



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월21일

(11) 등록번호 10-1522258

(24) 등록일자 2015년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7026782

(22) 출원일자(국제) 2007년03월27일

심사청구일자 2012년03월14일

(85) 번역문제출일자 2008년10월31일

(65) 공개번호 10-2008-0112359

(43) 공개일자 2008년12월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/065274

(87) 국제공개번호 WO 2007/117996

국제공개일자 2007년10월18일

(30) 우선권주장

11/645,359 2006년12월22일 미국(US)

60/788,876 2006년04월03일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2005123128 A2*

WO2004106384 A1

US20040038297 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

유니버시티 오브 레스터

영국 엘리1 7알에치 레스터서 레스터 유니버시티
로드

오메로스 코포레이션

미국, 워싱턴 98119, 시애틀, 201 엘리엇 에버뉴
웨스트

(72) 발명자

슈와에블, 한스-빌헬름

영국 엘리12 7에이에프 레스터서 마운트소렐 더
그린 36

스토버, 코르뒤라, 마가렛

영국 엘리2 7큐에이 레스터서 에일스톤 에리스 로
드 7

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 22 항

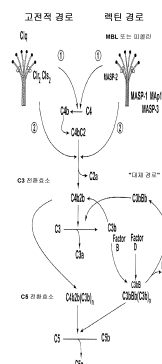
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 MASP-2 의존성 보체 활성화 유관 증상의 치료 방법

(57) 요약

본 발명의 일 특징으로서, 본 발명은 살아있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화의 효과를 억제하는 방법을 제공한다. 본 방법은 이들이 필요한 대상체에, MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는데 효과적인 MASP-2 억제제의 양을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시 상태에서, MASP-2 억제제는 면역 시스템의 고전적(C1q-의존성) 경로 성분을 손상시키지 않은 채 MASP-2-매개 대체 보체 경로 활성화에 관련된 세포성 손상을 억제한다. 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 액틴-의존성 보체 활성화의 효과를 억제하는 조성물을 제공한다.

대표도



(72) 발명자

테드포드, 클라크, 이.

미국 워싱턴 98370 폴스보 노스이스트 록아웃 레인
4058

파렌트, 제임스, 비.

미국 워싱턴 98110 바인브릿지 아일랜드 피.오. 박
스 10278

후지타, 테이조

일본 960-8157 후쿠시마 호라이 2에프-2-10-7

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO:6의 전장 MASP-2 폴리펩티드와 결합하지만, CUBI-EGF-CUBII 도메인으로 구성되는 MASP-2 N-말단 절편과 결합하지 않고, CCPII-SP 도메인으로 구성되는 MASP-2 C-말단 절편과 결합하지 않는, MASP-2 억제 항체 또는 이들의 절편으로서,

상기 MASP-2 억제 항체 또는 이들의 절편은 C1q-의존성 보체 활성화를 실질적으로 억제하지 않으면서 MASP-2 의존성 보체 활성화를 선택적으로 억제하는 것을 특징으로 하는 MASP-2 억제 항체 또는 이들의 절편.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 항체 또는 이들의 절편은 단클론, 또는 다클론, 또는 재조합 항체이고, 또는 항체는 감소된 효과기 기능을 보유하고, 또는 항체는 키메라, 인체적응형 또는 인간 항체이고, 또는 항체는 MASP-2 결핍 유전자삽입 동물 내에서 생산되는 것을 특징으로 하는 MASP-2 억제 항체 또는 이들의 절편.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항의 MASP-2 억제 항체의 치료학적 유효량 및 약학적 담체를 포함하는, 이들이 필요한 살아 있는 대상체 내에서 MASP-2 의존성 보체 활성화의 효과를 억제하는데 사용을 위한 약제에 있어서,

대상체는 다음으로부터 선택되는 MASP-2 의존성 보체 매개 증상을 겪고 있고:

이식 및/또는 재이식시의 혈관계형성, 혈관염, 헤노흐-셴라인 자반 신장염, 전신성 홍반 루푸스-유관 혈관염, 류마티스 관절염과 관련된 혈관염, 면역 복합 혈관염, 타카야수병, 확장 심근병증, 당뇨병성 혈관병증, 가와사키 병(동맥염), 정맥 공기 색전증(VGE), 및 스텐트 삽입 후 재협착, 회전죽상반 절제술 및 경피경혈관 심장동맥 확장술(PTCA)로부터 선택되는 혈관 증상;

대동맥류 복부, 심폐순환 우회술, 장기 이식 및/또는 사지/손가락 재접합술에 관계된 혈관 재문합, 뇌졸중, 심근 경색, 및 쇼크 및/또는 외과적 수술 후 혈류역학 소생술에 관련된 허혈-재관류 손상;

죽상동맥경화증;

췌장염, 크론병, 궤양 대장염, 과민성 대장 증후군 및 게실염으로부터 선택되는 염증 위장관 장애;

급성 호흡 곤란 증후군, 수혈-관련 급성 폐 손상, 허혈/재관류 급성 폐 손상, 만성 폐쇄 폐순환 질환, 천식, 베게너육아종증, 항사구체 기저막 질환(긋파스처 질환), 태변 흡인 증후군, 폐쇄기관지염 증후군, 특발성 폐섬유증, 화상에 의한 2차 급성 폐 손상, 비심장성 폐부종, 수혈-관련 호흡 저하 및 폐공기증으로부터 선택되는 폐순환 증상;

골관절염, 류마티스 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 통풍, 신경병관절병증, 건선 관절염, 척추관절병증, 결정성 관절병증, 근육퇴행위축증 및 전신성 홍반 루푸스(SLE)로부터 선택되는 근골격 증상;

사구체간질증식성 사구체신염, 막사구체신염, 막증식성 사구체신염(사구체간질모세관 사구체신염), 급성 감염후 사구체신염(염쇄구균감염후 사구체신염), 한랭글로블린 사구체신염, 루푸스 신장염, 헤노흐-셴라인 자반 신장염 및 IgA 신장병으로부터 선택되는 신장 증상;

건선, 자가면역 수포성 피부병, 호산구증가해면화, 수포성 유천포창, 후천성 수포성 표피박리증, 임신성 포진, 열적 화상 손상 및 화학적 화상 손상으로부터 선택되는 피부 증상;

다발성 경화증, 중증근무력증, 헌팅턴무도병, 근위축성 측삭 경화증, 급성특발다발성신경염, 뇌졸중 후 재관류, 퇴행성 디스크, 뇌 외상, 파킨슨병, 알츠하이머 질환, 밀러-피셔 증후군, 뇌 외상 및/또는 출혈, 탈수초 및 수막염으로부터 선택되는 신경계 장애 또는 손상;

패혈증, 중증 패혈증, 패혈 쇼크, 패혈증에 기인한 급성 호흡 곤란 증후군, 전신 염증 반응 증후군, 출혈 쇼크, 용혈 빈혈, 자가면역 혈전성 용혈 빈혈 및 용혈 요독증후군으로부터 선택되는 혈액 장애;

통증 방광 질환, 감각 방광 질환, 만성 무균성 방광염, 간질성 방광염, 불임증, 태반기능부전 및 유산 및 경색 전협심증으로부터 선택되는 비뇨생식 증상;

비비만 당뇨병(타입-1 당뇨병 또는 인슐린-의존성 당뇨병) 및/또는 혈관병증, 신경병증 및 망막병증으로부터 선택되는 타입-1 또는 타입-2(성인형) 당뇨병에 관련된 합병증에 관련된 증상;

악성종양;

하시모토 갑상선염, 스트레스, 불안감, 뇌하수체로부터의 프로락틴, 성장 또는 다른 인슐린-유사 성장 인자 및 아드레노코르티코트로핀의 조절 방출에 관련된 호르몬 장애와 같은 내분비 장애;

연령-관련 황반 변성;

또는 대상체는

(i) 체외순환 재관류 과정, 또는

(ii) 장기 또는 조직 이식 수술, 또는

(iii) 화학치료제 치료 및/또는 방사선 요법을 받았거나, 하는 중이거나 또는 하게 될 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 대상체는 이식 및/또는 재이식시의 혈관재형성, 혈관염, 헤노흐-헨라인 자반 신장염, 전신성 홍반 루푸스-유관 혈관염, 류마티스 관절염과 관련된 혈관염, 면역 복합 혈관염, 타카야수병, 확장 심근병증, 당뇨병 혈관병증, 가와사키병(동맥염), 정맥 공기 색전증(VGE), 및 스탠트 삽입 후 재협착, 회전죽상반 절제술 및 경피경혈관 심장동맥 확장술(PTCA)로부터 선택되는 MASP-2-의존성 보체 매개 혈관 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 대상체는 허혈-재관류 손상과 관련된 MASP-2-의존성 보체 매개 증상을 겪고 있으며, 허혈-재관류 손상은 대동맥류 복구, 심폐순환 우회술, 장기 이식 및/또는 사지/손가락 재접합술에 관계된 혈관 재문합, 뇌졸중, 심근 경색, 및 쇼크 및/또는 외과적 수술 후 혈류역학 소생술에 관련된 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 8

제 5 항에 있어서, 이들이 필요한 대상체에서 죽상동맥경화증의 치료 또는 예방을 위한 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 9

제 5 항에 있어서, 대상체는 염증 위장관 장애와 관련되는 MASP-2-의존성 보체 매개 증상을 겪고 있으며, 염증 위장관 장애는 궤양염, 크론병, 궤양 대장염, 과민성 대장 증후군 및 게실염으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 10

제 5 항에 있어서, 대상체는 급성 호흡 곤란 증후군, 수혈-관련 급성 폐 손상, 허혈/재관류 급성 폐 손상, 만성

폐쇄 폐순환 질환, 천식, 베게너육아종증, 항사구체 기저막 질환(긧파스처 질환), 태번 흡인 증후군, 폐쇄기관지염 증후군, 특발성 폐섬유증, 화상에 의한 2차 급성 폐 손상, 비심장성 폐부종, 수혈-관련 호흡 저하 및 폐공기증으로부터 선택되는 MASP-2-의존성 보체 매개 폐순환 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 11

제 5 항에 있어서, 대상체는 체외순환 재관류 과정을 받았거나, 하는 중이거나 또는 하게될 것이며, 예를 들어 체외순환 재관류 과정은 혈액투석, 혈장교환, 백혈구분반술, 최외막형 산소공급기(ECMO), 헤파린-유도성 최외막형 산소섭취 LDL 침전(HELP) 및 심폐순환 우회술(CPB)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 12

제 5 항에 있어서, 대상체는 장기 또는 조직 이식 수술, 예를 들어 장기 타がい식술, 장기 이종장기이식 장기 및 조직 이식을 받았거나, 하는 중이거나 또는 하게될 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 13

제 5 항에 있어서, 대상체는 화학치료제 치료 및/또는 방사선 요법을 받았거나, 하는 중이거나 또는 하게될 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 14

제 5 항에 있어서, 대상체는 골관절염, 류마티스 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 통풍, 신경병관절병증, 건선관절염, 척추관절병증, 결정성 관절병증, 근육퇴행위축증 및 전신성 홍반 루푸스(SLE)로부터 선택되는 근골격 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 15

제 5 항에 있어서, 대상체는 사구체간질증식성 사구체신염, 막사구체신염, 막증식성 사구체신염(사구체간질모세관 사구체신염), 급성 감염후 사구체신염(염쇄구균감염후 사구체신염), 한랭글로블린 사구체신염, 루프스 신장염, 헤노흐-헨라인 자반 신장염 및 IgA 신장병으로부터 선택되는 MASP-2 의존성 보체 매개 신장 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 16

제 5 항에 있어서, 대상체는 건선, 자가면역 수포성 피부병, 호산구증가해면화, 수포성 유천포창, 후천성 수포성 표피박리증, 임신성 포진, 열적 화상 손상 및 화학적 화상 손상으로부터 선택되는 MASP-2 의존성 보체 매개 피부 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 17

제 5 항에 있어서, 대상체는 다발성 경화증, 중증근무력증, 헌팅턴무도병, 근위축성 측삭 경화증, 급성특발다발성신경염, 뇌졸중 후 재관류, 퇴행성 디스크, 뇌 외상, 파킨슨병, 알츠하이머 질환, 밀러-피셔 증후군, 뇌 외상 및/또는 출혈, 탈수초 및 수막염으로부터 선택되는 신경계 장애 또는 손상과 관련된 MASP-2 의존성 보체 매개 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 18

제 5 항에 있어서, 대상체는 패혈증, 중증 패혈증, 패혈 쇼크, 패혈증에 기인한 급성 호흡 곤란 증후군, 전신염증 반응 증후군, 출혈 쇼크, 용혈 빈혈, 자가면역 혈전성 용혈 빈혈 및 용혈 요독증후군으로부터 선택되는 혈액 장애와 관련된 MASP-2 의존성 보체 매개 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 19

제 5 항에 있어서, 대상체는 통증 방광 질환, 감각 방광 질환, 만성 무균성 방광염, 간질성 방광염, 불임증, 태반기능부전 및 유산 및 경색전협심증으로부터 선택되는 비뇨생식 증상과 관련된 MASP-2 의존성 보체 매개 증상

을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 20

제 5 항에 있어서, 대상체는 비비만 당뇨(타입-1 당뇨 또는 인슐린-의존성 당뇨병) 및/또는 혈관병증, 신경병증 및 망막병증으로부터 선택되는 타입-1 또는 타입-2(성인형) 당뇨에 관련된 합병증에 관련된 MASP-2-의존성 보체 매개 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 21

제 5 항에 있어서, 대상체는 악성종양을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 22

제 5 항에 있어서, 대상체는 하시모토 갑상선염, 스트레스, 불안감, 뇌하수체로부터의 프로락틴, 성장 또는 다른 인슐린-유사 성장 인자 및 아드레노코르티코트로핀의 조절 방출에 관련된 호르몬 장애와 같은 내분비 장애를 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 23

제 5 항에 있어서, 대상체는 연령-관련 황반 변성의 보체 매개 안과적 증상을 겪고 있는 것을 특징으로 하는 사용을 위한 약제.

청구항 24

약학적 담체에서 제 1 항 또는 제 2 항의 MASP-2 억제 항체의 치료학적 유효량을 결합하는 것을 포함하는, 약제가 필요한 살아있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화의 효과를 억제하는데 사용을 위한 약제를 제조하는 방법.

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화의 역효과를 억제하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 보체 시스템은 미생물 감염 및 다른 급성 손상에 대한 염증 반응을 개시하고 증폭하는 초기 활성화 기작을 제공한다(M. K. Liszewski and J. P. Atkinson, 1993, in Fundamental Immunology, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York). 보체 활성화는 잠재적인 병원체에 대한 소중한 최전방의 방어를 제공하지만, 보호성 염증 반응을 증진하는 보체의 활성화는 숙주에 대한 잠재적인 위협이 될 수 있다(K.R. Kalli, et al., Springer Semin. Immunopathol. 75:417-431, 1994; B.P. Morgan, Eur. J. Clinical Investig. 24:219-228, 1994). 예를 들면, C3 및 C5 단백질분해 산물은 호중구를 모집하여 활성화시킨다. 이러한 활성화된 세포는 무차별적으로 파괴 효소를 방출하며, 장기 손상을 유발할 수 있다. 이와 함께, 보체 활성화는 숙주 세포의 부근 및 미생물 표적상에서 용해성 보체 성분의 부작용을 유발하여 숙주 세포를 용해시킨다.

[0003] 보체 시스템은 다수의 급성 및 만성 질환 상태, 예컨대: 심근 경색, 뇌졸중, 수반성 혈관재형성, ARDS, 재관류 손상, 패혈 쇼크, 열화상 수반성 모세혈관 누출, 심폐 우회술 후 염증, 이식 거부 반응, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 중증근무력증, 및 알츠하이머 질환의 발병 기전에 기여함으로써 연관되어 있다. 이러한 증상의 대부분에서, 보체가 원인은 아니지만 발병기전에 관련되는 수 개의 인자 중의 하나이다. 그럼에도 불구하고, 보체 활성화는 주요 병리학적 기작일 수 있으며, 다수의 이러한 질환 상태의 임상적 조절을 위한 한 핵심일 수 있다. 다양한 질환 상태에 있어서 보체-매개 조직 손상의 중요성에 대한 인식이 증가하여 효과적인 보체 억제 약물의

필요성이 강조된다. 보체 활성화를 특이적으로 표적화하거나 억제하기 위한 용도로 인간에 인가된 약물은 없다.

[0004]

현재, 보체 시스템은 3종류의 별도의 경로를 통하여 활성화될 수 있다고 널리 알려져 있다: 고전적 경로, 력틴 경로, 및 대체 경로. 고전적 경로는 외래 입자(즉, 항원)에 결합된 항체에 의하여 촉발되며, 따라서 특이적 항체의 생성을 위한 항원에 노출되기 전에 필요하게 된다. 고전적 경로의 활성화는 면역 반응의 발달에 관련되어 있기 때문에, 고전적 경로는 후천성 면역 시스템의 일부이다. 이에 반하여, 력틴 및 대체 경로 둘 모두는 클론 면역성에 독립적이며, 선천성 면역 시스템의 일부이다.

[0005]

고전적 경로의 활성화의 제1 단계는 특이적 인식 분자, C1q와 항원-결합 IgG 및 IgM의 결합이다. 보체 시스템 활성화에 의하여 세린 프로테아제 효소원의 순차적 활성화가 이루어진다. C1q는 C1이라는 복합체로서 C1r 및 C1s 세린 프로테아제 전효소와 결합되어 있으며, C1q와 면역 복합체의 결합에 있어서, C1r의 Arg-Ile 부위의 자가단백질분해 분열 후 C1s의 C1r 활성화가 따르며, 이로써 C4 및 C2의 분해능을 얻게된다. C4가 두 절편, C4a 및 C4b로 분열되어, C4b 절편이 인접 히드록실 또는 아미노기로 공유결합을 형성하도록 하며, 활성화된 C2의 C2b 절편과의 비공유 상호작용을 통하여 C3 전환효소(C4b2b)의 후속적 생성이 가능하도록 한다. C3 전환효소(C4b2b)는 C5 전환효소(C4b2b3b)의 생성과 미생물 용해를 유발시킬 수 있는 막 공격 복합체(C5b-9)의 형성을 유도하는 C3를 활성화시킨다. 활성화된 형태의 C3 및 C4(C3b 및 C4b)는 다수의 포식세포상의 보체 수용체에 의하여 인식되는 외래 표적 표면에 공유적으로 부착된다.

[0006]

독립적으로, 력틴 경로에 의한 보체 시스템 활성화의 첫 단계는 특이적 인식 분자의 결합이며, 이는 유관 세린 프로테아제의 활성화를 뒤 따른다. 그러나, C1q에 의한 면역 복합체의 결합보다는, 력틴 경로 내의 인식 분자는 탄수화물-결합 단백질 (만난-결합 력틴(MBL), H-피콜린, M-피콜린, 및 L-피콜린)이다(J. Lu et al., Biochim. Biophys. Acta 7572:387-400, 2002; Holmskov et al., Annu. Rev. Immunol. 21:547-578 (2003); Teh et al., Immunology 101:225-232 (2000)). 문헌 Ikeda et al.는 최초로, C1q과 같이, MBL가 C4-의존성 방식 내의 효소 만난-피복 적혈구에 결합에 의한 보체 시스템을 활성화시킬 수 있다는 것을 입증하였다 (K. Ikeda et al., J. Biol. Chem. 2(52:7451-7454, 1987). 콜렉틴 단백질족의 구성원인 MBL는 탄수화물과 피라노스 환의 적도판에 지향성인 3- 및 4-히드록시기 결합하는 칼슘-의존성 력틴이다. MBL의 돌출 리간드는 따라서 D-만노스 및 N-아세틸-D-글루코사민이나, 입체적 요구에 적합하지 않는 탄수화물은 MBL에 대한 검출불가능한 친화도를 가진다 (Weis, W.I., et al., Nature 360:127-134, 1992). MBL과 1가 당(Sugar) 간의 상호작용은 전형적으로 2 mM 범위의 해리 상수로서 지극히 약하다. MBL는 동시에 수개의 당당류 잔기와 상호작용을 함으로써 글리칸 리간드에 밀착된, 특이적 결합을 달성한다(Lee, R.T., et al., Archiv. Biochem. Biophys. 299:129-136, 1992). MBL는 일반적으로 미생물 예컨대, 박테리아, 효모, 기생충 및 특정 바이러스를 장식하는 탄수화물 패턴을 인식한다. 이에 반하여, MBL은 일반적으로 포유류 혈장 및 세포 표면 글리코단백질상에 존재하는 "성숙" 복합 글리코접합체를 장식하는 전중단 및 궁극적인 당인 D-갈락토오스 및 시알산을 인식하지 못한다. 이 결합 특이성은 자가 활성으로부터 보호하는 것을 돕는다고 알려져 있다. 그러나, MBL는 포유류 세포의 세포질 세망 및 골지내에 격리된 N-링크 글리코단백질 및 글리코지질상의 고-만노스 "전구체" 글리칸의 클러스터에 고친화도로 결합한다 (Maynard, Y., et al., J. Biol. Chem. 257:3788-3794, 1982). 따라서, 손상된 세포는 MBL 결합을 통한 력틴 경로 활성화의 잠재적인 표적이다.

[0007]

피콜린은 MBL보다는 다른 유형의 력틴 도메인, 즉 피브리노겐-유사 도메인을 가공한다. 피콜린은 Ca^{++} -비의존성 방식 내의 당 잔기에 결합한다. 인간에 있어서, 3 종류의 피콜린, L-피콜린, M-피콜린 및 H-피콜린이 확인되었다. 혈청 피콜린인 L-피콜린 및 H-피콜린은 N-아세틸-D-글루코사민에 대한 특이성에서 공통점이 있다; 그러나, H-피콜린은 N-아세틸-D-갈락토사민에 결합한다. L-피콜린, H-피콜린 및 MBL의 당 특이성에서의 차이점은 다른 력틴이 상보적일 수 있으며, 오버래핑을 통하여, 다른 글리코접합체를 표적화할 수 있다는 것을 의미한다. 이러한 개념은 력틴 경로 내의 공지의 력틴에서, 오직 L-피콜린만이 모든 그람-양성 박테리아상에서 발견되는 지질 타이코산, 세포벽 글리코접합체에 특이적으로 결합한다는 최근의 연구에 의하여 지지된다(Lynch, N. J., et al., J. Immunol. 172:1198-1202, 2004). 콜렉틴(즉, MBL)과 피콜린은 아미노산 서열내에서 현저한 유사성이 없다. 그러나, 이 두 군의 단백질은 유사한 도메인 기구를 보유하며, C1q와 같이, 다중부위 결합의 가능성을 최대화하는 올리고머 구조 내로 결합된다. MBL의 혈청 농도는 건강한 집단에서 매우 유동적이며, 이는 MBL 유전자의 프로모터 및 암호화 영역 모두 내의 유전자다형성/돌연변이에 의하여 유전적으로 조절된다. 급성기 단백질에서, MBL의 발현은 염증 과정에서 추가로 상방조절된다. L-피콜린은 MBL과 유사한 농도로 혈청 내에서 존재한다. 따라서, 력틴 경로의 L-피콜린 암(arm)은 강도에서 MBL 암(arm)에 잠재적으로 비교된다. MBL 및 피콜린은 옵소닌으로서 기능할 수도 있으며, 이는 이러한 단백질과 포식세포 수용체의 상호작용을 필요로 한다(Kuhlman, M.,

et al, J. Exp. Med. 169:1733, 1989; Matsushita, M., et al, J. Biol. Chem. 271:2448-54, 1996). 그러나, 포식 세포상의 수용체(들)의 특성은 아직 확립되지 않았다.

[0008]

인간 MBL는 이들의 콜라겐-유사 도메인을 통한 특수한 C1r/C1s-유사 세린 프로테아제, 즉 MBL-유관 세린 프로테아제(MASPs)와의 특이적이며 고친화도 상호작용을 형성한다. 현재까지, 3개의 MASP가 설명되었다. 우선, 단일 효소 "MASP"가 확인되었으며, 보체 캐스케이드의 개시를 책임지는 효소로서 특성화되었다(즉, C2 및 C4 분열)(Ji, Y. H., et al., J. Immunol. 150:571-578, 1993). 그 다음, 이는 MASP가 두 프로테아제: MASP-1 및 MASP-2의 혼합물이라는 사실을 입증하였다(Thiel, S., et al, Nature 386:506-510, 1997). 그러나, MBL-MASP-2 복합체 단독으로 보체 활성화에 충분하다는 것이 입증되었다(Vorup-Jensen, T., et al., J. Immunol. 165:2093-2100, 2000). 추가적으로, 단지 MASP-2만이 고속으로 C2 및 C4를 분열시켰다(Ambrus, G., et al., J. Immunol. 170:1374-1382, 2003). 따라서, MASP-2는 C4 및 C2를 활성화시켜 C3 전환효소, C4b2b를 생성하는 프로테아제이다. 이는 C1 복합체와의 현저한 차이이며, 여기서 두 특이적 세린 프로테아제(C1r 및 C1s)의 배위 반응은 보체 시스템의 활성화를 유도한다. 최근, 제3의 신규의 프로테아제, MASP-3가 분리되었다(Dahl, M.R., et al., Immunity 15:127-35, 2001). MASP-1 및 MASP-3는 대안적으로 동일한 유전자의 스플라이스된 산물이다. MASP-1 및 MASP-3의 생물학적 기능은 용해되어 잔존한다.

[0009]

MASPs는 C1 복합체의 효소성분인 이들의 C1r 및 C1s와 동일한 도메인 기구를 공유한다(Sim, R.B., et al., Biochem. Soc. Trans. 28:545, 2000). 이러한 도메인은 N-말단 C1r/C1s/sea 성게 Vegf/골형성 단백질(CUB) 도메인, 표피 성장 인자-유사 도메인, 제2 CUB 도메인, 보체 조절 단백질 도메인의 직렬, 및 세린 프로테아제 도메인을 포함한다. C1 프로테아제에 있어서, MASP-2의 활성화는 세린 프로테아제 도메인에 인접한 Arg-Ile 결합의 분열을 통하여 발생하며, 이는 효소를 이황화결합 A 및 B 사슬로 나누고, 후자는 세린 프로테아제 도메인으로 구성되어 있다. 최근, 유전적으로 결정된 MASP-2의 결핍이 알려졌다(Stengaard-Pedersen, K., et al., New Eng. J. Med. 349:554-560, 2003). 단일 뉴클레오타이드의 돌연변이는 CUB1 도메인 내에서 Asp-Gly 교환을 유도하며, MBL에 결합하지 못하는 MASP-2를 부여한다.

[0010]

MBL는 19 kDa의 MBL-유관 단백질(MAP 19) (Stover, CM., J. Immunol. 162:3481-90, 1999) 또는 작은 MBL-유관 단백질(sMAP) (Takahashi, M., et al., Int. Immunol. 11:859-863, 1999)로 언급되는 비효소적 단백질과 유관되어 있다. MAP19은 MASP 2 유전자 산물의 대체 스플라이싱에 의하여 형성되며, 4개의 독특한 아미노산의 추가 서열이 따르는 MASP-2의 최초 2 도메인을 포함한다. MASP 1 및 MASP 2 유전자는 각각 염색체 3 및 1 상에 위치한다(Schwaebble, W., et al., Immunobiology 205:455-466, 2002). 수개의 증거에 의하여 다른 MBL-MASP 복합체가 존재하며 혈청 내의 전체 MASP의 많은 부분이 MBL과 결합되어 있지 않다는 사실이 입증되었다(Thiel, S., et al., J. Immunol. 165:878-887, 2000). H- 및 L-피콜린 모두는 MASP와 결합되어 있으며, MBL와 같이 렉틴 보체 경로를 활성화시킨다(Dahl, M.R., et al., Immunity 15:127-35, 2001; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). 렉틴 및 고전적 경로 둘 모두는 일반적인 C3 전환효소(C4b2b)를 형성하고, 두 경로는 이 단계에서 집중된다.

[0011]

렉틴 경로는 감염에 대한 숙주 방어에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 숙주 방어에서의 MBL 관여에 대한 강력한 증거는 기능성 MBL의 혈청 수준이 감소하는 환자의 분석에서 나타났다(Kilpatrick, D. C, Biochim. Biophys. Acta 1572:401-413, 2002). 이러한 환자는 박테리아 및 진균 감염을 재발시키는 감수성을 나타낸다. 이러한 증상은 모계 유도성 항체 역가가 감쇄하므로써 취약성의 명백한 원인과과정에서, 항체 반응의 전체 레퍼토리를 발달시키기 전에 생의 초기에 명백하다. 이 증후군은 종종 MBL의 콜라겐 부분 내의 몇몇 부위에서 돌연변이를 유발시키며, 이는 MBL 올리고머의 적절한 형성을 방해한다. 그러나, MBL는 보체 비의존성 옵소닌으로서 기능하므로, 증가된 감염에 대한 감수성의 정도가 손상된 보체 활성화에 기인한다는 것은 밝혀지지 않았다.

[0012]

비-감염성 인간 질환의 발병기전내에서 고전적 및 대체 보체 경로에 관여한다는 광범위한 증거가 있음에도, 렉틴 경로의 역할은 평가되기 시작하였다. 최근 연구는 렉틴 경로의 활성화가 허혈/재관류 손상에서 보체 활성화 및 유관 염증을 일으킬 수 있다는 증거를 제공한다. 문헌 Collard et al. (2000)은 산화 스트레스를 가한 배양된 내피 세포는 MBL에 부착되며, 인간 혈청에 노출에 의하여 C3의 부착을 나타낸다는 것을 보고하였다(Collard, CD., et al., Am. J. Pathol. 156:1549-1556, 2000). 이와 함께, 인간 혈청을 차단 항-MBL 단클론 항체로 처리하면 MBL 결합 및 보체 활성화가 억제되었다. 이러한 연구결과는 심근 허혈-재관류의 레트 모델에 확장되며, 레트 MBL에 대한 차단 항체로 처리된 이 레트는 대조군 항체로 치료한 레트보다 심장동맥 폐색에 의한 심근 손상이 현저하게 감소된다고 나타난다(Jordan, J.E., et al., Circulation 104:1413-1418, 2001). 산화 스트레스 후 혈관 내피에 대한 MBL 결합의 분자 기작은 불분명하다; 최근의 연구는 산화 스트레스 후 렉틴 경로의 활성화가 글리코접합체가 아닌, 혈관 내피 사이토크라틴에 결합한 MBL에 의하여 매개될 수 있다는 것을 제안하였다

(Collard, CD., et al., Am. J. Pathol. 159:1045-1054, 2001). 그 밖의 연구는 허혈/재관류 손상의 발병기전 내의 고전적 및 대체 경로에 관한 것이며, 이 질환에서의 렉틴 경로의 역할은 논란속에 있다(Riedermann, N.C., et al., Am. J. Pathol. 162:363-367, 2003).

[0013] 고전적 및 렉틴 경로와 대비하여, C1q 및 렉틴이 다른 두 경로에서 수행하는 인식 기능을 수행하는 대체 경로의 개시자는 발견되지 않았다. 현재 외래 또는 다른 비정상 표면(박테리아, 효모, 바이러스 감염 세포, 또는 손상된 조직)에 의하여 자발적으로 촉발된다는 것이 널리 받아들여지고 있다. 대체 경로에 직접 관여하는 4개의 혈장 단백질이 있다: C3, 인자 B 및 D, 및 프로퍼딘. 천연 C3로부터 C3b의 단백질분해 생성은 기능에 대한 대체 경로가 필요하다. 대체 경로 C3 전환효소(C3bBb)는 필수 서브유닛으로서 C3b를 함유하고 있기 때문에, 대체 경로를 통하는 제1 C3b의 기원에 관한 의문이 복잡한 문제를 제시하였으며, 상당한 연구를 자극하게 되었다.

[0014] C3는 티오에스테르 결합으로 알려진 드문 번역후 변형을 포함하는 단백질족(C4 및 α-2 매크로글로블린)에 속한다. 티오에스테르기는 말단 카르보닐기가 시스테인 3 아미노산의 설프하이드릴기에 결합된 글루타민으로 구성된다. 이 결합은 불안정하며 글루타민의 친전자성 카르보닐기는 히드록실 또는 아미노기를 통하여 다른 분자와 공유 결합을 형성할 수 있다. 무손상 C3의 소수성 포켓내에 격리되는 경우 티오에스테르 결합은 상당히 안정적이다. 그러나, C3가 C3a 및 C3b로 단백질분해 분열되어 C3b상에서 고반응성 티오에스테르 결합에 노출되게 되며, 이 기작에 의하여, C3b가 표적에 공유적으로 부착된다. 이와 함께 잘 문서화된 C3b가 보체 표적에 공유 결합하는 역할 이외에도, C3 티오에스테르는 대체 경로의 촉발에 주요한 역할을 갖게된다. 널리 수용되는 "틱-오버 이론"에 따라, 대체 경로는 유체-상 전환효소, iC3Bb의 생성에 의하여 개시되며, C3를 가수분해된 티오에스테르(iC3; C3(H₂O)) 및 인자 B로 형성한다(Lachmann, PJ., et al., Springer Semin. Immunopathol. 7:143-162, 1984). C3b-유사 iC3는 단백질 내의 내부 티오에스테르의 저속 자발적 가수분해에 의하여 천연 C3로부터 생성된다(Pangburn, M. K., et al., J. Exp. Med. 754:856-867, 1981). iC3Bb 전환효소의 활성화를 통하여, C3b 분자는 표적 표면에 부착되며, 이에 따라 대체 경로가 개시된다.

[0015] 대체 경로 활성화의 개시자에 대하여 거의 알려진 것이 없다. 활성화제는 효모 세포벽(지모산), 많은 순수 폴리싸카라이드, 레빗 적혈구, 특정 면역글로블린, 바이러스, 진균, 박테리아, 동물 종양 세포, 기생충, 및 손상된 세포를 포함하는 것으로 알려져 있다. 이러한 활성화제에 일반적인 유일한 특징은 탄수화물의 존재이며, 탄수화물 구조의 복잡성 및 다양성은 인식된 공유 분자 결정기를 형성하기 힘들게한다.

[0016] 대체 경로는 추가의 대체 경로 C3 전환효소(C3bBb)의 형성에 있어서 생성된 모든 C3b에 인자 B가 관여하기 때문에 렉틴/고전적 경로 C3 전환효소(C4b2b)의 강력한 증폭 루프를 제공하게 된다. 대체 경로 C3 전환효소는 프로퍼딘의 결합에 의하여 안정화된다. 프로퍼딘은 대체 경로 C3 전환효소 반감기를 6 내지 10배 향상시킨다. C3 전환효소에 C3b를 부가함으로써 대체 경로 C5 전환효소의 형성을 유도한다.

[0017] 모든 3 경로(즉, 고전적, 렉틴 및 대체 경로)는 C5에서 집중된다고 알려져 있으며, 이는 분열되어 다수의 사전염증 효과를 지닌 산물을 형성한다. 집중된 경로 말단 보체 경로라고 한다. C5a는 평활근 및 혈관 색조, 및 혈관 투과성의 변화를 유도하는 가장 잠재적인 아나필라톡신이다. 이는 가장 강력한 케모택신이며 호중구 및 단핵구 둘 모두의 활성제이다. C5a-매개 세포성 활성화는 사이토카인, 가수분해효소, 아라키돈산 대사물질 및 반응성 산소종을 포함하는 다수의 추가의 염증 매개체의 방출을 유도함으로써 염증 반응을 현저하게 증폭시킬 수 있다. C5 분열은 막 공격 복합체(MAC)로 알려진 C5b-9의 형성을 유도한다. 저용해 MAC 부착은 용해성 세공(pore)-형성 복합체로서의 역할과 함께 염증에 있어서의 중요한 역할을 하게된다는 강력한 증거가 있다.

발명의 상세한 설명

[0018] 발명의 개요

[0019] 본 발명의 일 특징으로서, 본 발명은 살아있는 대상체 내의 MASP-2-의존성 보체 활성화의 역효과를 억제하는 방법을 제공한다. 이 방법은 이들이 필요한 대상체에 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는데 효과적인 MASP-2 억제제의 양을 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서, "MASP-2-의존성 보체 활성화"라는 표현은 렉틴-의존성 MASP-2 시스템을 통하여 발생하는 대체 경로 보체 활성화를 말한다. 본 발명의 다른 특징으로서, MASP-2 억제제는 실질적으로 고전적 또는 C1q-의존성 시스템을 통한 보체 활성화의 억제없이 렉틴-의존성 MASP-2 시스템을 통한 보체 활성화를 억제하여, C1q-의존성 시스템이 기능성을 보유하도록 한다.

[0020] 본 발명의 이러한 특징에 대한 일 실시상태로서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체 또는 이들의 절편이다. 본 발명의 다른 실시상태로서, 항-MASP-2 항체는 감소된 효과기 기능을 보유한다. 일 실시 상태에서, MASP-2 억제제

는 MASP-2 억제 펩타이드 또는 비-펩타이드 MASP-2 억제제이다.

- [0021] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 MASP-2-의존성 보체 활성화의 역효과를 억제하는 조성물을 제공한다. 방법은 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하며, 이들이 필요한 살아있는 대상체 내에서, MASP-2-의존성 보체 활성화의 역효과를 억제하는 용도의 의약의 제조 방법을 제공한다. 방법은 이하의 설명할 각 증상, 질환 및 장애의 치료 용으로 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 용도의 의약의 제조 방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 방법, 조성물 및 의약은 본원에서 추가로 기술하는 급성 또는 만성 병리학적 증상 또는 손상을 겪고 있는 인간을 포함하는 포유류 대상체 내의 MASP-2-의존성 보체 활성화의 생체 내 역효과를 억제하는데 유용하다. 이러한 증상 및 손상은 유관 자가면역 질환 및/또는 염증 증상 내의 MASP-2 매개 보체 활성화를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 일 특징으로서, 대동맥류 복구, 심폐순환 우회술, 예를 들면, 장기 이식(예컨대, 심장, 폐, 간, 신장) 및/또는 사지/손가락 재접합술, 뇌졸중, 심근 경색, 쇼크 수반성 혈류역학 소생술 및/또는 외과적 수술에 관련된 혈관 재문합을 포함하나 이에 한정되지 않는 허혈성 재관류를 겪고 있는 대상체를 약학적 담체 중의 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량으로 치료함으로써 허혈 재관류 손상을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 특징으로서, 죽상동맥경화증을 겪고 있거나 걸리기 쉬운 대상체를 약학적 담체 중의 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량으로 치료함으로써 죽상동맥경화증의 억제하는 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 특징으로서, MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 환자에 투여함으로써 심혈관 증상, 뇌혈관 증상, 말초(예컨대, 근골격) 혈관 증상, 신장혈관 증상, 장간막/장관 혈관, 및 이식 및/또는 재이식에서의 혈관재형성을 포함하나 이에 한정되지 않는 혈관 증상을 경험하는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. 이러한 증상은: 혈관염, 예컨대 헤노흐-셴라인 자반 신장염, 전신성 홍반 루푸스-유관 혈관염, 류마티스 관절염과 관련된 혈관염(소위 악성 류마티스 관절염), 면역 복합 혈관염, 및 타카야수병; 확장 심근병증; 당뇨병성 혈관병증; 가와사키병(동맥염); 정맥 공기 색전증(VGE); 및/또는 스탠트 삽입 후 재협착, 회전죽상반 절제술 및/또는 경피경혈관 심장동맥 확장술(PTCA)의 치료를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 본 발명의 다른 특징으로서, 췌장염, 게실염 및 배변 장애 예컨대 크론병, 궤양 대장염, 및 과민성 대장 증후군을 포함하나 이에 한정되지 않는 염증 위장관 장애를 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 다른 특징으로서, 급성 호흡 곤란 증후군, 수혈-관련 급성 폐 손상, 허혈/재관류 급성 폐 손상, 만성 폐쇄 폐질환, 천식, 베게너육아종증, 항사구체 기저막 질환(긧파스처 질환), 태변 흡인 증후군, 폐쇄기관지염 증후군, 특발성 폐섬유증, 화상에 의한 2차 급성 폐 손상, 비심장성 폐부종, 수혈-관련 호흡 저하, 및 폐공기증을 포함하나 이에 한정되지 않는 폐순환 증상을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 다른 특징으로서, 혈액투석, 혈장교환, 백혈구분반술, 최외막형 산소섭취(ECMO), 해파린-유도성 최외막형 산소섭취 LDL 침전(HELP) 및 심폐 우회술(CPB)을 포함하나 이에 한정되지 않는 체외순환 재관류 과정을 했거나, 하고 있거나 또는 하게 될 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 다른 특징으로서, 골관절염, 류마티스 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 통풍, 신경병관절병증, 건선 관절염, 강직척추염 또는 다른 척추관절염 및 결정성 관절병증, 근육퇴행위축증 또는 전신성 홍반 루푸스(SLE)를 포함하나 이에 한정되지 않는 근골격 증상을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 다른 특징으로서, 사구체간질증식성 사구체신염, 막사구체신염, 막증식성 사구체신염(사구체간질모세관 사구체신염), 급성 감염후 사구체신염(염쇄구균감염후 사구체신염), 한랭글로블린 사구체신염, 루푸스 신장염, 헤노흐-셴라인 자반 신장염 또는 IgA 신장병을 포함하나 이에 한정되지 않는 신장 증상을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 다른 특징으로서, 건선, 자가면역 수포성 피부병, 호산구증가해면화, 수포성 유천포창, 후천성 수포성 표피박리증 및 임신성 포진 및 기타 피부 장애, 또는 열 또는 화학적 화상 손상에 의한 모세혈관 누출을 포함하나 이에 한정되지 않는 피부 증상을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.

- [0032] 본 발명의 다른 특징으로서, 전체 장기(예컨대, 신장, 심장, 간, 췌장, 폐, 각막, 등) 또는 이식편(예컨대, 관막, 힘줄, 골수, 등)의 타가이식술 또는 이종장기이식을 포함하나 이에 한정되지 않는 장기 또는 기타 조직 이식을 받은 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 다른 특징으로서, 다발성 경화증(MS), 중증근무력증(MG), 헌팅턴무도병(HD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 급성특발다발성신경염, 뇌졸중 후 재관류, 퇴행성 디스크, 뇌 외상, 파킨슨병(PD), 알츠하이머 질환(AD), 밀러-피셔 증후군, 뇌 외상 및/또는 출혈, 탈수초 및 수막염을 포함하나 이에 한정되지 않는 중추신경계 장애 또는 손상 또는 말초 신경계 장애 또는 손상을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 다른 특징으로서, 중증 패혈증, 패혈 쇼크, 패혈증에 의한 급성 호흡 곤란 증후군, 및 전신 염증 반응 증후군을 제한없이 포함하는 패혈증 또는 패혈증의 결과 증상을 포함하나 이에 한정되지 않는 혈액 장애를 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. 관련 방법은 출혈 쇼크, 용혈 빈혈, 자가면역 혈전성 용혈 빈혈(TTP), 용혈 요독증후군(HUS) 또는 기타 골수/혈액 파괴 증상을 포함하는 기타 혈액 장애를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 다른 특징으로서, 통증 방광 질환, 감각 방광 질환, 만성 무균성 방광염 및 간질성 방광염, 남성 및 여성 불임증, 태반기능부전 및 유산 및 경색전협심증을 포함하나 이에 한정되지 않는 비뇨생식 증상을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 다른 특징으로서, 비비만 당뇨(타입-1 당뇨 또는 인슐린 의존성 당뇨병) 또는 타입-1 또는 타입-2(성인형) 당뇨의 혈관병증, 신경병증 또는 망막병증 합병증을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 다른 특징으로서, 이러한 환자에게 전후화학치료요법 또는 전후방사선요법적으로, 즉, 화학치료제(들) 및/또는 방사선 요법의 투여 전 및/또는 도중 및/또는 후에 MASP-2 억제제를 투여함에 의한 암성 증상의 치료를 제한없이 포함하는 화학치료제 및/또는 방사선 요법으로 치료하는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제의 전후화학치료요법 또는 전후방사선요법의 투여는 화학치료제 또는 방사선 요법의 부작용을 감소시키는데 유용하다. 본 발명의 추가의 특징으로서, 약학적으로 허용가능한 담체 중의 MASP-2 억제제를 악성 종양 환자에 투여하여 악성 종양을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 다른 특징으로서, 약학적 담체 중의 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 이러한 대상체에 투여함으로써 내분비 장애를 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 치료를 가하는 증상은 비제한적 예로써 하시모토 갑상선염, 스트레스, 불안감 및 뇌하수체로부터의 프로락틴, 성장 또는 인슐린-유사 성장 인자, 및 아드레노코르티코트로핀의 조절 방출에 관련된 기타 잠재적인 호르몬 장애를 포함한다.
- [0039] 본 발명의 다른 특징으로서, 약학적 담체 중의 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 이러한 증상의 대상체에 투여함으로써 연령-관련 황반 변성 또는 기타 보체 매개 안과학적 증상을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다.

실시예

- [0472] **VI. 실시예**
- [0473] 다음의 실시예는 본 발명의 실시예에 대한 최선의 방법을 설명하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것을 아니다. 본원에서 인용한 모든 문헌은 참고자료로서 명백히 포함되어 있다.
- [0474] **실시예 1**
- [0475] 이 실시예는 MASP-2 (MASP-2-/-)이 결핍이나 Map19 (Map19+/+)는 충분한 마우스 주의 생성을 설명한다.
- [0476] **재료 및 방법:** 표적화 벡터 pKO-NTKV 1901은 세린 프로테아제 도메인을 암호화하는 엑손을 포함하는 뮤린 MASP-2의 C-말단을 암호화하는 3개의 엑손을 파괴시키도록 설계되었다(도 4). PKO-NTKV 1901은 뮤린 ES 세포주 E14.1a (SV129 O1a)를 전달감염시키기 위하여 사용되었다. 네오마이신-저항성 및 티미딘 키나아제-민감성 클론이 선택되었다. 600 ES 클론을 선별하였으며, 여기서, 4개의 다른 클론을 확인하고 및 서던 블롯에 의하여 기대된 선택적 표적화 및 재조합(도 4)을 함유한다는 것을 입증하였다. 키메라는 배아 전이에 의하여 이러한 4개의 양성 클론으로부터 생성되었다. 키메라를 유전적 배경 C57/BL6 내에서 역교배시켜 유전자삽입 수컷을 생산하였

다. 유전자삽입 수컷을 암컷과 교배시켜 50%의 자손이 파괴된 MASP-2 유전자의 이형접합을 나타내는 F1을 생성시켰다. 이종접합 마우스를 이종교배시켜 동종접합 MASP-2 결핍 자손을 생성하였으며, 그 결과 이종접합 및 야생형 마우스가 각각 1:2:1의 비율로 나타났다.

[0477] 결과 및 표현형: 결과 동종접합 MASP-2^{-/-} 결핍 마우스는 생활성이며 임신가능한 것으로 밝혀졌으며, 정확한 표적화를 확인하기 위한 서던 블롯, MASP-2 mRNA의 부재를 확인하기 위한 노던 블롯, 및 MASP-2 단백질의 부재를 확인하기 위한 웨스턴 블롯에 의하여 MASP-2 결핍을 입증하였다(데이터 미도시). Map19 mRNA의 존재 및 MASP-2 mRNA의 부재는 LightCycler 기기상에서 시간-용해 RT-PCR을 사용하여 추가로 확인하였다. MASP-2^{-/-} 마우스는 기대하는 바와 같이 Map19, MASP-1, 및 MASP-3 mRNA 및 단백질을 계속 발현하지 않았다(데이터 미도시). 프로퍼딘, 인자 B, 인자 D, C4, C2, 및 C3용 MASP-2^{-/-} 마우스 내의 mRNA의 존재 및 부재는 LightCycler 분석에 의하여 평가되었으며, 야생형 한배자손 대조구의 것과 일치하였다(데이터 미도시). 동종접합 MASP-2^{-/-} 마우스의 혈장은 렉틴-경로-매개 보체 활성화 및 대체 경로 보체 활성화가 전체적으로 결핍되었다(실시예 2).

[0478] 순수 C57BL6 배경상의 MASP-2^{-/-} 주의 생성: 실험 동물 모델로서 MASP-2^{-/-} 주를 사용하기 전에 9마리를 생성하기 위하여 MASP-2^{-/-} 마우스를 순수 C57BL6 주와 역교배시켰다.

[0479] **실시예 2**

[0480] 이 실시예는 MASP-2가 대체 및 렉틴 경로를 통한 보체 활성화에 필요하다는 것을 입증한다.

[0481] 방법 및 재료:

[0482] 렉틴 경로 특이적 C4 분열 측정법: C4 분열 측정법은 L-피콜린에 결합하는, 에스. 아우레우스(*S. aureus*)의 지질타이코산 (LTA)으로부터 렉틴 경로 활성화 결과를 측정하는 문헌 Petersen, et al., J. Immunol. Methods 257:101 (2001)에 설명되어 있다. 측정법(실시예 11)은 후술하는 바와 같이 MASP-2^{-/-} 마우스 혈청을 첨가하기 전에 LPS 및 만난 또는 지모산의 플레이트를 피복함으로써 MBL에 의한 렉틴 경로 활성화를 측정하도록 전환되었다. 측정법은 변형되어 고전적 경로에 기인한 C4 분열의 가능성을 제거하였다. 이는 1 M NaCl 함유 시료 희석 완충액을 사용하여 달성하였으며, 렉틴 경로 인식 성분이 이들의 리간드에 고친화도로 결합하는 것을 가능하게 하나 내재 C4 활성화를 예방하여, 따라서 C1 복합체의 분해에 의한 고전적 경로의 관여를 배제한다. 요약하자면, 변형된 측정법에서 혈청 시료(고염(1 M NaCl) 완충액으로 희석)를 리간드-피복 플레이트에 첨가하고, 그 다음 생리학적 염농도의 완충액 내에서 일정량의 정제된 C4를 첨가한다. MASP-2를 함유한 결합된 인식 복합체는 C4를 분해하고, C4b가 부착된다.

[0483] 측정법:

[0484] 1) Nunc Maxisorb 마이크로리터 플레이트 (Maxisorb, Nunc, Cat. No. 442404, Fisher Scientific)를 1 μ g/ml 만난(M7504 Sigma) 또는 피복 완충액(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)으로 희석된 모든 다른 리간드(예컨대, 예컨대 하기 열거된 것)로 피복시켰다.

[0485] 다음의 시약을 측정법에 사용하였다:

[0486] a. 만난 (1 μ g/웰 만난(M7504 Sigma) 100 μ l 피복 완충액 용액):

[0487] b. 지모산 (1 μ g/웰 지모산(Sigma) 100 μ l 피복 완충액 용액);

[0488] c. LTA (1 μ g/웰 100 μ l 피복 완충액 용액 또는 2 μ g/웰 20 μ l 메탄올 용액)

[0489] d. 1 μ g의 H-피콜린 특이적 Mab 4H5 피복 완충액 용액

[0490] e. 아에로코커스 비리단스(*Aerococcus viridans*)의 PSA (2 μ g/웰 100 μ l 피복 완충액 용액)

[0491] f. 100 μ l/웰의 포르말린-고정 에스. 아우레우스(*S. aureus*) DSM20233 (OD₅₅₀=0.5)의 피복 완충액 용액.

[0492] 2) 플레이트를 4℃에서 밤샘(overnight) 배양하였다.

[0493] 3) 밤샘 배양후, 잔여 단백질 결합 부위를 1-3 시간 동안 0.1% HSA-TBS 차단 완충액 (0.1% (w/v) HSA의 10 mM Tris-CL용액, 140 mM NaCl, 1.5 mM NaN₃, pH 7.4)으로 배양된 플레이트에 의하여 포화시켰으며, 그 다음 플레이트를 TBS/tween/Ca²⁺ (TBS, 0.05% Tween 20 및 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ 포함, pH 7.4)로 3회 세척하였다.

[0494] 4) 시험된 혈청 시료를 MBL-결합 완충액 (1 M NaCl)로 희석하였고, 희석된 시료를 플레이트에 첨가하고, 4℃에

서 밤샘 배양하였다. 완충액을 넣은 웰은 음성 대조구로서만 사용하였다.

[0495] 5) 4℃에서 밤샘 배양 후, 플레이트를 TBS/tween/Ca²⁺로 3회 세척하였다. 인간 C4 (100μl/웰의 1μg/ml BBS 희석 용액(4 mM 바르비톨, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4))를 플레이트에 첨가하고 37℃에서 90분간 배양하였다. 플레이트를 다시 TBS/tween/Ca²⁺로 세척하였다.

[0496] 6) C4b 부착은 알카라인 포스파타아제-접합 닭 항-인간 C4c(1:1000 희석 TBS/tween/Ca²⁺ 용액)으로 검출되었으며, 이를 플레이트에 첨가하고, 실온에서 90분간 배양시켰다. 플레이트를 TBS/tween/Ca²⁺로 다시 3회 세척하였다.

[0497] 7) 알카라인 포스파타아제는 100μl의 p-니트로페닐 포스페이트 기질 용액에 첨가하고, 실온에서 20분간 배양한 뒤, 마이크로리터 플레이트 리더 내에서 OD₄₅₀를 읽음으로써 검출하였다.

[0498] 결과: 도 6A-B는 MASP-2+/+의 혈청 희석액(십자형), MASP-2+/- (폐쇄 원) 및 MASP-2-/- (폐쇄 삼각형) 내의 만난 (도 6A) 및 지모산 (도 6B) 상의 C4b 부착량을 나타낸다. 도 6C는 야생형 혈청에 정상화된 C4b 부착량의 측정에 기초하여 야생형 마우스(n=5)에 비하여 MASP-2-/+ 마우스(n=5) 및 MASP-2-/- 마우스(n=4)의 지모산(백색 바) 또는 만난(음영 바)으로 피복된 플레이트상의 상대적인 C4 전환효소 활성을 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다. 도 6A-C에 나타난 바와 같이, MASP-2-/- 마우스의 혈장은 만난 및 지모산 피복된 플레이트 상의 렉틴-경로-매개 보체 활성화 내의 완전 결핍이다. 이러한 결과는 MASP- 또는 MASP-3이 아닌, MASP-2가 렉틴 경로의 효과기 성분이라는 것을 분명하게 입증하였다.

[0499] C3b 부착 측정법:

[0500] 1) Nunc Maxisorb 마이크로리터 플레이트 (Maxisorb, Nunc, Cat. No. 442404, Fisher Scientific)를 1μg/ml 만난(M7504 Sigma) 또는 피복 완충액(15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)으로 희석된 모든 다른 리간드(예컨대, 예컨대 하기 열거된 것)로 피복시켰다.

[0501] 2) 잔여 단백질 결합 부위를 1-3 시간 동안 0.1% HSA-TBS 차단 완충액 (0.1% (w/v) HSA의 10 mM Tris-CL용액, 140 mM NaCl, 1.5 mM NaN₃, pH 7.4)으로 배양된 플레이트에 의하여 포화시켰다.

[0502] 3) 플레이트를 TBS/tw/Ca⁺⁺ (TBS, 0.05% Tween 20 및 5 mM CaCl₂)로 세척하였으며, 희석된 BBS를 혈청 시료(4 mM 바르비톨, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4)에 첨가하였다. 완충액을 넣은 웰은 음성 대조구로서 사용하였다. 야생형 또는 MASP-2-/- 마우스에서 획득한 대조구 세트의 혈청 시료는 측정에 사용되기 전에 C1q가 결핍되었다. C1q-결핍 마우스 혈청은 제조자의 지시에 따라 레빗 항-인간 C1q IgG(Dako, Glostrup, Denmark)로 피복된 단백질-A-커플 다이내비드(Dynal Biotech, Oslo, Norway)를 사용하여 제조된다.

[0503] 4) 4℃에서 밤샘 배양 후, TBS/tw/Ca⁺⁺로 세척하였으며, 전환되고 및 결합된 C3는 TBS/tw/Ca⁺⁺를 1:1000로 희석된 다클론 항-인간-C3c 항체(Dako A 062)로 검출된다. 2차 항체는 TBS/tw/Ca⁺⁺로 1:10,000 희석된 알카라인-포스파타아제(Sigma Immunochemicals A-3812)에 접합된 염소 항-레빗 IgG(전체 분자)이다. 대체 보체 경로(AP)의 전체는 100μl 기질 용액 (시그마 패스트 p-니트로페닐 포스페이트 타블렛 세트, Sigma)의 첨가 및 실온 배양에 의하여 결정된다. 가수분해는 마이크로리터 플레이트 리더 내에서 450 nm 흡광도를 측정함으로써 정량적으로 모니터링되었다. 표준 곡선은 연속 희석 혈장/혈청 시료를 사용하는 각 분석을 위하여 생성되었다.

[0504] 결과: 도 7A 및 7B에 나타난 결과는 수종의 마우스의 풀을 형성한 혈청에서 나왔다. 십자는 MASP-2+/+ 혈청을 나타내며, 검은 원은 C1q 결핍 MASP-2+/+ 혈청을, 개방 사각형은 MASP-2-/- 혈청을 나타내고, 개방 삼각형은 C1q 결핍 MASP-2-/- 혈청을 나타낸다. 도 7A-B에 나타난 바와 같이, C3b 부착 측정법으로 시험된 MASP-2-/- 마우스의 혈청은 만난(도 7A) 및 지모산(도 7B) 피복 플레이트 상의 낮은 수준의 C3 활성화를 나타낸다. 이 결과는 MASP-2가 대체 보체 경로를 개시하기 위하여 C3에서 초기 C3b 생성에 기여하는 것이 필요하다는 것을 분명하게 입증한다. 이는 보체 인자 C3, 인자 B, 인자 D 및 프로퍼딘이 비의존성 기능성 대체 경로를 형성한다는 일반적인 관점에서 놀라운 결과이며, C3는 활성화 표면 예컨대 지모산상에 유체상 전환효소 iC3Bb 및 부착C3b 분자를 생성하는 "C3b-유사" 형태로의 자발적 입체구조 변화를 겪게된다.

[0505] 제조합 MASP-2는 MASP-2-/- 마우스 혈청 내의 렉틴 경로-의존성 C4 활성화를 재구성한다

- [0506] MASP-2의 부재가 MASP-2^{-/-} 마우스 내의 렉틴 경로-의존성 C4 활성화 손실의 직접적 원인이라는 사실을 확립하기 위하여, 재조합 MASP-2 단백질을 혈청 시료에 첨가한 효과는 전술한 C4 분열 측정법으로 조사되었다. 기능적으로 활성인 뮤린 MASP-2 및 촉매적으로 불활성인 뮤린 MASP-2A(세린 프로테아제 도메인 내의 활성-부위 세린 잔기는 알려진 잔기로 치환) 재조합 단백질을 생산하였으며, 실시예 5에서와 같이 정제하였다. 4 MASP-2^{-/-} 마우스의 풀을 형성한 혈청을 재조합 뮤린 MASP-2 또는 불활성 재조합 뮤린 MASP-2A의 단백질 농도를 증가시켜 사전 배양하였으며, C4 전환효소 활성을 전술한 바와 같이 측정하였다.
- [0507] **결과:** 도 8에 나타난 바와 같이, 기능적으로 활성인 뮤린 재조합 MASP-2 단백질(개방 삼각형 표시)을 MASP-2^{-/-} 마우스의 혈청에 첨가하여 단백질 농도 의존성 방식 내에서 렉틴 경로-의존성 C4 활성화를 복구하였으며, 여기서, 촉매적으로 불활성인 뮤린 MASP-2A 단백질(별 표시)은 C4 활성화를 복구하지 못하였다. 도 8의 결과는 풀을 형성한 야생형 마우스 혈청(점선 표시)으로 관찰된 C4 활성화에 대하여 정상화되었다.
- [0508] **실시예 3**
- [0509] 이 실시예는 뮤린 MASP-2^{-/-}, Map19^{+/+} 이거나, 인간 MASP-2 삽입유전자를 발현하는 유전자삽입 마우스 주의 생성을 설명한다(뮤린 MASP-2 녹아웃 및 인간 MASP-2 녹-인).
- [0510] **재료 및 방법:** 인간 MASP-2를 암호화하는 미니유전자(소위 "미니 hMASP-2") (SEQ ID NO:49, 도 5)는 인간 MASP-2 유전자의 프로모터 영역을 포함하도록 구축되며, 다음의 8 엑손의 암호화 서열을 나타내는 cDNA 서열이 따르는 최초 3 엑손(엑손 1 내지 엑손 3)을 포함하고, 따라서 내재 프로모터에 의하여 유도된 전장 MASP-2 단백질을 암호화하게 된다. 미니 hMASP-2 구조체는 MASP-2^{-/-}의 수정란에 주입되어, 인간 MASP-2를 유전자삽입에 의하여 발현하여 결핍 뮤린 MASP-2를 대체하도록 한다.
- [0511] **실시예 4**
- [0512] 이 실시예는 인간 혈청의 효소전구체 형태 내에서의 인간 MASP-2 단백질 분리를 설명한다.
- [0513] **인간 MASP-2 분리의 방법:** 인간 혈청 MASP-2 분리 방법은 문헌 Matsushita et al., J. Immunol. 165:2637-2642, 2000에 설명되어 있다. 요약하자면, 인간 혈청을 0.2 M NaCl, 20 mM CaCl₂, 0.2 mM NPGb, 20 μM p-APMSF, 및 2% 만니톨을 함유하는 10 mM 이미다졸 완충액(pH 6.0)을 사용하여 효모 만산-세파로스 컬럼에 통과시켰다. MBL을 지닌 MASP-1 및 MASP-2 효소전구체 복합체는 0.3 M 만노스를 함유한 상기 완충액과 함께 용출되었다. MBL에서 효소전구체 MASP-1 및 MASP-2를 분리하기 위하여, 복합체를 함유한 제조물을 항-MBL-세파로스에 도포하고, 그 다음 MASP가 20 mM EDTA 및 1 M NaCl를 함유한 이미다졸 완충액과 함께 용출되었다. 마지막으로, 효소전구체 MASP-1 및 MASP-2는 항-MBL-세파로스로서 사용된 동일한 완충액 내에서 항-MASP-1-세파로스를 통과시켜 서로 분리되었다. MASP-2는 용출액에서 회수되었으나, MASP-1은 0.1 M 글리신 완충액(pH 2.2)으로 용출되었다.
- [0514] **실시예 5**
- [0515] 이 실시예는 폴리펩타이드 유도성 재조합 전장 인간, 레트 및 뮤린 MASP-2, MASP-2, 및 MASP-2의 촉매 활성화된 돌연변이형의 재조합 발현 및 단백질 생산을 설명한다.
- [0516] **전장 인간, 뮤린 및 레트 MASP-2의 발현:**
- [0517] 인간 MASP-2(SEQ ID NO: 4)의 전장 cDNA 서열은 포유류 발현 벡터 pCI-Neo (Promega)내로 서브클론되었으며, 이는 CMV 증진제/프로모터 영역의 조절하에 진핵세포 발현을 유도한다(Kaufman RJ. et al., Nucleic Acids Research 79:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:531-66 (1991)). 전장 마우스 cDNA(SEQ ID NO:50) 및 레트 MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:53)은 pED 발현 벡터 내로 각각 서브클론되었다. MASP-2 발현 벡터를 표준 인산 칼슘 전달감염 과정을 사용하여 유작성 차이니즈 햄스터 난소 세포주 DXB1 내로 전달감염시켰다(Maniatis et al., 1989). 이러한 구조체로 전달감염된 세포는 매우 느리게 성장하였으며, 암호화된 프로테아제가 세포독성이라는 것을 암시한다.
- [0518] 또 다른 접근법으로써, 이의 내재 프로모터에 의하여 MASP-2의 인간 cDNA를 함유한 미니유전자 구조체(SEQ ID NO:49)는 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO) 내로 일시적으로 전달감염되었다. 인간 MASP-2 단백질은 배양 배지 내로 분리되었으며, 하기와 같이 분리되었다.
- [0519] **전장 촉매 불활성 MASP-2의 발현:**

[0520] 이론적 근거: 인식 하위성분 MBL 또는 피콜린(L-피콜린, H-피콜린 또는 M-피콜린)이 이들의 개별적인 탄수화물 패턴에 결합한 후 자가촉매성 분열에 의하여 MASP-2가 활성화된다. 자가촉매성 분열에 의한 MASP-2의 활성화는 혈청으로부터 MASP-2 분리절차, 또는 재조합 발현 후 정제 절차 중에 종종 발생된다. 항원으로 사용되는 더욱 안정적인 단백질 제조물을 획득하기 위하여, MASP-2로서 설계된 MASP-2의 촉매불활성 형태는 레트(SEQ ID NO:55 Ser617이 Ala617로); 마우스(SEQ ID NO:52 Ser617이 Ala617로); 또는 인간(SEQ ID NO:3 Ser618이 Ala618로) 내의 알려진 잔기를 지닌 프로테아제 도메인의 촉매성 삼조체(triad) 내에 존재하는 세린 잔기를 대체함으로써 생성된다.

[0521] 촉매불활성 인간 및 뮤린 MASP-2A 단백질을 생성하기 위하여, 부위-지향 돌연변이유발은 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수행된다(표 5). 표 5의 올리고뉴클레오타이드는 효소 활성 세린을 암호화하는 인간 및 뮤린 cDNA의 영역을 폴도록 설계되었으며, 올리고뉴클레오타이드는 세린 코돈이 알라닌 코돈으로 변화하도록 mismatches를 함유한다. 예를 들면, PCR 올리고뉴클레오타이드 SEQ ID NO:56-59는 인간 MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)와 조합으로 사용하여 개시 코돈에서 효소 활성 세린 및 세린에서 종결 코돈까지의 영역을 증폭하고 Ser618이 Ala618가 되는 돌연변이를 함유하는 돌연변이 MASP-2A의 완전 개방 리딩형을 생성한다. PCR 산물은 표준 테일링 과정을 사용하여 아가로스 겔 전기영동 및 밴드 제조물 및 단일 아데노신 오버랩이 생성된 후 정제되었다. 아데노신 테일 MASP-2A는 그 다음 이. 콜리(E. coli) 내로 형질전환된 pGEM-T 이지 벡터 내로 클론되었다.

[0522] 촉매 불활성 레트 MASP-2A 단백질은 동물량의 이러한 두 올리고뉴클레오타이드 SEQ ID NO:64 및 SEQ ID NO:65를 2분간 100°C로 가열하고 실온으로 서냉시켜 결합함으로써, 분해효소화 및 폴립과정을 하여 생성시켰다. 결과인 폴립 절편은 Pst1 및 Xba1 적합성 말단을 보유하며, 야생형 레트 MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:53)의 Pst1-Xba1 절편의 위치에 삽입되어 레트 MASP-2A를 생성한다.

[0523] 5 'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTC 3' (SEQ ID NO:64)

[0524] 5' CTAGAAACACTAATGCCCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO:65)

[0525] 인간, 뮤린 및 레트 MASP-2A는 각각 포유류 발현 벡터 pED 또는 pCI-Neo 내로 추가로 서브클론되거나, 차이니즈 햄스터 난소 세포주 DXB1으로 전달감염된다. 또 다른 접근법으로써, 촉매 불활성 형태의 MASP-2가 문헌 Chen et al., J. Biol. Chem., 27<5(28):25894-25902, 2001에 설명된 바와 같이 제조되었다. 요약하자면, 전장 인간 MASP-2 cDNA를 함유한 플라스미드(Thiel et al., Nature 386:506, 1997)는 Xho1 및 EcoR1에 의하여 분해되고, MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)는 pFastBac1 바칼로바이러스 전이 벡터(Life Technologies, NY)의 대응 제한 부위 내로 클론된다. Ser618에서의 MASP-2 세린 프로테아제 활성화 부위는 펩타이드 영역 아미노산 610-625(SEQ ID NO: 13)를 암호화한 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드를 천연 영역 아미노산 610 내지 625로 치환함으로써 Ala618로 변환되어 불활성 프로테아제 도메인을 지닌 MASP-2 전장 폴리펩타이드를 생성한다. 폴리펩타이드 영역을 함유한 발현 플라스미드의 구조는 인간 Masp-2로부터 유도되었다.

[0526] 다음 구조체는 MASP-2 단일 펩타이드(잔기 1-15, SEQ ID NO:5)를 사용해 제조되어 MASP-2의 다양한 도메인을 분비한다. 인간 MASP-2 CUBI 도메인(SEQ ID NO: 8)을 발현하는 구조체는 MASP-2(SEQ ID NO:6)의 잔기 1-121 암호화 영역을 증폭하는 PCR에 의하여 생산된다(N-말단 CUBI 도메인에 대응). 인간 MASP-2 CUBIEGF 도메인(SEQ ID NO:9)을 발현하는 구조체는 MASP-2(SEQ ID NO:6)잔기 1-166 암호화 영역을 증폭하는 PCR에 의하여 생산된다(N-말단 CUBIEGF 도메인에 대응). 인간 MASP-2 CUBIEGFCUBII 도메인(SEQ ID NO: 10)을 발현하는 구조체는 MASP-2(SEQ ID NO:6)잔기 1-293 암호화 영역을 증폭하는 PCR에 의하여 생산된다(N-말단 CUBIEGFCUBII 도메인에 대응). 상기 언급된 도메인은 확립된 PCR법에 따라 Vent_R 폴리머라아제 및 템플릿으로서 pBS-MASP-2를 사용한 PCR에 의하여 증폭된다. 센스 프라이머의 5' 프라이머 서열(5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCTC-S' SEQ ID NO:34)은 PCR 산물의 5' 말단에서 BamHI 제한 부위 (밑줄)를 도입한다. 각 MASP-2 도메인의 안티센스 프라이머(표 5)는 각 PCR 산물의 말단에 EcoRI 부위(밑줄)이 따르는 종결 코돈(볼드체)에 도입되도록 설계된다. 증폭되는 경우, DNA 절편은 BamHI 및 EcoRI로 분해되고 pFastBac1 벡터의 대응 부위 내로 클론된다. 결과 구조체는 제한 맵핑에 의하여 특성화되며, dsDNA 서열화에 의하여 확인된다.

표 5

[0527]	표 5: MASP-2 PCR 프라이머		
	MASP-2 도메인	5' PCR 프라이머	3' PCR 프라이머

SEQ ID NO:8 CUBI (aa 1-121의 SEQ ID NO:6)	5'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA3' (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (aa 1-166의 SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGC3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (aa 1-293의 SEQ ID NO: 6)	5'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGAT3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 인간 MASP-2	5'ATGAGGCTGCTG ACCCCTCTGGGCC-3' (SEQ ID NO:56) hMASP-2 순방	5'TTAAATCACTAATTATG TTCTCGATC 3' (SEQ ID NO:59) hMASP-2 역방
SEQ ID NO:4 인간 MASP-2 cDNA	5'CAGAGGTGACGC AGGAGGGGCAC3' (SEQ ID NO:58) hMASP-2_ala_순방	5'GTGCCCTCTGCGTCAC CTCTG3' (SEQ ID NO:57) hMASP-2_ala_역방
SEQ ID NO:50 뮤린 MASP-2 cDNA	5'ATGAGGCTACTC ATCTTCCTGG3' (SEQ ID NO:60) mMASP-2_순방	5'TTAGAAATTACTTATTAT GTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO:63) mMASP-2_역방
SEQ ID NO:50 뮤린 MASP-2 cDNA	5'CCCCCCTGCGT CACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO:62) mMASP-2_ala_순방	5'CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGGG3' (SEQ ID NO:61) mMASP-2_ala_역방

[0528] MASP-2의 재조합 진핵세포 발현 및 효소 불활성 마우스, 래트, 및 인간 MASP-2A의 단백질 생산.

[0529] 상기 MASP-2 및 MASP-2A 발현 구조체는 표준 인산 칼슘 전달감염 과정을 사용하여 DXB1 세포 내로 전달감염된다 (Maniatis et al., 1989). MASP-2A는 무-혈청 배지 내에서 생산되었으며, 제조물이 다른 혈청 단백질에 의하여 오염되지 않도록 한다. 배지는 융합성 세포로부터 격일로 수확되었다(총 4회). 재조합 MASP-2A 수준은 3종의 각각은 평균 약 1.5 mg/l의 배양 배지였다.

[0530] MASP-2A 단백질 정제: MASP-2A(상기 Ser-Ala 돌연변이)는 MBP-A-아가로스 컬럼상의 친화도 크로마토그래피에 의하여 정제된다. 이 전략은 추가의 태그를 사용하지 않고 신속한 정제를 가능하게 한다. MASP-2A(100-200 ml의 배지, 부하 완충액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl 및 25 mM CaCl₂ 함유)의 동부피로 희석)를 10 ml의 부하 완충액으로 사전 평형된 MBP-아가로스 친화도 컬럼(4 ml)에 탑재하였다. 그 다음 10 ml의 추가의 부하 완충액으로 세척하고, 단백질을 1 ml 분획(50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1.25 M NaCl 및 10 mM EDTA 함유)내에서 용출시켰다. MASP-2A를 함유한 분획은 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의하여 확인되었다. 필요한 경우, MASP-2A를 모노Q 컬럼 (HR 5/5)상의 이온-교환 크로마토그래피에 의하여 추가로 정제하였다. 단백질을 50 mM Tris-Cl(pH 7.5, 50 mM NaCl 함유)로 투석하고, 동일한 완충액 내에서 평형이된 컬럼에 투여하였다. 세척 후, 결합된 MASP-2A를 10 ml 이상의 0.05-1 M NaCl 성분으로 용출시켰다.

[0531] 결과: MASP-2A 단백질의 0.25-0.5 mg 산출은 200 ml의 배지에서 획득하였다. MALDI-MS로 측정된 분자질량 77.5 kDa는 글리코실화에 의하여 미개질 폴리펩타이드(73.5 kDa)의 계산값보다 컸다. 각 N-글리코실화 부위의 글리칸 부착이 관찰된 질량을 설명해준다. MASP-2A는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 상의 단일 밴드로서 이동하며, 이는 이들이 생합성 시 단백질분해적으로 가공되지 않는다는 것을 입증한다. 평형 초원심분리에 의하여 측정된 중량-평균 분자량은 글리코실화 폴리펩타이드의 동중이량체의 계산값과 일치한다.

[0532] **재조합 인간 MASP-2 폴리펩타이드의 생산**

[0533] 또 다른 폴리펩타이드에서 유도된 재조합 MASP-2 및 MASP2A의 생산 방법은 문헌 Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068-5077, 2001에 설명되어 있다. 요약하자면, 스포도테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 곤충 세포(Ready-Plaque Sf9 Cell, Novagen, Madison, WI)를 50 IU/ml 페니실린 및 50 mg/ml 스트렙토마이신(Life Technologies)으로 보충된 Sf900II 무-혈청 배지(Life Technologies)에서 성장 및

유지시켰다. 트리초플루시아 니(Trichoplusia ni)(High Five) 곤충 세포 (Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France)를 50 IU/ml 페니실린 및 50 mg/ml 스트렙토마이신으로 보충된 TC100 배지(Life Technologies, 10% FCS(Dominique Dutscher, Brumath, France) 함유) 내에서 유지시켰다. 재조합 바쿨로바이러스를 Bac-to-Bac 시스템(Life Technologies)을 사용하여 생성하였다. bacmid DNA는 Qiagen midiprep 정제 시스템(Qiagen)을 사용하여 정제하였으며, Sf900II SFM 배지(Life Technologies) 내에서 제조자의 지시에 따라 세포펙틴을 사용한 Sf9 곤충 세포 전달감염에 사용하였다. 재조합 바이러스 입자를 4일 후 수거 하였으며, 바이러스 플라크 측정법으로 역가를 측정하였고, King and Possee, The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman 및 Hall Ltd., London, pp. 111-114, 1992에 의하여 증폭하였다.

[0534] 하이 파이프 세포(1.75×10^7 세포/ 175-cm^2 조직 배양 플라스크)는 96시간 동안 28℃의 Sf900II SFM 배지내에서 감염다중도 2로서 MASP-2 폴리펩타이드를 함유한 재조합 바이러스로 감염되었다. 상청액은 원심분리로 수거되었으며 및 디소프로필 포스포로플루오로테이트를 첨가하여 최종 농도가 1 mM가 되었다.

[0535] MASP-2 폴리펩타이드가 배양 배지내로 분리된다. 배양 상청액은 50 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 50 mM 트리에탄올아민 하이드로클로라이드, pH 8.1으로 투석되고, 및 loaded at 1.5 ml/min로 동일한 완충액에서 평형인 Q-세파로스 고속 흐름 컬럼(Amersham Pharmacia Biotech) (2.8×12 cm)에 투여되었다. 용출은 1.2 리터의 선형 성분을 350 mM NaCl의 동일한 완충액 용액에 도포하여 수행된다. 재조합 MASP-2 폴리펩타이드를 함유한 분획은 웨스턴 블롯 분석에 의하여 확인되었으며, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 60%(w/v)까지 첨가하고, 및 밤샘하여 4℃에 놓아 둔다. 펠렛을 145 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 50 mM 트리에탄올아민 하이드로클로라이드, pH 7.4에 재현탁시키고, 동일한 완충액에서 평형인 TSK G3000 SWG 컬럼 (7.5×600 mm) (Tosohaas, Montgomeryville, PA)상에 적용한다. 정제된 폴리펩타이드를 Microsep 미세농축기상의 초여과기법을 사용하여 0.3 mg/ml로 농축시켰다(m.w. 배제 = 10,000) (Filtron, Karlstein, Germany).

[0536] **실시예 6**

[0537] 이 실시예는 MASP-2 폴리펩타이드에 대한 다클론 항체의 생산 방법을 설명한다.

[0538] 재료 및 방법:

[0539] MASP-2 항원: 다클론 항-인간 MASP-2 항혈청은 다음의 분리된 MASP-2 폴리펩타이드로 면역화한 레빗에 의하여 생산된다: 혈청에서 분리된 인간 MASP-2(SEQ ID NO:6)(실시예 4); 재조합 인간 MASP-2 (SEQ ID NO:6), 불활성 프로테아제 도메인 (SEQ ID NO: 13)을 함유한 MASP-2A(실시예 4-5); 및 재조합 CUBI(SEQ ID NO:8), CUBEGFI(SEQ ID NO:9), 및 CUBEGFCUBII(SEQ ID NO: 10)(실시예 5).

