***** (+Zn) -- (+EDTA)	***** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	+ (+Zn)
2013	**** (+Zn) -- (+EDTA)	** (+Zn) -- (+EDTA)	ND	++++ (+Zn)
2014	**** (+Zn) -- (+EDTA)	*** (+Zn) * (+EDTA)	ND	+++ (+Zn)
2015	*** (- Zn) ***** (+Zn) -- (+EDTA)]	*** (- Zn) ***** (+Zn) -- (+EDTA)]	ND	+ (+Zn)
2016	**** (+Zn) -- (+EDTA)	* (+Zn) * (+EDTA)	ND	+++ (+Zn)
2017	***	--	ND	>++
2018	***	--	ND	>++
2019	**	--	ND	>+
2020	*	--	ND	>+
2021	**	--	+	>++

MASP-2阻害およびトロンビン阻害の K_i 値:

- * 25 μ M未満の K_i 値
- ** 10 μ M未満の K_i 値
- *** 2.5 μ M未満の K_i 値
- **** 0.5 μ M未満の K_i 値
- ***** 0.05 μ M未満の K_i 値
- $\geq 25 \mu$ Mの K_i 値

レクチン経路阻害:

- > 50 μ Mの IC_{50} 値

10

20

30

40

50

+ 5 μ M ~ 50 μ M の範囲にあるIC₅₀値

MASP-2対トロンビンについての化合物の選択性:

-- 1.0倍未満

+ 1.0~5.0倍

++ 5.0~25倍

+++ 25~100倍

++++ >100倍

ND 未確定

【0718】

前記に基づいて、一局面において、本発明は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した哺乳動物対象において、急性呼吸窮迫症候群またはこの疾患の他の症状発現、例えば血栓症を、処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに(すなわち、レクチン経路活性化を阻害するのに)有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一部の態様において、前記対象は1つもしくは複数の呼吸症状および/または血栓症に罹患しており、前記方法は、少なくとも1つの呼吸症状を改善するのに(すなわち、呼吸機能を改善するのに)、および/または血栓症を軽減させるのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む。

【0719】

一態様において、前記方法は、COVID-19に感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、SARS-CoVに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、MERS-CoVに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記対象は、MASP-2阻害物質の投与前に、コロナウイルス(すなわち、COVID-19、SARS-CoV、またはMERS-CoV)を有すると特定されている。一態様において、前記対象はCOVID-19に感染していると特定されており、酸素補給を必要としており、MASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体、例えば、ナルソプリマブは、酸素補給の必要をなくするのに有効な投与量および期間、前記対象に投与される。

【0720】

一態様において、前記対象はCOVID-19を有すると特定されており、COVID-19誘発性血栓症に罹患しているかまたはその発症リスクがあり、前記方法は、前記対象において凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、またはその重症度を低減させるのに治療上有効な量のMASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体、例えば、ナルソプリマブ)を含む組成物を投与する工程を含む。一部の態様において、本発明の方法は、止血に影響を及ぼすことなく抗凝固効果および/または抗血栓症および/または抗血栓形成をもたらす。一態様において、前記対象における血栓症の存在または非存在を確かめるために、COVID-19に罹患している対象においてD-ダイマーレベルが測定され、標準範囲より高いD-ダイマーレベルは血栓症の存在を示し、前記対象は、前記対象において凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、またはその重症度を低減させるのに治療上有効な量のMASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体、例えば、ナルソプリマブ)で処置され、これは、例えば、D-ダイマーレベルが健常対象の正常範囲内に低減することで測定することができる。

【0721】

一態様において、前記方法は、インフルエンザウイルス、例えば、インフルエンザA型ウイルス(H1N1(1918年に「スペイン風邪」および2009年に「ブタインフルエンザ」の原因となった);H2N2(1957年に「アジア風邪」の原因となった)、H3N2(1968年に香港風邪の原因となった)、H5N1(2004年に「鳥インフルエンザ(Bird Flu)」の原因となった)、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9、およびH6N1);またはインフルエンザB型ウイルス、またはインフルエンザC型ウイルスに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記対象は、MASP-2阻害物質の投与前にインフルエンザウイルスを有すると特定されている。

10

20

30

40

50

【0722】

一態様において、前記対象は、MASP-2阻害物質処置前に前記対象から得られた血液試料中に、対照健常対象または集団にある循環内皮細胞のレベルと比較して高レベルの循環内皮細胞を有することが確かめられている。一部の態様において、前記方法は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象における循環内皮細胞の数を低減させるのに十分な量で、ある量のMASP-2阻害物質を投与する工程を含む。

【0723】

一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化を阻害する低分子である。

【0724】

一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2の発現阻害因子である。

【0725】

一態様において、MASP-2阻害抗体は、ヒトMASP-2に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片である。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその断片は、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される。一態様において、MASP-2阻害抗体は古典経路を実質的に阻害しない。一態様において、MASP-2阻害抗体は90%ヒト血清中でのC3b沈着を30 nM以下のIC₅₀で阻害する。

【0726】

一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0727】

一部の態様において、前記方法は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むMASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を、1mg/kg～10mg/kg(すなわち、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、または10mg/kg)の投与量で、少なくとも2週間(例えば、少なくとも3週間、または少なくとも4週間、または少なくとも5週間、または少なくとも6週間、または少なくとも7週間、または少なくとも8週間、または少なくとも9週間、または少なくとも10週間、または少なくとも11週間、または少なくとも12週間)の期間にわたって少なくとも週1回(例えば、少なくとも週2回または少なくとも週3回)、投与する工程を含む。

【0728】

一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は約4mg/kg(すなわち、3.6mg/kg～4.4mg/kg)である。

【0729】

一態様において、MASP-2阻害抗体(例えば、ナルソプリマブ)の投与量は、COVID-19に罹患している対象に、約4mg/kg(すなわち、3.6mg/kg～4.4mg/kg)の投与量で、少なくとも2週間、または少なくとも3週間、または少なくとも4週間(例えば、2週間～4週間)の期間にわたって少なくとも週2回投与される。

【0730】

一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は、約300mg～約450mg(すなわち、約300mg～約400mg、または約350mg～約400mg)、例えば、約300mg、約305mg、約310mg、約315mg、約320mg、約325mg、約330mg、約335mg、約340mg、約345mg、約350mg、約355mg、約360mg、約365mg、約370mg、約375mg、約380mg、約385mg、約390mg、約395mg、約400mg、約405mg、約410mg、約415mg、約

10

20

30

40

50

420mg、約425mg、約430mg、約435mg、約440mg、約445mg、または約450mg)の一定用量である。一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は約370mg($\pm 10\%$)の一定用量である。

【0731】

一態様において、前記方法は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に、約370mg($\pm 10\%$)の一定の投与量のMASP-2阻害抗体を少なくとも8週間の処置期間にわたって週2回を静脈内投与する工程を含む。

【0732】

一態様において、MASP-2阻害物質は対象に全身送達される。一態様において、MASP-2阻害物質は、経口投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与

10

【0733】

一態様において、前記対象はCOVID-19誘発性肺炎またはARDSに罹患しており、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、肺炎またはARDSの1つまたは複数の症状を軽減させるのに十分な時間にわたって投与される。一態様において、前記対象は人工呼吸器を付けており、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、機械的換気の必要をなくするのに十分な投与量および期間、投与される。一態様において、前記対象は侵襲的人工呼吸器を付けている。一態様において、前記対象は非侵襲的人工呼吸器を付けている。一態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、酸素補給の必要をなく

20

【0734】

一態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は単独療法としてコロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に投与される。一部の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に、1種類または複数種のさらなる治療剤と組み合わせて、例えば、MASP-2阻害物質と、1種類もしくは複数種の抗ウイルス剤、または1種類もしくは複数種の抗凝固剤、あるいは1種類もしくは複数種の治療用抗体または1種類もしくは複数種の治療用低分子化合物を含む薬学的組成物の形で投与される。一部の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に投与され、前記対象は、1種類または複数種のさらなる治療剤、例えば、1種類もしくは複数種の抗ウイルス剤、または1種類もしくは複数種の抗凝固剤、あるいは1種類もしくは複数種の治療用抗体または1種類もしくは複数種の治療用低分子化合物による処置を受けている。

30

【0735】

前記に基づいて、別の局面において、本発明は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した哺乳動物対象において1つもしくは複数の長期後遺症を処置する、寛解させる、予防する、またはその発症リスクを低減させるための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに(すなわち、レクチン経路活性化を阻害するのに)有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法を提供する。一部の態様において、前記対象は1つもしくは複数の呼吸症状および/または血栓症に罹患しており、前記方法は、少なくとも1つの呼吸症状を改善するのに(すなわち、呼吸機能を改善するのに)、および/または血栓症を軽減させるのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む。

40

【0736】

一態様において、前記方法は、COVID-19に感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、SARS-CoVに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記方法は、MERS-CoVに感染した対象に前記組成物を投与する工程を含む。一態様において、前記対象は、MASP-2阻害物質の投与前にコロナウイルス(すなわち、COVID-19、SARS-CoV、またはMERS-CoV)を有すると特定されている。一態様において、前記対象はSARS-CoV-2に感染していると特定されており、酸素

50

補給を必要としており、MASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体、例えば、ナルソプリマブは、酸素補給の必要をなくするのに有効な投与量および期間、前記対象に投与される。

【0737】

一態様において、前記対象はCOVID-19に感染していると特定されており、軽度症状を経験し、MASP-2阻害物質、例えば、MASP-2阻害抗体、例えば、ナルソプリマブは、前記対象において1つもしくは複数のCOVID-19関連長期後遺症を処置する、寛解させる、予防する、またはその発症リスクを低減させるのに有効な投与量および期間、前記対象に投与される。一部の態様において、前記方法は、COVID-19に罹患している対象またはCOVID-19に以前に感染した対象において、1つもしくは複数のCOVID-19関連長期後遺症を処置する、寛解させる、予防する、またはその発症リスクを低減させるのに有用であり、長期後遺症は、COVID-19に感染したことがある対象における心血管合併症(心筋損傷、心筋症、心筋炎、血管内凝固、脳卒中、静脈および動脈合併症、ならびに肺血栓症を含む); 神経学的合併症(認知困難、混乱状態、記憶喪失、「ブレインフォグ」とも呼ばれるもの、頭痛、脳卒中、めまい、失神、発作、食欲不振、不眠、嗅覚脱失、味覚脱失、ミオクローヌス、神経因性疼痛、筋肉痛; 例えばアルツハイマー病、ギランバレー症候群、ミラー・フィッシャー症候群、パーキンソン病等の神経学的疾患の発症を含む); 腎臓損傷(例えば、急性腎障害(AKI); 肺線維症、呼吸困難、肺塞栓症を含む肺合併症)、ならびに炎症状態、例えば、川崎病、川崎病様疾患、小児多系統炎症性症候群(MIS-C)、および多系統臓器不全からなる群より選択される。最近、発表されたデータから、小児SARS-CoV-2感染症は臨床重症度に関係なく高発生率のTMAを引き起こすことが分かっている(Diorio C. et al., Blood Advances vol 4(23), Dec 8, 2020を参照されたい)。小児SARS-CoV-2感染症は炎症性多系統症候群(MIS-C)の原因となり得ることも報告されている(Radia T. et al., Paediatr Respir Rev Aug 11, 2020を参照されたい)。

【0738】

最近、複数の国際グループが、「回復した」COVID-19患者の60%超に、認知/CNS異常、肺異常、心臓異常、肝臓異常、および他の異常を含む重篤な後遺症があるという報告を発表した(例えば、Bonow et al., JAMA Cardiology vol 5(7) July 2020; Del Rio et al., JAMA vol 324 (17), November 2020; Lindner et al., JAMA Cardiology vol 5(11), November 2020; Marchiano S. et al., bioRxiv, August 30, 2020; Puntmann V. et al., JAMA Cardiology vol 5 (11), November 2020; Xiong Q. et al., Clin Microbial Infect 2020を参照されたい)。例えば、Yelin D. et al., Lancet Infect Dis 2020, 9/1/2020に記載のように、急性COVID-19から回復している人の長期愁訴には、極度の疲労、筋力低下、微熱、集中力の欠如、記憶の欠落、気分変化、睡眠困難、腕および脚における針で刺されるような痛み、下痢および嘔吐、味覚および嗅覚の喪失、咽頭痛および嚥下困難、糖尿病および高血圧の新規発症、皮膚発疹、息切れ、胸痛、ならびに動悸が含まれる。注目すべきことに、本明細書中の実施例21および22に記載のように、ナルソプリマブで処置した6人の初期ベルガモ研究COVID-19患者に対する5~6ヶ月経過観察から、長期のCOVID-19後遺症の臨床証拠または臨床検査証拠は示されなかった。

【0739】

一態様において、前記対象は、MASP-2阻害物質処置前に前記対象から得られた血液試料中に、対照健常対象または集団にある循環内皮細胞のレベルと比較して高レベルの循環内皮細胞を有することが確かめられている。一部の態様において、前記方法は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象における循環内皮細胞の数を低減させるのに十分な量で、ある量のMASP-2阻害物質を投与する工程を含む。

【0740】

一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2依存性補体活性化を阻害する低分子である。

【0741】

10

20

30

40

50

一態様において、MASP-2阻害物質は、MASP-2の発現阻害因子である。

【0742】

一態様において、MASP-2阻害抗体は、ヒトMASP-2に特異的に結合するモノクローナル抗体またはその断片である。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその断片は、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される。一態様において、MASP-2阻害抗体は古典経路を実質的に阻害しない。一態様において、MASP-2阻害抗体は90%ヒト血清中でのC3b沈着を30 nM以下のIC₅₀で阻害する。

【0743】

一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む。一態様において、MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片は、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0744】

一部の態様において、前記方法は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むMASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片を含む組成物を、1mg/kg～10mg/kg(すなわち、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、または10mg/kg)の投与量で、少なくとも2週間(例えば、少なくとも3週間、または少なくとも4週間、または少なくとも5週間、または少なくとも6週間、または少なくとも7週間、または少なくとも8週間、または少なくとも9週間、または少なくとも10週間、または少なくとも11週間、または少なくとも12週間)の期間にわたって少なくとも週1回(例えば、少なくとも週2回または少なくとも週3回)、投与する工程を含む。

【0745】

一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は約4mg/kg(すなわち、3.6mg/kg～4.4mg/kg)である。

【0746】

一態様において、MASP-2阻害抗体(例えば、ナルソプリマブ)の投与量は、COVID-19に罹患している対象に、約4mg/kg(すなわち、3.6mg/kg～4.4mg/kg)の投与量で、少なくとも2週間、または少なくとも3週間、または少なくとも4週間、または少なくとも5週間、または少なくとも6週間、または少なくとも7週間、または少なくとも8週間の期間(例えば、2週間～4週間、または2週間～5週間または2～6週間、または2週間～7週間、または2週間～8週間)にわたって少なくとも週2回投与される。

【0747】

一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は、約300mg～約450mg(すなわち、約300mg～約400mg、または約350mg～約400mg)、例えば、約300mg、約305mg、約310mg、約315mg、約320mg、約325mg、約330mg、約335mg、約340mg、約345mg、約350mg、約355mg、約360mg、約365mg、約370mg、約375mg、約380mg、約385mg、約390mg、約395mg、約400mg、約405mg、約410mg、約415mg、約420mg、約425mg、約430mg、約435mg、約440mg、約445mg、または約450mg)の一定用量である。一態様において、MASP-2阻害抗体の投与量は約370mg(±10%)の一定用量である。

【0748】

一態様において、前記方法は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に、約370mg(±10%)の一定の投与量のMASP-2阻害抗体を、少なくとも8週間の処置期間にわたって週2回、静脈内投与する工程を含む。

【0749】

10

20

30

40

50

一態様において、MASP-2阻害物質は対象に全身送達される。一態様において、MASP-2阻害物質は、経口投与、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与されるか、または吸入剤として投与される。

【0750】

一態様において、前記対象はCOVID-19誘発性肺炎またはARDSに罹患しており、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、肺炎またはARDSの1つまたは複数の症状を軽減させ、かつCOVID-19関連長期後遺症を軽減させるまたは予防するのに十分な時間にわたって投与される。一態様において、前記対象は人工呼吸器を付けており、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、機械的換気の必要をなくするのに十分な投与量および期間、投与される。一態様において、前記対象は侵襲的人工呼吸器を付けている。一態様において、前記対象は非侵襲的人工呼吸器を付けている。一態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、酸素補給の使用をなくするのに十分な投与量および期間、投与される。

【0751】

一態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に単独療法として投与される。一部の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に、1種類または複数種のさらなる治療剤と組み合わせて、例えば、MASP-2阻害物質と、1種類もしくは複数種の抗ウイルス剤、または1種類もしくは複数種の抗凝固剤、あるいは1種類もしくは複数種の治療用抗体または1種類もしくは複数種の治療用低分子化合物を含む薬学的組成物の形で投与される。一部の態様において、MASP-2阻害物質(例えば、MASP-2阻害抗体)は、コロナウイルスまたはインフルエンザウイルスに感染した対象に投与され、前記対象は、1種類または複数種のさらなる治療剤、例えば、1種類もしくは複数種の抗ウイルス剤または1種類もしくは複数種の抗凝固剤、あるいは1種類もしくは複数種の治療用抗体、あるいは1種類もしくは複数種の治療用低分子化合物による処置を受けている。

【0752】

他の態様

1. コロナウイルスに感染した対象において急性呼吸窮迫症候群を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法

1. コロナウイルスに感染した哺乳動物対象において、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、またはコロナウイルス感染症の他の何らかの肺での症状発現もしくは他の症状発現、例えば血栓症を、処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法。

2. MASP-2阻害物質がMASP-2抗体またはその断片である、パラグラフ1記載の方法。

3. MASP-2阻害物質が、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である、パラグラフ2記載の方法。

4. MASP-2抗体またはその断片が、SEQ ID NO:6を含むポリペプチドに、補体系における異なる抗原に結合するよりも少なくとも10倍高い親和性で特異的に結合する、パラグラフ2記載の方法。

5. 抗体またはその断片が、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される、パラグラフ2記載の方法。

