



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0104201
(43) 공개일자 2022년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 37/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/40 (2013.01)
A61P 11/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-7020672
(22) 출원일자(국제) 2020년11월24일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년06월17일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/062082
(87) 국제공개번호 WO 2021/108447
국제공개일자 2021년06월03일
(30) 우선권주장
62/940,720 2019년11월26일 미국(US)
62/940,735 2019년11월26일 미국(US)

(71) 출원인
오메로스 코퍼레이션
미국, 워싱턴 98119, 시애틀, 201 엘리엇 애버뉴
웨스트
(72) 발명자
데모폴로스 그레고리 에이.
미국 워싱턴 98119 시애틀 엘리엇 애버뉴 웨스트
201
두들러 토마스 에이.
미국 워싱턴 98119 시애틀 엘리엇 애버뉴 웨스트
201
(74) 대리인
특허법인와이에스장

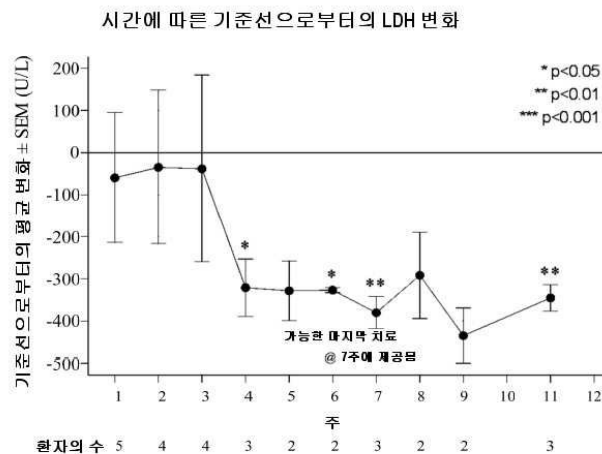
전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 발명의 명칭 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 특발성 폐렴 증후군 (IPS) 및/또는 모세혈관 누출 증후군 (CLS) 및/또는 생착 증후군 (ES) 및/또는 체액 과부하 (FO)를 치료 및/또는 예방하는 방법

(57) 요약

한 측면으로, 발명은 HSCT-IPS를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 및/또는 HSCT-CLS를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 및/또는 HSCT-FO를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 및/또는 HSCT-ES를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 인간 대상체에서 MASP-2-의존성 보체 활성화의 효과를 억제하는 방법을 제공한다. 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제제를 그것을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

대표도



도 59

(52) CPC특허분류

A61P 37/06 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/54 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/90 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

조혈 줄기 세포 이식 후에 특발성 폐렴 증후군 (HSCT-IPS)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법으로서, MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 데 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이팩터 기능이 감소된 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC₅₀으로 C3b 침착을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 방법은 대상체에게 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 단계 전에 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT-IPS) 후에 특발성 폐렴 증후군을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 대상체는 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 대상체는 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 대상체는 미만성 폐포 출혈 (DAH)이 없는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67을 포함하는 중쇄 가변 영역 및

SEQ ID NO:70을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 4 mg/kg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 1회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 4 mg/kg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 2회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 370 mg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 1회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 370 mg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 2회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

조혈 줄기 세포 이식 후 모세혈관 누출 증후군 (HSCT-CLS)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법으로서, MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 데 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제17항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제17항에 있어서, 방법은 대상체에게 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 단계 전에 조혈 줄기 세포 이식 후 모세혈관 누출 증후군 (HSCT-CLS)을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제17항에 있어서, 대상체는 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제17항에 있어서, 대상체는 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제17항에 있어서, 대상체는 정맥 폐색성 질환 (VOD)이 없는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제17항에 있어서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제17항에 있어서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제17항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 4 mg/kg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 1회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 4 mg/kg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 2회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

제17항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 370 mg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 1회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 370 mg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 2회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

조혈 줄기 세포 이식 후 체액 과부하 (HSCT-FO)를 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법으로서, MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 데 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메릭 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제33항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제33항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제33항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제33항에 있어서, 방법은 대상체에게 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 단계 전에 조혈 줄기 세포 이식 후 체액 과부하 (HSCT-F0)를 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제33항에 있어서, 대상체는 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

제33항에 있어서, 대상체는 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 42

제33항에 있어서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 43

제33항에 있어서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 44

제33항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 4 mg/kg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 1회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 4 mg/kg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 2회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 46

제33항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 370 mg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 1회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 370 mg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 2회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 48

조혈 줄기 세포 이식 후 생착 증후군 (HSCT-ES)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법으로서, MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 데 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 50

제48항에 있어서, 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 51

제48항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 52

제48항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 53

제48항에 있어서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 54

제48항에 있어서, 방법은 대상체에게 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 단계 전에 조혈 줄기 세포 이식 후 생착 증후군 (HSCT-ES)을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 55

제48항에 있어서, 대상체는 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 56

제48항에 있어서, 대상체는 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 57

제48항에 있어서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 58

제48항에 있어서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 59

제48항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 4 mg/kg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 1회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 4 mg/kg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 2회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 61

제48항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 370 mg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 1회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 방법은 대상체에게 약 370 mg의 투여량을 가지는 상기 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 적어도 4주의 치료 기간 동안 적어도 매주 2회 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 2019년 11월 26일에 출원된 미국 가출원 번호 62/940,720호, 및 2019년 11월 26일에 출원된 미국 가출원 번호 62/940,735호의 이익을 주장하며, 상기 출원들은 그 전문이 참조로 본원에 포함된다.

[0003] 서열 목록에 관한 진술

[0004] 본 출원과 관련된 서열 목록은 종이 사본 대신 텍스트 파일형식으로 제공되며 명세서에 참조됨으로써 본원에 포함된다. 서열 목록이 들어 있는 텍스트 파일의 명칭은 MP_1_0307_PCT_Sequence_Listing_20201120_ST25.txt이고; 파일은 115 KB이며; 2020년 11월 20일에 생성되었고; 명세서의 출원과 함께 EFS-웹을 통해 제출되었다.

배경 기술

[0005] 보체 시스템은 인간 및 기타 척추동물에서 미생물 감염 및 다른 급성 손상에 대한 면역 반응을 개시하고, 증폭시키고 조정하기 위한 조기 작용 메커니즘을 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 활성화가 잠재적 병원체에 대한 가치 있는 제일선 방어를 제공하지만, 보호 면역 반응을 촉진하는 보체의 활성화는 또한 숙주에게 잠재적 위협을 나타낼 수 있다 (K.R. Kalli, et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 15:417-431, 1994; B.P. Morgan, *Eur. J. Clinical Invest.* 24:219-228, 1994). 예를 들어, C3 및 C5 단백질 분해 생성물은 호중구를 모집하여 활성화한다. 숙주 방어를 위해서는 없어서는 안 될 것이지만, 활성화된 호중구는 파괴적 효소의 방출에 있어 무차별적이고 장기 손상을 유발할 수 있다. 더불어, 보체 활성화는 인접한 숙주 세포뿐만 아니라 미생물 표적에서 용해성 보체 구성요소의 침착을 유발하여 숙주 세포 용해를 초래할 수 있다.