[0540] 다클론 항체: 미리 BCG (bacillus Calmette-Guerin vaccine) 접종된 6주령 레빗은 100 μg 의 MASP-2 폴리펩타이드의 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 무균 식염수 용액 주사에 의하여 면역화되었다. 주사는 매 4주마다 실시하였으며, 항체 역가를 ELISA 측정법으로 모니터링하였다(실시예 7). 배양 상청액은 항체 정제를 위하여 단백질 A 친화도 크로마토그래피로 수거하였다.

[0541] **실시예 7**

[0542] 이 실시예는 레트 또는 인간 MASP-2 폴리펩타이드에 대한 무린 단클론 항체 생산 방법을 설명한다.

[0543] 재료 및 방법:

[0544] 8-12 주령 수컷 A/J 마우스(Harlan, Houston, Tex.)에 완전 프로인트 보조제(Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 내의 100 μg 의 인간 또는 레트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩타이드의 200 μl 의 포스페이트 완충 식염수(PBS) 용액(pH 7.4)을 피하주사하였다(실시예 4 또는 실시예 5와 같음). 2 주 간격으로, 마우스에 불완전 프로인트 보조제 내의 50 μg 의 인간 또는 레트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩타이드를 2회 피하주사하였다. 4주 차에, 마우스에 50 μg 의 인간 또는 레트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩타이드의 PBS 용액을 주사하였고, 4일 후 융합하였다.

[0545] 각각의 융합을 위하여, 단일 세포 현탁액이 면역화된 마우스의 비장에서 제조되었으며, Sp2/0 다발글수종 세포와의 융합에 사용되었다. 5×10^8 의 Sp2/0 및 5×10^8 비장 세포가 50% 폴리에틸렌 글리콜(M.W. 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) 및 5% 디메틸설폭사이드(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)을 함유한 배지 내에서 융합되었다. 세포는 10% 보빈 태아 혈청, 100 units/ml의 페니실린, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 스트렙토마이신, 0.1 mM 하이포탄틴,

0.4 μM 아미노프테린 및 16 μM 티미딘으로 보충된 Iscove 배지 (Gibco, Grand Island, N. Y.)의 200 μl 의 현탁액 당 1.5×10^5 비장 세포의 농도로 조정되었다. 200 마이크로리터의 세포 현탁액을 약 20개의 96-웰 미세배양 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 약 10일 후, 배양 상청액은 ELISA 측정법에서 정제된 인자 MASP-2의 반응성으로 선별하기 위하여 수거하였다.

[0546] ELISA 측정법: Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) 마이크로테스트 플레이트의 웰을 50 μl 의 정제된 hMASP-2 또는 50 ng/ml 레트 rMASP-2 (또는 rMASP-2A)를 실온에서 밤샘 첨가하여 피복시켰다. 피복을 위한 저농도의 MASP-2은 고-친화도 항체의 선택을 가능하게 한다. 플레이트 튀김으로 피복 용액을 제거한 뒤, 200 μl 의 BLOTTO (무지방 건조유)의 PBS 용액을 1시간 동안 각 웰에 첨가하여 비-특이적 부위를 차단하였다. 1시간 뒤, 웰을 완충액 PBST(PBS, 0.05% Tween 20 함유)으로 세척하였다. 각 융합 웰에서 40 마이크로리터의 배양 상청액을 수거하고 50 μl 의 BLOTTO를 혼합하고, 그 다음 마이크로테스트 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. 1시간의 배양 후, 웰을 PBST로 세척하였다. 결합된 유리 항체를 효소 HRP 접합 염소 항-마우스 IgG(Fc 특이적)과의 반응에 의하여 검출하였으며(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.), 1:2,000으로 BLOTTO 내에서 희석하였다. 발색을 위하여 0.1% 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘(Sigma, St. Louis, Mo.) 및 0.0003% 과산화수소(Sigma)을 함유한 과산화효소 기질 용액을 30분 동안 각 웰에 첨가하였다. 반응은 50 μl 의 2M H_2SO_4 /웰을 첨가하여 종결시켰다. 반응 혼합물의 450 nm에서의 광학적 밀도는 BioTek ELISA Reader(BioTek Instruments, Winooski, Vt.)로 읽었다.

[0547] MASP-2 결합 측정법:

[0548] 상기 MASP-2 ELISA 측정법에서 양성으로 시험된 배양 상청액은 MASP-2에 대한 MASP-2 억제제결합 친화도를 측정하기 위하여 결합 측정법으로 시험할 수 있다. 유사한 측정법이 억제제가 보체 시스템내에서 다른 항원과 결합하는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0549] 폴리스티렌 마이크로리터 플레이트 웰(96-웰 배지 결합 플레이트, Corning 코스타, Cambridge, MA)는 MASP-2 (20 ng/100 μl /웰, Advanced Research Technology, San Diego, CA)의 인산-완충 식염수(PBS) 용액으로 pH 7.4에서 4°C로 밤샘 피복되었다. MASP-2 용액 흡인 후, 웰은 1% 보빈 혈청 알부민(BSA; Sigma Chemical)을 함유한 PBS로 2시간 동안 실온에서 차단되었다. MASP-2 피복이 없는 웰은 배경 대조구로 사용하였다. 차단 용액 내의 다양한 농도의 하이브리도마 상청액의 분취물 또는 정제된 항-MASP-2 MoAbs을 웰에 첨가하였다. 실온에서의 2시간 배양 후, 웰을 PBS로 광범위하게 린스하였다. MASP-2-결합 항-MASP-2 MoAb은 과산화효소-접합 염소 항-마우스 IgG (Sigma Chemical)의 차단 용액의 첨가에 의하여 검출되었으며, 1시간 동안 실온에서 배양되었다. 플레이트를 다시 PBS로 철저히 린스되었으며, 100 μl 의 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘(TMB) 기질(Kirkegaard 및 Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)이 첨가되었다. TMB의 반응은 100 μl 의 1M 인산 첨가로 중단되었으며, 플레이트를 마이크로플레이트 리더로 450 nm에서 읽었다(SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

[0550] 양성 웰의 배양 상청액에 대하여 기능성 측정법 예컨대 C4 분열 측정법(실시예 2)으로 보체 활성화 억제능을 시험하였다. 양성 웰 내의 세포는 제한 희석으로 클론되었다. MoAbs은 전술한 ELISA 측정법에서 hMASP-2의 반응성이 다시 시험되었다. 선택된 하이브리도마는 스피너 플라스크 내에서 성장되었으며, 사용된 배양 상청액은 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의하여 항체 정제를 위하여 수거되었다.

[0551] **실시예 8**

[0552] 이 실시예는 MASP-2 억제제에 대한 선별 모델로 사용되기 위한 인간 MASP-2 발현 MASP-2/- 녹아웃 마우스의 생성을 설명한다.

[0553] 재료 및 방법: MASP-2/- 마우스(실시예 1) 및 인간 MASP-2 삽입유전자 구조체를 발현하는 MASP-2/- 마우스(인간 MASP-2 녹-인)(실시예 3)를 교배하였으며, 유리 MASP-2/-, 유리 Map 19+, 인간 MASP-2+의 자손은 인간 MASP-2 억제제를 확인하기 위하여 사용되었다.

[0554] 이러한 동물 모델은 MASP-2 억제제 예컨대 인간 항-MASP-2 항체, MASP-2 억제 펩타이드 및 비펩타이드, 및 MASP-2 억제제를 함유한 조성물의 확인 및 효능을 위한 시험 기질로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 동물 모델은 화합물 또는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 촉발시킬 수 있다고 알려진 약제에 노출되며, MASP-2 억제제는 노출된 동물 내에서 질환 증상의 감소를 유발할 수 있는 충분한 시간 및 농도로 동물 모델에 투여된다.

[0555] 이와 함께, 유리 MASP-2/-, Map 19+, 인간 MASP-2+ 마우스는 세포 배양 장애 모델로서 사용될 수 있는 MASP-

2-유관 질환에 관련된 하나 이상의 세포 타입을 함유하는 세포주를 생성하기 위하여 사용될 수 있다. 유전자삽입 동물의 계속적 세포주의 생성은 당해 기술 분야에 공지되어 있으며, 예를 들면 소형, J.A., et al, Mol. Cell Biol, 5:642-48, 1985이다.

[0556]

실시예 9

[0557]

이 실시예에는 인간 MASP-2 및 인간 면역글로블린을 발현하는 MASP-2 녹아웃 마우스 내에서 인간 MASP-2에 대한 인간 항체를 생산하는 방법을 설명한다.

[0558]

재료 및 방법:

[0559]

MASP-2^{-/-} 마우스는 실시예 1에서 설명된 바와 같이 생성된다. 마우스는 실시예 3에서 설명된 바와 같이 인간 MASP-2를 발현하도록 구축되었다. 인간 MASP-2를 발현하는 동종접합 MASP-2^{-/-} 마우스 및 MASP-2^{-/-} 마우스를 각각 내재 면역글로블린 중쇄 및 경쇄와의 표적화된 파괴 및 인간 면역글로블린과의 최소한 일부의 발현하도록 조작된 배아 줄기 세포로부터 유도된 마우스와 교배시켰다. 바람직하게는, 인간 면역글로블린과의 일부는 중쇄 및 경쇄 성분의 미정렬 서열을 포함한다. 내재 면역글로블린 유전자의 불활성화 및 외래 면역글로블린 유전자의 도입 모두는 표적화된 상동 재조합에 의하여 달성된다. 이 프로세스의 결과인 유전자삽입 포유류는 면역글로블린 성분 서열을 기능적으로 재배열하고, 내재 면역글로블린 유전자를 발현하지 않으면서 인간 면역글로블린 유전자에 의하여 암호화된 다양한 아이소타입의 항체의 레퍼토리를 발현할 수 있다.

[0560]

이러한 특성을 보유한 포유류의 생산 및 특성은, 예를 들면 Thomson, A.D., Nature 148:1547-1553, 1994, 및 Sloane, B. F., Nature Biotechnology 14:826, 1996에 설명되어 있다. 마우스 항체 유전자가 불활성화되었으며 기능적으로 인간 항체 유전자로 대체되도록 유전자 조작된 마우스 주는 구독할 수 있다(예컨대, XenoMouse®, Abgenix, Fremont CA). 결과 자손 마우스는 인간 요법에 사용되기 적합한 인간 MASP-2에 대한 인간 MoAb를 생산할 수 있다.

[0561]

실시예 10

[0562]

이 실시예에는 인체적응형 뮤린 항-MASP-2 항체 및 항체 절편의 생성 및 생산을 설명한다.

[0563]

뮤린 항-MASP-2 단클론 항체가 수컷 A/J 마우스에서 생성되었다(실시예 7). 뮤린 항체는 후술하는 바와 같이 인체적응화되어 뮤린 불변 영역을 인간 대응 영역으로 대체하여 항체의 키메라 IgG 및 Fab 절편을 생성함으로써 이들의 면역원성을 감소시키며, 본 발명에 따라 인간 대상체내의 MASP-2-의존성 보체 활성화의 역효과를 억제하는데 유용하다.

[0564]

1. 뮤린 하이브리도마 세포의 항-MASP-2 가변 영역 유전자의 클로닝

[0565]

총 RNA는 제조사 프로토콜을 따라 RNeasy를 사용하여 하이브리도마 세포 분비 항-MASP-2 MoAb(실시예 7)에서 분리된다(Biotech, Houston, Tex.). 제1 가닥 cDNA가 프라이머로서 올리고 dT를 사용하여 총 RNA로부터 합성된다. PCR은 면역글로블린 불변 C 영역-유도성 3' 프라이머를 사용하여 수행되었으며, 5' 프라이머로서 뮤린 VH 또는 VK 유전자의 리더 펩타이드 또는 제1 프레임워크 영역으로부터 유도된 프라이머 세트를 변형시킨다. 앵커드 PCR은 문헌 Chen and Platsucas (Chen, P. F., Scand. J. Immunol. 35:539-549, 1992)에서 설명된 바와 같이 수행된다. VK 유전자 클로닝을 위하여, 2중 가닥 cDNA는 Not1-MAK1 프라이머(5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTCTTT-3' SEQ ID NO:38)을 사용하여 제조된다. 풀린 아답터 AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO:39) 및 AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO:40)는 2중 가닥 cDNA의 5' 및 3' 말단 모두에 결합된다. 3' 말단의 아답터는 Not1 분해에 의하여 제거된다. 분해 산물은 그 다음 5' 프라이머로서 AD1 올리고뉴클레오타이드 및 3' 프라이머로서 MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTTC-3' SEQ ID NO:41)와 함께 템플릿으로서 PCR에 사용된다. 약 500 bp의 DNA 절편이 pUC19 내로 클론된다. 클론된 서열이 기대되는 뮤린 면역글로블린 불변 영역을 포함한다는 사실을 입증하기 위한 서열 분석을 위하여 수개의 클론이 선택된다. Not1-MAK1 및 MAK2 올리고뉴클레오타이드는 VK 영역에서 유도되었으며, 각각 C 카와 유전자의 최초 염기쌍으로부터 하방 182 및 84 bp 었다. 클론은 완전한 VK 및 리더 펩타이드를 포함하여 선택되었다.

[0566]

VH 유전자의 클로닝을 위하여, 이중-가닥 cDNA는 Not1-MAG1 프라이머(5'-CGCGGCCGCGAGCTGCTCAGAGTGAGA-3' SEQ ID NO:42)를 사용하여 제조된다. 풀린 아답터 AD1 및 AD2는 2중 가닥 cDNA의 5' 및 3' 말단 모두에 결합된다. 3' 말단의 아답터는 Not1 분해에 의하여 제거된다. 분해 산물은 AD1 올리고뉴클레오타이드 및 프라이머로서 MAG2(5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGAAATA-3' SEQ ID NO:43)와 함께 템플릿으로서 PCR에 사용된다. 500 내지 600 bp 길이의 DNA 절편 pUC19 내로 클론되었다. Not1-MAG1 및 MAG2 올리고뉴클레오타이드는 뮤린 C_H 7.1 영역으로

부터 유도되었으며, 각각 뮤린 C γ 7.1 유전자의 최초 bp로부터 하방 180 및 93 bp였다. 클론은 완전 VH 및 리더 캡타이드를 포함하도록 선택되었다.

[0567]

2. 키메라 MASP-2 IgG 및 Fab를 위한 발현 벡터의 구축.

[0568]

전술한 클론된 VH 및 VK 유전자는 PCR 반응에서 템플릿으로 사용되어 Kozak 컨센서스 서열의 5' 말단 및 스플라이스 공여자의 3' 말단의 뉴클레오타이드 서열에 첨가된다. 서열의 PCR 에러 부재를 확인하기 위한 분석 후, VH 및 VK 유전자가 각각 인간 C γ 1 및 C κ 카파를 함유하는 발현 벡터 카세트 내로 삽입되어, pSV2neoVH-huC γ 1 및 pSV2neoV-huC κ 를 산출한다. 중쇄- 및 경쇄 벡터의 CsCl 성분-정제 플라스미드 DNA가 전기천공에 의한 COS 세포의 전달감염에 사용된다. 48시간 후, 배양 상청액을 ELISA로 시험하여 약 200 ng/ml의 키메라 IgG의 존재를 확인하였다. 세포를 수확하고, 총 RNA를 제조하였다. 제1 가닥 cDNA는 프라이머로서 올리고 dT를 사용하여 총 RNA로부터 합성된다. 이 cDNA는 PCR에서 템플릿으로 사용되어 Fd 및 카파 DNA 절편을 생성한다. Fd 유전자를 위하여, PCR은 5' 프라이머로서 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SEQ ID NO:44) 및 CHI-유도성 3' 프라이머(5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTTGCCACCTTG-3' SEQ ID NO:45)를 사용하여 수행되었다. DNA 서열은 인간 IgG1의 완전한 VH 및 CH1 도메인을 함유하는 것으로 확인되었다. 적합한 효소에 의한 분해 후, Fd DNA 절편은 발현 벡터 카세트 pSV2dhfr-TUS의 HindIII 및 BamHI 제한 부위에 삽입되어 pSV2dhfrFd를 산출하였다. pSV2 플라스미드는 구독이 가능하며, 다양한 공급원의 DNA 부분으로 구성되어 있다: pBR322 DNA(얇은 줄)는 pBR322 기원의 DNA 복제(pBR ori) 및 락타마아제 암피실린 내성 유전자(Amp)를 포함하며; 넓은 헛칭 및 마크에 의하여 나타나는 SV40 DNA는 SV40 기원의 DNA 복제(SV40 ori), 초기 프로모터 (5' dhfr 및 neo 유전자), 및 폴리아데닐화 신호 (3' dhfr 및 neo 유전자)를 포함한다. SV40-유도성 폴리아데닐화 신호(pA)는 Fd 유전자의 3' 말단에 놓인다.

[0569]

카파 유전자를 위하여, PCR은 5' 프라이머로서 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO:46) 및 CK-유도성 3' 프라이머 (51-CGGGATCCTTCTCCCTTAACACTCT-31 SEQ ID NO:47)를 사용하여 수행된다. DNA 서열은 완전한 VK 및 인간 CK 영역을 함유하는 것으로 확인된다. 적합한 제한 효소로 분해 후, 카파 DNA 절편은 발현 벡터 카세트 pSV2neo-TUS의 HindIII 및 BamHI 제한 부위에 삽입되어 pSV2neoK를 산출한다. Fd 및 카파 유전자 모두의 발현은 HCMV-유도성 증진제 및 프로모터 성분에 의하여 유도된다. Fd 유전자는 사슬내 이황화 결합에 관여하는 시스테인 아미노산 잔기를 포함하지 않기 때문에, 이 재조합 키메라 Fab는 비-공유적으로 링크된 중쇄- 및 경쇄를 포함한다. 이 키메라 Fab는 cFab로서 설계되었다.

[0570]

중쇄 및 경쇄간 이황화 결합을 지닌 재조합 Fab를 획득하기 위하여, 상기 Fd 유전자는 인간 IgG1의 힌지 영역으로부터 추가의 9 아미노산 (EPKSCDKTH SEQ ID NO:48)의 암호화 서열을 포함하도록 확장되었다. Fd 유전자의 3' 말단의 30 아미노산을 암호화하는 BstEII-BamHI DNA 부분은 확장된 Fd를 암호화하는 DNA 부분으로 대체되었으며, 그 결과 pSV2dhfrFd/9aa가 된다.

[0571]

3. 키메라 항-MASP-2 IgG의 발현 및 정제

[0572]

키메라 항-MASP-2 IgG 분비 세포주를 생성하기 위하여, NSO 세포가 전기천공에 의하여 정제된 플라스미드 DNAs의 pSV2neoVH-huC γ 1 및 pSV2neoV-huC κ 카파로 전달감염되었다. 전달감염 세포는 0.7 mg/ml G418의 존재로 선택되었다. 세포는 혈청-함유 배지를 사용하여 250 ml 스핀너 플라스크 내에서 성장하였다. 100 ml 스핀너 배양액의 배양 상청액을 10-ml PROSEP-A 컬럼 (Bioprocessing, Inc., Princeton, N. J.)에 투여하였다. 컬럼을 10 bed 부피의 PBS로 세척하였다. 결합된 항체는 50 mM 시트레이트 완충액, pH 3.0으로 용출되었다. 동부피의 1 M Hepes, pH 8.0이 정제된 항체를 함유한 분획에 첨가되어 pH를 7.0으로 조절한다. 잔여 염은 밀리포어 막 초여과에 의한 PBS로의 완충액 교환에 의하여 제거된다(M.W. 배제: 3,000). 정제된 항체의 단백질 농도는 BCA 법에 의하여 결정된다(Pierce).

[0573]

4. 키메라 항-MASP-2 Fab의 발현 및 정제

[0574]

키메라 항-MASP-2 Fab를 분비하는 세포주의 생성을 위하여, CHO 세포는 전기천공에 의하여 정제된 플라스미드 DNAs의 pSV2dhfrFd (또는 pSV2dhfrFd/9aa) 및 pSV2neo카파로 전달감염되었다. 전달감염 세포는 G418 및 메토크세이트의 존재로 선택되었다. 선택된 세포주는 메토크세이트의 증가된 농도를 증폭시켰다. 세포는 제한 희석에 의하여 서브클론된 단일-세포이다. 고-생산 단일-세포 서브클론된 세포주는 그 다음 100 ml 스핀너 배양에서 무-혈청 배지를 사용하여 성장된다.

[0575]

키메라 항-MASP-2 Fab는 MASP-2 MoAb에 대한 마우스 항-이디오타입 MoAb를 사용한 친화도 크로마토그래피에 의하여 정제된다. 항-이디오타입 MASP-2 MoAb는 마우스를 열쇄구멍 샷갓조개 헤모시아닌(KLH)과 접합된 뮤린 항-

MASP-2 MoAb로 면역화하고, 인간 MASP-2와 경쟁할 수 있는 특이적 MoAb 결합으로 선별함으로써 제조될 수 있다. 정제를 위하여, cFab 또는 cFab/9aa를 생산하는 CHO 세포의 스핀너 배양물의 100 ml의 상청액을 항-이디오타입 MASP-2 MoAb과 결합된 친화도 컬럼에 투입하였다. 컬럼은 결합된 Fab가 50 mM 디에틸아민, pH 11.5으로 용출되기 전에 PBS로 철저하게 세척하였다. 잔여 염은 진술한 완충액 교환으로 제거되었다. 정제된 Fab의 단백질 농도는 BCA법(Pierce)에 의하여 결정되었다.

[0576] 키메라 MASP-2 IgG, cFab, 및 cFab/9aa가 MASP-2-의존성 보체 경로를 억제하는 능력은 억제 측정법(실시에 2)을 사용하여 측정할 수 있다.

[0577] **실시에 11**

[0578] 이 실시예는 L-피콜린/P35, H-피콜린, M-피콜린 또는 만난을 통한 MASP-2-의존성 보체 활성화를 차단할 수 있는 MASP-2 억제제를 확인하도록 기능성 선별법으로서 시험관 내 C4 분열 측정법을 설명한다.

[0579] C4 분열 측정법: A C4 분열 측정법은 Petersen, S.V., et al., J. Immunol. Methods 257:107, 2001에 설명되어 있으며, 이는 L-피콜린에 결합하는 *S. aureus*의 지질타이코산(LTA)의 랙틴 경로 활성화 결과를 측정한다.

[0580] 시약: 포르말린-고정 *S. aureus* (DSM20233)를 다음과 같이 제조한다: 박테리아를 트립틱 소이 혈액 배지 내에서 37°C로 밤샘 성장시키고, PBS로 3회 세척한 후, PBS/0.5% 포르말린 내에서 실온으로 1시간 동안 고정시켰으며, 피복 완충액 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)에 재현탁되기 전에 PBS로 추가로 3회 세척하였다.

[0581] 측정법: Nunc MaxiSorb 마이크로리터 플레이트 (Nalgene Nunc International, Rochester, NY)의 웰은: 100 μ l의 포르말린-고정 *S. aureus* DSM20233 (OD550 = 0.5)의 피복 완충액 용액과 1 μ g의 L-피콜린의 피복 완충액 용액으로 피복되었다. 밤샘 배양 후, 웰은 0.1% 인간 혈청 알부민 (HSA)의 TBS (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.4) 용액으로 차단시켰으며, 그 다음 0.05% Tween 20 및 5 mM CaCl₂을 함유한 TBS(세척 완충액)으로 세척하였다. 인간 혈청 시료는 20 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% Triton X-100, 0.1% HSA, pH 7.4 내에서 희석되었으며, 이는 내재 C4의 활성화를 예방하고, C1 복합체 (C1q, C1r 및 C1s로 구성)를 분해한다. 항-MASP-2 MoAbs 및 억제 펩타이드를 포함하는 MASP-2 억제제에 다양한 농도의 혈청 시료를 첨가한다. 희석된 시료를 플레이트에 첨가하고 4°C로 밤샘 배양하였다, 24시간 후, 플레이트를 세척 완충액으로 철저하게 세척하고, 그 다음 0.1 μ g의 정제된 인간 C4 (Dodds, A.W., Methods Enzymol. 223:46, 1993)의 100 μ l의 4 mM 바르비탈, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4 용액을 각 웰에 첨가한다. 37°C에서 1.5 시간 후, 플레이트를 다시 세척하고, C4b 부착을 알카라인 포스파타아제-접합 닭 항-인간 C4c(Immunosystem, Uppsala, Sweden)를 사용하여 검출하고 및 비색 기질 p-니트로페닐 포스페이트를 사용하여 측정한다.

[0582] 만난상의 C4 측정법: 전술한 측정법은 다양한 MASP-2 억제제와 혼합된 혈청에 첨가하기 전에 LSP 및 만난을 보유한 피복에 의하여 MBL을 통하여 랙틴 경로 활성화를 측정하도록 변형될 수 있다.

[0583] H-피콜린(Hakata Ag)상의 C4 측정법: 전술한 측정법은 다양한 MASP-2 억제제와 혼합된 혈청에 첨가하기 전에 LSP 및 H-피콜린을 보유한 피복에 의하여 H-피콜린을 통하여 랙틴 경로 활성화를 측정하도록 변형될 수 있다.

[0584] **실시에 12**

[0585] 다음의 측정법은 야생형 및 MASP-2-/- 마우스 내의 고전적 경로 활성화의 존재를 입증한다.

[0586] 방법: 면역 복합체는 피복 마이크로리터 플레이트 (Maxisorb, Nunc, cat. No. 442404, Fisher Scientific)에 의하여 0.1% 인간 혈청 알부민의 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.4 용액으로 1 시간 동안 실온에서 그 자체로 생성되며, TBS/tween/Ca²⁺로 1:1000 희석된 양 항 전혈청 항혈청(Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Scotland)으로 4°C에서 밤샘 배양된다. 혈청 시료는 야생형 및 MASP-2-/- 마우스에서 획득하며, 피복된 플레이트에 첨가된다. 대조군 시료는 C1q는 야생형 및 MASP-2-/- 혈청 시료에서 고갈되도록 제조된다. C1q-결핍 마우스 혈청은 제조자의 지시에 따라 레빗 항-인간 C1q IgG(Dako, Glostrup, Denmark)로 피복된 단백질-A-커플 다이아비드(Dynal Biotech, Oslo, Norway)를 사용하여 제조된다. 플레이트를 37°C에서 90분 동안 배양된다. 결합된 C3b는 TBS/tw/ Ca⁺⁺로 1:1000 희석된 다클론 항-인간-C3c 항체(Dako A 062)로 검출된다. 2차 항체는 염소 항-레빗 IgG이다.

[0587] 결과: 도 9은 IgG in 야생형 혈청, MASP-2-/- 혈청, C1q-결핍 야생형 및 C1q-결핍 MASP-2-/- 혈청으로 피복된 플레이트상의 상대적 C3b 부착 수준을 나타낸다. 이러한 결과는 고전적 경로가 MASP-2-/- 마우스 군주 내에서

무손상이라는 것을 입증한다.

[0588] **실시예 13**

[0589] 다음의 측정법은 고전적 경로가 면역 복합체에 의하여 개시된 증상하에서 MASP-2 억제제의 효과를 분석함으로써 MASP-2 억제제가 고전적 경로를 차단하는지 여부를 시험하는데 사용된다.

[0590] **방법:** 고전적 경로가 면역 복합체에 의하여 개시된 보체 활성화 증상의 MASP-2 억제제 효과를 시험하기 위하여, 3병의 90% NHS를 함유한 50 μ l 시료를 10 μ g/ml의 면역 복합체(IC) 또는 PBS의 존재하에 37°C에서 배양하였으며, 동일한 3병의 시료 (+/-IC)는 37°C 배양시 200 nM 항-프로페딘 단클론 항체를 함유하도록 포함된다. 두시간의 37°C 배양 후, 13 mM EDTA를 모든 시료에 첨가하여 추가의 보체 활성화를 종결시켰으며, 시료를 즉시 5°C로 냉각하였다. 그 다음 제조자의 지시에 따라 ELISA 키트(Quidel, Catalog Nos. AO 15 and A009)를 사용하여 보체 활성화 산물(C3a 및 sC5b-9)을 측정하기 전에 시료를 -70°C로 저장하였다.

[0591] **실시예 14**

[0592] 이 실시예는 렉틴-의존성 MASP-2 보체 활성화 시스템이 복부 대동맥류 복구 후 허혈/재관류 상내에서 활성화된다는 것을 입증하였다.

[0593] **실험적 근거 및 설계:** 복부 대동맥류(AAA) 복구를 한 환자에 허혈-재관류 손상을 가하였으며, 이는 보체 활성화에 의하여 크게 매개되었다. AAA 복구를 한 환자 내의 허혈-재관류 손상에 있어서의 MASP-2-의존성 보체 활성화의 렉틴 경로의 역할을 조사하였다. 혈청 내의 만난-결합 렉틴(MBL)은 재관류시 발생하는 MASP-2-의존성 렉틴 경로 활성화의 양을 측정하는데 사용된다.

[0594] **환자 혈청 시료 분리:** 선택적 산하 AAA 복구를 한 총 23명의 환자 및 주요 복부 수술을 한 8명의 대조군 환자들이 연구에 포함시켰다. AAA 복구를 한 환자에 있어서, 전신성 혈액 시료를 수술중 정해진 4 시점에서 각 환자의 노동맥(동맥라인을 통하여)에서 채취하였다: 시점 1: 마취 유도; 시점 2: 대동맥 크래핑 직전; 시점 3: 대동맥 크래핑 제거 직전; 및 시점 4: 재관류시. 주요 복부 수술을 한 대조군 환자에 있어서, 전신성 혈액 시료는 최면 유도시와 시술 시작 후 2 시간 후 채취하였다.

[0595] **MBL 수준의 측정법:** 각 환자 혈장 시료는 ELISA 기법을 사용하여 만난-결합 렉틴 (MBL)의 수준을 측정하였다.

[0596] **결과:** 이 연구의 결과는 도 10에 나타내었으며, 이는 MBL 수준 (y 축)의 각 다양한 시점 (x 축)에서의 평균 백분율 변화를 나타낸다. MBL의 초기값은 100%이며, 그 뒤로 상대적으로 감소한다. 도 10에 나타낸 바와 같이, AAA 환자(n=23)는 혈장 MBL 수준의 현저한 감소를 나타내며, AAA 후 허혈/재관류 시점에서의 평균 약 41% 감소가 된다. 이에 반하여, 주요 복부 수술을 한 대조군 환자(n=8) 내에서는 혈장 시료 내에서 MBL 소비가 적음을 관찰하였다.

[0597] 제공된 데이터는 보체 시스템의 MASP-2-의존성 렉틴 경로가 AAA 복구 후 허혈/재관류 상에서 활성화된다는 강력한 사실을 제공한다. MBL 수준의 감소는 허혈-재관류 손상에 관련된 것으로 보이며, 이는 크래핑된 주요 혈관이 수술 후 재관류되는 경우 MBL 수준이 현저하고 급속하게 감소하기 때문이다. 이에 반하여, 주요 허혈-재관류 손상없이 주요 복부 수술을 한 환자의 대조군 혈청은 MBL 혈장 수준의 약간의 감소만을 나타낸다. 우리는 재관류 손상 내의 보체 활성화의 잘 확립된 기여의 관점에서, 허혈 내피 세포상의 MASP-2의 활성화-의존성 렉틴 경로는 허혈/재관류 손상의 병리학상의 주요 인자라고 결론지었다. 따라서, MASP-2-의존성 보체 활성화의 렉틴 경로의 특이적 일시적 차단 또는 감소는 일시적 허혈 손상, 예컨대, 심근 경색, 장 경색, 화상, 이식 및 뇌졸중에 관한 임상적 수술 및 질환의 결과를 향상시키는 치료적 효과에 현저한 이익을 가질 것으로 기대한다.

[0598] **실시예 15**

[0599] 이 실시예는 류마티스 관절염 치료에 유용한 MASP-2 억제제 시험용 동물 모델로서 MASP-2-/- 균주의 용도를 설명한다.

[0600] **배경 및 이론적 근거:** 류마티스 관절염 모델: K/BxN T 세포 수용체(TCR) 유전자삽입(tg) 마우스는 최근 개발된 염증 관절염 모델이다(Kouskoff, V., et al, Cell 87:811-822, 1996; Korganow, A.S., et al, Immunity 10:451-461, 1999; Matsumoto, L, et al., Science 286:1732-1735, 1999; Maccioni M. et al., J. Exp. Med. 195(8):1071-1077, 2002). K/BxN 마우스는 인간 RA의 대부분의 임상적, 조직학적 및 면역학적 특징을 지닌 자가 면역 질환을 자체적으로 발달시킨다(Ji, H., et al., Immunity 16:157-168, 2002). 류마티스 장애는 관절 특이적이거나, 개시된 후 T에 의하여 영속되며, B 세포는 글루코스-6-포스페이트 아이소머라아제 ("GPI"), 편재하여 발현

되는 항원에 자기반응성이다. 추가적으로, 혈청(또는 정제된 항-GPI Igs)이 관절염성 K/BxN 마우스에서 건강한 동물로 전이되면 수일 내에 관절염을 일으키게된다. 다클론 항-GPI 항체 또는 IgG1 아이소타입의 항-GPI 단클론 항체의 풀이 건강한 수여자에 주입된 경우 관절염을 유도한다는 것을 보여주었다(Maccioni et al., 2002). 무린 모델은 인간 RA에 관한 것이며, RA 환자의 혈청은 정상 개체에서는 발견되지 않는 항-GPI 항체를 함유하는 것으로 밝혀졌기 때문이다. C5-결핍 마우스는 이 시스템에서 시험되었으며, 관절염 발달을 차단하는 것으로 나타났다(Ji, H., et al., 2002, supra). C3 무효과 마우스 내에서 관절염의 강한 억제가 있으며, 이는 대체 경로에 관련되어 있으나, MBP-A 무효과 마우스는 관절염을 발달시켰다. 마우스에 있어서 그러나, MBP-C의 존재는 MBP-A의 손실을 보상해준다.

[0601] MASP-2가 렉틴 및 대체 경로 모두의 개시에 필수적인 역할을 한다는 본원의 관찰에 기초하여, K/BxN 관절염성 모델은 RA 치료제로서 효과적인 MASP-2 억제제의 선별에 유용하다.

[0602] **방법:** 관절염성 K/BxN 마우스의 혈청은 60일령에서 획득하였으며, 풀을 형성하고, MASP-2-/- 수여자(실시예 1)에게 주사되었으며(150-200 μ l i.p.); 및 대조군 한배자손은 MASP-2 억제제 (MoAb, 본원의 억제 펩타이드 등)로 또는 없이 0일 및 2일에 획득하였다. 정상 마우스 군은 혈청 주사 2일 전 MASP-2 억제제로 선처리되었다. 추가의 마우스 군은 0일에 혈청 주사를 맞았고, 6일차에 MASP-2 억제제를 맞았다. 임상적 지표는 시간에 따라 각 영향받은 발에 1 포인트, 살짝 부풀어오른 것에 1/2 포인트를 부여하였다. 발목 두께를 캘리퍼스 측정하였다(두께는 0일에서의 두께와의 차이로 정의되었다).

[0603] **실시예 16**

[0604] 이 실시예는 인간 혈장으로 관류된 레빗 심장의 생체 외 모델 내에서 보체-매개 조직 손상의 억제 측정법을 설명한다.

[0605] **배경 및 이론적 근거:** 보체 시스템의 활성화는 이종이식편의 초급성 거부반응에 기여한다. 이전의 연구들은 초급성 거부반응은 대체 경로의 활성화를 통한 항-공여자 항체의 부재에서 발생할 수 있다는 것을 보여준다(Johnston, P.S., et al., Transplant Proc. 23:877-879, 1991).

[0606] **방법:** 분리된 항-MASP-2 억제제 예컨대 항-MASP-2 항체(실시예 7)가 조직 손상 내의 보체 경로를 억제할 수 있는지를 결정하기 위하여, 항-MASP-2 MoAbs 및 항체 절편을 회석한 인간 혈장으로 관류된 분리된 레빗 심장의 생체 외 모델 내를 사용하여 시험하였다. 이 모델은 대체 보체 경로를 활성화시킴으로써 레빗 심근에 손상을 유발한다고 사전에 알려졌다(Gralinski, M.R., et al., Immunopharmacology 34:79-88, 1996).

[0607] **실시예 17**

[0608] 이 실시예는 본 발명의 방법에 따라 렉틴-의존성 경로에 관련된 증상의 치료를 위하여 MASP-2 억제제의 효과적인 투약량을 측정하기에 유용한 호중구 활성화를 측정하는 측정법을 설명한다.

[0609] **방법:** 호중구 엘라스테라아제의 측정 방법은 Gupta-Bansal, R., et al., Molecular Immunol. 37:191-201, 2000에 설명되어있다. 요약하자면, 엘라스테라아제와 혈청 α 1-안티트립신의 복합체는 엘라스테라아제 및 α 1-안티트립신 모두에 대한 항체를 사용하는 두-부위 샌드위치 측정법으로 측정된다. 폴리스티렌 마이크로리터 플레이트는 1:500으로 회석된 항-인간 엘라스테라아제 항체 (결합 부위, Birmingham, UK)의 PBS 용액으로 4°C에서 피복된다. 항체 용액을 흡인한 후, 웰은 0.4% HAS를 함유한 PBS로 2시간 동안 실온에서 차단되었다. MASP-2 억제제로 처리되거나, 처리되지 않은 혈장 시료의 분취물(100 μ l)을 웰에 첨가하였다. 실온의 2 시간 배양 후, 웰을 PBS로 철저히 행구었다. 결합된 엘라스테라아제- α 1-안티트립신 복합체는 1 시간의 실온 배양을 하는 1:500으로 회석된 과산화효소 결합- α 1-안티트립신 항체의 차단 용액의 첨가로 검출된다. PBS로 플레이트를 세척한 후, 100 μ l의 TMB 기질 분취물을 첨가하였다. TMB의 반응은 100 μ l의 인산의 첨가로 중단되었으며, 플레이트를 마이크로플레이트 리더내에서 450 nm를 읽었다.

[0610] **실시예 18**

[0611] 이 실시예는 심근 허혈/재관류를 치료하는데 유용한 MASP-2 억제제를 시험하기 위한 동물 모델을 설명한다.

[0612] **방법:** 심근 허혈-재관류 모델은 Vakeva et al., Circulation 97:2259-2267, 1998, 및 Jordan et al., Circulation 104(12):1413-1418, 2001에 설명되어 있다. 설명된 모델은 MASP-2-/- 및 MASP-2+/+ 마우스에 사용되기 위하여 다음과 같이 변형되었다. 요약하자면, 성인 수컷 마우스를 마취시키고, 목 정맥 및 장기에 캐뉼러를 삽입하고, 호흡은 설치류 인공호흡기로 3.5% 내지 5% 사이의 CO₂를 배출하도록 조절하면서 100% 산소를 유지

하였다. 좌측 개흉술을 시도하였으며, 봉합은 좌 심장동맥의 기원에서 3 내지 4 mm에 두었다. 허혈 5분 전, 동물에 MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체(예컨대, 투약 범위는 .01 내지 10 mg/kg 사이)를 투여하였다. 허혈은 심장동맥을 둘러싼 봉합사를 조임으로써 시작되었으며, 30 분간 유지하였고, 4 시간의 재관류를 하였다. 봉합사 조임을 제외하고 동일한 삼-수술 동물을 준비하였다.

[0613] 보체 C3 부착의 분석: 재관류 후, 면역조직화학을 위한 시료는 좌심실의 중앙 영역에서 얻어, 고정시키고, 가동 전까지 -80℃로 냉동하였다. 조직 섹션을 HRP-접합 염소 항-레트 C3 항체와 함께 배양하였다. 생체 내 C3 부착을 감소시키는 MASP-2 억제제를 확인하기 위하여 조직 섹션을 항-MASP-2 억제제의 존재하에 C3 염색의 존재를 삼-수술 대조구 동물 및 MASP-2-/- 동물과 비교하여 분석하였다.

[0614] **실시예 19**

[0615] 이 실시예는 MASP-2 억제제가 이식된 조직이 허혈/재관류 손상되는 것으로부터 보호하는 능력을 시험하는 동물 모델로서 MASP-2-/- 군주의 사용을 설명한다.

[0616] 배경/이론적 근거: 허혈/재관류 손상은 이식중 공여자 장기 내에서 발생한다고 알려져 있다. 다양한 허혈 모델 및 보체 억제제 예컨대 가용성 수용체 타입 1(CR1)을 사용하여 입증된 바와 같이 조직 손상의 범위는 허혈의 길이에 관련되며, 보체에 의하여 매개된다(Weisman et al., Science 249:146-151, 1990; Mulligan et al., J. Immunol. 148:1479-1486, 1992; Pratt et al., Am. J. Path. 163(4): 1457-1465, 2003). 동물 이식 모델은 문헌 Pratt et al., Am. J. Path. 163(4): 1457-1465에 설명되어 있으며, 이는 MASP-2 억제제가 이식된 조직이 허혈/재관류 손상되는 것으로부터 보호하는 능력을 선별하는 MASP-2-/- 마우스 모델 및/또는 MASP-2+/+ 모델 시스템으로 사용하기 위하여 변형된다. 이식 전 관류 유체에 의한 공여자 신장의 관류는 공여자 신장 내로 항-MASP-2 억제제가 도입될 기회를 제공한다.

[0617] 방법: MASP-2-/- 및/또는 MASP-2+/+ 마우스를 마취시켰다. 공여자 좌측신장은 절개하여, 대동맥을 머리방향으로 결찰하고, 신장 동맥을 꼬리쪽으로 결찰하였다. 포르텍스 튜브 카테터(Portex Ltd, Hythe, UK)를 결찰부 사이에 삽입하였고, 신장에 5 ml의 솔트론 신장 관류 용액(Baxter Health Care, UK)과 MASP-2 억제제 예컨대 항-MASP-2 단클론 항체 (투약량의 범위는 .01 mg/kg 내지 10 mg/kg)를 최소한 5 분간 관류시켰다. 신장 이식을 수행하였으며, 마우스의 경과를 모니터링하였다.

[0618] 이식 수여자의 분석: 신장 이식편을 다양한 시간 간격에서 수확하였으며, 조직 섹션은 C3 부착의 정도를 결정하기 위하여 항-C3를 사용하여 분석하였다.

[0619] **실시예 20**

[0620] 이 실시예는 류마티스 관절염(RA)을 치료하기에 유용한 MASP-2 억제제를 시험하기 위한 콜라겐-유도성 관절염(CIA) 동물 모델의 사용을 설명한다.

[0621] 배경 및 이론적 근거: 콜라겐-유도성 관절염(CIA)은 자연형 II 콜라겐으로 면역 후 감염되기 쉬운 설치류 및 영장류 주에서 유도되는 자가면역 다발성관절염을 나타내며, 인간 류마티스 관절염(RA)의 유관 모델로서 인식된다(Courtney et al., Nature 283: 666 (1980); Trentham et al., J. Exp. Med. 146: 857 (1977)). RA 및 CIA 모두는 관절 염증, 판누스 형성 및 연골 및 골 미란에 의하여 특징화된다. CIA 걸리기 쉬운 무린주 DBA/1LacJ는 보빈 타입 II 콜라겐으로 면역화된 후 임상적 격렬한 관절염을 발달시키는 마우스 CIA 모델로 개발되었다(Wang et al., J. Immunol. 164: 4340-4347 (2000)). C5-결핍 마우스주를 DBA/1LacJ와 교배시켰으며, 결과주는 CIA 관절염 발달에 저항적인 것으로 나타났다(Wang et al., 2000, supra).

[0622] MASP-2가 렉틴 및 대체 경로 모두의 개시에서 필수적인 역할을 한다는 본원의 관찰에 기초하여, CIA 관절염성 모델은 RA 치료제로 사용하기에 효과적인 MASP-2 억제제를 선별하기에 유용하다.

[0623] 방법: MASP-2-/- 마우스는 실시예 1에서 설명된 바와 같이 생성되었다. MASP-2-/- 마우스는 DBA/1LacJ 군주(The Jackson Laboratory)에서 유도된 마우스와 교배되었다. F1 및 후속적 자손을 이중교배하여 DBA/1LacJ 계열 동종접합 MASP-2-/-를 생산하였다.

[0624] 콜라겐 면역화는 문헌 Wang et al., 2000, supra에 설명된 바와 같이 수행되었다. 요약하자면, 야생형 DBA/1LacJ 마우스 및 MASP-2-/- DBA/1LacJ 마우스는 0.01 M 아세트산(농도 4 mg/ml)으로 용해된 보빈 타입 II 콜라겐 (BCII) 또는 마우스 타입 II 콜라겐 (MCII)(Elastin Products, Owensville, MO)로 면역화되었다. 각 마우스는 200 ug CII 및 100 ug 마이코박테리아를 꼬리 기저부의 진피내에 주사되었다. 마우스는 21일 후 재-면역화되었으며, 관절염의 외관을 매일 조사하였다. 관절염 지표는 각 발병한 발의 관절염 중증도에 관하여 시간에

따라 평가되었다.

[0625] MASP-2 억제제는 콜라겐 면역화 시점에서, 전신적으로나, 또는 하나 이상의 관절에 국부적으로 MASP-2 억제제 예컨대 항-MASP-2 단클론 항체(투약량의 범위는 .01 mg/kg 내지 10 mg/kg)를 주사함으로써 야생형 DBA/1LacJ CIA 마우스 내에서 선별되었으며, 관절염 지표는 전술한 바와 같이 시간 경과에 따라 평가되었다. 치료제로서 항-hMASP-2 단클론 항체는 MASP-2^{-/-}, hMASP^{+/+} 넉-인 DBA/1LacJ CIA 마우스 모델 내에서 간단하게 평가되었다.

[0626] **실시예 21**

[0627] 이 실시예는 면역-복합체 매개 사구체신염을 치료하기에 유용한 MASP-2 억제제를 시험하기 위한 (NZB/W) F1 동물 모델의 사용을 설명한다.

[0628] 배경 및 이론적 근거: 뉴질랜드 블랙 x 뉴질랜드 화이트(NZB/W) F1 마우스는 인간 면역-복합체 매개 사구체신염과 상당한 유사성을 지닌 자가면역 증후군을 자체적으로 발달시킨다. NZB/W F1 마우스 12 월령경에 예외없이 사구체신염을 겪게된다. 전술한 바와 같이, 보체 활성화가 면역-복합체 매개 사구체신염의 발병 기전 내에서 상당한 역할을 한다는 것이 입증되었다. 이는 NZB/W F1 마우스 모델에 항-C5 MoAb를 투여하면 사구체신염의 경과를 현저히 개선시키게 된다는 사실을 추가적으로 보여주었다 (Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 93:8563-8568 (1996)). MASP-2가 렉틴 및 대체 경로 모두의 개시에서 필수적인 역할을 한다는 본원의 관찰에 기초하여, NZB/W F1 동물 모델은 사구체신염 치료제로 사용하기에 효과적인 MASP-2 억제제를 선별하기에 유용하다.

[0629] 방법: MASP-2^{-/-} 마우스는 실시예 1에서 설명된 바와 같이 생성되었다. MASP-2^{-/-} 마우스는 각각 NZB 및 NZW 주(The Jackson Laboratory)에서 유도된 마우스와 교배되었다. F1 및 후속적 자손을 이중교배하여 NZB 및 NZW 유전적 배경 모두에서 동종접합 MASP-2^{-/-}을 생산하였다. 이 모델 내에서 사구체신염의 발병기전 내의 MASP-2의 역할을 결정하기 위하여, 야생형 NZB x NZW 마우스 또는 MASP-2^{-/-}NZB x MASP-2^{-/-}NZW 마우스의 교배에 의한 F1 개체 내에서 이 질환의 발달을 비교하였다. 일주일 간격으로 소변 시료를 MASP-2^{+/+} 및 MASP-2^{-/-} F1 마우스에서 수거하였으며, 소변 단백질 수준을 항-DNA 항체의 존재에 관하여 모니터링하였다(Wang et al., 1996, supra). 신장의 조직병리학적 분석은 혈관관 기질 부착량 및 사구체신염 발달을 모니터링하기 위하여 수행하였다.

[0630] NZB/W F1 동물 모델은 사구체신염 치료제로 사용하기에 효과적인 MASP-2 억제제를 선별하기에 유용하다. 18 주령에서, 야생형 NZB/W F1 마우스에 항-MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 단클론 항체(투약량의 범위는 .01 mg/kg 내지 10 mg/kg)를 일주일 또는 이주일 간격으로 복막내 주사하였다. 상기-모니터링된 사구체신염의 조직병리학적 및 생화학적 마커는 마우스 내의 질환 발달을 평가하고, 이 질환의 치료용으로 유용한 MASP-2 억제제를 확인하기 위하여 사용된다.

[0631] **실시예 22**

[0632] 이 실시예는 체외순환(ECC) 예컨대 심폐순환 우회술(CPB) 회로에 의한 조직 손상 결과를 예방하기 위한 MASP-2 억제제를 시험하기 위한 모델로서 튜빙 루프를 사용한 것을 설명한다.

[0633] 배경 및 이론적 근거: 전술한 바와 같이, CPB시 ECC 환자는 혈액이 체외순환 회로의 인공 표면에 노출됨으로써, 그러나 또한 외과적 외상 및 허혈-재관류 손상 등의 표면-비 의존성 인자에 의하여 부분적으로 유발되는 전신성 염증 반응을 겪게된다(Butler, J., et al., Ann. Thorac. Surg. 55:552-9, 1993; Edmunds, L.H., Ann. Thorac. Surg. 66(Suppl):S12-6, 1998; Asimakopoulos, G., Perfusion 14:269-77, 1999). 혈액과 CPB 회로의 인공 표면간의 상호작용에 의하여, 대체 보체 경로가 CPB 회로내의 보체 활성화에 있어서 우세한 역할을 한다는 것이 추가로 알려졌다(Kirklin et al., 1983, 1986, 전술). 따라서, MASP-2가 렉틴 및 대체 경로 모두의 개시에서 필수적인 역할을 한다는 본원의 관찰에 기초하여, 튜빙 루프 모델은 체외순환 노출-촉발 염증 반응의 예방 또는 치료하기 위한 치료제로 사용하기에 효과적인 MASP-2 억제제를 선별하기에 유용하다.

[0634] 방법: Gupta-Bansal et al., Molecular Immunol. 37:191-201 (2000)에 설명되어 있는 바와 같이 심폐순환 우회술 회로를 위한 전술한 튜빙 루프 모델의 변형이 사용되었다(Gong et al., J. Clinical Immunol. 16(4):222-229 (1996)). 요약하자면, 혈액을 건강한 대상체 내에서 7 ml 진공채혈관(헤어핀 7 유닛/ml의 전혈을 함유)으로 신선하게 수거한다. CPB 과정에서 사용된 것과 유사한 폴리에틸렌 튜빙(예컨대, LD. 2.92 mm; O.D. 3.73 mm, 길이: 45 cm)에 1 ml의 혈액이 충전되고, 작은 조각의 실리콘 튜빙을 구비한 루프로 마감하였다. 헤어핀화된 혈액과 10 mM EDTA를 함유한 대조구 튜빙을 배경 대조구로서 연구에 포함시켰다. 시료 및 대조구 튜빙을 수조 내에서 37℃로 1 시간동안 수직으로 회전시켰다. 배양 후, 혈액 시료를 1.7 ml 마이크로프루즈 튜브(EDTA 함유)로 이

동시켜 최종 농도가 20 mM EDTA가 되도록 하였다. 시료를 원심분리하였으며, 혈장을 수거하였다. MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체를 회전시키기 직전에 헤어핀화된 혈액에 첨가하였다. 혈장 시료를 C3a 및 가용성 C5b-9의 농도를 측정하기 위한 측정법에 가하였다(Gupta-Bansal et al., 2000, supra).

[0635] **실시예 23**

[0636] 이 실시예는 패혈증 또는 격렬한 패혈증, 패혈 쇼크, 패혈증 및 전신 염증 반응 증후군에 의한 급성 호흡 곤란 증후군 결과를 포함하는 패혈증 증상 결과를 치료하기에 유용한 MASP-2 억제제를 시험하는 설치류 맹장 결찰 및 천차(CLP) 모델 시스템의 사용을 설명한다.

[0637] **배경 및 이론적 근거:** 전술한 바와 같이, 보체 활성화는 다수의 연구들에서 패혈증의 발병기전에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다(Bone, R.C., *Annals. Internal. Med.* 115:457-469, 1991). CLP 설치류 모델은 인간 패혈증의 임상적 결과를 모사하는 모델로 인식되고 있으며, 인간 패혈증의 합리적인 대체 모델로 간주된다(Ward, P., *Nature Review Immunology* Vol 4: 133-142 (2004)). 최근 연구에서는 CLP 동물의 항-C5a 항체 치료가 세균 혈증을 감소시키며, 생존율을 상당히 향상시킨다는 것을 보여주었다(Huber-Lang et al., *J. of Immunol.* 169: 3223-3231 (2002)). 따라서, MASP-2가 렉틴 및 대체 경로 모두의 개시에서 필수적인 역할을 한다는 본원의 관찰에 기초하여, CLP 설치류 모델은 패혈증 또는 패혈증 증상 결과의 예방 또는 치료하기 위한 치료제로 사용하기에 효과적인 MASP-2 억제제를 선별하기에 유용하다.

[0638] **방법:** CLP 모델은 문헌 Huber-Lang et al., 2004, supra에 설명된 모델로부터 다음과 같이 변형되었다. MASP-2^{-/-} 및 MASP-2^{+/+} 동물을 마취시켰다. 2 cm의 중앙 복부 절개를 행하였으며, 맹장을 돌막창지판막아래에서 강하게 결찰하여, 배변 장애를 회피하였다. 맹장은 21-게이지 바늘로 천자되었다. 복부 절개부는 실크 봉합사 및 피부 클립으로(Ethicon, Summerville, NJ)으로 층 내에서 봉합되었다. CLP 직후, 동물에 MASP-2 억제제 예컨대 항-MASP-2 단클론 항체(투약량의 범위는 .01 mg/kg 내지 10 mg/kg)의 주사를 투여하였다. 치료제로서 항-hMASP-2 단클론 항체는 MASP-2^{-/-}, hMASP-2^{+/+} 녀-인 CLP 마우스 모델 내에서 쉽게 평가되었다. 마우스의 혈장은 문헌 Huber-Lang et al., 2004, supra에 설명된 측정법을 사용하여 보체-유도성 아나필라톡신 및 호흡 급증의 수준을 분석하였다.

[0639] **실시예 24**

[0640] 이 실시예는 MASP-2 활성을 차단하는 고친화도 항-MASP-2 Fab2 항체 절편의 확인을 설명한다.

[0641] **배경 및 이론적 근거:** MASP-2는: MBL 및 피클린의 결합 부위(들), 세린 프로테아제 촉매성 부위, 단백질분해 기질 C2의 결합 부위, 단백질분해 기질 C4의 결합 부위, MASP-2 효소원의 자가활성화의 MASP-2 분열 부위, 및 두 Ca⁺⁺ 결합 부위를 포함하는 다수의 별도의 기능성 도메인을 지닌 복합체 단백질이다. Fab2 항체 절편은 고친화도로 MASP-2에 결합하는 것으로 확인되었으며, 확인된 Fab2 절편은 이들이 MASP-2 기능성 활성을 차단하는지 여부를 결정하기 위한 기능성 측정법으로 시험되었다.

[0642] MASP-2 기능성 활성을 차단하기 위하여, 항체 또는 Fab2 항체 절편은 MASP-2 기능성 활성에 요구되는 MASP-2 상의 구조 에피토프에 결합하거나 이를 방해하여야 한다. 따라서, 이들이 MASP-2 기능성 활성에 직접관계되는 MASP-2 상의 구조 에피토프에 결합하지 않는다면 다수의 또는 모든 고친화도 결합 항-MASP-2 Fab2는 MASP-2 기능성 활성을 억제할 수 없다.

[0643] 렉틴 경로 C3 전환효소 형성의 억제를 측정하는 기능성 측정법은 항-MASP-2 Fab2s의 "차단 활성"을 평가하기 위하여 사용된다. 렉틴 경로 내의 MASP-2의 1차적 생리학적 역할이 렉틴-매개 보체 경로의 다음 기능성 성분, 즉 렉틴 경로 C3 전환효소를 생성하게 한다는 것이 알려져 있다. 렉틴 경로 C3 전환효소는 단백질분해적으로 C3를 C3a 및 C3b로 분해하는 결정적인 효소적 복합체(C4bC2a)이다. MASP-2는 렉틴 경로 C3 전환효소(C4bC2a)의 구조적 성분이 아니다; 그러나, MASP-2 기능성 활성은 렉틴 경로 C3 전환효소를 포함하는 두 단백질 성분(C4b, C2a)을 생성하기 위하여 필요하다. 추가적으로, 열거된 MASP-2의 모든 별개의 기능성 활성은 MASP-2가 렉틴 경로 C3 전환효소를 생성하기 위하여 필요한 것 같다. 이러한 이유 때문에, 항-MASP-2 Fab2s의 "차단 활성"을 평가하기에 바람직한 측정법은 렉틴 경로 C3 전환효소 형성의 억제를 측정하는 기능성 측정법이라고 생각된다.

[0644] **고친화도 Fab2s의 생성:** 선택된 대상 리간드와 반응하는 Fab2s를 확인하기 위한 인간 가변 경쇄 및 중쇄 항체 서열의 파지 디스플레이 라이브러리 및 자동화 항체 선택 기술이 레트 MASP-2 단백질(SEQ ID NO:55)에 대한 고친화도 Fab2s를 생산하기 위하여 사용된다. 공지의 양의 레트 MASP-2 (~1 mg, >85% 순수) 단백질이 항체 선별을 위하여 사용된다. 3 라운드의 증폭이 최선의 친화도를 지닌 항체의 선택에 사용된다. 항체 절편을 발현하는 약

250 개의 다른 히트가 ELISA 선별을 위하여 선택된다. 고친화도 히트는 다른 항체의 유일성을 결정하기 위하여 후속적으로 서열화된다.

[0645] 40개의 유일한 항-MASP-2 항체가 정제되며, 하기할 250 μg 의 각 정제된 Fab2 항체가 MASP-2 결합 친화도 및 보체 경로 기능성 시험의 특성화를 위하여 사용되었다.

[0646] **항-MASP-2 Fab2s 활성의 억제(차단)의 평가에 사용되는 측정법**

[0647] 1. 렉틴 경로 C3 전환효소 형성 억제를 측정하기 위한 측정법:

[0648] 배경: 렉틴 경로 C3 전환효소는 단백질분해적으로 C3가 두 잠재적 전염증 절편, 아나필라톡신 C3a 및 옵소닌 C3b로 분해하는 효소적 복합체(C4bC2a)이다. C3 전환효소의 형성은 염증을 매개하는 렉틴 경로의 핵심 단계인 것 같다. MASP-2는 렉틴 경로 C3 전환효소(C4bC2a)의 구조적 성분이 아니다; 따라서 항-MASP-2 항체(또는 Fab2)는 선제하는 C3 전환효소의 활성을 직접적으로 억제하지 못한다. 그러나, MASP-2 세린 프로테아제 활성은 렉틴 경로 C3 전환효소를 포함하는 두 단백질 성분(C4b, C2a)의 생성을 위하여 필요하다. 따라서, MASP-2 기능성 활성을 억제(즉, 항-MASP-2 Fab2 차단)하는 항-MASP-2 Fab2는 렉틴 경로 C3 전환효소의 새로운 형성을 억제한다. C3는 이의 구조의 일부로서 특이적이고 고 반응성인 티오에스테르기를 함유한다. 이 측정법 내의 C3 by C3 전환효소의 분열에 있어서, C3b상의 티오에스테르기는 에스테르 또는 아마이드 결합을 통하여 플라스틱 웰의 바닥에 고정된 마크로분자상에서 히드록실 또는 아미노기와 공유 결합을 형성할 수 있다, 따라서 ELISA 측정법에서 C3b의 검출을 촉진하게 된다.

[0649] 효모 만난은 렉틴 경로의 공지된 활성제이다. C3 전환효소의 형성을 측정하는 다음의 방법에서, 만난으로 피복된 플라스틱 웰을 렉틴 경로를 활성화시키기 위하여 희석된 레트 혈청과 함께 37°C로 30 분간 배양하였다. 그 다음 웰을 세척하고, 웰상에 고정된 C3b를 표준 ELISA법을 사용하여 측정하였다. 이 측정법에서 생성된 C3b의 양은 렉틴 경로 C3 전환효소의 새로운 형성을 직접 반영한다. 선택된 농도에서의 항-MASP-2 Fab2s가 이들의 C3 전환효소 형성 및 결과적인 C3b 생성의 억제하는 능력에 대한 이 측정법에서 시험되었다.

[0650] 방법:

[0651] 96-웰 코스타 배지 결합 플레이트를 50 mM 카보네이트 완충액(pH 9.5)으로 희석된 만난으로, 1 $\mu\text{g}/50\mu\text{l}$ /웰에서 5°C로 밤샘 배양하였다. 밤샘 배양 후, 각 웰은 200 μl PBS로 3회 세척하였다. 웰을 100 μl /웰의 1% 보빈 혈청 알부민의 PBS 용액으로 차단시키고, 온건 혼합으로 실온에서 1시간 동안 배양 하였다. 각 웰을 200 μl 의 PBS로 3회 세척하였다. 항-MASP-2 Fab2 시료를 선택된 농도의 Ca^{++} 및 Mg^{++} 함유 GVB 완충액(4.0 mM 바르비탈, 141 mM NaCl, 1.0 mM MgCl_2 , 2.0 mM CaCl_2 , 0.1% 젤라틴, pH 7.4)으로 5°C로 희석하였다. 0.5% 레트 혈청을 상기 시료에 5°C로 첨가하였으며 100 μl 을 각 웰에 이동시켰다. 플레이트를 덮고, 37°C에서 30분간 수조에서 배양하여 보체 활성화를 가능하게 하였다. 반응은 37°C 수조의 플레이트를 얼음-물 혼합물 용기에 이동시켜 중단시켰다. 각 웰은 200 μl 의 PBS-Tween 20 (0.05% Tween 20의 PBS 용액)으로 5회 세척하고, 그 다음 200 μl 의 PBS로 2회 세척하였다. 100 μl /웰의 1:10,000 희석 1차 항체(레빗 항-인간 C3c, DAKO A0062)를 2.0 mg/ml 보빈 혈청 알부민을 함유한 PBS에 첨가하였으며, 온건 혼합하면서 실온에서 1시간 배양하였다. 각 웰을 200 μl PBS로 5회 세척하였다. 100 μl /웰의 1:10,000 희석 2차 항체(과산화효소-접합 염소 항-레빗 IgG, American Qualex A102PU)를 2.0 mg/ml의 보빈 혈청 알부민을 함유한 PBS에 첨가하였으며, 진탕기에서 온건 혼합하면서 실온에서 1시간 배양하였다. 각 웰을 200 μl 의 PBS로 5회 세척하였다. 100 μl /웰의 과산화효소 기질 TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)을 첨가하고, 실온에서 10분간 배양하였다. 과산화효소 반응은 100 μl /웰의 1.0 M H_3PO_4 를 첨가하여 중단시키고, OD₄₅₀을 측정하였다.

[0652] **2. MASP-2-의존성 C4 분열의 억제를 측정하는 측정법**

[0653] 배경: MASP-2의 세린 프로테아제 활성은 고도로 특이적이며, MASP-2의 두 단백질 기질만이 확인되었다; C2 및 C4. C4 분열은 C4a 및 C4b를 생성한다. 항-MASP-2 Fab2는 C4 분열에 직접 관계된 MASP-2상의 구조 에피토프에 결합할 수 있으며(예컨대, C4의 MASP-2 결합 부위; MASP-2 세린 프로테아제 촉매성 부위), 따라서 MASP-2의 C4 분열 기능성 활성을 억제한다.

[0654] 효모 만난은 렉틴 경로의 공지된 활성제이다. MASP-2의 C4 분열 활성을 측정하기 위한 다음의 방법에서, 렉틴 경로를 활성화하기 위하여 만난으로 피복된 플라스틱 웰을 희석된 레트 혈청으로 37°C로 30분간 배양하였다. 이 ELISA 측정법에 사용된 1차 항체 인간 C4만을 인식하기 때문에, 희석된 레트 혈청은 인간 C4 (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 보

충되었다. 그 다음 웰을 세척하고, 표준 ELISA법을 사용한 웰상에 고정된 인간 C4b를 고정하였다. 이 측정법의 생성된 C4b의 양은 MASP-2 의존성 C4 분열 활성의 측정치이다. 선택된 농도에서의 항-MASP-2 Fab2는 C4 분열의 억제하는 이들의 능력에 대하여 이 측정법에서 시험되었다.

[0655]

방법: 96-웰 코스타 배지 결합 플레이트를 1.0 $\mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$ /웰에서 50 mM 카보네이트 완충액으로 희석된 만난(pH 9.5)으로 5°C에서 밤샘 배양하였다. 각 웰을 200 μl PBS로 3회 세척하였다. 웰을 100 μl /웰의 1% 보빈 혈청 알부민의 PBS용액으로 차단시켰으며 온건 혼합하면서 실온에서 1시간 배양하였다. 각 웰을 200 μl 의 PBS로 3회 세척하였다. 항-MASP-2 Fab2 시료를 선택된 농도의 Ca^{++} 및 Mg^{++} 함유 GVB 완충액(4.0 mM 바르비탈, 141 mM NaCl, 1.0 mM MgCl_2 , 2.0 mM CaCl_2 , 0.1% 젤라틴, pH 7.4)으로 5°C에서 희석하였다. 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 인간 C4 (Quidel)를 이러한 시료 내에 첨가하였다. 0.5% 레트 혈청을 5°C에서 상기 시료에 첨가하였으며, 100 μl 를 각 웰에 이동시켰다. 플레이트를 덮고, 37°C로 30분간 배양하여 보체 활성화를 가능하게 하였다. 반응은 37°C 수조의 플레이트를 얼음-물 혼합물 용기에 이동시켜 중단시켰다. 각 웰은 200 μl 의 PBS-Tween 20 (0.05% Tween 20의 PBS 용액)으로 5회 세척하고, 그 다음 200 μl 의 PBS로 2회 세척하였다. 100 μl /웰의 1:700 희석 바이오틴-접합 닭 항-인간 C4c (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden)를 2.0 mg/ml 보빈 혈청 알부민(BSA)을 함유한 PBS에 첨가하고, 온건 혼합하면서 실온에서 1시간 배양하였다. 각 웰을 200 μl PBS로 5회 세척하였다. 100 μl /웰의 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 과산화효소-접합 스트렙타비딘(Pierce Chemical #21126)을 2.0 mg/ml BSA 함유 PBS에 첨가하였으며 진탕기에서 온건 혼합하면서 실온에서 1시간 배양하였다. 각 웰을 200 μl 의 PBS로 5회 세척하였다. 100 μl /웰의 과산화효소 기질 TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)를 첨가하고, 실온에서 16분간 배양하였다. 과산화효소 반응은 100 μl /웰의 1.0 M H_3PO_4 를 첨가함으로써 중단시켰으며 OD_{450} 를 측정하였다.

[0656]

3. '천연' 레트 MASP-2에 대한 항-레트 MASP-2 Fab2의 결합 측정법

[0657]

배경: MASP-2는 일반적으로 특이적 레틴 분자(만노스-결합 단백질(MBL) 및 피콜린)를 포함하는 MASP-2 이량체 복합체로서 혈장내에 존재한다. 따라서, 항-MASP-2 Fab2과 생리학적 유전형인 MASP-2의 결합을 연구하는 경우, 정제된 제조항 MASP-2보다는 Fab2와 혈장내의 '천연' MASP-2의 상호작용이 사용되는 결합 측정법을 발전시키는 것이 중요하다. 이 결합 측정법에서, 10% 레트 혈청의 '천연' MASP-2-MBL 복합체는 우선 만난-피복 웰상에 고정된다. 고정된 '천연' MASP-2에 대한 다양한 항-MASP-2 Fab2s 결합 친화도를 표준 ELISA 법을 사용하여 연구하였다.

[0658]

방법: 96-웰 코스타 고결합 플레이트를 1 $\mu\text{g}/50\ \mu\text{l}$ /웰에서 50 mM 카보네이트 완충액으로 희석된 만난(pH 9.5)으로 5°C로 밤샘 배양하였다. 각 웰을 200 μl PBS로 3회 세척하였다. 웰을 100 μl /웰의 0.5% 비지방 건조유의 PBST(PBS, 0.05% Tween 20) 용액으로 차단시켰으며, 온건 혼합하면서 실온에서 1시간 배양하였다. 각 웰을 200 μl 의 TBS/Tween/ Ca^{++} 세척 완충액(Tris-완충 식염수, 0.05% Tween 20, 5.0 mM CaCl_2 함유, pH 7.4)으로 3회 세척하였다. 10% 레트 혈청의 고염 결합 완충액 용액(20 mM Tris, 1.0 M NaCl, 10 mM CaCl_2 , 0.05% Triton-X100, 0.1% (w/v) 보빈 혈청 알부민, pH 7.4)를 얼음에서 제조하였다. 100 μl /웰을 첨가하고, 5°C에서 밤샘 배양하였다. 웰을 200 μl 의 TBS/Tween/ Ca^{++} 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 웰을 그 다음 200 μl PBS로 2회 세척하였다. Ca^{++} 및 Mg^{++} 함유 GVB 완충액 (4.0 mM 바르비탈, 141 mM NaCl, 1.0 mM MgCl_2 , 2.0 mM CaCl_2 , 0.1% 젤라틴, pH 7.4)으로 희석된 100 μl /웰의 선택된 농도의 항-MASP-2 Fab2를 첨가하였으며, 온건 혼합하면서 실온에서 1 시간 배양하였다. 각 웰을 200 μl PBS로 5회 세척하였다. 1:5000로 희석된 100 μl /웰의 HRP-접합 염소 항-Fab2(Biogeneis Cat No 0500-0099)의 2.0 mg/ml 보빈 혈청 알부민 PBS 용액을 첨가하였으며 온건 혼합하면서 실온에서 1시간 배양하였다. 각 웰을 200 μl PBS로 5회 세척하였다. 100 μl /웰의 과산화효소 기질 TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)를 첨가하였으며, 실온에서 70분간 배양하였다. 과산화효소 반응 100 μl /웰의 1.0 M H_3PO_4 를 첨가함으로써 중단시키고 및 OD_{450} 를 측정하였다.

[0659]

결과:

[0660]

고친화도로 레트 MASP-2 단백질과 반응하는 약 250 개의 다른 Fab2를 ELISA 선별로 선택하였다. 이러한 고친화도 Fab2s는 다른 항체의 유일성을 결정하기 위하여 서열화되었으며, 50개의 유일한 항-MASP-2 항체가 정제되어 추가의 분석을 하였다. 250 μg 의 각 정제된 Fab2 항체를 MASP-2 결합 친화도 특성화 및 보체 경로 기능성 시험에 사용하였다. 이 분석 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6

[0661]

표 6: 렉틴 경로 보체 활성화를 차단하는 항-MASP-2 Fab2			
Fab2 항체#	C3 전환효소 (IC ₅₀ (nM))	K _d	C5 전환효소 (IC ₅₀ (nM))
88	0.32	4.1	ND
41	0.35	0.30	0.81
11	0.46	0.86	<2nM
86	0.53	1.4	ND
81	0.54	2.0	ND
66	0.92	4.5	ND
57	0.95	3.6	<2nM
40	1.1	7.2	0.68
58	1.3	2.6	ND
60	1.6	3.1	ND
52	1.6	5.8	<2nM
63	2.0	6.6	ND
49	2.8	8.5	<2nM
89	3.0	2.5	ND
71	3.0	10.5	ND
87	6.0	2.5	ND
67	10.0	7.7	ND

[0662]

상기 표 6에 나타난 바와 같이, 50개의 항-MASP-2 Fab2가 시험되었으며, 17개의 Fab2s가 10 nM Fab2s와 동등 또는 그 이하의 IC₅₀값으로 C3 전환효소 형성을 잠재적으로 억제하는 MASP-2 차단 Fab2로 확인되었다(34%의 양성 히트율). 확인된 17개중 8개의 Fab2s가 나노몰 이하의 범위의 IC₅₀값을 갖는다. 추가적으로, 모든 17개의 MASP-2 차단 Fab2s(표 6)는 필수적으로 렉틴 경로 C3 전환효소 측정법내의 C3 전환효소 형성의 완전한 억제를 보여준다. 도 11A는 Fab2 항체 #11의 C3 전환효소 형성 측정 결과를 도시하며, 이는 시험된 다른 Fab2 항체의 대표적인 것이고, 그 결과는 표 6에 나타내었다. 이는 각 MASP-2 분자가 Fab2에 결합되는 경우, 이론적으로 "차단" Fab2가 부분적으로 MASP-2 기능을 억제할 수 있기 때문에 중요한 고려사항이 된다.

[0663]

만난이 렉틴 경로의 공지의 활성제라하더라도, 이론적으로는 레트 혈청내의 항-만난 항체의 존재가 고전적 경로를 활성화시키고 고전적 경로 C3 전환효소를 통하여 C3b를 생성하는 것을 가능하게할 수 있다. 그러나, 이 실시예에서 열거된 17개 각각의 차단 항-MASP-2 Fab2s는 C3b 생성(>95 %)를 잠재적으로 억제되며, 따라서 렉틴 경로 C3 전환효소에 대한 이 측정법의 특이성을 입증한다.

[0664]

결합 측정법은 각각의 명백한 K_d를 계산하기 위하여 모든 17개의 차단 Fab2s로 수행하였다. 6개의 차단 Fab2에 대한 항-레트 MASP-2 Fab2와 천연 레트 MASP-2의 결합 측정법의 결과를 표 6에 나타내었다. 도 11B는 Fab2 항체 #11의 결합 측정법의 결과를 도시한다. 유사한 결합 측정법은 다른 Fab2로 수행되었으며, 결과를 표 6에 나타내었다. 일반적으로, 각각의 6개의 Fab2와 '천연' MASP-2의 결합으로 획득한 명백한 K_d는 C3 전환효소 기능성 측정법 내에서 Fab2에 대한 IC₅₀값과 대체로 일치한다. MASP-2가 프로테아제 활성의 활성화에 대하여 '불활성'에서 '활성'로의 입체구조적 변화를 겪는다는 증거가 있다(Feinberg et al, EMBO J 22:2348-59 (2003); Gal et al, J. Biol. Chem. 280:33435-44 (2005)). C3 전환효소 형성 측정법에 사용된 정상 레트 혈장에 있어서, MASP-2는 '불활성' 효소원 입체구조 내에서 1차적으로 나타난다. 이에 반하여, 결합 측정법에서, MASP-2는 고정된 만난에 결합된 MBL을 보유한 복합체의 일부로서 존재한다; 따라서, MASP-2는 '활성' 입체구조 내에 있다(Petersen et al., J. Immunol Methods 257:107-16, 2001). 결과적으로, 이러한 두 기능성 측정법에서 시험된 각각 17개의 차단 Fab2에 대한 IC₅₀과 K_d 사이의 정확한 일치를 필수적으로 기대할 필요는 없다. 이는 각 측정법에서 Fab2는 서로 다른 입체구조의 MASP-2와 결합하기 때문이다. 그럼에도 불구하고, Fab2 #88는 예외로 하고, 두 측정법에서 시험된 다른 각각의 16개의 Fab2는 IC₅₀ 및 명백한 K_d 사이에서 상당히 밀접한 일치를 보이는 것 같다(표 6).

[0665]

수개의 차단 Fab2가 C4의 MASP-2 매개 분열 억제에 대하여 평가되었다. 도 11C는 C4 분열 측정법의 결과를 도시

하며, Fab2 #41에 의한 억제를 나타내고, $IC_{50}=0.81 \text{ nM}$ 였다(표 6). 도 12에 나타난 바와 같이, 시험된 모든 Fab2가 C3 전환효소 측정법에서 얻은 것과 유사한 IC_{50} 으로 C4 분열을 억제하는 것으로 나타난다(표 6).

[0666] 만난이 렉틴 경로의 공지의 활성제라하더라도, 이론적으로는 렉틴 혈청내의 항-만난 항체의 존재가 고전적 경로를 활성화시키고 C4의 C1s-매개 분열에 의하여 C4b를 생성하는 것을 가능하게할 수 있다. 그러나, 수개의 항-MASP-2 Fab2는 C4b 생성(>95 %)를 잠재적으로 억제하는 것으로 확인되었으며, 따라서 MASP-2 매개 C4 분열에 대한 이 측정법의 특이성을 입증한다. C4는 C3와 유사하게 이의 구조의 일부로서 특이적이며 고도의 반응성 티오에스테르기를 함유한다. 이 측정법에서 MASP-2에 의한 C4 분열에 있어서, C4b상의 티오에스테르기는 에스테르 또는 아마이드 결합을 통하여 플라스틱 웰의 바닥에 고정된 마크로분자상에서 히드록실 또는 아미노기와 공유 결합을 형성할 수 있다, 따라서 ELISA 측정법에서 C4b의 검출을 촉진하게 된다. 이러한 연구들은 C4 및 C3 전환효소 활성을 모두 기능적으로 차단하는 렉틴 MASP-2 단백질에 대한 고친화도 FAB2의 생성을 분명하게 입증하며, 따라서 렉틴 경로 활성화를 예방한다.

[0667] **실시예 25**

[0668] 이 실시예는 실시예 24에 설명한 바와 같이 생성된 수개의 차단 항-렉틴 MASP-2 Fab2 항체에 대한 에피토프 맵핑을 설명한다.

[0669] 방법:

[0670] 도 13에 나타난 바와 같이, N-말단 6X His 태그를 보유한 모든 다음의 단백질이 pED4 벡터를 사용하여 CHO 세포 내에서 발현되었다:

[0671] 알려진 활성 중심에서 세린의 변화에 의하여 불활성화된 렉틴 MASP-2A, 전장 MASP-2 단백질(S613A);

[0672] 자가활성화를 감소시키도록 변경된 렉틴 MASP-2K, 전장 MASP-2 단백질 (R424K);

[0673] CUBI, EGF-유사 및 CUBI-II 도메인 만을 함유하는 CUBI-II, 렉틴 MASP-2의 N-말단 절편; 및

[0674] CUBI 및 EGF-유사 도메인 만을 함유하는 CUBI/EGF-유사, 렉틴 MASP-2의 N-말단 절편.

[0675] 이러한 단백질은 전술한 바와 같이 니켈-친화도 크로마토그래피에 의하여 배양 상청액으로부터 정제된다(Chen et al., J. Biol. Chem. 276:25894-02 (2001)).