6. MASP-2阻害抗体が、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する、パラグラフ2記載の方法。

7. MASP-2阻害抗体が、10%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、パラグラフ2記載の方法。

8. MASP-2阻害抗体が、90%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、パラグラフ2記載の方法。

9. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列の

10

20

30

40

50

CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ2記載の方法。

10. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ2記載の方法。

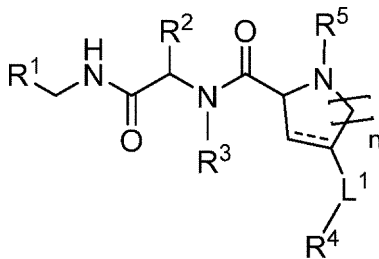
11. MASP-2阻害物質が低分子MASP-2阻害化合物である、パラグラフ1記載の方法。

12. MASP-2阻害化合物が合成低分子または半合成低分子である、パラグラフ11記載の方法。

13. MASP-2阻害物質が、MASP-2の発現阻害因子である、パラグラフ1記載の方法。

14. 低分子MASP-2阻害化合物が、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)、または(VIIB)のいずれか1つの化合物である、パラグラフ11記載の方法。

15. 低分子MASP-2阻害化合物が、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

====

が二重結合または単結合を表し、

R¹が、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R²が、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R³が、水素、アルキル、ハロアルキル、もしくはシクロアルキルであるか、またはR²およびR³が、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒に、置換されていてもよい4~7員環ヘテロシクリルを形成し、

R⁴が、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R⁵が、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、(CH₂)_mC(=O)OR⁶、C(=O)R⁶、C(=O)OR⁶、(CH₂)_mNR⁶S(O)₂R⁷、またはC(=O)NR⁶R⁷であり、

R⁶およびR⁷が、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルであり、

L¹が、直接結合、-CR^{8a}R^{8b}-、-S(O)_t-、NR^{8c}、または-O-であり、

R^{8a}およびR^{8b}がそれぞれ独立して、水素、アルキル、またはR^{8a}およびR^{8b}であり、それら結合している炭素と一緒に、置換されていてもよい3~6員環シクロアルキルを形成し、

R^{8c}が、水素、アルキル、ハロアルキル、(C=O)アルキル、(C=O)Oアルキル、(C=O)シクロアルキル、(C=O)Oシクロアルキル、(C=O)アリール、(C=O)Oアリール、(C=O)ヘテロアリール、(C=O)Oヘテロアリール、(C=O)ヘテロシクリル、(C=O)Oヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルアルキルであり、

nが、1または2であり、

mが、1、2、3、4、5、または6であり、

tが、0、1、または2である、

パラグラフ11記載の方法。

16. 低分子MASP-2阻害化合物が表4A、4B、4C、4D、または4Eの化合物である、パラグラフ11記載の方法。

17. 低分子MASP-2阻害化合物が、分子量200Da~2,000Da、250Da~2,000Da、300Da~2,000Da、300Da~1,000Da、300Da~600Da、350Da~2,000Da、350Da~1,500Da、350Da~1,200Da、350Da~1,000Da、350Da~900Da、350Da~800Da、350Da~700Da、350Da~600Daの低分子である、パラグラフ11記載の方法。

10

18. 低分子MASP-2阻害化合物が、グアニジン基およびベンズアミジン基より選択される0~1個の塩基性基を有する、パラグラフ11記載の方法。

19. 低分子MASP-2阻害化合物が、約25 μ M未満、約10 μ M未満、約2.5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.1 μ M未満のMASP-2阻害Ki値を有する、パラグラフ11記載の方法。

20. 低分子MASP-2阻害化合物が、約50 μ M未満、約5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.05 μ M未満のレクチン経路阻害IC₅₀を有するレクチン経路阻害因子である、パラグラフ11記載の方法。

21. 低分子MASP-2阻害化合物が、約2倍超、約5倍超、約10倍超、約25倍超、約50倍超、または約100倍超のMASP-2阻害対トロニン阻害の選択性を有する選択的MASP-2阻害因子である、パラグラフ11記載の方法。

20

22. 低分子MASP-2阻害化合物のMASP-2に対する親和性がトロニンに対する親和性より高く、MASP-2:トロニンの選択性比が少なくとも1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、または30:1である、パラグラフ11記載の方法。

22. 低分子MASP-2阻害化合物がMASP-2の共有結合阻害因子でない、パラグラフ11記載の方法。

23. 低分子MASP-2阻害化合物が内因性MASP-2リガンドでも基質でもない、パラグラフ11記載の方法。

30

24. MASP-2阻害物質が、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与、経口投与されるか、または吸入剤として投与される、パラグラフ1~23のいずれか一項記載の方法。

25. コロナウイルスが重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2(他にSARSコロナウイルス2またはSARS-CoV-2とも呼ばれる)である、パラグラフ1~24のいずれか一項記載の方法。

26. コロナウイルスが重症急性呼吸器症候群コロナウイルス(SARS-CoV)である、パラグラフ1~24のいずれか一項記載の方法。

27. コロナウイルスが中東呼吸器症候群コロナウイルス(MERS-CoV)である、パラグラフ1~24のいずれか一項記載の方法。

28. 対象が、MASP-2阻害物質の投与前にコロナウイルスを有すると特定されている、パラグラフ1~27のいずれか一項記載の方法。

40

29. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が呼吸機能を改善するのに有効な量で投与される、パラグラフ1~28のいずれか一項記載の方法。

30. 哺乳動物対象がヒト対象である、パラグラフ1~29のいずれか一項記載の方法。

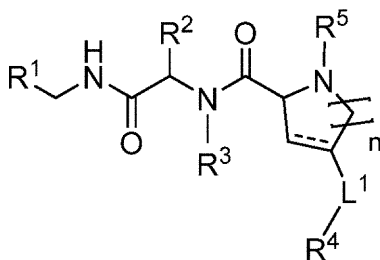
【0753】

II.COVID-19誘発性急性呼吸窮迫症候群(ARDS)または肺炎に罹患しているヒト対象を処置するための方法

1. COVID-19誘発性急性呼吸窮迫症候群(ARDS)または肺炎に罹患しているヒト対象を処置するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法。

50

2. 対象が処置前に人工呼吸器を付けており、かつMASP-2阻害物質が、機械的換気の必要をなくするのに十分な投与量および期間、投与される、パラグラフ1記載の方法。
3. 対象が侵襲的人工呼吸器を付けている、パラグラフ2記載の方法。
4. 対象が非侵襲的人工呼吸器を付けている、パラグラフ2記載の方法。
5. 対象が、処置前に酸素補給を必要としており、かつMASP-2阻害物質が、酸素補給の使用をなくするのに十分な投与量および期間、投与される、パラグラフ1記載の方法。
6. MASP-2阻害物質がMASP-2抗体またはその断片である、パラグラフ1～5のいずれか一項記載の方法。
7. MASP-2阻害物質が、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である、パラグラフ6記載の方法。
8. MASP-2抗体またはその断片が、SEQ ID NO:6を含むポリペプチドに、補体系における異なる抗原に結合するよりも少なくとも10倍高い親和性で特異的に結合する、パラグラフ6または7記載の方法。
9. 抗体またはその断片が、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される、パラグラフ6～8のいずれか一項記載の方法。
10. MASP-2阻害抗体が、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する、パラグラフ6～9のいずれか一項記載の方法。
11. MASP-2阻害抗体が、10%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、パラグラフ6～10のいずれか一項記載の方法。
12. MASP-2阻害抗体が、90%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、パラグラフ6～10のいずれか一項記載の方法。
13. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ6～12のいずれか一項記載の方法。
14. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ6～13のいずれか一項記載の方法。
15. MASP-2阻害物質が低分子MASP-2阻害化合物である、パラグラフ1～5のいずれか一項記載の方法。
16. MASP-2阻害化合物が合成低分子または半合成低分子である、パラグラフ15記載の方法。
17. MASP-2阻害物質が、MASP-2の発現阻害因子である、パラグラフ1記載の方法。
18. 低分子MASP-2阻害化合物が、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)、または(VIIB)のいずれか1つの化合物である、パラグラフ15記載の方法。
19. 低分子MASP-2阻害化合物が、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、
 式中、

が二重結合または単結合を表し、

R^1 が、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R^2 が、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R^3 が、水素、アルキル、ハロアルキル、もしくはシクロアルキルであるか、または R^2 および R^3 が、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒にあって、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^4 が、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^5 が、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、 $(CH_2)_mC(=O)OR^6$ 、 $C(=O)R^6$ 、 $C(=O)OR^6$ 、 $(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$ 、または $C(=O)NR^6R^7$ であり、

R^6 および R^7 が、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルであり、

L^1 が、直接結合、 $-CR^{8a}R^{8b}-$ 、 $-S(O)_t-$ 、 NR^{8c} 、または $-O-$ であり、

R^{8a} および R^{8b} が、それぞれ独立して、水素、アルキル、または R^{8a} および R^{8b} であり、それらが結合している炭素と一緒にあって、置換されていてもよい3～6員環シクロアルキルを形成し、

R^{8c} が、水素、アルキル、ハロアルキル、 $(C=O)$ アルキル、 $(C=O)O$ アルキル、 $(C=O)$ シクロアルキル、 $(C=O)O$ シクロアルキル、 $(C=O)$ アリール、 $(C=O)O$ アリール、 $(C=O)$ ヘテロアリール、 $(C=O)O$ ヘテロアリール、 $(C=O)$ ヘテロシクリル、 $(C=O)O$ ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルアルキルであり、

n が、1または2であり、

m が、1、2、3、4、5、または6であり、

t が、0、1、または2である、

パラグラフ15記載の方法。

20. 低分子MASP-2阻害化合物が表4A、4B、4C、4D、または4Eの化合物である、パラグラフ15記載の方法。

21. 低分子MASP-2阻害化合物が、分子量200Da～2,000Da、250Da～2,000Da、300Da～2,000Da、300Da～1,000Da、300Da～600Da、350Da～2,000Da、350Da～1,500Da、350Da～1,200Da、350Da～1,000Da、350Da～900Da、350Da～800Da、350Da～700Da、350Da～600Daの低分子である、パラグラフ15記載の方法。

22. 低分子MASP-2阻害化合物が、グアニジン基およびベンズアミジン基より選択される0～1個の塩基性基を有する、パラグラフ15記載の方法。

23. 低分子MASP-2阻害化合物が、約25 μM 未満、約10 μM 未満、約2.5 μM 未満、約1 μM 未満、約0.5 μM 未満、または約0.1 μM 未満のMASP-2阻害 K_i 値を有する、パラグラフ15記載の方法。

24. 低分子MASP-2阻害化合物が、約50 μM 未満、約5 μM 未満、約1 μM 未満、約0.5 μM 未満、または約0.05 μM 未満のレクチン経路阻害 IC_{50} を有するレクチン経路阻害因子である、パラグラフ15記載の方法。

25. 低分子MASP-2阻害化合物が、約2倍超、約5倍超、約10倍超、約25倍超、約50倍超、または約100倍超のMASP-2阻害対トロニン阻害の選択性を有する選択的MASP-2阻害因子である、パラグラフ15記載の方法。

26. 低分子MASP-2阻害化合物のMASP-2に対する親和性がトロニンに対する親和性より高く、MASP-2:トロニンの選択性比が少なくとも1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、または30:1である、パラグラフ15記載の方法。

10

20

30

40

50

27. 低分子MASP-2阻害化合物がMASP-2の共有結合阻害因子でない、パラグラフ15記載の方法。

28. 低分子MASP-2阻害化合物が内因性MASP-2リガンドでも基質でもない、パラグラフ15記載の方法。

29. MASP-2阻害物質が、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与、経口投与されるか、または吸入剤として投与される、パラグラフ1～28のいずれか一項記載の方法。

【0754】

III. SARS-CoV-2に感染したヒト対象において血栓症を処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法

1. SARS-CoV-2に感染したヒト対象において重症度または凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、または軽減させるための方法であって、前記対象において凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、またはその重症度を軽減させるのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法。

2. 対象が処置前に標準範囲より高いD-ダイマーレベルを有し、かつMASP-2阻害物質が、前記対象におけるD-ダイマーレベルを健常対象の正常範囲内に低減させるのに十分な量および時間、投与される、パラグラフ1記載の方法。

3. MASP-2阻害物質が止血に影響を及ぼすことなく抗凝固効果および/または抗血栓症効果をもたらす、パラグラフ1または2記載の方法。

4. MASP-2阻害物質がMASP-2抗体またはその断片である、パラグラフ1～3のいずれか一項記載の方法。

5. MASP-2阻害物質が、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である、パラグラフ4記載の方法。

6. MASP-2抗体またはその断片が、SEQ ID NO:6を含むポリペプチドに、補体系における異なる抗原に結合するよりも少なくとも10倍高い親和性で特異的に結合する、パラグラフ4または5記載の方法。

7. 抗体またはその断片が、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される、パラグラフ4～6のいずれか一項記載の方法。

8. MASP-2阻害抗体が、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する、パラグラフ4～7のいずれか一項記載の方法。

9. MASP-2阻害抗体が、10%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、パラグラフ4～8のいずれか一項記載の方法。

10. MASP-2阻害抗体が、90%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、パラグラフ4～9のいずれか一項記載の方法。

11. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ4～10のいずれか一項記載の方法。

12. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ4～11のいずれか一項記載の方法。

13. MASP-2阻害物質が低分子MASP-2阻害化合物である、パラグラフ1～3のいずれか一項記載の方法。

14. MASP-2阻害化合物が合成低分子または半合成低分子である、パラグラフ13記載の方法。

15. MASP-2阻害物質が、MASP-2の発現阻害因子である、パラグラフ1記載の方法。

16. 低分子MASP-2阻害化合物が、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)、または(VIIB)のいずれか1つの化合物である、パラグラフ13記載の方法。

10

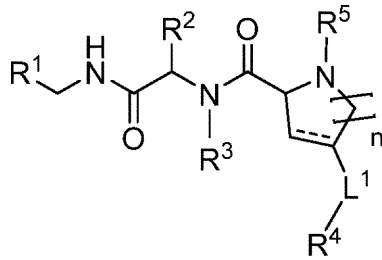
20

30

40

50

17. 低分子MASP-2阻害化合物が、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

が二重結合または単結合を表し、

R^1 が、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R^2 が、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R^3 が、水素、アルキル、ハロアルキル、もしくはシクロアルキルであるか、または R^2 および R^3 が、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒に、置換されていてもよい4~7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^4 が置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^5 が、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、 $(CH_2)_mC(=O)OR^6$ 、 $C(=O)R^6$ 、 $C(=O)OR^6$ 、 $(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$ 、または $C(=O)NR^6R^7$ であり、

R^6 および R^7 が、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルであり、

L^1 が、直接結合、 $-CR^{8a}R^{8b}-$ 、 $-S(O)_t-$ 、 NR^{8c} 、または $-O-$ であり、

R^{8a} および R^{8b} がそれぞれ独立して、水素、アルキル、または R^{8a} および R^{8b} であり、それらが結合している炭素と一緒に、置換されていてもよい3~6員環シクロアルキルを形成し、

R^{8c} が、水素、アルキル、ハロアルキル、 $(C=O)$ アルキル、 $(C=O)O$ アルキル、 $(C=O)$ シクロアルキル、 $(C=O)O$ シクロアルキル、 $(C=O)$ アリール、 $(C=O)O$ アリール、 $(C=O)$ ヘテロアリール、 $(C=O)O$ ヘテロアリール、 $(C=O)$ ヘテロシクリル、 $(C=O)O$ ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルアルキルであり、

n が、1または2であり、

m が、1、2、3、4、5、または6であり、

t が、0、1、または2である、

パラグラフ13記載の方法。

18. 低分子MASP-2阻害化合物が表4A、4B、4C、4D、または4Eの化合物である、パラグラフ13記載の方法。

19. 低分子MASP-2阻害化合物が、分子量200Da~2,000Da、250Da~2,000Da、300Da~2,000Da、300Da~1,000Da、300Da~600Da、350Da~2,000Da、350Da~1,500Da、350Da~1,200Da、350Da~1,000Da、350Da~900Da、350Da~800Da、350Da~700Da、350Da~600Daの低分子である、パラグラフ13記載の方法。

20. 低分子MASP-2阻害化合物が、グアニジン基およびベンズアミジン基より選択される0~1個の塩基性基を有する、パラグラフ13記載の方法。

10

20

30

40

50

21. 低分子MASP-2阻害化合物が、約25 μ M未満、約10 μ M未満、約2.5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.1 μ M未満のMASP-2阻害 K_i 値を有する、パラグラフ13記載の方法。

22. 低分子MASP-2阻害化合物が、約50 μ M未満、約5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.05 μ M未満のレクチン経路阻害 IC_{50} を有するレクチン経路阻害因子である、パラグラフ13記載の方法。

23. 低分子MASP-2阻害化合物が、約2倍超、約5倍超、約10倍超、約25倍超、約50倍超、または約100倍超のMASP-2阻害対トロニン阻害の選択性を有する選択的MASP-2阻害因子である、パラグラフ13記載の方法。

24. 低分子MASP-2阻害化合物のMASP-2に対する親和性がトロニンに対する親和性より高く、MASP-2:トロニンの選択性比が少なくとも1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、または30:1である、パラグラフ13記載の方法。

25. 低分子MASP-2阻害化合物がMASP-2の共有結合阻害因子でない、パラグラフ13記載の方法。

26. 低分子MASP-2阻害化合物が内因性MASP-2リガンドでも基質でもない、パラグラフ13記載の方法。

27. MASP-2阻害物質が、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与、経口投与されるか、または吸入剤として投与される、パラグラフ1~26のいずれか一項記載の方法。

【0755】

IV.SARS-CoV-2に感染したことがあるヒト対象において、1つもしくは複数のCOVID-19関連長期後遺症を処置する、寛解させる、予防する、またはその発症リスクを低減させるための方法

1. SARS-CoV-2に現在感染しているかまたはSARS-CoV-2に感染したことがあるヒト対象において、1つもしくは複数のCOVID-19関連長期後遺症を処置する、寛解させる、予防する、またはその発症リスクを低減させるための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法。