[0006] 보체 시스템은 또한: 심근 경색(myocardial infarction), 뇌졸중(stroke), ARDS, 재관류 손상(reperfusion injury), 패혈성 쇼크(septic shock), 열 화상 후 모세혈관 누출(capillary leakage following thermal burns), 심폐 우회후 염증(postcardiopulmonary bypass inflammation), 이식 거부반응(transplant rejection), 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 중증 근무력증(myasthenia gravis), 및 알츠하이머병(Alzheimer's disease)을 포함한 수많은 급성 및 만성 질환 상태의 발병에 연루되었다. 거의 모든 이들 상태에서, 보체는 원인은 아니지만 발병에 관여하는 여러 인자 중 하나이다. 그럼에도 불구하고, 보체 활성화는 주요 병리적 메커니즘일 수 있고 이들 질환 상태 중 많은 것에서 임상 제어를 위한 효과적인 지점을 나타낸다. 다양한 질환 상태에서 보체-매개 조직 손상의 중요성에 대한 점점 커지는 인식은 효과적인 보체 억제 약물에 대한 필요성을 강조한다. 지금까지, C5에 대한 항체인 에쿨리주맙(eculizumab) (Solaris®)이 인간에 사용되도록 승인된 유일한 보체-표적화 약물이다. 그러나 아직까지, C5는 보체 시스템의 "하류"에 위치한 여러 이펙터 분자 중 하나이며, C5의 봉쇄는 보체 시스템의 활성화를 억제하지 못한다. 그러므로, 보체 활성화의 개시 단계의 억제제가 "하류" 보체 억제제를 뛰어넘는 상당한 장점을 가질 것이다.

- [0007] 현재, 보체 시스템은 3가지의 구별되는 경로: 고전적 경로, 렉틴 경로, 및 대체 경로를 통해 활성화될 수 있는 것으로 널리 받아들여진다. 고전적 경로는 일반적으로 외래 입자 (즉, 항원)에 결합된 숙주 항체로 구성된 복합체에 의해 촉발되며 그로써 특정 항체 반응의 생성을 위해 항원에 대한 사전 노출을 필요로 한다. 고전적 경로의 활성화는 숙주에 의한 사전 적응 면역 반응에 의존적이기 때문에, 고전적 경로는 후천성 면역 체계의 일부본이다. 대조적으로, 렉틴 및 대체 경로는 둘 다 적응 면역에 무관하며 선천성 면역 체계의 일부본이다.
- [0008] 보체 시스템의 활성화는 세린 프로테아제 지모겐의 순차적인 활성화를 초래한다. 고전적 경로의 활성화의 제1 단계는 특정 인식 분자, C1q의 항원 결합 IgG 및 IgM 분자에의 결합이다. C1q는 C1로 불리는 복합체로서 C1r 및 C1s 세린 프로테아제 전구효소(proenzymes)와 회합된다. 면역 복합체에 C1q가 결합될 때, C1r의 Arg-Ile 부위의 자가단백분해성 절단이 일어나고 이어서 C1r-매개 절단 및 C1s의 활성화가 일어나며, 그로써 C4 및 C2를 절단하는 능력을 획득하게 된다. C4는 C4a 및 C4b로 지정된 2개의 단편으로 절단되며, 유사하게, C2는 C2a 및 C2b로 절단된다. C4b 단편은 인접한 하이드록실 또는 아미노 기와 공유 결합을 형성할 수 있어서 활성화된 C2의 C2a 단편과의 비공유 상호작용을 통해 C3 전환효소 (C4b2a)를 생성한다.
- [0009] C3 전환효소 (C4b2a)는 C3을 C3a 및 C3b 하위구성요소로 단백질 분해성 절단함으로써 활성화하여 C5 전환효소 (C4b2a3b)의 생성을 유도하고, 그것은, C5 절단에 의해 세포 용해를 유도하는 세포막을 파괴할 수 있는 막 공격 복합체 (C6, C7, C8 및 C-9와 조합된 C5b, 또한 "MAC"로서 언급됨)의 형성으로 이어진다. C3 및 C4 (C3b 및 C4b)의 활성화된 형태는 외래 표적 표면 상에 공유적으로 침착되고, 다중 식세포 상의 보체 수용체에 의해 인식된다.
- [0010] 독립적으로, 렉틴 경로를 통한 보체 시스템의 활성화의 제1 단계는 또한 특정 인식 분자의 결합과, 이어서 관련된 세린 프로테아제 전구효소의 활성화이다. 그러나, C1q에 의한 면역 복합체의 결합보다는 오히려, 렉틴 경로의 인식 분자는 종합적으로 렉틴으로서 언급된 탄수화물-결합 단백질 (만난-결합 렉틴 (MBL), H-피콜린, M-피콜린, L-피콜린 및 C-유형 렉틴 CL-11)의 그룹을 포함한다. J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400, (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000)) 참고. 또한 J. Luet et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:387-400 (2002); Holmskov et al., *Annu Rev Immunol* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000); Hansen et al., *J. Immunol* 185(10):6096-6104 (2010) 참고.
- [0011] Ikeda 등은 처음, C1q와 같이, MBL이 효모 만난-코팅 적혈구에 결합시 C4-의존성 방식으로 보체 시스템을 활성화할 수 있음을 입증하였다 (Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, (1987)). 콜렉틴 단백질 패밀리의 구성원인 MBL은 피라노스 고리의 적도면에 배향된 3- 및 4-하이드록시기를 가진 탄수화물에 결합하는 칼슘-의존성 렉틴이다. MBL에 중요한 리간드는 그러므로 D-만노스 및 N-아세틸-D-글루코사민인 한편, 이런 입체적 요건에 맞지 않는 탄수화물은 MBL에 대해 검출할 수 없는 친화도를 가진다 (Weis et al., *Nature* 360:127-134, (1992)). MBL과 일가 당 사이의 상호작용은 극히 약하며, 해리 상수는 전형적으로 한 자리 밀리몰 범위이다. MBL은 결합력에 의해, 즉, 서로 매우 근접하게 위치한 다중 당단 잔기와 동시에 상호작용함으로써 글리칸 리간드에 단단하고 특이적인 결합을 이룬다 (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, (1992)). MBL은 일반적으로 박테리아, 효모, 기생충 및 특정 바이러스와 같은 미생물을 장식하는 탄수화물 패턴을 인식한다. 대조적으로, MBL은 보통 포유류 플라즈마 및 세포 표면 당단백질 상에 존재하는 "성숙한" 복합체 당곤주게이트를 장식하는 끝에서 두 번째 및 최종 당인 D-갈락토스 및 시알산을 인식하지 못한다. 이런 결합 특이성은 "외래" 표면의 인식을 촉진하고 "자기 활성화"로부터 보호하는 것을 돕는 것으로 여겨진다. 그러나, MBL은 포유류 세포의 소포체 및 골지에 격리된 N-결합 당단백질 및 당지질 상의 고-만노스 "전구체" 글리칸의 클러스터와 높은 친화도로 결합한다 (Maynard et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794, (1982)). 그러므로, 손상된 세포는 MBL 결합을 통한 렉틴 경로 활성화의 잠재적 표적이다.
- [0012] 피콜린은 피브리노겐-유사 도메인으로 불리는, MBL과 상이한 유형의 렉틴 도메인을 가지고 있다. 피콜린은 Ca^{++} -무관한 방식으로 당 잔기에 결합한다. 인간에서, 3 종류의 피콜린 (L-피콜린, M-피콜린 및 H-피콜린)이 확인되었다. 2개의 혈청 피콜린인 L-피콜린 및 H-피콜린은 일반적으로 N-아세틸-D-글루코사민에 대해 특이성을 가지고 있다; 그러나, H-피콜린 또한 N-아세틸-D-글루코사민에 결합한다. L-피콜린, H-피콜린, CL-11, 및 MBL의 당 특이성의 차이는 상이한 렉틴이 상보하고, 비록 중복되지만, 상이한 당곤주게이트를 표적으로 하는 것을 의미한다. 이런 개념은 렉틴 경로의 공지된 렉틴 중에서, L-피콜린만이 모든 그람 양성균에서 발견된 세포벽 당곤주게이트인 리포테이코산에 특이적으로 결합한다는 최근 보고에 의해 지지된다 (Lynch et al., *J. Immunol.* 172:1198-1202, (2004)). 콜렉틴 (즉, MBL) 및 피콜린은 아미노산 서열에서 유의한 유사성을 갖고 있지 않다.