[0676] CCP-II 및 렉틴 MASP-2의 세린 프로테아제 도메인을 함유하는 C-말단 폴리펩타이드(CCP-II-SP)가 pTrxFus(Invitrogen)를 사용하여 티오레독신 융합 단백질로서 이. 콜리(E. coli)에서 발현되었다. 단백질은 티오벤드 친화도 수지를 사용하여 세포 용해질에서 정제되었다. 티오레독신 융합 파트너는 음성 대조구로서 빈 pTrxFus에서 발현되었다.

[0677] 모든 재조합 단백질은 TBS 완충액 내로 투석되었으며 및 이들의 농도는 280 nm의 OD를 측정함으로써 결정되었다.

[0678] **도트 블롯 분석:**

[0679] 전술한 5개의 재조합 MASP-2 폴리펩타이드(도 13) (및 CCP-II-세린 프로테아제 폴리펩타이드에 대한 음성 대조구로서 티오레독신 폴리펩타이드)의 연속 희석으로 니트로셀룰로스 막에 점을 찍었다. 점적은 단백질의 양은 5배 단계에서 100 ng 내지 6.4 pg의 범위였다. 후의 실험에서, 점적은 단백질의 양은 다시 5배 단계에서 50 ng 내지 16 pg의 범위였다. 막을 5% 탈지분유 파우더의 TBS 용액(차단 완충액)으로 차단하였으며, 그 다음 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 항-MASP-2 Fab2s의 차단 완충액 (5.0 mM Ca^{2+} 함유) 용액으로 배양하였다. 결합된 Fab2는 HRP-접합 항-인간 Fab (AbD/Serotec; 1/10,000 희석) 및 ECL 검출 키트(Amersham)를 사용하여 검출하였다.

[0680] 하나의 막을 양성 대조구로서 다클론 레빗-항 인간 MASP-2 Ab와 함께 배양하였다 (Stover et al., J Immunol 163:6848-59 (1999)). 이 경우, 결합된 Ab는 HRP-접합 염소 항-레빗 IgG (Dako; 1/2,000 희석)을 사용하여 검출하였다.

[0681] MASP-2 결합 측정법

[0682] ELISA 플레이트는 1.0 μg /웰의 재조합 MASP-2A 또는 CUBI-II 폴리펩타이드의 카보네이트 완충액(pH 9.0) 용액으로 4°C에서 밤샘하여 피복되었다. 웰은 1% BSA의 TBS 용액으로 차단되었으며, 항-MASP-2 Fab2의 연속 희석물을 5.0 mM Ca^{2+} 함유 TBS에 첨가한다. 플레이트를 실온에서 1시간 배양하였다. TBS/tween/ Ca^{2+} 로 3회 세척 후,

1/10,000로 희석된 HRP-접합 항-인간 Fab (AbD/Serotec)의 TBS/Ca2+용액을 첨가하였으며, 플레이트를 추가적으로 실온에서 1시간 배양하였다. 결합된 항체는 TMB 과산화효소 기질 키트(Biorad)를 사용하여 검출되었다.

결과:

Fab2와 다양한 MASP-2 폴리펩타이드의 반응을 입증하는 도트 블롯 분석의 결과는 아래 표 7에 나타내었다. 표 7의 수치값은 신호강도의 절반값을 나타내는데 필요한 점적한 단백질의 양을 나타낸다. 나타낸 바와 같이, 모든 폴리펩타이드(티오레독신 용합 파트너만의 예로로서)는 양성 대조구 Ab에 의하여 인식되었다(다클론 항-인간 MASP-2 혈청, 레빗 내에서 린스).

표 7

표 7: 도트 블롯상의 다양한 재조합 레트 MASP-2 폴리펩타이드의 반응					
Fab 항체#	ASP-2A	CUBI-II	CUB/EGF-like	CCPII-SP	티오레독신
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
양성 대조구	<0.032 ng	0.16 ng	0.16 ng	<0.032 ng	NR

NR = 반응 없음. 양성 대조구 항체는 다클론 항-인간 MASP-2 혈청이며, 레빗 내에서 린스됨.

모든 Fab2가 ASP-2A 및 ASP-2K와 반응하였다(데이터 미도시). 대다수의 Fab2가 CCPII-SP 폴리펩타이드를 인식하였으나 N-말단 절편은 인식하지 못하였다. 두 예외는 Fab2 #60 및 Fab2 #57였다. Fab2 #60은 ASP-2A와 CUBI-II 절편을 인식하였으나, CUBI/EGF-유사 폴리펩타이드 또는 CCPII-SP 폴리펩타이드를 인식하지 못하였고, 이는 이것이 CUBI 내의 에피토프, 또는 스페닝 CUBI 및 EGF-유사 도메인에 결합한다는 것을 나타낸다. Fab2 #57는 ASP-2A를 인식하나 시험된 모든 ASP-2 절편을 인식하지 못하며, 이는 아마도 이 Fab2가 CCP1내의 에피토프를 인식하는 것을 나타낸다. Fab2 #40 및 #49는 완전한 ASP-2A에만 결합한다. ELISA 결합 측정법에서(도 14), Fab2 #60는 또한 명백한 낮은 친화도를 보임에도 CUBI-II 폴리펩타이드에 결합하였다.

이러한 발견은 ASP-2 단백질의 다중 영역에 대한 유일한 차단 Fab2의 확인을 입증한다.

실시예 26

이 실시예는 무린 신장 허혈/재관류 모델에서 ASP-2-/- 마우스의 분석을 설명한다.

배경/이론적 근거: 체온에서의 신장의 허혈-재관류(I/R) 손상은 다수의 임상적 증상, 예컨대 순환혈액량 감소성 쇼크, 신장 동맥 폐색 및 교차-검자 수술에 관련된 것이다.

신장 허혈-재관류(VR)는 사망율이 50%에 이르는 급성 신장 기능 상실의 중요한 원인이다(Levy et al., JAMA 275:1489-94, 1996; Thadhani et al, N. Engl. J. Med. 334: 1448-60, 1996). 이식 후 신장 기능 상실은 신장이식 후의 일반적이며 위협적인 합병증이다(Nicholson et al., Kidney Int. 58:2585-91, 2000). 신장 VR 손상의 효과적인 치료는 현재 없으며, 혈액투석이 가능한 유일한 치료이다. 신장 VR 손상의 병태생리학에 관련되어 있다. 최근 연구들은 보체 활성화의 렉틴 경로가 신장 VR 손상의 발병기전에 중요한 역할을 한다는 것을 알아내었다 (deVries et al., Am. J. Path. 765:1677-88, 2004).

방법:

ASP-2(-/-) 마우스는 실시예 1에 설명된 바와 같이 생성되었으며 최소한 10마리의 생성을 위하여 C57B1/6과 역

교배하였다. 22-25g의 6마리의 수컷 MASP-2(-/-) 및 6마리의 야생형(+/+) 마우스에 히노벨(Hypnovel, 6.64 mg/kg; Roche products Ltd, Welwyn Garden City, UK)의 복막내 주사로 투여하였으며, 후속적으로 이소플루란(Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK)을 흡입시켜 마취시켰다. 이소플루란은 최소한의 간독성을 지닌 흡입 마취제이기 때문에 선택되었다; 농축물을 정확하게 생산하였으며, 동물은 연장된 마취 후에도 신속하게 회복하였다. 히노벨은 동물내에서 신경이완진통 증상을 생성하기 때문에 투여되었으며, 이는 소량의 이소플루란이 투여된다는 것을 의미한다. 일정한 체온을 유지하기 위하여 동물 밑에 워 패드들을 깔았다. 그 다음, 중앙 복부 절개를 수행하고, 리트랙터를 사용하여 체강을 열어놓았다. 연결 조직을 신장 정맥 위 아래에서 제거하였으며, 좌우 신장 동맥, 및 신장 뿌리를 미세동맥류 클램프로 55분간 클램프했다. 이 기간의 허혈은 이 연구소의 이전 연구에 기초한다 (Zhou et al, J. Clin. Invest. 105:1363-71 (2000)). 이와 함께, 표준 허혈 시간 55분은 허혈 적정후 선택되었으며, 55 분이 5% 이하의 낮은 사망율을 지닌 가역적인 일정한 손상을 준다는 것을 알아내었다. 폐색 후, 0.4 ml의 따뜻한 식염수(37℃)를 복부를 허혈 시간 동안 덮어두었다. 미세동맥류 클램프를 제거한 후, 신장은 신장의 혈액 재흐름, 색변화가 관찰되었다. 추가의 0.4 ml의 따뜻한 식염수를 복강에 두고, 개복부를 봉합하였으며, 동물을 우리로 돌려보냈다. 꼬리 혈액 시료를 클램프 제거후 24 시간에 채취하였으며, 48 시간에 마우스를 희생시켰고, 추가의 혈액 시료를 수거하였다.

[0694] 신장 손상의 평가: 신장 기능은 6마리의 수컷 MASP-2(-/-) 및 6마리의 WT(+/+) 마우스내의 재관류 후 24 및 48 시간에서 평가되었다. 혈액 크레아틴 측정은 질량 분석기에 의하여 측정되었으며, 이는 신장 기능의 재생 지표를 제공한다(민감도 < 1.0 μmol/L). 도 15는 야생형 C57B1/6 대조구 및 MASP-2 (-/-)의 재관류 후 24 시간 및 48 시간에서의 혈액 요소 질소 제거를 도시한다. 도 15에 나타난 바와 같이, MASP-2(-/-) 마우스는 야생형 대조구 마우스에 비하여 24 및 48 시간에서 혈액 요소의 양의 현저한 감소를 나타내며, 이는 허혈 재관류 손상 모델 내의 신장 손상에 대한 보호적인 기능 효과를 의미한다.

[0695] 전체적으로, 증가된 혈액 요소는 외과적 수술 및 허혈 손상 후 24 및 48 시간에서 WT(+/+) 및 MASP-2(-/-) 마우스 모두에서 나타난다. 비-허혈 WT(+/+) 수술 동물 내의 혈액 요소 수준은 5.8 mmol/L로 별도로 결정하였다. 도 15에 나타난 데이터와 함께, 하나의 MASP-2(-/-) 동물은 각각 24 및 48 시간에서 6.8 및 9.6 mmol/L의 값을 나타내어 허혈 손상의 거의 완전한 보호를 나타낸다. 이 동물은 잠재적인 예외자로서 군 분석에서 배제되었으며, 여기서는 허혈 손상이 나타나지 않았다. 따라서, 도 15의 최종 분석에는 5마리의 MASP-2(-/-) 마우스 및 6마리의 WT (+/+) 마우스가 포함되며, MASP-2 (-/-) 마우스는 24 및 48 시간에서 혈액 요소의 통계학적으로 현저한 감소를 보인다(스튜던트 t-테스트 $p < 0.05$). 이러한 발견은 MASP-2 활성의 억제가 허혈 손상에 기한 신장 손상의 보호적인 또는 치료 효과를 갖는 것으로 기대된다는 것을 의미한다.

[0696] **실시예 27**

[0697] 이 실시예는 마우스 심근 허혈/재관류 모델 내의 MASP-2(-/-) 마우스의 분석을 설명한다.

[0698] **배경/이론적 근거:**

[0699] 만노스-결합 렉틴(MBL)은 넓은 범위의 탄수화물 구조에 대하여 반응하는 면역 복합체-비의존성 방법 내의 보체 활성화를 개시하는 순환 분자이다. 이러한 구조는 감염체의 성분이 될 수 있으며 또는 특히 괴사, 발암성 또는 세포자멸성 세포 내의 내재 탄수화물 모이어티를 변경시킨다. 이러한 형태의 세포사는 재관류된 심근에서 발병하며, 보체 활성화는 허혈이 재관류에 의하여 종결되는 시점에 존재하는 영역 이전의 손상에 확장되는 것 같다. 보체 활성화가 심근 재관류를 악화시킨다는 명백한 증거가 있으나, 이러한 활성화 기작은 잘 알려져 있지 않으며, 모든 공지의 경로의 억제가 참기어려운 역효과를 갖는 것으로 보인다. 최근 연구는 고전적 경로 또는 대체 증폭 루프 보다는 MBL이 관여한다는 것을 나타낸다(본 발명의 정의에 따른다). 이는 경색이 MBL(A/C)-에서는 감소하였으나, C1q-, 무효과 마우스에서는 아니기 때문이다(Walsh M.C. et al, Jour of Immunol. 775:541-546 (2005)). 그러나, 이러한 마우스는 여전히 렉틴 경로를 통하여 보체를 활성화시킬 수 있는 순환 성분, 예컨대 피콜린 A를 보유한다.

[0700] 이 연구는 MASP-2(-/-)가 심근 허혈 및 재관류 손상에 덜 민감한지 여부를 결정하기 위하여 MASP-2(-/-) 마우스 대 야생형(+/+) 대조구를 조사하였다. MASP-2(-/-) 마우스에 국부적 허혈을 가하고, 경색 크기를 이들의 야생형 한배 자손과 비교하였다.

[0701] 방법: 다음의 프로토콜은 전술한 문헌 Marber et al., J. CHn Invest. 95:1446-1456 (1995)에서 설명한 바와 같이 허혈/재관류 손상을 유도하는 과정에 기초한다.

[0702] MASP-2(-/-) 마우스는 실시예 1에 설명된 바와 같이 생성되었으며, 최소한 10마리의 생성을 위하여 C57B1/6와

역교배하였다. 7마리의 MASP-2(-/-) 마우스 및 7마리의 야생형(+/+) 마우스를 케타민/메토프로판(각각 100 mg/kg 및 0.2 mg/kg)으로 마취시켰으며, 직장 온도를 $37 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 로 유지하기 위하여 자동 온도조절 온열 패드에 바로눴다. 마우스를 직접 관찰하기 위하여 삽관하였으며, 호흡률 110/min 및 일회호흡량 $225\mu\text{l}/\text{min}$ (인공호흡기-Hugo Sachs Elektronik MiniVent Type 845, Germany)로 실기를 호흡시켰다.

[0703]

모피를 면도하고, 전외측 피부 절개를 좌측 겨드랑이에서 검상돌기까지 하였다. 대흉근을 절개하고, 흉골 경계까지 절제하였으며 겨드랑이 고랑까지 이동시켰다. 소흉근을 이들의 두개 경계까지 절제하고 꼬리까지 이동시켰다. 근육은 후에 심장동맥 폐색시 근육 플랩으로 사용하였다. 5번 늑간 공간의 근육 및 벽측흉막을 좌측 폐의 경계에 약간 중앙부에서 트위저로 관통하였으며, 따라서 폐 또는 심장 손상을 피하였다. 흉막관통 후, 트위저는 심장에 닿지않게 흉골방향으로 흉막 뒤에 조심스럽게 두었으며, 흉막 및 늑간 근육을 전동 절제기로 절제하였다(Harvard Apparatus, UK). 출혈을 막기 위하여 특별관리를 하였다. 동일한 기법을 사용하여, 개흉술을 중앙 겨드랑이 선까지 확장하였다. 4번 갈비뼈를 제거한 후, 늑간 공간을 전체 심장이 노출될 때까지 확장시켰다. 두개의 작은 동맥 겸자로 심낭막을 개방하고, 심낭막 받침을 심장 약간 앞쪽으로 이동시켰다. 좌측 전단 하행 심장동맥(LAD)을 노출시키고, 8-0 모노필라멘트 봉합사와 라운드형 바늘로 LAD 밑을 통과시켰다. LAD 절찰 부위는 좌심방의 상부의 꼬리쪽에 있으며, 약 1/4의 라인은 방실 능선에서 좌심실의 끝까지 이어진다.

[0704]

모든 실험은 맹검으로 실시하였으며, 실험자는 각 동물의 유전형질을 인식하지 못하였다. 기기조작 및 외과적 과정을 마친 후, 마우스에 15 분의 평형형성 기간을 주었다. 그 다음 마우스에게 30 분의 심장동맥 폐색과 120 분의 재관류를 하였다.

[0705]

심장동맥 폐색 및 재관류 모델

[0706]

심장동맥 폐색은 전술한 체중 달기 시스템을 사용하여 달성되었다(Eckle et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 291 :H2533-H2540, 2006). 모노필라멘트 절찰의 두 말단은 2 mm 길이의 폴리에틸렌 PE-10 튜브 조각을 통과시켰으며, 시아노아크릴레이트 아교를 사용하여 5-0 봉합 길이에 부착되었다. 봉합은 두 수평 장착 이동식 로드와 연결되며, 각 질량 1 g이 봉합 양 말단에 부착되었다. 로드를 올림에 따라, 질량추가 현수되며, 봉합 부위가 압력을 받아 정의된 LAD 및 일정한 압력을 받게된다. LAD 폐색은 위험 영역의 창백성에 의하여 입증되며, LAD 관류 영역의 색은 밝은 적색에서 자색으로 변화하고, 이는 혈류의 중단을 의미한다. 재관류는 질량추가 시술 패드에 오고 절찰부 압력이 경감될 때까지 로드를 낮추어 달성된다. 재관류는 폐색을 입증하는데 사용되는 동일한 3 기준에 의하여 입증된다. 모든 3 기준이 심장동맥 폐색의 개시 또는 각각 15분의 재관류에서 일치하지 않으면 마우스는 추가의 분석에서 배제된다. 심장동맥 폐색시, 심장 표면의 온도 및 습도는 소흉근 플랩으로 심장을 덮고, 0.9% 식염수 습식 거즈에 의한 개흉 밀봉에 의하여 유지된다.

[0707]

심근 경색 크기의 측정:

[0708]

경색 크기(INF) 및 위험 영역(AAR)은 플라노메트리(planometry)에 의하여 측정된다. 500 LU. 헤어핀의 i.v. 주사 후, LAD는 재폐색되고, 위험영역(AAR)을 보여주기 위하여 $300\mu\text{l}$ 의 5%(w/vol) 에반스 블루(Sigma-Aldrich, Poole, UK)를 목 정맥에 서서히 주입하였다. 이는 좌심실의 비-허혈 영역에 염료가 진입하는 원인이 되며, 허혈 AAR는 미염색된 채로 남게된다. 경추 탈구로 마우스를 희생시킨 후, 심장을 신속하게 제거한다. 심장을 얼음에서 냉각시키고, 5% 아گار오스의 블록에 장착하고, 그 다음 $800\mu\text{m}$ 두께의 8조각의 횡단면으로 자른다. 모든 슬라이스를 37°C 에서 20분간, 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 완충액(pH 7.4)에 용해된 3% 2,3,5-트리페닐테트라졸람 클로라이드(Sigma Aldrich, Poole, UK)로 배양하였다. 슬라이스를 10% 포름알데히드 내에서 밤샘하여 고정하였다. 슬라이스를 두 커버 슬릿 사이에 두고, 고해상도 광학 스캐너를 사용하여, 각 슬라이스의 측면을 디지털 영상화하였다. 디지털 영상을 SigmaScan 소프트웨어(SPSS, US)를 사용하여 분석하였다. 경색된 영역(창백), 좌심실(LV) 위험영역(적색) 및 정상적 관류 LV 영역(청색)의 크기가 외관 색 및 색 경계의 확인에 의하여 각 색선에서 개략되었다. 영역은 각 슬라이스의 양 측면에서 정량화되었으며, 조사자에 의하여 평균처리되었다. 경색 크기는 각 동물의 위험 영역의 %로 계산되었다.

[0709]

결과: 경색된 영역(창백), LV 위험영역(적색) 및 정상 관류 LV 영역(청색)의 크기가 외관 색 및 색 경계의 확인에 의하여 각 색선에서 개략되었다. 영역은 각 슬라이스의 양 측면에서 정량화되었으며, 조사자에 의하여 평균처리되었다. 경색 크기는 각 동물의 위험 영역의 %로 계산되었다. 도 16A는 전술한 심장동맥 폐색 및 재관류 기법을 시술한 후 이들의 경색 크기를 결정하기 위한 7마리의 WT(+/+) 마우스 및 7마리의 MASP-2(-/-) 마우스의 평가를 나타낸다. 도 16A에 나타난 바와 같이, MASP-2(-/-) 마우스는 야생형(+/+) 마우스에 비하여 경색 크기에 있어서 통계학적으로 현저한 감소($p<0.05$)를 나타내며, 이는 허혈 재관류 손상 모델에 대한 보호적인 심근 효과를 의미한다. 도 16B는 시험된 개별 동물의 분포를 나타내며, 이는 MASP-2 (-/-) 마우스의 명백한 보호 효과를

나타낸다.

[0710] 실시예 28

[0711] 이 실시예에는 무린 황반 변성 모델에서의 MASP-2-/-의 결과를 설명한다.

[0712] **배경/이론적 근거:** 연령-관련 황반 변성(AMD)는 산업화 사회의 55세 이후 시각상실의 주 원인이다. AMD는 두개의 주요한 형태로 발생한다: 신생혈관(습윤) AMD 및 위축성(건조) AMD이다. 신생혈관(습윤)형은 ~20%의 AMD 환자만이 습윤형임에도 AMD에 관련된 90%의 심각한 시력 상실의 원인이다. AMD의 임상적 홀마크는 다중 드루젠, 지도형 위축, 및 콜로이드성 신생혈관형성(CNV)을 포함한다. 2004년 12월, FDA는 마쿠젠(Macugen, pegaptani b)을 습윤(신생혈관)형 AMD의 치료를 위하여 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 효과에 특이적으로 표적화하고, 차단하는 새로운 클래스의 안과적 약물로서 승인하였다(Ng et al., Nat Rev. Drug Discov 5:123-32 (2006)). 마쿠젠이 AMD 환자의 아군에 전도유망한 치료효과를 나타냄에도, 이 복합체 질환의 추가의 치료를 개발하기 위한 시도가 존재한다. 다중, 비의존성계의 연구는 AMD 발병기전 내의 보체 활성화의 중추적 역할에 관한 것이다. 가장 심각한 형태의 AMD인 콜로이드성 신생혈관형성(CNV)의 발병기전은 보체 경로의 활성화에 관한 것이다.

[0713] 25년 전, Ryan은 동물내의 CNV의 레이저-유도 손상 모델을 설명하였다(Ryan, S.J., Tr. Am. Ophth. Soc. LXXVII-J01 -145, 1979). 이 모델은 초기에 리저스 원숭이를 사용하여 발전되었으나, 동일한 기술이 다양한 연구 동물, 예컨대 마우스의 유사한 CNV 모델을 개발하는데 사용되고 있다(Tobe et al., Am. J. Pathol. 753:1641-46, 1998). 이 모델에서, 레이저 광응고가 CNV-유사 막의 형성이 되는 브런치 막의 파열에 사용되었다. 레이저-유도 모델은 다수의 중요한 인간 증상의 특징을 잡아내었다 (Ambati et al., Survey Ophthalmology 48:257-293, 2003). 레이저-유도 마우스 모델은 현재 잘 확립된 바, 대형 연구 프로젝트의 실험 베이스로 사용된다. 일반적으로 레이저-유도 모델은 인간 CNV와 충분한 생물학적 유사성을 공유하는 것으로 인식되며, 이 모델을 사용하는 발병기전의 전임상적 연구들 및 약물 억제는 인간 내의 CNV에 관련되어 있다.

[0714] **방법:**

[0715] A MASP-2-/- 마우스는 실시예 1에 설명된 바와 같이 생성되었으며, 10마리의 생성을 위하여 C57B1/6와 역교배되었다. 현재의 연구는 MASP-2 (-/-) 및 MASP-2 (+/+) 수컷 마우스가 레이저-유도성 CNV의 경과 내에서 평가되는 경우, 결과를 비교하였으며, 레이저 손상 후 ELISA에 의한 망막 색소 상피(RPE)/맥락막내의 조직 손상 및 VEGF 수준의 결정, CNV에 관련된 잠재적 혈관형성 인자의 측정으로서 레이저 공초점 현미경 스캐닝에 의하여 레이저-유도성 CNV의 부위에 집중된 신생혈관 AMD 모델을 가속화하였다.

[0716] **콜로이드성 신생혈관형성(CNV)의 유도:** 약물군 정렬로 표시된 단일 개체에 의하여 실험 0일에 각 동물의 양쪽 눈에 레이저 광응고(532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 μ m; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA)를 수행하였다. 스플릿 램프 전달 시스템 및 콘택트 렌즈로서 커버슬립을 사용하여 레이저 스폿을 시신경 주위에 표준화된 방법으로 가하였다. 레이저 손상의 형태학적 증점은 거품공동화의 외관이었으며, 이 징후는 브루쉬 막의 파괴에 관련된 것으로 보인다. 상세한 방법 및 평가된 종말점은 다음과 같다.

[0717] **형광안저조영술:** 형광안저조영술은 레이저 광응고 일주일 후 카메라 및 영상화 시스템 (TRC 50 IA 카메라; ImageNet 2.01 System; Topcon, Paramus, NJ)로 수행되었다. 사진은 0.1 ml의 2.5% 형광 나트륨의 복막내 주사 후 기저 카메라 렌즈에 접촉된 20-D 렌즈로 캡취되었다. 망막 전문가는 표시된 방법내의 단일 세팅에서 형광안저조영사진을 평가한 레이저 광응고 또는 혈관조영술에 관여하지 않았다.

[0718] **콜로이드성 신생혈관형성(CNV)의 부피:** 레이저 손상 일주일 후, 눈을 제핵하고 4% 파라포름알데히드로 30 분간 4 $^{\circ}$ C에서 고정하였다. 세안컵은 앞쪽 부분을 제거하여 얻었으며, PBS로 3회 세척하였으며, 메탄올 시리즈를 통하여 탈수 및 재수화를 하였다. 완충액(PBS, 1% 보빈 혈청알부민 및 0.5% Triton X-100 함유)으로 30 분간 실온에서 2회 차단 후, 세안컵을 내피 세포의 표면상의 말단 β -D-갈락토오스 잔기에 결합하고 및 무린 혈관계를 선택적으로 표지하는 0.2% BSA 및 0.1% Triton X-100을 함유한 PBS로 희석된 0.5% FITC-이소렉틴 B4 (Vector laboratories, Burlingame, CA)으로 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 0.1% Triton X-100 함유 PBS로 2회 세척 후, 신경감각 망막을 서서히 탈거하고 안신경으로부터 제거하였다. 4회의 릴렉싱 라디칼 절개를 하였으며, 및 잔존 RPE-맥락막-공막 복합체를 안티페이드 배지(Immu-Mount Vectashield Mounting Medium; Vector Laboratories)에 안착시키고 커버를 덮었다.

[0719] 안착된 것들을 스캐닝 레이저 공초점 현미경(TCS SP; Leica, Heidelberg, Germany)으로 조사하였다. 혈관은 블루 아르곤 파장(488 nm)으로 여기시켜 가시화하였으며, 515와 545 nm 사이의 방출을 캡취하였다. 40X 오일-침지 오브젝트가 영상화 연구들에 사용되었다. 수평 광학 섹션(1 μ m 단계)는 RPE-맥락막-공막 복합체의 표면에서 획득

특하였다. 병변에 연결된 주변 콜로이드성 혈관 네트워크를 확인할 수 있는 최심도 초점 평면은 병변의 바닥으로 결정되었다. 레이저-표적화 영역내의 모든 혈관 및 이 참조 평면의 외관은 CNV로 결정되었다. 각 섹션의 영상은 디지털로 저장되었다. CNV-유관 형광 영역은 현미경 소프트웨어(TCS SP; Leica)으로 컴퓨터 영상 분석하여 측정하였다. 각 수평 섹션 내의 형광 영역의 총합은 CNV 부피의 지표로서 사용되었다. 영상화는 치료군으로 지정한 작업자에 의하여 수행되었다.

[0720] 레이저 병변 발달 CNV의 가능성이 그들이 보유한 군에의하여 영향을 받기 때문에(마우스, 눈, 및 레이저 스폿), 평균 병변 부피는 분할 플롯 반복-측정 설계의 선형 혼합 모델을 사용하여 비교되었다. 전체 플롯 인자는 동물이 가진 유전군이며, 여기서 분할 플롯 인자는 눈이다. 통계학적 중요성은 0.05 수준에서 결정되었다. Post hoc 비교 평균은 다중 비교를 위한 본페로니(Bonferroni) 조정으로 구축된다.

[0721] **VEGF ELISA.** 12 레이저 스폿에 의한 손상 3일 후, RPE-맥락막 복합체를 용해 완충액(20 mM 이미다졸 HCl, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM Na 몰리브데이트, 및 1 mM EDTA, 프로테아제 억제제)내에서 얼음상에서 15분간 조음과파쇄하였다. 상청액내의 VEGF 단백질 수준은 모든 스플라이스 변이체를 인식하는 ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN)로 450 내지 570 nm (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 측정되었으며, 총 단백질에 대하여 정상화되었다. 2벌 측정을 광응고, 영상화, 또는 혈관조영술에 관여하지 않은 실험자가 수행하였다. VEGF 수는 평균 $\pm$ SEM의 최소한 3회의 비의존성 실험으로 나타내며, 만-윌트니 U 시험을 사용하여 비교하였다. 무효과 가설은 $P < 0.05$ 에서 거부되었다.

[0722] **결과:**

[0723] **VEGF 수준의 평가:**

[0724] 도 17A는 실험 0일에 C57B16 야생형 및 MASP-2(-/-) 마우스에서 분리된 RPE-맥락막 복합체 내의 VEGF 단백질 수준을 도시한다. 도 17A에 나타난 바와 같이, VEGF 수준의 평가는 C57b1 야생형 대조군 마우스에 비하여 MASP-2(-/-) 마우스내의 VEGF의 기저 수준이 감소함을 나타낸다. 도 17B는 레이저 유도 손상 3일 후 측정된 VEGF 단백질 수준을 도시한다. 도 17B에 나타난 바와 같이, VEGF 수준은 레이저 유도 손상 후 3일에 야생형(+/+) 마우스 내에서 현저히 증가하며, 이는 출간된 연구들과 일치한다(Nozaki et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:2328-33 (2006)). 그러나, MASP-2 (-/-) 마우스 내에서 현저히 낮은 수준의 VEGF를 나타낸다.

[0725] **콜로이드성 신생혈관형성(CNV)의 평가:**

[0726] 레이저 유도성 황반 변성 후 VEGF 수준 감소와 함께, CNV 영역이 레이저 손상 전 후에 결정되었다. 도 18은 레이저 유도 손상 7일 후 C57b1 야생형 마우스 및 MASP-2(-/-) 마우스에서 측정된 CNV 부피를 도시한다. 도 18에 나타난 바와 같이, MASP-2(-/-) 마우스는 야생형 대조군 마우스에 비하여 레이저 유도성 손상 7일 후 CNV 영역의 약 30% 감소를 나타내었다. 이러한 발견은 야생형(+/+) 대조군에 비하여 MASP (-/-) 마우스 내에서 VEGF 및 CNV의 감소가 나타났음을 의미하며, 억제제에 의한 MASP-2 차단이 황반 변성 치료에 있어서 예방 또는 치료 효과가 있음을 의미한다.

[0727] 실시예 29

[0728] 이 실시예는 무린 단클론 항체 유도성 류마티스 관절염 모델 내의 MASP-2(-/-)의 결과를 설명한다.

[0729] **배경/이론적 근거:** 가장 일반적으로 사용되는 류마티스 관절염(RA) 동물 모델은 콜라겐-유도성 관절염(CIA)이다(Linton and Morgan, Mol. Immunol. 36:905-14, 1999). 콜라겐 타입 II(CII)는 관절 기질 단백질의 주요 구성 성분의 하나이며, 보조제 내의 천연 CII에 의한 면역화는 관절 연골 내의 CII 교차-반응성 자가면역 반응에 의하여 자가면역 다발성관절염을 유도한다. RA에서, CIA에 대한 감수성은 특정 클래스 II MHC 상동체의 발현에 관련되어있다. C57B1/6주를 포함하는 일부 마우스주는 고전적 CIA에 내성이 있으며, 적절한 MHC 하플로타입이 결핍되기 때문이며, 따라서 고 항-CII 항체 역가를 생성하지 못한다. 그러나, 타입 II 콜라겐에 대한 4개의 특이적 단클론 항체의 각테일을 마우스에 i.v. 또는 i.p. 투여하며 모든 마우스 주에서 유도될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이러한 관절염유발 단클론 항체를 구득할 수 있다(Chondrex, Inc., Redmond, WA). 이 CIA의 수동 전이 모델은 다수의 최근 연구에서 C57B1/6 마우스 균주를 사용하였다고 보고하였다(Kagari et al., J. Immunol. 169:1459-66, 2002; Kato et al., J. Rheumatol. 30:241-55, 2003; Banda et al, J. Immunol. 177:1904-12, 2006). 후속 연구는 CIA의 수동 전이 모델을 사용한 관절염 발달에 대하여 야생형(+/+)(WT) 및 MASP-2(-/-) 마우스의 민감도를 비교하였으며, 이 둘은 C57B1/6 유전적 배경을 공유한다.

[0730] **방법:**

- [0731] 동물: A MASP-2(-/-) 마우스는 실시예 1에 설명된 바와 같이 생성되었으며 10마리의 생성을 위하여 C57B1/6와 역교배되었다. 항체 주사시 7 내지 8주령의 14마리의 수컷 및 암컷 C57BL/6 야생형 마우스 및 항체 주사시 7 내지 8주령의 10마리의 수컷 및 암컷 MASP-2(-/-) 및 야생형(+/+) C57B1/6 마우스가 이 연구에 사용되었다. 20마리의 명확한 반응체를 얻기 위하여 20마리의 마우스에 단클론 항체 콕테일이 주사되었다(10마리 두 군). 동물(10/군) 우리당 5마리로 사육하였으며 연구 개시 7일전 5마리씩 순응시켰다.
- [0732] 마우스에 단클론 항체 콕테일 (Chondrex, Redmond WA)(5 mg)을 실험 0 및 1일에 정맥 주사하였다. 시험 약제는 Chondrex사의 단클론 항체 + LPS였다. 실험 2일에, 마우스에 LPS를 ip 투약하였다. 마우스는 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12일 및 종결 전인 14일에 체중을 측정하였다. 14일에, 마우스를 이소플루란으로 마취시켰으며, 최종적으로 혈청을 방혈하였다. 혈액 수거 후, 마우스 안락사시켰으며, 앞, 뒷 다리를 무릎까지 제거하여, 추후의 과정을 위하여 포르말린에 넣었다.
- [0733] 치료군:
- [0734] 1 군(대조군): 4마리 마우스 C57/BL/6 WT(+/+)주 ;
- [0735] 2 군(시험군): 10마리 마우스 C57/BL/6 WT(+/+)주(mAb 콕테일 + LPS); 및
- [0736] 3 군(시험군): 10마리 마우스 C57/BL/MASP-2KO/6Ai(-/-)주(mAb 콕테일 + LPS)
- [0737] 임상적 관절염 스코어는 다음의 스코어 시스템으로 매일 평가되었다:
- [0738] 0 = 정상; 1= 1개의 뒤 또는 앞발 관절 영향; 2= 2개의 뒤 또는 앞발 관절 영향; 3= 3개의 뒤 또는 앞발 관절 영향; 4= 중등(홍반 및 증등의 종창, 또는 4 발가락 관절 영향); 5= 심각(확산된 홍반 및 심각한 종창의 발, 발가락 유동 불가)
- [0739] **결과:**
- [0740] 도 19는 2주까지의 평균 일일 임상적 관절염의 스코어를 도시한 군 데이터를 나타낸다. 임상적 관절염 스코어는 Col2 MoAb 치료를 받지 않은 대조군에서 관찰되지 않았다. MASP (-/-) 마우스는 9 내지 14일에 낮은 임상적 관절염 스코어를 받았다. 전체 임상적 관절염 스코어는 WT(+/+) 마우스에 비하여 MASP-2(-/-)군에서 21% 감소를 나타내는 곡선 분석(AUC)하의 영역이다. 그러나, 전술한 C57B16 마우스 배경은 강건한 전체 관절염 임상적 스코어를 제공하지 못한다. 작은 발생률 및 군의 크기에 기인하여, 양성 경향의 경우에도, 데이터는 단지 경향만을 제공하며($p = 0.1$), $p < 0.05$ 수준에서 통계학적으로 현저하지 못하였다. 치료군의 추가의 동물이 통계학적 중요성을 나타내는데 필요하다. 관절염 발생 감소에 기인하여, 발병된 발의 스코어가 중증도에 관하여 평가되었다. 3 이상의 임상적 관절염 스코어의 단일 발생은 MASP-2 (-/-)마우스 내에서 발견되지 않았으며, 30%의 WT (+/+) 마우스에서 관찰되었고, 추가의 제안은 (1) 관절염의 중증도가 보체 경로 활성화에 관련될 수 있으며 (2) MASP-2의 차단이 관절염에 이득이 될 수 있다는 것이다.
- [0741] **실시예 30**
- [0742] 이 실시예는 소형 만노스-결합 렉틴-결합 단백질(Map 19 또는 sMAP)이 MASP-2 의존성 보체 활성화의 억제제라는 사실을 입증한다.
- [0743] 배경/이론적 근거 :
- [0744] 요약:
- [0745] 만노스-결합 렉틴 (MBL) 및 피콜린은 선천성 면역성을 활성화시키는 패턴 인식 단백질이며, MBL-유관 세린 프로테아제(MASP)를 통한 렉틴 보체 경로의 활성화를 촉발시킨다. 렉틴 경로의 활성화에서, MASP-2는 C4 및 C2를 분해한다. 소형 MBL-유관 단백질(sMAP), 절단형 MASP-2는 MBL/피콜린-MASP 복합체와 결합한다. sMAP의 역할을 분명히하기 위하여, sMAP-특이적 엑손의 표적 파괴하여 sMAP-결핍 (sMAP-/-) 마우스를 생성하였다. 유전자 파괴의 의하여, sMAP-/- 마우스에서 MASP-2의 발현 수준이 감소하였다. 제조합 sMAP(rsMAP) 및 제조합 MASP-2(rMASP-2)는 결핍 혈청내에서 MBL-MASP-sMAP 복합체를 재구성하는 경우, 이러한 제조합체와 MBL의 결합은 경쟁적이며, MBL-MASP-sMAP 복합체의 C4 분열 활성이 rMASP-2의 첨가에 의하여 회복되고, 여기서 rsMAP의 첨가는 활성을 감소시킨다. 따라서, MASP-2는 C4의 활성화에 필수적이며, sMAP는 렉틴 경로의 활성화에서 조절 역할을 한다.
- [0746] 도입:

- [0747] 보체 시스템은 프로테오용해의 사슬 반응 및 단백질 복합체의 조립을 매개하며, 선천성 및 후천성 면역 시스템 모두의 일부로서 생체방어의 주요 역할을 한다. 포유류 보체 시스템은 3개의 활성화 경로, 고전적 경로, 대체 경로, 및 렉틴 경로로 구성되어 있다(Fujita, Nat. Rev. Immunol. 2: 346-353 (2002); Walport, N Engl J Med 344: 1058-1066 (2001)). 렉틴 경로는 침입 병원체에 대한 1차 방어선을 제공한다. 이 경로의 병원체 인식 성분인, 만노스-결합 렉틴(MBL) 및 피콜린은, 박테리아, 바이러스, 및 기생충의 표면상의 탄수화물 어레이에 결합하며, MBL-결합 혈청 프로테아제(MASPs)를 활성화하여 하방 반응 캐스케이드를 촉발한다. 선천성 면역 방어에 대한 렉틴 경로의 중요성은, 특히 후천적 면역 시스템이 확립되기 전 유아기에 다양한 감염성 질환에 대한 증가된 감수성을 지닌 MBL의 결핍에 관한 다수의 임상적 연구들에서 지적하였다(Jack et al., Immunol Rev 180: 86-99 (2001); Neth et al. Infect Immun 68: 688-693 (2000); Summerfield et al, Lancet 345: 886-889 (1995); Super et al., Lancet 2: 1236-1239 (1989)). 그러나, 렉틴 경로는 또한 소망하지 않는 보체 활성화에 기여하며, 이는 다수의 병리학적 증상, 예컨대 심장 및 신장의 허혈/관류 손상 내의 염증 및 조직 손상에 관여한다(de Vries et al., Am J Pathol 165: 1677-1688 (2004); Fiane et al., Circulation 108: 849-856 (2003); Jordan et al., Circulation 104: 1413-1418 (2001); Walsh et al., J Immunol 175: 541-546 (2005)).
- [0748] 전술한 바와 같이, 렉틴 경로는 MBL 및 피콜린에 의하여 탄수화물 인식에 관여하며(Fujita et al, Immunol Rev 198: 185-202 (2004); Holmskov et al, Annu Rev Immunol 21: 547-578 (2003); Matsushita and Fujita, Immunobiology 205: 490-497 (2002) 이러한 렉틴은 MASP-1(Matsushita and Fujita, J Exp Med 176: 1497-1502 (1992); Sato et al, Int Immunol 6: 665-669 (1994); Takada et al, Biochem Biophys Res Commun 196: 1003-1009 (1993), MASP-2(Thiel et al, Nature 386: 506-510 (1997), MASP-3(Dahl et al, Immunity 15: 127-135 (2001), 및 MASP-2의 절단된 단백질(소형 MBL-유관 단백질; sMAP 또는 MAP19)(Stover et al, J Immunol 162: 3481-3490 (1999); Takahashi et al, Int Immunol 11: 8590863 (1999)과 복합체를 형성한다. MASP족 구성원은 6개의 도메인으로 구성되어 있다; 두 C1r/C1s/Uegf/골형성 단백질(CUB) 도메인, 표피 성장 인자(EGF)-유사 도메인, 두 보체 대조구 단백질(CCP) 또는 짧은 컨센서스 반복(SCR) 도메인, 및 세린 프로테아제 도메인(Matsushita et al, Curr Opin Immunol 10: 29-35 (1998). MASP-2 및 sMAP는 단일 구조 유전자로부터 대체 스플라이싱에 의하여 생성되며, sMAP는 제1 CUB(CUB1) 도메인, EGF-유사 도메인 및 sMAP-특이적 엑손에 의하여 암호화된 C-말단부의 여분의 4 아미노산으로 구성되어 있다. MASP-1 및 MASP-3는 대체 스플라이싱에 의한 단일 유전자로부터 생성될 수 있다(Schwaebler et al, Immunobiology 205: 455-466 (2002). MBL 및 피콜린이 마이크로브의 표면상의 탄수화물에 결합하는 경우, 효소전구체 형태의 MASP는 제2 CCP와 프로테아제 도메인 사이를 분해하여 중쇄(H)- 및 경쇄(L)-사슬로 불리는 두 폴리펩타이드로 구성된 활성 형태가 된다. 따라서 보체 성분에 대한 단백질분해 활성을 획득하게 된다. 축적된 증거는 MASP-2가 C3 전환효소(C4bC2a)의 형성을 유도하는 C4 및 C2를 분해함을 나타낸다(Matsushita et al, J. Immunol 165: 2637-2642 (2000)). 우리는 MASP-1이 C3를 직접적으로 분해하며 및 후속적으로 증폭 루프를 활성화시킨다는 것을 제안한다(Matsushita and Fujita, Immunobiology 194: 443-448 (1995). 그러나 이 기능은 논란이 있다(Ambrus et al, J. Immunol 170: 1374-1382 (2003). MASP-3가 L-사슬내의 세린 프로테아제 도메인을 함유하고, 합성 기질에 대한 이들의 단백질분해 활성을 발휘함에도(Zundel et al, J Immunol 172: 4342-4350 (2004), 이들의 생리학적 기질은 확인되지 못하였다. 세린 프로테아제 도메인이 결핍된 sMAP의 기능은 여전히 미지이다.
- [0749] 현재의 연구에서, 렉틴 보체 경로의 활성화에서의 sMAP의 역할을 분명히 하기 위하여, 우리는 sMAP의 C-말단부에서 4 아미노산 잔기(EQSL)를 암호화하는 sMAP-특이적 엑손을 파괴시켰으며, sMAP-/- 마우스를 생성하였다. 우리는 하방-조절 렉틴 경로의 활성화에 대한 sMAP의능력을 최초로 보고하였다.
- [0750] **재료 및 방법**
- [0751] 마우스
- [0752] 표적화 벡터는 129/Sv 마우스 MASP-2 유전자의 엑손 1-4 및 엑손 6의 일부 및 엑손 5 대신 네오마이신 내성 유전자 카세트를 포함하도록 구축된다(도 20A). DT-A 유전자는 벡터의 3' 말단에 삽입되고 및 3개의 lox p 부위는 장래에 네오마이신 카세트 및 프로모터 영역을 제거하기 위하여 조건부 표적화를 수행하도록 삽입된다. 표적화 벡터는 129/Sv ES 세포내로 전기천공되었다. 표적화된 ES 클론은 양육 ICR 모체의 자궁내로 이식된 C57BL/6J 포배내로 미세주입되었다. 수컷 키메라 마우스를 암컷 C57BL/6J 마우스와 교배시켜 이종접합(+/-) 마우스를 생산하였다. 이종접합(+/-) 마우스는 프로브를 사용하여 BamH I로 분해된 테일 DNA 서던 블롯 분석에 의하여 선별되었다(도 20A). 서던 블롯 분석은 이종접합(+/-) 마우스의 DNA내에서 6.5-kbp 및 11-kbp 밴드를 나타낸다(도 20B). 이종접합(+/-) 마우스는 C57BL/6J 마우스와 역교배되었다. 동종접합(-/-) 마우스를 획득하기 위하여, 이종접합(+/-) 마우스를 이종교배하였다. 동종접합(-/-) 마우스(C57BL/6J 배경)를 테일 DNA의 PCR-기초 유전형에

의하여 확인하였다. PCR 분석은 엑손 4-특이적 및 네오 유전자-특이적 센스 프라이머 및 엑손 6-특이적 안티센스 프라이머의 혼합물을 사용하여 수행하였다. 동종접합(-/-) 마우스의 DNA는 단일 1.8-kbp 밴드를 나타내었다(도 20C). 모든 실험에서, 8 내지 12 주령 마우스를 Fukushima Medical University의 동물 실험 가이드에 따라 사용하였다.

[0753] 노던 블롯 분석

[0754] 야생형(+/+) 및 동종접합(-/-) 마우스 간의 폴리(A)+ RNA(1 μ g)를 전기영동으로 분리하고, 나일론 막을 이동시켜, sMAP, MASP-2 H-사슬, MASP-2 L-사슬, 또는 네오 유전자에 특이적인 32P-표지 cDNA 프로브로 혼성화시켰다. 동일한 막을 벗겨내고 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈하이드로게나아제(GAPDH)에 특이적 프로브로 재혼성화하였다.

[0755] 정량적 RT-PCR

[0756] 실시간 PCR을 LightCycler 시스템(Roche Diagnostics)으로 수행하였다. 60 ng의 야생형(+/+) 및 동종접합(-/-) 마우스 간의 폴리(A)+ RNA에서 합성된 cDNA를 실시간 PCR용 템플릿으로 사용하였으며, MASP-2 H- 및 L-사슬 및 sMAP의 cDNA 절편이 증폭되고 모니터링되었다.

[0757] 면역블로팅

[0758] 시료를 환원 조건하의 10 또는 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동하였으며, 단백질을 폴리비닐리덴 디플루오라이드(PVDF) 막에 전이시켰다. 막상의 단백질은 MASP-1의 L-사슬에 대하여 발생된 항-M ASP-I 항혈청 또는 MASP-2의 H-사슬의 펩타이드에 대하여 발생된 항-MASP-2/sMAP 항혈청으로 검출된다.

[0759] MBL-MASP-sMAP 복합체 내의 MASPs 및 sMAP의 검출

[0760] 마우스 혈청(20 μ l)을 0.1% (w/v) BSA (TBS-Ca²⁺/BSA)를 함유한 480 μ l의 TBS-Ca²⁺ 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 및 5 mM CaCl₂)에 첨가하고, 40 μ l의 50% 만난-아가로스 겔 슬러리(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)의 TBS-Ca²⁺/BSA 완충액 용액으로 4℃에서 30 분간 배양하였다. 배양 후, 각 겔을 TBS-Ca²⁺ 완충액으로 세척하고, SDS-PAGE에 대한 시료용 완충액을 겔에 첨가하였다. 겔을 비등시키고, 상청액에 SDS-PAGE를 가하고, 면역블로팅하여 MBL 복합체 내의 MASP-1, MASP-2, 및 sMAP를 검출하였다.

[0761] C4 부착 측정법

[0762] 마우스 혈청은 TBS-Ca²⁺/BSA 완충액으로 100 μ l까지 희석된다. 희석된 시료를 만난-피복 미세티터 웰에 첨가하고, 실온에서 30분간 배양하였다. 웰을 찬 세척 완충액(TBS-Ca²⁺ 완충액, 0.05% (v/v) Tween 20 함유)으로 세척하였다. 세척 후, 인간 C4를 각 웰에 첨가하고, 얼음상에서 30분간 배양하였다. 웰을 찬 세척 완충액으로 세척하고, HRP-접합 항-인간 C4 다클론 항체(Biogeneis, Poole, England)를 각 웰에 첨가하였다. 37℃로 30 분간의 배양 후, 웰을 세척 완충액으로 세척하였으며 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 용액을 각 웰에 첨가하였다. 발달시킨 후, 1 M H₃PO₄ 를 첨가하고 및 450 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0763] C3 부착 측정법

[0764] 마우스 혈청은 0.1%(w/v) HSA를 함유한 BBS 완충액(4 mM 바르비탈, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 및 1 mM MgCl₂, pH 7.4)으로 100 μ l까지 희석되었다. 희석된 시료를 만난-피복 미세티터 웰에 첨가하고 37℃에서 1시간동안 배양하였다. 웰을 세척 완충액으로 세척하였다. 세척 후, HRP-접합 항-인간 C3c 다클론 항체(Dako, Glostrup, Denmark)를 각 웰에 첨가하였다. 실온의 1시간 배양 후, 웰을 세척 완충액으로 세척하였으며, TMB 용액을 각 웰에 첨가하였다. 전술한 바와 같이 색을 측정하였다.

[0765] 재조합

[0766] 세린 프로테아제 도메인내의 활성-부위 세린 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 재조합 마우스 sMAP (rsMAP), rMASP-2, 및 불활성 마우스 MASP-2 돌연변이(MASP-2i)를 전술한 바와 같이 제조하였다(Iwaki and Fujita, 2005).

[0767] MBL-MASP-sMAP 복합체의 재구성

[0768] 동종접합(-/-) 마우스 혈청(20 μ l) 및 다양한 양의 MASP-2i 및/또는 rsMAP를 총부피 40 μ l의 TBS-Ca²⁺ 완충액 내에서 얼음상 밤샘 배양하였다. 이 혼합물을 만난-아가로스 겔 슬러리와 함께 배양하였으며, 겔에 결합된 MBL-MASP 복합체내의 MASP-2i 및 rsMAP를 "MBL-MASP-sMAP 복합체 내의 MASPs 및 sMAP의 검출"에 설명한 바와 같이

검출하였다.

[0769] C4 부착 활성의 재구성

[0770] 동종접합(-/-) 마우스 혈청 (0.5 μ l) 및 다양한 양의 rMASP-2 및/또는 rsMAP를 총부피 20 μ l의 TBS-Ca2+ 내에서 얼음상 밤샘 배양하였다. 이 혼합물을 80 μ l의 TBS-Ca2+/BSA 완충액으로 희석하고 만난-피복 웰에 첨가하였다. 모든 후속적 과정을 "C4 부착 측정법"에 설명한 바와 같이 수행하였다.

[0771] 결과

[0772] 도 20: sMAP 유전자의 표적화 파괴. (A) MASP-2/sMAP 유전자, 표적화 벡터, 및 표적화 상동체의 부분적 제한 맵. sMAP-특이적 엑손(엑손 5)을 네오 유전자 카세트에 대체. (B) 수컷 키메라 마우스와 암컷 C57BL/6J 마우스 교배로 유도된 자손의 게놈 DNA 서던 블롯 분석. 테일 DNA는 BamH I로 분해되고, (A)가 절편된 프로브와 혼성화된다. 11-kbp 밴드가 야생형 상동체에서 유도되고, 6.5-kbp 밴드가 표적화 상동체에서 유도된다. (C) PCR 유전형 분석. 테일 DNA를 엑손 4-특이적 및 네오 유전자-특이적 센스 프라이머 및 엑손 6-특이적 안티센스 프라이머의 혼합물을 사용하여 분석하였다. 2.5-kbp 밴드를 야생형 상동체에서 획득하였으며, 1.8-kb 밴드를 표적화 상동체에서 획득하였다.

[0773] 도 21: 동종접합(-/-) 마우스 내의 sMAP 및 MASP-2 mRNAs 발현. (A) 노던 블롯 분석. 야생형(+/+) 및 동종접합(-/-) 마우스 간의 폴리(A)+ RNAs를 전기영동하고, 나일론 막에 전이시키고, 및 sMAP, MASP-2 H-사슬, MASP-2 L-사슬, 또는 네오 유전자에 특이적인 32P-표지 프로브와 혼성화하였다. 네오(2.2 kb)에 특이적 밴드를 동종접합(-/-) 마우스에서 관찰하였다. (B) 정량적 RT-PCR. MASP-2 H- 및 L-사슬 및 sMAP cDNA 절편이 LightCycler 기기(Roche Diagnostics) 내에서 실시간 PCR에 의하여 증폭되었다. 야생형(+/+) 및 동종접합(-/-) 마우스 간의 폴리(A)+ RNAs에서 합성된 cDNA를 템플릿으로 사용하였다. 나타낸 데이터는 두 실험의 평균이다.

[0774] 도 22: 동종접합(-/-) 마우스 혈청 내의 MASP-2 결핍. (A) 마우스 혈청내의 MASP-2 및 sMAP의 면역블롯팅. 야생형(+/+) 또는 동종접합(-/-) 마우스 혈청(2 μ l)에 면역블롯팅을 하고 항-MASP-2/sMAP 항혈청을 검출하였다. (B) MBL-MASP-sMAP 복합체 내의 MASPs 및 sMAP 검출. 마우스 혈청은 만난-아가로스 겔로 배양되었으며, 겔에 결합된 MBL 복합체내의 sMAP, MASP-1, 및 MASP-2 재료 및 방법에 설명한 바와 같이 검출하였다.

[0775] 도 23: 동종접합(-/-) 마우스 혈청내의 C4 및 C3의 분열 감소. (A) 만난-피복 웰상의 C4 부착. 마우스 혈청은 2-배로 희석되고, 만난-피복 웰에서 실온으로 30 분간 배양한다. 웰 세척 후, 인간 C4를 각 웰에 첨가하고 얼음상에서 30 분간 배양하였다. 웰에 부착된 인간 C4의 양을 HRP-접합 항-인간 C4 다클론 항체를 사용하여 측정하였다. (B) 만난-피복 웰상의 C3 부착. 희석된 마우스 혈청을 만난-피복 웰에 첨가하고 37도로 1시간 배양하였다. 웰상의 내재 C3 부착은 HRP-접합 항-인간 C3c 다클론 항체로 검출되었다.

[0776] 도 24: sMAP 및 MASP-2와 MBL의 경쟁적 결합. (A) 동종접합(-/-) 마우스 혈청내의 MBL-MASP-sMAP 복합체의 재구성. MASP-2i 및/또는 rsMAP (4 μ g)을 동종접합(-/-) 마우스 혈청(20 μ l)으로 배양하였다. 이 혼합물에 만난-아가로스 겔로 추가의 배양을 하였으며, 겔에 결합된 분획상의 rsMAP 및 MASP-2i가 면역블롯팅에 의하여 검출되었다. (B) 다양한 양의 MASP-2i(0-5 μ g) 및 일정량의 rsMAP(5 μ g)을 동종접합(-/-) 마우스 혈청(20 μ l)으로 배양하고, 만난-아가로스 겔로 추가 배양하였다. (C) 일정량의 MASP-2i (0.5 μ g) 및 다양한 양의 rsMAP (0-20 μ g)를 동종접합(-/-) 마우스 혈청(20 μ l)으로 배양하였다. (D) 다양한 양의 rsMAP (0-20 μ g)를 야생형(+/+) 마우스 혈청 (20 μ l)로 배양하였다.

[0777] 도 25: rMASP-2 첨가에 의한 C4 부착 활성의 복구. 다양한 양의 rsMAP (0-5 μ g)(A) 또는 rMASP-2(0-1.5 μ g)(B)를 총부피 20 μ l의 TBS-Ca2+ 완충액에서 0.5 μ l의 동종접합(-/-) 마우스 혈청으로 얼음상 밤샘 배양하였다. 그 다음 이 혼합물을 80 μ l의 TBS-Ca2+/BSA 완충액으로 희석하고, 만난-피복 웰에 첨가하였으며, 웰에 부착된 C4의 양을 측정하였다.

[0778] 도 26: sMAP 첨가에 의한 C4 부착 활성의 감소. (A) rMASP-2(1 μ g) 및 다양한 양의 rsMAP(0-0.5 μ g)를 0.5 μ l의 동종접합(-/-) 마우스 혈청으로 배양하였다. 이 혼합물을 만난-피복 웰에 첨가하고, 웰에 부착된 C4의 양을 측정하였다 (B) rsMAP(0-0.7 μ g)를 야생형 혈청(0.5 μ l)으로 배양하였으며, 만난-피복 웰에 부착된 C4의 양을 측정하였다.

[0779] 결과:

[0780] 동종접합(-/-) 마우스내의 sMAP 및 MASP-2 발현

- [0781] 생체 내 sMAP의 역할을 분명히 하기 위하여, 우리는 sMAP가 결핍된 유전자 표적화 마우스를 확립하였다. 표적화 벡터는 sMAP에 특이적 엑손(엑손 5)을 네오마이신 내성 유전자 카세트에 대체하도록 구축하였다(도 20A). 양성 ES 클론은 C57BL/6 포배 내로 주입되고, 시조 키메라는 C57BL/6J 암컷으로 배양되었다. 기니아픽-색 퍼프의 테일 DNA 서던 블롯 분석은 표적화 상동체의 세균 전이를 나타낸다(도 20B). 이종접합(+/-) 마우스는 도 20A의 프로브를 사용하여 BamH I로 분해된 테일 DNA의 서던 블롯 분석에 의하여 선별된다. 서던 블롯 분석은 이종접합(+/-) 마우스의 DNA 내의 6.5-kbp 및 11-kbp 밴드를 나타낸다(도 20B). 이종접합(+/-) 마우스를 C57BL/6J 마우스와 역교배시켰다. 동종접합(-/-) 마우스를 얻기 위하여, 이종접합(+/-) 마우스를 이종교배하였다. 동종접합(-/-) 마우스(C57BL/6J 배경)는 테일 DNA의 PCR 기초 유전형에 의하여 확인되었으며, 단일 1.8-kbp 밴드를 산출한다(도 20C).
- [0782] 동종접합(-/-) 마우스는 정상적으로 발달하였으며, 야생형(+/+) 마우스와 체중의 현저한 차이를 나타내지 않았다. 이들간의 형태학적 차이도 없었다. 노던 블롯 분석에서, sMAP 특이적 프로브는 야생형(+/+) 마우스내의 단일 0.9-kb 밴드를 검출하였으며, 반면에 동종접합(-/-) 마우스 내에서는 특이적 밴드를 검출하지 못하였다(도 21A). MASP-2 H- 또는 L-사슬에 특이적인 프로브를 사용하는 경우, 전술한 바와 같이 수개의 특이적 밴드를 야생형(+/+) 마우스내에서 검출하였고(Stover et al, 1999), H-사슬-특이적 프로브도 sMAP 특이적-밴드를 검출하였다. 그러나, 동종접합(-/-) 마우스 내에서는 상응 밴드가 매우 약하며, 수개의 추가의 밴드가 검출되었다. 우리는 또한 정량적 RT-PCR 분석을 수행하여 sMAP 및 MASP-2 mRNAs의 발현 수준을 검사하였다. 동종접합(-/-) 마우스에서, sMAP mRNA의 발현이 완전히 차단되었다으며 MASP-2도 현저하게 감소하였다: H- 및 L-사슬내의 야생형(+/+) 마우스의 약 2%의 것을 실시간 PCR로 정량화하였다(도 21B). 추가적으로, 단백질 수준에서 MASP-2의 발현을 검사하였다. sMAP 및 MASP-2 모두는 면역블롯팅에 의하여 동종접합(-/-) 마우스 혈청에서는 검출이 불가능하였다(도 22A). 동종접합(-/-) 마우스 혈청을 만난-아가로스 겔로 배양 후, MASP-1이 복합체내에서 검출되었음에도 sMAP 및 MASP-2 모두는 겔에 결합된 분획내에서 검출할 수 없었다(도 22B).
- [0783] 동종접합(-/-) 마우스 혈청내의 렉틴 경로를 통한 C4 및 C3의 분해 활성화
- [0784] 동종접합(-/-) 마우스 혈청을 만난-피복 웰내에서 배양하는 경우, 웰에 부착된 인간 C4의 양은 1/400 내지 1/50의 범위에서 희석된 정상 혈청의 약 20% 였다(도 23A). 우리는 동종접합(-/-) 마우스 혈청내의 렉틴 경로의 C3 부착 활성을 조사하였다. 마우스 혈청을 만난-피복 웰에 첨가하고 웰에 부착된 내재 C3의 양을 측정하였다. 이 양은 결핍 혈청내에서 감소하였으며, 1/10로 희석된 정상 혈청의 약 21% 였다 (도 23B).
- [0785] 동종접합(-/-) 마우스 혈청내의 MBL-MASP-sMAP 복합체의 재구성
- [0786] 재조합 마우스 sMAP (rsMAP) 또는 불활성 마우스 MASP-2 돌연변이(MASP-2i)를 동종접합(-/-) 마우스 혈청에 첨가하는 경우, 두 재조합체는 MBL에 결합할 수 있다 (도 24A, 레인 3 및 4). rsMAP 및 MASP-2i가 동시에 혈청과 배양되는 경우(도 24A, 레인 5), 두 재조합체는 MBL-MASP-sMAP 복합체 내에서 검출된다. 그러나 복합체에 결합된 sMAP의 양은 rsMAP만을 혈청으로 배양하는 경우보다 적었다. 그 다음 sMAP 및 MASP-2와 MBL의 경쟁적 결합을 추가로 조사하였다. 일정량의 rsMAP 및 다양한 양의 MASP-2i를 결핍 혈청에 첨가하였다. rsMAP의 결합은 증가된 양의 MASP-2i에 의한 투여량-의존성 방식에서 감소하였다(도 24B). 역으로, MBL에 결합된 MASP-2i의 양은 rsMAP의 첨가에 의하여 감소되었다(도 24C). rsMAP를 야생형 혈청에 첨가하는 경우, 내재 sMAP 및 MASP-2와 MBL의 결합은 복용량-의존성 방식에서 감소하였다(도 24D).
- [0787] 동종접합(-/-) 마우스 혈청내의 C4 부착 활성의 재구성
- [0788] 재조합체를 사용하여 만난-피복 웰상의 C4 부착의 재구성 실험을 수행하였다. rsMAP를 결핍 혈청에 첨가하는 경우, 부착된 C4의 양은 사실상 복용량-의존성 방식내의 기저 수준으로 감소하였다(도 25A). rMASP-2를 혈청에 첨가하는 경우, C4의 양은 복용량-의존성 방식내의 야생형 혈청의 46%까지 회복하였으며, 고점에 이르렀다(도 25B). 그 다음, 우리는 C4 부착에 대한 sMAP의 효과를 조사하였다. 일정량의 rMASP-2 및 다양한 양의 rsMAP을 결핍 혈청에 첨가하는 경우, 부착된 C4의 양은 복용량-의존성 방식 내의 rsMAP의 첨가에 의하여 감소되었다(도 26A) 및 rsMAP를 야생형 혈청에 첨가하여 부착된 C4의 양을 감소시키며(도 26B), 이는 sMAP이 렉틴 경로의 활성화에 조절 역할을 하는 것을 의미한다.
- [0789] 토의
- [0790] 우리는 sMAP-특이적 엑손의 표적화 파괴를 통하여 sMAP-/- 마우스를 생성하였다. MASP-2의 발현수준은 이러한 마우스내에서 mRNA 및 단백질 수준 모두가 급격히 감소하였다(도 21 및 22). MASP-2 프로브에 의한 노던 블롯 분석은 sMAP-/- 마우스의 폴리(A)+ RNA 내에서 추가의 밴드만을 나타내며, 이는 MASP-2 유전자의 정상 스플라이

싱이 sMAP 유전자의 표적화에 의하여 변경되며 따라서, MASP-2의 발현 수준은 상당히 감소하였다. 결과적으로, 결핍 혈청내의 MBL-MASP 복합체에 의한 C4의 분열은 정상 혈청의 것에 비하여 80% 감소하였다(도 23A). 재구성 실험에서, C4 분열 활성은 rsMAP이 아닌 rMASP-2의 첨가에 의하여 복구되었다(도 25). 결핍 혈청에서 관찰된 C4 부작의 감소는 MBL-MASP 복합체내의 MASP-2 결핍에 의하여 유발되어야한다(도 22B). 따라서, MASP-2가 MBL-MASP 복합체에 의한 C4의 활성화에 필수적인 것이 분명하다. 그러나, rMASP-2의 첨가는 분열 활성을 완전하게 복구하지 못하며, C4 부작은 고점에 이른다. 전술한 바와 같이(Cseh et al, J Immunol 169: 5735-5743 (2002); Iwaki and Fujita, J Endotoxin Res 11: 47-50 (2005)), 대부분의 rMASP-2는 정제 절차 도중 자가활성화에 의하여 활성형태로 전환되며, 일부는 이들의 프로테아제 활성을 상실한다. 활성 또는 불활성 상태의 MASP-2는 이들의 MBL 결합에 현저한 영향을 주지 못하기 때문에(Zundel et al, J Immunol 172: 4342-4350 (2004)), 이들의 프로테아제 활성을 상실한 rMASP-2가 MBL에 결합하고, 경쟁적으로 활성 형태의 결합을 막는 것이 가능하며, 따라서 C4 부작의 불완전 복구가 된다. 렉틴 경로의 C3 분열 활성 결핍 혈청내에서 감소된다(도 23B). 부작된 C3의 양의 감소는 아마도 매우 낮은 수준의 C3 전환효소 활성에 기인하며, MASP-2에 의하여 생성된 C4b 및 C2a 절편으로 구성되어 있다.

[0791]

동종이량체로서 MASP와 sMAP는 결합되며 이들의 N-말단 CUB 및 EGF-유사 도메인을 통하여 MBL 또는 L-피콜린과의 복합체를 형성한다(Chen and Wallis, J Biol Chem 276: 25894-25902 (2001); Cseh et al, J Immunol 169: 5735-5743 (2002); Thielens et al, J Immunol 166: 5068-5077 (2001); Zundel et al, J Immunol 172: 4342-4350 (2004)). sMAP 및 MASP-2의 CUBI-EGF-CUB2 부분의 결정구조는 이들의 동종이량체 구조를 알려준다(Feinberg et al, EMBO J 22: 2348-2359 (2003); Gregory et al, J Biol Chem 278: 32157-32164 (2003)). MBL의 콜라겐-유사 도메인은 MASP의 결합에 관여한다(Wallis and Cheng, J Immunol 163: 4953-4959 (1999); Wallis and Drickamer, J Biol Chem 279: 14065-14073 (1999), 도메인에 도입된 일부 돌연변이는 MBL의 MASP-1 및 MASP-2의 CUBI-EGF-CUB2 부분에 대한 결합을 감소시킨다(Wallis and Dodd, J Biol Chem 275: 30962-30969 (2000)). MASP-2 및 MASP-1/3의 결합 부위는 오버랩되나 일치하지는 않는다(Wallis et al, J Biol Chem 279: 14065-13073 (2004)). MBL의 sMAP-결합 부위는 확인되지 않았으나, sMAP 및 MASP-2의 결합 부위는 아마도 동일한 것 같으며, 이는 CUBI-EGF 영역이 sMAP 및 MASP-2 내에서 동일하기 때문이다. 따라서, sMAP 및 MASP-2가 서로 경쟁하여 MBL-MASP-sMAP 복합체의 재구성에서 MBL에 결합하는 것이 당연하다(도 24). sMAP의 MBL에 대한 친화도는 MASP-2 보다 낮다(Cseh et al, J Immunol 169: 5735-5743 (2002); Thielens et al, J Immunol 166: 5068-5077 (2001)). 마우스 혈청내의 sMAP의 농도는 결정된 바 없다. 도 22A에 나타난 바와 같이, 그러나, 야생형 혈청내의 sMAP의 양은 MASP-2의 것보다 훨씬 많다. 따라서 sMAP는 MASP-2/sMAP 결합 부위를 점유할 수 있으며, MASP-2가 MBL에 결합하는 것을 막고 결과적으로 MBL-MASP 복합체의 C4 분열 활성을 감소시킨다. 렉틴 경로내의 sMAP의 조절 기작은 조사되지 않고 있다. sMAP가 보체 활성화의 전 후에 조절 역할을 하는지 여부는 미지이다. sMAP는 미생물 감염전 MBL-MASP 복합체의 무의식적 활성화를 예방하거나 또는 활성화된 경우 렉틴 경로의 과다활성화를 억제할 수 있게된다. 렉틴 경로내의 또 다른 잠재적인 조절자가 있다. MASP-3는 또한 MBL에 결합시 MASP-2의 경쟁자이며 MASP-2의 C4 및 C2 분열 활성을 하향조절한다(Dahl et al, Immunity 15: 127-135 (2001)). sMAP와 MASP-3간의 상호작용이 조사되지 않았지만, 공동작용으로 렉틴 경로의 활성화를 하향조절할 수 있게된다.

[0792]

이 연구에서, 우리는 sMAP와 MASP-2는 MBL에 결합하기 위하여 경쟁하며, sMAP는 MBL-MASP 복합체에 의하여 활성화된 렉틴 경로를 하향조절할 수 있는 능력을 보유한다는 것을 입증하였다. sMAP이 피콜린-MASP 복합체에 의하여 활성화된 또 다른 경로의 렉틴 경로를 조절하는 것이 타당하다. MASP-2 및 sMAP는 또한 마우스 피콜린 A에 결합하기 위하여 경쟁하며, 피콜린 A-MASP 복합체의 C4 분열 활성을 하향조절한다(Y Endo et al, 제조물 내). MBL 무효과 마우스의 연구가 최근 보고되었다(Shi et al, J Exp Med 199: 1379-1390 (2004)). MBL 무효과 마우스는 MBL 렉틴 경로 내의 C4 분열 활성을 갖지 않으며, 스타필로코커스 아우레우스 감염에 걸리기 쉽다. 현재의 연구에서, MASP-2의 결핍인 sMAP-/- 마우스는 렉틴 경로내의 C4 분열 활성과 함께 C3 분열 활성의 감소를 나타낸다. 이들의 손상된 옵소닌화 활성에 기인하여, sMAP-결핍 마우스는 박테리아 감염 걸리기 쉽다. sMAP-결핍 마우스 추가의 조사에 의하여 감염성 질환에 대한 보호에 있어서 렉틴 경로의 기능을 분명히 하게될 것이다.

[0793]

또 다른 중요한 발견은 정상 혈청에 rsMAP를 첨가하여 C4의 활성화의 감소가 된다는 점이다(도 26B). 렉틴 경로는 수종의 장기 내에서 염증 및 조직 손상을 조절한다고 입증되었다(de Vries et al, Am J Pathol 165: 1677-1688 (2004); Fiane et al, Circulation 108: 849-856 (2003); Jordan et al, Circulation 104: 1413-1418 (2001); Walsh et al, J Immunol 175: 541-546 (2005)). 흉복부 대동맥류의 치료를 한 MBL-결핍 환자에 있어서, 보체는 활성화되지 않았으며, 전염증 마커의 수준은 수술 후 감소되었다(Fiane et al, Circulation 108: 849-856 (2003)). 축적된 증거들은 다양한 혈관 내의 허혈 및 재관류 증상에서 MBL의 잠재적인 병태생리학

적 역할을 입증하였다. 따라서, MBL의 특이적 차단 또는 렉틴 보체 경로의 억제는 허혈/관류-유관 손상을 예방하기 위한 치료적 관련 전략을 나타낸다. 따라서, 이들이 렉틴 경로 활성화의 감쇄제로 작용하기 때문에, sMAP는 억제제 후보의 하나가 될 수 있다.

[0794] 실시예 31

[0795] 이 실시예에는 MASP-2가 C3의 C4 우회 활성화에 대한 역할한다는 것을 입증한다.

[0796] **배경/이론적 근거:** 최근, 대체 경로의 억제가 허혈 급성 기능상실로부터 신장을 보호한다는 것을 보여주었다 (Thurman et al., J. Immunol 170: 1517-1523 (2003)). 본원의 데이터는 렉틴 경로가 대체 경로-활성화를 지시하고, 차례로 보체 활성화를 시너지적으로 증폭시킨다는 것을 의미한다. 우리는 렉틴 경로의 일시적 억제가 대체 경로-활성화에 영향을 미치며, 따라서 보체-매개 이식편 손상 및 염증을 제한하여 장기 이식의 장기간의 결과를 향상시키며 이식편에 대한 후천적 면역 반응의 원치않는 유도를 완화하고, 후천적 면역 시스템을 통한 2차 이식편 거부반응을 감소시킨다는 가설을 세웠다. 이는 선천적 MBL 결핍에 의한 렉틴 경로의 부분적 손상을 나타내는 최근 임상적 데이터에 의하여 지지된다(약 30%의 인구에서 나타남), 증가된 신장 동종이식의 인간 생존에 관련된 것이다(Berger, Am J Transplant 5: 1361-1366 (2005)).

[0797] 허혈-재관류(I/R) 손상에서의 보체 성분 C3 및 C4의 관여는 유전자 표적화 마우스주를 사용하여 일시적 창자 및 근육 허혈의 모델에서 잘 확립되었다(Weiser et al., J Exp Med 183: 2342-2348 (1996); Williams et al. J Appl Physiol 86: 938-42, (1999)). C3는 신장 VR 손상 및 2차 이식편 거부반응에 상당한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Zhou et al., J Chn Invest 105: 1363-1371 (2000); Pratt et al., Nat Med 8: 582-587 (2002); Farrar, et al., Am J. Pathol 164: 133-141 (2004)). C4 결핍의 표현형이 마우스 신장 동종이식편 거부반응 모델에서 관찰되지 않는다는 것은 놀라운 것이다(Lin, 2005 In Press). 이러한 C4 결핍 마우스의 혈청 및 혈장의 후속적 분석은, 그러나 이러한 마우스가 C3의 LP-의존성 분열 및 추가의 보체의 하방 활성화를 나타내는 잔여 기능성 활성을 보유한다는 것을 의미한다(도 27C).

[0798] 기능성 C4-우회(C2-우회)의 존재는 다수의 연구자들이 전술한(그러나 완전하게 특성화되지 않은) 현상이며 (Miller et al., Proc Natl Acad Sci 72: 418-22 (1975); Knutzen Steuer et al, J Immunol 143(7): 2256-61 (1989); Wagner et al., J Immunol 163: 3549-3558 (1999), 이는 C4 (및 C2) 결핍 혈청내의 대체 경로-비의존성 C3-전환에 관련되어 있다.

[0799] **방법:** C3 부착에 대한 렉틴 경로 및 고전적 경로의 효과. 마우스 혈장(EGTA/ Mg2+, 항응고제)을 희석하고, 4.0 mM 바르비탈, 145 mM NaCl, 2.0 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, pH 7.4로 재칼슘화하였고, 그 다음 만난(도 27A 및 27C에 나타난 바와 같이) 또는 지모산(도 27B에 나타난 바와 같이)으로 피복된 미세티터 플레이트에 첨가하였으며, 90 분간 37°C로 배양하였다. 플레이트를 10 mM Tris-Cl, 140 mM NaCl, 5.0 mM CaCl₂, 0.05% Tween 20, pH 7.4로 3회 세척하고, 그 다음 항-마우스 C3c 항체를 사용하여 C3b 부착을 측정하였다.

[0800] **결과:** 도 27 A-C에 나타난 결과는 3회의 비의존성 실험의 대표적인 것이다. 만난 또는 지모산 대신 면역글로블린 복합체로 피복된 웰 내의 동일한 혈청을 사용하는 경우, C3b 부착 및 인자 B 분열이 WT(+/+) 마우스 혈청 및 풀을 형성한 MASP-2(-/-) 혈청에서 관찰되었으나, C1q 결핍 혈청에서는 관찰되지 않았다(데이터 미도시). 이는 개시 C3b가 CP 활성을 통하여 제공되는 경우 대체 경로 활성화가 MASP-2-/- 혈청내에서 복구될 수 있다는 것을 의미한다. 도 27C은 C3는 C4 (-/-) 결핍 혈장내에서 렉틴 경로-의존성 방식으로 효과적으로 활성화될 수 있다는 놀라운 사실을 나타낸다. 이 "C4 우회"는 가용성 만난 또는 만노스를 지닌 혈장의 사전 배양을 통하여 렉틴 경로-활성화의 억제에 의하여 폐쇄된다.

[0801] 만난 및 지모산상에 C3b 부착은 MASP-2 (-/-) 결핍 마우스내에서 심각하게 저하되며, 대체 경로 활성화에 대한 이전의 다수의 논문에 따른 실험 조건하에서도 모든 세 경로를 허용하게 된다. 도 27 A-C에 나타난 바와 같이, MASP-2 (-/-) 결핍 마우스 혈장은 렉틴 경로를 통한 C4를 활성화시키지 않으며 렉틴 경로 또는 대체 경로를 통해서도 C3를 분해하지도 않는다. 따라서 우리는 MASP-2가 이 C4-우회에 필요하다는 가설을 세웠다. 렉틴 경로-의존성 C4-우회에 관여하는 것으로 보이는 성분의 확인에 있어서 추가의 진전은 최근 Teizo Fujita 교수에 의하여 보고되었다. 후지타 MASP- 1/3 결핍 마우스 군주와 교배한 C4 결핍 마우스의 혈장은 C4 결핍 혈장의 렉틴 경로에 의한 C3 분해의 능력을 잃었다. 이는 재조합 MASP-1를 결합된 C4 및 MASP-1/3 결핍 혈장에 첨가함으로써 복구되었다(Takahashi, Mol Immunol 43: 153 (2006)). 이는 MASP-1가 C4의 부재하에 C3를 분해하는 렉틴 경로-유도성 복합체의 형성에 관여한다는 것을 의미한다(재조합 MASP-1는 C3가 아닌, C2를 분해한다; Rossi et al, J Biol Chem 276: 40880-7 (2001); Chen et al, J Biol Chem 279: 26058-65 (2004)). 우리는 MASP-2가 형성된 이

우회에 필요하다는 것을 관찰하였다.