2. 対象がCOVID-19誘発性肺炎またはARDSに罹患しており、かつMASP-2阻害物質が呼吸機能を改善するのに有効な量で投与される、パラグラフ1記載の方法。

3. 対象がCOVID-19誘発性凝固または血栓症に罹患しており、かつMASP-2阻害物質が、前記対象において凝固もしくは血栓症を処置する、予防する、またはその重症度を低減させるのに有効な量で前記対象に投与される、パラグラフ1記載の方法。

4. MASP-2阻害物質がMASP-2抗体またはその断片である、パラグラフ1~3のいずれか一項記載の方法。

5. MASP-2阻害物質が、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である、パラグラフ4記載の方法。

6. MASP-2抗体またはその断片が、SEQ ID NO:6を含むポリペプチドに、補体系における異なる抗原に結合するよりも少なくとも10倍高い親和性で特異的に結合する、パラグラフ4または5記載の方法。

7. 抗体またはその断片が、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される、パラグラフ4~6のいずれか一項記載の方法。

8. MASP-2阻害抗体が、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する、パラグラフ4~7のいずれか一項記載の方法。

9. MASP-2阻害抗体が、10%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下の IC_{50} で阻害する、パラグラフ4~8のいずれか一項記載の方法。

10. MASP-2阻害抗体が、90%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下の IC_{50} で阻害する、パラグラフ4~9のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

40

50

11. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ4～10のいずれか一項記載の方法。

12. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ4～11のいずれか一項記載の方法。

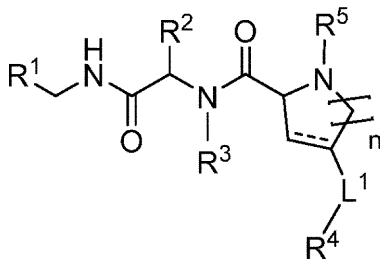
13. MASP-2阻害物質が低分子MASP-2阻害化合物である、パラグラフ1～3のいずれか一項記載の方法。

14. MASP-2阻害化合物が合成低分子または半合成低分子である、パラグラフ13記載の方法。

15. MASP-2阻害物質が、MASP-2の発現阻害因子である、パラグラフ1記載の方法。

16. 低分子MASP-2阻害化合物が、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)、または(VIIB)のいずれか1つの化合物である、パラグラフ13記載の方法。

17. 低分子MASP-2阻害化合物が、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、

式中、

が二重結合または単結合を表し、

R^1 が、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、

R^2 が、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R^3 が、水素、アルキル、ハロアルキル、もしくはシクロアルキルであるか、または R^2 および R^3 が、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒にあって、置換されていてもよい4～7員環ヘテロシクリルを形成し、

R^4 が置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R^5 が、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、 $(CH_2)_mC(=O)OR^6$ 、 $C(=O)R^6$ 、 $C(=O)OR^6$ 、 $(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$ 、または $C(=O)NR^6R^7$ であり、

R^6 および R^7 が、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルであり、

L^1 が、直接結合、 $-CR^{8a}R^{8b}-$ 、 $-S(O)_t-$ 、 NR^{8c} 、または $-O-$ であり、

R^{8a} および R^{8b} がそれぞれ独立して、水素、アルキル、または R^{8a} および R^{8b} であり、それらが結合している炭素と一緒にあって、置換されていてもよい3～6員環シクロアルキルを形成し、

R^{8c} が、水素、アルキル、ハロアルキル、 $(C=O)$ アルキル、 $(C=O)O$ アルキル、 $(C=O)$ シクロアルキル、 $(C=O)O$ シクロアルキル、 $(C=O)$ アリール、 $(C=O)O$ アリール、 $(C=O)$ ヘテロアリール、 $(C=O)O$ ヘテロアリール、 $(C=O)$ ヘテロシクリル、 $(C=O)O$ ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シ

10

20

30

40

50

クロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルアルキルであり、

nが、1または2であり、

mが、1、2、3、4、5、または6であり、

tが、0、1、または2である、

パラグラフ13記載の方法。

18. 低分子MASP-2阻害化合物が表4A、4B、4C、4D、または4Eの化合物である、パラグラフ13記載の方法。

19. 低分子MASP-2阻害化合物が、分子量200Da~2,000Da、250Da~2,000Da、300Da~2,000Da、300Da~1,000Da、300Da~600Da、350Da~2,000Da、350Da~1,500Da、350Da~1,200Da、350Da~1,000Da、350Da~900Da、350Da~800Da、350Da~700Da、350Da~600Daの低分子である、パラグラフ13記載の方法。

20. 低分子MASP-2阻害化合物が、グアニジン基およびベンズアミジン基より選択される0~1個の塩基性基を有する、パラグラフ13記載の方法。

21. 低分子MASP-2阻害化合物が、約25 μ M未満、約10 μ M未満、約2.5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.1 μ M未満のMASP-2阻害Ki値を有する、パラグラフ13記載の方法。

22. 低分子MASP-2阻害化合物が、約50 μ M未満、約5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.05 μ M未満のレクチン経路阻害IC₅₀を有するレクチン経路阻害因子である、パラグラフ13記載の方法。

23. 低分子MASP-2阻害化合物が、約2倍超、約5倍超、約10倍超、約25倍超、約50倍超、または約100倍超のMASP-2阻害対トロンビン阻害の選択性を有する選択的MASP-2阻害因子である、パラグラフ13記載の方法。

24. 低分子MASP-2阻害化合物のMASP-2に対する親和性がトロンビンに対する親和性より高く、MASP-2:トロンビンの選択性比が少なくとも1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、または30:1である、パラグラフ13記載の方法。

25. 低分子MASP-2阻害化合物がMASP-2の共有結合阻害因子でない、パラグラフ13記載の方法。

26. 低分子MASP-2阻害化合物が内因性MASP-2リガンドでも基質でもない、パラグラフ13記載の方法。

27. MASP-2阻害物質が、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与、経口投与されるか、または吸入剤として投与される、パラグラフ1~26のいずれか一項記載の方法。

28. 1つまたは複数のCOVID-19関連長期後遺症が、心血管合併症(心筋損傷、心筋症、心筋炎、血管内凝固、脳卒中、静脈および動脈合併症、ならびに肺血栓症を含む); 神経学的合併症(認知困難、混乱状態、記憶喪失、「ブレインフォグ」とも呼ばれるもの、頭痛、脳卒中、めまい、失神、発作、食欲不振、不眠、嗅覚脱失、味覚脱失、ミオクローヌス、神経因性疼痛、筋肉痛、例えばアルツハイマー病、ギランバレー症候群、ミラー・フィッシャー症候群、パーキンソン病等の神経学的疾患の発症を含む)、腎臓損傷(例えば、急性腎障害(AKI)); 肺合併症(肺線維症、呼吸困難、肺塞栓症を含む)、炎症状態、例えば、川崎病、川崎病様疾患、小児多系統炎症性症候群、多系統臓器不全、極度の疲労、筋力低下、微熱、集中力の欠如、記憶の欠落、気分変化、睡眠困難、腕および脚における針で刺されるような痛み、下痢および嘔吐、味覚および嗅覚の喪失、咽頭痛および嚥下困難、糖尿病および高血圧の新規発症、皮膚発疹、息切れ、胸痛、ならびに動悸からなる群より選択される、パラグラフ1~27のいずれか一項記載の方法。

29. 対象がCOVID-19誘発性肺炎またはARDSから回復しており、かつMASP-2阻害物質が、1つもしくは複数の長期後遺症を処置するまたは寛解させる量で投与される、請求項2

10

20

30

40

50

8記載の方法。

30. 前記対象がCOVID-19誘発性凝固または血栓症から回復しており、かつMASP-2阻害物質が、1つもしくは複数の長期後遺症を処置するまたは寛解させる量で投与される、請求項28記載の方法。

【0756】

V. インフルエンザウイルスに感染した哺乳動物対象において、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、またはインフルエンザウイルス感染症の他の何らかの肺での症状発現もしくは他の症状発現を、処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法

1. インフルエンザウイルスに感染した哺乳動物対象において、急性呼吸窮迫症候群、肺炎、またはインフルエンザウイルス感染症の他の何らかの肺での症状発現もしくは他の症状発現を、処置する、阻害する、軽減させる、または予防するための方法であって、MASP-2依存性補体活性化を阻害するのに有効な量のMASP-2阻害物質を前記対象に投与する工程を含む、方法。

10

2. インフルエンザウイルスがインフルエンザウイルスA、インフルエンザウイルスB、またはインフルエンザウイルスCである、パラグラフ1記載の方法。

3. インフルエンザウイルスAが、H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9、およびH6N1からなる群より選択される、パラグラフ2記載の方法。

4. 前記対象が、MASP-2阻害物質の投与前にインフルエンザウイルスを有すると特定されている、パラグラフ1～3のいずれか一項記載の方法。

20

5. MASP-2阻害物質が、呼吸機能を改善するのに有効な量で投与される、パラグラフ1～4のいずれか一項記載の方法。

6. MASP-2阻害物質がMASP-2抗体またはその断片である、パラグラフ1～5のいずれか一項記載の方法。

7. MASP-2阻害物質が、MASP-2モノクローナル抗体であるか、またはSEQ ID NO:6の一部に特異的に結合するその断片である、パラグラフ6記載の方法。

8. MASP-2抗体またはその断片が、SEQ ID NO:6を含むポリペプチドに、補体系における異なる抗原に結合するよりも少なくとも10倍高い親和性で特異的に結合する、パラグラフ6または7記載の方法。

9. 抗体またはその断片が、組換え抗体、低下したエフェクター機能を有する抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、およびヒト抗体からなる群より選択される、パラグラフ6～8のいずれか一項記載の方法。

30

10. MASP-2阻害抗体が、C1q依存性補体活性化を実質的に阻害することなくレクチン経路補体活性化を選択的に阻害する、パラグラフ6～9のいずれか一項記載の方法。

11. MASP-2阻害抗体が、10%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、パラグラフ6～10のいずれか一項記載の方法。

12. MASP-2阻害抗体が、90%ヒト血清中でのC3b沈着を30nM以下のIC₅₀で阻害する、パラグラフ6～10のいずれか一項記載の方法。

13. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67に示したアミノ酸配列のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:69に示したアミノ酸配列のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ6～12のいずれか一項記載の方法。

40

14. MASP-2阻害抗体またはその抗原結合断片が、SEQ ID NO:67を含む重鎖可変領域およびSEQ ID NO:69を含む軽鎖可変領域を含む、パラグラフ6～13のいずれか一項記載の方法。

15. MASP-2阻害物質が低分子MASP-2阻害化合物である、パラグラフ1～5のいずれか一項記載の方法。

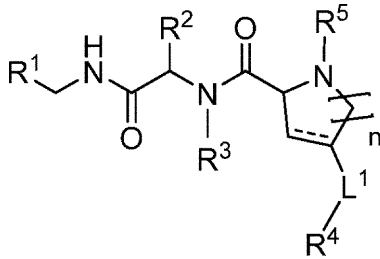
16. MASP-2阻害化合物が合成低分子または半合成低分子である、パラグラフ15記載の方法。

17. MASP-2阻害物質が、MASP-2の発現阻害因子である、パラグラフ1記載の方法。

50

18. 低分子MASP-2阻害化合物が、式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)、または(VIIB)のいずれか1つの化合物である、パラグラフ15記載の方法。

19. 低分子MASP-2阻害化合物が、以下の構造:



を有する化合物、またはその立体異性体、互変異性体、もしくは薬学的に許容される塩であり、
式中、
====

が二重結合または単結合を表し、

R¹が、置換もしくは非置換アリールまたは置換もしくは非置換ヘテロアリールであり、
R²が、水素、アルキル、アルコキシ、ハロアルキル、ヒドロキシアリール、ハロアルコキシ、またはシクロアルキルであり、

R³が、水素、アルキル、ハロアルキル、もしくはシクロアルキルであるか、またはR²およびR³が、それぞれ、それらが結合している炭素および窒素と一緒に、置換されていてもよい4~7員環ヘテロシクリルを形成し、

R⁴が、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルであり、

R⁵が、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、ホスホンアルキル、(CH₂)_mC(=O)OR⁶、C(=O)R⁶、C(=O)OR⁶、(CH₂)_mNR⁶S(O)₂R⁷、またはC(=O)NR⁶R⁷であり、
R⁶およびR⁷が、それぞれの場合で、独立して、水素、アルキル、ハロアルキル、シクロアルキル、またはアリールアルキルであり、

L¹が、直接結合、-CR^{8a}R^{8b}-、-S(O)_t-、NR^{8c}、または-O-であり、

R^{8a}およびR^{8b}がそれぞれ独立して、水素、アルキル、またはR^{8a}およびR^{8b}であり、それらが結合している炭素および窒素と一緒に、置換されていてもよい3~6員環シクロアルキルを形成し、

R^{8c}が、水素、アルキル、ハロアルキル、(C=O)アルキル、(C=O)Oアルキル、(C=O)シクロアルキル、(C=O)Oシクロアルキル、(C=O)アリール、(C=O)Oアリール、(C=O)ヘテロアリール、(C=O)Oヘテロアリール、(C=O)ヘテロシクリル、(C=O)Oヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、置換もしくは非置換シクロアルキル、置換もしくは非置換ヘテロシクリル、置換もしくは非置換アリールアルキル、置換もしくは非置換ヘテロアリールアルキル、置換もしくは非置換シクロアルキルアルキル、または置換もしくは非置換ヘテロシクリルアルキルであり、

nが、1または2であり、

mが、1、2、3、4、5、または6であり、

tが、0、1、または2である、

パラグラフ15記載の方法。

20. 低分子MASP-2阻害化合物が表4A、4B、4C、4D、または4Eの化合物である、パラグラフ15記載の方法。

21. 低分子MASP-2阻害化合物が、分子量200Da~2,000Da、250Da~2,000Da、300Da~2,000Da、300Da~1,000Da、300Da~600Da、350Da~2,000Da、350Da~1,500Da、350Da~1,200Da、350Da~1,000Da、350Da~900Da、350Da~800Da

、350Da～700Da、350Da～600Daの低分子である、パラグラフ15記載の方法。

22. 低分子MASP-2阻害化合物が、グアニジン基およびベンズアミジン基より選択される0～1個の塩基性基を有する、パラグラフ15記載の方法。

23. 低分子MASP-2阻害化合物が、約25 μ M未満、約10 μ M未満、約2.5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.1 μ M未満のMASP-2阻害Ki値を有する、パラグラフ15記載の方法。

24. 低分子MASP-2阻害化合物が、約50 μ M未満、約5 μ M未満、約1 μ M未満、約0.5 μ M未満、または約0.05 μ M未満のレクチン経路阻害IC₅₀を有するレクチン経路阻害因子である、パラグラフ15記載の方法。

25. 低分子MASP-2阻害化合物が、約2倍超、約5倍超、約10倍超、約25倍超、約50倍超、または約100倍超のMASP-2阻害対トロンビン阻害の選択性を有する選択的MASP-2阻害因子である、パラグラフ15記載の方法。

10

26. 低分子MASP-2阻害化合物のMASP-2に対する親和性がトロンビンに対する親和性より高く、MASP-2:トロンビンの選択性比が少なくとも1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1、または30:1である、パラグラフ15記載の方法。

27. 低分子MASP-2阻害化合物がMASP-2の共有結合阻害因子でない、パラグラフ15記載の方法。

28. 低分子MASP-2阻害化合物が内因性MASP-2リガンドでも基質でもない、パラグラフ15記載の方法。

20

29. MASP-2阻害物質が、皮下投与、腹腔内投与、筋肉内投与、動脈内投与、静脈内投与、経口投与されるか、または吸入剤として投与される、パラグラフ1～28のいずれか一項記載の方法。

【0757】

本明細書において言及される全ての刊行物、特許出願、および特許は参照により本明細書に組み入れられる。

【0758】

本発明の範囲および精神から逸脱することない、本発明の説明された方法および組成物の様々な修正および変更が当業者に明らかである。本発明は、特定の望ましい態様に関連して説明されたが、特許請求される本発明は、このような特定の態様に過度に限定されてはならないことが理解されるはずである。

30

【0759】

例示的な態様が例示および説明されたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく本明細書において様々な変更を加えることができると理解される。

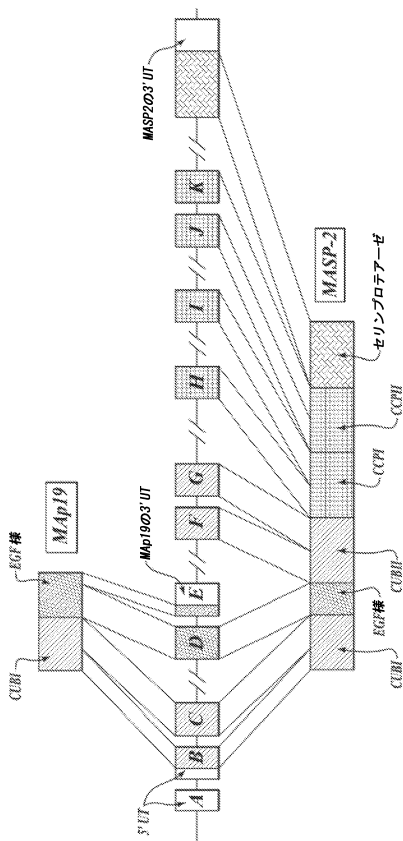
【0760】

特許請求の範囲

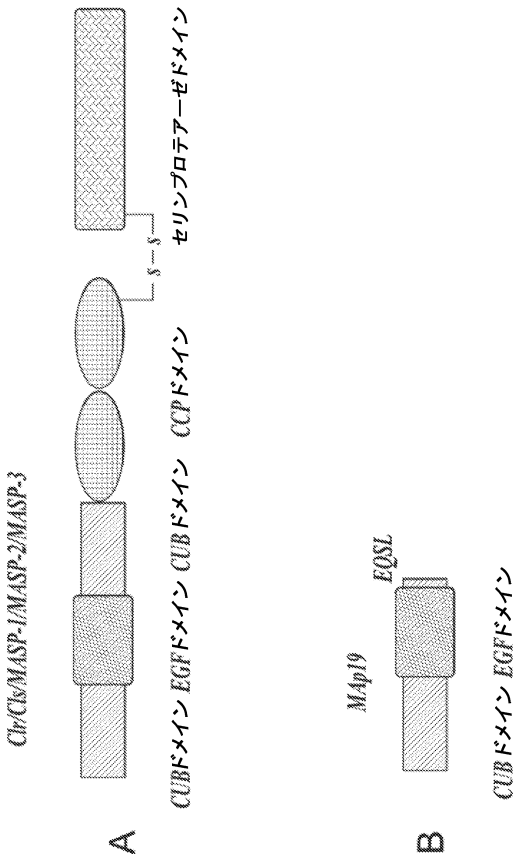
排他的な権利または特権が特許請求されている本発明の態様は、特許請求の範囲の通りに規定される。