그러나, 단백질의 두 그룹은 유사한 도메인 조직화를 가지며, C1q와 같이, 올리고머 구조로 조립되어 다중부위 결합의 가능성이 최대화된다고 한다.

- [0013] MBL의 혈청 농도는 건강한 집단에서 매우 가변적이고 이것은 MBL 유전자의 프로모터 및 코딩 영역 둘 다에서의 다형성/돌연변이에 의해 유전적으로 제어된다. 급성 단계 단백질로서, MBL의 발현은 추가로 염증 중에 상향 조절된다. L-피콜린은 혈청에 MBL의 농도와 유사한 농도로 존재한다. 그러므로, 렉틴 경로의 L-피콜린 분지는 잠재적으로 MBL 팔(arm)과 강도가 비슷하다. MBL 및 피콜린은 또한 옹소닌으로서 작용할 수 있어서, 식세포가 MBL- 및 피콜린-장식된 표면을 표적으로 하는 것을 허용한다 (Jack et al., *J Leukoc Biol.*, 77(3):328-36 (2004), Matsushita and Fujita, *Immunobiology*, 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., *J Immunol*, 174(1):418-25(2005) 참고). 이런 옹소닌화는 이들 단백질과 식세포 수용체와의 상호작용을 필요로 하지만 (Kuhlman et al., *J. Exp. Med.* 169:1733, (1989); Matsushita et al., *J. Biol. Chem.* 271:2448-54, (1996)), 그것의 실체는 아직 확립되지 않았다.
- [0014] 인간 MBL은 그것의 콜라겐 유사 도메인을 통해서 독특한 C1r/C1s-유사 세린 프로테아제와, MBL-결합 세린 프로테아제 (MASP)로 명명되는, 특이적이고 고-친화도 상호작용을 형성한다. 현재까지, 3개의 MASP가 기술되었다. 첫째, 단일 효소 "MASP"가 보체 캐스케이드의 개시 (즉, C2 및 C4 절단)를 담당하는 효소로서 확인되고 특성화되었다 (Matsushita et al., *J Exp Med* 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., *J. Immunol.* 150:571-578, (1993)). 계속해서 MASP 활성은, 실제로, 2개 프로테아제: MASP-1 및 MASP-2의 혼합인 것으로 측정되었다 (Thiel et al., *Nature* 386:506-510, (1997)). 그러나, MBL-MASP-2 복합체 단독이 보체 활성화에 충분한 것으로 입증되었다 (Vorup-Jensen et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100, (2000)). 나아가, MASP-2만이 C2 및 C4를 고속으로 절단하였다 (Ambrus et al., *J. Immunol.* 170:1374-1382, (2003)). 그러므로, MASP-2는 C4 및 C2를 활성화하여 C3 전환효소, C4b2a를 생성하는 것을 담당하는 프로테아제이다. 이것이 고전적 경로의 C1 복합체로부터의 유익한 차이이며, 여기서 2개의 특정 세린 프로테아제 (C1r 및 C1s)의 협응 작용은 보체 시스템의 활성화로 이어진다. 더불어, 세 번째 신규한 프로테아제인 MASP-3이 분리되었다 (Dahl, M.R., et al., *Immunity* 15:127-35, 2001). MASP-1 및 MASP-3은 동일한 유전자의 대체 스플라이싱된 생성물이다.
- [0015] MASP는 동일한 도메인 조직화를 C1 복합체의 효소 구성요소인 C1r 및 C1s의 그것과 공유한다 (Sim et al., *Biochem. Soc. Trans.* 28:545, (2000)). 이들 도메인은 N-말단 C1r/C1s/성체 VEGF/뿔 형성 단백질 (CUB) 도메인, 표피 성장 인자-유사 도메인, 제2 CUB 도메인, 보체 제어 단백질 도메인의 탠덤, 및 세린 프로테아제 도메인을 포함한다. C1 프로테아제에서처럼, MASP-2의 활성화는 세린 프로테아제 도메인에 인접한 Arg-Ile 결합의 절단을 통해 일어나며, 그것은 효소를 다이설파이드-연결된 A 및 B 사슬로 나누고, 후자는 세린 프로테아제 도메인으로 이루어진다.
- [0016] MBL은 또한 MASP2의 촉매적 활성이 결핍된 19 kDa의 MBL-결합 단백질 (MAp19) 또는 작은 MBL-결합 단백질 (sMAP)로서 알려져 있는 MASP-2의 대체 스플라이싱 형태와 결합할 수 있다 (Stover, *J. Immunol.* 162:3481-90, (1999); Takahashi et al., *Int. Immunol.* 11:859-863, (1999)). MAp19는 MASP-2의 처음 2개의 도메인과, 이어서 4개의 독특한 아미노산의 엑스트라 서열을 포함한다. MAp19의 기능은 분명하지 않다 (Degn et al., *J Immunol. Methods*, 2011). MASP-1 및 MASP-2 유전자는 각각 인간 염색체 3 및 1에 위치한다 (Schwaebler et al., *Immunobiology* 205:455-466, (2002)).
- [0017] 여러 라인의 증거가 상이한 MBL-MASP 복합체가 있고 혈청 중의 MASP의 큰 분율이 MBL과 복합체를 형성하지 않는 것을 시사한다 (Thiel, et al., *J. Immunol.* 165:878-887, (2000)). H- 및 L-피콜린은 둘 다 모든 MASP에 결합하며 MBL처럼 렉틴 보체 경로를 활성화한다 (Dahl et al., *Immunity* 15:127-35, (2001); Matsushita et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, (2002)). 렉틴 및 고전적 경로는 둘 다 공통 C3 전환효소 (C4b2a)를 형성하며 이 단계에서 두 경로는 수렴된다.
- [0018] 렉틴 경로는 나이브(naive) 숙주에서 감염에 대한 숙주 방어에서 중요한 역할을 하는 것으로 널리 여겨진다. 숙주 방어에 MBL의 포함에 대한 강력한 증거는 기능성 MBL의 혈청 수준이 감소된 환자의 분석으로부터 온다 (Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* 1572:401-413, (2002)). 그러한 환자는 재발하는 박테리아 및 진균 감염에 대한 민감성을 나타낸다. 이들 증상은 보통 모체로부터 유래된 항체 역가가 약해짐에 따라 취약성의 창이 나타나는 동안, 그러나 항체 반응의 전체 레퍼토리가 발달하기 전인 생의 초기에 분명하다. 이 증후군은 자주 MBL 올리고머의 적절한 형성을 간섭하는, MBL의 콜라겐성 부분의 여러 부위에서의 돌연변이로부터 유발된다. 그러나, MBL이 보체와 무관한 옹소닌으로서 기능할 수 있기 때문에, 감염에 대한 어느 정도의 증가된 민감성이 손상된 보체 활성화로 인한 것인지는 알려져 있지 않다.