- [0802] 더 많은 기능성 및 정량적 변수 및 조직학이 이 파일릿 연구를 공고히하기 위하여 필요하다, 이들의 예비적 결과는 렉틴 경로에 의한 보체 활성화가 신장 I/R 손상의 병태생리학에 현저히 기여하며, MASP-2^{-/-} 마우스가 더 빠른 신장 기능 회복을 보여준다는 가설을 강하게 지지한다.
- [0803] 본 발명의 바람직한 실시 상태를 설명하고 도시하였음에도, 다양한 변화가 본 발명의 범위 및 사상을 벗어나지 않고도 생성될 수 있다는 사실을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 본 발명의 전술한 특징 및 다수의 장점은 첨부된 도면과 함께 다음의 상세한 설명에 의하여 좀더 명확하게 이해될 것이며, 여기서:
- [0041] 도 1은 대체 보체 경로가 보체 활성화에 대한 렉틴 경로-의존성 MASP-2 활성화를 필요로한다는 새로운 발견을 나타내는 플로우차트이다;
- [0042] 도 2는 인간 MASP-2의 계층 구조를 나타내는 도면이다;
- [0043] 도 3A는 인간 MASP-2 단백질의 도메인 구조를 나타내는 도면이다;
- [0044] 도 3B는 인간 M Ap 19 단백질의 도메인 구조를 나타내는 도면이다;
- [0045] 도 4는 뮤린 MASP-2 녹아웃 전략을 나타내는 도면이다;
- [0046] 도 5는 인간 MASP-2 미니유전자 구조체를 나타내는 도면이다;
- [0047] 도 6A는 MASP-2-결핍이 만난상의 C4b 부착 결핍에 의하여 측정된 렉틴-경로-매개 C4 활성화의 손실을 유도한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0048] 도 6B는 MASP-2-결핍이 지모산상의 C4b 부착 결핍에 의하여 측정된 렉틴-경로-매개 C4 활성화 손실을 유도한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0049] 도 6C는 만난 및 지모산상의 C4b 부착에 의하여 측정된 MASP-2^{+/+}; MASP-2^{-/-} 및 야생형 균주에서 획득한 혈청 시료의 상대적 C4 활성화 수준을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0050] 도 7A는 MASP-2-결핍이 만난상에 C3b 부착 결핍에 의하여 측정된 렉틴-경로-매개 및 대체 경로 매개 C3 활성화 모두의 손실을 유도한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0051] 도 7B는 MASP-2-결핍이 지모산상에 C3b 부착 결핍에 의하여 측정된 렉틴-경로-매개 및 대체 경로 매개 C3 활성화 모두의 손실을 유도한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0052] 도 8은 뮤린 재조합 MASP-2를 MASP-2^{-/-} 혈청시료를 첨가하여 만난상의 C4b 부착에 의하여 측정된 단백질 농도 의존성 방식 내의 렉틴-경로-매개 C4 활성화를 회복한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0053] 도 9는 고전적 경로가 MASP-2^{-/-} 균주 내에서 기능성이라는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0054] 도 10은 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템이 복부 대동맥류 복구 후 허혈/재관류상 내에서 활성화된다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0055] 도 11A는 실시예 24에서 설명하는 바와 같이 항-MASP-2 Fab2 항체 #11가 C3 전환효소 형성을 억제한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0056] 도 11B는 실시예 24에서 설명하는 바와 같이 항-MASP-2 Fab2 항체 #11가 천연 레트 MASP-2에 결합한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0057] 도 11C는 실시예 24에서 설명하는 바와 같이 항-MASP-2 Fab2 항체 #41이 C4 분열을 억제한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0058] 도 12는 실시예 24에서 설명하는 바와 같이 모든 항-MASP-2 Fab2 항체가 억제된 C3 전환효소 형성이 C4 분열을 억제하는 것으로 시험되었다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;

- [0059] 도 13은 실시예 25에서 설명하는 바와 같이 항-MASP-2 차단 Fab2 항체의 에피토프 맵핑에 사용되는 레트 MASP-2에서 유도된 제조합 폴리펩타이드를 나타내는 도면이다;
- [0060] 도 14는 실시예 25에서 설명하는 바와 같이 항-MASP-2 Fab2 #40 및 #60가 레트 MASP-2 폴리펩타이드에 결합한다는 사실을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0061] 도 15는 실시예 26에서 설명하는 바와 같이 신장 허혈/재관류 손상 모델 내에서 재관류 후 24 및 48시간에서의 야생형(+/+) 및 MASP-2(-/-) 마우스의 혈액 요소 질소 제거를 입증하는 결과를 제공한다;
- [0062] 도 16A는 실시예 27에서 설명하는 바와 같이 심장동맥 폐색 및 재관류 모델 내의 손상 후 야생형(+/+)의 경색 크기 및 MASP-2(-/-) 마우스의 감소된 경색 크기를 입증하는 결과를 제공한다;
- [0063] 도 16B는 실시예 27에서 설명하는 바와 같이 심장동맥 폐색 및 재관류 모델에서 시험된 개별 동물의 분류를 나타내는 결과를 제공한다;
- [0064] 도 17A는 실시예 28에서 설명하는 바와 같이 야생형(+/+) 및 MASP-2(-/-) 마우스에서 분리된 RPE-맥락막 복합체 내의 기저 VEGF 단백질 수준을 나타내는 결과를 제공한다;
- [0065] 도 17B는 실시예 28에서 설명하는 바와 같이 황반 변성 모델 내의 레이저 유도 손상 후 3일에서 야생형(+/+) 및 MASP-2(-/-) 마우스에서 유도한 RPE-맥락막 복합체 내의 VEGF 단백질 수준을 나타내는 결과를 제공한다;
- [0066] 도 18은 실시예 28에서 설명하는 바와 같이 야생형(+/+) 및 MASP-2(-/-) 마우스 내에서 레이저 유도 손상 후 7일의 평균 콜로이드성 신생혈관형성(CNV) 부피를 나타내는 결과를 제공한다;
- [0067] 도 19는 실시예 29에서 설명하는 바와 같이 Col2 mAb-유도 류마티스 관절염 경과 후 야생형(+/+) 및 MASP-2(-/-) 마우스의 평균 임상적 관절염 스코어를 나타내는 결과를 제공한다;
- [0068] 도 20A는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 sMAP(Map 19) 유전자의 표적화된 파괴를 나타내는 도면이다;
- [0069] 도 20B는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 수컷 sMAP(-/-) 키메라 마우스와 암컷 C57BL/6 마우스의 교미에 의하여 유도된 자손으로부터 분리된 게놈 DNA의 서던 블롯 분석을 제공한다;
- [0070] 도 20C는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 야생형(+/+) 및 sMAP(-/-) 마우스의 PCR 유전형 분석을 제공한다;
- [0071] 도 21A는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 sMAP(-/-) 마우스 내의 sMAP 및 MASP-2 mRNA의 노던 블롯 분석을 제공한다;
- [0072] 도 21B는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 야생형(+/+) 및 sMAP(-/-) 마우스 내의 MASP-2 H-사슬, MASP-2 L-사슬 및 sMAP를 암호화하는 cDNA의 정량적 RT-PCR 분석을 제공한다;
- [0073] 도 22A는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 sMAP(-/-), 즉, MAP19(-/-), 마우스 혈청내의 MASP-2 및 sMAP의 결핍을 입증하는 면역블롯을 제공한다;
- [0074] 도 22B는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 MASP-2 및 sMAP가 MBL-MASP-sMAP 복합체 내에서 검출되었음을 입증하는 결과를 제공한다;
- [0075] 도 23A는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 야생형(+/+) 및 sMAP(-/-) 마우스 혈청 내의 만난-피복 웰상의 C4 부착을 나타내는 결과를 제공한다;
- [0076] 도 23B는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 야생형(+/+) 및 sMAP(-/-) 마우스 혈청 내의 만난-피복 웰상의 C3 부착을 나타내는 결과를 제공한다;
- [0077] 도 24A는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 sMAP(-/-) 혈청내의 MBL-MASP-sMAP 복합체의 재구성을 나타내는 결과를 제공한다;
- [0078] 도 24B-D는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 rsMAP와 MASP-2i가 MBL에 경쟁적 결합한다는 사실을 나타내는 결과를 제공한다;
- [0079] 도 25A-B는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 rsMAP가 아닌 rMASP-2의 첨가에 의하여 C4 부착 활성의 저장을 나타내는 결과를 제공한다;
- [0080] 도 26A-B는 실시예 30에서 설명하는 바와 같이 rsMAP의 첨가에 의하여 C4 부착 활성의 감소를 나타내는 결과를 제공한다; 및

[0081]	도 27A-C는 실시예 31에서 설명하는 바와 같이 MASP-2는 C3의 C4 우회 활성화를 책임진다는 사실을 나타내는 결과를 제공한다.
[0082]	서열 목록의 설명
[0083]	SEQ ID NO:1 인간 MAP 19 cDNA
[0084]	SEQ ID NO:2 인간 MAP 19 단백질(리더 포함)
[0085]	SEQ ID NO:3 인간 MAP19 단백질(성숙)
[0086]	SEQ ID NO:4 인간 MASP-2 cDNA
[0087]	SEQ ID NO:5 인간 MASP-2 단백질(리더 포함)
[0088]	SEQ ID NO:6 인간 MASP-2 단백질(성숙)
[0089]	SEQ ID NO:7 인간 MASP-2 gDNA(엑손 1-6)
[0090]	항원: (MASP-2 성숙 단백질 참조)
[0091]	SEQ ID NO:8 CUBI 서열 (aa 1-121)
[0092]	SEQ ID NO:9 CUBEGF 서열 (aa 1-166)
[0093]	SEQ ID NO: 10 CUBEGFCUBII (aa 1-293)
[0094]	SEQ ID NO: 11 EGF 영역 (aa 122-166)
[0095]	SEQ ID NO: 12 세린 프로테아제 도메인 (aa 429 - 671)
[0096]	SEQ ID NO: 13 세린 프로테아제 도메인 불활성 (aa 610-625, Ser618의 Ala 돌연변이 포함)
[0097]	SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL (CUBI 펩타이드)
[0098]	SEQ ID NO: 15
[0099]	TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLC
[0100]	GQ (CUBI 펩타이드)
[0101]	SEQ ID NO: 16 TFRSDYSN (MBL 결합 영역 중핵)
[0102]	SEQ ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL 결합 영역)
[0103]	SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG (EGF 펩타이드)
[0104]	SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSGRGSGGALV (세린 프로테아제 결합 중핵)
[0105]	펩타이드 억제제:
[0106]	SEQ ID NO:20 MBL 전장 cDNA
[0107]	SEQ ID NO:21 MBL 전장 단백질
[0108]	SEQ ID NO:22 OGK-X-GP (컨센서스 결합)
[0109]	SEQ ID NO:23 OGKLG
[0110]	SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G
[0111]	SEQ ID NO:25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO
[0112]	SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEGEPGQGLRGLQGPOGKLGGPOG
[0113]	SEQ ID NO:27 GAOGSOGKEGAOGPGGPOGPOGKMGPKGEOGDO (인간 h-피콜린)
[0114]	SEQ ID NO:28
[0115]	GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPN

- [0116] GAOGEO (인간 피콜린 p35)
- [0117] SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (C4 분열 부위)
- [0118] 발현 억제제:
- [0119] SEQ ID NO:30 CUBI-EGF 도메인의 cDNA (SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드
- [0120] 22-680)
- [0121] SEQ ID NO:31
- [0122] 5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCTCCTGGGC 3'
- [0123] MASP-2 번역개시 부위(센스)를 포함하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드
- [0124] 12-45
- [0125] SEQ ID NO:32
- [0126] 5' GACATTACCTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG 3'
- [0127] MASP-2 MBL 결합 부위(센스)를 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4
- [0128] 의 뉴클레오타이드 361-396
- [0129] SEQ ID NO:33
- [0130] 5' AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA 3'
- [0131] CUBII 도메인을 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오
- [0132] 타이드 610-642
- [0133] 클로닝 프라이머:
- [0134] SEQ ID NO:34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCTC (CUB용 5' PCR)
- [0135] SEQ ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (CUB용 3' PCR)
- [0136] SEQ ID NO:36 GGAATTCCTACAGGCGCT (CUBIEGF용 3' PCR)
- [0137] SEQ ID NO:37 GGAATTCCTAGTAGTGAT (CUBIEGFCUBII용 3' PCR)
- [0138] SEQ ID NOS:38-47은 인체적응형 항체용 클로닝 프라이머이다
- [0139] SEQ ID NO:48은 9 aa 펩타이드 결합이다
- [0140] 발현 벡터:
- [0141] SEQ ID NO:49는 MASP-2 미니유전자 삽입체이다
- [0142] SEQ ID NO:50은 무린 MASP-2 cDNA이다
- [0143] SEQ ID NO:51은 무린 MASP-2 단백질이다(w/리더)
- [0144] SEQ ID NO:52는 성숙 무린 MASP-2 단백질이다
- [0145] SEQ ID NO:53 레트 MASP-2 cDNA
- [0146] SEQ ID NO:54는 레트 MASP-2 단백질이다(w/ 리더)
- [0147] SEQ ID NO:55는 성숙 레트 MASP-2 단백질이다
- [0148] SEQ ID NO:56-59는 인간 MASP-2A를 생성하는데 사용되는 인간 MASP-2의 부위-지향 돌연변이유발용 올리고뉴클레오타이드이다
- [0149] SEQ ID NO:60-63는 무린 MASP-2A를 생성하는데 사용되는 무린 MASP-2의 부위-지향 돌연변이유발용 올리고뉴클레오타이드이다

- [0150] SEQ ID NO: 64-65는 레트 MASP-2A를 생성하는데 사용되는 레트 MASP-2의 부위-지향 돌연변이유발용 올리고뉴클레오타이드이다
- [0151] 발명의 상세한 설명
- [0152] 본 발명은 MASP-2가 대체 보체 경로 활성화 개시에 필요하다는 놀라운 사실의 발견에 기초하고 있다. MASP-2/-인 녹아웃 마우스 모델을 사용하여, 본 발명자들은 고전적 경로를 손상시키지 않으면서 렉틴 매개 MASP-2 경로를 통하여 대체 보체 경로 활성화를 억제할 수 있다는 것을 보여주었으며 고전적 경로의 부재하에 대체 보체 활성화의 요구로서 렉틴-의존성 MASP-2 활성화를 확립하였다. 본 발명은 또한 면역 시스템의 고전적(C1q-의존성) 경로 성분을 손상시키지 않으면서 렉틴-매개 대체 보체 경로 활성화와 관련된 세포성 손상을 억제하기 위한 치료적 표적으로서의 MASP-2의 용도를 개시한다.
- [0153] I. 정의
- [0154] 본원에서 달리 정의하지 않는 한, 본원의 모든 용어는 본원의 기술분야의 숙련자가 이해하는 동일한 의미를 지니게된다. 다음의 정의는 본 발명의 명세서 및 청구항 내에 사용된 용어에 관하여 명확성을 제공하기 위하여 제공된다.
- [0155] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "MASP-2-의존성 보체 활성화"는 렉틴-의존성 MASP-2 활성화를 통하여 발생하는 대체 경로 보체 활성화이다.
- [0156] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대체 경로"는, 예를 들면, 진균 및 효모 세포벽의 지모산, 그람 음성 외막와 레빗 적혈구, 및 다수의 순수 폴리싸카라이드, 레빗 적혈구, 바이러스, 박테리아, 동물 종양 세포, 기생충 및 손상된 세포의 리포폴리싸카라이드(LPS)에 의하여 촉발된 보체 활성화이며, 이는 전통적으로 보체 인자 C3로부터의 C3b의 자발적 단백질분해 생성으로부터 발생하는 것으로 알려져 있다.
- [0157] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "렉틴 경로"는 혈청과 만난-결합 렉틴(MBL) 및 피콜린을 포함하는 비-혈청 탄수화물-결합 단백질의 특이적 결합을 통하여 발생하는 보체 활성화를 말한다.
- [0158] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "고전적 경로"는 외래 입자에 결합되는 항체에 의하여 촉발되는 보체 활성화를 말하며, 인식 분자 C1q의 결합을 필요로 한다.
- [0159] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "MASP-2 억제제"는 MASP-2에 결합하거나 또는 직접 상호작용하고 MASP-2-의존성 보체 활성화를 효과적으로 억제하는 모든 약제를 의미하며, 항-MASP-2 항체 및 이들의 MASP-2 결합 절편, 천연 및 합성 펩타이드, 소분자, 가용성 MASP-2 수용체, 발현 억제제 및 분리된 천연 억제제를 포함하며, 렉틴 경로 내에서 또 다른 인식 분자(예컨대, MBL, H-피콜린, M-피콜린, 또는 L-피콜린)에 결합하기 위한 MASP-2와 경쟁하는 펩타이드를 포괄하나 이러한 기타 인식 분자에 결합하는 항체를 포괄하지는 않는다. 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 20% 이상, 예컨대 50% 이상, 예컨대 90% 이상으로 MASP-2-의존성 보체 활성화를 감소시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시상태에서, MASP-2 억제제는 90% 이상 MASP-2-의존성 보체 활성화를 감소시킨다(즉, MASP-2 보체 활성화가 단지 10% 이하가 된다).
- [0160] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 모든 항체-생산 포유류(예컨대, 마우스, 레트, 레빗, 및 인간을 포함하는 영장류)로부터 유도된 항체 및 이들의 항체 절편을 포괄하며, MASP-2 폴리펩타이드 또는 이들의 부분에 특이적으로 결합한다. 예시적인 항체는 다클론, 단클론 및 재조합 항체; 다특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체); 인체적응형 항체; 무인 항체; 키메라, 마우스-인간, 마우스-영장류, 영장류-인간 단클론 항체; 및 항-이디오타입 항체를 포함하며, 모든 무손상 분자 또는 이들의 절편이 될 수 있다.
- [0161] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "항체 절편"은 일반적으로 항원 결합 또는 이들의 가변 영역을 포함하는 전장 항-MASP-2 항체에서 유도되거나 또는 관련된 부분을 의미한다. 항체 절편의 예에는 Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2 및 Fv 절편, scFv 절편, 이합체, 선형 항체, 단일-사슬 항체 분자 및 항체 절편으로부터 형성된 다특이적 항체를 포함한다.
- [0162] 본원에서 사용된 바와 같이, "단일-사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 절편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하며, 여기서 이러한 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에 제공된다. 일반적으로, Fv 폴리펩타이드는 VH와 VL 도메인간의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함하며, 이는 scFv가 소망하는 구조의 항원 결합을 형성할 수 있도록 한다.
- [0163] 본원에서 사용된 바와 같이, "키메라 항체"는 비-인간 종(예컨대, 설치류) 항체에서 유도된 가변 도메인 및 상보-결정 영역을 함유하는 재조합 단백질이며, 반면 항체 분자의 나머지는 인간 항체에서 유도된 것이다.

- [0164] 본원에서 사용된 바와 같이, "인체적응형 항체"는 인간 항체 프레임워크내로 이식된 비-인간 면역글로불린으로부터 유도된 특이적 상보-결정 영역을 확인하는 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 인체적응형 항체는 일반적으로 재조합 단백질이며, 항체 상보-결정 영역만이 비-인간 기원의 것이다.
- [0165] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "만난-결합 력틴"("MBL")는 만난-결합 단백질("MBP")과 동일한 의미이다.
- [0166] 본원에서 사용된 바와 같이, "막 공격 복합체"("MAC")는 막에 삽입되어 파괴시키는 말단 5개의 보체 성분(C5-C9)의 복합체이다. C5b-9를 참조한다.
- [0167] 본원에서 사용된 바와 같이, "대상체"는 인간, 비-인간 영장류, 개, 고양이, 말, 양, 염소, 소, 레빗, 돼지 및 설치류를 제한없이 포함하는 모든 포유류를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 아미노산 잔기는 다음과 같이 약어로 사용한다: 알라닌(Ala;A), 아스파라긴(Asn;N), 아스파르트산(Asp;D), 아르기닌(Arg;R), 시스테인(Cys;C), 글루탐산(Glu;E), 글루타민(Gln;Q), 글리신(Gly;G), 히스티딘(His;H), 이소류신(Ile;I), 류신(Leu;L), 라이신(Lys;K), 메티오닌(Met;M), 페닐알라닌(Phe;F), 프롤린(Pro;P), 세린(Ser;S), 트레오닌(Thr;T), 트립토판(Trp;W), 티로신(Tyr;Y), 및 발린(Val;V).
- [0168] 최광의로, 자연 발생 아미노산은 각 아미노산의 측쇄의 화학적 특성에 기초하여 그룹으로 나눌 수 있다. "소수성" 아미노산은 Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys 또는 Pro를 의미한다. "친수성" 아미노산은 Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg 또는 His를 의미한다. 이러한 아미노산 분류는 다음과 같이 추가적인 하단위로 나누어질 수 있다. "무전하 친수성" 아미노산은 Ser, Thr, Asn 또는 Gln이다. "산성" 아미노산은 Glu 또는 Asp이다. "염기성" 아미노산은 Lys, Arg 또는 His이다.
- [0169] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "보존적 아미노산 치환"은 각각의 다음의 군내에서 아미노산 간의 치환을 의미한다: (1) 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신, (2) 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판, (3) 세린 및 트레오닌, (4) 아스파르트산염 및 글루탐산염, (5) 글루타민 및 아스파라긴, 및 (6) 라이신, 아르기닌 및 히스티딘.
- [0170] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 본원에서 사용된 바와 같이 리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA)의 올리고머 또는 폴리머 또는 이들의 모사체를 말한다. 이 용어는 또한 자연 발생적 뉴클레오타이드, 당 및 뉴클레오타이드간 공유(골격) 결합 및 비-자연 발생적 변형을 포함하는 올리고뉴클레오타이드로 구성된 올리고핵염기를 포함한다.
- [0171] II. 대체 경로: 새로운 이해
- [0172] 보체 대체 경로는 효모 세포벽으로부터 제조된 지모산이 보체를 활성화시키는데 사용된다는 연구에 기초하여 1959년대 초반에 Louis Pillemer 및 그의 동료에 의하여 최초로 설명되었다 (Pillemer, L. et al., J. Exp. Med. 103:1-13, 1956; Lepow, I.H., J. Immunol. 125:471-478, 1980). 그 뒤로 지금까지, 지모산은 인간 및 설치류 혈청내의 대체 경로의 특이적 활성화제의 규범적 예시로 고려되어 왔다 (Lachmann, P.J., et al., Springer Semin. Immunopathol. 7: 143-162, 1984; Van Dijk, H., et al., J. Immunol. Methods 85:233-243, 1985; Pangburn, M. K., Methods in Enzymol. 162:639-653, 1988). 대체 경로 활성화의 통상의 널리 사용되는 측정법은 혈청을 플라스틱 웰상에 피복된 지모산과 함께 배양하고, 배양 후 고체상의 C3b 부착량을 측정하는 것이다. 기대하는 바와 같이, 정상 마우스 혈청으로 배양 후 지모산-피복 웰상의 실질적인 C3b 부착이 있었다(도 7B). 그러나, 동종접합 MASP-2-결핍 마우스의 혈청을 지모산-피복 웰에서 배양하면 정상 혈청에 비하여 C3b 부착이 실질적으로 감소하였다. 추가적으로, 이 측정법에서 MASP 2 유전자 내의 결핍을 위한 마우스 이중접합의 혈청을 사용하면 동종접합 MASP-2-결핍 마우스 혈청 및 정상 마우스 혈청에서 획득한 것들 간의 중간체인 C3b 부착의 수준을 나타낸다. 동일한 결과를 만난, 대체 경로를 활성화시킨다고 알려진 또 다른 폴리사카라이드로 피복된 웰을 사용하여 획득하였다(도 7A). MASP 2 유전자를 제외하고는 정상 및 MASP-2 결핍 마우스는 동일한 유전자 배경을 공유하기 때문에, 이러한 기대치 않았던 결과는 MASP-2가 대체 경로의 활성화에 필수적인 역할을 한다는 것을 입증하였다.
- [0173] 이러한 결과는 현재 의학 교과서 및 보체에 관한 최근의 연구에 필수적으로 설명된 바와 같이 대체 경로는 보체 활성화의 독립적이며, 자체-작동 경로가 아니라는 강력한 증거를 제공한다. 현재 널리 구독하는 과학 논문에서 대체 경로는 자발적 "틱-오버" C3 활성화의 증폭을 통하여 특정 입자화 표적(마이크로브, 지모산, 레빗 적혈구)상의 표면에 활성화된다. 그러나, 두 공지의 대체 경로 "활성화제"에 의한 MASP-2 녹아웃 마우스의 혈청내의 현저한 대체 경로 활성화의 부재는 "틱-오버 이론"으로 보체 활성화의 중요한 생리학적 기작을 설명하는 것을 불가능하게 한다.

- [0174] MASP-2 프로테아제가 렉틴 보체 캐스케이드의 개시를 책임지는 효소로서 특이적이며 잘 정의된 역할을 보유하는 것으로 알려져 있기 때문에, 이러한 결과는 후속적 대체 경로의 활성화의 임계적인 첫 단계로서 지모산 및 만난에 의한 렉틴 경로의 활성화에 관여한다. C4b는 대체 경로에 의해서가 아닌 렉틴 경로에 의해서 생성된 활성화 산물이다. 이러한 개념과 일치하게도, 정상 마우스 혈청을 지모산- 또는 만난-피복 웰로 배양하면 웰상에 부착된 C4b가 되며, 피복된 웰이 MASP-2-결핍 마우스의 혈청으로 배양되는 경우 이 C4b 부착은 실질적으로 감소한다(도 6A, 6B 및 6C).
- [0175] 대체 경로는, 보체 활성화의 비의존성 경로로서 널리 알려진 역할과 함께, 고전적 및 렉틴 경로를 통하여 초기에 촉발된 보체 활성화용 증폭 루프를 제공할 수도 있다(Liszewski, M. K. 및 J. P. Atkinson, 1993, in Fundamental Immunology, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York; Schweinle, J.E., et al., J. Clin. Invest. 84:1821-1829, 1989). 이 대체 경로-매개 증폭 기작, 고전적 또는 렉틴 보체 캐스케이드 각각의 활성화에 의하여 생성된 C3 전환효소(C4b2b)는 C3를 C3a와 C3b로 분열시키고, 따라서 C3bBb, 대체 경로 C3 전환효소를 형성하는데 관여할 수 있는 C3b를 제공한다.
- [0176] MASP-2 녹아웃 혈청 내의 대체 경로 활성화의 부재에 대한 가능한 설명은 렉틴 경로가 지모산, 만난, 및 다른 잠정적인 대체 경로의 "활성화제"에 의하여 초기 보체 활성화에 필요로 한다는 것이며, 반면 대체 경로는 보체 활성화를 증폭하기 위한 결정적 역할을 한다. 환언하자면, 대체 경로는 비의존성 선형 캐스케이드라기보다는 활성화를 위한 렉틴 및 고전적 보체 경로 의존성 피드포워드 증폭 루프이다.
- [0177] 전술한 바와 같이 2개의 별개의 경로(고전적, 대체 및 렉틴 경로)를 통하여 활성화된 보체 캐스케이드보다는, 우리의 결과는 두 주요 시스템으로 구성된 보체를 관찰하는 것이 더 정확하며, 이는 제1 근사치로, 보체 면역 방어 시스템의 선천성(렉틴) 및 후천성(고전적) 원에 상응하게 된다. 렉틴(MBP, M-피콜린, H-피콜린, 및 L-피콜린)은 선천성 보체 시스템을 촉발하는 특이적 인식 분자이며, 이 시스템은 렉틴 경로 및 유관 대체 경로 증폭 루프를 포함한다. C1q는 후천성 보체 시스템을 촉발하는 특이적 인식 분자이며, 이 시스템은 고전적 경로 및 유관 대체 경로 증폭 루프를 포함한다. 우리는 이러한 두 주요 보체 활성화 시스템을 각각 렉틴-의존성 보체 시스템과 C1q-의존성 보체 시스템이라한다.
- [0178] 면역 방어에 있어서의 필수적인 역할과 함께, 보체 시스템은 다수의 임상적 증상의 조직 손상에 기여한다. 따라서, 이러한 역효과를 예방하기 위한 치료학적으로 유효한 보체 억제제를 개발하기 위한 수요가 증가하고 있다. 보체가 두 주요 보체 활성화 시스템으로 구성된다는 인식에서 보체의 면역 방어 가능성이 완전히 차단되지 않은 특정 병리학적 상태를 유발하는 보체 활성화 시스템만을 특이적으로 억제하는 것이 매우 바람직하다는 인식이 되었다. 예를 들면, 렉틴-의존성 보체 시스템에 의하여 우세하게 매개되는 보체 활성화를 지닌 질환 상태에서, 이 시스템만을 특이적으로 억제하는 것이 유리하다. 이는 C1q-의존성 보체 활성화 시스템 손상되지 않게되어 면역 복합체 가공을 조절하고 감염에 대한 숙주 방어를 조력하게된다.
- [0179] 렉틴-의존성 보체 시스템을 특이적으로 억제하는 치료제 개발의 표적이 되는 바람직한 단백질 성분이 MASP-2이다. 렉틴-의존성 보체 시스템(MBL, H-피콜린, M-피콜린, L-피콜린, MASP-2, C2-C9, 인자 B, 인자 D, 및 프로페딘)의 모든 단백질 성분에서, MASP-2 만이 렉틴-의존성 보체 시스템에 유일하면서도 시스템을 기능하기 위하여 필요한 것이다. 렉틴(MBL, H-피콜린, M-피콜린 및 L-피콜린)은 렉틴-의존성 보체 시스템에서 유일한 성분이다. 그러나, 렉틴 성분 중의 어떤 하나의 손실이 렉틴 잉여성에 기인하여 시스템의 활성화를 필수적으로 억제하지 않는다. 렉틴-의존성 보체 활성화 시스템의 억제를 보장하기 위하여 모든 4종의 렉틴을 억제하는 것이 필요하다. 추가적으로, MBL 및 피콜린이 보체 비의존성 옵소닌 활성을 보유한 것으로 알려져 있기 때문에, 렉틴 기능을 억제하면 이 유리한 감염에 대한 숙주 방어 기작이 손실된다. 이에 반하여, MASP-2가 억제 표적인 경우, 이 보체-비의존성 렉틴 옵소닌 활성이 손상되지 않은 채로 남는다. 렉틴-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하기 위한 치료적 표적으로서의 MASP-2의 부가적인 이점은 MASP-2의 혈장 농도가 모든 보체 단백질 중에서 가장 낮은 점이다(~ 500 ng/ml); 따라서, MASP-2의 저농도의 고-친화도 억제제가 완전 억제를 달성하기 위하여 필요할 것이다(Moller-Kristensen, M., et al, J. Immunol Methods 282:159-167, 2003).
- [0180] **III. MASP-2 억제제를 사용한 다양한 질환 및 증상 및 치료 방법에 있어서의 MASP-2의 역할**
- [0181] **허혈 재관류 손상**
- [0182] 허혈 재관류 손상(I/R)은 허혈의 확장기 후 혈류가 회복될 때 발생한다. 이는 질환의 광범위한 스펙트럼 내에서 이환율 및 사망율의 일반적인 원인이다. 수술 환자는 대동맥류 복구, 심폐순환 우회술, 예를 들면, 장기 이식(예컨대, 심장, 폐, 간, 신장) 및 손가락/사지 재접합술과 관련된 혈관 재문합, 뇌졸중, 심근 경색 및 쇼크 후

혈류역학 소생술 및/또는 외과적 과정 후 취약한 상태이다. 죽상경화 질환 환자는 심근 경색, 뇌졸중, 및 색전증-유도성 창자 및 하지 허혈에 걸리기 쉽다. 외상 환자는 종종 사지의 일시적 허혈을 겪는다. 이와 함께, 모든 대량 혈액 손실의 원인은 전신 I/R 반응을 유도한다.

[0183] I/R 손상의 병태생리학은 진행에 기여하는 최소한 두 주요 인자의 복합이다: 보체 활성화 및 산소 라디칼-매개 손상을 수반하는 호중구 자극. I/R 손상에 있어서, 보체 활성화는 30년전 심근 경색에서 최초로 설명되었으며, I/R 조직 손상에 대한 보체 시스템의 기열르 다양하게 조사해왔다(Hill, J.H., et al., J. Exp. Med. 133:885-900, 1971). 축적된 증거들은 I/R 손상의 주요 매개체로서 보체를 지적한다. 보체 억제제는 수종의 I/R 동물 모델의 제한적 손상에서 성공을 거두어 왔다. 초기 연구에서, C3 고갈은 코브라 독 인자의 주입으로 달성되었으며, 신장 및 심장 내의 I/R에 유리하다고 보고되었다(Maroko, P. R., et al., 1978, J. Clin Invest. 61:661-670, 1978; Stein, S.H., et al, Miner Electrolyte Metab. 11:256-61, 1985). 그러나, 보체 수용체1(sCR1)의 가용성 형태는 심근 I/R 손상의 예방에 사용되는 제1 보체-특이적 억제제였다 (Weisman, H.F., et al., Science 249:146-51, 1990). 심근 I/R의 sCR1 치료는 재관류 후 백혈구 침윤 감소 및 심장 내피의 C5b-9 복합체 부착의 감소와 관련된 경색을 약화시킨다.

[0184] 실험적 심근 I/R에서, 재관류 전에 투여된 C1 에스테라아제 억제제(C1 INH)는 C1q의 부착을 예방하고 및 심장 근육 괴사를 현저하게 감소시킨다(Buerke, M., et al., 1995, Circulation 91:393-402, 1995). C3가 유전적으로 결핍된 동물은 골격근 또는 창자 허혈 후 국부 조직 괴사가 적었다(Weiser, M.R., et al., J. Exp. Med. 183:2343-48, 1996).

[0185] 막 공격 복합체는 보체-지향 손상의 궁극적인 운반체였으며, C5-결핍 동물의 연구는 I/R 손상 모델 내에서 감소된 국부 및 원격 손상을 나타낸다(Austen, W.G. Jr., et al., Surgery 126:343-48, 1999). 보체 활성화 억제제, 가용성 Crry(보체 수용체-유관 유전자 Y)는 무린 창자 재관류 발병 전 및 후에 공급되는 경우 손상에 효과적인 것으로 나타났다(Rehrig, S., et al., J. Immunol. 167:5921-27, 2001). 골격근 허혈 모델에서, 가용성 보체 수용체 1(sCR1)의 사용은 재관류의 개시 후 공급되는 경우 근육 손상을 감소시켰다(Kyriakides, C, et al., Am. J. Physiol. 세포 Physiol. 281:C244-30, 2001). 심근 I/R의 돼지 모델에서, 재관류 전에 아나필라톡신 C5a에 대한 단클론 항체("MoAb")로 치료한 동물은 경색을 감소시켰음을 보여주었다(Amsterdam, E.A., et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 268:H448-57, 1995). C5 MoAb로 치료한 레트가 심근 내의 경색 크기, 호중구 침윤 및 세포자멸사를 감소시켰음을 입증하였다(Vakeva, A., et al., Circulation 97:2259-67, 1998). 이러한 실험 결과는 I/R 손상의 발병기전 내의 보체 활성화의 중요성을 부각시켰다.

[0186] 보체 경로(고전적, 렉틴 또는 대체)가 I/R 손상에서의 보체 활성화에 우세하게 관여한다는 사실은 명확하지 않다. 문헌 Weiser et al.은 C3- 또는 C4- 녹아웃 마우스가 혈관 투과성의 현저한 감소에 기초하여 I/R 손상에 대하여 보호된다는 사실을 보여줌으로써 골격 I/R에서 렉틴 및/또는 고전적 경로의 중요한 역할을 입증하였다(Weiser, M. R., et al., J. Exp. Med. 183:2343-48, 1996). 이에 반하여, C4 녹아웃 마우스에 의한 신장 I/R 실험은 현저한 조직 보호가 없다는 것을 나타냈으나, 반면 C3-, C5-, 및 C6-녹아웃 마우스는 손상에서 보호되었으며, 이는 신장 I/R 손상시 보체 활성화는 대체 경로를 통하여 발생한다는 것을 암시한다(Zhou, W., et al., J. Clin. Invest. 105:1363-71, 2000). 인자 D 결핍 마우스를 사용하여, 문헌 Stahl et al.에서는 최근 마우스 창자 I/R 내의 대체 경로에서의 중요한 역할을 한다는 증거를 제시하였다(Stahl, G., et al., Am. J. Pathol. 162:449-55, 2003). 이에 반하여, 문헌 Williams et al.에서는 C3 장기 염색의 감소 및 C4 및 IgM(Rag1-/-) 결핍 마우스의 손상로부터의 보호를 보여줌으로써 마우스 창자 I/R 손상의 개시를 위한 고전적 경로에 우세한 역할을 암시하였다(Williams, J.P., et al., J. Appl. Physiol. 86:938-42, 1999).

[0187] 레트 만난-결합 렉틴(MBL)에 대한 단클론 항체로 심근 I/R 모델 레트를 치료하면 허혈후 재관류 손상이 감소된다(Jordan, J.E., et al., Circulation 104:1413-18, 2001). MBL 항체는 산화 스트레스 후 시험관 내 내피 세포의 보체 부착을 감소시키며, 심근 I/R 손상 내의 렉틴 경로의 역할을 나타낸다(Collard, CD., et al., Am. J. Pathol. 156:1549-56, 2000). 일부 장기의 I/R 손상은 천연 항체, 및 고전적 경로의 활성화인 특이적 카테고리 I의 IgM에 의하여 매개될 수 있다는 증거가 존재한다(Fleming, S.D., et al., J. Immunol. 169:2126-33, 2002; Reid, R.R., et al., J. Immunol. 169:5433-40, 2002).

[0188] 수종의 보체 활성화 억제제는 심근 I/R 합병증에 기인한 이환 및 사망을 예방하기 위한 잠재적인 치료제로서 개발되었다. 두 종의 이러한 억제제, sCR1(TP10) 및 인체적용형 항-C5 scFv(펙셀리주맵)는 II 임상시험 II기를 마쳤다. 펙셀리주맵은 추가의 임상시험 III기를 마쳤다. TP10는 I/II기 시험에서 환자가 잘 견디고, 유리하였으나, 시험 II기 말인 2002년 2월경 1차 목표를 달성하지 못하였다. 그러나, 개흉 수술을 거친 고위험

군 남성 환자의 데이터의 아군 분석에서 사망율 및 경색 크기를 현저하게 감소시켰음을 보여주었다. 인체적응형 항-C5 scFv의 투여는 COMA 및 COMPLY II 기 시험에서 전체 환자 급성 심근 경색 사망율을 감소시켰으나, 1차 목표를 달성하지 못하였다(Mahaffey, K.W., et al., Circulation 108:1176-83, 2003). 심장동맥 우회술 후 외과적으로 유도된 결과를 향상시키기 위한 III기 항-C5 scFv 임상시험(PREVIO-CABG)의 결과가 최근 발표되었다. 이 연구의 1차 목표는 달성되지 않았지만, 이 연구는 수술후 환자 이환율 및 사망율의 전체적인 감소를 입증하였다.

[0189] Dr. Walsh 및 동료연구자들은 MBL가 부재하여 MBL-의존성 력틴 경로 활성화를 회피하나 완전히-활성화된 고전적 보체 경로를 지닌 마우스가 심장 기능을 결과적으로 보존하면서 심장 재관류 손상으로부터 보호된다는 것을 입증하였다(Walsh et al., J. Immunol. 775:541-46, 2005). 현저하게도, 고전적 보체 경로의 인식 성분인 C1q가 결핍 되었으나 무손상 MBL 보체 경로를 보유한 마우스가 손상로부터 보호되지 못하였다. 이러한 결과는 력틴 경로가 심근 재관류 허혈 손상의 발병기전내의 주요 역할을 보유한다는 것을 나타낸다.

[0190] 보체 활성화는 위장관 허혈-재관류(I/R)에 관련된 조직 손상에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. GI/R 무린 모델을 사용하여, Hart 및 동료연구자들의 최근 연구는 유전적으로 MBL 결핍인 마우스가 위장관 I/R 후 창자 손상로부터 보호되었다고 보고하였다(Hart et al., J. Immunol. 774:6373-80, 2005). MBL-결핍 마우스에 재조합 MBL를 첨가하면 위장관 I/R 후 미치로 MBL-결핍 마우스에 비하여 손상을 현저히 증가시킨다. 이에 반하여, 유전적으로 고전적 경로 인식 성분인 C1q가 결핍된 마우스는 위장관 I/R 후 조직 손상로부터 보호되지 못하였다.

[0191] 신장 I/R는 급성 신장 기능 상실의 주요 원인이다. 보체 시스템은 신장 I/R 손상에 필수적으로 관여하는 것으로 보인다. 최근 연구에서, de Vries 및 동료연구자들은 력틴 경로가 신장 I/R 손상 실험 및 임상적 단계에서 활성화된다는 사실을 보고하였다(de Vries et al., Am. J. Path. 165:1677-88, 2004). 더욱이, 력틴 경로가 진행되며, 신장 I/R 중에 보체 C3, C6, 및 C9 부착으로 동시-국부화된다. 이러한 결과는 보체 활성화의 력틴 경로 신장 I/R 손상에 관여한다는 사실을 적시한다.

[0192] 본 발명의 일 특징은 약학적 담체 중의 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량으로 허혈 재관류 환자를 치료함으로써 허혈 재관류 손상의 치료하는 것에 관한 것이다. MASP-2 억제제는 동맥, 정맥, 두개내, 근육내, 피하, 또는 다른 비경구 투여, 및 잠재적으로 비-펩티드성 억제제의 경구 투여, 및 가장 적합하게는 동맥 또는 정맥 투여에 의하여 대상체에 투여된다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 투여는 허혈 재관류 후 즉시 또는 가능한 빨리 수행하는 것이 적절하다. 예컨대 재관류가 조절된 환경하에서 발생하는 경우(예컨대, 대동맥류 복구, 장기 이식 또는 심각한 외상성 사지 또는 손가락 재접합 후), MASP-2 억제제는 재관류 전 및/또는 과정 및/또는 후에 투여될 수 있다. 투여는 최적 치료 효과를 위하여 임상의가 결정한 바에 따라 주기적으로 반복될 수 있다.

[0193] 죽상동맥경화증

[0194] 보체 활성화가 인간 내의 아테롬경화발생과 관련되어 있다는 상당한 증거가 있다. 다수의 연구들은 현저한 보체 활성화가 정상 동맥에서 발생하지 않더라도, 보체는 죽상경화 병변에서 널리 활성화되며, 취약하고 파열된 플라크에서 특히 강하다는 것을 확실하게 보여주었다. 말단 보체 경로의 성분은 인간 죽종 내에서 빈번하게 발생한다(Niculescu, F., et al., Mol. Immunol. 36:949-55.10-12, 1999; Rus, H.G., et al., Immunol. Lett. 20:305-310, 1989; Torzewski, M., et al., Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 18:369-378, 1998). 동맥상 병변내의 C3 및 C4 부착이 입증되었다(Hansson, G. K., et al., Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. (A) 92:429-35, 1984). C5b-9 부착의 정도는 병변의 심각성과 상관관계가 있다고 밝혀졌다(Vlaicu, R., et al., Atherosclerosis 57:163-77, 1985). C5b-9이 아닌 보체 iC3b의 부착은 파열되고 취약한 플라크에서 특히 강력하며, 이는 보체 활성화가 급성 심장 증후군 내의 요인이 될 수 있다고 암시한다(Taskinen S., et al., Biochem. J. 367:403-12, 2002). 실험적 래빗 죽종에서, 보체 활성화가 병변의 발달을 진행시킨다고 알려져 있다(Seifer, P.S., et al., Lab Invest. 60:747-54, 1989).

[0195] 죽상경화 병변에서, 보체는 고전 및 대체 경로를 통하여 활성화되나, 력틴 경로를 통한 보체 활성화의 증거는 아직 거의 없다. 동맥 벽의 수종의 성분이 보체 활성화를 촉발시킬 수 있다. 보체의 고전적 경로는 효소적으로 분해된 LDL에 결합된 C-반응성 단백질(CRP)에 의하여 활성화될 수 있다(Bhakdi, S., et al., Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 19:2348-54, 1999). 이 연구와 일치하는 것은 말단 보체 단백질이 초기 인간 병변의 내막에서 CRP로 공동국부화 된다는 발견이다(Torzewski, J., et al., Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 18:1386-92, 1998). 이와 같이, 병변 내의 산화된 LDL에 특이적인 면역글로블린 M 또는 IgG 항체는 고전적 경로를 활성화시킬 수 있다(Witztum, J. L., Lancet 344:793-95, 1994). 인간 죽상경화 병변에서 분리된 지질은 미에스테르화된 콜레스테롤의 함량이 높으며, 대체 경로를 활성화할 수 있다 (Seifert P. S., et al., J. Exp. Med.

172:547-57, 1990). 페렴 클라미디아, 죽상경화 병변과 빈번하게 연관된 그람-음성 박테리아는 보체의 대체 경로를 활성화시킬 수 있다(Campbell L.A., et al., J. Infect. Dis. 172:585-8, 1995). 죽상경화 병변 내에 존재하는 다른 잠재적인 보체 활성화제는 콜레스테롤 결정 및 세포 잔해를 포함하며, 이들 둘 모두는 대체 경로를 활성화시킬 수 있다(Seifert, P. S., et al., Mol. Immunol. 24:1303-08, 1987).

[0196] 보체 활성화의 부산물은 죽상경화 병변의 발달에 영향을 미치는 다수의 생물학적 특성을 보유한다고 알려져 있다. 국부 보체 활성화는 세포 용해를 유도할 수 있으며, 진행된 병변의 괴사 중심에서 발견되는 세포 잔해의 최소한 일부를 생성한다(Niculescu, F. et al., Mol. Immunol. 36:949-55.10-12, 1999). 저용해 보체 활성화는 아테롬경화발생시 평활근 세포 증식 및 동맥 내막으로의 단핵구 침윤에 기여하는 현저한 요인이 될 수 있다(Torzewski J., et al., Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 18:673-77, 1996). 보체의 지속적 활성화는 지속적 염증을 유발시키기 때문에 결정적일 수 있다. 혈액 혈장의 보체 성분의 침윤과 함께, 동맥상 세포는 보체 단백질의 메신저 RNA를 발현하며, 다양한 보체 성분의 발현은 죽상경화 병변 내에서 상향조절된다(Yasojima, K., et al., Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 21:1214-19, 2001).

[0197] 아테롬경화발생시의 보체 단백질 결핍에 관한 제한된 수의 연구가 보고되었다. 실험 동물 모델 내의 결론은 논란이 있다. 레트에서는, 비타민 D의 독성 투약량에 의하여 유도된 죽상경화-유사 병변의 형성은 보체-결핍 동물 내에서 감소되었다(Geertinger P., et al., Acta. Pathol. Microbiol. Scand. (A) 78:284-88, 1970). 추가적으로, 콜레스테롤-섭취 레빗에서는, 유전적 C6 결핍(Geertinger, P., et al., Artery 1:177-84, 1977; Schmiedt, W., et al., Arterioscl. Thromb. Vase. Biol. 18:1790-1795, 1998) 또는 항보체제 K-76 COONa(Saito, E., et al., J. Drug Dev. 3:147-54, 1990)에 의한 보체 억제제 혈청 콜레스테롤 수준에 영향을 미치지 않고 죽상동맥경화증의 발달을 억제한다. 이에 반하여, 최근 연구는 C5 결핍이 아포지질단백질 E (ApoE) 결핍 마우스의 죽상경화 병변의 발달을 감소시키지 않는다는 사실을 보고하였다(Patel, S., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 286:164-70, 2001). 그러나, 또 다른 연구에서는 C3 결핍이거나 또는 결핍이 아닌 LDLR-결핍(IdIr-) 마우스 내의 죽상경화 병변의 발달이 평가되었다(Buono, C, et al., Circulation 105:3025-31, 2002). 이들은 죽종의 죽상경화-유사 병변으로의 돌연변이는 무손상 보체 시스템의 존재에 부분적으로 의존한다는 것을 알아내었다.

[0198] 본 발명의 일 특징은 죽상동맥경화증에 걸려있거나, 걸리기 쉬운 대상체를 약학적 담체 중의 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량으로 치료함으로써 죽상동맥경화증을 치료 또는 예방하는 것에 관련된 것이다. MASP-2 억제제는 동맥, 정맥, 경맥내, 두개내, 근육내, 피하 또는 다른 비경구 투여, 및 잠재적으로 비-펩티드성 억제제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. MASP-2 억제 조성물의 투여는 대상체 내의 죽상동맥경화증의 진단 후 또는 이러한 증상 발달의 고위험성의 대상체에서 예방적으로 수행될 수 있다. 투여는 최적 치료 효과를 위하여 임상의가 결정한 바에 따라 주기적으로 반복될 수 있다.

[0199] **다른 혈관 질환 및 증상**

[0200] 내피는 면역 시스템에 널리 노출되어 있으며, 특히 혈장 내에 존재하는 보체 단백질에 취약하다. 보체-매개 혈관 손상은 죽상동맥경화증(Seifert, P. S., et al., atherosclerosis 73:91-104, 1988), 허혈-재관류 손상(Weisman, H.F., Science 249:146-51, 1990) 및 심근 경색(Tada, T., et al., Virchows Arch 430:327-332, 1997)을 포함하는 심혈관 시스템의 수종의 질환의 병태생리학에 기여한다고 알려져 있다. 증거들은 보체 활성화가 다른 혈관 증상에 확장될 수 있다는 것을 암시한다.

[0201] 예를 들면, 보체 활성화는 다수의 혈관염의 발병기전에 기여한다는 증거가 있으며: 헤노흐-셴라인 자반 신장염, 전신성 홍반 루푸스-유관 혈관염, 류마티스 관절염과 관련된 혈관염(소위 악성 류마티스 관절염), 면역 복합 혈관염, 및 타카야수병을 포함한다. 헤노흐-셴라인 자반 신장염은 면역 발병기전을 지닌 소혈관의 전신 혈관염의 형태이며, 렉틴 경로를 통하여 C5b-9-유도성 내피 손상을 유도하는 보체 활성화가 중요한 기작으로서 인식된다(Kawana, S., et al., Arch. Dermatol. Res. 282:183-7, 1990; Endo, M., et al., Am J. Kidney Dis. 35:401-7, 2000). 전신성 홍반 루푸스(SLE)는 다수의 장기, 예컨대 피부, 신장, 관절, 간장막 표면, 및 중추신경 시스템 등에 영향을 미치는 전신성 자가면역 질환의 예이며, 빈번하게 심각한 혈관염에 관된다. 내피 세포와 결합하는 IgG 항-내피 항체 및 IgG 복합체가 활성 SLE를 지닌 환자의 혈청내에 존재하며, IgG 면역 복합체 및 보체의 부착은 SLE 혈관염 환자의 혈관벽내에서 발견된다(Cines, D. B., et al., J. Clin. Invest. 73:611-25, 1984). 혈관염에 관련된 류마티스 관절염, 소위 악성 류마티스 관절염(Tomooka, K., Fukuoka Igaku Zasshi 80:456-66, 1989), 면역-복합체 혈관염, A형 간염에 관련된 혈관염, 백혈구과괴성 혈관염, 및 타카야수병으로 알려진 동맥염은 또 다른 다형태군의 인간 질환을 형성하며, 여기서 내피 및 다른 세포 유형에 대한 보체-의존성 세포독성

은 문서화된 역할을 한다(Tripathy, N.K., et al., J. Rheumatol. 28:805-8, 2001).

[0202] 보체 활성화는 확장 심근병증에 역할을 한다는 사실을 알려주는 주는 증거가 있다. 확장 심근병증은 심장 팽창 및 손상된 심장 수축 기능의 증후군이다. 최근 데이터는 심근내의 진행중인 염증이 질환의 발달에 기여할 수 있다는 것을 나타낸다. C5b-9, 보체의 말단 막 공격 복합체는 면역글로블린 부착 및 TNF-알파의 심근 발현과 현저한 상관관계가 있다고 알려져 있다. 확장 심근병증 환자 28명의 심근 생검에서, C5b-9의 심근 축적이 입증되었으며, 이는 심근내의 만성 면역글로블린-매개 보체 활성화가 확장 심근병증의 진행에 부분적으로 기여한다는 것을 나타낸다(Zwaka, T.P., et al., Am. J. Pathol. 161(2):449-57, 2002).

[0203] 본 발명의 일 특징은 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 투여함으로써 심혈관 증상, 뇌혈관 증상, 말초 (예컨대, 근골격) 혈관 증상, 신장혈관 증상, 및 장간막/장관 혈관 증상을 포함하는 혈관 증상의 치료에 관한 것이다. 본 발명에 적합하다고 생각되는 증상은 제한없이: 혈관염, 예컨대 헤노흐-셴라인 자반 신장염, 전신성 홍반 루푸스-유관 혈관염, 류마티스 관절염과 관련된 혈관염(소위 악성 류마티스 관절염), 면역 복합 혈관염, 및 타카야수병; 확장 심근병증; 당뇨병성 혈관병증; 가와사키병(동맥염); 및 정맥 공기 색전증(VGE)을 포함한다. 또한, 보체 활성화는 관강내 외상 및 심혈관 침습 과정에 관련된 외래물질 염증 반응의 결과로서 발생된다는 것이 주어졌으며, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 스텐트 삽입 후 재협착, 회전축상반 절제술 및/또는 경피경혈관 심장동맥 확장술 (PTCA), 단독으로 또는 다른 재협착 억제제와 조합하여 억제에 사용될 수 있다고 알려져 있고, 예컨대 이는 U.S. Patent No. 6,492,332(Demopoulos)에서 개시하였다.

[0204] MASP-2 억제제는 동맥, 정맥, 근육내, 경막내, 두개내, 피하 또는 다른 비경구 투여, 및 잠재적으로 비-펩티드성 억제제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. 투여는 최적 치료 효과를 위하여 임상의가 결정한 바에 따라 주기적으로 반복될 수 있다. 재협착의 억제를 위하여, MASP-2 억제 조성물은 스텐트 삽입 또는 죽종 절제 또는 혈관형성 과정 전 및/또는 도중 및/또는 후에 투여될 수 있다. 대안적으로, MASP-2 억제 조성물은 스텐트 상에 피복되거나 또는 그 안으로 통합될 수 있다.

[0205] **위장관 장애**

[0206] 궤양 대장염 및 크론병은 염증 배변 질환(IBD)의 영역에 속하는 배변의 만성 염증 장애이다. IBD는 미지의 기원의 자연발생, 만성, 재발 염증으로 특성화된다. 인간 및 실험 동물 모두의 질환에 대한 면밀한 연구임에도 불구하고, 병리학의 정확한 기작은 여전히 미지이다. 그러나, 보체 시스템은 IBD 환자에서 활성화된다고 알려져 있으며, 질환 발병기전에서 역할을 한다고 알려져 있다(Kolios, G., et al., Hepato-Gastroenterology 45:1601-9, 1998; Elmgreen, J., Dan. Med. Bull. 33:222, 1986).

[0207] C3b 및 다른 활성화된 보체 산물은 IBD 환자의 표면 상피 세포의 관강내면, 및 점막내 근육 및 점막하 혈관에서 발견된다는 것을 나타내었다(Halstensen, T. S., et al., Immunol. Res. 10:485-92, 1991; Halstensen, T.S., et al., Gastroenterology 98:1264, 1990). 추가적으로, 다형핵 세포 침윤, 일반적으로 C5a 생성의 결과는 염증 배변에서 림포카인으로 관찰된다(Kohl, J., Mol. Immunol. 38:175, 2001). 다기능성 보체 억제제 K-76는 소규모 임상 연구(Kitano, A., et al., Dis. Colon Rectum 35:560, 1992), 및 카라지닌-유도성 대장염 레빗 모델(Kitano, A., et al., Clin. Exp. Immunol. 94:348-53, 1993)에서 궤양 대장염의 증상 발달을 산출한다고 보고되었다.

[0208] 신규의 인간 C5a 수용체 길항제는 IBD의 레빗 모델의 질환 병리학에 대하여 보호된다고 나타난다(Woodruff, T.M., et al, J. Immunol. 171:5514-20, 2003). 파괴-가속 인자(DAF), 막 보체 조절 단백질 내에 유전적으로 결핍이 있는 마우스는 IBD 모델에 사용되어 조직 손상을 상당히 크게하고, 전염증 사이토카인 생산을 증가시키게 된다(Lin, F., et al., J. Immunol. 172:3836-41, 2004). 따라서, 보체의 대조구는 창자 항상성을 조절하는데 중요하며, IBD의 발달에 관여하는 주요 병원성 기작이 될 수 있다.

[0209] 본 발명은 따라서 약학적 담체 중의 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 장애를 겪고 있는 환자에 투여함으로써 체장염, 계실염 및 배변 장애 예컨대 크론병, 궤양 대장염, 및 과민성 대장 증후군을 포함하나 이에 한정되지 않는 염증 위장관 장애를 겪는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 대상체에 동맥, 정맥, 근육내, 피하, 경막내, 두개내 또는 다른 비경구 투여, 및 잠재적으로 비-펩티드성 억제제의 경구 투여로 투여될 수 있다. 투여는 최적 치료 효과를 위하여 임상의가 결정한 바에 따라 주기적으로 반복될 수 있다.

[0210] **폐순환 증상**

[0211] 보체는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)(Ware, L, et al., N. Engl. J. Med. 342:1334-49, 2000); 수혈-관련 급성

폐 손상(TRALI)(Seeger, W., et al., Blood 76:1438-44, 1990); 허혈/재관류 급성 폐 손상(Xiao, F., et al., J. Appl. Physiol. 82:1459-65, 1997); 만성 폐쇄 폐순환 질환(COPD)(Marc, M.M., et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (Epub ahead of print), March 23, 2004); 천식(Krug, N., et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:1841-43, 2001); 베게너육아종증(Kalluri, R., et al., J. Am. Soc. Nephrol. 8:1795-800, 1997); 및 항사구체 기저막 질환(긧과스쳐 질환) (Kondo, C, et al., Clin. Exp. Immunol. 124:323-9, 2001)을 포함하는 다수의 폐 염증 장애의 발병기전에 관여하고 있다.

[0212]

현재 많은 ARDS 병태생리는 감염 또는 다른 자극에 대한 정상 반응으로서 개시되는 미조절 염증 캐스케이드에 관여하나, 궁극적으로 현저한 숙주의 자가손상을 일으킨다는 것이 수용된다(Stanley, T.P., Emerging Therapeutic Targets 2:1-16, 1998). ARDS 환자는 포괄적인 보체 활성화의 증거를 거의 전체적으로 보여주며(보체 성분 C3a 및 C5a의 증가된 혈장 수준), 보체 활성화의 정도는 ARDS의 발달과 결과에 상관관계가 있다(Hammerschmidt, D.F., et al., Lancet 1:947-49, 1980; Solomkin, J.S., et al., J. Surgery 97:668-78, 1985).

[0213]

다양한 실험 및 임상적 데이터는 ARDS 병태생리학에서 보체 활성화의 역할을 한다는 것을 나타낸다. 동물 모델에 있어서, 보체의 전신성 활성화는 인간 ARDS에서 보여주는 것과 유사한 조직병리학으로 급성 폐 손상을 유도한다(Till, G.O., et al., Am. J. Pathol. 129:44-53, 1987; Ward, P.A., Am. J. Pathol. 149:1081-86, 1996). 일반적인 보체 고갈 또는 C5a의 특이적 억제에 의한 보체 캐스케이드 억제는 급성 폐 손상 동물 모델에서 보호를 하게된다(Mulligan, M.S., et al., J. Clin. Invest. 98:503-512, 1996). 래트 모델에서, sCR1는 보체- 및 호중구-매개 폐 손상에서 보호적 효과를 보유한다(Mulligan, M.S., Yeh, et al., J. Immunol. 148:1479-85, 1992). 이와 함께, 사실상 모든 보체 성분은 타입 II 파리 세포, 파리마크로파지 및 폐 섬유아세포에의하여 폐 내에서 국부적으로 생산될 수 있다(Hetland, G., et al., Scand. J. Immunol. 24:603-8, 1986; Rothman, B. L, et al., J. Immunol. 145:592-98, 1990). 따라서 보체 캐스케이드는 폐 염증에 현저하게 기여하며, 결과적으로, ARDS에의한 폐 손상으로 자리매김한다.

[0214]

천식은 본질적으로, 염증 질환이다. 알러지 천식의 기초적인 특징은 다양한 특이적 및 비특이적 자극에 대한 기도 과민반응, 과도한 기도 점액 생산, 폐순환 호산구증가증, 및 혈청 IgE 농도의 증가를 포함한다. 천식이 다인자적 기원임에도, 이는 일반적으로 유전적으로 예민한 개인에 있어서 일반 환경 항원에 대한 부적절한 면역학적 반응의 결과로 발생한다고 알려져 있다. 보체 시스템은 인간 천식성 폐 내에서 고도로 활성화된다는 사실이 문헌에 보고되었다(Humbles, A.A., et al., Nature 406:998-01, 2002; van de Graf, E.A., et al., J. Immunol. Methods 147:241-50, 1992). 추가적으로, 동물 모델 및 인간의 최근 데이터는 보체 활성화가 질환 발병기전에 기여하는 중요한 기작이라는 증거를 제공한다(Karp, C. L., et al., Nat. Immunol. 1:221-26, 2000; Bautsch, W., et al., J. Immunol. 165:5401-5, 2000; Drouin, S.M., et al., J. Immunol. 169:5926-33, 2002; Walters, D.M., et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 27:413-18, 2002). 천식의 렉틴 경로에서의 역할은 만성 진균 천식의 무린 모델을 사용하는 연구에 의하여 지지되었다. 만난-결합 렉틴내에서 유전적 결핍을 지닌 마우스는 이 천식 모델 내의 정상 동물에 비하여 변화된 기도 과민반응을 발달시키킨다 (Hogaboam, CM., et al., J. Leukoc. Biol. 75:805-14, 2004). 보체는 천식에서 수개의 경로를 통하여 활성화될 수 있으며: (a) 알러지원-항체 복합체 형성의 결과인 고전적 경로를 통한 활성화; (b) 알러지원 표면상의 대체 경로 활성화; (c) 알러지원상의 탄수화물 구조 관여를 통한 렉틴 경로의 활성화; 및 (d) 염증 세포에서 방출된 프로테아제에 의한 C3 및 C5의 분열을 포함한다. 천식에서 보체의 역할을 하는 복합체에 대하여 많은 것을 알지 못하지만, 알러지 천식을 발달시키는데 관여하는 보체 활성화 경로의 확인은 이 증가하는 중요한 질환의 신규의 치료 전략 발전에 포커스를 제공한다.

[0215]

동물 모델을 사용하는 다수의 연구들은 알러지 표현형의 발달에 있어서 C3 및 이의 분열 산물, C3a에 대하여 결정적인 역할을 한다고 입증하였다. Drouin 및 동료연구자는 난알부민 (OVA)/아스페라길루스 푸미가투스 (Aspergillus fumigatus) 천식 모델 내의 C3-결핍 마우스를 사용하였다(Drouin et al., J. Immunol. 167:4141-45, 2001). 이들은 알러지원으로 시험하는 경우, C3 결핍 마우스는 매치된 야생형 대조군 마우스에 비하여 현저하게 감소된 AHR 및 폐 호산구증가증을 나타낸다는 것을 발견하였다. 추가적으로, 이러한 C3-결핍 마우스는 상당히 감소한 수의 IL-4 생산 세포 및 감소된 Ag-특이적 IgE 및 IgG1 반응을 보유한다. Taube 및 동료연구자들은 마우스 보체 수용체 Crry의 가용성 재조합 형태를 사용하여 C3 및 C4의 수준에서 차단 보체 활성화에 의하여 천식 OVA 모델 내에서 유사한 결과를 얻었다(Taube et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 168:1333-41, 2003). Humbles 및 동료연구자들은 마우스내의 C3aR를 결실시켜 호산구 기능에서 C3a의 역할을 조사하였다(Humbles et al., Nature 40(5):998-1001, 2000). 천식 OVA 모델을 사용하여, AHR의 발달을 에어로졸화된 메타

콜린으로부터 거의 완전하게 보호한다는 것을 관찰하였다. Drouin 및 동료연구자들(2002)은 OVA/A 푸미가투스 천식 모델 내의 C3aR-결핍 마우스를 사용하였으며, 감소된 AHR, 호산구 사용, TH2 사이토카인 생산, 및 폐 점액 분비, 및 감소된 Ag-특이적 IgE 및 IgG1 반응을 하는 C3-결핍 동물에 매우 유사한 알러지 반응을 감소시킨다는 것을 입증하였다(Drouin et al., J. Immunol. 169:5926-33, 2002). Bautsch 및 동료연구자들은 C3aR이 자연적 결실된 기니아피그 주를 사용하여 조사를 수행하였다(Bautsch et al., J. Immunol. 165:5401-05, 2000). 알러지 천식의 OVA 모델을 사용하여, 이들은 항원 시험후 기도 기관지수축의 현저한 보호를 관찰하였다.

[0216]

동물 모델을 사용하는 다수의 최근 연구들은 알러지 표현형의 발달에 있어서 C5 및 이들의 분열 산물 C5a의 결정적인 역할을 입증하였다. Abe 및 동료연구자는 C5aR 활성화와 기도 염증, 사이토카인 생산 및 기도 반응성을 연결하는 증거를 보고한바 있다(Abe et al., J. Immunol. 167:4651-60, 2001). 이러한 연구들에서, 가용성 CR1에 의한 보체 활성화의 억제, 푸탄(futhan, 보체 활성화 억제제) 또는 합성 헥사펩타이드 C5a 길항제는 메타콜린에 대한 염증 반응 및 기도 반응성을 차단한다. 차단 항-C5 단클론 항체를 사용한 연구들에서, Peng 및 동료연구자들은 C5 활성화가 천식 OVA 모델 내의 기도 염증 및 AHR에 실질적으로 기여한다는 것을 발견하였다(Peng et al., J. Clin. Invest. 115:1590-1600, 2005). 또한, Baelder 및 동료연구자들은 A. fumigatus 천식 모델에서 C5aR의 차단이 AHR를 실질적으로 감소시켰다는 것을 보고하였다(Baelder et al., J. Immunol. 774:783-89, 2005). 추가적으로, C3aR 및 C5aR 모두의 차단은 기도 염증을 현저하게 감소시키며, 이는 BAL 내의 호중구 및 호산구의 감소된 수에 의하여 입증된다.

[0217]

전에 열거한 연구들이 실험 알러지 천식의 발병기전 내의 보체 인자 C3 및 C5 및 이들의 분열 산물의 중요성을 부각시켰음에도, C3 및 C5는 모든 세 활성화 경로에 일반적이기 때문에 이러한 연구들은 각각의 세 보체 활성화 경로의 기여에 대한 정보를 제공하지 못하였다. 그러나, Hogaboam 및 동료연구자들의 최근 연구는 렉틴 경로가 천식 발병기전 내에서 주요 역할을 가질 수 있다는 것을 지적하였다(Hogaboam et al., J. Leukocyte Biol. 75:805-814, 2004). 이러한 연구들은 만능-결합 렉틴-A(MBL-A)이 유전적으로 결핍된 마우스와 렉틴 보체 경로의 활성화를 위한 인식 성분으로서 기능하는 탄수화물 결합 단백질을 사용하였다. 만능 진균 천식의 모델, MBL-A(+/-) 및 MBL-A(-/-)에서, A. fumigatus-민감화 마우스를 A. fumigatus conidia로 i.t. 시험한 후 4일 및 28일에서 조사하였다. 민감화한 MBL-A(-/-) 마우스 내의 AHR은 민감화한 MBL-A (+/+) 군에 비하여 코니디아 시험 후 양시점에서 현저하게 감소하였다. 이들은 폐 TH2 사이토카인 수준(IL-4, IL-5 및 IL-13)은 코니디아 후 4일에 야생형 군에 비하여 A. fumigatus-민감화한 MBL-A(-/-) 마우스 내에서 현저하게 감소하였다는 것을 발견하였다. 이들 결과는 MBL-A 및 렉틴 경로가 만능 진균 천식에서 AHR의 발달 및 유지에 주요 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0218]

최근 임상적 연구 결과는 천식의 발달 및 특이적 MBL 유전자다형성간의 관계는 렉틴 경로가 이 질환에서 중요한 병리학적 역할을 한다는 추가의 증거를 제공한다 (Kaur et al., Clin. Experimental Immunol. 143:414-19, 2006). MBL 혈장 농도는 개인에 따라 다양하며, 이는 MBL 유전자 내의 유전적 유전자다형성에 일차적으로 기여한다. 이들은 MBL 발현이 두배 내지 네배 상향조절된 특이적 MBL 유전자다형성의 최소한 하나의 카피를 보유하는 개체는 기관지 천식 발달 위험이 거의 5배 증가한다는 것을 밝혀내었다. 이 MBL 유전자다형성을 보유한 기관지 천식 환자내의 질환 마커의 심각성을 증가시킨다.

[0219]

본 발명의 특징은 따라서 급성 호흡 곤란 증후군, 수혈-관련 급성 폐 손상, 허혈/재관류 급성 폐 손상, 만성 폐쇄 폐순환 질환, 천식, 베게너육아종증, 항사구체 기저막 질환 (긧파스처 질환), 태변 흡인 증후군, 폐쇄기관지염 증후군, 특발성 폐섬유증, 화상의 2차 급성 폐 손상, 비심장성 폐부종, 수혈-관련 호흡 저하, 및 폐공기증을 제한없이 포함하는 폐순환 장애를 겪고 있는 대상체에 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 투여함으로써 폐순환 장애의 치료 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 전신 예컨대 동맥, 정맥, 경막내, 두개내, 근육내, 피하 또는 다른 비경구 투여, 및 잠재적으로 비-펩티드성 억제제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. MASP-2 억제제 조성물은 하나 이상의 추가의 치료제, 예컨대 항-염증제, 항히스타민, 코르티코스테로이드 또는 항생제와 조합할 수 있다. 투여는 증상이 호전될 때까지 임상의로 의하여 결정된 바와 같이 반복될 수 있다.

[0220]

체외순환

[0221]

혈액이 환자 순환계(체외순환 시스템 또는 ECC)로부터 전환되는 동안 수많은 의학적 과정이 있다. 이러한 과정은 혈액투석, 혈액교환, 백혈구분리술, 최외막형 산소공급기(ECMO), 폐파관-유도성 최외막형 산소섭취 LDL 침전(HELP) 및 심폐순환 우회술(CPB) 등이 포함된다. 이러한 과정들은 혈액 또는 혈액 산물을 정상 세포성 기능 및 항상성을 변화시키는 외래 표면에 노출시킨다. 선도적인 연구들(Craddock et al.)에서는 보체 활성화가 혈액투

석중 과립백혈구감소증의 가능한 원인으로서는 확인하였다(Craddock, P.R., et al., N. Engl. J. Med. 296:769-74, 1977). 1977년부터 현재까지의 많은 연구들의 결과는 혈액투석 또는 CPB 환자가 경험하는 다수의 역효과는 보체 시스템의 활성화에 의하여 유발된다는 것을 지적하였다(Chenoweth, DE., Ann. N.Y. Acad. Sci. 516:306-313, 1987; Hugli, T.E., Complement 3:111-127, 1986; Cheung, A.K., J. Am. Soc. Nephrol. 1:150-161, 1990; Johnson, R.J., Nephrol. Dial. Transplant 9:36-45 1994). 예를 들면, 보체 활성능은 신장 기능 회복, 감염 감수성, 폐순환 역기능, 이환율, 및 신장 기능 상실 환자의 생존율에 관한 혈액투석기의 생체적합성을 결정하는 중요한 기준이 된다 (Hakim, R.M., Kidney Int. 44:484-4946, 1993).

[0222]

혈액투석막에 의한 보체 활성화는 약한 C4a 생성에 기인한 대체 경로 기작에 의하여 발생한다고 널리 알려져 있다(Kirklin, J.K., et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 86:845-57, 1983; Vallhonrat, H., et al., ASAIO J. 45:113-4, 1999), 그러나 최근의 연구들은 고전적 경로가 관여할 수 있다는 것을 암시하였다(Wachtfogal, Y.T., et al., Blood 73:468-471, 1989). 그러나, 생의학 중합체를 포함하는 인공 표면상에서의 보체 활성화를 개시 및 조절하는 인자의 부적절한 이해가 여전히 있다. 예를 들면, 혈액투석에 사용되는 큐프로판(Cuprophane) 막은 매우 강력한 보체 활성화제로 분류되었다. 이론에 의하여 제한되고 싶지는 않으나, 발명자들은 이들은 아마도 이들의 폴리사카라이드 특성에 의하여 부분적으로 설명될 수 있다고 이론화하였다. 본 발명에서 확인된 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템은 렉틴 경로의 활성화가 대체 경로 활성화를 촉발시키는 기작을 제공한다.

[0223]

CPB중의 ECC 환자는 전신성 염증 반응을 격으며, 이는 혈액의 체외순환 회로의 인공 표면에 노출에 의하여, 그러나 또한 외과적 외상 및 허혈-재관류 손상과 같은 표면-비의존성 인자에 의하여 부분적으로 유발된다(Butler, J., et al., Ann. Thorac. Surg. 55:552-9, 1993; Edmunds, L.H., Ann. Thorac. Surg. 66(Suppl):S12-6, 1998; Asimakopoulos, G., Perfusion 14:269-77, 1999). CPB-촉발 염증 반응에 의하여 수술후 합병증, 일반적으로 "관류후증후군"이 될 수 있다. 이러한 수술후 경과를 인지부족(Fitch, J., et al., Circulation 100(25):2499-2506, 1999), 호흡기능상실, 출혈 장애, 신장 역기능 및, 가장 심각한 경우, 다중 장기 정지이다(Wan, S., et al., Chest 112:676-692, 1997). 상당한 정도의 외과적 외상이 있으나 CPB는 없는 수술과 대비하면 CPB의 심장 우회술 수술은 심각한 보체 활성화를 유도한다(E. Fosse, 1987). 따라서, 이러한 CPB-유관 문제의 1차로 의심되는 원인은 우회술 과정 중의 부적절한 보체 활성화이다(Chenoweth, K., et al., N. Engl. J. Med. 304:497-503, 1981; P. Haslam, et al., Anaesthesia 25:22-26, 1980; J.K. Kirklin, et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 86:845-857, 1983; Moore, F.D., et al., Ann. Surg 208:95-103, 1988; J. Steinberg, et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg 106:1901-1918, 1993). CPB 회로에서, 대체 보체 경로는 현저한 보체 활성화의 역할을 하며, 이는 혈액과 CPB 회로의 인공 표면간의 상호작용의 결과이다(Kirklin, J. K., et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg., 86:845-57, 1983; Kirklin, J.K., et al., Ann. Thorac. Surg. 41:193-199, 1986; Vallhonrat H., et al., ASAIO J. 45:113-4, 1999). 그러나, 고전적 보체 경로는 CPB시 활성화된다는 증거도 있다(Wachtfogel, Y. T., et al., Blood 73:468-471, 1989).

[0224]

1차 염증 물질은 보체 시스템의 활성화 후에 생성되며, 아나필라톡신 C3a 및 C5a, 옵소닌 C3b, 및 막 공격 복합체 C5b-9를 포함한다. C3a 및 C5a는 호중구, 단핵구, 및 혈소판의 강력한 자극제이다(Haeffner-Cavaillon, N., et al., J. Immunol., 139:794-9, 1987; Fletcher, M.P., et al., Am. J. Physiol. 265:H1750-61, 1993; Rinder, C.S., et al., J. Clin. Invest. 96:1564-72, 1995; Rinder, C.S., et al., Circulation 100:553-8, 1999). 이러한 세포의 활성화에 의하여 전염증 사이토카인(IL-1, IL-6, IL-8, TNF 알파), 산화 자유 라디칼 및 프로테아제의 방출이 일어난다(Schindler, R., et al., Blood 76:1631-8, 1990; Cruickshank, A.M., et al., Clin Sci (Lond) 79:161-5, 1990; Kawamura, T., et al., Can. J. Anaesth. 40:1016-21, 1993; Steinberg, J.B., et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 106:1008-1, 1993; Finn, A., et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 105:234-41, 1993; Ashraf, S.S., et al, J. Cardiothorac. Vase. Anesth. 11:718-22, 1997). C5a는 다형핵 세포(PMNs)내에서 Mac-1의 부착 분자 CD1 Ib 및 CD 18를 상향조절하고, PMN의 탈과립이 방출 전염증 효소를 유도한다고 알려져 있다(Rinder, C, et al., Cardiovasc Pharmacol. 27(Suppl 1):S6-12, 1996; Evangelista, V., et al, blood 93:876-85, 1999; Kinkade, J.M., Jr., et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 114:296-303, 1983; Lamb, NJ., et al, Crit. Care Med. 27:1738-44, 1999; Fujie, K., et al, Eur. J. Pharmacol. 374:117-25, 1999). C5b-9는 혈소판 상의 부착 분자 P-세렉틴(CD62P)의 발현을 유도한다(Rinder, C. S., et al., J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 118:460-6, 1999), 반면에 C5a 및 C5b-9 모두는 내피 세포상의 P-세렉틴의 표면 발현을 유도한다(Foreman, K.E., et al., J. Clin. Invest. 94:1147-55, 1994). 이러한 부착 분자는 백혈구, 혈소판 및 내피 세포간의 상호작용에 관여한다. 활성화된 내피 세포상의 부착 분자의 발현은 활성화된 백혈구의 분리를 담당하며, 이는 조직 염증 및 손상을 매개하게된다(Evangelista, V., Blood

1999; Foreman, K.E., J. Clin. Invest. 1994; Lentsch, A.B., et al., J. Pathol. 190:343-8, 2000).