40

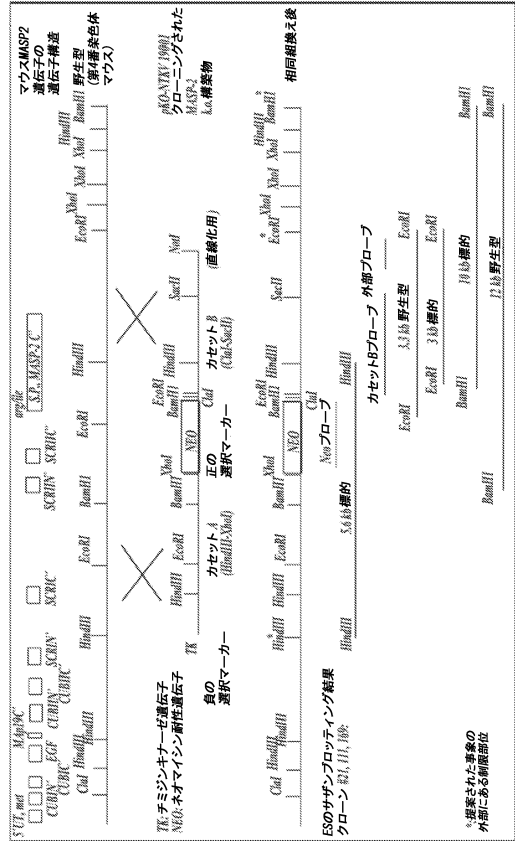
【図面】
【図 1】



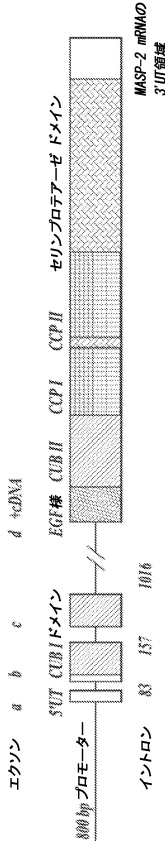
【図 2】



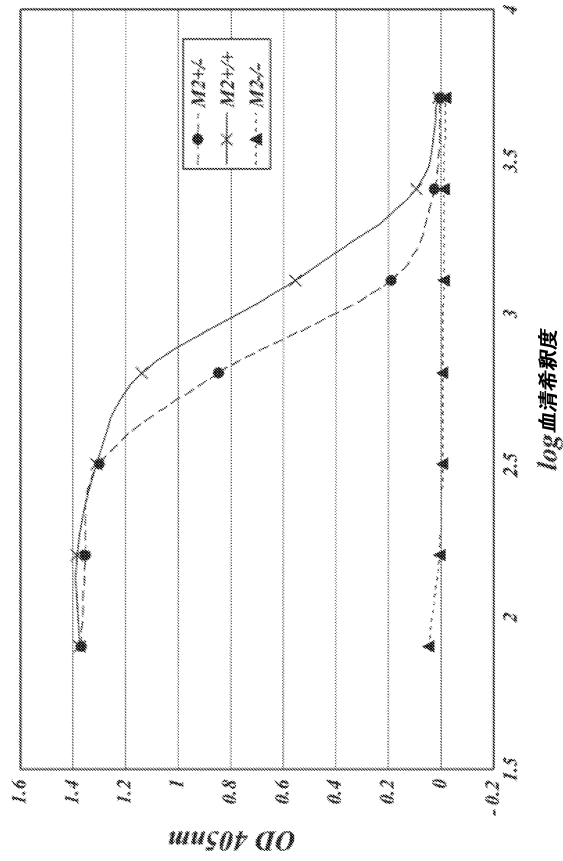
【図 3】



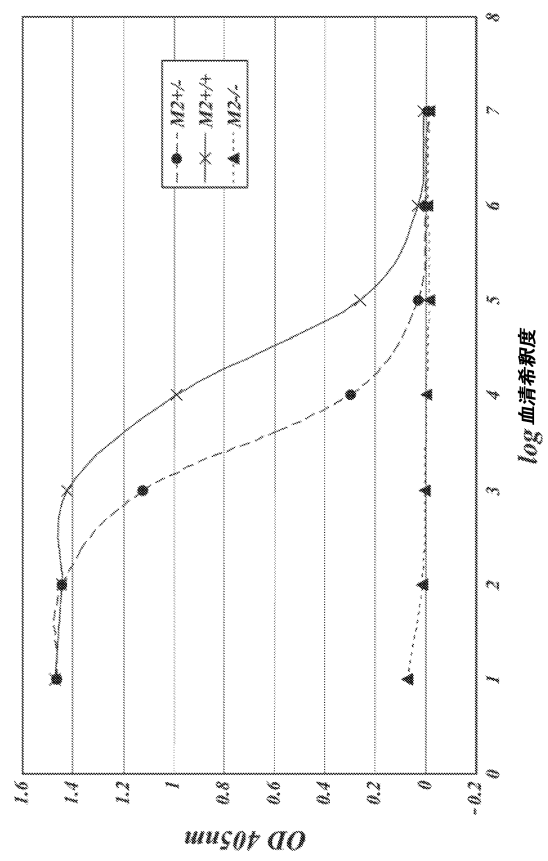
【図 4】



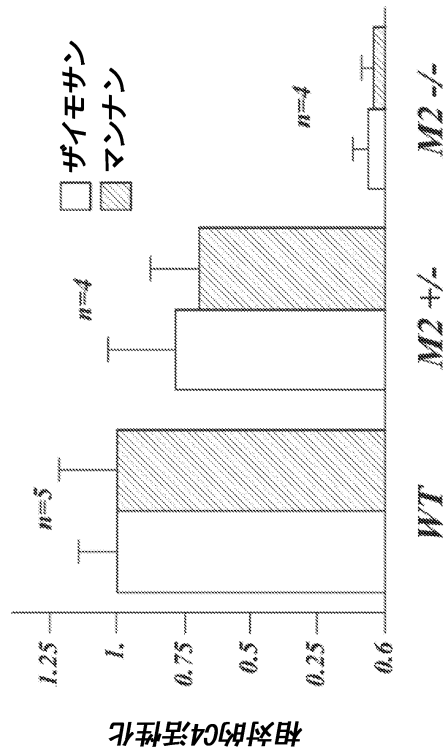
【図 5 A】



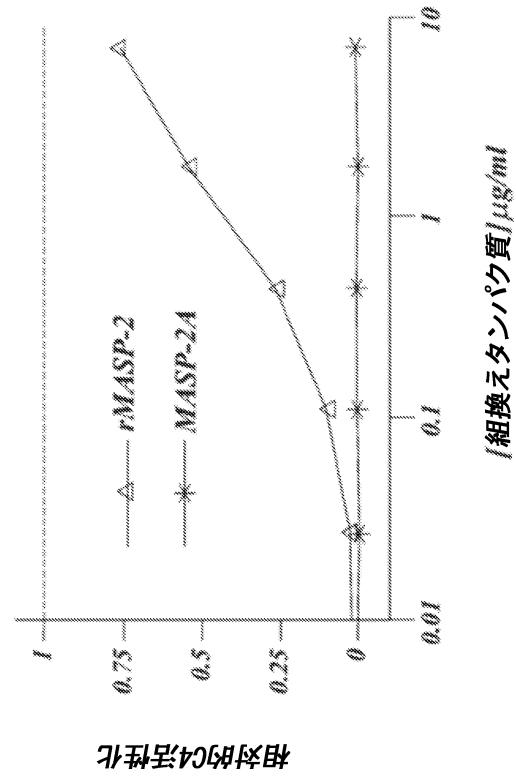
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 6】