- [0019] 고전적 및 렉틴 경로와 대조적으로, C1q 및 렉틴이 다른 두 경로에서 수행하는 인식 기능을 이행하는 것으로 나타난 대체 경로의 개시자가 없다. 현재 대체 경로는 체크시 자발적인 보체 활성화를 유지하는 적절한 분자 요소가 결핍된 외래 또는 다른 비정상적 표면 (박테리아, 효모, 바이러스로 감염된 세포, 또는 손상된 조직) 상에서 쉽게 증폭될 수 있는 자발적으로 낮은 수준의 전환 활성화를 진행하는 것이 널리 수용된다. 대체 경로의 활성화에 직접 관여하는 4개의 혈장 단백질: C3, 인자 B 및 D, 및 프로퍼딘(properdin)이 있다.
- [0020] 비록 비감염성 인간 질환의 발병에 고전적 및 대체 보체 경로가 모두 연루된 것을 보여주는 광범위한 증거가 있지만, 렉틴 경로의 역할은 이제 막 평가되기 시작하였다. 최근 연구는 렉틴 경로의 활성화가 허혈/재관류 손상에서 보체 활성화 및 관련된 염증의 원인일 수 있는 증거를 제공한다. Collard 등 (2000)은 산화성 스트레스를 받은 배양된 내피 세포가 MBL에 결합하여 인간 혈청에 노출시 C3의 침착을 보이는 것을 보고하였다 (Collard et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556, (2000)). 더불어, 항-MBL 단클론성 항체를 차단하면서 인간 혈청의 처리는 MBL 결합 및 보체 활성화를 억제하였다. 이들 발견은 심근 허혈-재관류의 래트 모델로 확장되었는데, 래트는 래트 MBL에 대해 지시된 차단 항체로 처리된 래트는 대조군 항체로 처리된 래트보다 관상 동맥의 폐색시 상당히 더 적은 심근 손상을 보였다 (Jordan et al., *Circulation* 104:1413-1418, (2001)). 산화성 스트레스 후 혈관 내피에 대한 MBL 결합의 분자 메커니즘은 분명하지 않다; 최근 연구는 산화성 스트레스 후 렉틴 경로의 활성화가 당관류게이트가 아니라, 혈관 내피 사이토케라틴에 대한 MBL 결합에 의해 매개될 수 있음을 시사한다 (Collard et al., *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054, (2001)). 다른 연구는 허혈/재관류 손상의 발병에서 고전적 및 대체 경로가 연루된 것과 이 질환에서 렉틴 경로의 역할이 논란의 여지가 있음을 보여주었다 (Riedermann, N.C., et al., *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003).
- [0021] 최근 연구는 MASP-1 (및 아마도 또한 MASP-3)이 대체 경로 활성화 효소 인자 D를 그것의 지모겐 형태로부터 효소적으로 활성 형태로 전환시키는 데 필요한 것을 보였다 (Takahashi M. et al., *J Exp Med* 207(1):29-37 (2010) 참고). 이 과정의 생리적 중요성은 MASP-1/3-결핍 마우스의 혈장에서 대체 경로 기능적 활성의 부재에 의해 강조된다. 천연 C3으로부터 C3b의 단백질 분해성 생성은 대체 경로가 기능하는 데 필요하다. 대체 경로 C3 전환효소 (C3bBb)가 필수 하위유닛으로서 C3b를 함유하기 때문에, 대체 경로를 통한 제1 C3b의 기원과 관련한 의문은 난해한 문제를 제시하였고 상당한 연구를 자극하였다.
- [0022] C3은 티오에스테르 결합으로서 알려진 흔하지 않은 번역후 변형을 함유한 단백질 패밀리에 속한다 (C4 및 α -2 거대글로불린과 함께). 티오에스테르 기는 말단 카르보닐 기가 3개 아미노산이 떨어져 있는 시스테인의 설프하이드릴 기와 공유 티오에스테르 결합을 형성하는 글루타민으로 구성된다. 이 결합은 불안정하고 친전자성 글루타밀-티오에스테르는 하이드록실 또는 아미노 기와 같은 친핵성 모이어티와 반응할 수 있고 그로써 다른 분자와 공유 결합을 형성한다. 티오에스테르 결합은 온전한 C3의 소수성 포켓 내에 격리될 때 타당하게 안정적이다. 그러나, C3의 C3a 및 C3b로의 단백질 분해성 절단은 C3b 상의 고도로 반응성인 티오에스테르 결합의 노출과, 이어서 하이드록실 또는 아미노 기를 포함하는 인접한 모이어티에 의한 친핵성 공격을 초래하여, C3b는 표적에 공유적으로 연결된다. C3b의 보체 표적에의 공유 부착에서 그것의 잘 증명된 역할 외에, C3 티오에스테르는 또한 대체 경로를 촉발시키는 데 중추적 역할을 하는 것으로 여겨진다. 광범위하게 수용된 "틱 오버 이론(tick-over theory)"에 따르면, 대체 경로는 C3과 가수분해된 티오에스테르 (iC3; $C3(H_2O)$) 및 인자 B로부터 형성된 유동상 전환효소, iC3Bb의 생성에 의해 개시된다 (Lachmann, P.J., et al., *Springer Semin. Immunopathol.* 7:143-162, (1984)). C3b-유사 $C3(H_2O)$ 은 천연 C3으로부터 단백질의 내부 티오에스테르의 느린 자발적 가수분해에 의해 생성된다 (Pangburn, M.K., et al., *J. Exp. Med.* 154:856-867, 1981). $C3(H_2O)Bb$ 전환효소의 활성을 통해, C3b 분자는 표적 표면 상에 침착되고 그로써 대체 경로가 개시된다.
- [0023] 대체 경로의 활성화의 개시자에 대해 알려진 것은 거의 없다. 활성화는 효모 세포벽 (지모산), 많은 순수한 다당, 토끼 적혈구, 특정 면역글로불린, 바이러스, 진균, 박테리아, 동물 종양 세포, 기생충, 및 손상된 세포를 포함하는 것으로 여겨진다. 이들 활성화에 공통적인 유일한 특징은 탄수화물의 존재지만, 탄수화물 구조의 복잡성 및 다양성은 인식되는 공유된 분자 결정기를 확립하는 것을 어렵게 만든다. 대체 경로 활성화는 이 경로의 억제 조절 구성요소, 예컨대 인자 H, 인자 I, DAF, 및 CRI과, 대체 경로의 유일한 양성 조절자인 프로퍼딘과의 미세한 균형을 통해 제어되는 것으로 널리 받아들여졌다 (Schwaebble W.J. 및 Reid K.B., *Immunol Today* 20(1):17-21 (1999) 참고).
- [0024] 위에서 기술된 외관상 상향 조절된 활성화 메커니즘 외에, 생성된 임의의 C3b가 인자 B와 함께 추가적인 대체 경로 C3 전환효소 (C3bBb)를 형성하는 데 참여할 수 있기 때문에 대체 경로는 또한 렉틴/고전적 경로 C3 전환효소 (C4b2a)에 대한 강력한 증폭 루프를 제공할 수 있다. 대체 경로 C3 전환효소는 프로퍼딘의 결합에 의해 안정