[0225] 이는 CPB 후 일어날 수 있는 다양한 문제를 유발시킬 수 있는 호중구, 단핵구, 혈소판 및 다른 순환 세포상의 이러한 보체 활성화 산물의 작용이다. 수개의 보체 억제제는 CPB 내의 잠재적인 응용에 관하여 연구되었다. 이들은 재조합 가용성 보체 수용체 1(sCR1)(Chai, P.J., et al., Circulation 101:541-6, 2000), 인체적응형 단일 사슬 항-C5 항체(h5G1.1-scFv 또는 펙셀리주맵)(Fitch, J.C.K., et al., Circulation 100:3499-506, 1999), 인간 막 보조인자 단백질과 인간 파괴 가속 인자의 재조합 융합 하이브리드(CAB -2)(Rinder, CS., et al., Circulation 100:553-8, 1999), 13-잔기 C3-결합 환형펩타이드(콤프스타틴)(Nilsson, B., et al., Blood 92:1661-7, 1998) 및 항-인자 D MoAb (Fung, M., et al., J. Thoracic Cardiovasc. Surg. 122:113-22, 2001)를 포함한다. sCR1 및 CAB-2는 C3 및 C5 활성화 단계에서 고전적 및 대체 보체 경로를 억제한다. 콤프스타틴은 C3 활성화 단계에서 보체 경로 모두를 억제하며, 여기서 h5G1.1-scFv는 C5 활성화 단계에서 그러하다. 항-인자 D MoAb는 C3 및 C5 활성화 단계에서 대체 경로를 억제한다. 그러나, 어떠한 이러한 보체 억제제도 본 발명에서 확인된 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 특이적으로 억제하지 못한다.

[0226] 심장동맥 우회술 이식편(CABG) 수술에서 수술전후 MI 및 사망율을 감소시키는 인체적응형 단일 사슬 항-C5 항체(h5G1.1-scFv, 펙셀리주맵)의 효능 및 안정성을 조사하기 위한 전망있는 3기 임상 연구의 결과가 보고되었다(Verrier, E.D., et al., JAMA 291:2319-27, 2004). 플라시보에 비하여, 펙셀리주맵은 CABG 수술을 한 2746 환자 내에서 사망 또는 MI의 복합적 목표의 위험을 현저하게 감소시키지 못하였다. 그러나, 판막 수술과 함께 또는 없이 CABG 수술을 한 3099 환자 모두에서 수술 후 30일 경 통계학적으로 의미있는 감소가 있었다. 펙셀리주맵은 C5 활성화 단계에서 억제하기 때문에, 이는 C5a 및 sC5b-9 생성을 억제하나, 다른 두 강력한 보체 염증 물질인, C3a 및 옅소닌 C3b의 생성에 영향을 미치지 못한다, 이는 또한 CPB-촉발 염증 반응에 기여하는 것으로 알려져 있다.

[0227] 본 발명의 일 특징은 따라서, 혈액투석, 혈장교환, 백혈구분반술, 최외막형 산소섭취(ECMO), 헤파린-유도성 최외막형 산소섭취 LDL 침전(HELP) 및 심폐순환 우회술(CPB)을 한 환자를 포함하는 체외순환 과정을 겪은 대상체를 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물로 치료함으로써 체외순환 노출-촉발 염증 반응의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 따른 MASP-2 억제제 치료는 때때로 CPB 과정의 결과인 인지 장애를 감소 또는 예방하기에 유용하다고 알려져 있다. MASP-2 억제제는 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의하여 수술전 및/또는 수술중 및/또는 수술후 대상체에 투여될 수 있다. 대안적으로, MASP-2 억제제는, 예컨대 MASP-2 억제제를 혈액이 순환하는 관 또는 막을 통과 또는 통하여 주입하거나 또는 혈액을 MASP-2 억제제로 피복된 표면 예컨대 관벽 내부, 막 또는 다른 표면 예컨대 CPB 기구와 접촉시켜 체외순환 중 대상체의 혈류에 도입될 수 있다.

[0228] **염증 및 비-염증 관절염 및 다른 근골격 질환**

[0229] 보체 시스템의 활성화는 류마티스성 질환의 다양한 발병기전에 관련되어 있으며; 류마티스 관절염(Linton, S.M., et al., Molec. Immunol. 36:905-14, 1999), 연소성 류마티스 관절염(Mollnes, T.E., et al., Arthritis Rheum. 29:1359-64, 1986), 골관절염(Kemp, P.A., et al., J. Clin. Lab. Immunol. 37:147-62, 1992), 전신성 홍반성 루푸스(SLE)(Molina, H., Current Opinion in Rheumatol. 14:492-497, 2002), 베체트 증후군(Rumfeld, W.R., et al., Br. J. Rheumatol. 25:266-70, 1986) 및 쇼그렌 증후군(Sanders, M.E., et al., J. Immunol. 138:2095-9, 1987)을 포함한다.

[0230] 면역-복합체-촉발 보체 활성화가 류마티스 관절염(RA)에서 조직 손상에 기여하는 주요 병리학적 기작이라는 명백한 증거가 있다. 보체 활성화 산물이 RA 환자의 혈장 내에서 증가되었다는 수많은 문헌이 있다(Morgan, B.P., et al, Clin. Exp. Immunol, 73:473-478, 1988; Auda, G., et al., Rheumatol. Int. 10:185-189, 1990; Rumfeld, W.R., et al, Br. J. Rheumatol. 25:266-270, 1986). 보체 활성화 산물 예컨대 C3a, C5a, 및 sC5b-9는 염증 류마티스성 관절 내에서 발견되며, 보체 활성화의 정도와 RA의 중증도 사이의 정비례 상관관계가 확립되었다(Makinde, V.A., et al., Ann. Rheum. Dis. 48:302-306, 1989; Brodeur, J.P., et al., Arthritis Rheumatism 34:1531-1537, 1991). 성인 및 연소성 류마티스 관절염 모두에서, C4d(고전적 경로 활성화의 마커)에 비하여 대체 경로 보체 활성화 산물 Bb의 증가된 혈청 및 윤활액 수준은 보체 활성화가 대체 경로에 의하여 우세하게 매개된다는 것을 나타낸다(El-Ghobarey, A. F. et al., J. Rheumatology 7:453-460, 1980; Agarwal, A., et al, Rheumatology 39:189-192, 2000). 보체 활성화 산물은 can directly 손상 조직을 직접 손상시킬 수 있거나(C5b-9를 통하여) 아나필라톡신 C3a 및 C5a에 의하여 염증 세포의 도입을 통하여 염증을 간접적으로 매개한다.

- [0231] 실험 관절염의 동물 모델은 RA 발병기전 내의 보체의 역할을 조사하기 위하여 널리 사용되어왔다. RA 동물 모델 내의 코브라 독 인자에 의한 보체 고갈은 관절염 발병을 예방하였다(Morgan, K., et al., *Arthritis Rheumat.* 24:1356-1362, 1981; Van Lent, P.L., et al., *Am. J. Pathol.* 140:1451-1461, 1992). 가용성 형태의 보체 수용체 1 (sCR1), 보체 억제제의 관절내 주사는 RA 레트 모델 내의 염증을 억제하였다(Goodfellow, R.M., et al., *Clin. Exp. Immunol.* 110:45-52, 1997). 추가적으로, sCR1는 레트 콜라겐-유도성 관절염의 발달 및 진행을 억제한다(Goodfellow, R.M., et al., *Clin Exp. Immunol.* 119:210-216, 2000). 가용성 CR1은 대체 경로 및 고전적 경로 내의 C3 및 C5 활성화 단계에서 고전적 및 대체 보체 경로를 억제하며, 따라서 C3a, C5a 및 sC5b-9의 생성을 억제한다.
- [0232] 1970 후반에, 설치류에 이중유래 타입 II 콜라겐 (CII; 인간 관절 연골의 주요 콜라겐 성분)를 접종하여 인간 RA와 현저하게 유사한 자가면역 관절염 (콜라겐-유도성 관절염, 또는 CIA)의 발달을 유도하였다는 것을 인식하였다(Courtenay, J. S., et al., *Nature* 283:666-68 (1980), Banda et al., *J. of Immunol.* 171:2109-2115 (2003)). 감수성있는 동물 내의 자가면역 반응은 특이적 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자, 싸이토카인 및 CII-특이적 B- 및 T-세포 반응을 포함하는 인자의 복합체 조합이 관여한다(reviewed by Myers, L.K., et al., *Life Sciences* 61:1861-78, 1997). 거의 40%의 순교배 마우스주가 보체 성분 C5의 완전 결핍이라는 관찰(Cinader, B., et al., *J. Exp. Med.* 72(9):897-902, 1964)은 C5-결핍 및 충분주 사이의 CIA 비교에 의하여 이 관절염 모델 내의 보체의 역할을 조사하는 간접 기화를 제공하게된다. 이러한 연구들의 결과는 C5 충분성이 CIA의 발달에 절대적으로 필요하다는 것을 의미한다(Watson et al., 1987; Wang, Y., et al., *J. Immunol.* 164:4340-4347, 2000). RA내의 C5 및 보체의 중요성에 대한 추가의 증거는 항-C5 단클론 항체(MoAbs)의 사용에 의하여 제공된다. CIA 무린 모델 내의 항-C5 MoAbs의 예방적 복막내 투여에 의하여 질환 발병이 거의 완전히 예방하였고, 활성 관절염의 치료에 의하여 현저한 임상적 이득이 있었으며 조직학적 질환을 완화시켰다(Wang, Y., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8955-59, 1995).
- [0233] 질환 발병기전 내의 보체 활성화의 잠재적인 역할에 대한 추가적 연구는 최근 개발된 염증 관절염 모델인, K/BxN T-세포 수용체 유전자삽입 마우스를 사용한 연구에 의하여 제공되었다(Korganow, A. S., et al., *Immunity* 7(9):451-461, 1999). 모든 K/BxN 동물은 인간 RA의 (비록 전부는 아니나) 거의 모든 임상적, 조직학적 및 면역학적 특징을 지닌 자가면역 질환을 자발적으로 발달시킨다. 추가적으로, 관절염 K/BxN 마우스에서 건강한 동물로 혈청을 전이하면 관절염유발 면역글로불린의 전이를 통하여 수일내 관절염이 유도된다. 질환 발달에 요구되는 특이적 보체 활성화 단계를 확인하기 위하여, 관절염성 K/BxN 마우스의 혈청을 특정 보체 경로 산물이 유전적으로 결핍된 다양한 마우스로 전이하였다(Ji, H., et al., *Immunity* 16:157-68, 2002). 흥미로운 것은, 연구 결과는 대체 경로 활성화가 결정적이며, 반면에 고전적 경로 활성화는 불요하다는 것을 나타낸다. 이와 함께, C5a의 생성이 결정적이며, 이는 C5-결핍 마우스 및 C5aR-결핍 마우스 모두가 질환 발달에서 보호되었기 때문이다. 이러한 결과와 일치하게, 이전의 연구는 C5a 수용체 발현은 유전적 제거가 마우스를 관절염으로부터 보호하였다고 보고하였다(Grant, E.P., et al., *J. Exp. Med.* 796:1461-1471, 2002).
- [0234] 인간 보체 성분 C5이 이들의 전-염증 성분으로 분열하는 것을 예방하는 인체적응형 항-C5 MoAb (5G1.1)는 RA의 잠재적인 치료제로서 Alexion Pharmaceuticals, Inc.(New Haven, Connecticut)사에 의하여 개발중이다.
- [0235] 두 연구 그룹은 렉틴 경로가 MBL과 특이적 IgG 글리코펩의 상호작용을 통하여 RA 환자내에서 염증을 증진시킨다는 것을 독립적으로 제안하였다(Malhotra et al., *Nat. Med.* 7:237-243, 1995; Cuchacovich et al., *J. Rheumatol.* 23:44-51, 1996). RA는 Fc 영역의 분자 내의 갈락토오스(IgG0 글리코펩)가 결핍된 IgG 글리코펩가 기록적으로 증가하는 것과 관련되어 있다(Rudd et al, *Trends Biotechnology* 22:524-30, 2004). IgG0 글리코펩의 백분율은 환자가 완화되는 경우 질환 진행, 및 정상으로의 회귀와 함께 증가된다. 생체 내, IgG0는 유효 조직상에 부착되며, MBL는 RA 환자의 유효액의 증가된 수준을 제공한다. RA 관련 클러스터화된 IgG상의 응집 아갈락토실 IgG(IgG0)는 만노스-결합 렉틴(MBL)에 결합할 수 있으며, 보체의 렉틴 경로를 활성화시킬 수 있다. 추가적으로, RA 환자 내의 MBL의 대립 변이체를 관찰하는 최근 임상적 연구는 MBL이 질환 내의 염증-증진 역할을 한다는 것을 나타낸다(Garred et al., *J. Rheumatol.* 27:26-34, 2000). 따라서, 렉틴 경로는 RA 발병기전에 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0236] 전신성 홍반 루푸스(SLE)는 자가항체, 면역 복합체 순환의 생성, 및 간헐적, 조절불가능 보체 시스템의 활성화를 일으키는 정의되지 않은 병인의 자가면역 질환이다. SLE 내의 자가면역성의 기원이 정의하기 어려우나, 이 질환 내의 혈관 손상에 기여하는 중요한 기작으로서 보체 활성화가 관여한다는 상당한 정보가 존재한다(Abramson, S.B., et al., *Hospital Practice* 33: 107-122, 1998). 보체의 고전적 및 대체 경로 모두의 활성화는 이 질환에 관여하며, C4d 및 Bb 모두가 중증 내지 중증 루푸스 질환 활성화의 민감성 마커이다(Manzi, S., et

al., Arthrit. Rheumat. 39:1178-1188, 1996). 대체 보체 경로 활성화는 임신중 전신성 홍반 루푸스 내의 질환 발작을 수반한다(Buyon, J. P., et al., Arthritis Rheum. 35:55-61, 1992). 이와 함께, 렉틴 경로는 질환 발달에 기여할 수 있으며, 이는 MBL의 자가항체가 최근 SLE 환자의 혈청에서 확인되었기 때문이다(Seelen, M.A., et al., Clin Exp. Immunol. 734:335-343, 2003).

[0237] 고전 경로를 통한 보체의 면역 복합체-매개 활성화는 조직 손상이 SLE 환자 내에서 발생하는 하나의 기작으로 알려져 있다. 그러나, 고전 경로의 보체 성분 내의 유전적 결핍은 루푸스 및 루푸스-유사 질환의 위험을 증가시킨다(Pickering, M. C, et al., Adv. Immunol. 16:227-324, 2000). SLE, 또는 유관 증후군은 80% 이상의 C1q, C1r/C1s, C4 또는 C3의 완전 결핍인 환자에서 발생한다. 이는 루푸스 내의 보체의 보호 효과와 악영향이 조화하는 명백한 패러독스를 나타낸다.

[0238] 고전적 경로의 중요한 활성화는 단백질 포식 시스템에 의한 순환 및 조직으로부터의 면역 복합체 제거를 증진하는 것 같다(Kohler, P.F., et al, Am. J. Med. 56:406-11, 1974). 이와 함께, 보체는 최근 세포자멸사의 제거 및 소거에 중요한 역할을 가지는 것으로 밝혀졌다(Mevorarch, D., et al., J. Exp. Med. 188:2313-2320, 1998). 고전적 경로 기능 결핍은 면역 복합체 또는 세포자멸성 세포가 조직에 축적되고, 염증 및 자가항원 방출을 일으키며, 자가항체 및 더 많은 면역 복합체 생산을 자극하고, 이로써 자가면역 반응을 유발시키는 발달 주기를 허용함으로써 대상체가 SLE 발달시킬 수 있도록 한다(Botto, M., et al., Nat. Genet. 19:56-59, 1998; Botto, M., Arthritis Res. 3:201-10, 2001). 그러나, 고전적 경로 성분의 이러한 "완전한" 결핍 상태는 SLE 환자 100명 중의 1명에게 나타난다. 따라서, 대다수의 SLE 환자에 있어서, 고전적 경로 성분 내의 보체 결핍은 질환 병인에 기여하지 않으며, 보체 활성화는 SLE 발병기전에 기여하는 중요한 기작이 될 수 있다. 고전적 경로 성분 내의 영구적 유전적 결핍을 지닌 드문 개체는 일생중 일정 시점에서 빈번하게 SLE를 발달시킨다는 사실은 질환을 일으킬 수 있는 기작 잉여성을 입증한다.

[0239] SLE 동물 모델의 결과는 질환의 발병기전 내의 보체 활성화의 중요한 역할을 지지한다. 차단 항-C5 MoAb를 사용한 C5 활성화 억제제는 NZB/NZW F1 마우스, SLE 마우스 모델 내에서 단백뇨 및 신장 질환을 감소시킨다(Wang Y., et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 93:8563-8, 1996). 추가적으로, 세포 분비 항-DNA 항체로 이식된 면역결핍 질환과 심각하게 결핍한 항-C5 MoAb 마우스 치료는 미치로 대조구에 비하여 생존 이익에 관한 단백뇨 및 신장 조직도 내에서 개선을 보여주었다(Ravirajan, C. T., et al., Rheumatology 43:442-1, 2004). 대체 경로는 SLE의 자가면역 질환 발현에서 중요한 역할을 하며, 인자 B-결핍 마우스와 SLE의 MRL/lpr 모델의 역교배에서 인자 B의 결핍이 혈관염, 사구체 질환, C3 소비 및 다른 자가항체의 수준 변화 없이 이 모델 내에서 일반적으로 발견되는 IgG3 RF 수준을 감소시킨다는 사실을 알았기 때문이다(Watanabe, H., et al., J. Immunol. 164:786-794, 2000). 인체적응형 항-C5 MoAb는 SLE의 잠재적인 치료제로서 조사중이다. 이 항체는 C5가 C5a와 C5b로 분열하는 것을 예방한다. I기 임상시험에서, 심각한 역효과가 보이지 않았으며, 심화된 인간 시험이 SLE의 효능을 시험하기 위하여 진행중이다(Strand, V., Lupus 70:216-221, 2001).

[0240] 인간 및 동물 연구들의 결과는 보체 시스템이 근육퇴행위축증의 발병기전에 직접적으로 기여할 가능성을 지지한다. 인간 디스트로핀 생검 연구들은 C3 및 C9가 디스트로핀 근육 내의 괴사 및 비-괴사 섬유 모두에 부착되었다는 것을 보여주었다 (Cornelio 및 Dones, Ann. Neurol. 76:694-701, 1984; Spuler and Engel, A.G., Neurology 50:41-46, 1998). DNA 마이크로어레이를 사용하여, Porter 및 동료연구자들은 디스트로핀 질환의 발달과 일치하여 디스트로핀-결핍(mdx) 마우스 내에서 기록적으로 증가된 수많은 보체-유관 mRNAs의 유전자 발현을 발견하였다 (Porter et al., Hum. Mol. Genet. 77:263-72, 2002). 디스퍼린, 경막 근육 단백질을 암호화하는 인간 유전자 내의 돌연변이는 두 형태의 골격근 질환, 즉 지대 근육퇴행위축증(LGMD) 및 미요시 근육병증의 주요 위험 인자로서 확인되었다(Liu et al., Nat. Genet. 20:31-6, 1998). 수종의 디스퍼린 내 돌연변이 마우스 모델이 개발되었으며, 이들은 또한 진행성 근육퇴행위축증을 발달시켰다. 보체 캐스케이드 활성화는 일부 LGMD 환자 내의 비괴사 근육 섬유의 표면상에서 확인되었다(Spuler and Engel., Neurology 50:41-46, 1998). 최근 연구에서, Wenzel 및 동료연구자들은 뮤린 및 인간 디스퍼린-결핍 근육 섬유 모두는 보체 억제 인자, CD33/DAF, C5b-9 MAC(막 공격 복합체)의 특이적 억제제를 결핍시킨다는 사실을 알아내었다(Wenzel et al., J. Immunol. 775:6219-25, 2005). 결론적으로, 디스퍼린-결핍 비괴사 근육 세포는 보체-매개 세포 용해에 더욱 민감하다. Wenzel 및 동료연구자들은 골격근 세포의 보체-매개 용해가 LGMD 및 미요시 근육병증 환자의 발달에 관여하는 주요 병리학적 기작일 수 있다는 것을 암시한다. Connolly 및 동료연구자들은 수종의 선천성 퇴행위축 모델, 라미닌 α2-결핍인 dy-/- 마우스의 발병기전에서 보체 C3의 역할을 연구하였다(Connolly et al., J. Neuroimmunol. 127:\$0-7, 2002). 이들은 C3 및 라미닌 α2 모두를 유전적으로 결핍시킨 동물을 생성하고, 근육 퇴행위축증의 dy-/- 모델내에서 C3의 부재가 생존을 연장시켰음을 발견하였다. 추가적으로, 이중 녹아웃(C37-/-

, dy-/-) 마우스는 dy-/- 마우스 보다 근육 강도가 더 강함을 나타내었다. 이 연구는 보체 시스템이 이 형태의 선천성 퇴행위축의 발병 기전에 직접적으로 기여할 수 있다고 제안한다.

[0241]

본 발명의 일 특징은 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 장애를 겪는 대상체에 투여함으로써, 골관절염, 류마티스 관절염, 연소성 류마티스 관절염, 통풍, 신경병관절병증, 건선 관절염, 강직척추염 또는 다른 척추관절염 및 결정성 관절병증, 근육퇴행위축증 또는 진신성 홍반 루푸스(SLE)를 포함하나 이에 한정되지 않는 염증 및 비-염증 관절염 및 다른 근골격 장애의 예방 또는 치료에 관한 것이다. MASP-2 억제제는 진신, 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 피하 또는 다른 비경구 투여, 또는 잠재적으로 비-펩티드제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. 대안적으로, 투여는 국부 전달, 예컨대 관절내 주사에 의하여 투여될 수 있다. MASP-2 억제제는 만성 증상을 조절 또는 치료하기 위하여 확장된 시간 간격을 두고 주기적으로 투여될 수 있으며, 관절상에 수행된 외과적 과정을 포함하는 급성 외상 또는 손상의 전, 도중 및/또는 후에 단일 또는 반복 투여될 수 있다.

[0242]

신장 증상

[0243]

보체 시스템의 활성화는 다양한 신장 질환의 발병기전에 관여하며; 사구체간질증식성 사구체신염(IgA-신장병, 버거씨 질환)(Endo, M., et al., Clin. nephrology 55:185-191, 2001), 막사구체신염(Kerjashki, D., Arch B Cell Pathol. 58:253-71, 1990; Brenchley, P.E., et al., Kidney Int., 41:933-1, 1992; Salant, D.J., et al., Kidney Int. 35:976-84, 1989), 막증식성 사구체신염(사구체간질모세관 사구체신염)(Bartlow, B.G., et al., Kidney Int. 75:294-300, 1979; Meri, S., et al., J. Exp. Med. 775:939-50, 1992), 급성 감염후 사구체신염(염쇄구균감염후 사구체신염), 한랭글로블린 사구체신염(Ohsawa, L, et al., Clin Immunol. 101:59-66, 2001), 루푸스 신장염(Gatenby, P.A., Autoimmunity 11:61-6, 1991), 및 헤노흐-헨라인 자반 신장염(Endo, M., et al., Am. J. Kidney Dis. 35:401-407, 2000)을 포함한다. 신장 질환의 보체 관련성은 수십년간 연구되어 왔으나 신장 질환의 발병, 발달 및 용해기의 정확한 역할은 여전히 논의중이다. 정상 증상하에서, 보체의 기여는 숙주에 이득이나, 보체의 부적절한 활성화 및 부작용은 조직 손상에 기여할 수 있다.

[0244]

사구체신염, 사구체염 염증은 보체 활성화, 염증 및 조직 손상을 촉발하는 사구체 또는 튜브형 구조상의 면역 복합체 부착에 의하여 종종 개시된다는 실질적인 증거가 있다. Kahn 및 Sinniah는 다양한 형태의 사구체신염 환자로부터 채취한 생검의 튜브형 기저막 내의 C5b-9 부착이 증가한다는 것을 입증하였다(Kahn, T.N., et al., Histopath. 26:351-6, 1995). IgA 신장학 환자 연구에서(Alexopoulos, A., et al., Nephrol. Dial. Transplant 70:1166-1172, 1995), 튜브형 상피/기저막 구조 내의 C5b-9 부착은 혈장 크레아틴 수준과 상관관계가 있다. 막성 신장병의 또 다른 연구는 임상적 결과 및 소변 sC5b-9 수준간의 관계를 입증하였다(Kon, S.P., et al, Kidney Int. 48:1953-58, 1995). 증가된 sC5b-9 수준은 불량한 예후와 양성 상관관계에 있다. 문헌 Lehto et al.에서는 막사구체신염 환자의 소변 내의 혈장 막, 및 C5b-9의 막 공격 복합체를 억제하는 CD59, 보체 조절 인자의 증가된 수준을 측정하였다(Lehto, T., et al., Kidney Int. 47:1403-11, 1995). 이러한 동일한 환자의 생검 시료의 조직병리학적 분석은 사구체염에서 C3 및 C9 단백질의 부착을 입증하였으나, 이러한 조직 내의 CD59의 발현은 정상 신장 조직의 것에 비하여 감소되었다. 이러한 다양한 연구들은 진행중인 보체-매개 사구체신염에 의하여 조직 손상 및 질환 예후의 정도와 상관관계있는 보체 단백질이 소변 배출 된다는 것을 제안하였다.

[0245]

사구체신염 다양한 동물 모델 내의 보체 활성화 억제는 질환의 병인 내의 보체 활성화의 중요성을 입증하였다. 막증식성 사구체신염(MPGN)의 모델에서, (C5b-9를 형성하지 않음) C6-결핍 레트 내에 항-Thy1 항혈청 주입은 C6+ 정상 레트 보다 사구체 세포성 증식을 90% 감소시키고, 혈소판 및 마크로파지 침윤을 80% 감소시키며, 감소된 콜라겐 타입 IV 합성(혈관간 기질 확장의 마커), 및 단백뇨의 50% 감소를 나타낸다(Brandt, J., et al., Kidney Int. 49:335-343, 1996). 이러한 결과는 이 레트 항-흉선세포 혈청 모델 내의 보체에 의한 조직 손상의 주요 매개체로서 C5b-9가 관여한다. 사구체신염의 또 다른 모델로서, 레트 항-레트 사구체 기저막의 다단계 투약량의 주입은 코브라 독 인자의 사전처리에 의하여 감독된 다형핵 백혈구(PMN)의 투약-의존성 유입을 생성한다(소비 보체에 대하여)(Scandrett, A.L., et al., Am. J. Physiol. 2<58:F256-F265, 1995). 코브라 독 인자-치료 레트는 대조구 레트보다 감소된 조직병리학, 감소된 장기 단백뇨, 및 낮은 크레아틴 수준을 나타낸다. 3개의 GN 레트 모델을 사용하여(항-흉선세포 혈청, Con A 항-Con A, 및 수동 하이만스 신염), 문헌 Couser et al.에서는 재조합 sCR1 단백질을 사용하여 보체 억제 방법의 잠재적인 치료 효능을 입증하였다(Couser, W.G., et al., J. Am. Soc. Nephrol. 5:1888-94, 1995). sCR1로 처리된 레트는 대조구 레트에 비하여 현저히 감소된 PMN, 혈소판 및 마크로파지 유입, 감소된 메산지오용해, 및 단백뇨를 나타내었다. 사구체신염 내의 보체 활성화의 중요성에 대한 추가의 증거는 NZB/W F1 마우스 모델 내의 항-C5 MoAb 사용에 의하여 제공되었다. 항-C5 MoAb는 C5의

분열을 억제하며, 따라서 C5a 및 C5b-9의 생성이 차단된다. 6개월간의 항-C5 MoAb의 계속적 치료에 의하여 사구체신염 증상의 현저한 개선이 있었다. 인간 보체 성분 C5가 이들의 전-염증 성분으로 분열되는 것을 막는 인체 적응형 항-C5 MoAb 단클론 항체(5G1.1)는 사구체신염의 잠재적 치료제로서 Alexion Pharmaceuticals, Inc.(New Haven, Connecticut)사에서 개발 중이다.

[0246]

신장 손상에서의 보체의 병리학적 역할에 대한 직접 증거는 특이적 보체 성분이 유전적 결핍된 환자의 연구에 의하여 제공되었다. 다수의 연구는 신장 질환과 보체 조절 인자 H의 결핍간의 관계를 문서화하였다 (AuIt, B.H., Nephrol. 74:1045-1053, 2000; Levy, M., et al, Kidney Int. 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., Nat. Genet. 31:424-8, 2002). 인자 H 결핍은 인자 B 및 C3의 낮은 혈장 수준 및 C5b-9의 소비로 나타난다. 비전형 막증식성 사구체신염(MPGN) 및 특발성 용혈 요독증후군(HUS) 모두는 인자 H 결핍과 관련이 있다. 인자 H 결핍 돼지(Jansen, J. H., et al., Kidney Int. 53:331-49, 1998) 및 인자 H 녹아웃 마우스(Pickering, M. C, 2002)는 보체 조절내의 인자 H이 중요성을 확인하는 MPGN-유사 증상을 나타낸다. 기타 보체 성분 결핍은 신장 질환과 관련이 있으며, 이차적으로 전신성 홍반 루푸스(SLE)의 발달과 관련이 있다(Walport, M. J., Davies, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 815:261-81, 1997). C1q, C4 및 C2의 결핍은 면역 복합체 및 세포자멸성 물질의 결합있는 제거에 관한 기작을 통하여 SLE 발달을 매우 쉽게한다. 다수의 이러한 SLE 환자에 있어서, 사구체를 통한 면역 복합체의 부작에 의하여 특성화된 루푸스 신장염이 발병한다.

[0247]

보체 활성화와 신장 질환의 연결에 관한 추가의 증거는 환자 내의 보체 성분에 대한 자가항체의 확인에 의하여 제공되며, 이들 중 일부는 신장 질환에 관련된 것이다(Trouw, L.A., et al., Mol. Immunol. 38: 199-206, 2001). 다수의 이러한 자가항체는 용어 신장염 인자 (NeF)가 도입되어 이 활성을 적시하는 신장 질환과 고도로 상관관계에 있다는 것을 보여준다. 임상적 연구들에서, 약 50%의 신장염 인자에 양성인환자가 MPGN을 발달시켰다(Spitzer, R.E., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 64:177-83, 1992). C3NeF은 대체 경로 C3 전환효소(C3bBb)에 대한 자가항체이며, 이 전환효소를 안정화시켜, 대체 경로 활성화를 증진시키게된다(Daha, M. R., et al., J. Immunol. 116:1-7, 1976). 이와 같이, 고전적 경로 C3 전환효소(C4b2a), 소위 C4NeF에 특이성을 지닌 자가항체는 이 전환효소를 안정화시키고, 따라서 고전적 경로 활성화를 증진시키게 된다(Daha, M.R. et al., J. Immunol. 125:2051-2054, 1980; Halbwachs, L., et al., J. Clin. Invest. 65:1249-56, 1980). 항-C1q 자가항체는 SLE 환자내의 신장염과 관련되어 있으며(Hovath, L., et al., Clin. Exp. Rheumatol. 19:667-72, 2001; Siegert, C, et al., J. Rheumatol. 18:230-34, 1991; Siegert, C, et al., Clin. Exp. Rheumatol. 10:19-23, 1992), 이러한 항-C1q 자가항체의 역가 증가가 보고되어 신장염 발작을 예측하게 된다(Coremans, et al., Am. J. Kidney Dis. 2(5):595-601, 1995). SLE 환자의 사후 신장에서 용출된 면역 침착물은 이러한 항-C1q 자가항체의 축적을 나타낸다(Mannick, M., et al., Arthritis Rheumatol. 4(9):1504-11, 1997). 이러한 모든 사실은 이러한 자가항체 병리학적 역할을 적시한다. 그러나, 항-C1q 자가항체를 보유한 모든 환자가 신장 질환을 발달시키는 것은 아니며, 또한 일부 건강한 개체도 낮은 역가의 항-C1q 자가항체를 보유한다 (Siegert, C. E., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 67:204-9, 1993).

[0248]

보체 활성화의 대체 및 고전적 경로와 함께, 렉틴 경로가 신장 질환에 있어서 중요한 병리학적 역할을 할 수 있다. 증가된 수준의 MBL, MBL-유관 세린 프로테아제 및 보체 활성화 산물은 수개의 다른 신장 질환, 예컨대 헤노흐-셴라인 자반 신장염 (Endo, M., et al., Am. J. Kidney Dis. 35:401-407, 2000), 한랭글로블린 사구체신염 (Ohsawa, L, et al., Clin. Immunol. 101:59-66, 2001) 및 IgA 신장병증(Endo, M., et al., Clin. Nephrology 55:185-191, 2001)으로 진단된 환자로부터 얻은 신장 생검 물질을 면역조직화학 기법에 의하여 검출하였다. 따라서, 보체와 신장 질환사이의 결합이 수십년간 알려져왔음에도, 어떻게 보체가 정확하게 이러한 신장 질환에 영향을 미치는지의 데이터는 완전하지 않다.

[0249]

본 발명의 일 특징은 따라서 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 장애를 겪고 있는 대상체에 투여함으로써 사구체간질증식성 사구체신염, 막사구체신염, 막증식성 사구체신염(사구체간질모세관 사구체신염), 급성 감염후 사구체신염(염쇄구균감염후 사구체신염), 한랭글로블린 사구체신염, 루푸스 신장염, 헤노흐-셴라인 자반 신장염 또는 IgA 신장병을 포함하나 이에 한정되지 않는 신장 증상의 치료에 관한 것이다. MASP-2 억제제는 전신, 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 피하 또는 다른 비경구 투여, 또는 잠재적으로 비-펩티드제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. MASP-2 억제제는 만성 증상을 조절 또는 치료하기 위하여 확장된 시간 간격을 두고 주기적으로 투여될 수 있으며, 급성 외상 또는 손상의 전, 도중 및/또는 후에 단일 또는 반복 투여될 수 있다.

[0250]

피부 장애

- [0251] 건선은 수백만의 사람이 영향받는 만성, 쇠약화 피부 증상이며, 유전적이고도 환경적인 요인에 영향을 받는다. 국소제 및 UVB 및 PUVA 광요법이 일반적으로 건선의 일선 치료로 고려된다. 그러나, 일반화되거나 또는 더 확장된 질환은, 전신 요법은 1차 치료로서 또는, 어떠한 경우에는, UVB 및 PUVA 요법을 강화하기 위하여 사용된다.
- [0252] 다양한 피부 질환 예컨대 건선의 주요 병인은 보체 시스템의 관여를 포함하는 면역 및 염증 프로세스의 역할을 지지한다. 더욱이, 보체 시스템의 역할은 중요한 비특이적 피부 방어 기작으로서 확립되었다. 이들의 활성화는 정상 숙주 방어 유지를 도울 뿐만 아니라 염증 및 조직 손상을 매개하는 산물의 생성을 유도한다. 보체의 전염증 산물은 옵소닌 및 세포- 자극 활성화(C3b 및 C3bi)을 지닌 C3의 거대 절편, 저분자량 아나필라톡신(C3a, C4a, 및 C5a), 및 막 공격 복합체를 포함한다. 이들 중에서, C5a 또는 이들의 분해 산물 C5a des Arg는 이것이 염증 세포상에서 강력한 화학주성을 발휘하기 때문에 가장 중요한 매개체가 되는 것 같다. C5a 아나필라톡신의 피부내 투여는 면역 복합체-매개 보체 활성화를 통하여 발생하는 피부 과민성 혈관염에서 관찰되는 것과 매우 유사한 피부 변화를 유도한다. 보체 활성화는 자가면역 수포성 피부병 내의 염증 변화의 발병기전에 관련되어있다. 표피 내의 천포창 항체에 의한 보체 활성화는 림포카인 염증 변화인 호산구증가해면화의 발달을 책임지는 것 같다. 수포성 유천포창(BP)에서, 기저막 영역 항원과 BP 항체의 상호작용은 백혈구 내층 진피표피 결합에 관련된 것으로 보이는 보체 활성화를 유도한다. 결과 아나필라톡신은 침윤 백혈구를 활성화시키고, 진피표피 분리 및 호산구 침윤을 촉진하는 마스트 세포 탈과립화를 유도하기도 한다. 이와 유사하게, 보체 활성화는 후천성 수포성 표피박리증 및 임신성 포진에서 주목하는 진피표피 분리내에서 더욱 직접 역할을 수행하는 것 같다.
- [0253] 건선에서의 보체 관여의 증거는 최근 실험인 건선 및 유관 질환 내의 염증 변화의 병태생리학적 기작에 관련된 문헌에서 찾을 수 있다. 성장하는 증거의 실체는 T-세포-매개 면역성이 건선 병변의 촉발 및 유지에 중요한 역할을 한다는 것이다. 건선 병변 내에서 활성화된 T-세포에 의하여 생산된 림포카인은 표피 증식에 큰 영향을 미친다는 것을 공개하였다. 각질층하의 특징적 호중구 축적은 건선 병변의 고염증 영역에서 관찰될 수 있다. 호중구는 주화성에 의하여 이끌리고 케모카인의 시너지 활성화, 자극받은 각질세포에 의한 IL-8 및 Gro-알파 방출, 및 대체 보체 경로 활성화에 의하여 생성된 C5a/C5a des-arg에 의하여 거기서 활성화된다(Terui, T., Tahoku J. Exp. Med. 190:239-244, 2000; Terui, T., Exp. Dermatol. 9:1-10, 2000).
- [0254] 건선 스케일 추출물은 율동성 경피 백혈구 화학주성의 유도에 관여하는 것으로 보이는 유일한 주화성 펩타이드 분획을 함유한다. 최근 연구들은 이 분획 내의 두 무관한 주화성 펩타이드, 즉, C5a/C5a des Arg 및 인터류킨 8(IL-8) 및 이들의 유관 사이토카인의 존재를 확인하였다. 경피 백혈구 이동 및 건선 병변 내의 이들의 상호관계에 대한 상대적 기여도를 조사하기 위하여, 면역반응성 C5a/C5a desArg 및 IL-8 in 건선 병변 스케일 추출물 및 무균 농포성피부병에 관련된 것들의 농도를 정량화하였다. C5a/C5a desArg 및 IL-8의 농도는 비-염증 정상각화 피부의 것들보다 병변 피부의 각질-조직 추출물 내에서 더욱 현저하게 증가하였다는 것을 발견하였다. C5a/C5a desArg 농도의 증가는 병변 스케일 추출물에 특이적이었다. 이러한 결과에 기초하여, C5a/C5a desArg는 보체 활성화를 선호하는 특이적 환경하의 염증 병변 피부에서만 생성되는 것 같다. 이는 보체 활성화 억제제의 사용에 의하여 건선 병변이 개선된다는 이론적 근거를 제공한다.
- [0255] 보체 시스템의 고전적 경로는 건선 내에서 활성화된 것으로 나타났으나, 소수의 건선 내의 염증 반응상의 대체 경로의 관여에 대한 보고서가 존재한다. 보체 활성화 경로의 종래의 견해에서, 보체 절편 C4d 및 Bb는 각각 고전적 및 대체 경로 활성화의 시점에서 방출된다. C4d 또는 Bb 절편의 존재는, 따라서, 고전적 및/또는 대체 경로를 통하여 진행되는 보체 활성화를 나타낸다. 일 연구에서는 효소 면역측정법을 사용하여 건선 스케일 추출물 내의 C4d 및 Bb 수준을 측정하였다. 이러한 피부병의 스케일은 비염증 피부의 각질층 내의 것들 보다 효소 면역측정법에 의하여 검출가능한 높은 수준의 C4d 및 Bb를 함유한다(Takematsu, H., et al., Dermatologica 787:289-292, 1990). 이러한 결과는 건선 병변 피부 내의 보체의 고전적 경로와 함께 대체 경로가 활성화된다는 것을 의미한다.
- [0256] 건선 및 아토피성 피부염 내의 보체의 관여에 대한 추가의 증거 경증 내지 중간 단계의 35명의 아토피성 피부염(AD) 환자 및 24명의 건선 환자의 말초 혈액 내에서 정상 보체 성분 및 활성화 산물을 측정함으로써 획득하였다. C3, C4 및 C1 불활성제(C1 INA)의 수준을 방사상 면역확산에 의하여 혈청 내에서 측정하였으며, 반면에 C3a 및 C5a 수준은 방사성면역측정법에 의하여 측정하였다. 건강한 비-아토피 대조구에 비하여, C3, C4 및 C1 INA의 수준은 두 질환에서 현저히 증가하였음을 발견하였다. AD에 있어서, C3a 수준이 증가되는 경향이 있으며, 반면에 건선에 있어서는, C3a 수준이 현저하게 증가한다. 이 결과는, AD 및 건선 모두에서, 보체 시스템이 염증 프로세스에 참여한다는 것을 나타낸다(Ohkonohchi, K., et al, Dermatologica 179:30-34, 1989). 건선 병변 피부 내의 보체 활성화는 또한 건선 환자의 혈장 및 각질 조직 내의 SC5b-9의 수준을 측정함으로써 정의된 표피 내의 말단 보체 복합체의 부착을 일으킨다. 건선 혈장 내의 SC5b-9의 수준은 대조구 또는 아토피성 피부염

환자 보다 현저히 높다. 병변 피부의 총 단백질 추출물에 대한 연구는 비염증 각질 조직 내에서 SC5b-9가 검출되지 않았음에도, 건선의 병변 각질 조직 내의 SC5b-9 수준이 높다는 것을 보여준다. C5b-9 내오항원에 대한 단클론 항체를 사용한 면역형광측정법에 의하면, C5b-9의 부착은 건선 피부의 각질층 내에서만 관찰되었다. 요약하자면, 건선 병변 피부 내에서, 보체 시스템이 활성화되며, 보체 활성화는 막 공격 복합체를 생성하는 최종 단계에 이르는 모든 방법을 진행시킨다.

[0257] 면역 시스템을 선택적으로 표적화하는 신규의 생물학적 약물은 최근 건선 치료에 사용되어 왔다. 현재 FDA 인가를 받았거나 3기 연구 중인 4종의 생물학적 약물은: T-세포 조절제인 alefacept(Amevive®) 및 efalizumab(Raptiva®); etanercept(Enbrel®), 가용성 TNF-수용체; 및 infliximab (Remicade®), 항-TNF 단클론 항체이다. Raptiva는 면역 반응 변형제이며, 여기서 표적화된 반응 기작은 림프구 상의 LFA-1와 항원-제시세포 및 혈관 내피 세포 상의 ICAM-1 사이의 상호작용의 차단이다. Raptiva에 의한 CD11a의 결합은 림프구 상의 사용가능한 CD11a 결합 부위의 포화 및 림프구상의 세포 표면 CD11a 발현의 하향-변화를 나타낸다. 이 반응 기작은 T-세포 활성화, 진피와 표피의 세포 이동 및 T-세포 재활성화를 억제한다. 따라서, 다수의 과학적 증거는 피부의 염증 질환 상태에서의 보체의 역할을 지적하며, 최근 약학적 접근법은 면역 시스템 또는 특이적 염증 프로세스를 표적화하고 있다. 그러나, 어느 것도 표적화한 접근법으로서 MASP-2를 확인하지 못하였다. 보체 활성화 내의 MASP-2의 역할에 대한 발명자의 새로운 이해에 기초하여, 발명자들은 MASP-2가 건선 및 다른 피부 장애의 치료를 위한 효과적인 표적이 될 수 있다고 믿고 있다.

[0258] 본 발명의 일 특징은 따라서 건선, 자가면역 수포성 피부병, 호산구증가해면화, 수포성 유천포창, 후천성 수포성 표피박리증, 아토피성 피부염, 임신성 포진 및 다른 피부 장애의 치료와 유발된 모세혈관 누출을 포함하는 열 및 화학적 화상의 치료에 관한 것이며, 따라서 약학적 단체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 피부 장애를 지닌 대상체에 투여하는 것에 관한 것이다. MASP-2 억제제는 스프레이, 로션, 젤, 페이스트, 연고 또는 MASP-2 억제제를 함유한 세척 용액의 도포에 의하여 국소적으로, 또는 전신적으로 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 피하 또는 다른 비경구 투여, 또는 잠재적으로 비-펩티드성 억제제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. 치료는 단일 투여 또는 급성 증상을 위한 반복 도포 또는 투약, 또는 만성 증상의 조절을 위한 주기적 도포 또는 투약이 될 수 있다.

[0259] 이식

[0260] 보체 시스템의 활성화는 고체 장기 이식 후 염증 반응에 현저히 기여한다. 타가이식술에서, 보체 시스템은 허혈/재관류에 의하여, 가능하다면, 이식편에 대한 항체에 의하여 활성화된다(Baldwin, W.M., et al., Springer Semin Immunopathol. 25:181-197, 2003). 비영장류에서 영장류로의 이종장기이식에서, 보체의 주요 활성화제는 선재하는 항체이다. 동물 모델의 연구들은 보체 억제제의 사용은 이식편 생존을 현저하게 연장시킬 수 있다는 것을 보여주었다(이하 참조). 따라서, 장기 이식 후 장기 손상 내의 보체 시스템의 확립된 역할이 있으며, 및 따라서 발명자들은 MASP-2에 대한 보체 억제제의 사용이 동종- 또는 이종장기이식 후 이식편의 손상을 예방할 수 있다는 것을 알아내었다.

[0261] 선천성 면역 기작, 특히 보체는 이전에 인식된 이식편에 대한 염증 및 면역 반응에 있어서 중대한 역할을 한다. 예를 들면, 대체 보체 경로 활성화는 신장 허혈/재관류 손상을 매개하는 것 같으며, 및 몸쪽 튜브형 세포는 이 환경 내의 보체 성분의 공급원 및 공격 부위 모두일 수 있다. 신장 내의 국부적으로 생산된 보체는 이식편에 대한 세포성 및 항체-매개 면역 반응 모두를 발달시키는 역할을 한다.

[0262] C4d는 고전적 및 렉틴-의존성 경로의 성분인 활성화된 보체 인자 C4의 분해산물이다. C4d 염색은 급성 및 만성 환경에서의 체액성 거부반응의 유용한 마커로서 출현하였으며, 항-공여자 항체 형성의 중요성에 새로운 관심을 유도하고 있다. C4d와 급성 세포성 거부반응의 형태학적 신호사이의 관계는 통계학적으로 현저하다. C4d는 24-43%의 타입 I 에피소드, 45%의 타입 II 거부반응 및 50%의 타입 III 거부반응에서 발견된다(Nikeleit, V., et al, J. Am. Soc. Nephrol. 73:242-251, 2002; Nikeleit, V., et al, Nephrol. Dial. Transplant 78:2232-2239, 2003). 다수의 요법에 있어서 이식 후 임상적 결과를 향상시키기 위한 수단으로서 보체의 억제 또는 국부 합성을 감소시키는 개발을 하고 있다.

[0263] 보체 캐스케이드의 활성화는 이식 중 다수의 프로세스의 결과로서 발생한다. 현재의 요법은, 세포성 거부반응의 제한에 효과적일지라도, 당면한 장애들을 모두 다루지 못하고 있다. 이러한 것들에는 체액성 거부반응 및 만성 동종이식편 신장병 또는 역기능이 포함된다. 이식된 장기에 대한 전체 반응이 숙주의 일부에서의 다수의 효과기 기작의 결과라고 해도, 보체는 이러한 것의 일부에서 주요한 역할을 할 수 있다. 신장 이식의 환경에서, 몸쪽 튜브형 세포에 의한 보체 국부 합성은 특정한 중요성을 나타내는 것 같다.

- [0264] 보체의 특이적 억제제의 활용가능성은 장기 이식 후 향상된 임상적 결과를 위한 기회를 제공한다. 보체 공격을 차단하는 기작에 의하여 작용하는 억제제가 특히 유용하며, 이미 면역-저하된 수여자 내에서의 증가된 효능 및 전신성 보체 고갈의 회피에 대한 약속을 보유하기 때문이다.
- [0265] 보체는 이종이식편 거부반응에 결정적 역할을 한다. 따라서, 효과적인 보체 억제제는 잠재적인 치료제로서 대단한 관심의 대상이다. 돼지-영장류 장기 이식에서, 초급성 거부반응(HAR)은 항체 부착 및 보체 활성화에 기인한다. 다중 전략 및 표적은 돼지-영장류 조합 내의 초급성 이종이식편 거부반응을 예방하기 위한 시험을 하여왔다. 이러한 접근법은 천연 항체의 제거, 코브라 독 인자에 의한 보체 고갈, 또는 가용성 보체 억제제 sCR1에 의한 C3 활성화 예방에 의하여 수반된다. 이와 함께, 보체 활성화 차단제-2(CAB-2), 인간 파괴 가속 인자(DAF) 및 막 보조인자 단백질에서 유도된 재조합 가용성 키메라 단백질은 고전적 및 대체 경로 모두의 C3 및 C5 전환효소를 억제한다. CAB-2는 생체 외에서 인간 혈액이 살포된 돼지 심장의 보체-매개 조직 손상을 감소시킨다. CAB-2 효능의 연구는 돼지 심장이 면역억제를 받지 않은 리저스 원숭이 내로 이종영양성으로 이식된 경우, 이식편 생존율은 CAB-2를 이식 받은 원숭이 내에서 기록적으로 연장되었다(Salerno, C.T., et al, Xenotransplantation 9:125-134, 2002). CAB-2는 기록적으로 보체 활성화를 억제하며, C3a 및 SC5b-9의 생성이 강하게 감소함으로써 나타난다. 이식편 거부반응에 있어서, iC3b, C4 및 C9의 조직 부착은 대조구와 유사하거나 또는 약간 감소하였으며, IgG, IgM, C1q 및 피브리인이 부착은 변화하지 않았다. 따라서, 보체 억제에 대한 이 접근법은 리저스 원숭이에 이식된 돼지 심장의 초급성 거부반응을 제거하였다. 이러한 연구들은 생존에 관한 보체 억제 효과의 장점을 입증하였으며, 본 발명자들은 MASP-2 억제제가 이종장기이식이 유용할 수 있다는 것을 믿고 있다.
- [0266] 또 다른 접근법은 레트-선민감화한 마우스 심장 이식 모델 내의 초급성 거부반응(HAR)을 예방할 수 있는 지 여부 및 시클로스포린 및 시클로스포파미드에 결합된 이러한 MoAb가 장기 이식편 생존을 달성할 수 있는지 여부를 결정하는 것에 초점을 두고 있다. 항-C5 MoAb가 HAR를 예방한다는 것을 발견하였다(Wang, H., et al, Transplant (58):1643-1651, 1999). 본 발명자들은 따라서 보체 캐스케이드 내의 다른 표적, 예컨대 MASP-2가 장래의 임상적 이종장기이식의 HAR 및 급성 혈관 거부반응을 예방하는데 가치가 있을 수 있다는 것을 믿고 있다.
- [0267] 이종이식편에서 관찰된 초급성 거부반응에 있어서 보체의 주요 역할이 잘 확립되었으나, 동종이형 이식에서의 사소한 역할이 나타나고 있다. 보체-고갈 동물이 항원 자극 후 비정상 항체 반응을 보인다는 사실과 함께 보체 및 후천성 면역 반응 사이의 링크는 알려져 있다. 보체 분할 산물 C3d에 의한 항원의 옅소닌화는 B 세포에 대한 항원 제시 효과를 크게 증가시키는 것으로 나타났으며, 특정 B 세포상의 보체 수용체 타입 2의 관여를 통하여 작용한다고 나타난다. 이 연구는 마우스 피부 이식편 모델의 이식 환경에 확장될 수 있으며, 여기서 C3- 및 C4-결핍 마우스는 동종-항체 생산에 있어서 상당한 결함을 지니며, 이는 고-친화도 IgG에 대한 클래스 스위칭의 실패에 기인한다. 신장 이식 내의 이러한 기작의 중요성이 증가되며, 이는 항-공여자 항체 및 체액성 거부반응의 중요성에 기인한다.
- [0268] 이전의 연구들은 이미 신장 이식 후 동종이식편 거부반응시 몸쪽 튜브형 세포에 의한 C3 합성의 상향조절을 입증하였다. 국부적 합성 보체의 역할이 마우스 신장 이식 모델 내에서 조사되었다. C3-충분 수여자 내로 이식된 C3-음성 공여체의 이식편이 C3-양성 공여체의 이식편 대조구에 비하여 생존 기간이 연장(>100 일) 되었다는 것을 입증하였으며, 이는 14일 내에 거부반응을 일으켰다. 추가적으로, C3-음성 이식편의 수여자 내의 항-공여자 T-세포 증식 반응은 대조구의 것과 비교하면 기록적으로 감소하였으며, 이는 T-세포 프라이밍 상의 국부적으로 합성된 C3의 효과를 적시한다.
- [0269] 이러한 관찰은 공여자 항원이 T-세포에 노출하여 이식편 내에서 최초로 발생하는 가능성 및 t국부적으로 합성된 보체는 공여자 항원의 옅소닌화에 의하거나 또는 항원-제시 세포 및 T-세포 모두에 추가의 신호를 제시함으로써 항원 제시를 강화하는 가능성을 제시한다. 이 신장 이식 환경하에서, 보체 생산 튜브형 세포는 세포 표면 상의 보체 부착을 입증한다.
- [0270] 본 발명의 일 특징은 따라서 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 전체 장기(예컨대, 신장, 심장, 간, 췌장, 폐, 각막, 등) 또는 이식편 (예컨대, 판막, 힘줄, 골수, 등)의 타がい식술 또는 이종장기이식을 받은 대상체를 포함하는 이식 수여자에 투여함으로써 조직 또는 고체 장기 이식에 기인한 염증 반응을 예방 또는 치료하는 것에 관한 것이다. MASP-2 억제제는 동맥, 정맥, 근육내, 피하 또는 다른 비경구 투여, 또는 잠재적으로 비-펩티드성 억제제의 경구투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. 투여는 이식 후 급성기에 및/또는 장기 이식 후 요법으로서 발생할 수 있다. 이식후 투여에 추가적으로 또는 대신에, 대상체는

이식 전 및/또는 이식 과정 중에 MASP-2 억제제로 치료할 수 있거나, 및/또는 이식된 장기 또는 조직에 MASP-2 억제제에 선치료함으로써 치료될 수 있다. 장기 또는 조직의 선치료는 MASP-2 억제제를 함유한 용액, 겔 또는 페이스트를 장기 또는 조직의 표면에 스프레이하거나 또는 표면을 세척하여 도포하거나, 또는 장기 또는 조직을 MASP-2 억제제 함유 용액에 침지시킬 수 있다.

[0271]

중추 및 말초 신경계 장애 및 손상

[0272]

보체 시스템의 활성화는 다발성 경화증(MS), 중증근무력증(MG), 헌팅턴무도병(HD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 급성특발다발성신경염, 뇌졸중 후 재관류, 퇴행성 디스크, 뇌 외상, 파킨슨병(PD) 및 알츠하이머 질환(AD)을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 중추신경 시스템(CNS) 또는 말초 신경계(PNS) 질환 또는 손상의 발병기전에 관여한다. 보체 단백질이 뉴런, 성상교세포 및 소교세포를 포함하는 CNS 세포 내에서 합성된다는 초기의 결정, 및 보체 활성화에 따라 CNS 내에서 생성된 아나필라톡신이 신경 기능을 변화시킬 수 있다는 인식이 CNS 장애 내의 보체의 잠재적인 역할에 대하여 열려있다(Morgan, B.P., et al., *Immunology Today* 17:10: 461-466, 1996). C3a 수용체 및 C5a 수용체가 뉴런상에서 발견되고, 감각, 운동 및 뇌 변연계의 특정 부위 내에 널리 분포되어 있음이 알려졌다(Barum, S.R., *Immunologic Research* 2(5:7-13, 2002). 더욱이, 아나필라톡신 C5a 및 C3a는 설 치류 내에서 식이습관을 변화시킴을 나타내었으며, 소교세포 및 뉴런 내의 칼슘 신호를 유도할 수 있다. 이러한 발견은 뇌 외상, 탈수초, 수막염, 뇌졸중 및 알츠하이머 질환을 포함하는 다양한 CNS 염증 질환 내의 보체 활성화를 억제하는 치료제에 관한 가능성을 발전시키고 있다.

[0273]

뇌 외상 또는 출혈은 일반적인 임상적 문제이며, 보체 활성화가 발생할 수 있으며, 그 결과 염증 및 부종을 악화시킬 수 있다. 보체 억제의 효과는 뇌 외상 래트 모델 내에서 연구되었다(Kaczorowski et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 75:860-864, 1995). sCR1의 투여는 뇌 손상 직전에 손상 부위 내로의 호중구 침윤이 상당히 억제되며, 이는 보체가 포식 세포의 사용에 중요하다는 것을 나타낸다. 이와 같이, 대뇌 출혈 후 환자의 보체 활성화는 혈장 및 뇌척수액(CSF) 모두 내에서 다중 보체 활성화 산물이 높은 수준으로 존재함으로써 분명하게 영향을 미치게 된다. C5b-9 복합체의 보체 활성화 및 증가된 염색은 격리된 척추 디스크 조직 내에서 입증되었으며, 디스크 탈출증 조직-유도성 좌골신경통에서의 역할을 제시할 수 있다 (Gronblad, M., et al., *Spine* 28(2): 114-118, 2003).

[0274]

MS는 CNS 내의 축삭을 피포하고 절연하는 미엘린의 급진적인 감소에 의하여 특성화된다. 개시 원인은 알려져 있지 않지만, 면역 시스템이 관여한다는 많은 양의 증거가 있다(Prineas, J.W., et al., *Lab Invest.* 38:409-421, 1978; Ryberg, B., *J. Neurol. Sci.* 54:239-261, 1982). 보체는 MS, 길랑-바레 증후군 및 밀러-피셔 증후군을 포함하는 CNS 또는 PNS 탈수초 질환의 병태생리학의 뚜렷한 역할을 한다는 명백한 증거가 있다(Gasque, P., et al., *Immunopharmacology* 49:171-186, 2000; Barnum, S.R. in Bondy S. et al. (eds.) *Inflammatory events in neurodegeneration*, Prominent Press 139-156, 2001). 보체는 조직 파괴, 염증, 미엘린 잔해의 제거 및 심지어 축삭의 재수초화에 기여한다. 보체 관련 명백한 증거에도 불구하고, 보체 치료 표적의 확인은 실험 알려진 뇌척수염(EAE), 다발성 경화증의 동물 모델 내에서만이 현재 평가되었다. 연구들은 C3 또는 인자 B 내의 EAE 마우스 결핍은 EAE 대조군 마우스에 비하여 탈수초를 약화시켰다는 것을 확립하였다(Barnum, *Immunologic Research* 2(5:7-13, 2002). 가용성 형태의 보체 억제제인 "sCrry" 및 C37-/- 및 인자 B-/-를 사용한 EAE 마우스 연구들은 보체가 여러 수준에서의 질환 모델의 발달 및 진행에 기여한다는 것을 입증하였다. 이와 함께, 인자 B-/- 마우스 내의 EAE 중증도의 상당한 감소는 EAE 내의 보체의 대체 경로의 추가의 증거를 제공한다(Nataf et al., *J. Immunology* 765:5867-5873, 2000).

[0275]

MG는 아세틸콜린 수용체의 손실 및 종말판의 파괴를 수반하는 신경근육 결합 질환이다. sCR1은 MG 동물 모델에 매우 효과적이며, 이는 추가적으로 질환 내의 보체의 역할을 나타낸다(Piddelesden et al., *J. Neuroimmunol.* 1997).

[0276]

AD의 조직학적 홀마크인, 신경변성 질환은 노인성 플라크 및 신경섬유농축제이다 (McGeer et al., *Res. Immunol.* 143:621-630, 1992). 이러한 병리학적 마커는 보체 시스템의 성분이 강력한 주이다. 증거는 신경 사망 및 인지 장애에 이르는 국부 신경염증 상태를 적시한다. 노인성 플라크는 비정상 아밀로이드-D렙타이드 (AD, 아밀로이드 전구체 단백질에서 유도된 펩타이드)를 함유한다. AD는 C1에 결합하고, 보체 활성화를 촉발하는 것으로 나타났다(Rogers et al., *Res. Immunol.* 143:624-630, 1992). 이와 함께, AD의 특징은 C1q 내지 C5b-9 고전적 보체 경로의 활성화된 단백질의 결합이며, 이는 신경성 플라크 내에서 고도로 국부화되어 발견된다 (Shen, Y., et al., *Brain Research* 769:391-395, 1997; Shen, Y., et al., *Neurosci. Letters* 305(3): 165-168, 2001). 따라서, AD는 고전적 경로에서 개시될 뿐만 아니라, 결과 계속적 염증 상태가 신경 세포사에 기여할 수

도 있다. 더욱이, AD에서의 보체 활성화 중기 C5b-9로 진행한다는 사실은 보체 시스템의 조절 기작이 보체 활성화 프로세스를 정지시키지 못한다는 것을 나타낸다.

[0277] C1q 결합 억제제인 프로테오글리칸, C3 전환효소 억제제인 Nafamstat, 및 C5 활성화 차단제 또는 C5a 수용체 억제제를 포함하는 수종의 보체 경로 억제제가 AD의 잠재적인 치료 방법으로서 제안되어 왔다(Shen, Y., et al., Progress in Neurobiology 70:463-472, 2003). 선천성 보체 경로 내의 개시 단계로서, 및 대체 경로 활성화를 위한 MASP-2의 역할은 잠재적인 신규의 치료 방법을 제공하며, AD 내의 보체 경로 관여를 암시하는 데이터의 건강함에 의하여 지지된다.

[0278] 다른 CNS 퇴행성 질환으로서 PD 환자의 뇌 손상 영역에서, 아교세포(특히 소교세포) 반응, 및 HLA-DR 항원, 싸이토카인, 및 보체 성분의 증가된 발현으로 특성화된 염증의 증거가 있다. 이러한 관찰은 면역 시스템 기작 PD 내의 신경 손상의 발병기전 내에 관여한다는 것을 적시한다. PD 내의 1차 손상의 세포성 기작은 아직 분류되지 않았다. 그러나, 미토콘드리아 돌연변이, 산화 스트레스 및 세포자멸사가 역할을 하는 것으로 보인다. 추가적으로, PD 내의 선조체 및 흑색질의 신경 손상에 의하여 개시되는 염증은 질환의 상태를 악화시킨다. 이러한 관찰은 보체 억제 약물의 치료가 PD 진행을 감속하는 작용을 하는 것을 나타낸다(Czlonkowska, A., et al., Med. Sci. Monit. 8:165-177, 2002).

[0279] 본 발명의 일 특징은 따라서 이러한 장애 또는 손상을 지닌 대상체에 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물로 치료함으로써, 말초 신경계(PNS) 및/또는 중추신경 시스템(CNS) 장애 또는 손상을 치료하는 것에 관한 것이다. 본 발명에 따라 치료할 수 있는 CNS 및 PNS 장애 및 손상은 다발성 경화증(MS), 중증근무력증(MG), 헌팅턴무도병(HD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 급성특발다발성신경염, 뇌졸중 후 재관류, 퇴행성 디스크, 뇌 외상, 파킨슨병 (PD), 알츠하이머 질환 (AD), 밀러-피셔 증후군, 뇌 외상 및/또는 출혈, 탈수초 및, 가능하다면, 수막염을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0280] CNS 증상 및 뇌 외상을 치료하기 위하여, MASP-2 억제제는 경막내, 두개내, 뇌실내, 동맥, 정맥, 근육내, 피하, 또는 다른 비경구 투여, 및 잠재적으로 비-펩타이드성 억제제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. PNS 증상 및 뇌 외상은 전신 경로의 투여 또는 대안적으로 역기능 또는 외상 부위의 국부 투여에 의하여 치료될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 투여는 효과적인 감경 또는 증상의 조절이 달성될 때까지 임상상의 결정에 의하여 주기적으로 반복될 수 있다.

[0281] 혈액 장애

[0282] 패혈증은 미생물 침입에 대한 환자의 압도적인 반응에 의하여 유발된다. 보체 시스템의 주요 기능은 침입하는 박테리아 및 다른 병원체에 대한 염증 반응을 조화하는 것이다. 이 생리학적 역할과 일치하여, 보체 활성화는 수많은 연구들에서 패혈증의 발병기전 내의 주요 역할이 나타났다(Bone, R.C., Annals. Internal. Med. 775:457-469, 1991). 패혈증의 임상적 징후의 정의는 계속 진행중이다. 패혈증은 일반적으로 감염에 대한 전신성 숙주 반응으로 정의된다. 그러나, 다수의 경우에 있어서, 감염에 대한 임상적 증거(예컨대, 양성 박테리아 혈액 배양)가 감염 증상의 환자 내에서 발견되지 않았다. 이 불일치는 1992년 컨센서스 컨퍼런스에서 용어 "전신 염증 반응 증후군"(SIRS)으로 확립되어 고려되게 되었으며, 박테리아 감염의 정의화한 존재가 요구되지 않는다(Bone, R.C., et al., Crit. Care Med. 20:724-726, 1992). 패혈증 및 SIRS는 염증 반응 조절의 무능력이 수반된다는 일반적인 합의가 있었다. 이러한 간단한 리뷰의 목적은, 패혈증의 임상적 정의에 적절한 패혈증, 패혈 쇼크, 및 SIRS를 포함시키려 하기 때문이다.

[0283] 1980년대 후반 이전의 감염 환자 내의 감염의 주 공급원은 그람-음성 박테리아였다. 리포폴리싸카라이드(LPS), 그람-음성 박테리아 세포벽의 주성분은, 다양한 세포 타입에서 염증 매개체의 방출을 자극하며, 동물에 주입시 급성 감염성 증상을 유도하는 것으로 알려져 있다(Haeney, M.R., et al., Antimicrobial Chemotherapy 47(Suppl. A):41-6, 1998). 흥미롭게도, 원인 미생물의 스펙트럼이 1970 및 1980 후반에 우세했던 그람-음성 박테리아에서 현재 우세한 그람-양성 박테리아로 이동한 것 같으며, 그 이유는 아직도 불분명하다(Martin, G.S., et al., N. Eng. J. Med. 348:1546-54, 2003).

[0284] 다수의 연구들은 염증 매개에 있어서의 보체 활성화의 중요성을 나타내며, 쇼크, 특히 감염 및 출혈 쇼크의 특성에 기여한다고 알려져 있다. 그람-음성 및 그람-양성 유기체 모두는 일반적으로 패혈 쇼크에 관여한다. LPS는 항체에 의한 고전적 경로 활성화 매개에 의하여 발생할 수도 있음에도 우세하게는 대체 경로를 통한 보체의 잠재적 활성제이다(Fearon, D.T., et al., N. Engl. J. Med. 292:937-400, 1975). 그람-양성 세포벽의 주요 성분은 펩티도글리칸 및 지질타이코산이며, 특이적 항체의 존재하에 이들이 고전적 보체 경로를 활성화시킬 수 있음

에도 두 성분은 대체 보체 경로의 잠재적 활성화제이다(Joiner, K.A., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:461-2, 1984).

[0285]

보체 시스템은 아나필라톡신 C3a 및 C5a가 패혈증시 일어날 수 있는 다양한염증 반응을 매개한다는 것이 연구자들에게 주목받았기 때문에 패혈증의 발병기전의 초기에 관여한다. 이러한 아나필라톡신은 혈관확장 및 미세혈관 투과성의 증가, 패혈 쇼크에 중심적 역할을 하는 증상들을 불러일으킨다(Schumacher, W.A., et al., *Agents Actions* 34:345-349, 1991). 이와 함께, 아나필라톡신은 기관지연축, 마스트 세포의 히스타민 방출, 및 혈소판 응집을 포함한다. 더욱이, 이들은 과립구, 예컨대 리소좀 효소의 주화성, 응집, 부착, 방출, 독성 과산화 음이온의 생성 및 류코트리엔의 형성에 수많은 효과를 발휘한다(Shin, H. S., et al., *Science* 162:361-363, 1968; Vogt, W., *Complement* 3:177-86, 1986). 이러한 생물학적 효과는 패혈증의 합병증 예컨대 쇼크 또는 급성 호흡 곤란 증후군(ARDS)의 발달에 역할을 한다고 알려져 있다(Hammerschmidt, D.E., et al., *Lancet* 7:947-949, 1980; Slotman, G.T., et al., *Surgery* 99:744-50, 1986). 추가적으로, 증가된 수준의 아나필라톡신 C3a는 패혈증의 치명적 결과와 관련되어 있다(Hack, C. E., et al., *Am. J. Med.* 86:20-26, 1989). 일부 쇼크 동물 모델에 있어서, 특정 보체-결핍 균주(예컨대, C5-결핍)는 LPS 주입의 효과에 더 저항적이다(Hseuh, W., et al., *Immunol.* 70:309-14, 1990). 설치류 내의 패혈증 발병시 항체에 의한 C5a 생성 차단은 상당히 증가된 생존을 나타낸다(Czermak, B. J., et al., *Nat. Med.* 5:788-792, 1999). 유사한 발견은 C5a 수용체(C5aR)가 차단된 경우, 항체 또는 소 분자 억제제에서 나타난다(Huber-Lang, M.S., et al., *FASEB J.* 16:1561-14, 2002; Riedemann, N.C. et al., *J. Clin. Invest.* 770:101-8, 2002). 초기 원숭이 실험 연구들은 C5a의 항체 차단이 이. 콜리-유도성 패혈 쇼크 및 성인 호흡 곤란 증후군을 약화시킨다는 것을 제시하였다(Han gen, D.H., et al., *J. Surg. Res.* 46:195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., *J. Clin. Invest.* 77:1812-16, 1986). 패혈증에 걸린 인간에 있어서, 덜 격렬하게 감염된 환자 및 생존자에 비하여, C5a가 증가되고, 다중 장기 정지와 함께 생존율이 현저하게 감소하였다(Nakae, H., et al., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 84:189-95, 1994; Nakae, et al., *Surg. Today* 26:225-29, 1996; Bengtson, A., et al., *Arch. Surg.* 123:645-649, 1988). 패혈증시 C5a가 악영향을 발휘하는 기작은 아직 자세하게 조사되지 않았으며, 최근 데이터는 패혈증시 C5a 생성이 혈액 호중구의 선천성 면역 기능(Huber-Lang, M.S., et al., *J. Immunol.* 169:3223-31, 2002), 호흡 급증을 발현하는 이들의 능력, 및 싸이토카인을 생성하는 이들의 능력(Riedemann, N.C., et al., *Immunity* 79:193-202, 2003)을 현저하게 감소시킨다는 것을 나타낸다. 이와 함께, 패혈증시 C5a 생성은 응고 효과를 가지는 것으로 보여진다(Laudes, L.J., et al., *Am. J. Pathol.* 160:1867-75, 2002). 보체-조절 단백질 CI INH는 패혈증 및 ARDS의 동물 모델에 있어서의 효능을 갖는다(Dickneite, G., *Behring Ins. Mitt.* 93:299-305, 1993).

[0286]

렉틴 경로는 패혈증 발병기전에 역할을 가진다. MBL은 렉틴 경로를 활성화시키고, 그람-음성 및 그람-양성 박테리아를 모두 포함하는 임상적으로 중요한 미생물의 범위를 결합하는 것으로 나타났다(Neth, O., et al., *Infect. Immun.* (58:688, 2000). 지질타이코산(LTA)은 LPS의 그람-양성 상대편으로 간주된다. 이는 단핵 포식 세포 및 전혈에서 사이토카인 방출을 유도하는 잠재적인 면역 자극제이다(Morath, S. et al., *J. Exp. Med.* 795:1635, 2002; Morath, S. et al., *Infect. Immun.* 70:938, 2002). 최근 L-피콜린이 수많은 그람-양성 박테리아중 예컨대 스트렙토코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에서 분리된 LTA에 특이적으로 결합하며 렉틴 경로를 활성화시킨다는 것이 입증되었다(Lynch, N.J., et al., *J. Immunol.* 772:1198-02, 2004). MBL은 엔테로코커스(*Enterococcus*) spp의 LTA에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 폴리글리세로포스페이트 사슬은 글리코실기로 치환되었고, 9개의 다른 중 예컨대 *S. aureus*의 LTA가 아니다(Polotsky, V.Y., et al., *Infect. Immun.* (54:380, 1996).

[0287]

본 발명의 특징은 따라서 중증 패혈증, 패혈 쇼크, 패혈증에 기인한 급성 호흡 곤란 증후군, 및 전신 염증 반응 증후군을 포함하나 이에 한정되지 않는 패혈증 또는 패혈증의 증상을 겪는 대상체에 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 투여하여 패혈증 또는 패혈증 증상을 치료하는 방법을 제공한다. 관련된 방법은 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 증상의 대상체에 투여하여 출혈 쇼크, 용혈 빈혈, 자가면역 혈전성 용혈 빈혈(TTP), 용혈 요독증후군(HUS) 또는 다른 골수/혈액 파괴 증상을 포함하는 다른 혈액 장애를 치료하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 전신, 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 흡입(특히 ARDS), 피하 또는 다른 비경구 투여, 또는 잠재적으로 비-펩티드제의 경구투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. MASP-2 억제제 조성물은 패혈증 및/또는 쇼크의 후유증과 대적하기 위하여 하나 이상의 추가의 치료제와 결합될 수 있다. 진보된 패혈증 또는 쇼크 또는 이들에 의한 디스트레스 증상에 대하여, MASP-2 억제 조성물은 신속-활성 투약형으로, 예컨대 MASP-2 억제제 조성물을 함유하는 용액의 볼루스의 정맥 또는 동맥 전달에 의하여 투여되는 것이 적절하다. 반복 투여는 증상이 해결될 때까지 임상상의 결정

에 따라 수행될 수 있다.

[0288]

비뇨생식 증상

[0289]

보체 시스템은 통증 방광 질환, 감각 방광 질환, 만성 무균성 방광염 및 간질성 방광염 (Holm-Bentzen, M., et al., J. Urol. 138:503-501, 1987), 불임증(Cruz, et al., Biol. Reprod. 54:1217-1228, 1996), 임신(Xu, C., et al, Science 287:498-507, 2000), 태아산모 내성(Xu, C, et al., Science 287:498-507, 2000), 및 경색전협심증(Haeger, M., Int. J. Gynecol. Obstet. 43:113-121, 1993)을 포함하는 수종의 별개의 비뇨생식 장애에 관련된다.

[0290]

통증 방광 질환, 감각 방광 질환, 만성 무균성 방광염 및 간질성 방광염은 미지의 병인 및 발병기전의 잘 정의되지 않는 증상이며, 따라서, 이들은 합리적인 치료법이 없다. 방광의 상피 및/또는 점막 표면 피복의 결함과 관련된 병인론적 이론, 및 면역학적 교란에 관한 이론이 우세하다(Holm-Bentzen, M., et al., J. Urol. 138:503-501, 1987). 간질성 방광염 환자가 면역글로블린(IgA, G, M), 보체 성분(C1q, C3, C4) 및 C1-에스테라아제 억제제에 대하여 시험되었다고 보고되었다. 보체 성분 C4의 혈청 수준의 매우 현저한 고갈이 있다(p 0.001 이하) 및 면역글로블린 G는 상당히 증가되었다(p 0.001 이하). 이 연구는 고전적 경로 보체 시스템의 활성화를 나타내며, 만성 국부 면역학적 프로세스가 이 질환의 발병기전에 관여한다는 가능성을 나타낸다 (Mattila, J., et al., Eur. Urol. 9:350-352, 1983). 더욱이, 방광 점막 내의 항원에 대한 자가항체의 결함 후, 보체 활성화는 이 질환에 전형적인 조직 손상의 생산 및 만성 자가-영속성 염증에 관여할 수 있다(Helin, H., et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 43:88-96, 1987). 비뇨생식 염증 질환 내의 보체의 역할과 함께, 재생산 기능은 보체 경로의 국부 조절에 의하여 영향을 받을 수도 있다. 자연 발생 보체 억제제는 숙주 세포에 신체의 보체 시스템을 조절할 필요가 있는 보호를 제공하는 것과 관련되어 있다. 인간 보체 억제제, MCP 및 DAF와 구조적으로 유사한 자연 발생적 설치류 보체 억제제인 Crry는 태아 발달에 있어서 보체의 조절 대조구를 묘사하도록 조사해 왔다. 흥미롭게도, Crry-/- 마우스를 생성하기 위한 시도는 성공적이었다. 대신에, 동종접합 Crry-/- 마우스는 자궁내에서 사망하였다고 밝혀졌다. Crry-/- 배아는 성교 후 10일 까지 생존하였으며, 생존은 발달 정지에 기인한 사망이 급속하게 감소하였다. 염증 세포가 Crry-/- 배아의 태반 조직 내로 상당히 침입하였다. 이에 반하여, Crry+/+ 배아가 태반 상에 부착된 C3를 보유하는 것 같다. 이는 보체 활성화가 태반 수준에서, 보체 조절 부재하에 발생하였으며, 배아가 사망하였다는 것을 나타낸다. 확인적 연구들은 C3 결핍 배경 상으로 Crry 돌연변이를 도입하는 것을 조사하였다. 이 구조 전략은 성공적이었다. 이와 함께, 이러한 데이터는 태아산모 보체 경계면이 조절되어야만 한다는 것을 나타낸다. 태반 내의 보체 조절의 사소한 변형이 태반기능부전 및 유산에 기여하게 된다(Xu, C, et al., Science 287:498-507, 2000).

[0291]

경색전협심증은 보체 시스템 활성화가 관여되나 논란이 남아 있는 임신-유도성 고혈압 장애이다(Haeger, M., Int. J. Gynecol. Obstet. 43:113-127, 1993). 전신 순환에서의 보체 활성화는 경색전협심증 내의 확립된 질환에 밀접하게 관련되어 있으며, 임상적 증상의 존재 전에 어떠한 증가도 나타나지 않는다. 따라서, 보체 성분은 경색전협심증의 예보로서 사용될 수 없다(Haeger, et al., Obstet. Gynecol. 78:46, 1991). 그러나, 태반 베드의 국부 환경에서의 증가된 보체 활성화는 국부 대조구 기작을 극복할 수 있으며 증가된 수준의 아나필라톡신 및 C5b-9를 나타낸다(Haeger, et al, Obstet. Gynecol. 73:551, 1989).