10

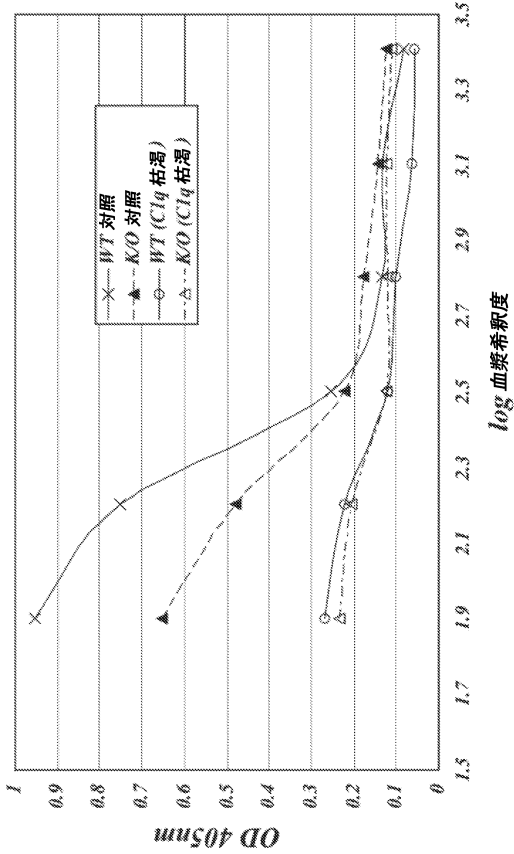
20

30

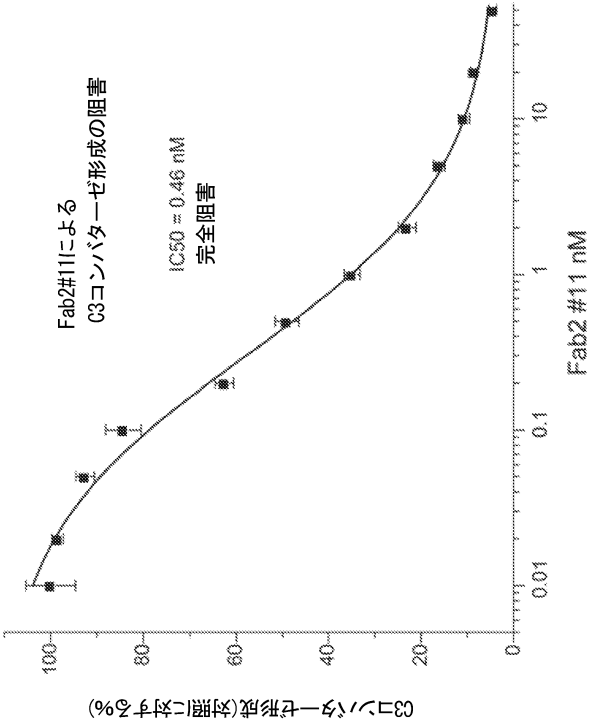
40

50

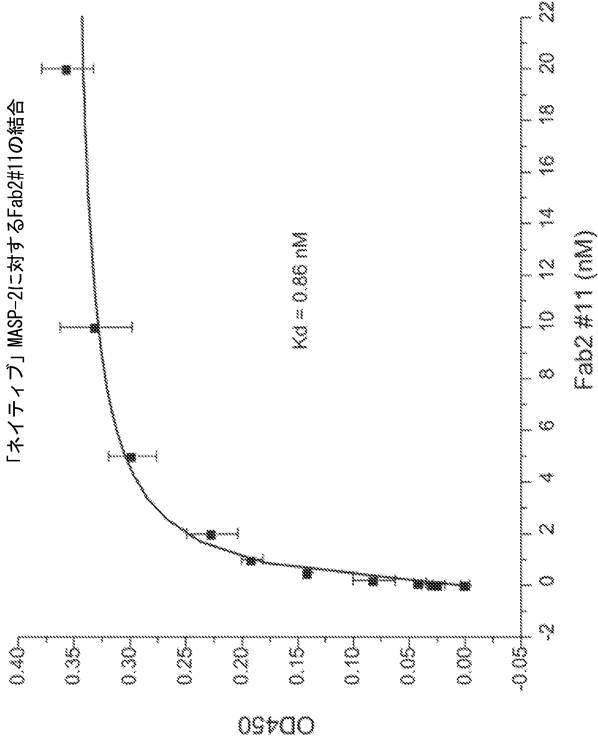
【図 7】



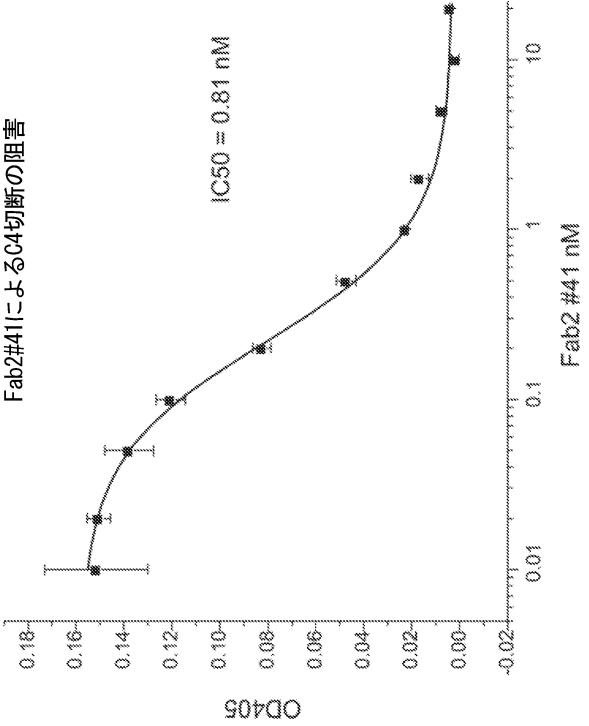
【図 8 A】



【図 8 B】



【図 8 C】



10

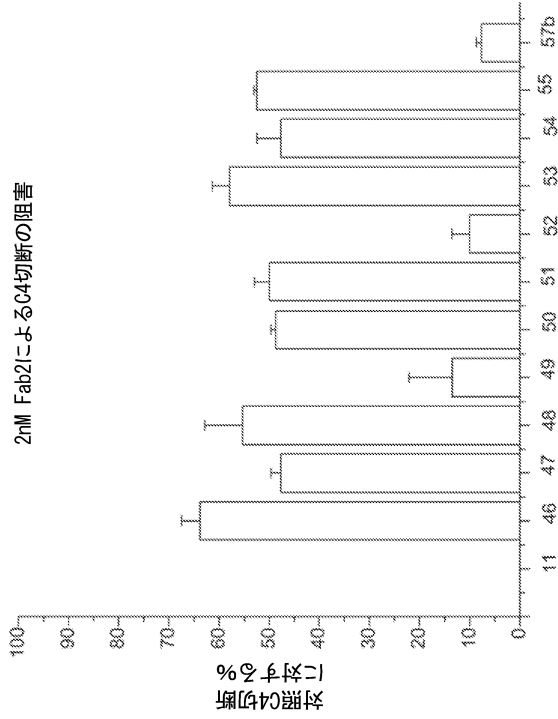
20

30

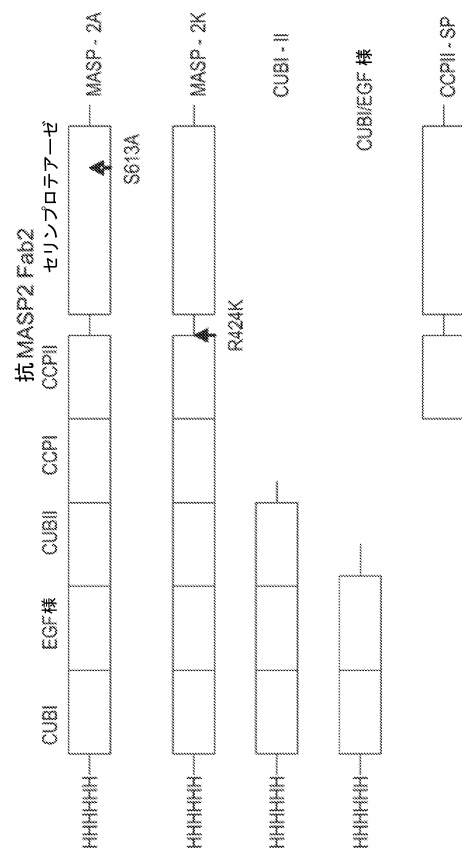
40

50

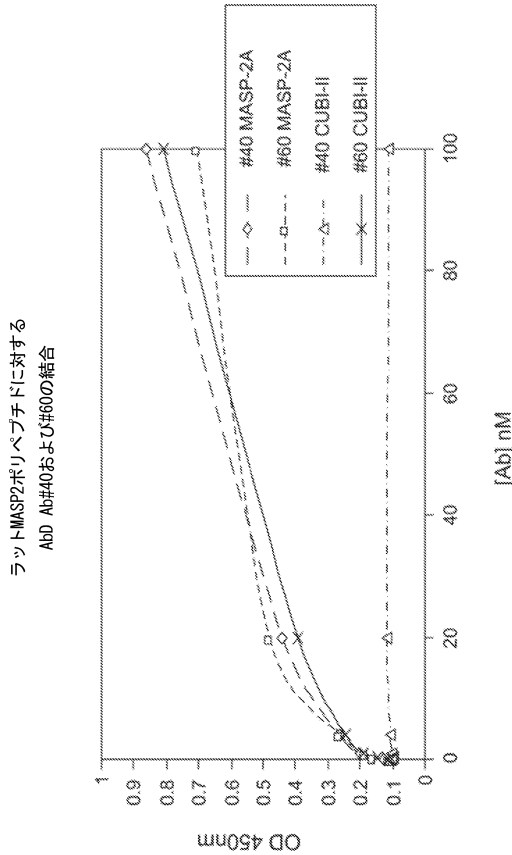
【図 9】



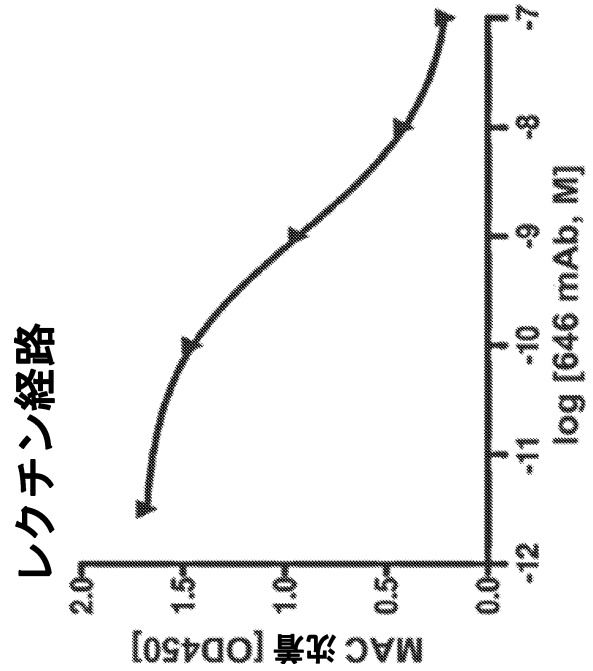
【図 10】



【図 11】



【図 12 A】



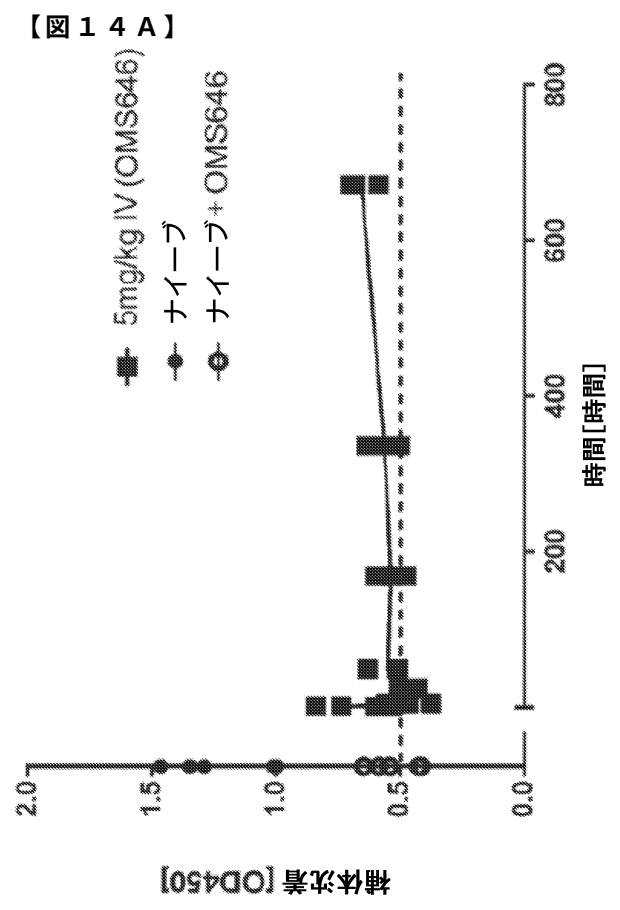
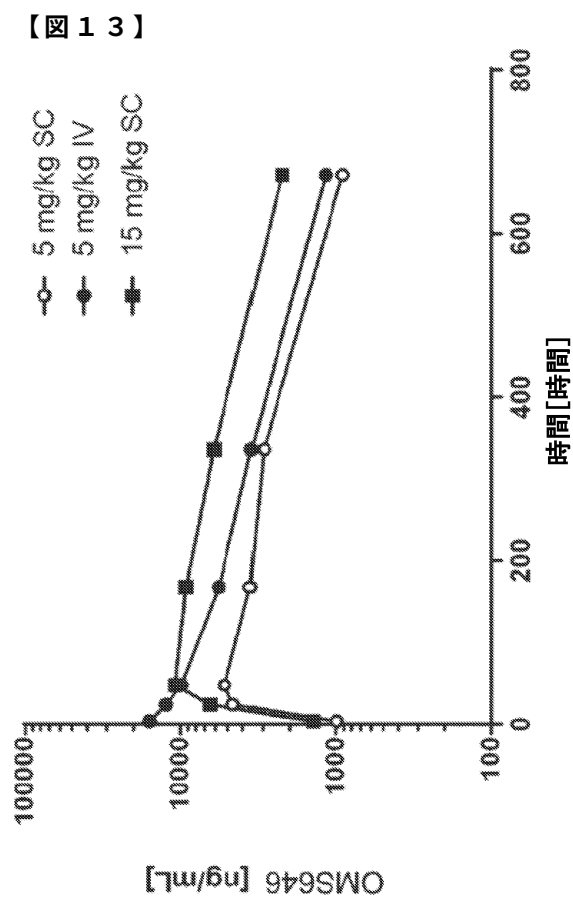
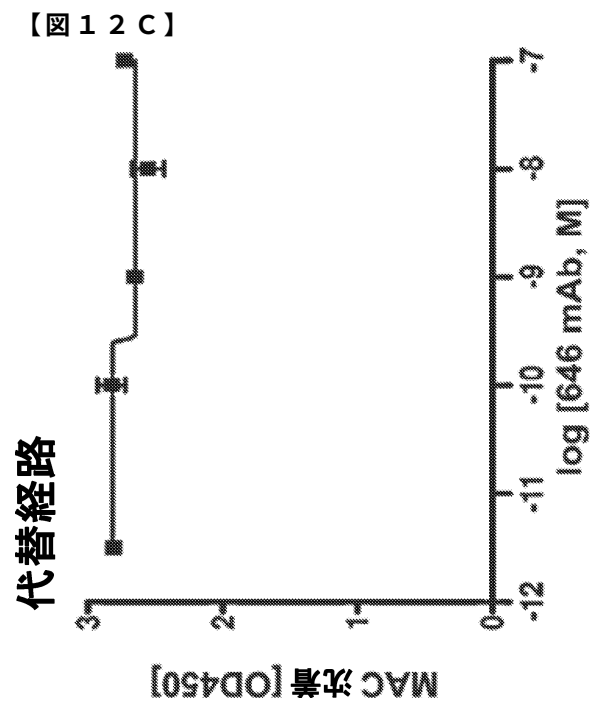
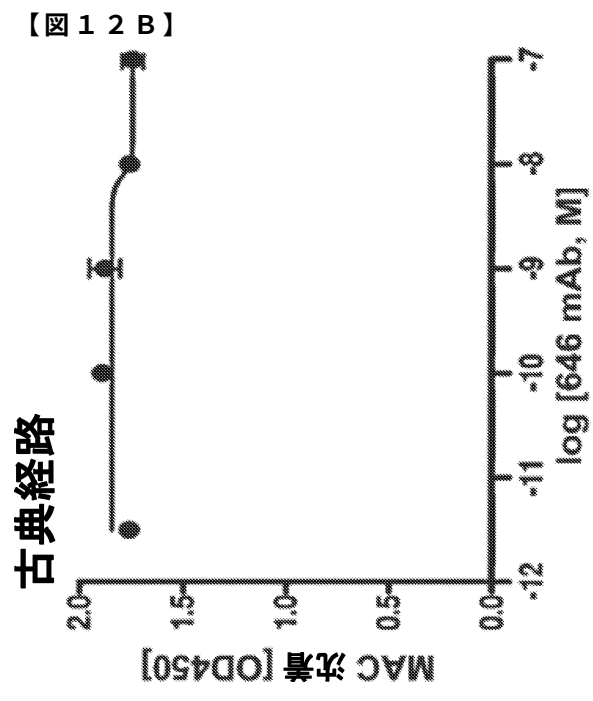
10