화된다. 프로퍼딘은 대체 경로 C3 전환효소 반감기를 10배 연장시킨다. C3b의 대체 경로 C3 전환효소에의 첨가는 대체 경로 C5 전환효소의 형성으로 이어진다.

- [0025] 모든 3개 경로 (즉, 고전적, 렉틴 및 대체)는 C5에서 수렴하는 것으로 여겨졌는데, 그것은 절단되어 다중 전염증 효과를 가진 생성물을 형성한다. 수렴된 경로는 말단 보체 경로로서 언급되었다. C5a는 가장 강력한 아나필라톡신으로, 평활근 및 혈관 색조의 변화, 뿐만 아니라 혈관 투과도의 변화를 유도한다. 또한 그것은 호중구 및 단핵세포 둘 다의 강력한 케모타xin 및 활성화자이다. C5a-매개 세포 활성화는 사이토카인, 가수분해 효소, 아라키돈산 대사산물, 및 반응성 산소 종을 포함한 다중 추가 염증 매개체의 방출을 유도함으로써 염증 반응을 상당히 증폭시킬 수 있다. C5 절단은 막 공격 복합체 (MAC)로도 알려져 있는 C5b-9의 형성으로 이어진다. 이제 저용해성 MAC 침착이 그것의 용해성 기공 형성 복합체로서의 역할 외에 염증에서 중요한 역할을 할 수 있다는 강력한 증거가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0026] 면역 방어에서의 필수 역할 외에, 보체 시스템은 많은 임상 상태에서 조직 손상에 기여한다. 그러므로, 이들 부작용을 방지하기 위한 치료적으로 효과적인 보체 억제제를 개발하는 것이 시급하다.

과제의 해결 수단

- [0027] 이 요약은 아래의 상세한 설명에서 한층 더 기술되는 단순화된 형태의 개념의 선택을 도입하도록 제공된다. 이 요약은 청구된 주제의 핵심 특징을 확인하기 위해 의도되지 않으며, 청구된 주제의 범주를 결정하는 데 보조수단으로서 사용되도록 의도되지 않는다.

- [0028] 한 측면으로, 본 발명은 조혈 줄기 세포 이식 후 특발성 폐렴 증후군(idiopathic pneumonia syndrome, IPS) (HSCT-IPS)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하고 그로써 HSCT-IPS의 적어도 한 증상을 개선시키는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 대상체에게 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하는 단계 전에 특발성 폐렴 증후군 (IPS)을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 한 구체예에서, 특발성 폐렴 증후군 (IPS)을 앓고 있는 대상체는 DAH를 갖지 않는 것으로 측정된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 90%의 인간 혈청에서 C3b 침착을 30 nM 이하의 IC₅₀으로 억제한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 HSCT-IPS를 앓고 있는 대상체에게 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 2주, 또는 적어도 3주 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안, 또는 적어도 9주 동안, 또는 적어도 10주 동안, 또는 적어도 11주 동안, 또는 적어도 12주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 4 mg/kg (즉, 3.6 mg/kg 내지 4.4 mg/kg)이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 300 mg 내지 약 450 mg (즉, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 350 mg 내지 약 400 mg), 예컨대 약 300 mg, 약 305 mg, 약 310 mg, 약 315 mg, 약 320 mg, 약 325 mg, 약 330 mg, 약 335 mg, 약 340 mg, 약 345 mg, 약 350 mg, 약 355 mg, 약 360 mg, 약 365 mg, 약

370 mg, 약 375 mg, 약 380 mg, 약 385 mg, 약 390 mg, 약 395 mg, 약 400 mg, 약 405 mg, 약 410 mg, 약 415 mg, 약 420 mg, 약 425 mg, 약 430 mg, 약 435 mg, 약 440 mg, 약 445 mg 또는 약 450 mg의 고정 용량이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량이다. 한 구체예에서, 방법은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량의 MASP-2 억제 항체를 HSCT-IPS를 앓고 있는 대상체에게 적어도 8주의 치료 기간 동안 매주 2회 정맥내로 투여하는 단계를 포함한다.

[0029]

또 다른 측면으로, 본 발명은 조혈 줄기 세포 이식 후 모세혈관 누출 증후군 (Capillary Leak Syndrome, CLS) (HSCT-CLS)을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 투여하고 그로써 HSCT-CLS의 적어도 한 증상을 개선시키는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 모세혈관 누출 증후군 (CLS)을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 한 구체예에서, CLS를 앓고 있는 대상체는 VOD를 갖지 않는 것으로 측정된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 HSCT-CLS를 앓고 있는 대상체에게 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 2주, 또는 적어도 3주 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안, 또는 적어도 9주 동안, 또는 적어도 10주 동안, 또는 적어도 11주 동안, 또는 적어도 12주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 4 mg/kg (즉, 3.6 mg/kg 내지 4.4 mg/kg)이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 300 mg 내지 약 450 mg (즉, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 350 mg 내지 약 400 mg), 예컨대 약 300 mg, 약 305 mg, 약 310 mg, 약 315 mg, 약 320 mg, 약 325 mg, 약 330 mg, 약 335 mg, 약 340 mg, 약 345 mg, 약 350 mg, 약 355 mg, 약 360 mg, 약 365 mg, 약 370 mg, 약 375 mg, 약 380 mg, 약 385 mg, 약 390 mg, 약 395 mg, 약 400 mg, 약 405 mg, 약 410 mg, 약 415 mg, 약 420 mg, 약 425 mg, 약 430 mg, 약 435 mg, 약 440 mg, 약 445 mg 또는 약 450 mg의 고정 용량이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량이다. 한 구체예에서, 방법은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량의 MASP-2 억제 항체를 HSCT-CLS를 앓고 있는 대상체에게 적어도 8주의 치료 기간 동안 매주 2회 정맥내로 투여하는 단계를 포함한다.

[0030]

또 다른 측면으로, 본 발명은 조혈 줄기 세포 이식 후 체액 과부하 (fluid overload, FO) (HSCT-FO)를 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 투여하고 그로써 HSCT-FO의 적어도 한 증상을 개선시키는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 체액 과부하 (FO)를 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메라 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다.