[0292]

제안된 하나의 항정자 항체(ASA)에 관련된 불임증 기작은 생식관 내의 보체 활성화의 역할을 통한 것이다. 이들의 보체 수용체 및 정자 표면 상의 말단 C5b-9 복합체의 형성을 통한 포식 세포에 의한 정자의 결함을 강화하는 C3b 및 iC3b 옵소닌의 생성과 이에 따른 정자 운동성의 감소는 임신을 감소의 잠재적인 원인이다. 증가된 C5b-9 수준은 불임 여성의 난소 난포액에서 입증되었다(D'Cruz, O.J., et al., J. Immunol. 744:3841-3848, 1990). 다른 연구들은 정자 이동성의 손상, 및 감소된 정자/난자 상호작용을 보여주며, 이는 보체가 관련된 것이다(D'Cruz, O.J., et al., J. Immunol. 146:611-620, 1991; Alexander, N.J., Fertil. Steril. 47:433-439, 1984). 마지막으로, sCR1에 대한 연구들은 인간 정자에 ASA- 및 보체 매개 손상에 대한 보호 효과를 입증하였다(D'Cruz, O.J., et al., Biol. Reprod. 54:1217-1228, 1996). 이러한 데이터는 비뇨생식 질환 및 장애의 치료에서 보체 억제제의 사용에 대한 수종의 증거를 제공한다.

[0293]

본 발명의 일 특징은 따라서 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 장애를 겪는 대상체에 투여함으로써, 비뇨생식 장애 환자 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물 및 방법으로 대상체를 치료할 수 있는 비뇨생식 장애는 비제한적 예로써, 통증 방광 질환, 감각 방광 질환, 만성 무균성 방광염 및 간질성 방광염, 남성 및 여성 불임증, 태반기능부전 및 유산 및 경색전협심증을 포함한다. MASP-2 억제제는 전신, 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구

투여, 또는 잠재적으로 비-캡티드제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. 대안적으로, MASP-2 억제 조성물은, 예컨대 방광내 관류 또는 액체 용액 또는 겔 조성물의 삽입에 의한 비노생식관에 대한 국부적 전달이 될 수 있다. 증상을 조절하거나 또는 완화하기 위하여 임상의의 판단에 따라 반복투여가 수행될 수도 있다.

[0294]

당뇨 및 당뇨 증상

[0295]

당뇨성 망막 미세혈관병증은 증가된 투과성, 백혈구울혈, 미소혈전증, 및 모세관 세포의 세포자멸사에 의하여 특성화되며, 이들 모두는 보체의 활성화에 의하여 유발 또는 증진될 수 있다. 당뇨 환자의 사구체 구조 및 신경 내막 미세혈관은 보체 활성화의 징후를 보인다. 당뇨에 있어서 보체 억제제의 감소된 활용성 또는 효과는 시험관 내 고 글루코스에 의하여 내피 세포 표면상에서 글리코실포스파티딜리노시톨(GPI)-앵커드 막 단백질이며, CD59가 이들의 보체-억제 기능을 저지하는 비효소적 당화를 겪는 두 억제제, CD55 및 CD59의 발현이 선택적으로 감소된다는 사실을 나타낸다. Zhang et al. (Diabetes 57:3499-3504, 2002)에 의한 연구들은 인간 비증식 당뇨성 망막병증의 특징으로서의 보체 활성화 및 억제 분자 내의 변화와 관계된 것을 조사하였다. 보체 활성화의 최종 산물인 C5b-9의 부작은 타입-2 당뇨가 있는 인간 눈 공여체의 망막 혈관벽에서 발생하나, 연령-매치 비당뇨 공여체의 혈관에서는 발생하지는 않는다. 고전적 경로에 유일한 보체 성분인 C1q 및 C4는 당뇨성 망막 내에서는 검출되지 않으며, 이는 C5b-9가 대체 경로에 의하여 생성되었음을 나타낸다. 당뇨 공여체는 CD55 및 CD59의 망막 수준에서 현저한 감소를 나타내며, 이 두 보체 억제제는 GPI 앵커에 의하여 혈장 막에 결합된다. 유사한 망막 혈관 내의 보체 활성화 및 망막 CD55 및 CD59의 수준의 선택적 감소가 스트렙토조톡신-유도성 당뇨의 10주 경과 레트에서 관찰되었다. 따라서, 당뇨는 당뇨성 망막 미세혈관병증의 다른 징후가 선행하는 보체 억제제 및 보체 활성화의 조절 결함이 원인인 것 같다.

[0296]

문헌 Gerl et al. (Investigative Ophthalmology and Visual Science 43:1104-08, 2000)는 당뇨성 망막병증에 의하여영향받은 눈 내의 활성화된 보체 성분의 존재를 결정하였다. 면역조직화학 연구들은 모든 50개의 당뇨성 망막병증 표본 내의 바닥복합층에 즉시 쌓이고 모세혈관을 두텁게 둘러싼 맥락막모세혈관층에서 검출되는 보체 C5b-9 복합체의 광범위한 부작을 발견하였다. C3d의 염색은 C5b-9 염색과 양성 상관관계를 지니며, 이는 보체 활성화가 그 자리에서 일어났다는 사실을 의미한다. 추가적으로, 양성 염색은 세포의 C5b-9와 안정적인 복합체를 형성하는 비트로넥틴에서 발견된다. 이에 반하여, C-반응성 단백질(CRP), 만난-결합 렉틴 (MBL), C1q, 또는 C4의 양성 염색은 없으며, 이는 보체 활성화가 C4-의존성 경로를 통하여 발생하지 않는다는 것을 나타낸다. 따라서, C3d, C5b-9, 및 비트로넥틴의 존재는 보체 활성화가, 가능하다면 당뇨성 망막병증에 의하여 영향을 받는 눈의 맥락막모세혈관층 내의 대체 경로를 통하여 달성된다는 것을 적시한다.

[0297]

보체 활성화는 안구 조직 질환 및 시력 손상에 기여할 수 있는 병리학적 후유증의 원인 요인이 될 수 있다. 따라서, 보체 억제제의 사용은 당뇨에서 발생할 수 있는 미세 혈관 손상을 감소 또는 차단하는 효과적인 요법이 될 수 있다.

[0298]

인슐린 의존성 당뇨병(IDDM, 타입-I 당뇨)은 다른 유형의 자가항체의 존재에 관련된 자가면역 질환이다 (Nicoloff et al., Clin. Dev. Immunol. 11:61-66, 2004). 순환 내의 이러한 항체 및 대응 항원의 존재는 순환 면역 복합체(CIC)의 형성을 유도하며, 이는 장기간 혈액 내에 잔존하는 것으로 알려져 있다. 소혈관 내의 CIC의 부작은 임상적 결과를 약화시키는 미세혈관병증을 유도하는 능력이 있다. 당뇨병 소아 내의 CIC 및 미세혈관 합병증의 발달 사이에 상관관계가 존재한다. 이러한 발견은 증가된 수준의 CIC IgG가 당뇨병 신장병의 초기 발달과 관련이 있으며 보체 경로의 억제제가 차단 당뇨성 신장병에 효과적이라는 사실을 나타낸다(Kotnik, et al., Croat. Med. J. 44:707-11, 2003). 이와 함께, 하방 보체 단백질의 형성 및 대체 경로의 관여가 IDDM 내의 전체 섬 세포 기능의 기여 요인이 되는 것 같으며, 잠재적인 손상 또는 제한 세포 사멸을 감소시키기 위한 보체 억제제의 사용이 기대된다(Caragher, et al., J. Endocrinol. 162:143-53, 1999).

[0299]

순환 MBL 농도는 건강한 대조구에 비하여 타입 1 당뇨 환자 내에서 현저히 증가하며, 이러한 MBL 농도는 소변 알부민 배출과 양성 상관관계를 가진다(Hansen et al., J. Clin. Endocrinol. Metab. 88:4857-61, 2003). 최근 임상적 연구는 고도- 및 저도-발현 MBL 유전형의 빈도가 타입 1 당뇨 환자와 건강한 대조구간에 유사하다는 사실을 발견하였다(Hansen et al., Diabetes 53:1570-76, 2004). 그러나, 당뇨 환자 중에서 신장병에 걸릴 위험은 이들이 고 MBL 유전형을 보유한 경우 현저하게 증가된다. 이는 고 MBL 수준 및 렉틴 경로 보체 활성화가 당뇨성 신장병의 발달에 기여할 수 있다고 적시한다. 이 결론은 최근 전망있는 연구에 의하여 지지되며, 여기서 새롭게 진단된 타입 1 당뇨성 환자의 코호트 연구에서 MBL 수준 및 알부민뇨간의 관계가 조사되었다(Hovind et al., Diabetes 54:1523-21, 2005). 이들은 타입 1 당뇨의 초기 단계에서 높은 수준의 MBL은 후의 지속적인 알부민뇨의 발달과 현저한 관련이 있다는 것을 발견하였다. 이러한 결과는 MBL 및 렉틴 경로가 존재하는 변화를

단순히 가속화하는 것 보다는 당뇨병 혈관 합병증의 특이적 발병기전에 관여한다는 것을 나타낸다. 최근 임상적 연구(Hansen et al., Arch. Intern. Med. 166:2007-13, 2006)에서는, MBL 수준이 15년간 추적 관찰한 타입 2 당뇨병 환자의 양호하게-특성화된 코호트 연구 내에서 기저에서 측정되었다. 이들은 공지의 교란요인의 조정 후, 저 MBL 수준의 환자들(<1000 μ g/L) 보다 고 MBL 혈장 수준의 환자(>1000 μ g/L)간에서 사망 위험이 현저하게 높았다는 것을 발견하였다.

[0300]

본 발명의 다른 특징으로서, 본 방법은 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 투여함으로써 비비만 당뇨병 (IDDM) 또는 IDDM 또는 성인형 (타입-2) 당뇨병의 혈관병증, 신경병증 또는 망막병증 합병증을 겪고 있는 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 전신, 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 피하 또는 다른 비경구 투여, 또는 잠재적으로 비-펩티드제의 경구투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. 대안적으로, 투여는 혈관병증, 신경병증 또는 망막병증 증상의 부위에 국부적으로 투여될 수 있다. MASP-2 억제제는 만성 증상의 치료 또는 조절을 위한 연장된 기간 동안의 주기적 투여, 또는 급성 증상의 치료를 위한 단일 또는 연속 투여가 될 수 있다.

[0301]

전후화학적치료 투여 및 악성 종양의 치료

[0302]

보체 시스템의 활성화는 악성 종양의 발병기전에 관여할 수 있다. 최근, C5b-9 보체 복합체, IgG, C3, C4, S-단백질/비트로넥틴, 피브로넥틴, 및 마크로파지의 신생항원은 다클론 또는 단클론 항체 및 스트렙타비딘-바이오틴-과산화효소 기법을 사용하여 6개의 양성 유방 종양 시료 및 17개의 유방암 시료를 국부화하였다. C5b-9를 제시하는 각 TNM 단계의 암종을 지닌 모든 조직 시료는 종양 세포막, 세포 잔존물상의 얇은 과립, 및 괴사 영역 내의 확산 부착물 상에 부착된다(Niculescu, F., et al., Am. J. Pathol. 140:1039-1043, 1992).

[0303]

이와 함께, 보체 활성화는 화학요법 또는 방사선 요법의 결과이므로, 따라서 보체 활성화 억제는 의원성 염증을 감소시키기 위한 악성 종양의 치료에 있어서 보조제로서 유용하다. 화학요법 및 방사선 요법이 수술에 선행하는 경우, C5b-9 부착은 더 강력해지며 확장된다. C5b-9 부착은 모든 양성 병변의 시료에서 부재하였다. S-단백질/비트로넥틴은 연결 조직 기질 내의 섬유성 부착으로서 및 피브로넥틴보다 덜 강력하고 덜 확장된 종양 세포 주위의 확산 부착으로서 제공된다. IgG, C3, 및 C4 부착은 암종 시료에서만 나타난다. C5b-9 부착의 존재는 보체 활성화의 지표이며, 유방암 내의 이의 후속적 병인론적 효과이다(Niculescu, F., et al., Am. J. Pathol. 140:1039-1043, 1992).

[0304]

펄스 조절가능 염료 레이저(577 nm)(PTDL) 요법은 헤모글로빈 응고 및 조직 괴사를 유도하며, 혈관에 주로 제한된다. PTDL-조사 정상 피부 연구에서, 주요한 발견은 다음과 같다: 1) C3 절편, C8, C9, 및 MAC는 혈관벽에 부착었다; 2) 이러한 부착은 적혈구 응고체의 부위에서의 트랜스페린의 즉시 부착과 달리 조사 후 7분이 경과하였기 때문에 단백질 변성에 기인하지 않았다; 3) C3 부착은 조직 괴사 자체가 증폭을 유도하지 않았기 때문에 특이적인 반응인 대체 경로에 의하여 보체 활성화의 증폭을 나타낸다; 및 4) 이러한 반응은 다형핵 백혈구의 국부 축적을 진행시킨다. 조직 괴사는 혈관중에서 더 뚜렷하다. 괴사 중앙부의 거대 혈관중 혈관은 보체를 현저하게 고정하지 않는다. 이와 달리, 주변부에 위치한 혈관내 보체 부착 하나의 예외를 지닌 정상피부 내에서 관찰되는 것과 유사하다: C8, C9, 및 MAC은 레이저 치료 후 즉시 동일한 혈관에서 검출되었으며, 이 발견은 C5 전환효소의 형성없이 직접 발생한 MAC의 결합과 일치한다. 이러한 결과는 보체가 PTDL-유도성 혈관 괴사 내에서 활성화되며, 염증 반응을 확실하게 한다는 것을 나타낸다.

[0305]

종양의 광역학 요법(PDT)은 강력한 숙주 면역 반응을 유발시키며, 이들 징후중의 하나는 뚜렷한 호중구증가이다. PDT-유도성 보체 활성화의 결과로서 방출된 보체 절편(직접 매개체)과 함께, 보체 활성화의 결과로서 발생하는 최소한 12개의 2차 매개체가 존재한다. 후자는 싸이토카인 IL-1베타, TNF-알파, IL-6, IL-10, G-CSF 및 KC, 트롬복산, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 히스타민, 및 응고 인자를 포함한다(Cecic, L, et al., Cancer Lett. 785:43-51, 2002).

[0306]

마지막으로, MASP-2-의존성 보체 활성화 억제제의 사용은 암치료의 표준 치료 요법과 관련하여 계획되었다. 예를 들면, 키메라 항-CD20 단클론 항체, 리툭시맙 치료는 순환 종양 세포의 수가 많은 환자에서 특히 중등 내지 중증의 최초-투약 부작용과 관련되어 있다. 리툭시맙의 최초 주입시의 최근 연구들은 5명의 재발 저도 비-호지킨 림프종(NHL) 내의 보체 활성화 산물(C3b/c 및 C4b/c) 및 싸이토카인(종양 괴사 인자 알파(TNF-알파), 인터류킨 6(IL-6 및 IL-8)에 의하여 측정되었다. 리툭시맙의 주입은 급속 보체 활성화를 유도하며, TNF-알파, IL-6 및 IL-8의 방출을 진행시킨다. 연구군이 작지만, 보체 활성화의 수준은 주입 전 B 세포 순환의 수($r=0.85$; $P=0.07$)와 부작용 중증도는 상관관계에 있는 것 같다. 그 결과는 리툭시맙 치료 부작용의 발병기전에 중심 역할을 하는 것을 나타낸다. 보체 활성화는 코르티코스테로이드에 의하여 예방될 수 없기 때문에, 이는 리툭시맙의 최초

투여시 보체 억제제의 가능한 역할에 대한 연구에 관한 것일 수 있다(van der Koik, L.E., et al, Br. J. Haematol. 775:807-811, 2001).

[0307] 본 발명의 다른 특징으로서, MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 화학치료제 및/또는 방사선 요법의 치료를 받은 대상체 내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. 이 방법은 전후화학치료적, 즉, 화학치료제(들) 및/또는 방사선 요법의 투여 전 및/또는 도중 및/또는 후에 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함한다. 예를 들면, 본 발명 MASP-2 억제제 조성물의 투여는 비-표적화된 건강한 조직 내의 화학- 및/또는 방사선 요법의 결정적 효과를 감소시키기 위하여 화학- 또는 방사선 요법과 동시에 또는 전에, 및 요법의 과정동안 계속하여 수행될 수 있다. 이와 함께, MASP-2 억제제 조성물은 화학- 및/또는 방사선 요법 후에 투여될 수 있다. 화학- 및 방사선 요법 요법은 반복적 치료가 필요하므로, 따라서, MASP-2 억제제 조성물의 투여가 화학치료제 및 광조사 치료와 일치하여 반복적되는 것이 가능하다는 것을 이해하여야 한다. MASP-2 억제제는 악성 종양 환자의 치료를 위한 화학치료제로서, 단독 또는 다른 화학치료제 및/또는 방사선 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 투여는 경구(비-펩티드성), 정맥, 근육내 또는 다른 비경구 경로를 통하는 것이 적합하다.

[0308] 내분비 장애

[0309] 보체 시스템은 최근 하시모토 갑상선염(Blanchin, S., et al., Exp. Eye Res. 73(6):887-96, 2001), 스트레스, 불안감 및 뇌하수체로부터의 프로락틴, 성장 또는 인슐린-유사 성장 인자, 및 아드레노코르티코트로핀의 조절 방출에 관련된 다른 잠재적인 호르몬 장애를 포함하는 소수의 내분비 증상 또는 장애에 관련되어 있다(Francis, K., et al., FASEB J. 77:2266-2268, 2003; Hansen, T.K., Endocrinology 144 (12):5422-9, 2003).

[0310] 양방향 커뮤니케이션이 분자 예컨대 호르몬 및 사이토카인을 사용하는 내분비계와 면역계 사이에 존재한다. 최근, 새로운 경로에서 C3a, 보체-유도성 사이토카인이 뇌하수체 전엽 호르몬 방출을 자극하고 및 시상하부-뇌하수체-부신축, 스트레스 반응에 대한 반응 중심 및 염증을 조절하는 반응 중심을 활성화한다는 사실이 밝혀졌다. C3a 수용체는 뇌하수체-호르몬- 분비 및 비-호르몬- 분비(folliculostellate) 세포 내에서 발현된다. C3a 및 C3adesArg(비-염증 대물질)은 프로락틴, 성장 호르몬, 및 아드레노코르티코트로핀을 방출하는 뇌하수체 세포 배양물을 자극한다. 이러한 호르몬의 혈청 수준은, 부신 코르티코스테론과 함께, 재조합 C3a 및 C3adesArg의 생체 내 투여에 의존적으로 복용량을 증가시킨다. 그 의미는 보체 경로가 내분비 뇌하수체 선과의 커뮤니케이션을 통하여 조직-특이적 및 전신성 염증 반응을 조절한다는 것이다 (Francis, K., et al., FASEB J. 77:2266-2268, 2003).

[0311] 동물 및 인간에서의 많은 연구들은 성장 호르몬(GH) 및 인슐린-유사 성장 인자-I(IGF-I)가 면역 기능을 조절한다는 것을 나타낸다. GH 요법은 임계적 환자의 사망율을 증가시킨다. 과도한 사망율은 거의 패혈 쇼크 또는 다중-장기 정지에 기인하며, 이는 면역 및 보체 기능의 GH-유도성 조절이 관여한다는 것을 나타내는 것이다. 만단-결합 렉틴(MBL)은 탄수화물 구조의 결합 후 보체 캐스케이드 및 염증의 활성화를 통하여 선천성 면역성에 있어서 중요한 역할을 하는 혈장 단백질이다. 증거는 성장 호르몬에 의한 MBL 수준에 현저한 영향을 미치고, 따라서, 잠재적으로 렉틴-의존성 보체 활성화에 영향을 미친다는 것을 지지한다(Hansen, T. K., Endocrinology 144(12) :5422-9, 2003).

[0312] 티로퍼옥시다아제(TPO)는 자가면역 갑상선 질환에 관련된 주요 자가항원의 하나이다. TPO는 보체 대조구 단백질(CCP)-유사 모듈 및 표피 성장 인자-유사 모듈에 따른 거대 N-말단 미엘로과산화효소-유사 모듈로 구성되어 있다. CCP 모듈은 C4 보체 성분의 활성화에 관련된 분자의 구성원이며, 연구들은 C4가 TPO에 결합되고 자가면역 증상 내의 보체 경로를 활성화시키는 지 여부를 조사하였다. 이들의 CCP 모듈을 통한 TPO는 Ig에 의한 중재없이 보체를 직접 활성화시킬 수 있다. 더욱이, 하시모토 갑상선염 환자에 있어서, 갑상선세포가 C4 및 보체 경로의 모든 하방 성분을 과다분비한다. 이러한 결과는 보체 경로의 활성화에 관한 다른 기작을 따라, TPO가 하시모토 갑상선염에서 관찰되는 대량 세포 파괴에 기여할 수 있다는 것을 나타낸다(Blanchin, S., et al., 2001).

[0313] 본 발명의 일 특징은 따라서 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 내분비 장애를 겪는 대상체에 투여함으로써 내분비 장애를 치료하기 위하여 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따라 치료되는 증상은 비제한적 예로써, 하시모토 갑상선염, 스트레스, 불안감 및 프로락틴, 성장 또는 인슐린-유사 성장 인자, 및 뇌하수체의 아드레노코르티코트로핀의 조절 방출에 관련된 다른 잠재적인 호르몬 장애를 포함한다. MAS-2 억제제는 전신적으로, 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 흡입, 비강, 피하 또는 다른 비경구 투여, 또는 잠재적으로 비-펩티드제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여될 수 있다. MASP-2 억제제 조성물은 하나 이상의 추가의 치료제와 결합될 수 있다. 투여는 증상이 호전될 때까지 임상주의 결정에

의하여 반복적으로 투여될 수 있다.

[0314] **안과학적 증상**

[0315] 연령-관련 황반 변성(AMD)은 수백만의 성인에 영향을 미치는 안맹 질환이나, 여전히, AMD를 발달시키는 생화학적, 세포성, 및/또는 분자적 후유증은 잘 알려져 있지 않다. AMD에 의하여 황반의 진행성 파괴가 일어나며, 망막의 뒤 및 망막 색소 상피(RPE)와 맥락막 사이의 황반 및 그 주위에 위치한 드루젠이라 불리는 세포성 부착물의 형성과 관계된다. 최근 연구들은 드루젠-유관 구성 성분 중에 염증 및 면역-매개 프로세스에 관한 단백질이 유력하다는 것을 알아내었다. 다수의 이러한 분자를 암호화하는 전사는 망막, RPE, 및 콜로이드성 세포 내에서 검출된다. 이러한 데이터는 강력한 항원-제시 세포인 수상돌기 세포가 드루젠 발달과 긴밀하게 관련되어 있으며, 보체 활성화가 드루젠 내 및 RPE-맥락막 경계면을 따라 활성화되는 핵심 경로라는 것을 입증하였다(Hageman, G.S., et al, Prog. Retin. Eye Res., 20:705-732, 2001).

[0316] 수개의 비의존성 연구들은 보체 인자 H(CFH) 유전자 내의 AMD 및 유전적 유전자다형성간의 강력한 관계를 보여 주었으며, AMD의 가능성은 대립유전자 위험에 대한 개별 동종접합 내의 7.4의 인자에 의하여 증가되었다(Klein, RJ. et al., Science, 308:362-364, 2005; Haines et al., Science 308:362-364, 2005; Edwards et al., Science 308:263-264, 2005). CFH 유전자는 6개의 비의존성 결합 스캔에 의하여 AMD 내에 관련된 영역인 염색체 1q31에 맵핑되었다(예컨대, D.W. Schultz et al., Hum. Mol. Genet. 72:3315, 2003). CFH는 보체 시스템의 핵심 조절제로 알려져 있다. 세포 및 순환상의 CFH는 C3의 C3a 및 C3b로의 활성화를 억제하거나, 및 존재하는 C3b를 불활성화시킴으로써 보체 활성화를 조절한다고 알려져 있다. C5b-9의 부착은 브루쉬 막, 모세관내 지주 및 AMD 환자 내의 드루젠에서 관찰된다(Klein et al.). 면역형광측정법 실험은 AMD에서, CFH의 유전자다형성이 콜로이드 모세혈관 및 콜로이드 혈관 내의 보체 부착을 유발시킨다는 것을 나타낸다(Klein et al.).

[0317] 막-유관 보체 억제제, 보체 수용체 1는 드루젠 내에서 국부화되었으나, 면역조직화학적으로 RPE 세포 내에서 검출되지 않았다. 이에 반하여, 제2 막-유관 보체 억제제, 막 보조인자 단백질은 드루젠-유관 RPE 세포, 및 드루젠 내의 작은 구형 구조 성분 내에 존재한다. 이러한 이전에 미확인된 성분이 보체 활성화 부위에 특징적으로 부착된 보체 성분 C3의 단백질분해 절편에 대한 강력한 면역반응성을 나타낸다. 이러한 구조는 보체 공격의 표적인 RPE 세포 파괴의 잔여 잔해에 제시된다는 것을 제안한다(Johnson, L.V., et al., Exp. Eye Res. 73:887-896, 2001).

[0318] 이러한 다중 보체 조절제 및 보체 활성화 산물(C3a, C5a, C3b, C5b-9)의 확인 및 국부화는 연구자들로 하여금 만성 보체 활성화가 드루젠 생체발생 및 AMD 병인의 프로세스 내에서 중요한 역할을 한다는 결론을 내리게 하였다(Hageman et al., Progress Retinal Eye Res. 20:705-32, 2001). 드루젠 내의 C3 및 C5 활성화 산물의 확인은 C3 및 C5 둘 모두가 세 경로 모두에 공통되기 때문에 본 발명에 관한 이해에 따라 보체가 고전적 경로나 렉틴 경로 또는 대체 증폭 루프를 통하여 활성화되었는지에 대한 식견을 제공한다. 그러나, 두 연구들은 고전적 경로의 활성화를 위한 필수적인 인식 성분인 C1q에 특이적인 항체를 사용하여 드루젠 면역-표지화를 관찰하였다(Mullins et al., FASEB J. 74:835-846, 2000; Johnson et al, Exp. Eye Res. 70:441-449, 2000). 두 연구들은 드루젠 내의 C1q 면역-표지화는 일반적으로 관찰되지 않았다고 결론 내렸다. 이러한 C1q에 의한 음성 결과는 드루젠 내의 보체 활성화가 고전적 경로를 통하여 발생하지 않는다는 것을 의미한다. 이와 함께, 면역-복합체 구성 성분(IgG 경쇄s, IgM)에 대한 드루젠의 면역-표지화는 Mullins et al., 2000의 연구에서 변화에 약하다고 보고되었으며, 추가적으로 고전적 경로가 이 질환 경과에서 발생하는 보체 활성화 내에서 보조 역할을 하는 것을 나타낸다.

[0319] 최근 발간된 두 연구들은 인간 CNV 모델 마우스 내의 레이저-유도 콜로이드성 신생혈관형성(CNV)의 발달에 있어서의 보체의 역할을 평가하였다. 면역조직학적 방법을 사용하여, Bora 및 동료연구자(2005)들은 레이저 치료 후 신생혈관 복합체 내의 보체 활성화 산물 C3b 및 C5b-9(MAC)의 현저한 부착을 발견하였다(Bora et al., J. Immunol. 174:491-1, 2005). 중요한 것은, CNV는 모든 보체 활성화 경로에 필요한 필수 성분인 C3가 결핍된 마우스(C3-/- 마우스) 내에서 발달되지 않는다는 것이다. CNV 내에 관여하는 세 혈관형성 인자인 VEGF, TGF- β 2, 및 β -FGF의 RNA 메세지 수준은 레이저-유도 CNV 후의 마우스 눈 조직에서 증가되었다. 현저한 것은, 보체 고갈에 의하여 이러한 혈관형성 인자의 RNA 수준의 기록적인 감소가 나타났다는 것이다.

[0320] ELISA법을 사용하여, Nozaki 및 동료연구자들은 잠재적인 아나필라톡신 C3a 및 C5a가 레이저-유도 CNV의 과정에서 초기에 발생하였다는 것을 입증하였다(Nozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 103:2328-33, 2006). 추가적으로, C3 및 C5의 이러한 두 생활성 절편은 야생형 마우스 내의 유리체내 주사 후 VEGF 발현을 유도하였다. 이러한 결과와 일치하게, Nozaki 및 동료연구자는 또한 C3a 및 C5a 수용체의 유전적 제거가 레이저 손상 후

VEGF 발현 및 CNV 형성을 감소시키고, C3a 또는 C5a의 항체-매개 중성화 또는 이들 수용체의 약리학적 차단도 CNV를 감소시켰다는 것을 보여주었다. 이전의 연구들은 특히 백혈구, 및 마크로파지의 사용이 레이저-유도 CNV에 있어서 중심 역할을 한다는 것을 확립하였다(Sakurai et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44:3578-85, 2003; Espinosa-Heidmann, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44:3586-92, 2003). 이들의 2006 논문에서, Nozaki 및 동료연구자들은 백혈구 사용은 레이저 손상 후 C3aR(-/-) 및 C5aR(-/-) 마우스에서 기록적으로 감소되었다는 것을 보고하였다.

[0321]

본 발명의 일 특징은 따라서 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 증상 또는 기타 보체-매개 안과학적 증상의 대상체에 투여함으로써 연령-관련 황반 변성 또는 기타 보체 매개 안과학적 증상을 치료하기 위하여 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제 조성물은, 예컨대 겔, 연고 또는 드롭 형태의 조성물의 관류 또는 도포에 의하여 국부적으로 눈에 투여할 수 있다. 대안적으로, MASP-2 억제제는 전신적으로, 예컨대 동맥, 정맥, 근육내, 흡입, 비강, 피하 또는 다른 비경구 투여, 또는 잠재적으로 비-펩티드제의 경구 투여에 의하여 대상체에 투여할 수 있다. MASP-2 억제제 조성물은 하나 이상의 추가의 치료제와 결합할 수 있으며, 예컨대 U.S. Patent Application Publication No. 2004-0072809-A1에 개시되어 있다. 투여는 증상이 호전되거나 또는 조절될 때까지 임상상에 의한 판단에 의하여 반복 투여될 수 있다.

[0322]

IV. MASP-2 억제제

[0323]

본 발명의 일 특징으로서, 본 발명 MASP-2-의존성 보체 활성화의 역효과의 억제 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 살아있는 대상체 내에 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양으로 투여된다. 본 발명의 특징의 실시에서 있어서, 대표적인 MASP-2 억제제는: MASP-2의 생물학적 활성을 억제하는 분자(예컨대 소분자 억제제, 항-MASP-2 항체 또는 MASP-2에 관여하거나 또는 단백질-단백질 상호작용을 방해하는 차단 펩타이드), 및 MASP-2의 발현을 감소시키는 분자(예컨대 MASP-2 안티센스 핵산 분자, MASP-2 특이적 RNAi 분자 및 MASP-2 리보자임)를 포함하며, 따라서 MASP-2가 대체 보체 경로의 활성화를 예방한다. MASP-2 억제제는 1차 요법으로서 단독으로 또는 다른 의학적 치료의 치료적 이점을 증진시키는 보조 요법으로서 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0324]

MASP-2-의존성 보체 활성화의 억제는 본 발명의 방법에 따라 MASP-2 억제제의 투여 결과로서 발생하는 보체 시스템의 성분의 다음의 변화 중의 최소한 하나에 의하여 특성화된다: MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템 산물 C4b, C3a, C5a 및/또는 C5b-9 (MAC)의 생성 또는 생산의 억제(예를 들면, 실시예 2에 설명된 바와 같이 측정), 비민감화한 레빗 또는 기니아 피그 적혈 세포를 사용한 용혈 측정으로 사정한 대체 보체 활성화의 감소, C4 분열 및 C4b 부착의 감소(예를 들면, 실시예 2에 설명된 바와 같이 측정), 또는 C3 분열 및 C3b 부착의 감소(예를 들면, 실시예 2에 설명된 바와 같이 측정).

[0325]

본 발명에 따라, MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템의 억제에 효과적인 MASP-2 억제제가 사용된다. 본 발명의 특징에 사용되는 MASP-2 억제제는, 예를 들면, 항-MASP-2 항체 및 이들의 절편, MASP-2 억제 펩타이드, 소분자, MASP-2 가용성 수용체 및 발현 억제제를 포함한다. MASP-2 억제제는 MASP-2의 생물학적 기능을 차단함으로써 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제할 수 있다. 예를 들면, 억제제는 MASP-2 단백질-대-단백질 상호작용을 효과적으로 차단하며, MASP-2 이합체화 또는 결합을 방해하며, block Ca²⁺ 결합을 차단하고, MASP-2 세린 프로테아제 활성화 부위를 방해하거나, 또는 MASP-2 단백질 발현을 감소시킬 수 있다.

[0326]

일 실시 상태에서, MASP-2 억제제는 C1q-의존성 보체 활성화 시스템의 기능을 손상시키지 않고 MASP-2 보체 활성화만을 선택적으로 억제한다.

[0327]

본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 보체 시스템 내의 다른 항원보다 최소한 10배의 친화도를 지닌 SEQ ID NO:6를 포함하는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 특이적 MASP-2 억제제이다. 또 다른 실시 상태에서, MASP-2 억제제는 보체 시스템 내의 다른 항원보다 최소한 100배 이상의 결합 친화도를 지닌 SEQ ID NO:6를 포함하는 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다. MASP-2 억제제의 결합 친화도는 적합한 결합 측정법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0328]

MASP-2 폴리펩타이드는 MASP-1, MASP-3, 및 C1r 및 C1s, C1 보체 시스템의 프로테아제에 유사한 분자 구조를 나타낸다. SEQ ID NO:4 내의 cDNA 분자는 MASP-2의 대표적인 예를 암호화하며(SEQ ID NO:5 내의 아미노산 서열로 구성), 인간 MASP-2 폴리펩타이드에 분해 후 분열되는 리더 서열(aa 1-15)을 제공하여 인간 MASP-2의 성숙 형태(SEQ ID NO:6)가 되도록 한다. 도 2에 나타난 바와 같이, 인간 MASP 2 유전자는 12개의 엑손을 포함한다. 인간

MASP-2 cDNA는 엑손 B, C, D, F, G, H, I, J, K 및 L에 의하여 암호화된다. 대체 스플라이스는 도 2에 나타난 바와 같이 엑손 B, C, D 및 E의 발생에 의하여 (SEQ ID NO:1) 암호화되는 MB L-유관 단백질 19로 불리는 20 kDa 단백질("Map19", 또는 "sMAP")(SEQ ID NO:2)가 된다. SEQ ID NO: 50의 cDNA 분자는 뮤린 MASP-2을 암호화하며(SEQ ID NO:51 내의 아미노산 서열로 구성), 뮤린 MASP-2 폴리펩타이드에 분비 후 분열되는 리더 서열을 제공하여 뮤린 MASP-2의 성숙 형태(SEQ ID NO:52)가 되도록 한다. SEQ ID NO:53의 cDNA 분자는 레트 MASP-2을 암호화하며(SEQ ID NO:54 내의 아미노산 서열로 구성), 레트 MASP-2 폴리펩타이드에 분비 후 분열되는 리더 서열을 제공하여 레트 MASP-2의 성숙 형태(SEQ ID NO:55)가 되도록 한다.

[0329] 당해 기술 분야의 숙련자는 각각 인간, 뮤린 및 레트 MASP-2의 단일 대립유전자, 및 대립 변이 및 대체 스플라이싱을 나타내는 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:50 및 SEQ ID NO:53에 개시된 서열이 발생될 수 있다는 것을 이해하고 있다. 침묵 돌연변이 및 아미노산 서열 변화를 일으키는 돌연변이를 포함하는 것들을 포함하는 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:50 및 SEQ ID NO:53에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 대립 변이체는 본 발명의 범위안에 존재한다. MASP-2 서열의 대립 변이체는 표준 절차에 따른 다른 개개의 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 프로브화에 의하여 클론될 수 있다.

[0330] 인간 MASP-2 단백질(SEQ ID NO:6)의 도메인은 도 3A에 나타내었으며, N-말단 C1r/C1s/sea 성게 Vegf/골형성 단백질(CUBI)도메인 (aa 1-121, SEQ ID NO:6), 표피 성장 인자-유사 도메인(aa 122-166), 제2 CUBI 도메인(aa 167-293), 및 보체 대조구 단백질 도메인의 탄핵 및 세린 프로테아제 도메인을 포함한다. MASP 2 유전자의 대체 스플라이싱은 Map 19가 되고(도 3B). Map 19는 도 2에 나타난 바와 같이 엑손 E에서 유도된 4개의 추가의 잔기(EQSL)를 지닌 MASP-2의 N-말단 CUBI-EGF 영역을 함유하는 비효소적 단백질이다.

[0331] 수종의 단백질은 단백질-대-단백질 상호작용을 통하여 MASP-2와 결합하거나 또는 상호작용하는 것으로 보인다. 예를 들면, MASP-2는 Ca^{2+} 의존성 복합체, 렉틴 단백질 MBL, H-피콜린 및 L-피콜린에 결합하거나 이를 형성하는 것으로 알려져 있다. 각 MASP-2/렉틴 복합체는 단백질 C4 및 C2의 MASP-2-의존성 분열을 통하여 보체가 활성화되는 것으로 알려져 있다(Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 776:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 768:3502-3506, 2002). 연구들은 MASP-2의 CUBI-EGF 도메인이 MASP-2와 MBL의 결합에 필수적이라는 것을 보여주었다(Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 766:5068, 2001). 이는 CUBIEGFCUBII 도메인이 MASP-2의 이합체화를 매개한다는 것을 나타내며, 이는 활성 MBL 복합체의 형성을 필요로 한다(Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000). 따라서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화에 중요한 것으로 알려진 MASP-2 표적 영역에 결합하거나 또는 방해하는 것으로 확인될 수 있다.

[0332] **항-MASP-2 항체**

[0333] 본 발명의 다른 특징으로써, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하는 항-MASP-2 항체를 포함한다. 본 발명의 특징에 유용한 항-MASP-2 항체는 모든 항체 생성 포유류에서 유도한 다클론, 단클론 또는 재조합 항체를 포함하며, 다특이적, 키메라, 인체적응형, 항-이디오타입, 및 항체 절편일 수 있다. 항체 절편은 Fab, Fab', F(ab)2, F(ab')2, Fv 절편, scFv 절편 및 추가로 본원에서 설명할 단일-사슬 항체를 포함한다.

[0334] 수종의 항-MASP-2 항체는 본원에서 설명되었으며, 이중 일부는 아래 표 1에 열거하였다. 이러한 이전에 설명된 항-MASP-2 항체는 본원에서 설명한 측정법을 사용하여 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하는 능력에 대하여 선별하였다. 예를 들면, 항 레트 MASP-2 Fab2 항체는 MASP-2 의존성 보체 활성화를 차단함으로써 확인되며, 이는 실시예 24 및 25에서 좀더 자세하게 설명되었다. 일단 항-MASP-2 항체의 MASP-2 억제제로서의 기능이 확인된 경우, 이하 설명할 항-이디오타입 항체의 생산 및 다른 MASP-2 결합 분자의 확인을 위하여 사용될 수 있다.

표 1

표 1: 본원의 MASP-2 특이적 항체		
항원	항체 타입	참고자료
재조합 MASP-2	레트 다클론	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 37:803-811, 2000
재조합 인간 CCP1/2-SP 절편 (MoAb 8B5)	레트 MoAb (하위클래스 IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003

재조합 인간 MAp19 (MoAb 6G12) (MASP-2와 교차반응)	레트 MoAb (하위클래스 IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., J. of Immunol. Methods 282:159-167, 2003
hMASP-2	마우스 MoAb(S/P) 마우스 MoAb(N-말단)	Peterson, S.V., et al., Mol. Immunol. 35:409, April 1998
hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP 도메인)	레트 MoAb: Nimoab 101, 하이브리도마 세포주 03050904(ECACC)에서 생산	WO 2004/106384
hMASP-2 (전장 his 태그)	뮤린 MoAbs: Nimoab 104 하이브리도마 세포주 M0545YM035(DSMZ) Nimoab 108 하이브리도마 세포주 M0545YM029(DSMZ) Nimoab 109 하이브리도마 세포주 M0545YM046(DSMZ) Nimoab 110 하이브리도마 세포주 M0545YM048(DSMZ)	WO 2004/106384

[0336]

감소된 효과기 기능을 지닌 항-MASP-2 항체

[0337]

본 발명의 다른 특징으로써, 항-MASP-2 항체는 감소된 효과기 기능을 보유하여 고전적 보체 경로의 활성화를 일으킬 수 있는 염증을 감소시키게 된다. IgG 분자의 고전적 보체 경로 촉발 능력은 분자의 Fc 부분 내의 잔기 내에 존재하는 것으로 알려져 있다(Duncan, A. R., et al., Nature 332:738-740 1988). 분자의 Fc 부분이 효소적 분열에 의하여 제거된 Ig 분자는 이 효과기 기능이 결여되어 있다(Harlow, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). 따라서, 감소된 효과기 기능을 지닌 항체는 효과기 기능을 최소화하거나, 또는 인간 IgG2 또는 IgG4 아이소타입이 되는 유전자 조작된 Fc 서열을 보유함으로써 분자의 Fc 부분의 결핍의 결과로서 생성되었다.

[0338]

감소된 효과기 기능을 지닌 항체는 본원의 실시예 9 및 문헌 Jolliffe, et al., Int'l Rev. Immunol. 70:241-250, 11993, 및 Rodrigues, et al., J. Immunol. 151:6954-6961, 1998에 설명된 IgG 중쇄의 Fc 부분의 표준 분자 생물학적 조작에 의하여 생산되었다. 감소된 효과기 기능을 지닌 항체는 보체를 활성화시키거나 및/또는 Fc 수용체와 상호작용하는 능력을 감소시키는 인간 IgG2 및 IgG4 아이소타입을 포함한다(Ravetch, J.V., et al., Annu. Rev. Immunol. 9:457-492, 1991; Isaacs, J.D., et al., J. Immunol. 148:3062-3011, 1992; van de Winkel, J. G., et al., Immunol. Today 74:215-221, 1993). IgG2 또는 IgG4 아이소타입을 포함하는 인간 MASP-2에 특이적인 인체적응형 또는 전 인간 항체는 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지된 수종의 방법 중의 하나에 의하여 생산될 수 있으며 이는 Vaughan, T.J., et al., Nature Biotechnical 16:535-539, 1998에 설명되어 있다.

[0339]

항-MASP-2 항체의 생산

[0340]

항-MASP-2 항체는 MASP-2 폴리펩타이드(예컨대, 전장 MASP-2) 또는 항원 MASP-2 에피토프-함유 펩타이드(예컨대, MASP-2 폴리펩타이드의 부분)를 사용하여 생산될 수 있다. 면역원성 펩타이드는 5개의 아미노산 잔기 정도로 작다. 예를 들면, SEQ ID NO:6의 전체 아미노산 서열을 포함하는 MASP-2 폴리펩타이드는 본 발명의 방법에 유용한 항-MASP-2 항체를 유도하는데 사용할 수 있다. 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 것으로 알려진 특정 MASP-2 도메인, 예컨대 CUBI, 및 CUBIEGF 도메인, 및 세린-프로테아제 활성화 부위를 포함하는 영역은 실시예 5에서 설명한 바와 같이 항원으로서 사용되는 재조합 폴리펩타이드로서 발현된다. 이와 함께, MASP-2 폴리펩타이드(SEQ ID NO:6)의 최소한 6개의 아미노산의 부분을 포함하는 펩타이드는 MASP-2 항체를 유도하기에 유용하다. MASP-2 항체를 유도하는 MASP-2 유도 항원의 추가의 실시예는 아래 표2에 제공하였다. 항체를 생성하는데 사용되는 MASP-2 펩타이드 및 폴리펩타이드는 천연 폴리펩타이드, 또는 재조합 또는 합성 펩타이드

및 촉매적 불활성 재조합 폴리펩타이드, 예컨대 MASP-2A로서 분리된다. 이는 실시예 5-7에서 추가적으로 설명한다. 본 발명의 다른 특징으로써, 항-MASP-2 항체는 실시예 8 및 9에 설명된 유전자삽입 마우스 균주를 사용하여 획득하였으며 아래 설명하였다.

[0341]

항-MASP-2 항체를 생산하기에 유용한 항원은 융합 폴리펩타이드, 예컨대 MASP-2의 융합체 또는 면역글로블린 폴리펩타이드 또는 말토오스-결합 단백질을 지닌 이들의 부분을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드 면역원은 전장 분자 또는 이들의 부분이 될 수 있다. 폴리펩타이드 부분이 합텐-유사인 경우, 이러한 부분은 면역화를 위하여 마크로분자 담체(예컨대 열쇄구멍 샷갓조개 헤모시아닌(KLH), 보빈 혈청 알부민(BSA) 또는 파상풍 독소이드)에 결합 또는 링크되는 것이 바람직하다.

표 2

[0342]

표2: MASP-2 유도 항원	
SIQ ID NO:	아미노산 서열
SIQ ID NO:6	인간 MASP-2 단백질
SIQ ID NO:51	뮤린 MASP-2 단백질
SIQ ID NO:8	인간 MASP-2의 CUBI 도메인 (aa 1-121의 SIQ ID NO:6)
SIQ ID NO:9	인간 MASP-2의 CUBIEGF 도메인 (aa 1-166의 SIQ ID NO:6)
SIQ ID NO:10	인간 MASP-2의 CUBIEGFCUBII 도메인 (aa 1-293의 SIQ ID NO:6)
SIQ ID NO:11	인간 MASP-2의 EGF 도메인 (aa 122-166의 SIQ ID NO:6)
SIQ ID NO:12	인간 MASP-2의 세린-프로테아제 도메인 (aa 429-671의 SIQ ID NO:6)
SIQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	세린-프로테아제 불활성화 돌연변이형 (aa 610-625의 SIQ ID NO:6, 돌연변이 Ser 618)
SIQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	인간 CUBI 펩타이드
SIQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVL ATLCGQ	인간 CUBI 펩타이드
SIQ ID NO:16 TFRSDYSN	인간 CUBI 도메인 내의 MBL 결합 영역
SIQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEK PFTGF	인간 CUBI 도메인 내의 MBL 결합 영역
SIQ ID NO:18 IDECQVAPG	EGF 펩타이드
SIQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRG DSGGALV	세린-프로테아제 활성 부위의 펩타이드

[0343]

다클론 항체

[0344]

MASP-2에 대한 다클론 항체는 당해 기술 분야의 숙련자에 공지된 방법을 사용하여 동물을 MASP-2 폴리펩타이드 또는 이들의 면역원성 부분으로 면역화하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 문헌 Green, et al., "Production of Polyclonal Antisera" in Immunochemical Protocols (Manson, ed.), 페이지 105를 참조하며, 실시예 6에 추가로 설명되어 있다. MASP-2 폴리펩타이드의 면역원성은 미네랄 겔, 예컨대 수산화 알루미늄 또는 프로인트 보조제(완전 또는 불완전), 표면 활성 물질 예컨대 라이소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다음이온, 오일 에멀전, 열쇄구멍 샷갓조개 헤모시아닌 및 디니트로페놀을 포함하는 보조제를 사용하여 증가될 수 있다. 다클론 항체는 일반적으로 동물 예컨대 말, 소, 개, 닭, 레트, 마우스, 레빗, 기니아피그, 염소, 또는 양에서 발생된다. 대안적으로, 본 발명에 유용한 항-MASP-2 항체는 하위인간 영양류에서 유도될 수 있다. 비비원송이 내에서 진단 및 치료적으

로 유용한 항체의 발생을 위한 일반적 기법은, 예를 들면, 문헌 Goldenberg et al., International Patent Publication No. WO 91/11465, 및 in Losman, M. J., et al., Int. J. Cancer 46:310, 1990에 기술되어 있다. 면역학적 활성 항체를 함유하는 혈청은 공지된 표준 과정을 사용하여 이러한 면역화된 동물의 혈액으로부터 생산된다.

[0345] **단클론 항체**

[0346] 일 실시 상태에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 단클론 항체이다. 항-MASP-2 단클론 항체는 단일 MASP-2 에피토프에 대하여 고도로 특이적이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 변형 "단클론"은 실질적으로 균일한 항체 집단으로부터 얻게되며, 모든 특정 방법에 의한 항체 요구 생산으로서 설명될 수 없는 항체의 특성을 나타낸다. 단클론 항체는 배양액 내의 계속적인 세포주에 의하여 항체 분자의 생산을 제공하는 모든 기법을 사용하여 획득할 수 있으며, 예컨대 하이브리도마법은 문헌 Kohler, G., et al., Nature 256:495, 1975에 있으며, 이들은 재조합 DNA법에 의하여 생산될 수도 있다(예컨대, U.S. Patent No. 4,816,567, Cabilly). 단클론 항체는 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수 있으며, 이는 Clackson, T., et al., Nature 352:624-628, 1991, 및 Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991에 설명되어 있다. 이러한 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD 및 이들의 모든 하위클래스를 포함하는 모든 면역글로블린 클래스가 될 수 있다.

[0347] 예를 들면, 단클론 항체는 적합한 포유류(예컨대, BALB/c 마우스)에 MASP-2 폴리펩타이드 또는 이들의 부분을 포함하는 조성물을 주입함으로써 획득할 수 있다. 미리 결정한 시간 후에, 비장세포를 마우스에서 제거하고 세포 배양 배지에 현탁시켰다. 비장세포를 무한증식 세포주에 융합시켜 하이브리도마를 형성하였다. 형성된 하이브리도마를 세포 배양에서 성장시키고 MASP-2에 대한 단클론 항체를 생산하는 능력으로 선별하였다. 항-MASP-2 단클론 항체의 생산을 설명하는 추가적인 예는 실시예 7에 제공되어 있다(Current Protocols in Immunology, Vol. L, John Wiley & Sons, pages 2.5.1-2.6.7, 1991.).

[0348] 인간 단클론 항체는 항원 시험에 대한 반응에서 특이적 인간 항체를 생산하도록 조작된 유전자삽입 마우스를 사용하여 획득할 수 있다. 이 기법에서, 인간 면역글로블린 중쇄 및 경쇄와의 요소가 내재 면역글로블린 중쇄 및 경쇄와의 표적화된 분열을 함유하는 배아 줄기 세포주에서 유도된 마우스 주 내로 도입되었다. 유전자삽입 마우스는 예컨대 MASP-2 항원인 인간 항원에 특이적인 인간 항체를 합성할 수 있으며, 마우스는 실시예 7에서 추가적으로 설명된 종래의 콜러-밀스틴 기술을 사용하여 다발골수종 세포주에 적합한 동물의 B-세포에 융합하여 인간 MASP-2 항체-분비 하이브리도마를 생성하기 위하여 사용될 수 있다. 인간 면역글로블린 게놈의 유전자삽입 마우스는 구득이 가능하다(예컨대, from Abgenix, Inc., Fremont, CA, and Medarex, Inc., Annandale, N. J.). 유전자삽입 마우스에서 인간 항체를 얻는 방법은, 예를 들면, Green, L.L., et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., Nature 368:856, 1994; 및 Taylor, L.D., et al., Int. Immun. 6:579, 1994에 설명되어 있다.

[0349] 단클론 항체는 다양한 확립된 기법에 의하여 하이브리도마 배양액으로부터 분리되고 정제될 수 있다. 이러한 분리 기법은 단백질-A 세포로스에 의한 친화도 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 및 이온-교환 크로마토그래피를 포함한다(예를 들면, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 및 pages 2.9.1-2.9.3; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in Methods in Molecular Biology, Humana Press, Inc., Vol. 10, pages 79-104, 1992). 생산된 경우라면, 다클론, 단클론 또는 파지-유도성 항체는 특이적 MASP-2 결합이 시험된다. 당해 기술 분야의 숙련자에게 공지된 다양한 측정법이 MASP-2에 특이적으로 결합된 항체를 검출하기 위하여 사용된다. 예시적인 측정법은 웨스턴 블롯 또는 표준 방법에 의한 면역침전 분석(예컨대, Ausubel et al.), 면역전기영동, 효소-링크 면역측정법, 도트 블롯, 억제 또는 경쟁 측정법 및 샌드위치 측정법을 포함한다(Harlow and Land, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). 항체가 MASP-2에 특이적으로 결합한다고 알려진 경우, 항-MASP-2 항체는 수종의 측정법 예컨대, 예를 들면, 렉틴-특이적 C4 분열 측정법(실시예 2), C3b 부착 측정법 (실시예 2) 또는 C4b 부착 측정법(실시예 2)에서 MASP-2 억제제로서 기능하는 능력에 대하여 시험된다.

[0350] 항-MASP-2 단클론 항체의 친화도는 당해 기술 분야의 숙련자에 의하여 쉽게 결정될 수 있다(예컨대, Scatchard, A., NY Acad. Sci. 57:660-672, 1949). 본 발명의 일 실시상태에서, 본 발명에 유용한 항-MASP-2 단클론 항체는 < 100nM, 바람직하게는 < 10nM 및 가장 바람직하게는 < 2nM의 결합 친화도로 MASP-2에 결합한다.

[0351] **키메라/인체적응형 항체**

[0352] 본 발명의 방법에 유용한 단클론 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정 종에서 유도된 항체 또는 특정 항체

클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응 서열에 일치하거나 또는 상동인이나 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종에서 유도된 항체 또는 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스항체, 및 이러한 항체의 절편 내의 대응 서열과 일치하거나 또는 상동인 키메라 항체를 포함한다(U.S. Patent No. 4,816,567 to Cabilly, 및 Morrison, S. L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA 87:6851-6855, 1984).

[0353] 본 발명에 유용한 일 형태의 키메라 항체는 인체적응형 단클론 항-MASP-2 항체이다. 인체적응형의 비-인간(예컨대, 뮤린) 항체는 키메라 항체이며, 이는 비-인간 면역글로블린에서 유도된 최소 서열을 함유한다. 인체적응형 단클론 항체는 비-인간(예컨대, 마우스) 상보 결정 영역(CDR)을 마우스 면역글로블린의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬에서 인간 가변 도메인으로 전이시킴으로써 생산된다. 일반적으로, 인간 항체의 잔기는 비-인간 상대방의 프레임워크 영역 내에서 치환되었다. 추가적으로, 인체적응형 항체는 수여자 항체 또는 공여자 항체 내에서 발견되는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 정제하기 위하여 만들어진다. 일반적으로, 인체적응형 항체는 실질적으로 모든 최소한 하나, 및 일반적으로 두 가변 도메인을 포함하며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 고가변 루프는 비-인간 면역글로블린의 것에 대응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 Fv 프레임워크 영역은 인간 면역글로블린 서열의 것이다. 인체적응형 항체는 선택적으로 면역글로블린 불변 영역(Fc), 일반적으로 인간 면역글로블린의 것의 최소한 부분을 포함한다. 자세한 내용은 문헌 Jones, P.T., et al., Nature 321:522-525, 1986; Reichmann, L., et al., Nature 332:323-329, 1988; 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992를 참조한다.

[0354] 본 발명에 유용한 인체적응형 항체는 최소한 MASP-2 결합 CDR3 영역을 포함하는 인간 단클론 항체를 포함한다. 이와 함께, Fc 부분은 IgA 또는 IgM 및 인간 IgG 항체를 생산하기 위하여 대체되었다. 이러한 인체적응형 항체는 특정 임상적 용도를 갖게되는데, 이는 이들이 인간 MASP-2를 특이적으로 인식하나 인간 내의 항체 자체에 대한 면역 반응을 일으키지 않기 때문이다. 결과적으로, 특히 반복 또는 장기 투여가 필요한 경우, 인간 생체 내 투여에 대한 연구가 되어야 한다.

[0355] 뮤린 항-MASP-2 단클론 항체에서 인체적응형 항-MASP-2 항체의 생성 예는 본원의 실시예 10에서 제공된다. 인체적응형 단클론 항체 생성 기법은, 예를 들면, Jones, P.T., et al., Nature 321:522, 1986; Carter, P., et al., Proc. Natl Acad. Sci USA 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., Crit. Rev. Biotech. 72:437, 1992; Singer, LL, et al., J. Immun. 750:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," in Protein Engineering: Principles 및 Practice, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pages 399-434, 1996; U.S. Patent No. 5,693,762, Queen, 1997에 나타나 있다. 이와 함께, 크기 특이적 뮤린 항체 영역에서 인체적응형 항체를 합성하는 제조사, 예컨대 단백질 디자인 랩(Mountain View, CA)이 있다.

[0356] **재조합 항체**

[0357] 항-MASP-2 항체는 재조합법을 사용하여 제조될 수도 있다. 예를 들면, 인간 항체는 인간 항체 (VH, VL, FV, Fd, Fab 또는 F(ab')₂)의 절편을 생산하기 위하여 인간 면역글로블린 발현 라이브러리(예를 들면, Stratagene, Corp., La Jolla, CA에서 구득)를 사용하여 제조될 수 있다. 이러한 절편은 키메라 항체를 생산하기 위한 기법과 유사한 기법을 사용하여 전 인간 항체의 구축에 사용될 수 있다.

[0358] **항-이디오타입 항체**

[0359] 항-MASP-2 항체가 소망하는 억제 활성이 있다고 확인되는 경우, 이러한 항체는 당해 기술 분야에 공지된 기법을 사용하여 MASP-2의 부분에 유사한 항-이디오타입 항체를 생성하기 위하여 사용될 수 있다. 예컨대, Greenspan, N.S., et al., FASEB J. 7:437, 1993를 참조한다. 예를 들면, MASP-2에 결합하며 및 보체 활성화에 필요한 MASP-2 단백질 상호작용을 경쟁적으로 억제하는 항체는 MASP-2 단백질상의 MBL 결합 부위를 닮아서, MASP-2 예컨대, 예를 들면, MBL의 결합 리간드에 결합하고, 중성화하는 항-이디오타입을 생성하기 위하여 사용할 수 있다.

[0360] **면역글로블린 절편**

[0361] 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 무손상 면역글로블린 분자 뿐만이 아니라 Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ 및 Fv 절편, scFv 절편, 이합체, 선형 항체, 단일-사슬 항체 분자 및 항체 절편에서 형성된 다회적 항체를 포함하는 공지의 절편을 포함한다.

[0362] 항체 분자, 파라토프의 작은 부분만이 항체와 이들의 에피토프의 결합에 관여한다는 사실이 당해 기술 분야에 공지되어 있다(예컨대, Clark, W.R., The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons,

Inc., NY, 1986). 항체의 pFc' 및 Fc 영역은 고전적 보체 경로의 효과기이나, 항원 결합에 관여하지 않는다. pFc' 영역이 효소적으로 분열되거나, 또는 pFc' 영역 없이 생산되는 항체는 F(ab')₂ 절편으로 지정되며, 무손상 항체의 항원 결합 부위 모두를 보유한다. 분리된 F(ab')₂ 절편은 이들의 두 항원 결합 부위의 의하여 2가 단클론 절편으로 언급된다. 이와 유사하게, Fc 영역이 효소적으로 분열되거나, 또는 Fc 영역 없이 생산되는 항체는 Fab 절편으로 지정되며, 무손상 항체 분자의 항원 결합 부위 중의 하나를 보유한다.

[0363]

항체 절편은 종래의 방법에 의하여 전 항체의 펩신 또는 파파인 소화에 의한 단백질분해 가수분해로 획득할 수 있다. 예를 들면, 항체 절편은 펩신으로 항체를 효소적 분열시켜 생산하여 F(ab')₂로 표시된 5S 절편을 제공한다. 이 절편은 티올 환원제를 사용하여 추가의 분열을 시켜 3.5S Fab' 1가 절편을 생산할 수 있다. 선택적으로, 분열 반응은 이황화 결합의 분열 결과인 설파하이드릴기에 대한 차단기를 사용하여 수행할 수 있다. 대안으로서, 펩신을 사용한 효소적 분열은 두 1가 Fab 절편 및 Fc 절편을 직접적으로 생산한다. 이러한 방법은, 예를 들면, U.S. Patent No. 4,331,647 to Goldenberg; Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman, et al., in Methods in Enzymology, 1:422, Academic Press, 1967; 및 by Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 및 2.10.-2.10.4에 설명되어 있다.

[0364]

일 실시 상태에서, Fc 영역이 부재한 항체 절편의 사용은 Fc와 Fc γ 수용체의 결합에 의하여 개시되는 고전적 보체 경로의 활성화를 회피하기에 바람직하다. Fc γ 수용체 상호작용을 회피하는 MoAb을 생산할 수 있는 수종의 방법이 있다. 예를 들면, 단클론 항체의 Fc 영역은 단백질분해 효소의 소화에 의하여 화학적으로 제거될 수 있으며(예컨대 피신 소화), 따라서, 예를 들면, 항원-결합 항체 절편 예컨대 Fab 또는 F(ab)₂ 절편을 생성한다 (Mariani, M., et al., Mol. Immunol. 28:69-11, 1991). 대안적으로, Fc γ 수용체에 결합하지 않는 인간 γ 4IgG 아이소타입이 본원에서 설명한 인체적응형 항체의 구축시 사용될 수 있다. 항체, 단일 사슬 항체 및 Fc 도메인이 부재한 항원-결합 도메인이 본원의 재조합 기법을 사용하여 조작될 수 있다.

[0365]

단일-사슬 항체 절편

[0366]

대안적으로, 중쇄 및 경쇄 Fv 영역이 연결된, MASP-2에 특이적인 단일 펩타이드 사슬 결합 분자를 생성할 수 있다. Fv 절편은 펩타이드 링커에 의하여 연결되어 단일-사슬 항원 결합 단백질을 형성할 수 있다(scFv). 이러한 단일-사슬 항원 결합 단백질은 올리고뉴클레오타이드에 의하여 연결된 VH 및 VL 도메인을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 구조 유전자를 구축함으로써 제조될 수 있다. 구조 유전자는 발현 벡터 내로 삽입되고, 이는 후속적으로 숙주 세포, 예컨대 이. 콜리(E. coli)에 도입된다. 재조합 숙주 세포는 두 V 도메인을 연결하는 링커 펩타이드를 지닌 단일 폴리펩타이드 사슬을 합성한다. scFvs를 생산하는 방법은 예를 들면, Whitlow, et al., "Method: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., Science 242:423, 1988; U.S. Patent No. 4,946,778, Ladner; Pack, P., et al., Bio/Technology 77:1271, 1993에 설명되어 있다.

[0367]

설명적 실시예로서, MASP-2 특이적 scFv는 시험관 내에서 림프구를 MASP-2 폴리펩타이드에 노출시키고, 파지 또는 유사 벡터 내에서 항체 디스플레이 라이브러리를 선택함으로써 획득할 수 있다(예를 들면, 고정화 또는 표지화 MASP-2 단백질을 또는 펩타이드를 사용하여). 잠재적인 MASP-2 폴리펩타이드 결합 도메인을 보유한 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자는 파지 또는 박테리아 예컨대 이. 콜리(E. coli) 상에 디스플레이된 무작위 펩타이드 라이브러리를 선별함으로써 획득할 수 있다. 이러한 무작위 펩타이드 디스플레이 라이브러리는 MASP-2와 상호작용하는 펩타이드의 선별에 사용될 수 있다. 무작위 펩타이드 디스플레이 라이브러리를 생성하고 선별하는 기법이 당해 기술 분야에 공지되어 있으며(U.S. Patent No. 5,223,409, Lardner; U.S. Patent No. 4,946,778, Ladner; U.S. Patent No. 5,403,484, Lardner; U.S. Patent No. 5,571,698, Lardner; 및 Kay et al., Phage Display of Peptide and Protein Academic Press, Inc., 1996) 및 무작위 펩타이드 디스플레이 라이브러리 및 이러한 라이브러리 선별 키트를 구축할 수 있으며, 예컨대, CLONTECH Laboratories, Inc.(Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc.(San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc.(Beverly, Mass.), 및 Pharmacia LKB Biotechnology Inc.(Piscataway, NJ.)가 있다.

[0368]

본 발명의 특징에 유용한 항-MASP-2 항체 절편의 또 다른 형태는 MASP-2 항원상의 에피토프에 결합하고, MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 단일 상보-결정 영역(CDR)을 암호화하는 펩타이드이다. CDR 펩타이드("최소 인식 유닛")는 대상 항체의 CDR을 암호화하는 유전자를 구축함으로써 획득할 수 있다. 이러한 유전자는, 예를 들면, 항체-생산 세포의 RNA 가변 영역을 합성하기 위한 폴리머라아제 사슬 반응을 사용하여 제조될 수 있다(예를 들면, Larrick et al., Method: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press, 1995; 및 Ward et

al., "Genetic Manipulation and Express of Antibodies," in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc., 1995).

[0369] 본원의 MASP-2 항체는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기 위하여 이들이 필요한 대상체에 투여된다. 일 실시 상태에서, MASP-2 억제제는 감소된 효과기 기능을 지닌 고-친화도 인간 또는 인체적응형 단클론 항-MASP-2 항체이다.

[0370] 펩타이드 억제제

[0371] 본 발명의 다른 특징으로써, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하는 분리된 천연 펩타이드 억제제 및 합성 펩타이드 억제제를 포함하는 분리된 MASP-2 펩타이드 억제제를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "분리된 MASP-2 펩타이드 억제제"는 렉틴 경로 내에서 또 다른 인식 분자(예컨대, MBL, H-피콜린, M-피콜린, 또는 L-피콜린)에 결합하기 위한 MASP-2에 경쟁하며, 및/또는 실질적으로 순수하고, 필수적으로 다른 물질이 없는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기 위하여 MASP-2와 직접적으로 상호작용하는 결합에 의하여 MASP-2 의존성 보체 활성화를 억제하는 펩타이드를 의미한다.

[0372] 펩타이드 억제제는 단백질-단백질 상호작용 및 촉매 부위를 방해하기 위하여 생체 내에서 성공적으로 사용될 수 있다. 예를 들면, LFA-I에 구조적으로 관련된 분자에 부착시키는 펩타이드 억제제가 최근 응고병의 임상적 사용에 승인되었다(Ohman, E.M., et al., European Heart J. 16:50-55, 1995). 짧은 선형 펩타이드 (<30 아미노산)는 인테그린-의존성 부착을 예방 또는 방해한다고 설명된다(Murayama, O., et al., J. Biochem. 720:445-51, 1996). 25 내지 200 개의 아미노산 잔기 길이 범위의 긴 펩타이드가 인테그린-의존성 부착을 차단하기 위하여 성공적으로 사용되어 왔다(Zhang, L., et al., J. Biol. Chem. 271(47):29953-57, 1996). 일반적으로, 긴 펩타이드 억제제는 짧은 펩타이드 보다 높은 친화도 및/또는 저속의 오프-율을 지니며, 따라서 더욱 강력한 억제제이 된다. 환형 펩타이드 억제제는 인간 염증 질환의 치료용으로 생체 내 인테그린의 효과적인 억제제로 나타난다(Jackson, D.Y., et al., J. Med. Chem. 40:3359-68, 1997). 환형 펩타이드 생산 방법 중의 하나는 펩타이드의 합성에 관여하며, 펩타이드의 말단 아미노산이 시스테인이고, 따라서 펩타이드가 말단 아미노산 사이에 이황화 결합에 의하여 환형 형태 내에 존재하도록 한다. 이는 조혈 신생물의 치료를 위한 생체 내 친화도 및 반감기를 향상시키는 것으로 보인다(예컨대, U.S. Patent No. 6,649,592, Larson).

[0373] 합성 MASP-2 펩타이드 억제제

[0374] 본 발명의 방법에 사용되기에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드는 MASP-2 기능에 중요한 표적 영역을 모사하는 아미노산 서열에 의하여 예시된다. 본 발명에 사용되는 억제 펩타이드의 크기는 약 5 아미노산 내지 약 300 아미노산의 범위이다. 표 3은 본 발명의 방법에 사용되는 예시적인 억제 펩타이드의 목록을 제공한다. 후보 MASP-2 억제 펩타이드는 수종의 측정법, 예를 들면, 렉틴 특이적 C4 분열 측정법(실시예 2), 및 C3b 부착 측정법(실시예 2) 중의 하나로 MASP-2 억제제로서의 기능을 하는 능력으로 시험하였다.

[0375] 일 실시 상태에서, MASP-2 억제 펩타이드는 MASP-2 폴리펩타이드에서 유도된 것이며, 전장 성숙 MASP-2 단백질(SEQ ID NO:6), 또는 MASP-2 단백질의 특정 도메인 예컨대, 예를 들면, CUBI 도메인(SEQ ID NO:8), CUBIEGF 도메인(SEQ ID NO:9), EGF 도메인(SEQ ID NO:11), 및 세린 프로테아제 도메인(SEQ ID NO: 12)으로부터 선택된다. 이전에 설명한 바와 같이, CUBEGFCUBII 영역은 MBL와 이합체 및 결합하는 것에 필요한 것으로 보인다(Thielens et al., supra). 특히, MASP-2의 CUBI 도메인 내의 펩타이드 서열 TFRSDYN(SEQ ID NO: 16)은 Asp105에서 Gly105로의 동종접합 돌연변이를 보유한 인간을 확인하는 연구에서 MBL의 결합에 관여하여, MBL 복합체에서 MASP-2의 손실이 되는 것으로 나타났다(Stengaard-Pedersen, K., et al., New England J. Med. 349:554-560, 2003).

[0376] MASP-2 억제 펩타이드는 MAP19(SEQ ID NO:3)으로부터 유도될 수 있다. 실시예 30에서 설명한 바와 같이, MAP19(SEQ ID NO:3)(sMAP)는, 렉틴 경로를 하향조절하는 능력을 보유하며, 이는 MBL 복합체에 의하여 활성화된다. Iwaki et al., J. Immunol. 777:8626-8632, 2006. 이론에 의하여 결합되는 것을 기대하는 반면, sMAP가 MBL 내에서 MASP-2/sMAP 결합 부위를 점유할 수 있는 것 같으며, MASP-2가 MBL에 결합하는 것을 예방한다. sMAP는 피콜린과 결합하여 MASP-2와 경쟁하고, 피콜린 A/MASP-2 복합체에 의하여 보체 활성화를 억제하는 것으로 보고되었다. Endo Y. et al., Immunogenetics 57: 837-844 (2005).

[0377] 일 실시 상태에서, MASP-2 억제 펩타이드는 MASP-2에 결합하는 렉틴 단백질로부터 유도되며 렉틴 보체 경로 내에서 관여한다. 수종의 다른 렉틴이 만난-결합 렉틴(MBL), L-피콜린, M-피콜린 및 H-피콜린을 포함하는 이 경로에 관련된 것으로 확인되었다. (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et

al., J. Exp. Med. 776:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). 이러한 력틴은 동종3량체 서브유닛의 올리고머로서 혈청 내에 존재하며, 각각은 탄수화물 인식 도메인을 지닌 N-말단 콜라겐-유사 섬유를 보유한다. 이러한 다른 력틴은 MASP-2에 결합하는 것으로 나타났으며, 력틴/MASP-2 복합체는 단백질 C4 및 C2의 분열을 통하여 보체를 활성화시킨다. H-피콜린은 24개의 아미노산의 아미노-말단 영역, 11개의 Gly-Xaa-Yaa 리피트의 콜라겐-유사 도메인, 12 개의 아미노산의 넥 도메인, 및 207개의 아미노산의 피브리노겐-유사 도메인을 보유한다(Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). H-피콜린은 GlcNAc에 결합하며 및 에스. 티피무리움(*S. typhimurium*), 에스. 미네소타(*S. minnesota*) 및 이. 콜리(*E. coli*)에서 유도된 LPS로 피복된 인간 적혈구를 응집한다. H-피콜린은 MASP-2 및 Map 19와 결합하는 것으로 나타났으며 력틴 경로를 활성화시킨다. Id. L-피콜린/P35는 또한 GlcNAc에 결합하며, 인간 혈청 내의 MASP-2 및 Map 19와 결합하는 것으로 나타났고, 이 복합체는 력틴 경로를 활성화시키는 것으로 나타났다 (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 164:2281, 2000). 따라서, 본 발명에 사용되는 MASP-2 억제 펩타이드는 MBL 단백질(SEQ ID NO:21), H-피콜린 단백질(Genbank accession number NM_173452), M-피콜린 단백질(Genbank accession number 000602) 및 L-피콜린 단백질(Genbank accession number NM_015838)에서 선택된 최소한 5개의 아미노산의 영역을 포함한다.

[0378]

더 특이적으로, 과학자들은 MBL상의 MASP-2 결합 부위는 MBP의 콜라겐-유사 도메인의 C-말단 부분의 힌지 및 넥 사이에 있는 12개의 GIY-X-Y 트리플렛 "GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS"(SEQ ID NO:26) 내에서 확인되었다(Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004). 이 MASP-2 결합 부위 영역은 인간 H-피콜린 및 인간 L-피콜린 내에서 고도로 전환되었다. 컨센서스 결합 부위는 아미노산 서열 "OGK-X-GP" (SEQ ID NO:22)를 포함하는 모든 3개의 력틴 단백질 내에 존재하며, 여기서 문자 "O"는 히드록시프롤린을 나타내며 문자 "X"는 소수성 잔기이다(Wallis et al., 2004, supra). 따라서, 일 실시 상태에서, 본 발명에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드는 최소한 6개의 아미노산 길이이며, SEQ ID NO:22를 포함한다. 아미노산 서열 "GLR GLQ GPO GKL GPO G"(SEQ ID NO:24)를 포함하는 MBL에서 유도된 펩타이드는 시험관 내에서 MASP-2와 결합하는 것으로 나타났다(Wallis, et al., 2004, supra). MASP-2의 결합을 증진시키기 위하여, 펩타이드는 천연 MBL 단백질 내에서 발견되는 삼중나선의 형성을 증진하기 위하여 각 말단에 두 GPO 트리플렛에 의하여 측면 보호되도록 합성될 수 있다("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O" SEQ ID NO:25)(Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004).

[0379]

MASP-2 억제 펩타이드는 H-피콜린 내의 컨센서스 MASP-2 결합 영역으로부터 서열 "GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO" (SEQ ID NO:27)를 포함하는 인간 H-피콜린으로부터 유도될 수 있다. L-피콜린 내의 컨센서스 MASP-2 결합 영역으로부터 서열 "GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO" (SEQ ID NO:28)를 포함하는 인간 L-피콜린으로부터 유도된 펩타이드를 포함한다.

[0380]

MASP-2 억제 펩타이드는 C4 분열 부위는 예컨대 항트롬빈III의 C-말단 부분에 링크된 C4 분열 부위인 "LQRALEILPNRVITKANRFLVFI" (SEQ ID NO:29)로부터 유도될 수 있다(Glover, G. L, et al., Mol. Immunol. 25:1261 (1988)).

표 3

[0381]

표 3: 예시적인 MASP-2 억제 펩타이드	
SEQ ID NO	공급원
SEQ ID NO: 6	인간 MASP-2 단백질
SEQ ID NO: 8	MASP-2의 CUBI 도메인 (aa 1-121의 SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 9	MASP-2의 CUBIEGF 도메인 (aa 1-166의 SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 10	MASP-2의 CUBIEGFCUBII 도메인 (aa 1-293의 SEQ ID NO: 6)
SEQ ID NO: 11	MASP-2의 EGF 도메인(aa 122-166)
SEQ ID NO: 12	MASP-2의 세린-프로테아제 도메인 (aa 429-671)
SEQ ID NO: 16	MASP-2 내의 MBL 결합 영역
SEQ ID NO: 3	인간 Map19
SEQ ID NO: 21	인간 MBL 단백질

SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP, 여기서 "O" = 하이드록시프롤린이며 "x"는 소수성 아미노산 잔기이다	인간 MBL 및 인간 피콜린의 합성 펩타이드 컨센서스 결합 부위
SEQ ID NO: 23 OGKLG	인간 MBL 코어 결합 부위
SEQ ID NO: 24 GKR GLQ GPO GKL GPO G	인간 MBL 트리플렛 6-10-입증 결합 MASP-2
SEQ ID NO: 25 GPOGPOGLRGLQGPO GKLGPOGGPOGPO	삼중 나선의 형성을 강화하도록 첨가된 GPO를 지닌 인간 MBL 트리플렛
SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEP GQGLRGLQGPOGKLG POGNOGPSGSGPKG QKGDGKS	인간 MBL 트리플렛 1-17
SEQ ID NO: 27 GAOGSOGKEKGAOGPQ GPO GPOGKMGPKEGEO GDO	인간 H-피콜린(Hataka)
SEQ ID NO: 28 GCOGLOGAOGDKGE AGTNGKRGERGPOGP OGKAGPOPNGAOGEO	인간 L-피콜린 P35
SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKA NRPFLVFI	인간 C4 분열 부위

[0382] 참고: 문자 "O"는 히드록시프롤린을 나타낸다. 문자 "X"는 소수성 잔기이다.

[0383] MASP-2 세린 프로테아제 부위를 억제하는 C4 분열 부위 및 다른 펩타이드에서 유도된 펩타이드는 화학적으로 변형되어 비가역성 프로테아제 억제제가 된다. 예를 들면, 적절한 변형은, C-말단에 할로메틸 케톤(Br, Cl, I, F), Asp 또는 GIu, 또는 기능성 측쇄에 첨가; 아미노기 또는 다른 기능성 측쇄 상의 할로아세틸(또는 다른 α-할로아세틸)기; 아미노 또는 카르복시 말단 또는 기능성 측쇄 상의 에폭사이드 또는 이민-함유기; 또는 아미노 또는 카르복시 말단 또는 기능성 측쇄상의 이미테이트 에스테르를 포함하나 필수적으로 이에 한정되지 않는다. 이러한 변형은 펩타이드의 공유 결합에 의하여 영구적인 효소 억제에 유용하다. 이에 의하여 펩타이드 억제제의 낮은 효과적 투약량 및/또는 덜 빈번한 투여가 요구된다.

[0384] 전술한 억제 펩타이드와 함께, 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드는 본원에서 설명한 바와 같이 획득한 항-MASP-2 MoAb의 MASP-2-결합 CDR3 영역을 함유하는 펩타이드를 포함한다. 펩타이드 합성에 사용되는 CDR 영역의 서열은 당해 기술 분야에 공지된 방법에 의하여 결정된다. 중쇄 가변 영역은 일반적으로 100 내지 150 개의 아미노산 길이의 범위이다. 경쇄 가변 영역은 일반적으로 80 내지 130 개의 아미노산 길이의 범위이다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 내의 CDR 서열은 당해 기술 분야의 숙련자에 의하여 쉽게 서열화 할 수 있는 단지 약 3-25개의 아미노산 서열 만을 포함한다.