20

30

40

50



10

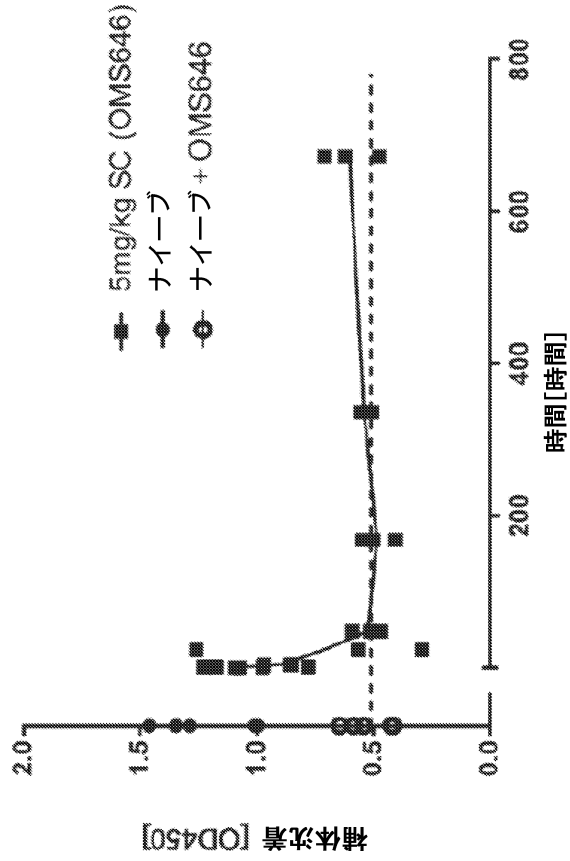
20

30

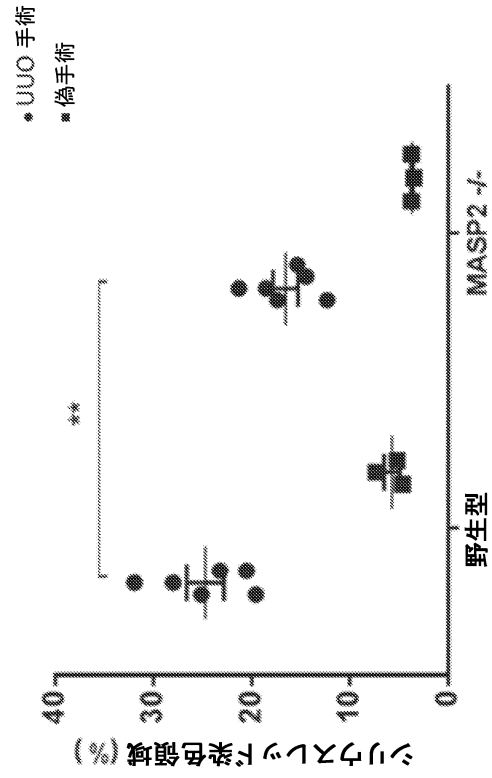
40

50

【図 1 4 B】

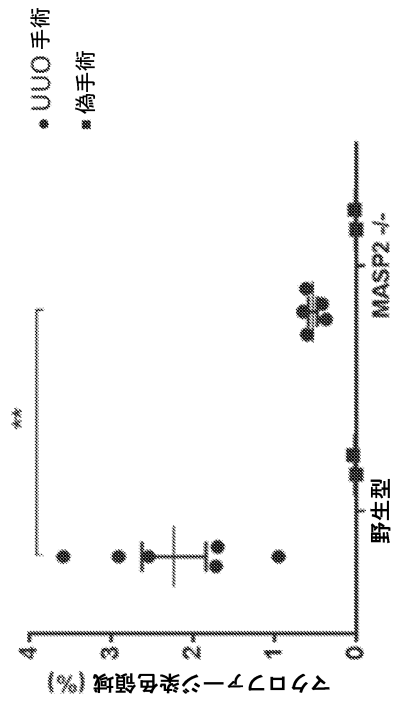


【図 1 5】



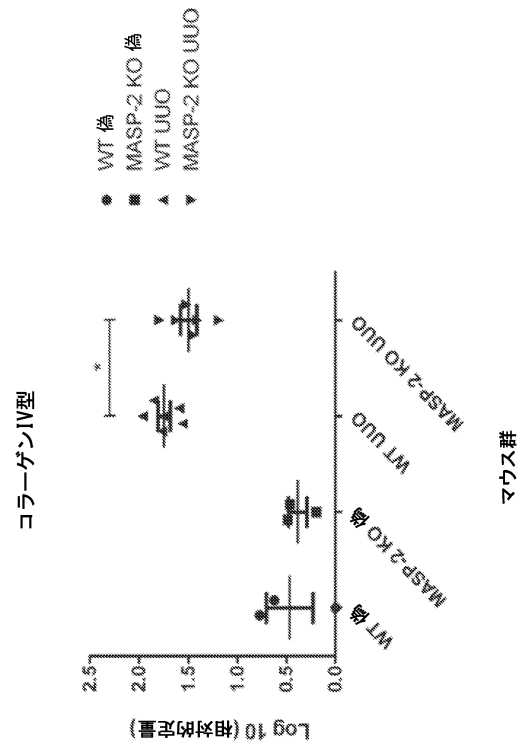
**p=0.0096

【図 1 6】



**p=0.0035

【図 1 7】



*p=0.0388

10

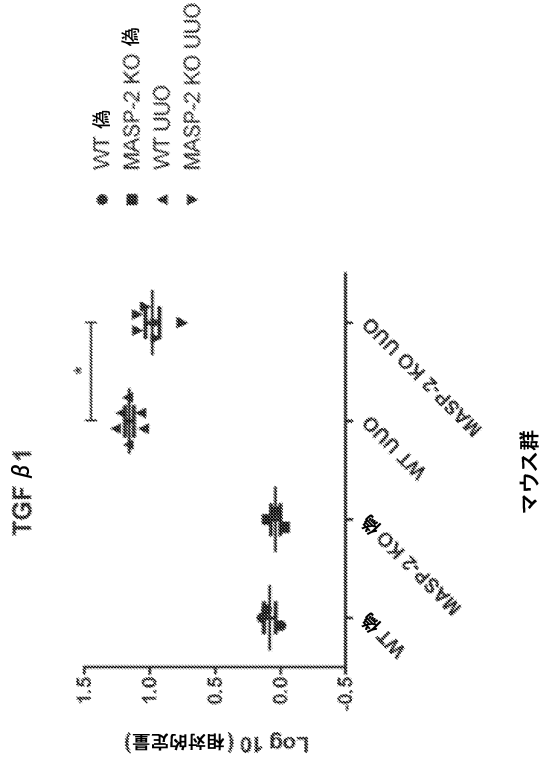
20

30

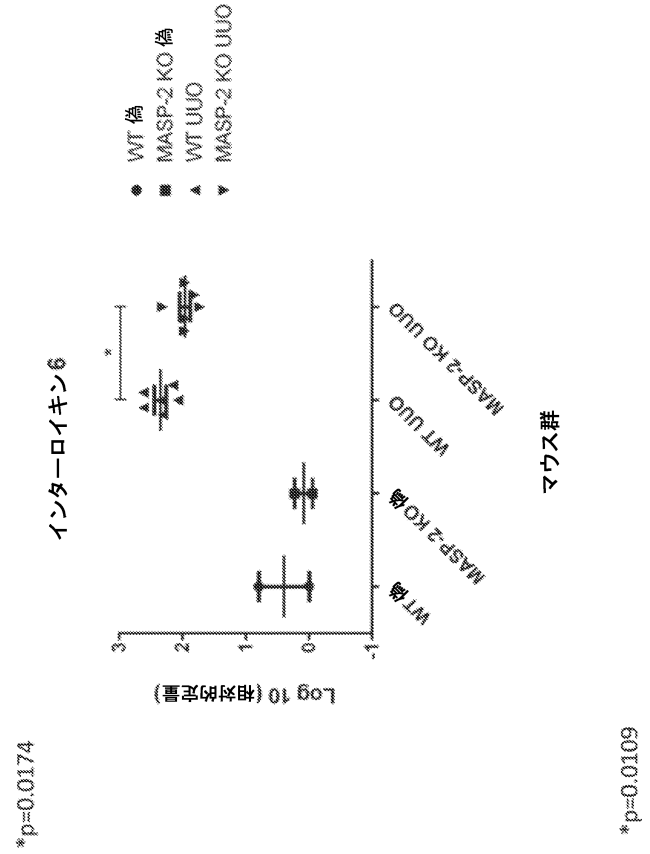
40

50

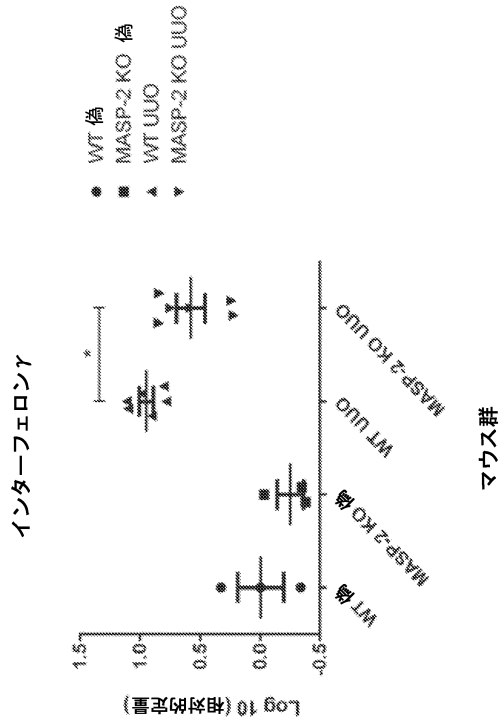
【図 18】



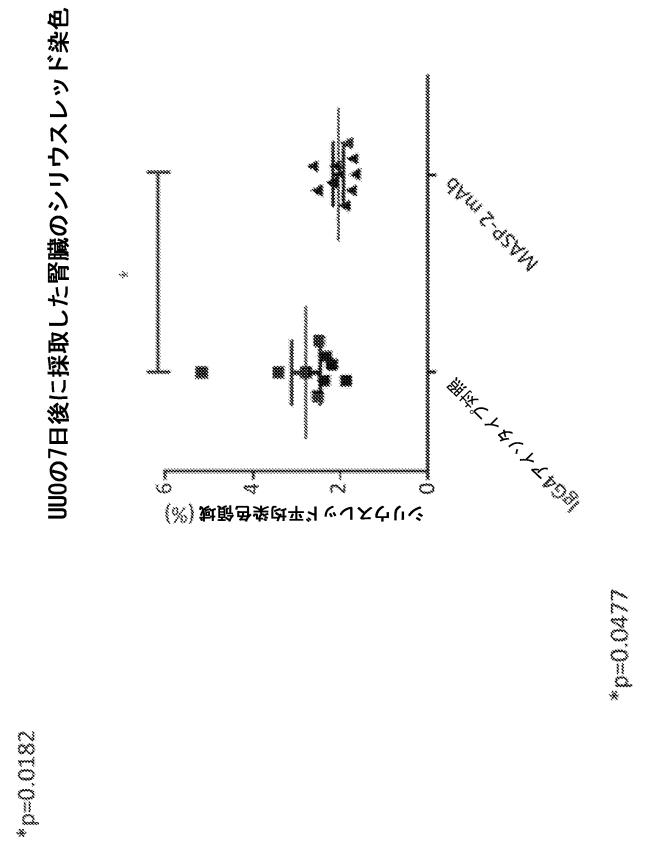
【図 19】



【図 20】



【図 21】



10

20

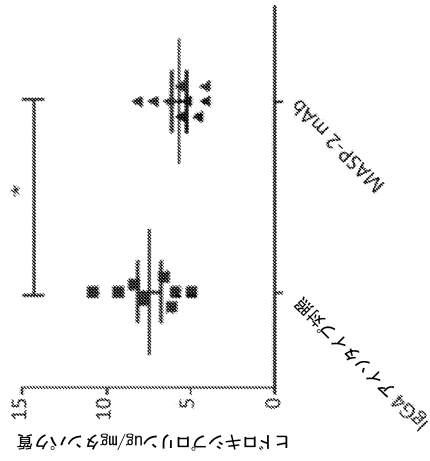
30

40

50

【図 2 2】

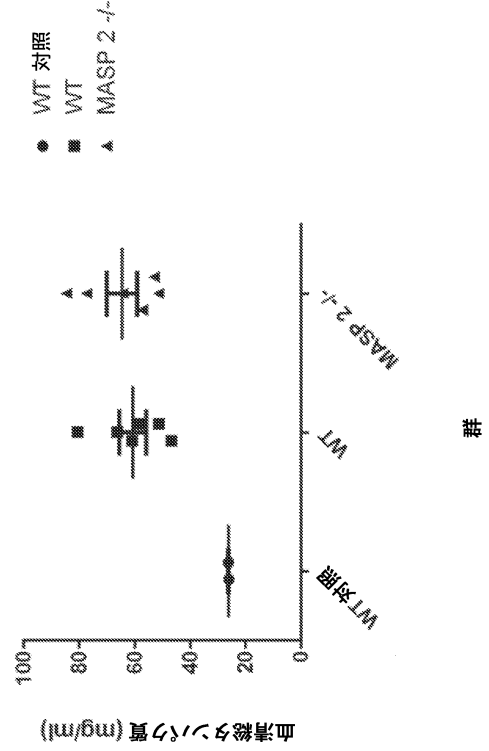
UUOの7日後に採取した腎臓のヒドロキシプロリン含有量



【図 2 3】

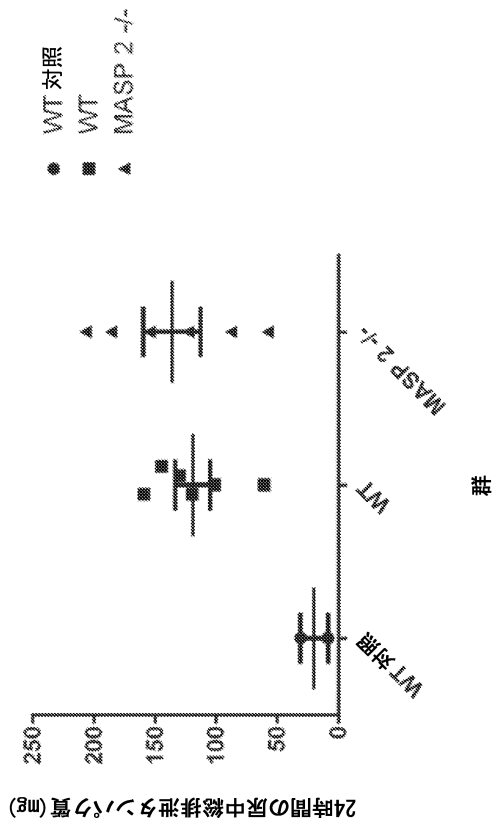
血清総タンパク質

*p=0.0439



【図 2 4】

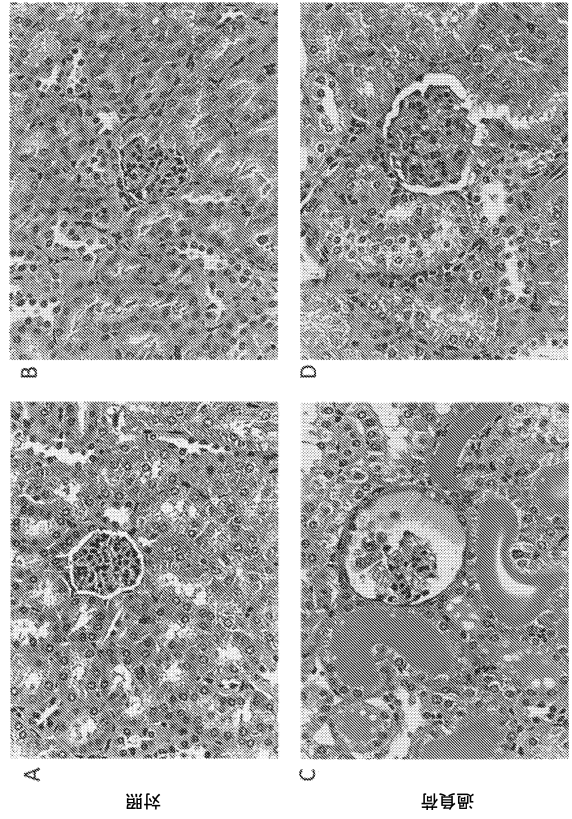
尿中総排泄タンパク質 (24時間)



【図 2 5】

MASP-2^{-/-}

野生型



10

20

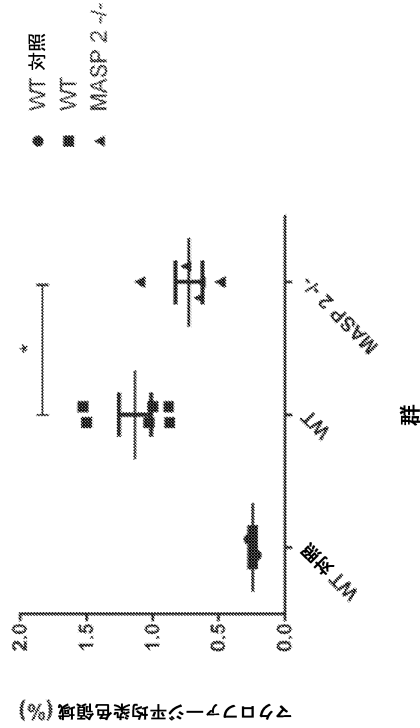
30

40

50

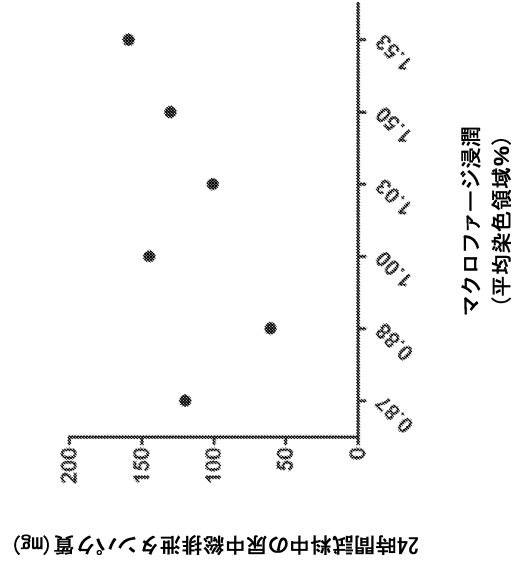
【図 2 6】

マクロファージ浸潤、F4/80抗体
野生型 対 MASP-2^{-/-}



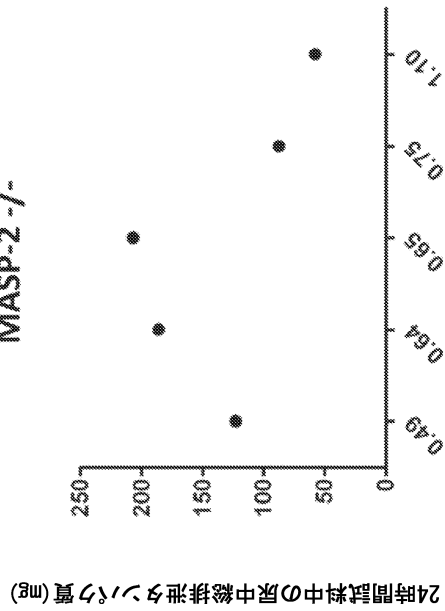
【図 2 7 A】

マクロファージ浸潤 - タンパク尿の相関
(野生型)