한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 HSCT-F0를 앓고 있는 대상체에게 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 2주, 또는 적어도 3주 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안, 또는 적어도 9주 동안, 또는 적어도 10주 동안, 또는 적어도 11주 동안, 또는 적어도 12주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 4 mg/kg (즉, 3.6 mg/kg 내지 4.4 mg/kg)이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 300 mg 내지 약 450 mg (즉, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 350 mg 내지 약 400 mg), 예컨대 약 300 mg, 약 305 mg, 약 310 mg, 약 315 mg, 약 320 mg, 약 325 mg, 약 330 mg, 약 335 mg, 약 340 mg, 약 345 mg, 약 350 mg, 약 355 mg, 약 360 mg, 약 365 mg, 약 370 mg, 약 375 mg, 약 380 mg, 약 385 mg, 약 390 mg, 약 395 mg, 약 400 mg, 약 405 mg, 약 410 mg, 약 415 mg, 약 420 mg, 약 425 mg, 약 430 mg, 약 435 mg, 약 440 mg, 약 445 mg 또는 약 450 mg의 고정 용량이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량이다. 한 구체예에서, 방법은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량의 MASP-2 억제 항체를 HSCT-F0를 앓고 있는 대상체에게 적어도 8주의 치료 기간 동안 매주 2회 정맥내로 투여하는 단계를 포함한다.

[0031]

또 다른 측면으로, 본 발명은 조혈 줄기 세포 이식 후 생착 증후군 (Engraftment syndrome, ES) (HSCT-ES)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 방법은 대상체에게 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 투여하고 그로써 HSCT-ES의 적어도 한 증상을 개선시키는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 이식 후 생착 증후군 (HSCT-ES)을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메릭 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 HSCT-ES를 앓고 있는 대상체에게 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 2주, 또는 적어도 3주 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안, 또는 적어도 9주 동안, 또는 적어도 10주 동안, 또는 적어도 11주 동안, 또는 적어도 12주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 4 mg/kg (즉, 3.6 mg/kg 내지 4.4 mg/kg)이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 300 mg 내지 약 450 mg (즉, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 350 mg 내지 약 400 mg), 예컨대 약 300 mg, 약 305 mg, 약 310 mg, 약 315 mg, 약 320 mg, 약 325 mg, 약 330 mg, 약 335 mg, 약 340 mg, 약 345 mg, 약 350 mg, 약 355 mg, 약

360 mg, 약 365 mg, 약 370 mg, 약 375 mg, 약 380 mg, 약 385 mg, 약 390 mg, 약 395 mg, 약 400 mg, 약 405 mg, 약 410 mg, 약 415 mg, 약 420 mg, 약 425 mg, 약 430 mg, 약 435 mg, 약 440 mg, 약 445 mg 또는 약 450 mg의 고정 용량이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량이다. 한 구체예에서, 방법은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량의 MASP-2 억제 항체를 HSCT-ES를 앓고 있는 대상체에게 적어도 8주의 치료 기간 동안 매주 2회 정맥내로 투여하는 단계를 포함한다.

[0032] 발명의 방법, 조성물 및 의약은 본원에서 한층 더 기술되는 바 HSCT-IPS (즉, 줄기 세포 이식 후 IPS)를 앓고 있거나 발병 위험이 있는 인간을 포함한 포유류 대상체에서 및/또는 HSCT-CLS (즉, 줄기 세포 이식 후 CLS)를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에서, 및/또는 HSCT-FO (즉, 줄기 세포 이식 후 FO)를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에서, 및/또는 HSCT-ES (즉, 줄기 세포 이식 후 ES)를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에서 생체내에서 MASP-2-의존성 보체 활성화의 부작용을 억제하기에 유용하다. 또 다른 측면으로, 본 발명은 치료적 유효량의 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 억제 항체 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는, MASP-2-의존성 보체 활성화의 부작용을 억제하기 위한 조성물을 제공한다. 또한 제약학적 담체에 치료적 유효량의 MASP-2 억제제를 포함하는, 필요로 하는 대상체에서 MASP-2-의존성 보체 활성화의 부작용을 억제하는 데 사용하기 위한 의약의 제조 방법이 제공된다. 또한 아래에서 본원에 기술된 상태, 질환 및 장애의 각각의 치료를 위해 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 데 사용하기 위한 의약의 제조 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 본 발명의 전술한 측면 및 많은 동반되는 장점은 그것이 첨부되는 도면과 함께 취해질 때, 하기의 상세한 설명을 참조로 더 잘 이해됨에 따라 보다 쉽게 인정될 것이다.

도 1은 인간 MASP-2의 계층 구조를 예시하는 다이어그램이다;

도 2A는 인간 MASP-2 단백질의 도메인 구조를 예시하는 개략도이다;

도 2B는 인간 Map19 단백질의 도메인 구조를 예시하는 개략도이다;

도 3은 쥐과 MASP-2 녹아웃 전략을 예시하는 다이어그램이다;

도 4는 인간 MASP-2 미니유전자 구성물을 예시하는 다이어그램이다;

도 5A는 실시예 2에서 기술되는 것과 같이, MASP-2-결핍이 만난 상의 C4b 침착의 결핍에 의해 측정되는 바 렉틴 경로-매개 C4 활성화의 손실로 이어지는 것을 입증하는 결과를 도시한다;

도 5B는 실시예 2에서 기술되는 것과 같이, MASP-2-결핍이 지모산 상의 C4b 침착의 결핍에 의해 측정되는 바 렉틴 경로-매개 C4 활성화의 손실로 이어지는 것을 입증하는 결과를 도시한다;

도 5C는 실시예 2에서 기술되는 것과 같이, MASP-2-결핍이 만난 및 지모산 상의 C4b 침착의 결핍에 의해 측정되는 바 MASP-2^{+/+}; MASP-2^{-/-} 및 야생형 스트레인으로부터 얻어진 혈청 샘플의 상대적인 C4 활성화 수준을 입증하는 결과를 도시한다;

도 6은 실시예 2에서 기술되는 것과 같이, 쥐과 재조합 MASP-2의 MASP-2^{-/-} 혈청 샘플에의 첨가가 만난 상의 C4b 침착에 의해 측정되는 바, 단백질 농도 의존성 방식으로 렉틴 경로-매개 C4 활성화를 회복시키는 것을 입증하는 결과를 도시한다;

도 7은 실시예 8에서 기술되는 것과 같이, 고전적 경로가 MASP-2^{-/-} 스트레인에서 기능적인 것을 입증하는 결과를 도시한다;

도 8A는 실시예 10에서 기술되는 것과 같이, 항-MASP-2 Fab2 항체 #11이 C3 전환효소 형성을 억제하는 것을 입증하는 결과를 도시한다;

도 8B는 실시예 10에서 기술되는 것과 같이, 항-MASP-2 Fab2 항체 #11이 천연 래트 MASP-2에 결합하는 것을 입증하는 결과를 도시한다;

도 8C는 실시예 10에서 기술되는 것과 같이, 항-MASP-2 Fab2 항체 #41이 C4 절단을 억제하는 것을 입증하는 결과를 도시한다;

도 9는 실시예 10에서 기술되는 것과 같이, C3 전환효소 형성을 억제한 것으로 테스트된 항-MASP-2 Fab2 항체가 전부 또한 C4 절단을 억제하는 것으로 나타난 것을 입증하는 결과를 도시한다;