[0385] 당해 기술 분야의 숙련자는 전술한 MASP-2 억제 펩타이드의 실질적 상동 변이 MASP-2 억제 활성을 발휘한다는 사실을 인식하였다. 예시적인 변이는 대상 펩타이드 및 이들의 혼합물의 카르복시-말단 또는 아미노-말단 부분에 아미노산의 삽입, 결실, 치환, 및/또는 추가를 보유한 펩타이드를 포함하나 필수적으로 이에 한정되지 않는다. 따라서, MASP-2 억제 활성을 보유한 상동 펩타이드들은 본 발명의 방법에 유용한 것으로 간주된다. 전술한 펩타이드는 복제 모티프 및 보존적 치환을 지닌 다른 변형을 포함할 수 있다. 보존적 변이체는 본원에 설명되어 있으며, 전하, 크기 또는 소수성 등이 다른 아미노산의 교환을 포함한다.

[0386] MASP-2 억제 펩타이드는 무손상 단백질 내의 부분을 더 유사하게 하기 위하여 가용성을 증가시키고 및/또는 양성 또는 음성 전하를 최소화하도록 변형된다. 유도체는 유도체가 MASP-2 억제의 소망하는 특성을 기능적으로 보

유하는 한 펩타이드의 정확한 1차 아미노산 구조를 보유할 수도 있고 보유하지 않을 수도 있다. 변형은 일반적으로 알려진 20개 아미노산 또는 또 다른 아미노산 중의 하나에 의한 치환 아미노산, 부수적으로 소망하는 특성, 예컨대 효소적 분해에 대한 내성을 지니도록 유도된 또는 치환된 아미노산 또는 D-아미노산 또는 또 다른 분자 또는 화합물, 예컨대 아미노산의 천연 입체 구조 및 기능을 모사하는 탄수화물, 아미노산 또는 펩타이드에 의한 치환; 아미노산 결실; 일반적으로 알려진 20개의 아미노산 또는 또 다른 아미노산에 의한 아미노산 삽입, 부수적으로 소망하는 특성, 예컨대 효소적 분해에 대한 내성을 지니도록 유도된 또는 치환된 아미노산 또는 D-아미노산 또는 또 다른 분자 또는 화합물, 예컨대 아미노산의 천연 입체구조 또는 기능을 모사하는 탄수화물, 아미노산 또는 펩타이드에 의한 치환; 또는 또 다른 분자 또는 화합물, 예컨대, 천연 입체구조, 전하 분배 및 모 펩타이드의 기능을 모사하는 탄수화물 또는 핵산 단량체에 의한 치환을 포함할 수 있다. 펩타이드는 아세틸화 또는 아미드화에 의하여 변형될 수 있다.

[0387]

유도체 억제 펩타이드의 합성은 펩타이드 생합성, 탄수화물 생합성 등의 공지된 기법에 의존할 수 있다. 시작점으로서, 숙련자들은 대상 펩타이드의 입체구조를 결정하기 위하여 적합한 컴퓨터 프로그램을 사용할 수 있다. 본원의 펩타이드 입체구조가 공지된 경우, 숙련자들은 제공하지 않는 특성을 보유하거나 또는 모 펩타이드 내에서 발견되는 것 보다 강화될 수 있으나 어떠한 종류의 치환이 염기성 입체구조 및 모 펩타이드의 전하 분포를 보유한 유도체를 형성하기 위하여 하나 이상의 부위에서 만들어질 수 있는지 합리적인 설계 방법 내에서 결정할 수 있다. 후보 유도체 분자가 확인된 경우, 유도체는 전술한 측정법을 사용하여 이들이 MASP-2 억제제로서 기능을 하는지를 결정하기 위하여 시험할 수 있다.

[0388]

MAASP-2 억제 펩타이드의 선별

[0389]

MAASP-2의 핵심 결합 영역의 분자구조를 모사하고 및 MASP-2의 보체 활성화를 억제하는 펩타이드를 생성하고 선별하기 위하여 분자 모델링 및 합리적인 분자 설계를 사용할 수 있다. 모델링에 사용된 분자 구조는 항-MAASP-2 단클론 항체의 CDR 영역, 및 이합체화에 요구되는 영역, MBL와의 결합에 관여하는 영역, 및 전술한 세린 프로테아제 활성화 부위를 포함하는 MASP-2 기능에 중요한 것으로 알려진 표적 영역을 포함한다. 특정 표적에 결합하는 펩타이드 확인 방법은 당해 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 분자 임프린팅은 마크로분자 구조 예컨대 특정 분자에 결합하는 펩타이드의 신규의 제조에 사용된다. 예를 들면, Shea, KJ., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymer: The New synthesis of Micromolecular Binding and Catalytic Sites," TRIP 2:(5) 1994를 참조.

[0390]

설명적인 예로서, MASP-2 결합 펩타이드 모사체의 제조 방법은 다음과 같다. 공지된 MASP-2 결합 펩타이드의 기능성 단량체 또는 MASP-2 억제(템플릿)를 발취하는 항-MAASP-2 항체의 결합 영역을 중합하였다. 템플릿을 그 다음 제거하고, 템플릿과 유사한 하나 이상의 특성을 발취하는 신규의 분자를 제공하는 템플릿에 의한 공백 내에서 제2 클래스의 단량체의 중합을 하였다. 이 방식의 펩타이드 제조와 함께, MASP-2 억제제 예컨대 폴리싸카라이드, 뉴클레오시드, 약물, 핵단백질, 지질단백질, 탄수화물, 글리코단백질, 스테로이드, 지질 및 다른 생물학적 활성 물질인 다른 MASP-2 결합 분자가 제조될 수 있다. 이 방법은 천연 대응작 보다 안정한 다양한 생물학적 모사체의 설계에 유용하며, 이는 일반적으로 비생분해성 골격을 지닌 화합물이 되는 기능성 단량체의 자유 라디칼 중합에 의하여 제조되기 때문이다.

[0391]

펩타이드 합성

[0392]

MAASP-2 억제 펩타이드는 당해 기술 분야에 공지된 기법, 예컨대 초기에 Merrifield, in J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963에서 설명된 고체-상 합성 기법에 의하여 제조될 수 있다. 자동화 합성이 예를 들면, 제조자의 설명에 따라 Applied Biosystems 43 IA 펩타이드 합성기 (Foster City, Calif.)에 의하여 달성될 수 있다. 다른 기법은, 예를 들면, 문헌 Bodanszky, M., et al., Peptide Synthesis, second edition, John Wiley & Sons, 1976, 및 공지의 다른 참고자료에서 찾을 수 있다.

[0393]

펩타이드는 당해 기술 분야의 숙련자에 공지된 표준 유전자 공학 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들면, 펩타이드는 발현 벡터 내로 펩타이드를 암호화하는 핵산의 삽입, DNA 발현, 및 필요한 아미노산의 존재하에 펩타이드로의 DNA 전이에 의하여 효소적으로 제조될 수 있다. 펩타이드는 담체 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 암호화한 펩타이드를 지닌 상 내에서 발현 벡터 내로 삽입됨으로써 융합되고, 후속적으로 펩타이드에서 분리되는 담체 단백질을 사용하여 분리정제할 수 있다. 융합 단백질-펩타이드는 크로마토그래피, 전기영동 또는 면역학적 기법(예컨대 담체 단백질의 항체를 통하여 수지에 결합)을 사용하여 분리될 수 있다. 펩타이드는 화학적 방법 또는 효소적으로, 예를 들면, 하이드롤라제에 의하여 분해될 수 있다.

- [0394] 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드는 종래의 기법을 따라 재조합 숙주 세포 내에서 생산될 수 있다. 서열을 암호화하는 MASP-2 억제 펩타이드를 발현하기 위하여, 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 발현 벡터 내에서 전사 발현을 조절하고 그 다음 숙주 세포 내로 도입되는 서열에 작동가능하게 연결되어야 한다. 전사 조절 서열과 함께, 예컨대 프로모터 및 인핸서, 발현 벡터가 발현 벡터를 담지하는 세포의 선택에 적합한 번역 조절 서열 및 마커 유전자에 포함될 수 있다.
- [0395] MASP-2 억제 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 프로토콜 예컨대 포스포라미다이트법을 사용하여 "유전자 기계"로 합성될 수 있다. 화학적으로 합성된 이중-가닥 DNA가 응용 예컨대 유전자 또는 유전자 절편의 합성에 요구되는 경우, 각 상보 가닥이 각각 제조된다. 짧은 유전자(60 내지 80 염기쌍)의 생산은 기술적으로 직접적이며, 상보 가닥을 합성하고, 그 다음 풀림을 하여 달성될 수 있다. 긴 유전자의 생산에 있어서, 합성 유전자(이중-가닥)는 길이가 20 내지 100개의 뉴클레오타이드인 단일-가닥 절편에서 모듈러 형태 내에서 조립된다. 폴리 뉴클레오타이드 합성에 대한 연구를 위하여, 예를 들면, 문헌 Glick and Pasternak, "Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA", ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; 및 Climie, S., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci USA 87:633, 1990를 참조한다.
- [0396] **소분자 억제제**
- [0397] 일 실시 상태에서, MASP-2 억제제는 저분자량의 천연 및 합성 물질, 예컨대 예를 들면, 펩타이드, 펩티도미메틱스 및 비펩타이드 억제제 (올리고뉴클레오타이드 및 유기화합물 포함)를 포함하는 소분자 억제제이다. MASP-2의 소분자 억제제는 항-MASP-2 항체의 가변 영역의 분자 구조에 기초하여 생성될 수 있다. 소분자 억제제는 컴퓨터 화 약물 설계를 사용한 MASP-2 결정 구조에 기초하여 설계되고 생성될 수 있다 (Kuntz LD., et al., Science 257:1078, 1992). 레트 MASP-2의 결정 구조는 문헌에 설명되었다(Feinberg, H., et al., EMBO J. 22:2348-2359, 2003). Kuntz et al.에 의한 방법을 사용하여, MASP-2 결정 구조 배치는 MASP-2에 결합할 수 있는 소분자 구조의 목록을 산출하는 컴퓨터 프로그램 예컨대 DOCK의 입력에 사용된다. 이러한 컴퓨터 프로그램의 사용은 당해 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 예를 들면, HIV-1 프로테아제 억제제의 결정 구조는 프로그램 DOCK를 사용하여 캠브리지 결정학 데이터베이스에서 검색된 화합물이 효소의 결합 부위에 맞는지 평가함으로써 HIV-1 프로테아제 억제제인 유일한 비펩타이드 리간드를 확인하기 위하여 사용할 수 있다(Kuntz, LD., et al., J. Mol. Biol. 161:269-288, 1982; DesJarlais, R.L., et al., PNAS 87:6644-6648, 1990).
- [0398] 잠재적인 MASP-2 억제제로서 컴퓨터화 법에 의하여 확인된 소분자 구조의 목록은 예컨대, 실시예 7에서 설명할 MASP-2 결합 측정법을 사용하여 선별되었다. MASP-2에 결합하는 것으로 알려진 소분자는 예컨대, 실시예 2의 기능성 측정법으로 측정하여, 이들이 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는지 여부를 결정한다.
- [0399] **MASP-2 가용성 수용체**
- [0400] 다른 적합한 MASP-2 억제제는 MASP-2 가용성 수용체를 포함하는 것으로 보이며, 당해 기술 분야의 숙련자에 공지된 방법을 사용하여 제조된다.
- [0401] **MASP-2의 발현 억제제**
- [0402] 본 발명의 특징의 또다른 실시상태에 있어서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 MASP-2 발현 억제제이다. 본 발명의 특징의 실시 상태에서, 대표적인 MASP-2 발현 억제제는 MASP-2 안티센스 핵산 분자 (예컨대 안티센스 mRNA, 안티센스 DNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드), MASP-2 리보자임 및 MASP-2 RNAi 분자를 포함한다.
- [0403] 안티-센스 RNA 및 DNA 분자는 MASP-2 mRNA를 하이브리드화하거나, MASP-2 단백질의 번역을 차단하여 MASP-2 mRNA의 번역을 직접적으로 차단하게된다. 안티센스 핵산 분자는 MASP-2의 발현을 방해할 수 있는 다른 다수의 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들면, 안티센스 핵산 분자는 이들의 보체의 전사를 시키는 전사의 전상 방향에 비하여 MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)의 암호화 영역(또는 이들의 부분)의 전환에 의하여 제조될 수 있다.
- [0404] 안티센스 핵산 분자는 일반적으로 최소한 표적 유전자 또는 유전자의 부분에 실질적으로 일치한다. 핵산은, 그러나, 발현을 억제하는 것이 완전하게 동일할 필요는 없다. 일반적으로, 높은 상동성이 짧은 안티센스 핵산 분자의 사용을 보상하기 위하여 사용될 수 있다. 최소 백분율 일치성은 일반적으로 약 65% 이상이나, 높은 백분율 일치성은 더욱 효과적인 내재 서열의 발현 억제를 발휘할 수 있다. 약 80% 이상의 실질적으로 높은 백분율 일치성이 일반적으로 바람직하나, 약 95% 내지 완전 일치가 일반적으로 가장 바람직하다.

[0405]

안티센스 핵산 분자가 표적 유전자로서 동일한 인트론 또는 엑손 패턴을 보유할 필요는 없으며, 표적 유전자의 비-암호화 부분은 암호화 부분으로서 표적 유전자 발현의 안티센스 억제에 달성하는데 동일하게 효과적일 수 있다. 긴 서열이 바람직하더라도 최소한 약 8개의 뉴클레오타이드의 DNA 서열이 안티센스 핵산 분자로서 사용될 수 있다. 본 발명에서, MASP-2의 억제제로 유용한 대표적인 실시예는 SEQ ID NO:4의 핵산 서열로 구성된 MASP-2 cDNA의 보체와 최소한 90% 일치하는 안티센스 MASP-2 핵산 분자이다. SEQ ID NO:4의 핵산 서열은 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열로 구성된 MASP-2 단백질을 암호화한다.

[0406]

MASP-2 mRNA에 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적화는 MASP-2 단백질 합성의 수준을 감소시키기 위하여 사용되는 또 다른 기작이다. 예를 들면, 폴리갈락투로나아제 및 뮤스카린 타입 2 아세틸콜린 수용체의 합성은 이들의 각각의 mRNA 서열에 관계된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의하여 억제된다(U.S. Patent No. 5,739,119, Cheng, 및 U.S. Patent No. 5,759,829, Shewmaker). 추가적으로, 안티센스 억제의 실시예는 핵 단백질 싸이클린, 다중 약제 억제 유전자(MDG1), ICAM-1, E-세렉틴, STK-I, 줄무늬 GABA_A 수용체 및 인간 EGF로 입증되었다(예컨대, U.S. Patent No. 5,801,154, Baracchini; U.S. Patent No. 5,789,573, Baker; U.S. Patent No. 5,718,709, Considine; 및 U.S. Patent No. 5,610,288, Reubenstein).

[0407]

시스템은 당해 기술 분야의 숙련자가 전사 내의 서열 접근성의 지표로서 RNA분해효소 H 분열을 사용하여 표적 mRNA 내의 적합한 부위용 프로브에 관한 올리고뉴클레오타이드가 본 발명에 유용한지 여부를 결정하기 위하여 사용된다. Scherr, M., et al, Nuclear Acids Res. 2(5:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., Nuclear Acids Res. 29:3665-3673, 2001. MASP-2 전사의 특정 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 혼합물을 MASP-2를 발현하는 세포 추출물, 예컨대 간세포에 첨가하고, RNA분해효소 H 취약 부위를 생성하기 위하여 혼성화하였다. 이 방법은 숙주 세포 내에서 표적 mRNA 내에서 특이적 결합을 감소 또는 억제할 수 있는 이합체, 헤어핀, 또는 다른 2차 구조를 형성하는 상대적인 이들의 능력에 기초하여 안티센스 조성물의 최적 서열 선택을 예견할 수 있는 컴퓨터-보조 서열 선택과 결합될 수 있다. 이러한 2차 구조 분석 및 표적 부위 선택 고려사항은 올리고 프라이머 분석 소프트웨어 (Rychlik, L, 1997) 및 BLASTN 2.0.5 알고리즘 소프트웨어(Altschul, S.F., et al, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1997)를 사용하여 수행할 수 있다. 표적 서열에 관한 안티센스 화합물은 바람직하게는 약 8 내지 약 50개 길이의 뉴클레오타이드를 포함한다. 약 9 내지 약 35개의 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 특히 바람직하다. 발명자들은 9 내지 35개 뉴클레오타이드 범위의 모든 올리고뉴클레오타이드 조성물(즉, 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, 또는 35개의 염기 길이)이 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드-기초 방법의 실시예 매우 바람직하다고 고려한다. 매우 바람직한 MASP-2 mRNA의 표적 영역은 AUG 번역 개시 코돈, 및 mRNA의 5' 영역에 실질적으로 상보인 서열, 예컨대, MASP-2 유전자 뉴클레오타이드 서열(SEQ ID NO:4)의 -10 및 +10 영역 사이에 있거나 그 주변에 있는 것이다. 예시적인 MASP-2 발현 억제제는 표 4에 제공되었다.

표 4

[0408]

표 4: MASP-2의 예시적인 발현 억제제	
SEQ ID NO:30 (SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 22-680)	CUBIEGF를 암호화한 MASP-2 cDNA의 핵산 서열(SEQ ID NO:4)
SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTG ACCCTCCTGGGC3'	MASP-2 번역 개시 부위(센스)를 포함하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 12-45
SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTTCGCTCCGACTC CAACGAGAA3'	MASP-2 MBL 결합 부위(센스)를 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 361-396
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCC GTATCCCAAA3'	CUBII 도메인능 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 610-642

[0409]

전에 사용된 바와 같이, 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 본원에서 사용된 바와 같이 리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA) 또는 이들의 모사체 올리고머 또는 중합체를 의미한다. 이 용어는 자연 발생 뉴클레오타이드, 당 및 뉴클레osi드간 공유(골격) 결합 및 비-자연 발생적 변형을 보유한 올리고뉴클레오타이드로 구성된 올리고핵 염기를 포함한다. 이러한 변형은 자연 발생 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 감소된 독성, 뉴클레아제 분해에 대한 증가된 안정성 및 증가된 세포성 흡인을 통하여 제공되지 않는 어떠한 바람직한 특성을 도입할 수 있도록 하

는 것이다. 예시적 실시 상태에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 포스페이트 치환체가 포스포로티오에이트에 의하여 대체된 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 생존을 연장시키기 위하여 포스포디에스터 골격을 변형한다는 점에서 천연 DNA와 다르다. 이와 같이, 올리고뉴클레오타이드의 일 또는 양 말단은 핵산 가닥 내의 인접 염기쌍 사이에 개재되는 하나 이상의 아크리딘 유도체에 의하여 치환될 수 있다.

[0410] 안티센스의 또 다른 대체물은 "RNA 간섭"(RNAi)를 사용하는 것이다. 이중-가닥 RNAs(dsRNAs)는 생체 내에서 포유류 내의 유전자 스플라이싱을 유발시킬 수 있다. RNAi의 천연 기능 및 보조-억제는 이동 유전 요소 예컨대 레트로트랜스포손 및 활성화되는 경우 숙주 세포 내에서 변종 RNA 또는 dsRNA를 생산하는 바이러스에 의한 침입에 대하여 계놈을 보호하는 것 같다(예컨대, Jensen, J., et al., Nat. Genet. 21:209-12, 1999). 이중-가닥 RNA 분자는 각각 길이가 약 19 내지 25개 (예컨대, 19-23 뉴클레오타이드)인 이중-가닥 RNA 분자를 형성할 수 있는 두 RNA 가닥을 합성함으로써 제조될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 방법에 유용한 dsRNA 분자는 서열에 상응하는 RNA를 포함할 수 있으며, 이들의 보체는 표 4에 나열하였다. 바람직하게는, 최소한 하나의 RNA 가닥은 1-5 뉴클레오타이드에서 3' 오버행을 보유한다. 합성된 RNA 가닥은 이중-가닥 분자를 형성하는 상태에서 결합된다. RNA 서열은 25개의 뉴클레오타이드 또는 그 이하의 총 길이의 SEQ ID NO:4의 최소한 8개의 뉴클레오타이드 부분을 포함한다. 주어진 표적의 siRNA 서열의 설계는 당해 기술 분야의 숙련자의 범위 내에 있다. 상업적 서비스를 siRNA 서열 설계에 사용할 수 있으며, 발현의 최소한 70% 억감을 보장한다(Qiagen, Valencia, Calif).

[0411] dsRNA는 약학적 조성물로서 투여되며, 알려진 방법에 의하여 수행되고, 여기서 핵산은 바람직한 표적 세포 내로 도입된다. 일반적으로 사용되는 유전자 전이 방법은 인산 칼슘, DEAE-텍스트란, 전기천공, 미소주사 및 바이러스법을 포함한다. 이러한 방법은 문헌 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993에서 개시되었다.

[0412] 리보자임은 MASP-2의 양 및/또는 생물학적 활성을 감소시키기 위하여 사용될 수 있으며, 예컨대 MASP-2 mRNA를 표적화하는 리보자임이다. 리보자임은 리보자임의 서열에 완전히 또는 부분적으로 상동인 서열을 보유한 핵산 분자를 분열시킬 수 있는 촉매성 RNA 분자이다. 리보자임 이동유전자 설계는 표적 RNA와 특이적으로 짝을 이루고, 특이적 위치에서 포스포디에스터 골격을 분해하고, 따라서 표적 RNA를 기능적으로 불활성화시킨 RNA 리보자임을 암호화할 수 있도록 한다. 이 분열의 수행에서, 리보자임은 그 자체로서 변형되지 않고, 따라서 재활용되어 다른 분자의 분해가 가능하다. 안티센스 RNA 내에 리보자임 서열이 포함되어 이들에 RNA-분열 활성을 부여한다. 따라서 안티센스 구조체의 활성을 증가시킨다.

[0413] 본 발명의 실시예에 유용한 리보자임은 일반적으로 최소한 약 9 뉴클레오타이드의 혼성화 영역을 포함하며, 이는 뉴클레오타이드 서열내에서 표적 MASP-2 mRNA의 최소한 일부에 상보적이며, 표적 MASP-2 mRNA를 분열시키는 촉매성 영역에 상보적이다(일반적으로, EPA No. 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J., et al, Nature 334:585-591, 1988; Fedor, M.J., et al, Proc. Natl. Acad. Sci USA 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al, Ann. Rev. Biochem. 55:599-629, 1986).

[0414] 리보자임은 리보자임 서열을 포함하는 RNA 올리고뉴클레오타이드의 형태 내에서 세포에 직접적으로 표적화될 수 있거나, 또는 소망하는 리보자임 RNA를 암호화하는 발현 벡터로서 세포 내로 도입될 수 있다. 리보자임은 안티센스 폴리뉴클레오타이드에서 설명된 동일한 방법에 사용되거나 적용될 수 있다.

[0415] 본 발명의 방법에 사용되는 안티-센스 RNA 및 DNA, 리보자임 및 RNAi 분자는 공지의 모든 DNA 및 RNA 분자의 합성법으로 제조될 수 있다. 이러한 것은 공지된 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 및 올리고리보뉴클레오타이드의 화학적 합성 기법, 예컨대 예를 들면 고체상 포스포라미다이트 화학 합성을 포함한다. 대안적으로, RNA 분자는 안티센스 RNA 분자를 암호화하는 DNA 서열의 시험관 내 및 생체 내 전사에 의하여 생성될 수 있다. 이러한 DNA 서열은 적합한 RNA 폴리머라아제 프로모터, 예컨대 T7 또는 SP6 폴리머라아제 프로모터에 통합된 다양한 벡터 내로 통합될 수 있다. 대안적으로, 사용된 프로모터에 의존하는, 구조적으로 또는 유도적으로 안티센스 RNA를 합성하는 안티센스 cDNA 구조체가 세포주 내에서 안정적으로 도입될 수 있다.

[0416] 공지의 다양한 DNA 분자 변형이 안정성 및 반감기를 증가시키는 수단으로서 도입될 수 있다. 유용한 변형은 분자의 5' 및/또는 3' 말단에 대한 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드의 측면보호 서열의 첨가 또는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 골격 내에서 포스포디에스테라아제 결합 보다는 포스포로티오에이트 또는 2'-O-메틸의 사용을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0417] V. 약학적 조성물 및 전달 방법 투약

- [0418] 본 발명의 다른 특징으로서, 본 발명은 MASP-2 억제제의 치료학적 유효량 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 MASP-2-의존성 보체 활성화의 역효과를 억제하는 조성물을 제공한다. MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화 유관 증상을 치료 또는 개선시키기 위하여 치료학적으로 유효한 투약량으로 이들이 필요한 대상체에 투여된다. 치료학적으로 유효한 투약량은 MASP-2 억제제 충분한 양으로서 증상을 개선시키는 양을 의미한다.
- [0419] MASP-2 억제제의 독성 및 치료 효능은 실험 동물 모델, 예컨대 실시예 3의 인간 MASP-2 삽입유전자를 발현하는 뮤린 MASP-2 $-/-$ 마우스 모델을 사용하여 표준 약학적 과정에 의하여 결정되었다. 이러한 동물 모델을 사용하여, 표준 방법에 의하여 NOAEL(역효과 수준 미관찰) 및 MED(최소 효과 투약량)을 결정할 수 있다. NOAEL 및 MED 효과간의 투약 비율은 치료적 비율이며, 이는 NOAEL/MED비로 표현된다. 큰 치료적 비율 또는 지표를 나타내는 MASP-2 억제제가 가장 바람직하다. 세포 배양 측정법 및 동물 연구들에서 획득한 테이터를 인간에 사용되는 투약량의 범위를 제형화하는데 사용된다. MASP-2 억제제의 투약량은 바람직하게는 독성이 거의 없거나 없는 MED를 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투약량은 사용된 투여 제형 및 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 다양하게 될 수 있다.
- [0420] 모든 화합물 제형에 있어서, 치료학적으로 유효한 투약량은 동물 모델을 사용하여 평가되었다. 예를 들면, 투약량은 동물 모델 내에서 공식화되어 MED를 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하게 된다. 혈장 내의 정량적 수준의 MASP-2 억제제를 예를 들면, 고속 액체 크로마토그래피에 의하여 측정할 수 있다.
- [0421] 독성 연구들과 함께, 효과적인 투약량은 살아있는 대상체 내의 MASP-2 단백질의 양 및 MASP-2 억제제의 결합 친화도에 기초하여 평가될 수 있다. 정상 인간 대상체 내의 MASP-2 수준은 500 ng/ml 범위 내의 낮은 수준의 혈청에서 존재하며, 및 특정 대상체 내의 MASP-2 수준은 MASP-2의 정량적 측정법을 사용하여 결정될 수 있는 것으로 보이며, 이는 문헌 Moller-Kristensen M., et al., J. Immunol. Methods 282:159-167, 2003에 설명되어 있다.
- [0422] 일반적으로, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물의 투약량은 대상체의 연령, 체중, 신장, 성별, 일반적인 의학적 증상, 및 이전의 병력 등의 요인에 따라 달라진다. 예시으로써, MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체는 약 0.010 내지 10.0 mg/kg, 바람직하게는 0.010 내지 1.0 mg/kg, 더욱 바람직하게는 0.010 내지 0.1 mg/kg 대상체 체중으로 투여될 수 있다. 일 실시 상태에서, 조성물은 항-MASP-2 항체와 MASP-2 억제 펩타이드의 조합을 포함할 수 있다.
- [0423] 주어진 대상체 내의 MASP-2 억제 조성물 및 본 발명의 방법의 치료 효능, 및 적절한 투약량은 당해 기술 분야의 숙련자에 공지된 보체 측정법에 따라 결정될 수 있다. 보체는 다양한 특이적 산물을 생성한다. 지난 10여년 간, 민감성 및 특이적 측정법이 개발되어 왔으며, 대부분의 이러한 활성화 산물, 예컨대 작은 활성화 절편 C3a, C4a, 및 C5a 및 큰 활성화 절편 iC3b, C4d, Bb, 및 sC5b-9는 구득이 가능하다. 대다수의 이러한 측정법은 기존 단백질이 아닌 절편상에서 노출된 신규 항원(신생항원)과 반응하는 단클론 항체를 활용한다. 여기서 이들이 형성되었으며, 이러한 측정법을 매우 단순하고, 특이적으로 만든다. 대부분은 ELISA 기술에 의존하나, 방사성면역 측정법이 C3a 및 C5a에 사용되기도 한다. 이러한 후자의 측정법은 미처리 절편 및 이들의 'desArg' 절편을 모두 측정하며, 이들이 순환 내에서 발견되는 주요한 형태이다. 미처리 절편 및 C5a_{desArg}는 세포 표면 수용체에 결합하여 급속하게 제거되며, 매우 낮은 농도에서 존재하고, 반면에 C3a_{desArg}는 세포에 결합하지 않아 혈장 내에 축적된다. C3a의 측정은 민감성, 경로-비의존성 보체 활성화 지표를 제공한다. 대체 경로 활성화는 Bb 절편을 측정함으로써 평가될 수 있다. 막 공격 경로 활성화의 유체-상 산물, sC5b-9의 검출은 보체가 활성화되어 완성된다는 증거를 제공한다. 렉틴 및 고전적 경로 둘 다 동일한 활성화 산물, C4a 및 C4d를 생산하기 때문에, 이러한 두 절편의 측정은 이러한 두 경로가 활성화 산물을 생산한다는 정보를 제공하지 못한다.
- [0424] **추가적 약제**
- [0425] MASP-2 억제제를 포함하는 조성물 및 방법은 선택적으로 하나 이상의 추가의 치료제를 포함할 수 있으며, 이는 MASP-2 억제제의 활성을 증가시키거나 또는 추가적인 또는 시너지적 방법에서 유관 치료적 기능을 제공한다. 예를 들면, 하나 이상의 MASP-2 억제제가 하나 이상의 항-염증 및/또는 진통제와 조합으로 투여될 수 있다. 추가의 약제(들)의 포함 및 선택은 소망하는 치료적 결과를 달성하기 위하여 결정될 것이다. 적합한 항-염증 및/또는 진통제는: 세로토닌 수용체 길항제; 세로토닌 수용체 작용제; 히스타민 수용체 길항제; 브라디키닌 수용체 길항제; 칼리크레인 억제제; 타키닌 수용체 길항제, 예컨대 뉴로킨인 및 뉴로킨인2 수용체 서브타입 길항제; 칼시토닌 유전자-유관 펩타이드(CGRP) 수용체 길항제; 인터류킨 수용체 길항제; 아라키돈산 대사물질 합성 경로 내의 효소 활성 억제제, 예컨대 PLA2 아이소형 억제제 및 PLC γ 아이소형 억제제를 포함하는 포스포리파아제 억제제, 시클로옥시게나아제 (COX) 억제제 (COX-1, COX-2이거나, 또는 비선택적 COX-1 및 -2 억제제임), 리포옥시

케나아제 억제제; 프로스타노이드 수용체 길항제, 예컨대 에니코사노이드 EP-1 및 EP-4 수용체 서브타입 길항제 및 트롬복산 수용체 서브타입 길항제; 류코트리엔 수용체 길항제, 예컨대 류코트리엔 B₄ 수용체 서브타입 길항제 및 류코트리엔 D₄ 수용체 서브타입 길항제; 오피오이드 수용체 작용제, 예컨대 μ -오피오이드, δ -오피오이드, 및 κ -오피오이드 수용체 서브타입 작용제; 퓨리노셉터 작용제 및 길항제, 예컨대 P2X 수용체 길항제 및 P2Y 수용체 작용제; 아데노신 3인산(ATP)-민감성 칼륨 채널 개방제; MAP 키나아제 억제제; 니코틴성 아세틸콜린 억제제; 및 알파 아드레날린성 수용체 작용제(알파-1, 알파-2, 및 비선택적 알파-1 및 2 작용제 포함)을 포함한다.

[0426] 재협착의 예방 또는 치료에 사용되는 경우, 본 발명의 MASP-2 억제제는 동시 투여용의 하나 이상의 항-재협착제와 결합될 수 있다. 적합한 항-재협착제는: 항혈소판제 예컨대: 트롬빈 억제제 및 수용체 길항제, 아데노신 디포스페이트(ADP) 수용체 길항제(퓨리노셉터1 수용체 길항제), 트롬복산 억제제 및 수용체 길항제 및 혈소판 막 글리코단백질 수용체 길항제; 세포 부착 분자의 억제제, 예컨대 선택된 억제제 및 인테그린 억제제; 항-주화성제; 인터류킨 수용체 길항제; 및 세포내 신호 억제제 예컨대: 단백질 키나아제 C(PKC) 억제제 및 단백질 티로신 포스파타아제, 세포내 단백질 티로신 키나아제 억제제의 조절제, src 상동2 (SH2) 도메인의 억제제, 및 칼슘 채널 길항제를 포함한다.

[0427] 본 발명의 MASP-2 억제제는 하나 이상의 기타 보체 억제제와 조합하여 투여될 수 있다. 현재 인간에게 인가된 보체 억제제는 없다, 그러나 일부 약리학적 제제가 생체 내 보체를 차단하는 것으로 보인다. 다수의 이러한 제제는 독성 또는 단지 부분적 억제제이며(Asghar, S. S., Pharmacol. Rev. 36:223-44, 1984), 이러한 사용은 연구 도구로서 사용이 제한된다. K76C00H 및 나팜스타트 메실레이트(nafamstat mesilate)는 동물 이식 모델에 일부 효과적인 것으로 나타났다(Miyagawa, S., et al., Transplant Proc. 24:483-484, 1992). 저분자량 헤어핀은 보체 활성화 조절에 효과적인 것으로 보인다(Edens, R.E., et al., Complement Today, pp. 96-120, Basel: Karger, 1993). 이러한 소분자 억제제가 본 발명의 MASP-2 억제제의 조합 사용에 유용한 약제라고 믿고 있다.

[0428] 다른 자연 발생 보체 억제제는 본 발명의 MASP-2 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 보체의 생물학적 억제제는 가용성 보체 인자1(sCR1)을 포함한다. 이는 자연 발생적 억제제이며, 인간 세포의 외부막 상에서 발견될 수 있다. 다른 막 억제제는 DAF, MCP, 및 CD59를 포함한다. 재조합 형태는 이들의 시험관 내 및 생체 내 항-보체 활성화를 위하여 시험되었다. sCR1은 이중 이식에 효과적인 것으로 보이며, 여기서, 보체 시스템(대체 및 고전적 모두)은 새로 이식된 장기를 통한 수분간의 혈액 관류 내에 과민반응성 거부반응 증후군을 촉발시키게 된다(Platt J.L., et al., Immunol. Today 77:450-6, 1990; Marino I.R., et al., Transplant Proc. 1071:6, 1990; Johnstone, P.S., et al., Transplant 54:573-6, 1992). sCR1의 사용에 의하여 보호되며, 이식된 장기의 생존 시간이 연장 되고, 장기 생존의 발병기전 내의 보체 경로에 연관된다(Leventhal, J. R. et al., Transplant 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K., et al., Trnasplant 57:363-70, 1994).

[0429] 본 발명의 조성물과 조합하여 사용하기에 적합한 추가의 보체 억제제는 또한 MoAbs 예컨대 Alexion Pharmaceuticals, Inc.(New Haven, Connecticut)사에 의하여 개발중인 것, 및 항-프로퍼딘 MoAbs를 포함한다.

[0430] 관절염(예컨대, 골관절염 및 류마티스 관절염) 치료에 사용되는 경우, 본 발명의 MASP-2 억제제는 하나 이상의 연골보호제와 결합될 수 있으며, 이는 하나 이상의 연골 동화 프로모터 및/또는 하나 이상의 연골 이화 억제제, 및 적합하게는 동시 투여시 동화제 및 이화 억제제 모두를 포함할 수 있다. 적합한 동화작용 증진 연골보호제는 인터류킨(IL) 수용체 작용제, 예컨대 IL-4, IL-10, IL-13, rhIL-4, rhIL-10 및 rhIL-13, 및 키메라 IL-4, IL-10, 또는 IL-13; 형질전환 성장 인자- β 초과(superfamily) 작용제, 예컨대 TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, 골형성 단백질 예컨대 BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7(OP-1), 및 OP-2/BMP-8, 성장-감별 인자, 예컨대 GDF-5, GDF-6 및 GDF-7, 재조합 TGF- β s 및 BMPs, 및 키메라 TGF- β s 및 BMPs; 인슐린-유사 성장 인자, 예컨대 IGF-1; 및 섬유모세포 성장 인자 예컨대 bFGF를 포함한다. 적합한 이화 억제 연골보호제는 인터류킨-1(IL-1) 수용체 길항제(IL-1ra), 예컨대 가용성 인간 IL-1 수용체(shuIL-1R), rshuIL-1R, rhIL-1ra, 항-IL1-항체, AF11567, 및 AF12198; 종양 괴사 인자(TNF) 수용체 길항제(TNF- α), 예컨대 sTNFR1 및 sTNFRII를 포함하는 가용성 수용체, 재조합 TNF 가용성 수용체, 및 키메라 TNF 가용성 수용체 예컨대 키메라 rhTNFR:Fc, Fc 융합 가용성 수용체 및 항-TNF 항체; 시클로옥시게나아제-2(COX-2 특이적) 억제제, 예컨대 DuP 697, SC-58451, celecoxib, rofecoxib, nimesulide, diclofenac, meloxicam, piroxicam, NS-398, RS-57067, SC-57666, SC-58125, flosulide, etodolac, L-745,337 및 DFU-T-614; 미토겐-활성 단백질 키나아제 (MAPK) 억제제, 예컨대 ERK1, ERK2, SAPK1, SAPK2a, SAPK2b, SAPK2d, SAPK3의 억제제, 예컨대 SB 203580, SB 203580 iodo, SB202190, SB 242235, SB 220025, RWJ 67657, RWJ 68354, FR 133605, L-167307, PD 98059, PD 169316; 핵 인자 카파 B(NFKB)의 억제제, 예컨대 카페인산 페닐에틸 에스테르(CAPE), DM-CAPE, SN-50 펩타이드, 히메니알딘 및 피롤

리돈 디티오카바메이트; 산화질소 합성효소(NOS) 억제제, 예컨대 N^G -모노메틸-L-아르기닌, 1400W, 테페닐렌아이 오디움, S-메틸 이소티오우레아, S-(아미노에틸)이소티오우레아, $L-N^G$ -(1-이미노에틸)라이신, 1,3-PBITU, 2-에틸-2-티오슈도우레아, 아미노구아니딘, N^G -니트로-L-아르기닌, 및 N^G -니트로-L-아르기닌 메틸 에스테르, 기질 메탈로프로테이나아제(MMPs)의 억제제, 예컨대 MMP-I, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-I 1, MMP-12, MMP-13, MMP-14 및 MMP-15의 억제제, 및 U-24522, 미노사이클린, 4-Abz-Gly-Pro-D-Leu-D-Ala-NHOH, Ac-Arg-Cys-Gly-Val-Pro-Asp-NH₂, 류만(rhuman) TIMP1, 류만 TIMP2, 및 포스포라미돈; 세포 부착 분자, 예컨대 $\alpha V \beta 3$ MoAb LM 609 및 이치스타틴(echistatin)을 포함하는 인테그린 작용제 및 길항제; 항-주화성제 예컨대 F-Met-Leu-Phe 수용체, IL-8 수용체, MCP-1 수용체 및 MIP1-I/RANTES 수용체; 세포내 신호 억제제로서, (a) 단백질 키나아제 억제제, 예컨대 (i) 칼포스틴 C, G-6203 및 GF 109203X를 포함하는 단백질 키나아제 C(PKC) 억제제(아이소자임), 및 (ii) 단백질 티로신 키나아제 억제제; (b) 세포내 단백질 티로신 포스포타아제(PTPases)의 조절제; 및 (c) SH2 도메인(src 상동2 도메인) 억제제를 포함하는 세포내 신호 억제제를 포함한다.

[0431]

일부 응용에 있어서, 연속 억제제와 조합으로 본 발명의 MASP-2 억제제의 투여에 이롭다. 예를 들면, 비노생식적 응용에 있어서, 최소한 하나의 평활근 연속 억제제 및/또는 최소한 하나의 항-염증제를 포함하는 것이 이득이며, 혈관적 과정에 있어서 최소한 하나의 혈관연속 억제제 및/또는 최소한 하나의 항-염증제 및/또는 최소한 하나의 항-재협착제를 포함하는 것이 유용하다. 연속 억제제의 적합한 실시예는: 세로토닌2 수용체 서브타입 길항제; 타키킨인 수용체 길항제; 산화질소 공여체; ATP-민감성 칼륨 채널 개방제; 칼슘 채널 길항제; 및 엔도텔린 수용체 길항제를 포함한다.

[0432]

약학적 담체 및 전달 운반체

[0433]

일반적으로, 다른 선택된 치료제와 결합된 본 발명의 MASP-2 억제제 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체 중에 포함되는 것이 적합하다. 담체는 비-독성이고, 생체적합성이 있으며, MASP-2 억제제의 생물학적 활성에 결정적으로 영향을 미치지 않는 것으로 선택된다(및 이들과 결합되는 모든 다른 치료제). 펩타이드용의 예시적인 약학적으로 허용가능한 담체는 U.S. Patent No. 5,211,657, Yamada에서 개시하였다. 본 발명에 유용한 항-MASP-2 항체 및 억제 펩타이드는 고체, 반고체, 겔, 액체 또는 기체형태 예컨대 타블렛, 캡슐, 파우더, 과립, 연고, 용액, 좌약, 흡입제 및 경구, 비경구 또는 외과적 투여가 가능한 주사 내로 제형화될 수 있다. 본 발명은 또한 의료기기 등을 피복함으로써 조성물의 국부 투여를 가능하게 한다.

[0434]

주사, 주입 또는 관류를 통한 비경구 전달 및 국소 전달에 적합한 담체는 증류수, 생리학적 인산-완충 식염수, 정상 또는 락테이트화 링거 용액, 텍스트로스 용액, 헵크 용액, 또는 프로판디올을 포함한다. 이와 함께, 무균, 고정유는 용매 또는 현탁 배지로서 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위하여, 모든 생체적합 오일은 합성 모노-또는 디글리세라이드를 포함하여 사용될 수 있다. 이와 함께, 지방산 예컨대 올레산은 주사가 가능 제품에 사용된다. 담체 및 제제는 액체, 현탁액, 중합가능 또는 중합불가능 겔, 페이스트 또는 연고로서 화합물화될 수 있다.

[0435]

담체는 또한 제제(들)의 전달을 지속 (즉, 연장, 지연 또는 조절)하거나 또는 치료제(들)의 전달, 흡입, 안정성 또는 약물동태학을 증진시키는 전달 운반체를 포함한다. 이러한 전달 운반체는 비-제한적 실시예로서, 단백질, 리포솜, 탄수화물, 합성 유기화합물, 무기화합물, 중합성 또는 공중합체성 수화겔 및 중합성 미셀로 구성된 미소입자, 미소구체, 나노구체 또는 나노입자를 포함한다. 적합한 수화겔 및 미셀 전달 시스템은 PEO:PHB:PEO 공중합체 및 공중합체/시클로덱스트린 복합체(WO 2004/009664 A2)와 PEO 및 PEO/시클로덱스트린 복합체(US 2002/0019369 A1)를 포함한다. 이러한 수화겔은 의도된 활성의 부위에 국부적으로 주사되거나, 또는 지속 방출 저장을 형성하기 위하여 피하적으로 또는 근육내 주사될 수 있다. 관절내 전달을 위하여, MASP-2 억제제는 주사가 가능한 전술한 액체 또는 겔 담체 중에 담지될 수 있으며, 전술한 주사가 가능한 지속-방출 전달 운반체, 또는 히알루론산 또는 히알루론산 유도체에 담지될 수 있다.

[0436]

비-펩티드제의 경구 투여를 위하여, MASP-2 억제제는 불활성 충전제 또는 희석제 예컨대 슈크로스, 옥수수전분, 또는 셀룰로스 내에 담지될 수 있다.

[0437]

국소 투여를 위하여, MASP-2 억제제는 연고, 로션, 크림, 겔, 드롭, 좌약, 스프레이, 액체 또는 파우더, 또는 겔 또는 경피 패치를 통한 미소캡슐 전달 시스템에 담지된다.

[0438]

다양한 비강 및 폐순환 전달 시스템, 예컨대 에어로졸, 계량 흡입기, 건조 파우더 흡입기, 및 분무기가 개발중이며 및 각각 에어로졸, 흡입기, 또는 분무형 전달 운반체 내에서 본 발명의 전달을 위하여 적합하게 적용될 수 있다.

- [0439] 경막내 (IT) 또는 뇌척수관내(ICV) 전달을 위하여, 적절한 무균 전달 시스템 (예컨대, 액체; 젤, 현탁액, 등)이 본 발명의 투여에 사용될 수 있다.
- [0440] 본 발명의 조성물은 또한 생체적합성 부형제, 예컨대 분산 또는 습윤제, 현탁제, 희석제, 완충제, 흡수촉진제, 에멀전화제, 결합제, 증점제, 향미제(경구 투여용) 등을 포함할 수 있다.
- [0441] **항체 및 펩타이드용 약학적 담체**
- [0442] 항-MASP-2 항체 및 억제 펩타이드에 관하여 살펴보면, 예시적인 제형이 무균 액체 예컨대 물, 오일, 식염수, 글리세롤 또는 에탄올일 수 있는 약학적 담체를 지닌 생리학적으로 허용가능한 희석제 내의 화합물의 용액 또는 현탁액의 주사가능 투여로서 비경구적으로 투여될 수 있다. 추가적으로, 보조 물질 예컨대 습윤제 또는 에멀전화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등이 항-MASP-2 항체 및 억제 펩타이드를 포함하는 조성물 내에 존재할 수 있다. 약학적 조성물의 추가의 성분은 식유 (예컨대 동물, 식물 또는 합성 기원), 예를 들면, 대두유 및 광유를 포함한다. 일반적으로, 글리콜 예컨대 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜은 주사가능 용액을 위한 바람직한 액체 담체이다.
- [0443] 항-MASP-2 항체 및 억제 펩타이드는 활성제의 지속 또는 박동성 방출을 허용하는 이러한 방식으로 제형화될 수 있는 저장 주사 또는 이식 제품의 형태로 투여될 수 있다.
- [0444] **발현 억제제를 위한 약학적으로 허용가능한 담체**
- [0445] 본 발명의 방법에 유용한 발현 억제제에 대하여 좀더 살펴보면, 조성물은 전술한 발현 억제제 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 것으로 제공된다. 조성물은 콜로이드성 분산 시스템을 추가로 포함할 수 있다.
- [0446] 발현 억제제를 포함하는 약학적 조성물은 용액, 에멀전, 및 리포솜-함유 제형을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이러한 조성물은 사전형성 액체, 자체-에멀전화 고체 및 자체-에멀전화 반고체를 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 성분으로부터 생성될 수 있다. 이러한 조성물의 제품은 일반적으로 발현 억제제와 하나 이상의 다음의 것과 결합하는 것에 관계된 것이다: 완충제, 항산화제, 저분자량 폴리펩타이드, 단백질, 아미노산, 탄수화물 예컨대 글루코스, 슈크로스 또는 텍스트린, 킬레이트제 예컨대 EDTA, 글루타티온 및 기타 안정화제 및 부형제. 비-특이적 혈청 알부민과 혼합된 중성 완충 식염수 또는 식염수가 적합한 희석제의 예이다.
- [0447] 일 실시 상태에서, 조성물은 일반적으로 액체의 형태로 분산된 액체의 비균질 시스템인 에멀전으로서 제조되고 제형화될 수 있다(Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1, Rieger 및 Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988). 에멀전 제형에서 사용되는 자연 발생 에멀전화제의 예는 아카시아, 밀랍, 라놀린, 레시틴 및 포스파타이드를 포함한다.
- [0448] 본 발명의 일 실시상태에서, 핵산을 포함하는 조성물은 마이크로에멀전으로 제형화될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이 미세에멀전은 물, 오일, 및 양친매성 계를 의미하며, 이는 단일 광학적 등방성 및 열역학적 안정 액체 용액이다(Rosoff in Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1). 본 발명의 방법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 소망하는 부위에 전달 및 전이하기 위하여 리포솜을 사용할 수 있다.
- [0449] 국소 투여용 발현 억제제의 약학적 조성물 및 제형은 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭, 좌약, 스프레이, 액체 및 파우더를 포함할 수 있다. 종래의 약학적 담체, 및 수성, 파우더 또는 오일계 및 증점제 등이 사용될 수 있다.
- [0450] **투여 방법**
- [0451] MASP-2 억제제를 포함하는 약학적 조성물은 국부 또는 전신성 투여 방법이 증상의 치료에 가장 적절한지 여부에 따라 여러 방법으로 투여될 수 있다. 추가적으로, 본원의 체외순환 재관류 과정에 관하여 살펴보면, MASP-2 억제제는 본 발명의 조성물을 재순환 혈액 또는 혈장에 도입을 통하여 투여할 수 있다. 추가적으로, 본 발명의 조성물은 이식가능 의료기기 상에, 또는 그 내부에 조성물을 피복 또는 포함시켜 달성할 수 있다.
- [0452] **전신 전달**
- [0453] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "전신 전달" 및 "전신 투여"는 경구 및 비경구 경로, 예컨대 근육내(IM), 피하, 정맥(IV), 동맥, 흡입, 설하, 볼, 국소, 경피, 비강, 직장, 질 및 의도한 치료적 활성의 단일 또는 다중 부위에 전달된 약제가 효과적으로 분산되는 다른 경로의 투여를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 조성물의 바람직한 경로의 전신 전달은 정맥, 근육내, 피하 및 흡입을 포함한다. 특정 본 발명의 조성물을 이용한 선택된

약제의 정확한 전신 투여 경로는 부분적으로 투여 경로와 관련된 대사적 형질전환 경로에 대한 약제 감수성에 의하여 결정된다. 예를 들면, 펩티드제는 경구보다는 다른 경로에 의하여 투여되는 것이 가장 적합하다.

[0454] MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드는 적합한 모든 수단에 의하여 이들이 필요한 대상체 내로 전달될 수 있다. MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드의 전달 방법은 경구, 폐순환, 비경구 (예컨대, 근육내, 복막내, 정맥(IV) 또는 피하 주사), 흡입 (예컨대 미세 파우더 제형을 통한), 경피, 비강, 질, 직장, 또는 설하 경로의 투여를 포함하며, 각 경로의 투여에 적절한 투약량으로 제형화될 수 있다.

[0455] 대표적인 예로서, MASP-2 억제 항체 및 펩타이드는 폴리펩타이드를 흡수할 수 있는 신체막, 예를 들면 비강, 위장관 및 직장 막에 도포함으로써 생체 내로 도입될 수 있다. 폴리펩타이드는 일반적으로 투과 증진제와 함께 흡수막에 도포된다(예컨대, 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.). 예를 들면, STDHF는 후시드산의 합성 유도체이며, 구조적으로 담즙염에 유사한 스테로이드성 계면활성제이고, 비강 전달용 투과 증진제로 사용되어 왔다. (Lee, W.A., Biopharm. 22, Nov./Dec. 1990.)

[0456] MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드는 효소적 분해로부터 폴리펩타이드를 보호하기 위하여 또다른 분자, 예컨대 지질과 함께 도입될 수 있다. 예를 들면, 중합체, 특히 폴리에틸렌 글리콜(PEG)의 공유결합은 신체 내에서 효소적 가수분해로부터 특정 단백질을 보호하기 위하여 사용되어 왔으며, 따라서 반감기를 증대시킨다(Fuertges, F., et al., J. Controlled release 11:139, 1990). 다수의 폴리머 시스템이 단백질 전달용으로 보고되었다(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, L, et al., J. Controlled release 10:195, 1989; Asano, M., et al., J. Controlled release 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al, J. Controlled release 9:195, 1989; Makino, K., J. Controlled release 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:219, 1989).

[0457] 최근, 리포솜은 향상된 혈형 안정성 및 순환 반감기를 지니도록 개발되어 왔다(예컨대, U.S. Patent No. 5,741,516, Webb). 추가적으로, 잠재적인 약물 담체로서 다양한 방법의 리포솜 및 리포솜-유사 제품이 연구되었다(예컨대, U.S. Patent No. 5,567,434, Szoka; U.S. Patent No. 5,552,157, Yagi; U.S. Patent No. 5,565,213, Nakamori; U.S. Patent No. 5,738,868, Shinkarenko; 및 U.S. Patent No. 5,795,587, Gao).

[0458] 경피적 응용에 있어서, MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드는 다른 적합한 성분, 예컨대 담체 및/또는 보조제와 결합될 수 있다. 이러한 다른 성분의 특성을 제한하지 않으나, 의도한 투여에 대하여 약학적으로 허용가능하여야 하며, 조성물의 활성 성분의 활성을 퇴화시킬 수 없다. 적합한 운반체의 예는 정제 콜라겐을 함유하거나 함유하지 않은 연고, 크림, 젤, 또는 현탁액을 포함한다. MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드는 경피 패치, 고약, 및 봉대내로 충전될 수 있으며, 바람직하게는 액체 또는 반-액체 형태이다.

[0459] 본 발명의 조성물은 소망하는 수준의 치료 효과를 유지하기 위하여 결정된 시간 간격을 두고 주기적으로 전신 투여될 수 있다. 예를 들면, 조성물은, 예컨대 피하 주사로, 매 2주 내지 4주 또는 덜 빈번한 간격으로 투여될 수 있다. 투여 요법은 약제의 조합 활성에 영향을 미칠 수 있는 다양한 요인을 고려하여 임상적에 의하여 결정될 것이다. 이러한 요인은 치료할 증상의 진행 정도, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 기타 임상적 요인을 포함한다. 개개의 약제의 투약량은 조성물 내에 포함되는 MASP-2 억제제의 기능, 및 모든 약제 전달 운반체(예컨대, 지속 방출 전달 운반체)의 존재 및 특성에 따라 다양할 것이다. 이와 함께, 투약량은 투여 빈도 및 전달되는 약제(들)의 약물동태학적 행동에 의하여 조절될 수 있다.

[0460] 국부 전달

[0461] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "국부"는 의도된 국부적 활성 부위 내 또는 주변에 약물을 도포하는 것을 포괄하며, 예를 들면, 피부 또는 다른 영향 조직에 대한 국소 전달, 안구 전달, 경막내(IT), 뇌척수관내(ICV), 동맥내, 동공내, 두개내 또는 혈관내 투여, 장작 또는 관류를 포함한다. 국부 투여는 전신성 부작용을 회피하고, 국부 전달 부위의 활성제의 전달 시간 및 농도를 보다 정확하게 조절하기 위하여 낮은 투약량으로 투여가 가능하다. 국부 투여는 표적 부위에 공지의 농도를 제공하며, 환자 내 대사 혈류 등의 차이에 무관하다. 향상된 투약량 조절 직접 전달 방법에 의하여 제공된다.

[0462] MASP-2 억제제의 국부 전달은 질환 또는 증상의 외과적 치료 방법, 예컨대 예를 들면 수술 중 예컨대 동맥상 우회술 수술, 죽종절제, 레이저 수술, 초음파 시술, 풍선 혈관형성 및 스텐트 장착 등의 의미에서 달성될 수

있다. 예를 들면, MASP-2 억제제는 풍선 혈관형성 수술시 대상체에 투여될 수 있다. 풍선 혈관형성 수술은 수축된 풍선을 구비한 카테터를 동맥에 삽입하는 것이다. 이 수축된 풍선을 죽상경화 플라크의 주변에 위치시키고, 팽창시켜 플라크가 혈관벽에 압착된다. 결과적으로, 풍선 표면은 혈관 표면 상의 혈관 내피 세포와 접촉하게 된다. MASP-2 억제제가 풍선 혈관형성 카테터에 부착되어, 죽상경화 플라크 부위에 약제를 방출할 수 있게 된다. 약제는 공지의 표준 방법에 따라 풍선 카테터에 부착될 수 있다. 예를 들면, 약제는 풍선이 팽창될 때까지 풍선 카테터의 격실 내에 저장될 수 있으며, 여기서 국부 환경으로 방출된다. 대안적으로, 약제는 풍선 표면에 충전되어, 풍선이 팽창될 때 동맥벽의 세포와 접촉하게 된다. 약제는 천공된 풍선 카테터 내에서 전달될 수 있으며 예컨대, 문헌 Flugelman, M.Y., et al, Circulation 85:1110-1117, 1992에 설명되어 있다. PCT 출원 WO 95/23161에서는 치료적 단백질을 풍선 혈관형성 카테터에 결합하는 예시적 방법을 개시하였다. 이와 같이, MASP-2 억제제는 스텐트에 도포된 겔 또는 중합성 피복 내에 포함될 수 있거나, 또는 스텐트의 물질 내로 포함될 수 있으므로, 스텐트는 혈관 장착 후 MASP-2 억제제를 용출한다.

[0463] 관절염 및 다른 근골격 장애의 치료에 사용되는 MASP-2 억제 조성물은 관절내 주사에 의하여 국부적으로 전달될 수 있다. 이러한 조성물은 적절하게 지속 방출 전달 운반체를 포함할 수 있다. 국부 전달이 필요한 추가의 실시예로서, 비뇨생식 증상의 치료에 사용되는 MASP-2 억제 조성물은 적절하게 방광내 또는 다른 비뇨생식 구조에 설치될 수 있다.

[0464] 의료기기상의 피복

[0465] MASP-2 억제제 예컨대 항체 및 억제 펩타이드는 이식가능 또는 부착가능한 의료기기의 표면 상에 (또는 그 내부에) 고정될 수 있다. 변형된 표면은 일반적으로 동물 신체 내에 이식 후 살아있는 조직에 접촉하게 된다. "이식가능 또는 부착가능한 의료기기"는 정상 작동시 동물 신체 조직에 이식되는, 또는 부착되는 모든 기기를 의미한다(예컨대, 스텐트 및 이식가능 약물 전달 기기). 이러한 이식가능 또는 부착가능 의료기기는, 예를 들면, 니트로셀룰로스, 디아조셀룰로스, 유리, 폴리스티렌, 폴리비닐클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 세파로스, 아가, 전분, 나일론, 스테인레스 스틸, 티타늄 및 생분해성 및/또는 생체적합성 중합체로 제조된다. 단백질과 기기의 결합은 결합된 단백질의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 기법에 의하여 달성될 수 있으며, 예를 들면 단백질의 N- C-말단 잔기 중의 하나 또는 둘다 기기에 부착시킴으로써 달성된다. 부착은 단백질 내의 하나 이상의 내부 부위에서 만들어진다. 다중 부착(단백질의 내부 또는 말단 모두)이 사용될 수 있다. 이식가능 또는 부착가능 의료기기의 표면은 단백질 고정을 위한 기능기(예컨대, 카르복실, 아미드, 아미노, 에테르, 히드록실, 시아노, 니트리도, 설파나미도, 아세틸리닉, 에폭사이드, 실라닉, 안하이드리드, 썬시니믹, 아지도)를 포함하도록 개질될 수 있다. 커플링 화학은 에스테르, 에테르, 아미드, 아지도 및 설파나미도 유도체, 시아나이트 및 MASP-2 항체 또는 억제 펩타이드 상에 활용되는 기능기에 대한 다른 결합의 형성을 포함하나 이에 한정되지 않는다. MASP-2 항체 또는 억제 절편은 친화도 태그 서열을 단백질, 예컨대 GST(D.B. Smith and K.S. Johnson, Gene 67:31, 1988), 폴리히스티딘(E. Hochuli et al., J. Chromatog. 411:11, 1987), 또는 바이오틴에 첨가함으로써 비-공유적으로 결합될 수 있다. 이러한 친화도 태그는 단백질을 기기에 가역적으로 부착하기 위하여 사용될 수 있다.

[0466] 단백질은 기기 본체의 표면에 공유적으로 부착될 수 있으며, 예를 들면, 의료기기의 표면의 공유 활성화에 의한다. 대표적인 실시예로서, 기질세포성 단백질(들)은 반응기의 모든 다음의 짝에 의하여 기기 본체에 부착될 수 있다(기기 본체의 표면상에 존재하는 짝의 일 구성원 및 기질세포성 단백질(들)상에 존재하는 짝의 다른 구성원): 에스테르 결합을 하기 위한 히드록실/카르복실산; 에스테르 결합을 하기 위한 히드록실/안하이드라이드; 우레탄 결합을 하기 위한 히드록실/이소시아나이트. 유용한 반응기를 보유하지 않은 기기 본체의 표면은 기질세포성 단백질(들)의 부착을 가능하게 하는 반응기를 형성하도록 전파-주파수 방출 혈장 (RFGD)으로 치료될 수 있다(예컨대, 산소-함유기를 도입하기 위한 산소 혈장 치료; 아민기를 도입하기 위한 프로필 아미노 혈장 치료).

[0467] 핵산 분자 예컨대 안티센스, RNAi- 또는 DNA-암호화 펩타이드 억제제를 포함하는 MASP-2 억제제는 기기 본체에 부착된 다공성 기질에 삽입될 수 있다. 표면층을 형성하기 유용한 대표적인 다공성 기질은 텐돈 또는 피부 콜라겐으로부터 제조된 것이며, 다양한 상업적 공급원으로부터 획득이 가능하다(예컨대, Sigma 및 Collagen Corporation), 또는 콜라겐 기질은 U.S. Patent No. 4,394,370, Jefferies 및 4,975,527. Koezuka에 설명된 바와 같이 제조되었다. 일 콜라겐성 물질은 UltraFiber™ 로 명명되었으며 Norian Corp. (Mountain View, California)사에서 구득이 가능하다.

[0468] 특정 중합성 기질을 소망하는 경우 사용할 수 있으며, 아크릴 에스테르 중합체 및 락트산 중합체를 포함하고,

예를 들면, U.S. Patent Nos. 4,526,909, Urist 및 4,563,489, Urist에 개시되어 있다. 유용한 중합체의 특정 실시예는 오르소에스테르, 안하이드라이드, 프로필렌-코퓨마레이트, 또는 하나 이상의 α -히드록시 카르복실산 단량체의 중합체(예컨대, α -히드록시 아세트산(글리콜산) 및/또는 α -히드록시 프로피온산(락트산))의 것이다.

[0469]

치료 요법

[0470]

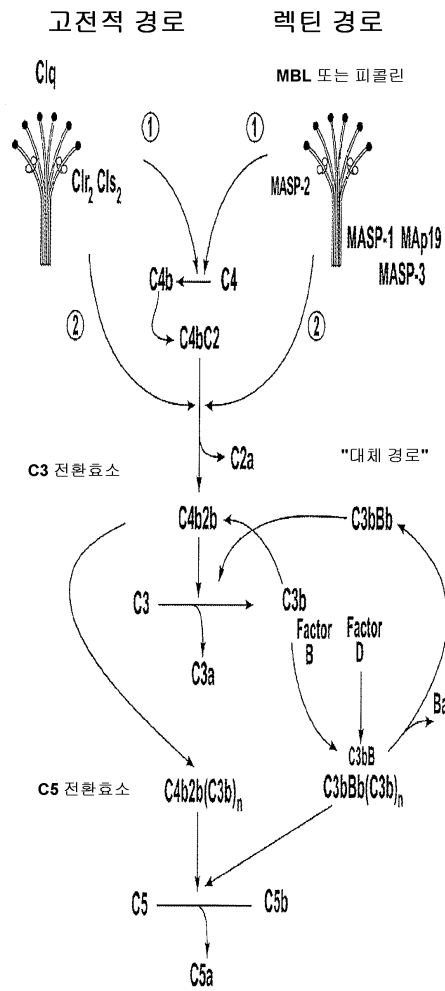
예방적 응용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 발달시킬 위험을 제거 또는 감소시키기 충분한 양으로 MASP-2-의존성 보체 활성화에 관계된 증상에 걸리기 쉬운 또는 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 응용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 감경 또는 최소한 부분적으로 감소시키기에 충분한 치료학적 유효량으로 MASP-2-의존성 보체 활성화에 관련된 증상이 의심되거나 또는 이미 걸려있는 대상체에 투여된다. 예방적 및 치료적 요법 모두에 있어서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체 내에서 충분한 치료적 결과가 달성될 때까지 수종의 투약량으로 투여될 수 있다. MASP-2 억제 본 발명의 조성물의 적용은 급성 증상, 예컨대, 재관류 손상 또는 다른 외상성 손상의 치료를 위하여 조성물의 단일 투여, 또는 제한된 순서의 투여에 의하여 달성된다. 대안적으로, 조성물은 만성 증상, 예컨대, 관절염 또는 건선의 치료를 위하여 시간적 간격을 두고 투여될 수 있다.

[0471]

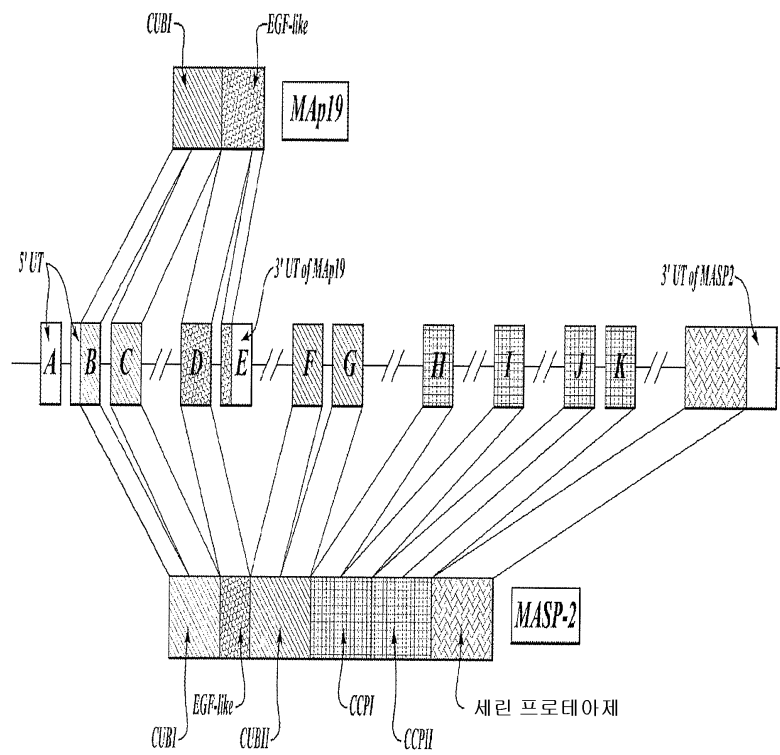
본 발명의 조성물 및 방법은 일반적으로 진단적 및 치료적 의학적 및 외과적 수술에 의한 염증 및 유관 진행에 사용될 수 있다. 이러한 진행을 억제하기 위하여, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 수술 전후적으로 사용될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이 "수술 전후적으로"는 수술전 및/또는 수술중 및/또는 수술후, 즉, 수술 전에, 수술 전 및 도중에, 수술 전 및 후에, 수술 전, 후 및 도중에, 수술 중에, 수술 중 및 후에, 또는 수술 후에 억제 조성물을 투여한다는 것이다. 수술 전후 적용은 외과적 또는 수술 부위에 조성물의 국부 투여, 예컨대 상기 부위의 주사 또는 계속적 또는 간헐적 관류 또는 전신 투여에 의하여 수행될 수 있다. MASP-2 억제제 용액의 국부 수술 전후 전달에 적합한 방법은 US Patent No. 6,420,432, Demopoulos 및 6,645,168, Demopoulos에 개시되어 있다. MASP-2 억제제(들)을 포함하는 연골보호제 조성물의 국부 전달에 적합한 방법은 PCT 특허 출원 WO 01/07067 A2에 개시되어 있다. MASP-2 억제제(들)을 포함하는 연골보호제의 전신 전달에 적합한 방법 및 조성물은 PCT 특허 출원 WO 03/063799 A2에 개시되어 있다.