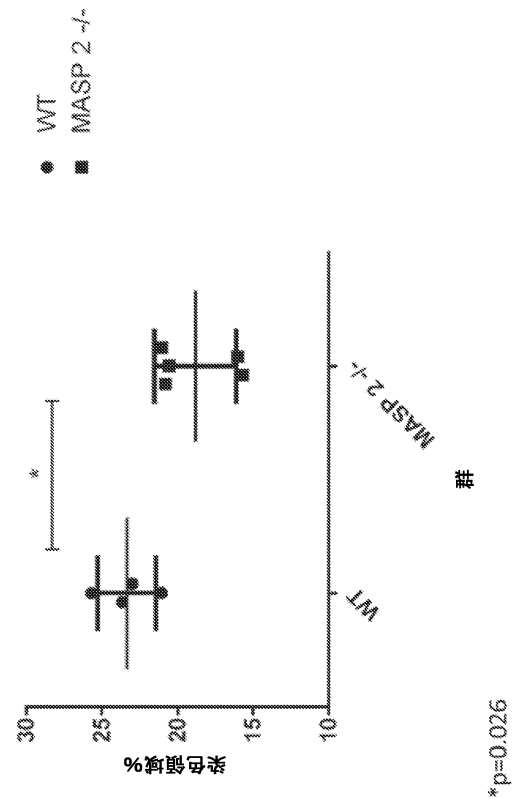
【図 2 7 B】

マクロファージ浸潤 - タンパク尿の相関
MASP-2^{-/-}



【図 2 8】

マクロファージ浸潤
(平均染色領域%)
トランスフォーミング増殖因子β



10

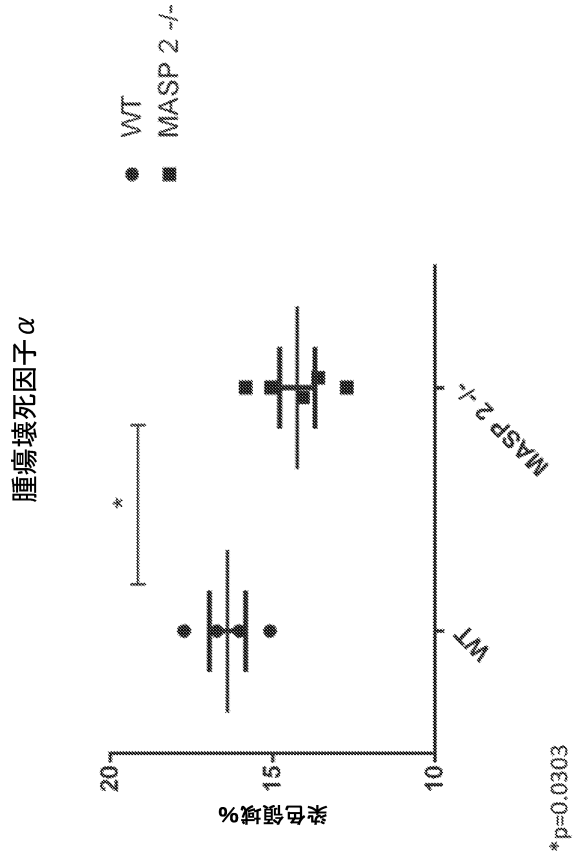
20

30

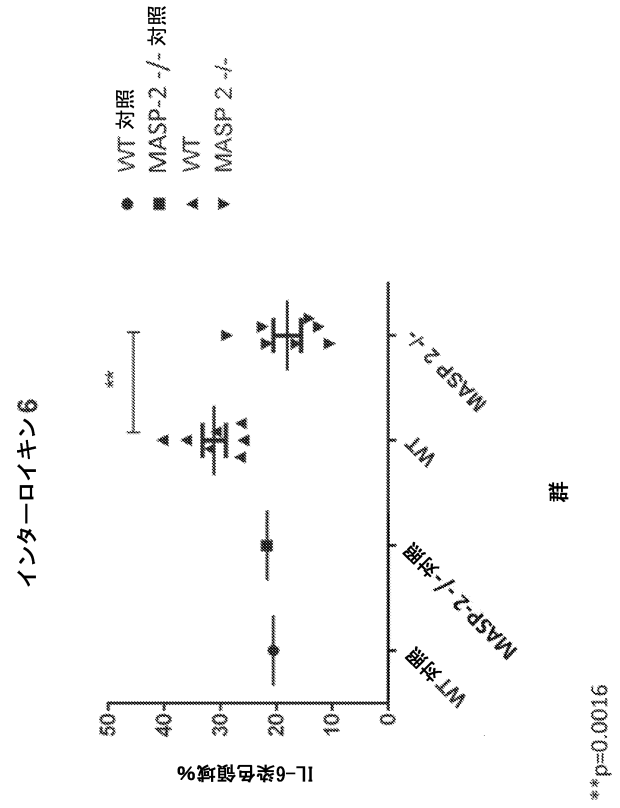
40

50

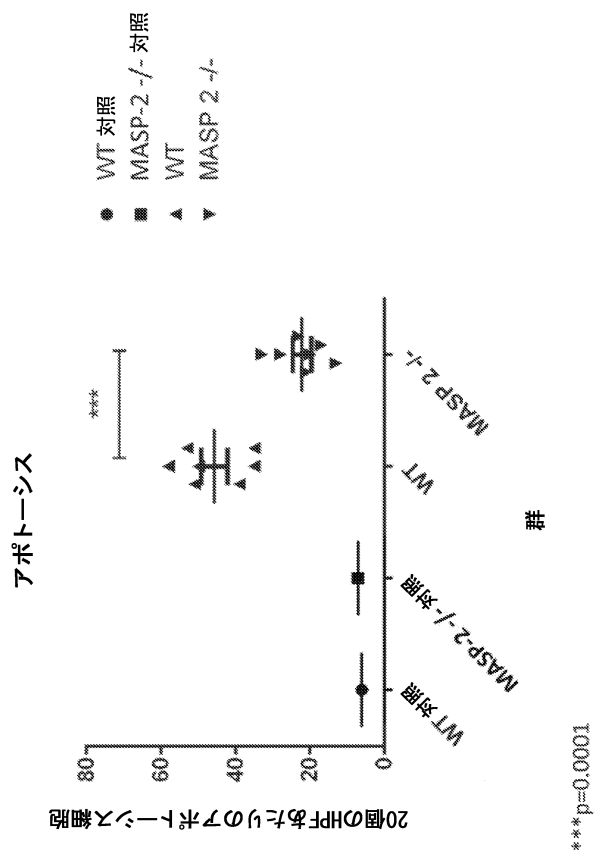
【図 29】



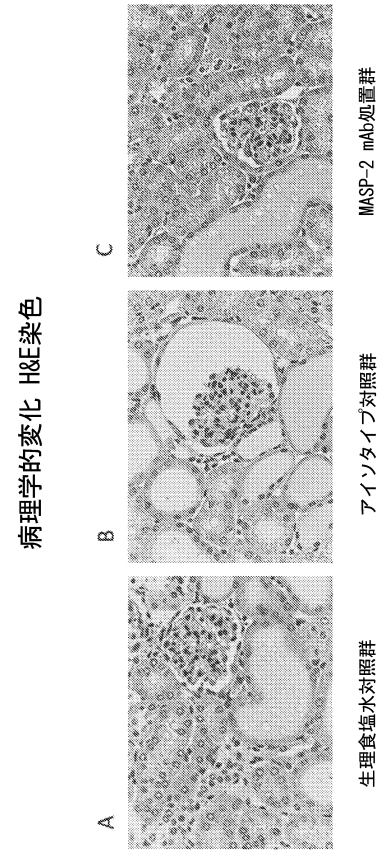
【図 30】



【図 31】



【図 32】



10

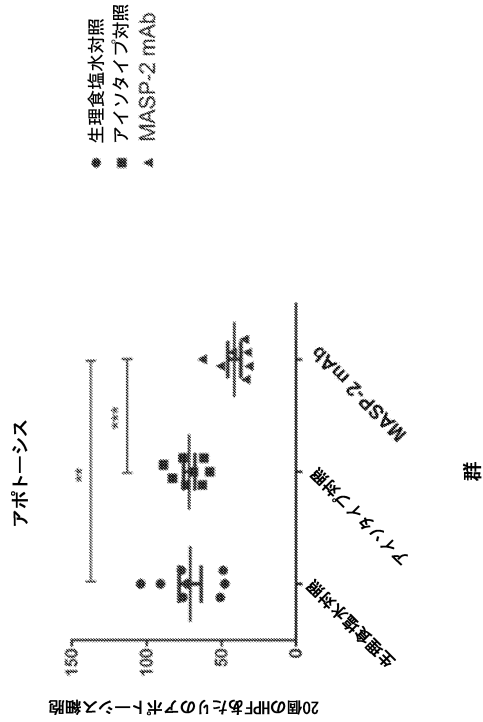
20

30

40

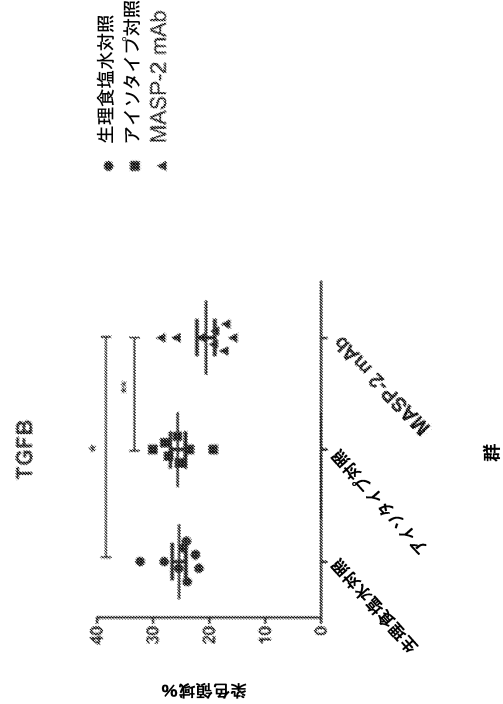
50

【図 3 3】



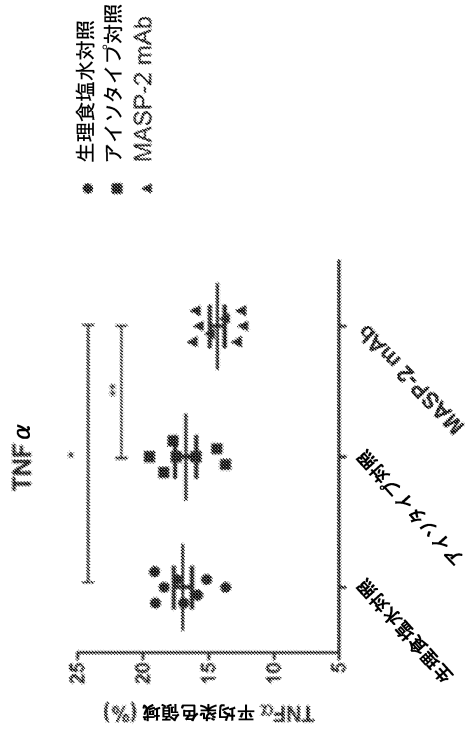
**p=0.0002
***p=0.0052

【図 3 4】



*p = 0.0324
**p=0.0349

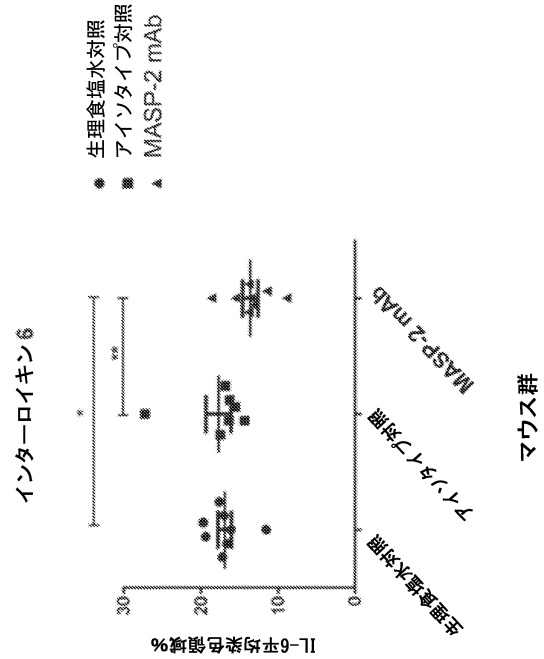
【図 3 5】



マウス群

*p=0.011
**p=0.0285

【図 3 6】



マウス群

*p=0.0269
**p=0.0445

10

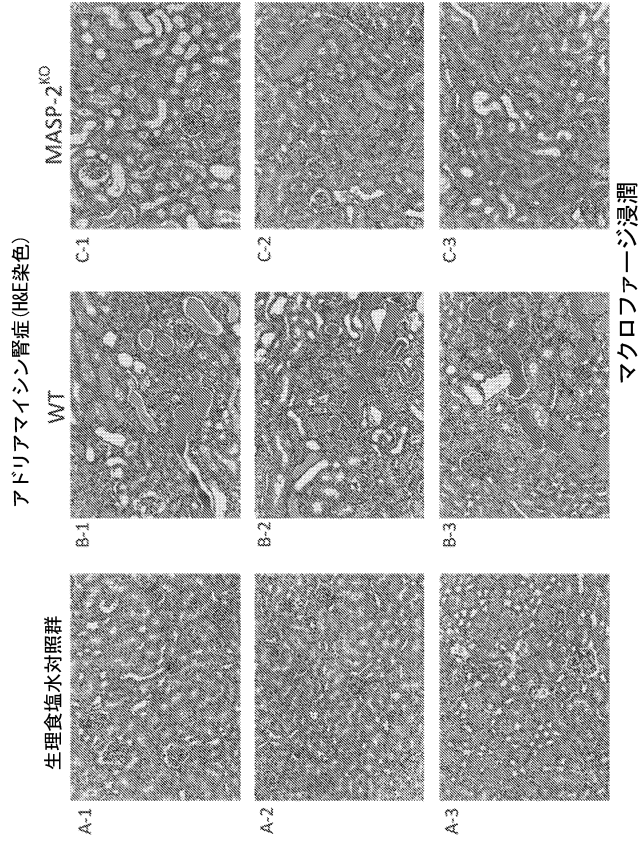
20

30

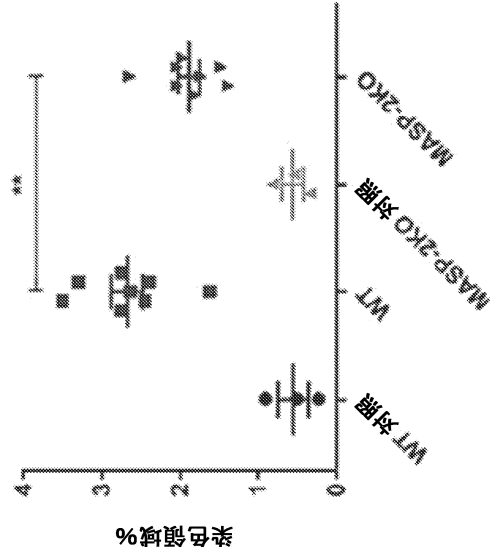
40

50

【図 3 7】



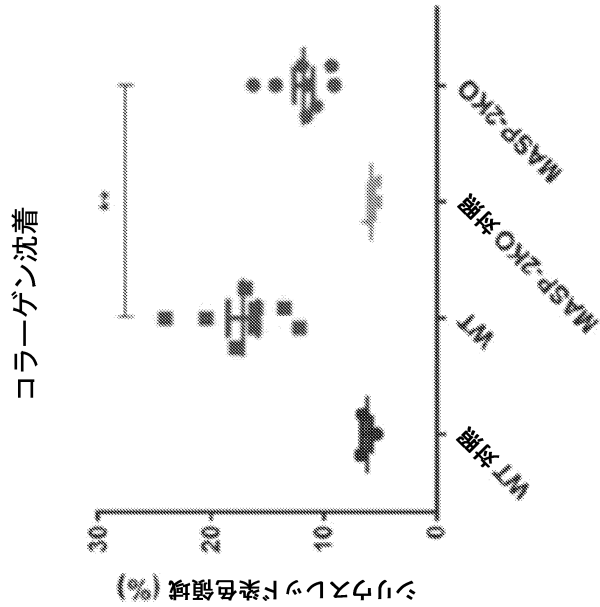
【図 3 8】



10

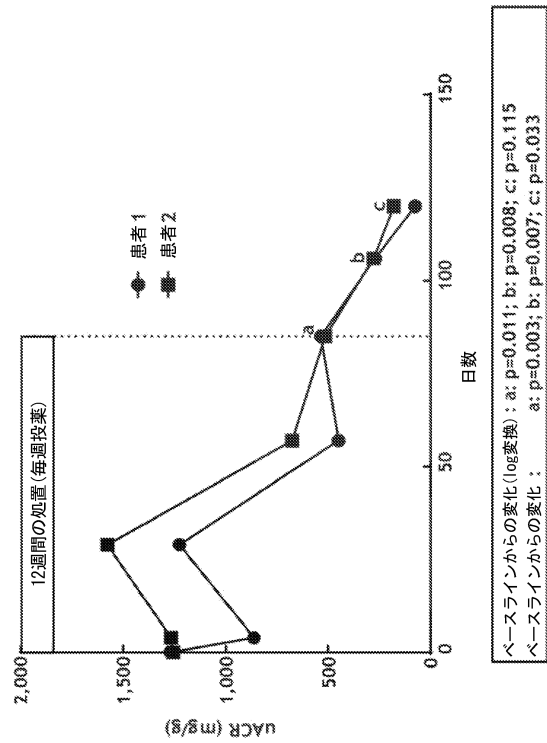
20

【図 3 9】



【図 4 0】

OMS646で処置したIgAN患者における尿アルブミン/クレアチニン比 (uACR)