도 10은 실시예 11에서 기술되는 것과 같이, 항-MASP-2 차단 Fab2 항체의 에피토프 지도화에 사용된 래트 MASP-2로부터 유래된 재조합 폴리펩타이드를 예시하는 다이어그램이다;

도 11은 실시예 11에서 기술되는 것과 같이, 항-MASP-2 Fab2 #40 및 #60의 래트 MASP-2 폴리펩타이드에의 결합을 입증하는 결과를 도시한다;

도 12는 실시예 12에서 기술되는 것과 같이, 신장 허혈/재관류 손상 모델에서 재관류 후 24 및 48시간 후에 야생형 (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에 대한 혈액 요소 질소 제거를 입증하는 결과를 도시한다;

도 13A는 실시예 13에서 기술되는 것과 같이, 야생형 (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스로부터 분리된 RPE-맥락막 복합체에서 기준선 VEGF 단백질 수준을 보여주는 결과를 도시한다;

도 13B는 실시예 13에서 기술되는 것과 같이, 황반 변성(macular degeneration) 모델에서 레이저 유도 손상 후 야생형 (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에서 3일째 RPE-맥락막 복합체의 VEGF 단백질을 보여주는 결과를 도시한다;

도 14는 실시예 13에서 기술되는 것과 같이, 야생형 (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에서 레이저 유도 손상 후 7일째에 평균 맥락막 혈관신생 (CNV) 부피를 보여주는 결과를 도시한다;

도 15A 및 15B는 실시예 14에서 기술되는 것과 같이, 정상적인 래트 혈청에서 MASP-2 Fab2 항체의 투여 후 C4b 침착의 억제 (도 15A) 및 트롬빈 활성화의 억제 (도 15B)에 대한 용량 반응 곡선을 도시한다;

도 16A 및 16B는 실시예 15에서 기술되는 것과 같이, 파종성 혈관내 응고(disseminated intravascular coagulation)의 국지화된 슈바르츠만(Schwartzman) 반응 모델에서 보체 경로가 고갈제 코브라 독 인자 (CVF) 및 말단 경로 억제제 (C5aR 길항물질)에 의해 억제되어 있는 미처리 야생형 마우스 및 야생형 마우스에서의 혈소판 응집 (도 16A)과 비교된 MASP-2 (-/-) 마우스에서의 측정된 혈소판 응집 (응집 면적으로서 표시됨) (도 16B)을 도시한다;

도 17은 실시예 16에서 기술되는 것과 같이, WT (+/+) (B6) 또는 WT (+/+) 도너 신장의 MASP-2 (-/-) 이식 수령체 마우스에서 측정된 혈액 요소 질소 (BUN) 수준을 그래프로 도시한다;

도 18은 실시예 17에서 기술되는 것과 같이, 맹장 결찰 및 천공 (CLP) 모델에서 미생물 감염 후 경과일 수의 함수로서 WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스의 백분율 생존을 그래프로 도시한다;

도 19는 실시예 17에서 기술되는 것과 같이, 맹장 결찰 및 천공 (CLP) 모델에서 미생물 감염 후 WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-)에서 측정된 박테리아 수를 그래프로 도시한다;

도 20은 실시예 18에서 기술되는 것과 같이, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 비내 투여로 도전 후 6일 후의 WT (+/+) , MASP-2 (-/-) 및 C3 (-/-) 마우스의 생존율을 예시하는 카플란-마이어(Kaplan-Mayer) 도표이다;

도 21은 실시예 19에서 기술되는 것과 같이, WT 마우스에서 0.3 mg/kg 또는 1.0 mg/kg의 마우스 항-MASP-2 단클론성 항체의 피하 투여 후 다양한 시점에서 취해진 샘플 중의, 대조군의 %로서 측정된, C4b 침착의 수준을 그래프로 도시한다;

도 22는 실시예 19에서 기술되는 것과 같이, WT 마우스에서 0.6 mg/kg의 마우스 항-MASP-2 단클론성 항체의 복강내 투여 후 다양한 시점에서 취해진 샘플 중의, 대조군의 %로서 측정된, C4b 침착의 수준을 그래프로 도시한다;

도 23은 실시예 20에서 기술되는 것과 같이, 0.3 mg/kg 또는 1.0 mg/kg의 마우스 항-MASP-2 단클론성 항체의 단일 복강내 주사로 사전 처리된 WT (+/+) 마우스에서 레이저 유도된 손상 후 7일째에 평균 맥락막 혈관신생 (CNV) 부피를 그래프로 도시한다;

도 24A는 실시예 21에서 기술되는 것과 같이, 5×10^8 /100 μ l cfu 수막염균(*N. meningitidis*)으로 감염된 후 MASP-2 (-/-) 및 WT (+/+) 마우스에서 생존율을 그래프로 도시한다;

도 24B는 실시예 21에서 기술되는 것과 같이, 5×10^8 cfu/100 μ l 수막염균으로 감염된 MASP-2 KO (-/-) 및 WT (+/+) 마우스로부터 취한 혈액 샘플에서 다양한 시점에서 회수된 수막염균의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다;

도 25A는 실시예 21에서 기술되는 것과 같이, 2×10^8 cfu/100 μ l 수막염균으로 감염된 후 MASP-2 KO (-/-) 및

WT (+/+) 마우스의 생존율을 그래프로 도시한다;

도 25B는 실시예 21에서 기술되는 것과 같이, 2×10^8 cfu/100 μ l 수막염균으로 감염된 WT (+/+) 마우스로부터 취한 혈액 샘플에서 다양한 시점에서 회수된 수막염균의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다;

도 25C는 실시예 21에서 기술되는 것과 같이, 2×10^8 cfu/100 μ l 수막염균으로 감염된 MASP-2 (-/-) 마우스로부터 취한 혈액 샘플에서 다양한 시점에서 회수된 수막염균의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다;

도 26A는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 (-/-) 마우스가 기능성 고전적 경로를 유지하는 것을 입증하는 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 26B는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 (-/-) 마우스가 기능성 대체 경로를 유지하는 것을 입증하는, 지모산 코팅된 플레이트 상의 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 27A는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이 위험 영역 (AAR) 및 경색 크기 (INF)를 보여주는, C4 (-/-) 마우스 (n=6마리) 및 매칭되는 WT 한배새끼 대조군 (n=7마리)에서 관상 동맥의 좌측 전방 하행 가지 (LAD)의 결찰 및 재관류 후의 심근 허혈/재관류 손상 (MIRI)-유도된 조직 손실을 그래프로 도시한다;

도 27B는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, C4 (-/-) 마우스가 WT 대조군 (점선)과 같이 MIRI에 취약한 것을 입증하는, 도 42A에서 기술된 것과 같이 처리된 C4 (-/-) 및 WT 마우스에서 위험 영역 (AAR)의 함수로서의 경색 크기 (INF)를 그래프로 도시한다;