도면

도면1

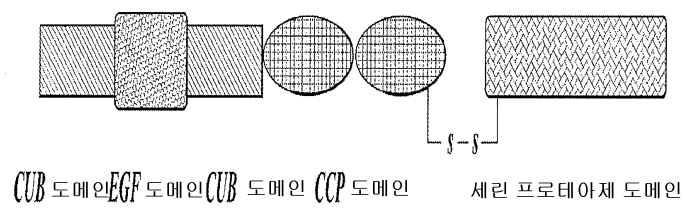


도면2

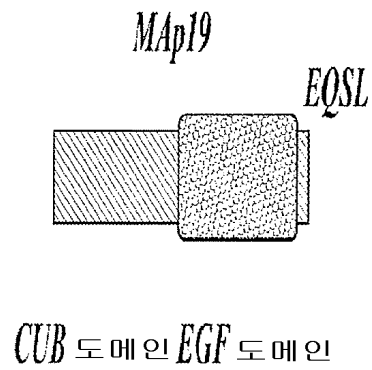


도면3A

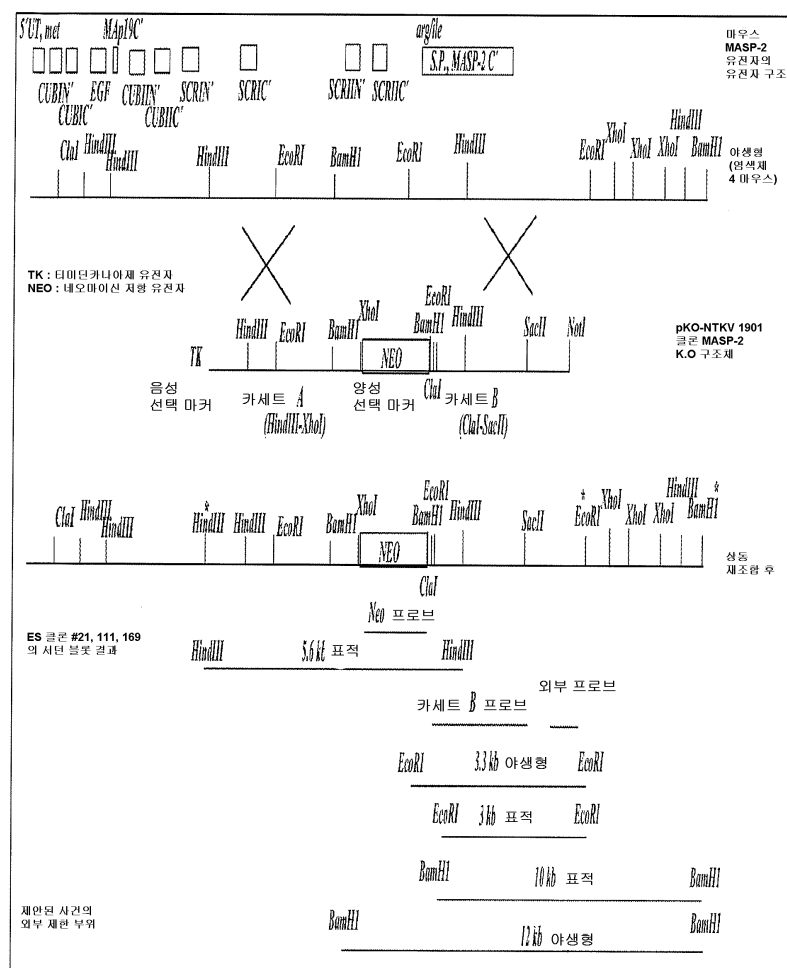
Clr/Clu/MASP-1/MASP-2/MASP-3



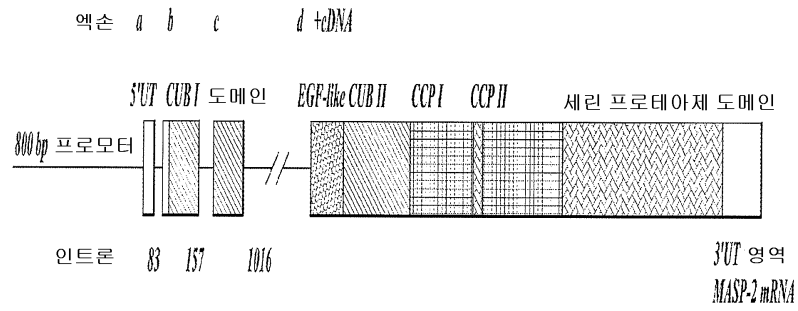
도면3B



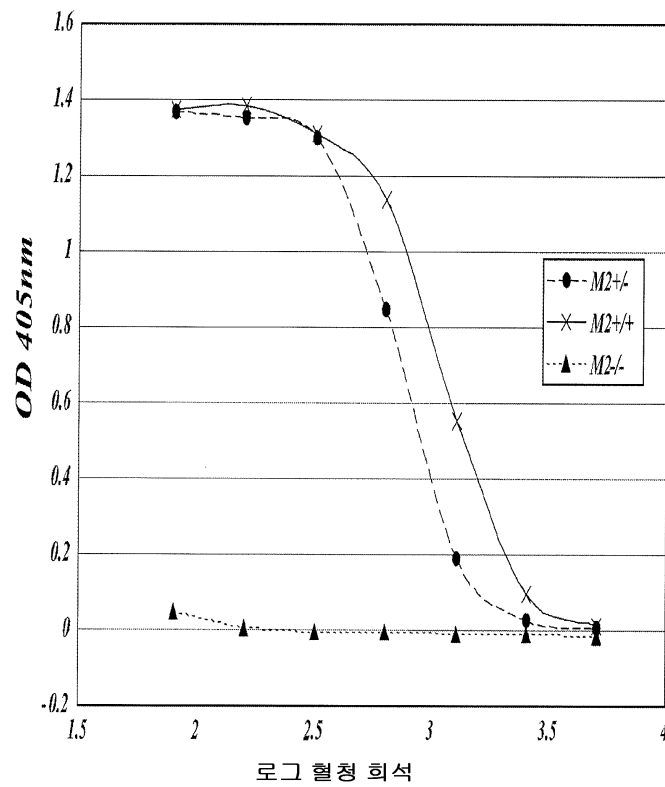
도면4



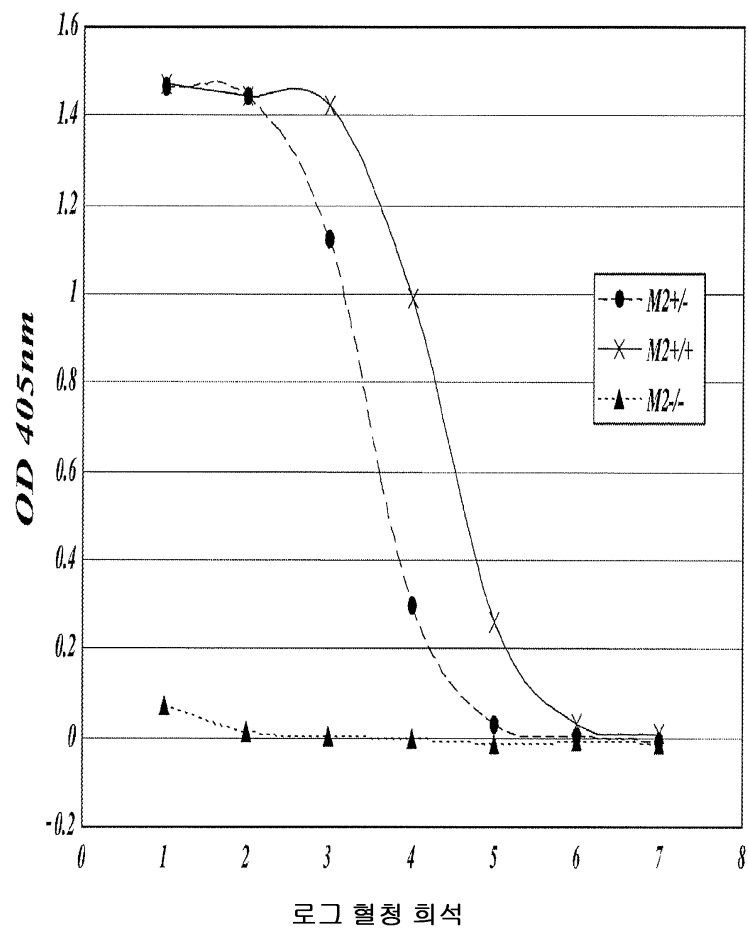
도면5



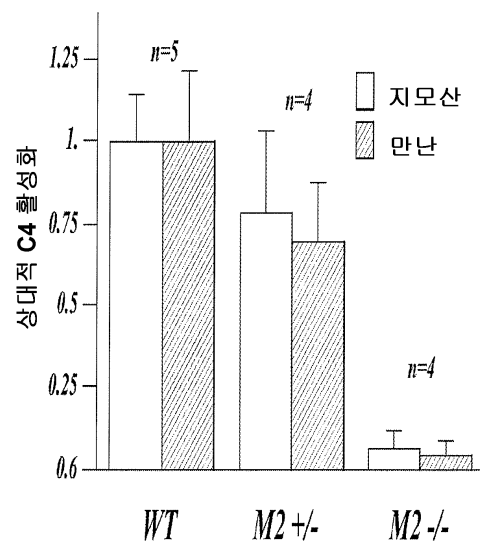
도면6A



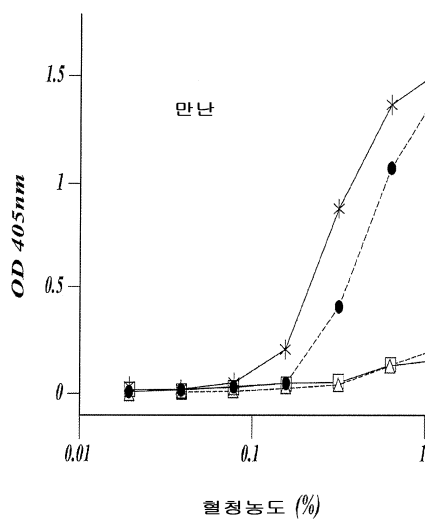
도면6B



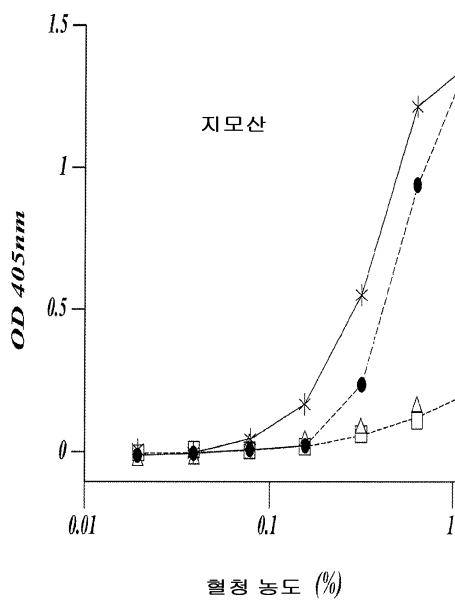
도면6C



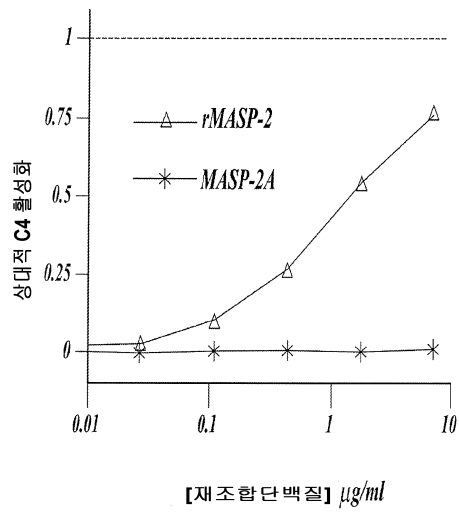
도면7A



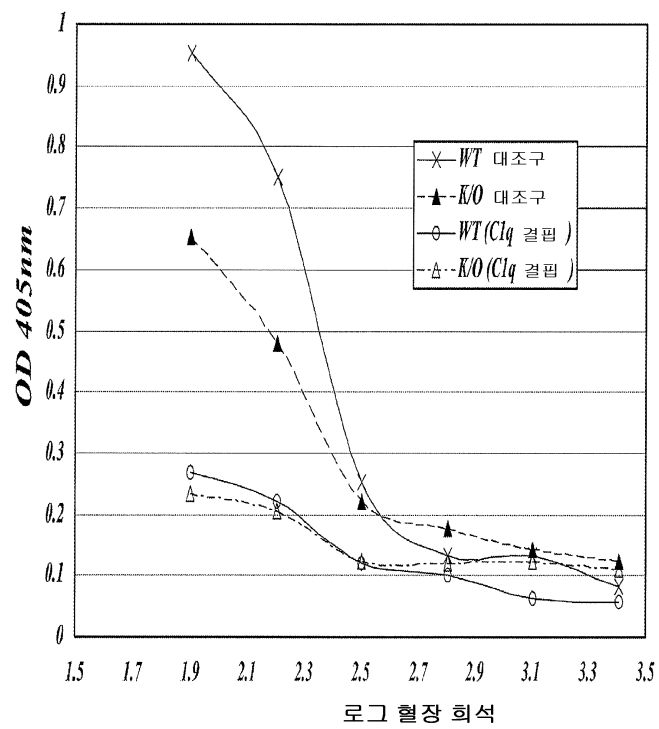
도면7B



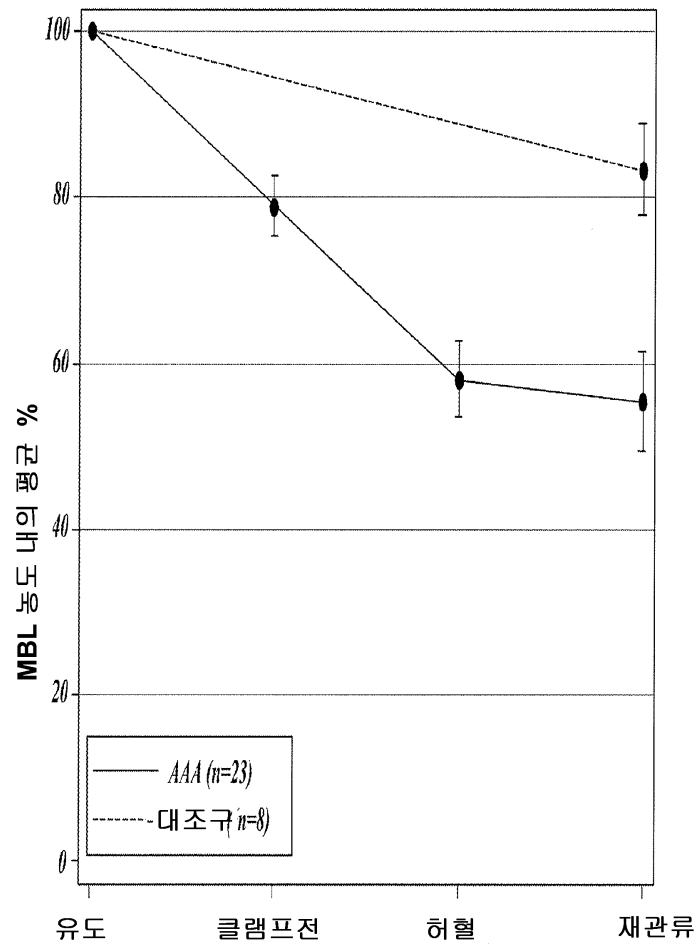
도면8



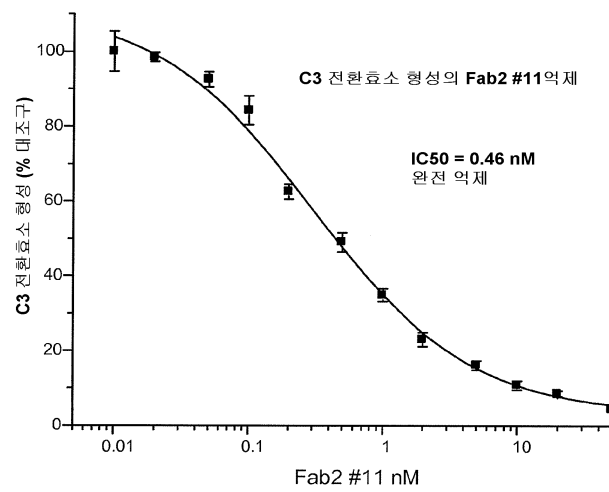
도면9



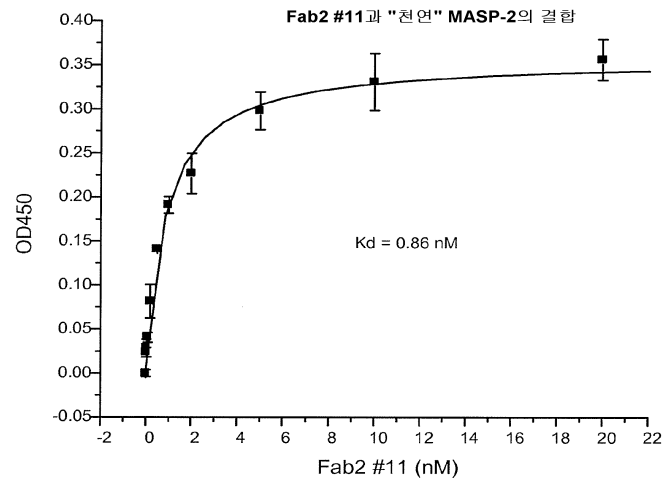
도면10



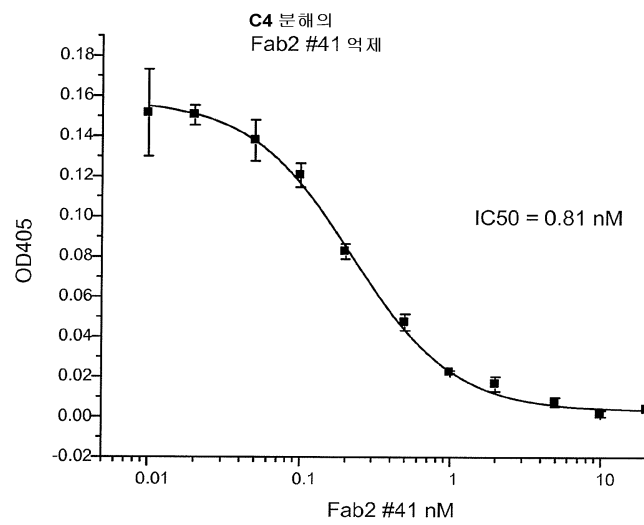
도면11A



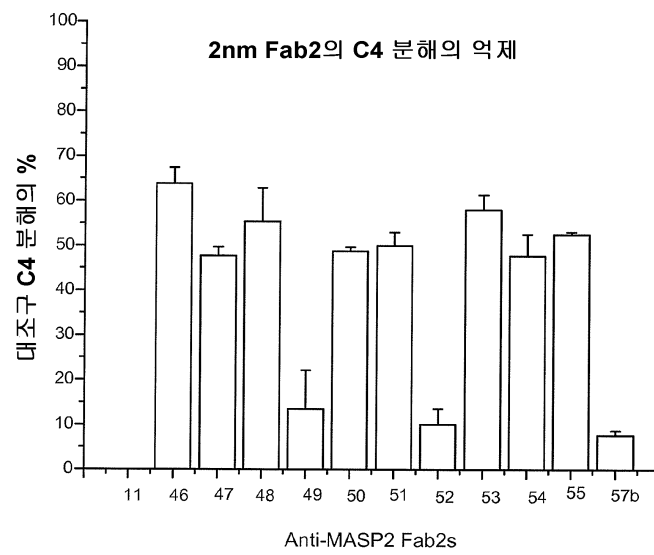
도면11B



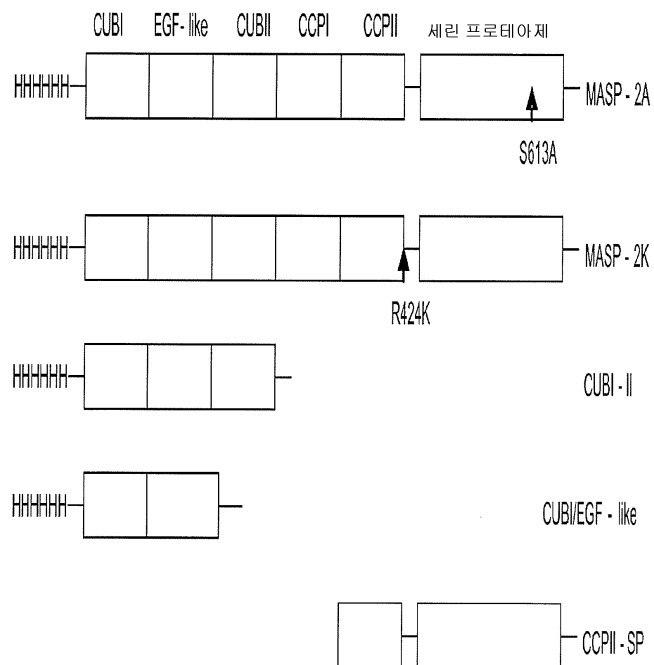
도면11C



도면12

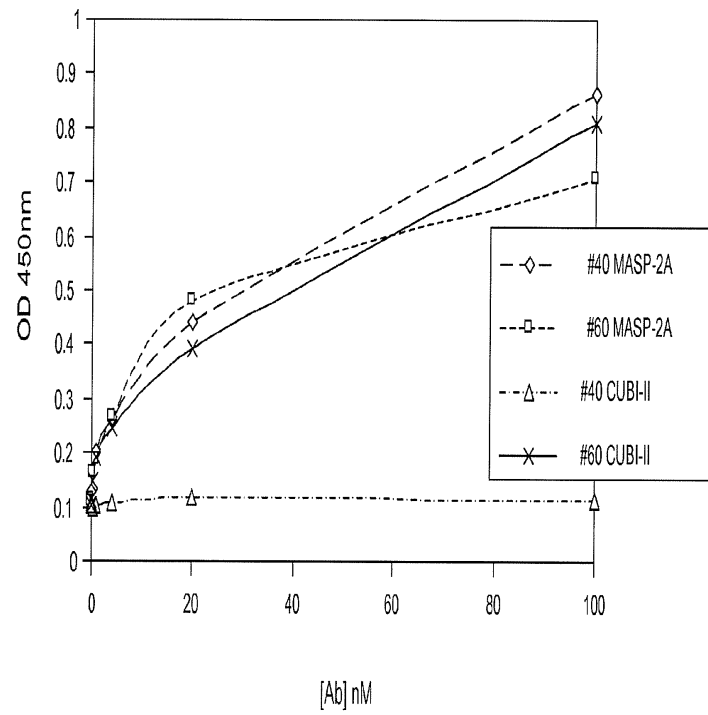


도면13

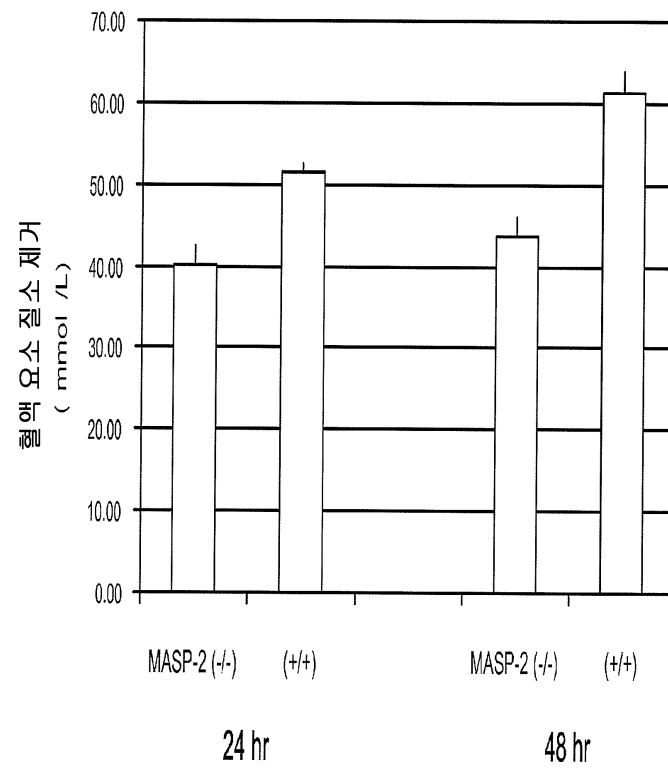


도면14

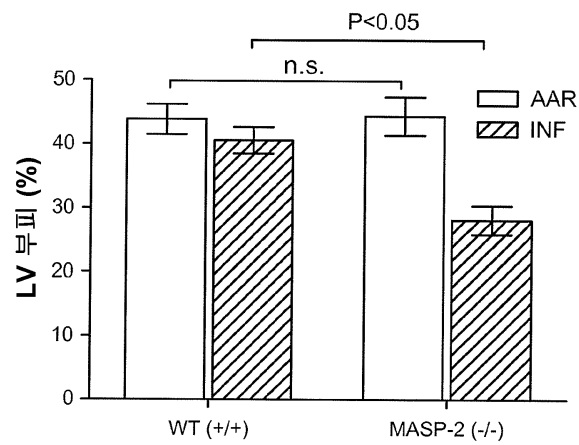
AbD Ab #40 & #60과 레트 MASP-2
폴리펩타이드의 결합



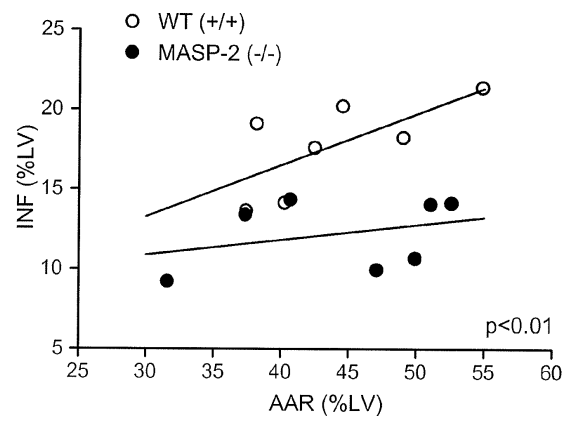
도면15



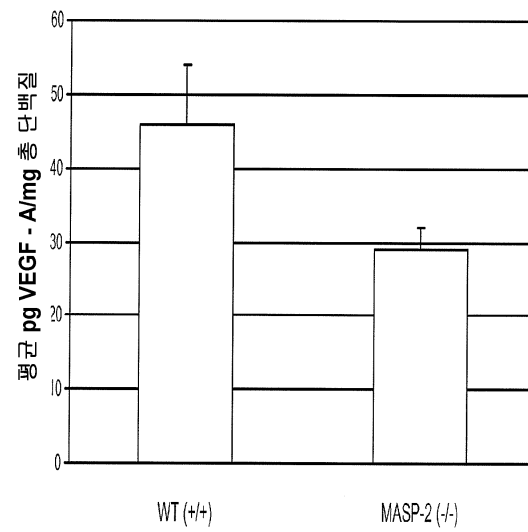
도면16A



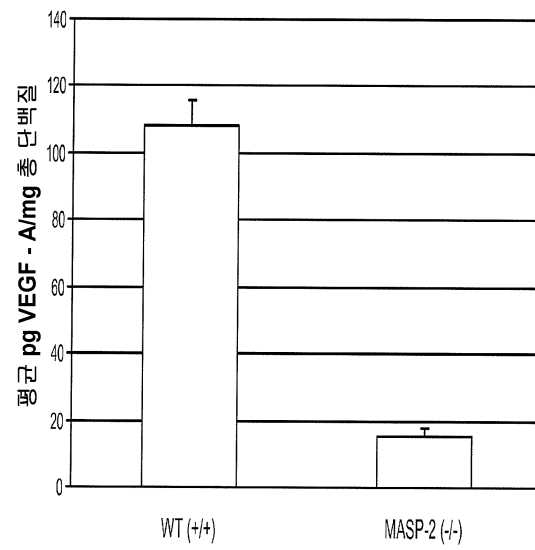
도면16B



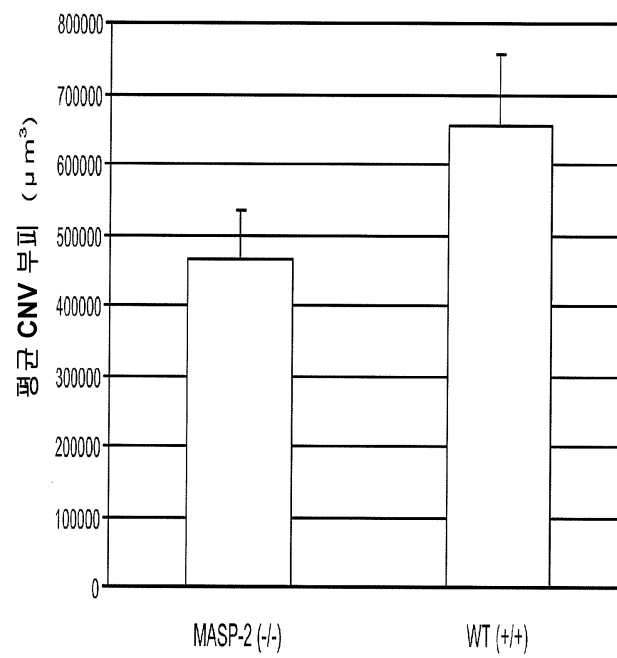
도면17A



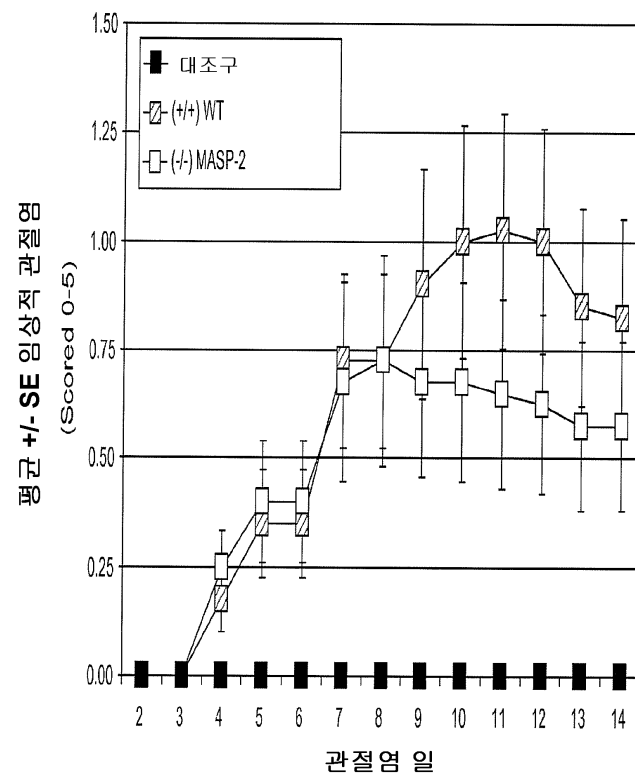
도면17B



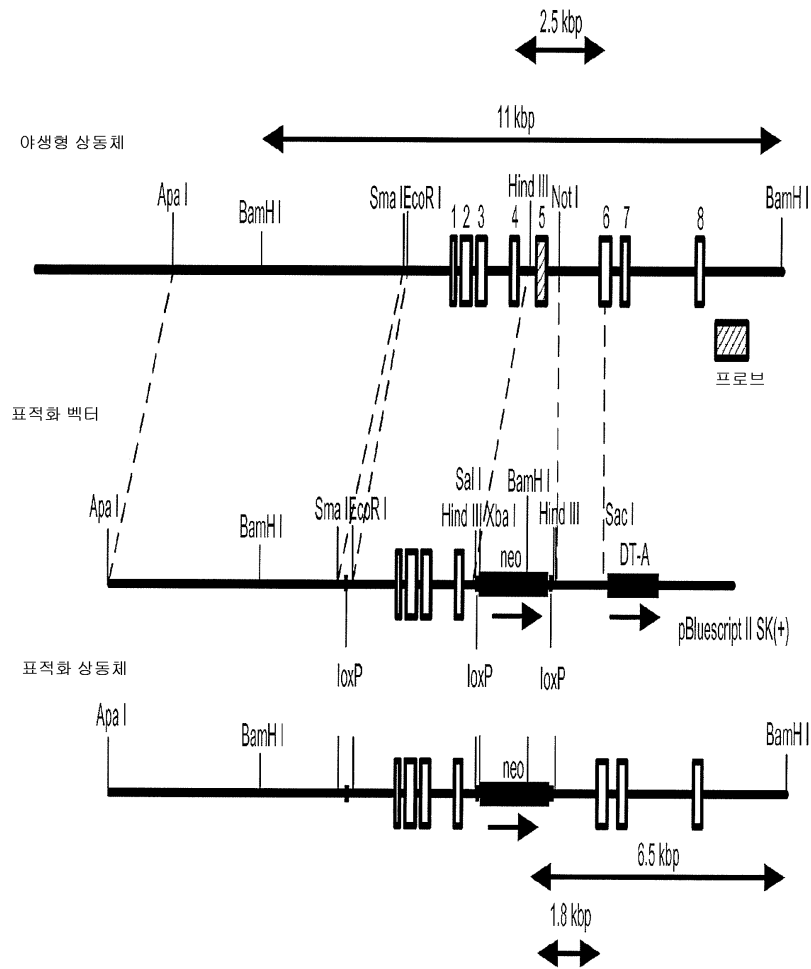
도면18



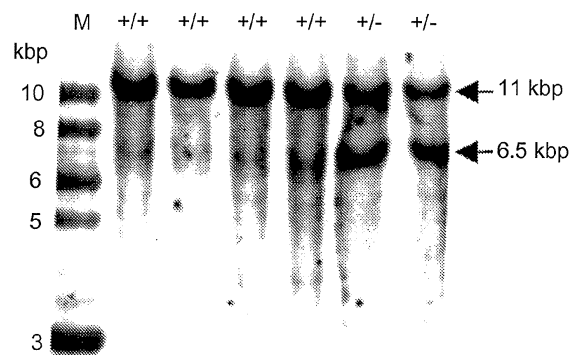
도면19



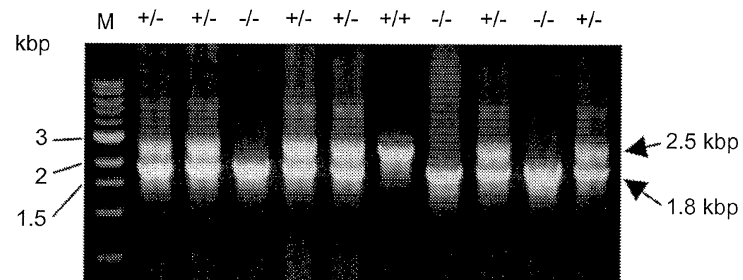
도면20A



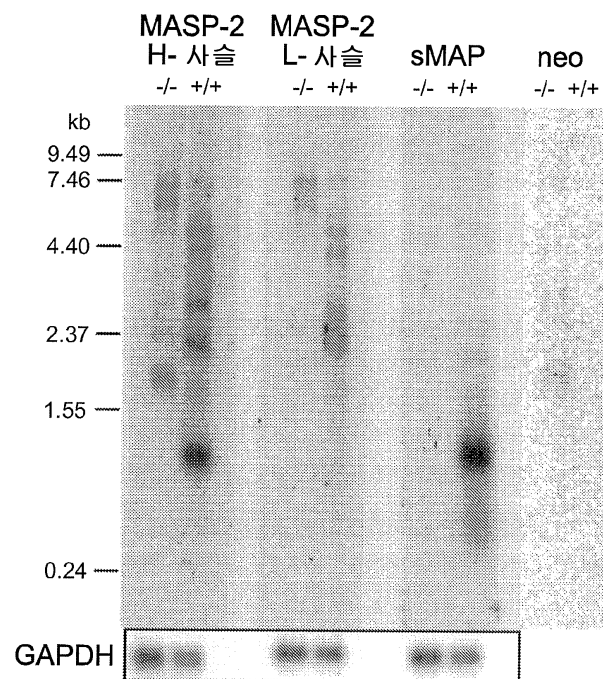
도면20B



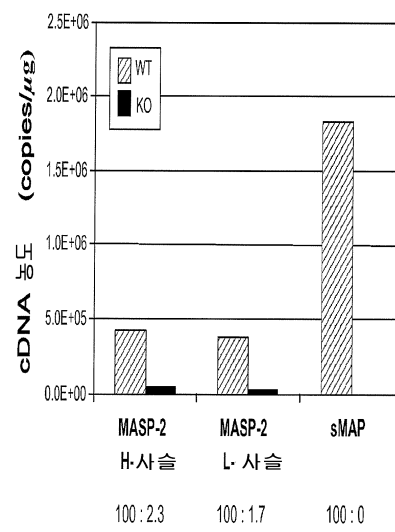
도면20C



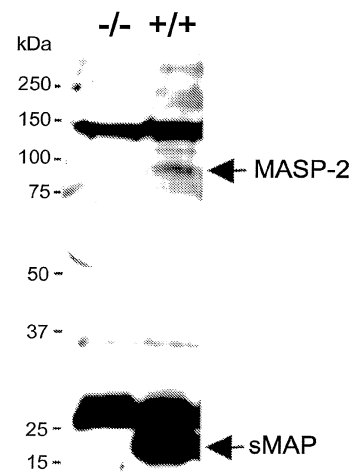
도면21A



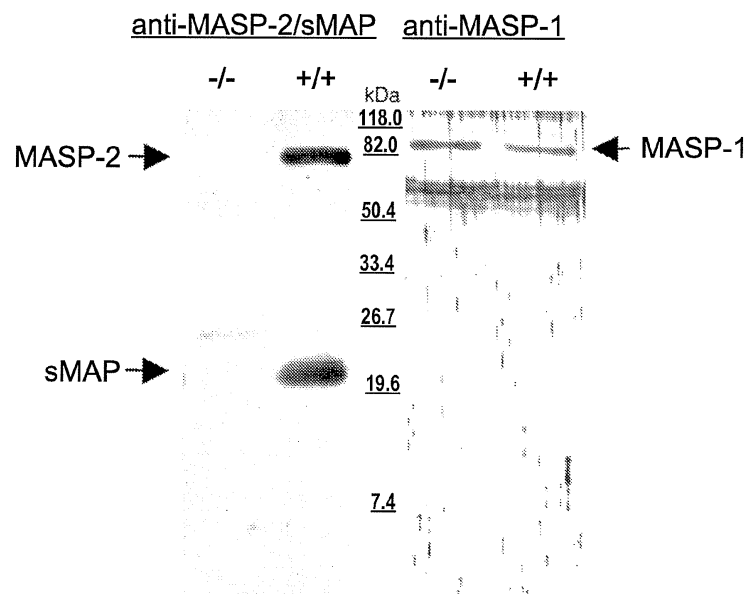
도면21B



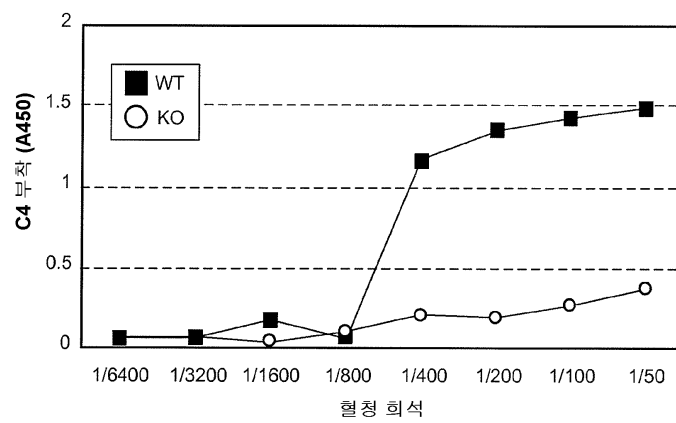
도면22A



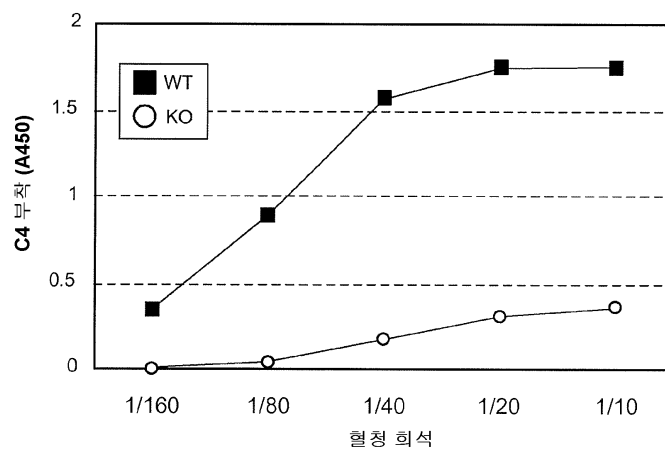
도면22B



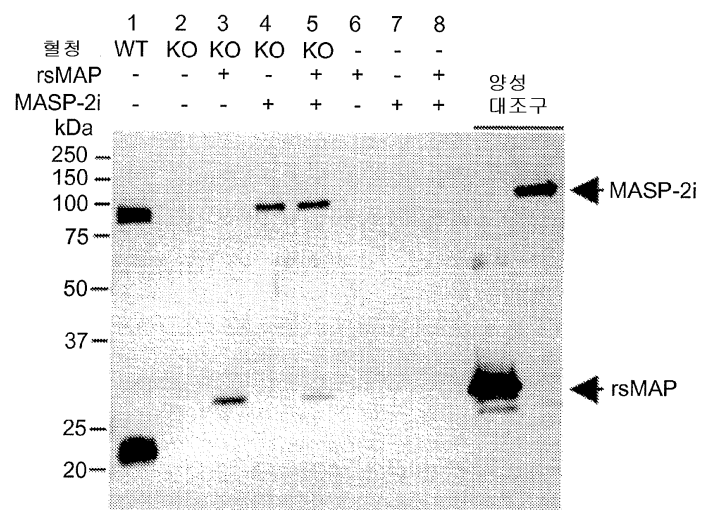
도면23A



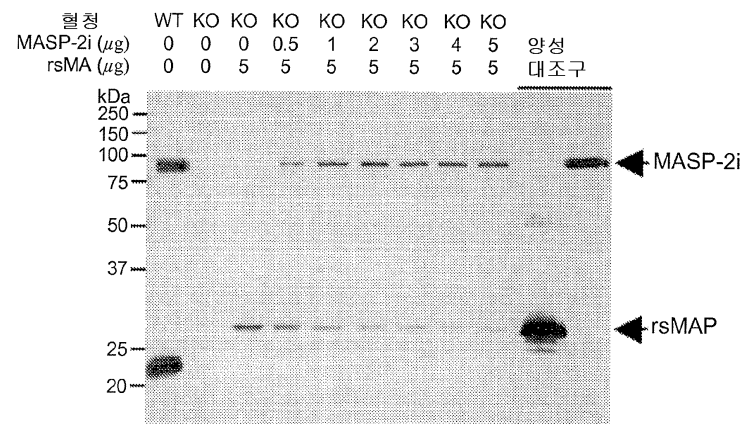
도면23B



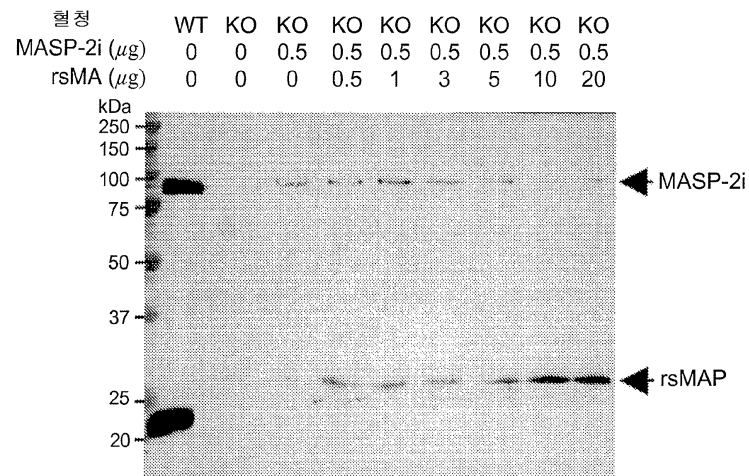
도면24A



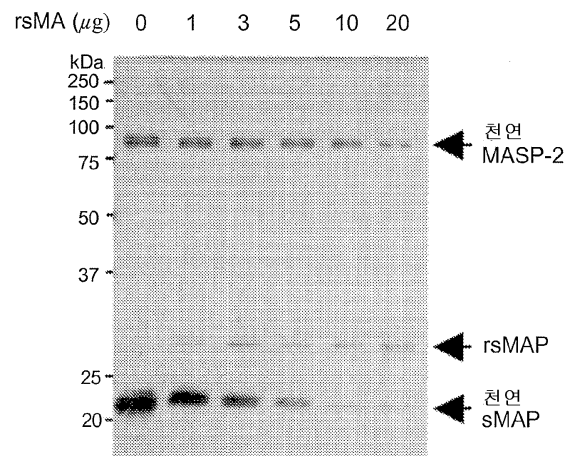
도면24B



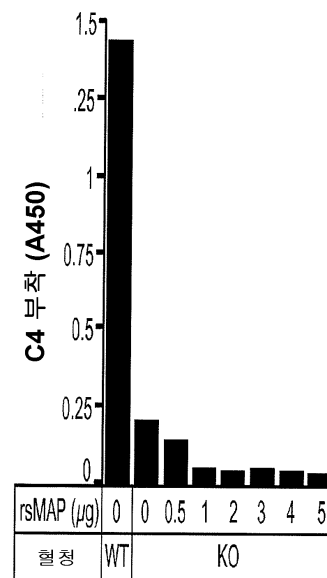
도면24C



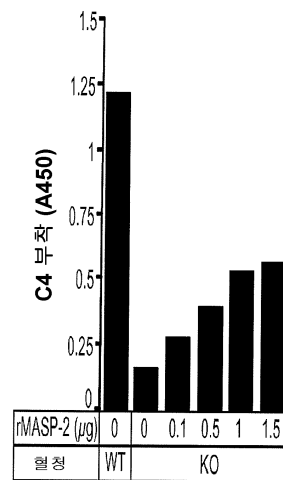
도면24D



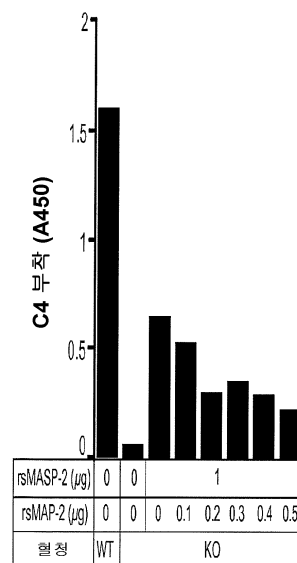
도면25A



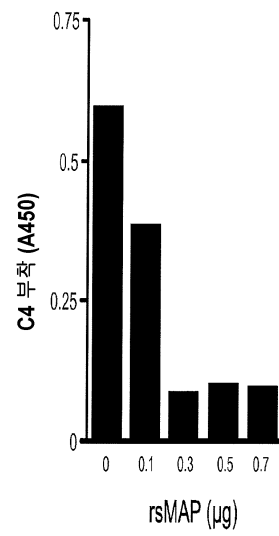
도면25B



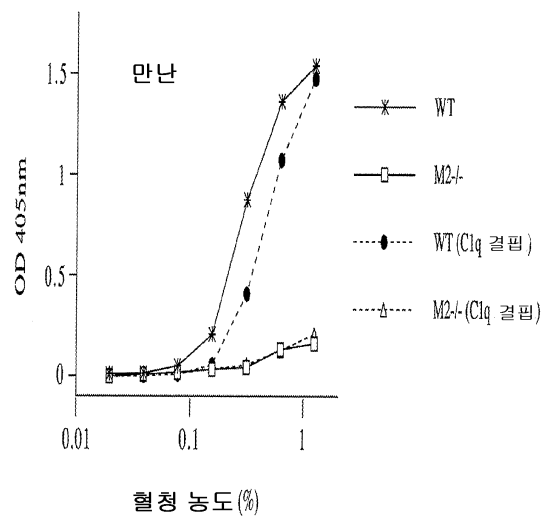
도면26A



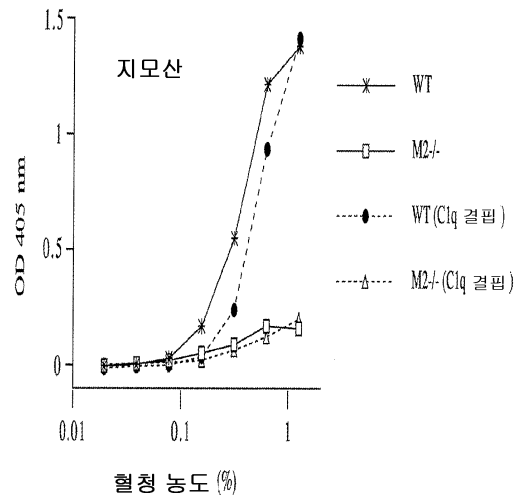
도면26B



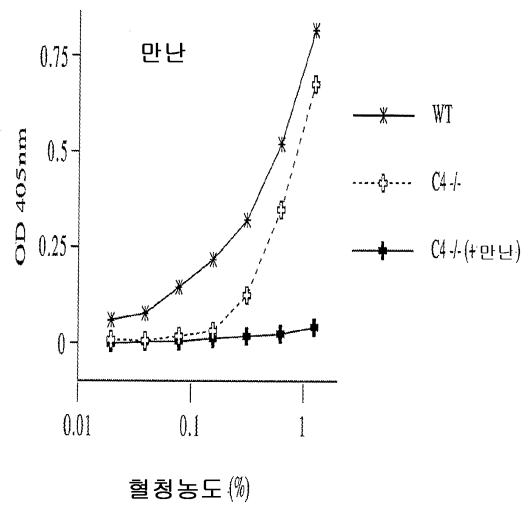
도면27A



도면27B



도면27C



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<120> METHODS FOR TREATING CONDITIONS ASSOCIATED WITH MASP-2 DEPENDENT
COMPLEMENT ACTIVATION

<130> OMER-1-29200

<150> US 11/645,359

<151> 2006-12-22

<150> US 60/788,876

<151> 2006-04-03

<150> US 60/578,847

<151> 2004-06-10

<150> US 11/150,883

<151> 2005-06-09

<160> 65

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 725

<212> DNA

<213> Homo sapien

<220>

<221> CDS

<222> (27)..(584)

<400> 1

ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt	53
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu	
1 5	

ctg tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct	101
Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro	
10 15 20 25	

gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat	149
Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn	
30 35 40	

gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg	197
Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu	

45	50	55	
cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu 60 65 70			245
tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu 75 80 85			293
tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr 90 95 100 105			341
ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr 110 115 120			389
tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu 125 130 135			437
gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp 140 145 150			485
cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala 155 160 165			533
ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc ctc Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu 170 175 180 185			581
tag cctcccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc			634
tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggtctgtgcc ccaactccca ttcaccacc			694
atggacccaa taataaacct ggccccaccc c			725
<210> 2			
<211> 185			
<212> PRT			

<213> Homo sapien

<400> 2

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
180 185

<210> 3
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 3

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
50 55 60

Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser
85 90 95

Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln
115 120 125

Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His
130 135 140

Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg
145 150 155 160

Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
165 170

<210> 4
<211> 2460
<212> DNA
<213> Homo sapien

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(2082)

<400> 4
ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg 51
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu
1 5 10

tgt ggc tgc gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg 99
Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val
15 20 25

ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat gac 147
Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp
30 35 40

cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg cgc 195
Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg
45 50 55

ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag tac 243
Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr
60 65 70

gac ttc gtc aag ctg agc tgc ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc 291
Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys
75 80 85 90

ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc 339
Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe
95 100 105

tac tgc ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser 110 115 120	387
aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp 125 130 135	435
att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His 140 145 150	483
cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly 155 160 165 170	531
tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly 175 180 185	579
cag gtc ttc acc cag agg tct ggg gag ctc agc agc cct gaa tac cca Gln Val Phe Thr Gln Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro 190 195 200	627
cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu 205 210 215	675
gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu 220 225 230	723
aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr 235 240 245 250	771
gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg 255 260 265	819
att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu 270 275 280	867

tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln 285 290 295	915
cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val 300 305 310	963
caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr 315 320 325 330	1011
ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala 335 340 345	1059
gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser 350 355 360	1107
att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu 365 370 375	1155
tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr 380 385 390	1203
agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr 395 400 405 410	1251
gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser 415 420 425	1299
ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly 430 435 440	1347
ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp 445 450 455	1395

caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr 460 465 470	1443
gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His 475 480 485 490	1491
gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca Asp Ala Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser 495 500 505	1539
cct cat tat aca caa gcc tgg tct gaa gct gtt ttt ata cat gaa ggt Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly 510 515 520	1587
tat act cat gat gct ggc ttt gac aat gac ata gca ctg att aaa ttg Tyr Thr His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu 525 530 535	1635
aat aac aaa gtt gta atc aat agc aac atc acg cct att tgt ctg cca Asn Asn Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro 540 545 550	1683
aga aaa gaa gct gaa tcc ttt atg agg aca gat gac att gga act gca Arg Lys Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala 555 560 565 570	1731
tct gga tgg gga tta acc caa agg ggt ttt ctt gct aga aat cta atg Ser Gly Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met 575 580 585	1779
tat gtc gac ata ccg att gtt gac cat caa aaa tgt act gct gca tat Tyr Val Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr 590 595 600	1827
gaa aag cca ccc tat cca agg gga agt gta act gct aac atg ctt tgt Glu Lys Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys 605 610 615	1875
gct ggc tta gaa agt ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly 620 625 630	1923

ggg gca ctg gtg ttt cta gat agt gaa aca gag agg tgg ttt gtg gga 1971
Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly
635 640 645 650

gga ata gtg tcc tgg ggt tcc atg aat tgt ggg gaa gca ggt cag tat 2019
Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr
655 660 665

gga gtc tac aca aaa gtt att aac tat att ccc tgg atc gag aac ata 2067
Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile
670 675 680

att agt gat ttt taa ctgctgtgc tgcagtcag gattcttcat ttttagaat 2122
Ile Ser Asp Phe
685

gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg 2182

gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact 2242

tgccagttta attccagcct tacccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca 2302

gtcatctttg cccaccagtg gtaatgtcac tgcctcaaatt acatttcatt accttaaaaa 2362

gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgtcttttg 2422

tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa 2460

<210> 5
<211> 686
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 5

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser

20

25

30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg
180 185 190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu
195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile

210	215	220
Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu		
225	230	235 240
Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly		
	245	250 255
Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn		
	260	265 270
Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly		
	275	280 285
Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro Met		
	290	295 300
Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu		
305	310	315 320
Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln		
	325	330 335
Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly		
	340	345 350
Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro		
	355	360 365
Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly		
	370	375 380
Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe		
385	390	395 400
Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly		
	405	410 415

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu Pro
420 425 430

Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly
435 440 445

Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu Gly
450 455 460

Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu Thr
465 470 475 480

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu Asp
485 490 495

Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala
500 505 510

Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly
515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile
530 535 540

Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser
545 550 555 560

Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr
565 570 575

Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile
580 585 590

Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro
595 600 605

Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly
610 615 620

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
625 630 635 640

Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
645 650 655

Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
660 665 670

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
675 680 685

<210> 6
<211> 671
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 6

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
50 55 60

Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser
85 90 95

Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln
115 120 125

Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His
130 135 140

Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg
145 150 155 160

Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln
165 170 175

Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys
180 185 190

Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val
195 200 205

Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr
210 215 220

Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His
225 230 235 240

Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser
245 250 255

Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr
260 265 270

Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro
275 280 285

Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile
290 295 300

Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu
305 310 315 320

Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp
325 330 335

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly
340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro
355 360 365

Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
370 375 380

Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp
385 390 395 400

Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu
405 410 415

Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly
420 425 430

Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu
435 440 445

Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu
450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu
465 470 475 480

Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln
485 490 495

Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala
500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val
515 520 525

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu
530 535 540

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu
545 550 555 560

Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro
565 570 575

Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr
580 585 590

Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser
595 600 605

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
610 615 620

Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
625 630 635 640

Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
645 650 655

Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
660 665 670

<210> 7
<211> 4900
<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 7
cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc 60

ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga 120

ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg 180

gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggg gggagcacag gcctgggcct caccgcccct 240

gccctgccc taggctgtg accctctgg gccttctgtg tggctcggtg gccaccccct 300

taggcccga gttgcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atccccggc tttccagggg 360

agtatgcaa tgaccaggag cggcgtgga ccctgactgc accccccggc taccgcctgc 420

gccttactt caccacttc gacctggagc tctccacct ctgcgagtac gacttcgtca 480

aggtgccgtc agacgggagg gctggggttt ctcagggtcg ggggggtccc aaggagtagc 540

cagggttcag ggacacctgg gacaggggc caggcttggc caggaggag atcaggcctg 600

ggtcttgct tcactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaggtgc 660

tggccacgt gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt 720

tctactcgt gggtccagc ctggacatta cttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780

cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgagggtga gccaagagg gtcctgcaac 840

atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900

tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggcctgacat catccacaat 960

gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtggcaac tctgagccag 1020

ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtac gcagggactg gccgggcgcg gcagctcacg 1080

cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt 1140

caaggccagc cagggaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200

gggcgtgggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactaggga ggctgaggca ggagaattgc 1260

ttgaacctgc gagtggagg ctgcagtga cagagattgc accactacac tccacctggg 1320

cgacagacta gactccgtct caaaaaacaa aaaacaaaaa ccacgcaggg ccgaggggccc 1380

attacaagc tgacaaagtg ggccctgcc a gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440

gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500

tccttagaag ctgctgaag ggttcagcgc tgtagcccg cccctgggt ttgattgact 1560

ccctcatta gctgggtgac ctgcggccga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620

gatgtttgca tctttctccc agcgtgctg ggagcttgca gcgaccctag gcctgtaagg 1680

tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggctctctc tgaggtccac 1740

tctgaggta tggatctctt gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctctga 1800

cggcctgcct ggccctgcct ctccccaga cattgacgag tgccagggtg ccccgaggaga 1860

ggcggccacc tgcgaccacc actgccaca ccacctgggc gggtttctact gctcctgccg 1920

cgcaggctac gtcctgcacc gtaacaagc cacctgctca ggtgaggag gctgcctggg 1980

ccccaacgca cctctctctg ggatacccg ggctcctcag ggccattgct gctctgccca 2040

ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc 2100
 cctttctcag ccttgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtgccac cctgccctag 2160
 cactgagact aattctaaca tcccactgtg tacctggttc cacctgggct ctgggaaccc 2220
 ctcatgtagc cacgggagag tgggggtatc taccctcggt ccttgactg ggttctctgtt 2280
 ccctgcactg ggggacgggc cagtgtcttg gggcgtgggc agccccaccc tgtggcgctg 2340
 accctgctcc cccgactcgg ttttctctct cgggggtctct ccttgctctc ctgactcttc 2400
 ttccagagca gagectctag cctccccctgg agtccggct gccagcagg tcagaagcca 2460
 gagccaggct gctggcctca gtcggggtt gggctgagat gctgtgcccc aactccatt 2520
 caccacccat ggaccaata ataaacctgg cccacccca cctgctgccg cgtgtctctg 2580
 gggggggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gtcctctctc gcctaccctc ctcacagcct 2640
 catgaacccc aggtctgtgg gagectctc catggggcca cacggtcctt ggcctcacc 2700
 cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgtc gagtccagg 2760
 cccagaggc tgagcccaga gtaacttga accacccca ttcagggtct ggctggagg 2820
 agcctgacct acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtcccc 2880
 gcaaatccag ggggtattcc cactgcccc taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca 2940
 atgttggggc tcttacttc ctagaggcct cacaactca atgccccca ctgcagctgg 3000
 ggggtgggtg gtgttatggg atggggacca agccttctt gaaggataga gccagccca 3060
 acacccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc 3120
 agtcatgac actgttgct tgaacttcca agaacagccc cagggaagg gtcaaacag 3180
 gggaagggg gtgatgagag atccttctc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg 3240

ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg 3300

tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggctcgagg agatgctcct 3360

ctcttttccc gaattccag ggaccagga gagtgtccct tcttctctt cctgtgtgtc 3420

catccacccc cgcccccg cctggcagag ctggtggaac tcagtgtctt agccctacc 3480

ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgtccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540

tgtgcgtccc atcccgatg ctgcctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaacccc 3600

ctctctaagc ggccctcag ccacgggtg ggtcgtttgg tttctggga ggcctcagg 3660

gctggccacc tgcagggccc agcccaacc aggatgcag atgtccagc cacatccctg 3720

tcccagtttc ctgtcccca aggcattcac cctgctgtg gtgcgaggc tgatagagg 3780

cacgccaagt cactcccctg ccttccctc ctccagccc tgtgtccgg ccaggtcttc 3840

accagaggt ctggggagct cagcagcct gaataccac ggccgtatcc caaactctcc 3900

agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960

tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg 4020

ctcctgggcc cctcatctg tccagatcc tccccctca gccagctgc acccctact 4080

tcctgcagca tggccccac cagttcccg tcaccctcgg tgacccacc tcttcagtg 4140

ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200

cacccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg 4260

gttacttccc tccgccagg ccagaccag gcagctgtc cccagcttcc atgagcttct 4320

ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggccattc tgtgggaaga cattgcccc 4380

caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga 4440

ccacacaggc tggaagatcc actacacgag cacagtgage aagtgggctc agatccttgg 4500

tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtga gggtctttct 4560

gggcaggact aggaaggagc accaggttta gtggtgctga ggtctgagc agcagcttct 4620

aaggggaagc acccgtgccc tctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680

ccacccattc acccatcact catcttttac ccaccaccc ttgcccactc atccttctgt 4740

ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccacccatcc atcctttgcc acacaacat 4800

ccacccattc tttacctac ccatcctatc catccatcct tctatcagca tctttctacc 4860

accatcctt cgttcggtea tccatcatca tccatccatc 4900

<210> 8
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapien

<400> 8

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
 20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
 35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
 50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser

65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
130 135

<210>	9
<211>	181
<212>	PRT
<213>	Homo sapien

<400> 9

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80

Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp

85

90

95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110

Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
145 150 155 160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser
180

<210> 10
<211> 293
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 10

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15

Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe

50	55	60
Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser		
65	70	75
Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp		
	85	90
Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser		
	100	105
Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr		
	115	120
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val		
	130	135
Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu		
	145	150
Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn		
	165	170
Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg		
	180	185
Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu		
	195	200
Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile		
	210	215
Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu		
	225	230
Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly		

245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn
260 265 270

Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly
275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr
290

<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 11

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys
1 5 10 15

Asp His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg
20 25 30

Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys
35 40

<210> 12
<211> 242
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 12

Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn

20

25

30

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala
35 40 45

Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His
50 55 60

Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr
65 70 75 80

His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn
85 90 95

Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys
100 105 110

Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly
115 120 125

Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val
130 135 140

Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys
145 150 155 160

Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly
165 170 175

Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala
180 185 190

Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile
195 200 205

Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val

210	215	220
Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser		
225	230	235 240

Asp Phe

<210> 13
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 13

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ala Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
1 5 10 15

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 14

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
1 5 10 15

<210> 15
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<400> 15

Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp
1 5 10 15

Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser
20 25 30

Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln
35 40

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 16

Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn
1 5

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 17

Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
1 5 10 15

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe

20

25

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 18

Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly
1 5

<210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<400> 19

Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys
1 5 10 15

Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val
20 25

<210> 20
<211> 960
<212> DNA
<213> Homo sapien

<220>
<221> CDS
<222> (51)..(797)

<400> 20

attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc Met Ser 1	56
ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser 5 10 15	104
tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala 20 25 30	152
gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp 35 40 45 50	200
ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu 55 60 65	248
aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro 70 75 80	296
ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly 85 90 95	344
aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala 100 105 110	392
ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctc acc ttc tct ctg Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu 115 120 125 130	440
ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met 135 140 145	488
acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val 150 155 160	536
gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc	584

Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile
165 170 175

aag gag gaa gcc ttc ctg ggc atc act gat gag aag aca gaa ggg cag 632
Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln
180 185 190

ttt gtg gat ctg aca gga aat aga ctg acc tac aca aac tgg aac gag 680
Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu
195 200 205 210

ggg gaa ccc aac aat gct ggt tct gat gaa gat tgt gta ttg cta ctg 728
Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu
215 220 225

aaa aat ggc cag tgg aat gac gtc ccc tgc tcc acc tcc cat ctg gcc 776
Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His Leu Ala
230 235 240

gtc tgt gag ttc cct atc tga agggatcatat cactcaggcc ctccttgtct 827
Val Cys Glu Phe Pro Ile
245

ttttactgca acccacaggc ccacagtatg ctgaaaaga taaattatat caatttcctc 887

atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca 947

aagcaataat agt 960

<210> 21
<211> 248
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 21

Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala
1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys
20 25 30

Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly
35 40 45

Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln
50 55 60

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly
65 70 75 80

Asn Pro Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp
85 90 95

Pro Gly Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg
100 105 110

Lys Ala Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe
115 120 125

Ser Leu Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu
130 135 140

Ile Met Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala
145 150 155 160

Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn
165 170 175

Leu Ile Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu
180 185 190

Gly Gln Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp
195 200 205

Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu
210 215 220

Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His
225 230 235 240

Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile
245

<210>	22
<211>	6
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide consensus sequence

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Wherein X at position 1 represents hydroxyproline

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Wherein X at position 4 represents hydrophobic residue

```

<400> 22

Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro
1 5

<210>	23
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)

```

<223> Wherein X represents hydroxyproline

<400> 23

Xaa Gly Lys Leu Gly
1 5

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(15)

<223> Wherein X at positions 9 and 15 represents hydroxyproline

<400> 24

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly
1 5 10 15

<210> 25

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(27)

<223> Wherein X at positions 3, 6, 15, 21, 24, 27 represents hydroxyproline

<400> 25

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly
1 5 10 15

Lys Leu Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa
20 25

<210> 26
<211> 53
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic peptide

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Gly Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly
1 5 10 15

Gln Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa
 20 25 30

Gly Asn Xaa Gly Pro Ser Gly Ser Xaa Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly
 35 40 45

Asp Xaa Gly Lys Ser
 50

<210> 27
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic peptide

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(33)
 <223> Wherein X at positions 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 represents
 hydroxyproline

<400> 27

Gly Ala Xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly
 1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Xaa Gly Asp
 20 25 30

Xaa

<210> 28
 <211> 45
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(45)

<223> Wherein X at positions 3, 6, 9, 27, 30, 36, 42, 45 represents hydroxyproline

<400> 28

Gly	Cys	Xaa	Gly	Leu	Xaa	Gly	Ala	Xaa	Gly	Asp	Lys	Gly	Glu	Ala	Gly
1			5				10					15			

Thr	Asn	Gly	Lys	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly	Pro	Xaa	Gly	Pro	Xaa	Gly	Lys
		20					25					30			

Ala	Gly	Pro	Xaa	Gly	Pro	Asn	Gly	Ala	Xaa	Gly	Glu	Xaa
		35				40					45	

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 29

Leu	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Ile	Leu	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Ile	Lys	Ala
1			5				10					15			

Asn	Arg	Pro	Phe	Leu	Val	Phe	Ile
			20				

<210> 30

<211> 559

<212> DNA
<213> Homo sapien

<400> 30
atgaggctgc tgacctctct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggcccg 60

aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120

aatgaccagg agcggcgctg gacctgact gcaccccccg gctaccgctt gcgcctctac 180

ttcacccact tcgacctgga gctctccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240

tcggggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc 300

cctggcaagg acactttcta ctgctgggc tccagcctgg acattacatt ccgctccgac 360

tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420

gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg 480

ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540

tcagccctgt gctccggcc 559

<210> 31
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligo

<400> 31
cgggcacacc atgaggctgc tgacctctct gggc 34

<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 32

gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag

33

<210> 33

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 33

agcagccctg aatacccacg gccgtatccc aaa

33

<210> 34

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 34

cgggatccat gaggtgctg accctc

26

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 35

ggaattccta ggctgcata

19

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 36

ggaattccta cagggcgct

19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 37

ggaattccta gtagtggat

19

<210> 38

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 38

tgcggccgct gtagtgctg tcttt

25

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 39

ggaattcact cggtattctc gga

23

<210> 40
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligo

<400> 40
 tccgagaata acgagtg

17

<210> 41
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligo

<400> 41
 cattgaaagc tttggggtag aagttgttc

29

<210> 42
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligo

<400> 42
 cgcgcccgca gctgctcaga gtgtaga

27

<210> 43
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic oligo

<400> 43

cggtaaagctt cactggctca gggaata 28

<210> 44
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligo

<400> 44
aagaagcttg ccgccacat ggattggctg tggaact 37

<210> 45
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligo

<400> 45
cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 46
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic oligo

<400> 46
aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic oligo

<400> 47

cgggatcctt ctccctctaa cactct

26

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic peptide

<400> 48

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

1

5

<210> 49

<211> 4960

<212> DNA

<213> Homo Sapien

<400> 49

ccggacgtgg tggcgcagtc ctgtaatccc agctactcgg gagcctgagg caggagaatt 60

gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctacacctg taatcccagc actttgcgag 120

gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacaggga 180

gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaagg gataaaaaaa aaaaaagac 240

aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagtcttgga 300

agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt 360

tttttttttt tttaggttgg agtctcactc tgtcgtccag gctggagtgc agtgggtcga 420

tctcgatca ctgcaacctc cgctccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc 480

gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatTTTTgta ttttagtag 540

agatgggatt tcacatggt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccacc 600

accttggcct ccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gcaaaagcg 660

acttctaagc ctgaaggga atcggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta 720

agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg 780

gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttaa gaccagcctg accaacaatgg 840

agaaacccca tccctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa 900

tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc 960

agttagctat gattgcagca ctgcactgaa gccggggcaa cagaacaaga tcaaaaaaa 1020

agggagggtt gaggggcaga gccaggattt gttccaggc tgtgttacc taggtccgac 1080

tccttgctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcatg 1140

gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tcactggaca 1200

aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc 1260

acaccatgag gtaggtgggc gccacagcc tccctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg 1320

cctgggcctt caccgccctt gccctgccca taggtgctg accctcctgg gccttctgtg 1380

tggctcgtg gccacccctt tggggccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc 1440

atccccggc tttccagggt agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc 1500

acccccggc taccgcctgc gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct 1560

ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctggggtt tctcagggtc 1620

ggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680

ccaggaggga gatcaggcct gggctcttgcc ttacttcct gtgacacctg accccacagc 1740

tgagctcggg ggccaagtg ctggccacgc tgtcgggca ggagagcaca gacacggagc 1800

ggccccctgg caaggacact ttctactcgc tgggtccag cctggacatt accttcgct 1860

ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggtg 1920

agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980

ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccacctttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040

tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc 2100

tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160

ggccgggcgc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga 2220

tcatttgagg tcaggagtcc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280

aaaactacaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag 2340

gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca 2400

ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa 2460

acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag 2520

cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtcctgcag agaccaactg tgtgacctct 2580

ggcaagtggc tcaattttct tgcctcttag gaagctgctg caagggttca gcgtgtagc 2640

cccgcctt gggtttgatt gactccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg 2700

aaactccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcacttt ctcccagcgc tgctgggagc 2760

ttgcagcgac ctaggcctg taaggatgatt ggcccggcac cagtcccga ccctagacag 2820

gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcattggatc tcctgggagg agtccaggct 2880

ggatcccccc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctcccc cagacattga 2940

cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct 3000

gggcggtttc tactgtctct gccgcgagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060

ctcagccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120

ataccacagg ccgtatccca aactctccag ttgcatttac agcatcagcc tggaggaggg 3180

gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaaccct 3240

gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg 3300

gaagacattg cccacagga ttgaacaaa aagcaacag gtgaccatca cctttgtcac 3360

agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg 3420

cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct 3480

gaaagacagc ttctccatct tttcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540

cctgaaatcc ttactgcag ttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgccccg 3600

gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc agtggccgag tggagtacat 3660

cacaggctct ggagtgaaca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt 3720

ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780

ctccaaagga gaaaaatcac tcccagctcg tgagcctgtt tgtggactat cagccccgac 3840

aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaacct ggtgattttc cttggcaagt 3900

cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac 3960

agctgtcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc gccctggaca ttcgaatggg 4020

caccctgaaa agactatcac ctctattatcac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca 4080

tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gcactgatta aattgaataa 4140

caaagtgtga atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc 4200

ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaaccc aaaggggttt 4260

tcttgctaga aatctaattg atgtcgacat accgattgtt gaccatcaa aatgtactgc 4320

tgcataatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgttaact gctaacaatgc tttgtgctgg 4380

cttagaaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tgggttttct 4440

agatagttaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctgggggtt ccatgaattg 4500

tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatatc cctggatcga 4560

gaacataatt agtgattttt aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc atttttagaa 4620

atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca 4680

tggcagttgt tgctccacc aaaaaaacag actccaggtg aggtgctgtt catttctcca 4740

cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga 4800

cagtcattct tgcccacca gtgtaatgtc actgctcaa ttacatttca ttacctaaa 4860

aagccagtct cttttcatc ttggtgttgg catttctgta aatgcctgt ccatgctctt 4920

tgtttttaaa cttgttctta ttgaaaaaa aaaaaaaaaa 4960

<210> 50
 <211> 2090
 <212> DNA
 <213> Murine MASP-2 CDS

<220>

<221> CDS
<222> (33)..(2090)

<400> 50

ggcgctggac tgcagagcta tgggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg 53
Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu
1 5

ggt ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct 101
Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro
10 15 20

gaa cct gta ttc ggg cgc ctg gtg tcc cct ggc ttc cca gag aag tat 149
Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr
25 30 35

gct gac cat caa gat cga tcc tgg aca ctg act gca ccc cct ggc tac 197
Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr
40 45 50 55

cgc ctg cgc ctc tac ttc acc cac ttt gac ctg gaa ctc tct tac cgc 245
Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg
60 65 70

tgc gag tat gac ttt gtc aag ttg agc tca ggg acc aag gtg ctg gcc 293
Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala
75 80 85

aca ctg tgt ggg cag gag agt aca gac act gag cag gca cct ggc aat 341
Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn
90 95 100

gac acc ttc tac tca ctg ggt ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc 389
Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser
105 110 115

gac tac tcc aat gag aag ccg ttc aca ggg ttt gag gcc ttc tat gca 437
Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala
120 125 130 135

gcg gag gat gtg gat gaa tgc aga gtg tct ctg gga gac tca gtc cct 485
Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro
140 145 150

tgt gac cat tat tgc cac aac tac ttg ggc ggc tac tat tgc tcc tgc 533

Cys	Asp	His	Tyr	Cys	His	Asn	Tyr	Leu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Cys		
155								160				165					
aga	gcg	ggc	tac	att	ctc	cac	cag	aac	aag	cac	acg	tgc	tca	gcc	ctt	581	
Arg	Ala	Gly	Tyr	Ile	Leu	His	Gln	Asn	Lys	His	Thr	Cys	Ser	Ala	Leu		
170								175				180					
tgt	tca	ggc	cag	gtg	ttc	aca	gga	aga	tct	ggg	tat	ctc	agt	agc	cct	629	
Cys	Ser	Gly	Gln	Val	Phe	Thr	Gly	Arg	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ser	Ser	Pro		
185								190				195					
gag	tac	ccg	cag	cca	tac	ccc	aag	ctc	tcc	agc	tgc	acc	tac	agc	atc	677	
Glu	Tyr	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Lys	Leu	Ser	Ser	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile		
200								205				210				215	
cgc	ctg	gag	gac	ggc	ttc	agt	gtc	atc	ctg	gac	ttc	gtg	gag	tcc	ttc	725	
Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Phe	Ser	Val	Ile	Leu	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Phe		
				220								225				230	
gat	gtg	gag	acg	cac	cct	gaa	gcc	cag	tgc	ccc	tat	gac	tcc	ctc	aag	773	
Asp	Val	Glu	Thr	His	Pro	Glu	Ala	Gln	Cys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Lys		
				235								240				245	
att	caa	aca	gac	aag	ggg	gaa	cac	ggc	cca	ttt	tgt	ggg	aag	acg	ctg	821	
Ile	Gln	Thr	Asp	Lys	Gly	Glu	His	Gly	Pro	Phe	Cys	Gly	Lys	Thr	Leu		
250								255								260	
cct	ccc	agg	att	gaa	act	gac	agc	cac	aag	gtg	acc	atc	acc	ttt	gcc	869	
Pro	Pro	Arg	Ile	Glu	Thr	Asp	Ser	His	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Phe	Ala		
265								270								275	
act	gac	gag	tcg	ggg	aac	cac	aca	ggc	tgg	aag	ata	cac	tac	aca	agc	917	
Thr	Asp	Glu	Ser	Gly	Asn	His	Thr	Gly	Trp	Lys	Ile	His	Tyr	Thr	Ser		
280								285								290	
aca	gca	cgg	ccc	tgc	cct	gat	cca	acg	gcg	cca	cct	aat	ggc	agc	att	965	
Thr	Ala	Arg	Pro	Cys	Pro	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Asn	Gly	Ser	Ile		
				300								305				310	
tca	cct	gtg	caa	gcc	acg	tat	gtc	ctg	aag	gac	agg	ttt	tct	gtc	ttc	1013	
Ser	Pro	Val	Gln	Ala	Thr	Tyr	Val	Leu	Lys	Asp	Arg	Phe	Ser	Val	Phe		
				315								320				325	
tgc	aag	aca	ggc	ttc	gag	ctt	ctg	caa	ggt	tct	gtc	ccc	ctg	aaa	tca	1061	
Cys	Lys	Thr	Gly	Phe	Glu	Leu	Leu	Gln	Gly	Ser	Val	Pro	Leu	Lys	Ser		

330	335	340	
ttc act gct gtc tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg ccg atg cca			1109
Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro			
345	350	355	
gag tgc agc att att gat tgt ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc			1157
Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly			
360	365	370	375
cat gtg gac tat atc aca ggc cct caa gtg act acc tac aaa gct gtg			1205
His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val			
	380	385	390
att cag tac agc tgt gaa gag act ttc tac aca atg agc agc aat ggt			1253
Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly			
	395	400	405
aaa tat gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa			1301
Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu			
410	415	420	
aaa ctc ccc ccg gtt tgt gag cct gtt tgt ggg ctg tcc aca cac act			1349
Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr			
425	430	435	
ata gga gga cgc ata gtt gga ggg cag cct gca aag cct ggt gac ttt			1397
Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe			
440	445	450	455
cct tgg caa gtc ttg ttg ctg ggt caa act aca gca gca gca ggt gca			1445
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala			
	460	465	470
ctt ata cat gac aat tgg gtc cta aca gcc gct cat gct gta tat gag			1493
Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu			
	475	480	485
aaa aga atg gca gcg tcc tcc ctg aac atc cga atg ggc atc ctc aaa			1541
Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys			
490	495	500	
agg ctc tca cct cat tac act caa gcc tgg ccc gag gaa atc ttt ata			1589
Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile			

505	510	515	
cat gaa ggc tac act cac ggt gct ggt ttt gac aat gat ata gca ttg			1637
His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu			
520	525	530	535
att aaa ctc aag aac aaa gtc aca atc aac gga agc atc atg cct gtt			1685
Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val			
	540	545	550
tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act			1733
Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr			
	555	560	565
gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga			1781
Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg			
	570	575	580
aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc			1829
Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr			
	585	590	595
acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg			1877
Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met			
600	605	610	615
ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac			1925
Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp			
	620	625	630
agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt			1973
Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe			
	635	640	645
gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc			2021
Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly			
	650	655	660
cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag			2069
Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu			
	665	670	675
aac ata ata agt aat ttc taa			2090
Asn Ile Ile Ser Asn Phe			

680

685

<210> 51
 <211> 685
 <212> PRT
 <213> Murine MASP-2 CDS

<400> 51

Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr
 1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser
 20 25 30

Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
 35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
 50 55 60

Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
 85 90 95

Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser
 100 105 110

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
 115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val
 130 135 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu
145 150 155 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn
165 170 175

Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg
180 185 190

Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu
195 200 205

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly
245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His
260 265 270

Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly
275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr
290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu
305 310 315 320

Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln
325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly

340

345

350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro
355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln
370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe
405 410 415

Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val
420 425 430

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln
435 440 445

Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln
450 455 460

Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr
465 470 475 480

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn
485 490 495

Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala
500 505 510

Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly
515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile

530	535	540
Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser		
545	550	555 560
Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr		
	565	570 575
Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile		
	580	585 590
Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly		
	595	600 605
Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly		
	610	615 620
Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp		
625	630	635 640
Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser		
	645	650 655
Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile		
	660	665 670
Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe		
	675	680 685
<210> 52		
<211> 670		
<212> PRT		
<213> Murine MASP-2 mature protein		
<400> 52		
Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val		
1	5	10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
85 90 95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
115 120 125

Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
130 135 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln
145 150 155 160

Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly
165 170 175

Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys
180 185 190

Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val
195 200 205

Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala
210 215 220

Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His
225 230 235 240

Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser
245 250 255

His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr
260 265 270

Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro
275 280 285

Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val
290 295 300

Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu
305 310 315 320

Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp
325 330 335

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly
340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro
355 360 365

Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
370 375 380

Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly
385 390 395 400

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro
405 410 415

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly
420 425 430

Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly
435 440 445

Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu
450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu
465 470 475 480

Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln
485 490 495

Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala
500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr
515 520 525

Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala
530 535 540

Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu
545 550 555 560

Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro
565 570 575

Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro
580 585 590

Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly
595 600 605

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
610 615 620

Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
625 630 635 640

Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
645 650 655

Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe
660 665 670

<210> 53
<211> 2091
<212> DNA
<213> Rat MASP-2 CDS

<220>
<221> CDS
<222> (10)..(2067)

<400> 53
tggcacaca atg agg cta ctg atc gtc ctg ggt ctg ctt tgg agt ttg gtg 51
Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val
1 5 10

gcc aca ctt ttg ggc tcc aag tgg cct gag cct gta ttc ggg cgc ctg 99
Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
15 20 25 30

gtg tcc ctg gcc ttc cca gag aag tat ggc aac cat cag gat cga tcc 147
Val Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser
35 40 45

tgg acg ctg act gca ccc cct ggc ttc cgc ctg cgc ctc tac ttc acc 195
Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr
50 55 60

cac ttc aac ctg gaa ctc tct tac cgc tgc gag tat gac ttt gtc aag His Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys 65 70 75	243
ttg acc tca ggg acc aag gtg cta gcc acg ctg tgt ggg cag gag agt Leu Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser 80 85 90	291
aca gat act gag cgg gca cct ggc aat gac acc ttc tac tca ctg ggt Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly 95 100 105 110	339
ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc gac tac tcc aat gag aag cca Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro 115 120 125	387
ttc aca gga ttt gag gcc ttc tat gca gcg gag gat gtg gat gaa tgc Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys 130 135 140	435
aga aca tcc ctg gga gac tca gtc cct tgt gac cat tat tgc cac aac Arg Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn 145 150 155	483
tac ctg ggc ggc tac tac tgc tcc tgc cga gtg ggc tac att ctg cac Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His 160 165 170	531
cag aac aag cat acc tgc tca gcc ctt tgt tca ggc cag gtg ttc act Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr 175 180 185 190	579
ggg agg tct ggc ttt ctc agt agc cct gag tac cca cag cca tac ccc Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro 195 200 205	627
aaa ctc tcc agc tgc gcc tac aac atc cgc ctg gag gaa ggc ttc agt Lys Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser 210 215 220	675
atc acc ctg gac ttc gtg gag tcc ttt gat gtg gag atg cac cct gaa Ile Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu 225 230 235	723

gcc cag tgc ccc tac gac tcc ctc aag att caa aca gac aag agg gaa Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu 240 245 250	771
tac ggc ccg ttt tgt ggg aag acg ctg ccc ccc agg att gaa act gac Tyr Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp 255 260 265 270	819
agc aac aag gtg acc att acc ttt acc acc gac gag tca ggg aac cac Ser Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His 275 280 285	867
aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc aca gca cag ccc tgc cct gat Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp 290 295 300	915
cca acg gcg cca cct aat ggt cac att tca cct gtg caa gcc acg tat Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr 305 310 315	963
gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt Val Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu 320 325 330	1011
ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aag tca ttc act gct gtc tgt cag aaa Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys 335 340 345 350	1059
gat gga tct tgg gac cgg ccg ata cca gag tgc agc att att gac tgt Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys 355 360 365	1107
ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc cac gtg gac tat atc aca ggc Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly 370 375 380	1155
cct gaa gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac agc tgt gaa gag Pro Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu 385 390 395	1203
act ttc tac aca atg agc agc aat ggt aaa tat gtg tgt gag gct gat Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp 400 405 410	1251

gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tcc ctc ccg gtt tgc aag Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys 415 420 425 430	1299
cct gtc tgt gga ctg tcc aca cac act tca gga ggc cgt ata att gga Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly 435 440 445	1347
gga cag cct gca aag cct ggt gac ttt cct tgg caa gtc ttg tta ctg Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu 450 455 460	1395
ggt gaa act aca gca gca ggt gct ctt ata cat gac gac tgg gtc cta Gly Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu 465 470 475	1443
aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu 480 485 490	1491
gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln 495 500 505 510	1539
gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala 515 520 525	1587
ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr 530 535 540	1635
atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala 545 550 555	1683
tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu 560 565 570	1731
acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro 575 580 585 590	1779

att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac 1827
Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr
595 600 605

cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc 1875
Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg
610 615 620

ggc ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggc gca tta gtg ttt 1923
Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
625 630 635

cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg 1971
Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
640 645 650

ggc tct att aac tgt ggc ggc tca gaa cag tat ggc gtc tac acg aaa 2019
Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
655 660 665 670

gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa 2067
Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
675 680 685

tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2091

<210> 54

<211> 685

<212> PRT

<213> Rat MASP-2 CDS

<400> 54

Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr
1 5 10 15

Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser
20 25 30

Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr

35	40	45
Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe		
50	55	60
Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr		
65	70	75
Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp		
85	90	95
Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser		
100	105	110
Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr		
115	120	125
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr		
130	135	140
Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu		
145	150	155
Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn		
165	170	175
Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg		
180	185	190
Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu		
195	200	205
Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr		
210	215	220
Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln		

225	230	235	240
Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly			
	245	250	255
Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser Asn			
	260	265	270
Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly			
	275	280	285
Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr			
	290	295	300
Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu			
305	310	315	320
Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln			
	325	330	335
Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly			
	340	345	350
Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro			
	355	360	365
Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu			
	370	375	380
Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe			
385	390	395	400
Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe			
	405	410	415
Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro Val			
	420	425	430

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln
435 440 445

Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Glu
450 455 460

Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala
465 470 475 480

Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile
485 490 495

Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala Trp
500 505 510

Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe
515 520 525

Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn
530 535 540

Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu
545 550 555 560

Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln
565 570 575

Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Val
580 585 590

Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro Gly
595 600 605

Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly
610 615 620

Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp
625 630 635 640

Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser
645 650 655

Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr
660 665 670

Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
675 680 685

<210> 55
<211> 670
<212> PRT
<213> Rat MASP-2 mature protein

<400> 55

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val
1 5 10 15

Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp
20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
35 40 45

Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
85 90 95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
115 120 125

Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
130 135 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln
145 150 155 160

Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly
165 170 175

Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys
180 185 190

Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile
195 200 205

Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala
210 215 220

Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr
225 230 235 240

Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser
245 250 255

Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr
260 265 270

Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro
275 280 285

Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val
290 295 300

Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu
305 310 315 320

Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp
325 330 335

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly
340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro
355 360 365

Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
370 375 380

Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly
385 390 395 400

Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro
405 410 415

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly
420 425 430

Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly
435 440 445

Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr
450 455 460

Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp
465 470 475 480

Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala
485 490 495

Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly
500 505 510

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile
515 520 525

Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser
530 535 540

Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
545 550 555 560

Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile
565 570 575

Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro
580 585 590

Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly
595 600 605

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
610 615 620

Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
625 630 635 640

Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
645 650 655

Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
660 665 670

<210> 56

<211> 28

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo Sapien MASP-2 PCR primer

<400> 56
atgaggctgc tgaccctcct gggccttc 28

<210> 57
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo Sapien MASP-2 PCR primer

<400> 57
gtgcccctcc tgcgtcacct ctg 23

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo Sapien MASP-2 PCR primer

<400> 58
cagaggtgac gcaggagggg cac 23

<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Homo Sapien MASP-2 PCR primer

<400> 59
ttaaatcac taattatggt ctcgatc 27

<210> 60
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Murine MASP-2 PCR primer

<400> 60
 atgaggctac tcattcttct gg 22

<210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Murine MASP-2 PCR primer

<400> 61
 ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23

<210> 62
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Murine MASP-2 PCR primer

<400> 62
 cccccctgc gtcacctctg cag 23

<210> 63
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Murine MASP-2 PCR primer

<400> 63
ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29

<210> 64
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide from rat MASP-2

<400> 64
gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt 29

<210> 65
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide from rat MASP-2

<400> 65
ctagaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca 37