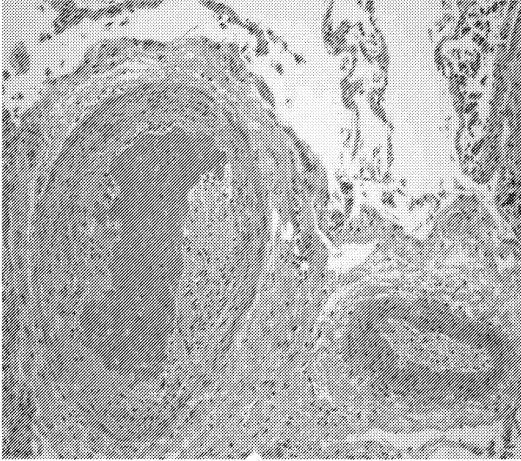


30

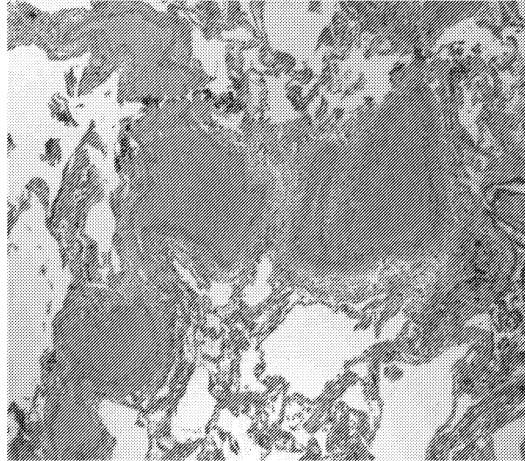
40

50

【図 4 1 A】

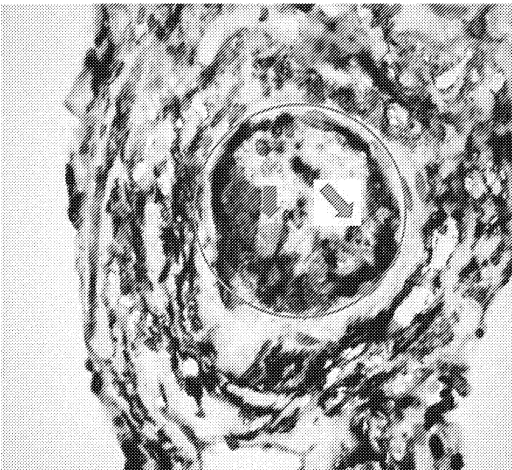


【図 4 1 B】



10

【図 4 1 C】



【図 4 1 D】



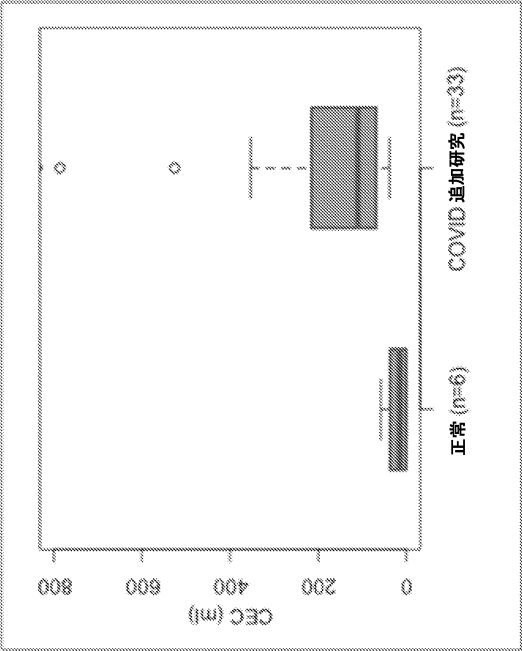
20

30

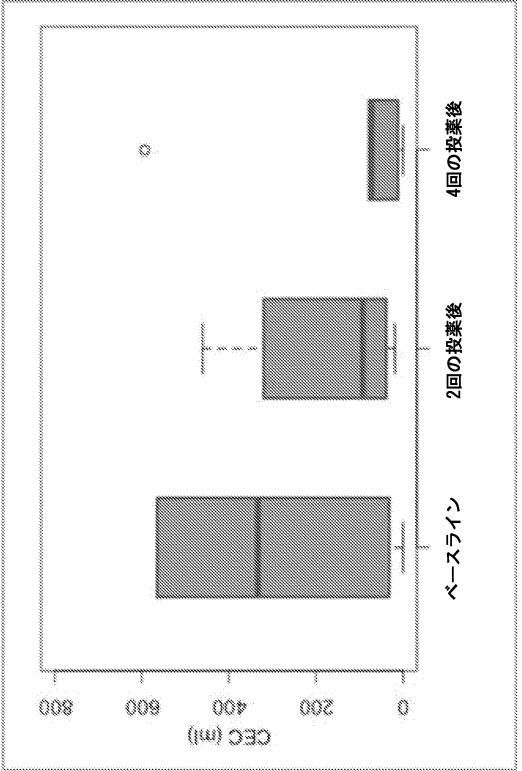
40

50

【図 4 2 A】



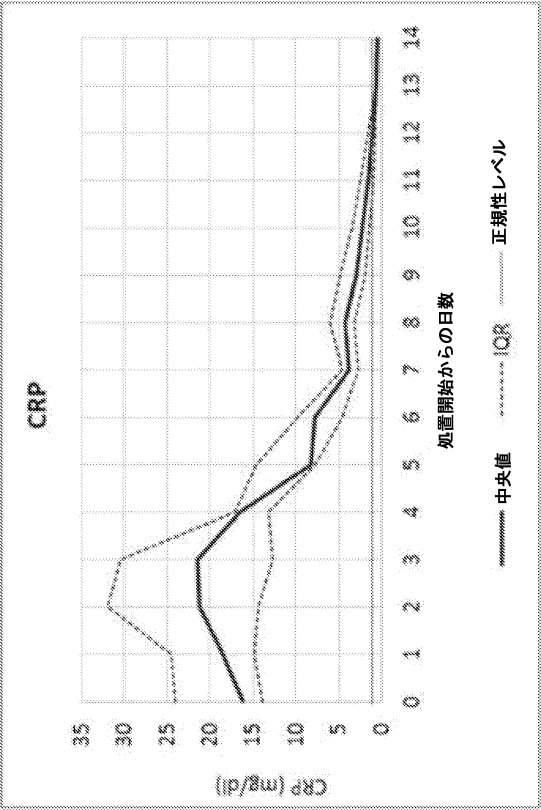
【図 4 2 B】



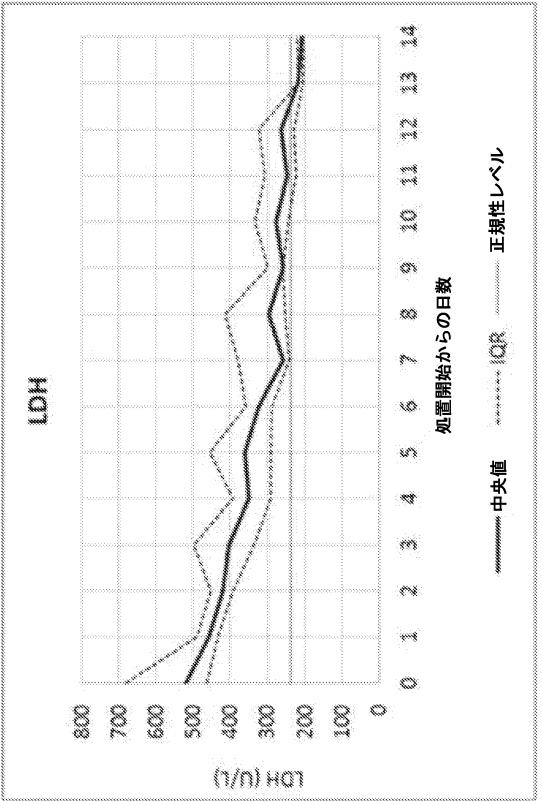
10

20

【図 4 3】



【図 4 4】

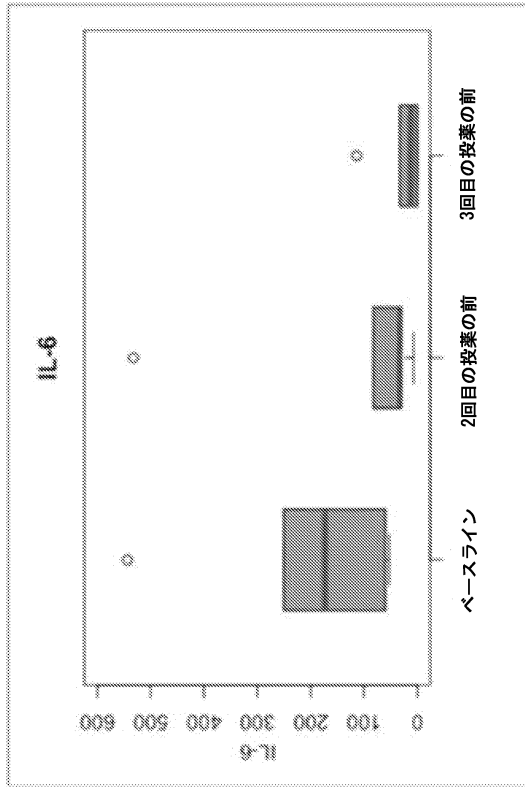


30

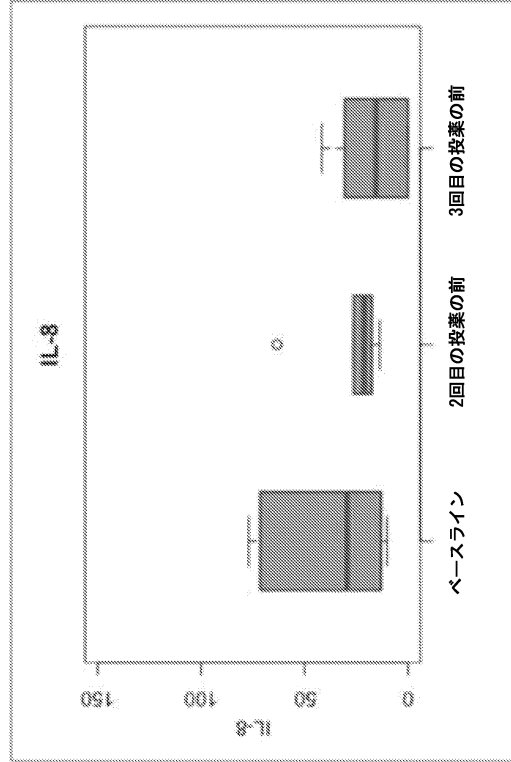
40

50

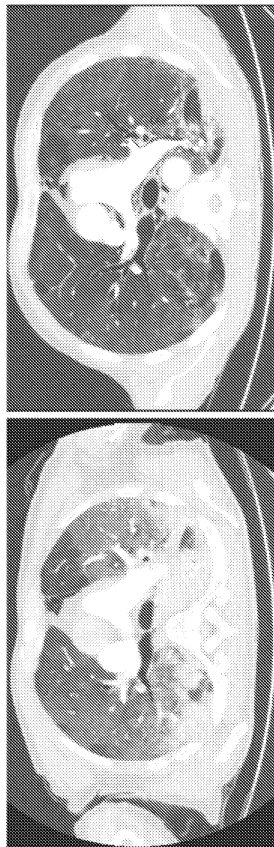
【図 4 5】



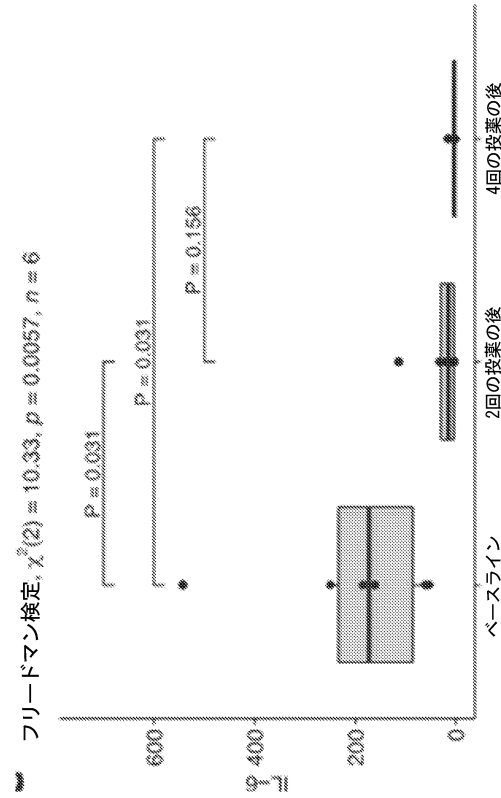
【図 4 6】



【図 4 7】



【図 4 8】



10

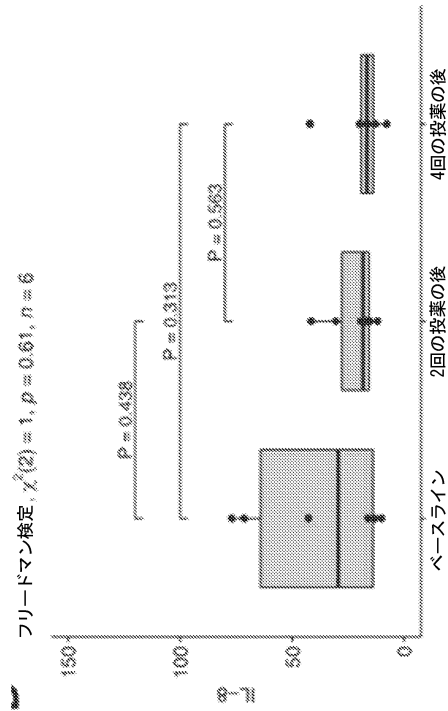
20

30

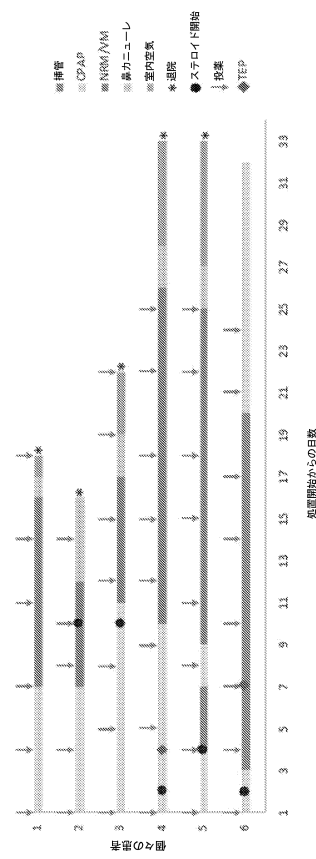
40

50

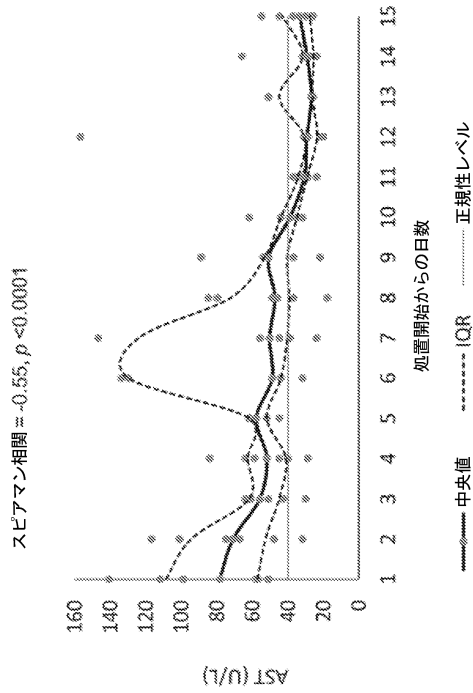
【図 49】



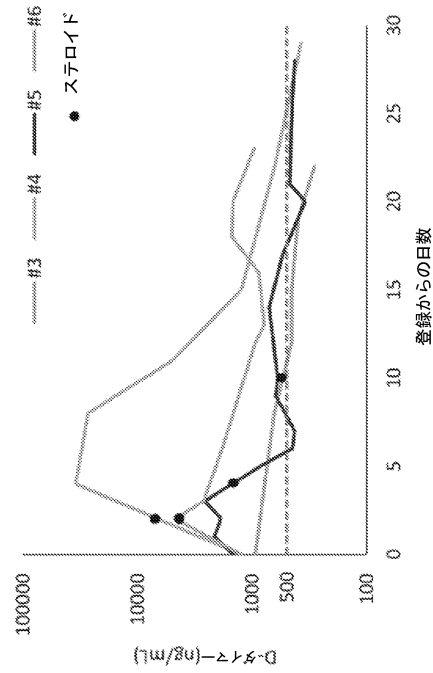
【図 50】



【図 51 A】



【図 51 B】



10

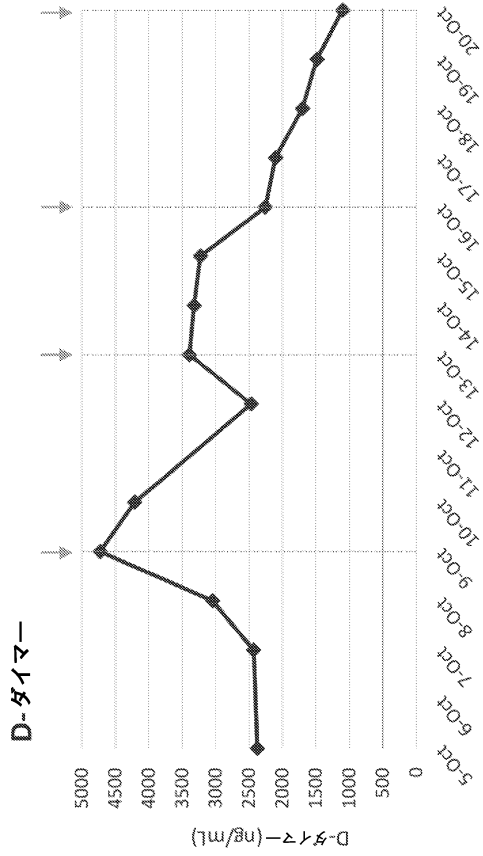
20

30

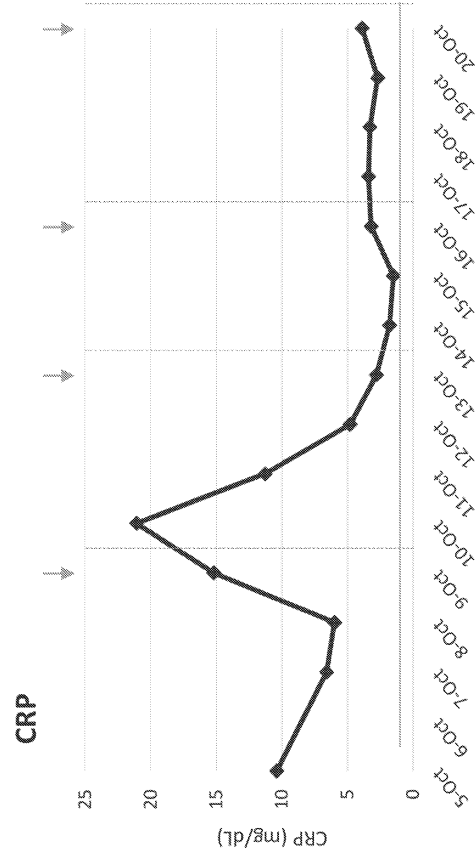
40

50

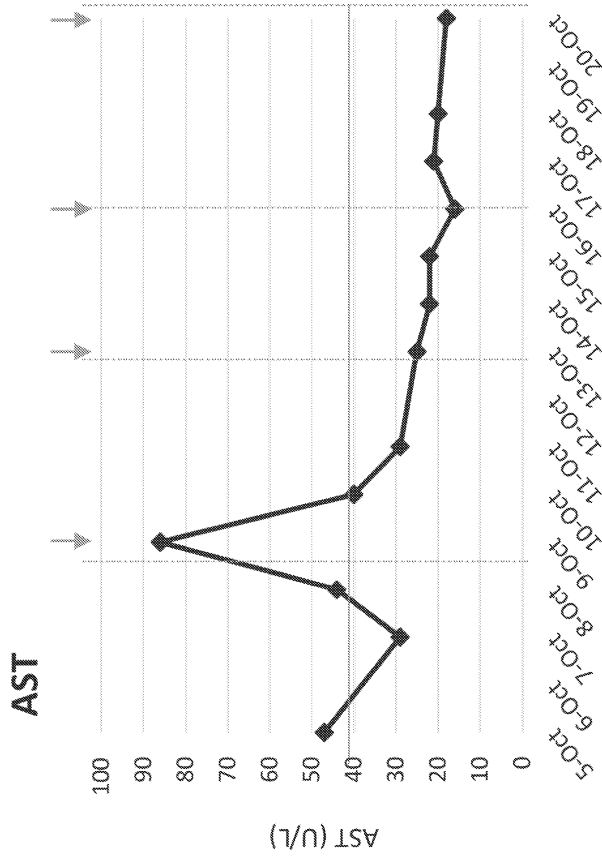
【図 5 2 A】



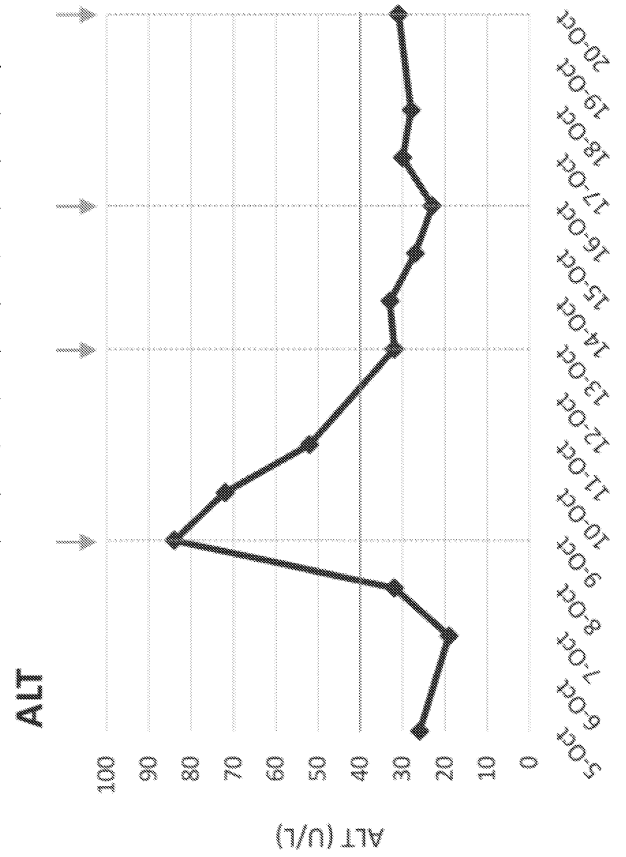
【図 5 2 B】



【図 5 2 C】



【図 5 2 D】



10

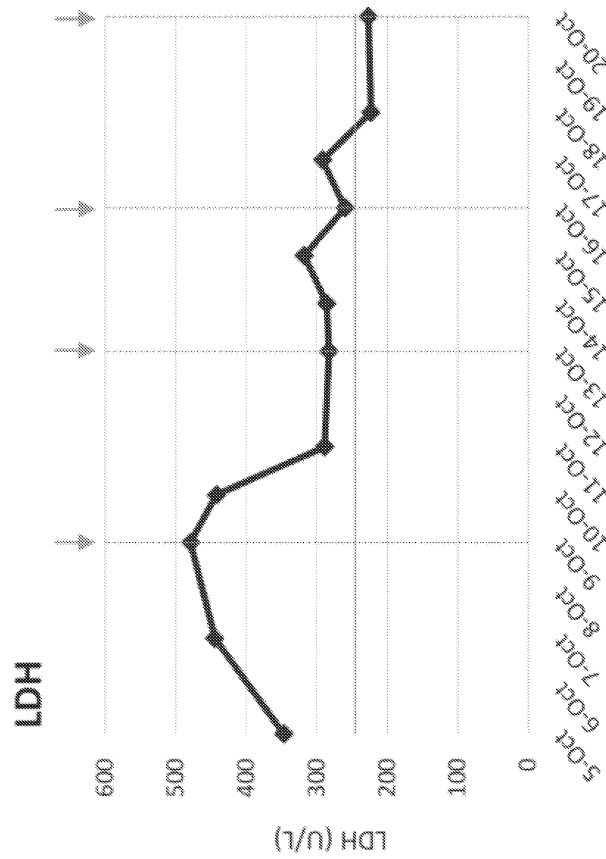
20

30

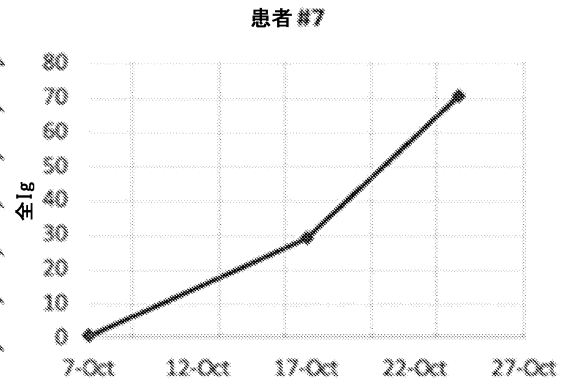
40

50

【図 5 2 E】



【図 5 3】



【配列表】

0007530437000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12
A 6 1 K	31/397 (2006.01)	A 6 1 K	31/397
A 6 1 K	31/40 (2006.01)	A 6 1 K	31/40
A 6 1 K	31/445 (2006.01)	A 6 1 K	31/445
A 6 1 K	31/4184 (2006.01)	A 6 1 K	31/4184
A 6 1 K	31/4439 (2006.01)	A 6 1 K	31/4439
A 6 1 K	31/16 (2006.01)	A 6 1 K	31/16
A 6 1 K	38/05 (2006.01)	A 6 1 K	38/05
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
A 6 1 P	31/14 (2006.01)	A 6 1 P	31/14

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/015,299

(32)優先日 令和2年4月24日(2020.4.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/008,540

(32)優先日 令和2年4月10日(2020.4.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/105,637

(32)優先日 令和2年10月26日(2020.10.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/986,566

(32)優先日 令和2年3月6日(2020.3.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/054,298

(32)優先日 令和2年7月21日(2020.7.21)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/062,843

(32)優先日 令和2年8月7日(2020.8.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

-
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 デモプロス グレゴリー エイ.
アメリカ合衆国 98119 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウエスト 201
- (72)発明者 キントン ティネカ ジェイ.
アメリカ合衆国 98119 ワシントン州 シアトル エリオット アベニュー ウエスト 201
- 審査官 伊藤 良子
- (56)参考文献 国際公開第2019/231933 (WO, A1)
米国特許出願公開第2019/0127484 (US, A1)
Am J Respir Cell Mol Biol, 2013年08月, Vol.49, Iss.2, pp.221-230
Eur Respir J, 2015年, Vol.46, p.1691-1700
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K
A61P
C07K
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
PubMed