도 28A는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, WT 마우스, C4 (-/-) 마우스로부터의 혈청, 및 만난과 함께 사전 인큐베이션된 C4 (-/-) 마우스로부터의 혈청을 사용하는 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 28B는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, 다양한 농도의 항-쥐과 MASP-2 mAb (mAbM11)와 혼합된 WT, C4 (-/-), 및 MASP-2 (-/-) 마우스로부터의 혈청에 대한 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 28C는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, WT (C4 충분)로부터의 인간 혈청 및 C4 결핍 혈청, 및 만난과 함께 사전 인큐베이션된 C4 결핍 대상체로부터의 혈청에 대한 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 28D는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, WT (C4 충분) 및 항-인간 MASP-2 mAb (mAbH3)와 혼합된 C4 결핍 대상체로부터의 인간 혈청에 대한 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 29A는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, 렉틴 활성화 경로 특이적 검정 조건 하에서, 또는 고전적 활성화 경로 특이적 검정 조건 하에서 테스트된 다양한 보체 결핍 마우스 스트레인으로부터의 혈장에서의 C3 전환효소 활성의 비교 분석을 그래프로 도시한다;

도 29B는 실시예 22에서 기술되는 것과 같이, 렉틴 활성화 경로 특이적 조건 하에서 테스트된 다양한 보체 결핍 마우스 스트레인으로부터의 혈장에서의 C3 전환효소 활성의 시간-분해 역동학을 그래프로 도시한다;

도 30은 실시예 23에서 기술되는 것과 같이, 트롬빈 기질 FXIa 및 FXa에 의한 a' 사슬의 존재에 의해 나타난, 인간 C3의 활성화를 보여주는 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한다;

도 31은 실시예 23에서 기술되는 것과 같이, WT, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) 및 C4 (-/-)로부터 얻어진 혈청 샘플에 대한 C3 침착 검정의 결과를 도시한다;

도 32A는 실시예 29에서 기술되는 것과 같이, 대조군 마우스 및 항-쥐과 MASP-2 항체 (mAbM11) 또는 항-인간 MASP-2 항체 (mAbH6)로 테스트된 마우스에서 7.0 Gy 방사선에 노출된 후 시간에 따른 생존율을 보여주는 카플란-마이어 생존 곡선이다;

도 32B는 실시예 29에서 기술되는 것과 같이, 대조군 마우스 및 항-쥐과 MASP-2 항체 (mAbM11) 또는 항-인간 MASP-2 항체 (mAbH6)로 테스트된 마우스에서 6.5 Gy 방사선에 노출된 후 시간에 따른 생존율을 보여주는 카플란-마이어 생존 곡선이다;

도 33은 실시예 30에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 결핍 마우스가 수막염균 유도된 사망으로부터 보호되는 것을 입증하는, 2.6×10^7 cfu의 수막염균 혈청균 A Z2491의 감염 용량의 투여 후에 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 생존율을 그래프로 예시한 카플란-마이어 도표이다;

도 34는 실시예 30에서 기술되는 것과 같이, MASP-2-결핍 마우스가 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58 유도된 사

망으로부터 보호되는 것을 입증하는, 6×10^6 cfu의 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58의 감염 용량의 투여 후에 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 생존율을 그래프로 예시한 카플란-마이어 도표이다;

도 35는 실시예 30에서 기술되는 것과 같이, 비록 MASP-2 KO 마우스가 WT 마우스와 동일한 용량의 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58로 감염되었지만, MASP-2 KO 마우스는 WT와 비교하여 향상된 균혈증(bacteraemia)의 제거를 보인 것을 입증하는, 6×10^6 cfu의 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58로 복강내 감염 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스로부터 취한 혈액 샘플에서 상이한 시점에 회수된 로그 cfu/ml의 수막염균 혈청균 B 스트레인을 그래프로 도시한다 (상이한 시점에서 두 그룹의 마우스에 대해 모두 $n=3$ 마리, 결과는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시됨);

도 36은 실시예 30에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 결핍 마우스가 6시간 전에 훨씬 더 낮은 질병 점수로 감염에 대해 높은 저항성을 보인 것을 입증하는, 6×10^6 cfu/100 μ l 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58로 감염된 후 3, 6, 12 및 24시간 전에 MASP-2 및 WT 마우스의 평균 질병 점수를 그래프로 도시한다;

도 37은 실시예 31에서 기술되는 것과 같이, 항-MASP-2 항체가 수막염균으로 감염된 대상체에서 치료 및 생존율 개선에 효과적인 것을 입증하는, 감염 용량의 4×10^6 /100 μ l cfu 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58의 투여 후, 억제 항-MASP-2 항체 (1 mg/kg) 또는 대조군 아이소타입 항체의 감염 후 3시간 후 투여 후의 마우스의 생존율을 그래프로 예시한 카플란-마이어 도표이다;

도 38은 실시예 32에서 기술되는 것과 같이, 인간 혈청에서 수막염균의 보체 의존성 사멸이 인간 항-MASP-2 항체의 첨가에 의해 상당히 향상된 것을 보여주는, (A) 정상 인간 혈청 (NHS) 플러스 인간 항-MASP-2 항체; (B) 정상 인간 혈청 (NHS) 플러스 아이소타입 대조군 항체; (C) MBL-/- 인간 혈청; (D) 정상 인간 혈청 (NHS) 및 (E) 열 비활성화된 정상 인간 혈청 (NHS)의 존재 하에 인큐베이션한 후 0, 30, 60 및 90분 전에 6.5×10^6 cfu/100 μ l 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58로 복강내 감염된 후 20% 인간 혈청 농도에서의 상이한 시점에서 회수된 수막염균 혈청균 B-MC58의 생존 가능한 카운트의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다;

도 39는 실시예 32에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 -/- 마우스 혈청이 WT 마우스 혈청보다 수막염균에 대해 더 높은 수준의 박테리아 사멸 활성을 가지는 것을 입증하는, 마우스 혈청 샘플에서 상이한 시점에 회수된 수막염균 혈청균 B-MC58의 로그 cfu/ml의 생존 가능한 카운트를 그래프로 도시한다;

도 40은 실시예 33에서 기술되는 것과 같이, 혈청 농도 범위에 걸쳐 인간 혈청에 의한 만난-코팅 쥐과 적혈구의 용혈 (광도계에 의해 측정된, 용해된 마우스 적혈구 (Crry/C3-/-)의 상층액으로의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다. 테스트된 혈청은 열-비활성화 (HI) NHS, MBL-/-, NHS +항-MASP-2 항체 및 NHS 대조군을 포함하였다;

도 41은 실시예 33에서 기술되는 것과 같이, 혈청 농도 범위에 걸쳐 인간 혈청에 의한 비-코팅 쥐과 적혈구의 용혈 (광도계에 의해 측정된, 용해된 WT 마우스 적혈구의 상층액으로의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다. 테스트된 혈청은 열-비활성화 (HI) NHS, MBL-/-, NHS +항-MASP-2 항체 및 NHS 대조군을 포함하였고, MASP-2의 억제제가 민감화되지 않은 WT 마우스 적혈구의 보체-매개 용해를 억제하는 것을 입증한다;

도 42는 실시예 34에서 기술되는 것과 같이, 혈청 농도 범위에 걸쳐 인간 혈청에 의한 비-코팅 쥐과 적혈구의 용혈 (광도계에 의해 측정된, 용해된 마우스 적혈구 (CD55/59 -/-)의 상층액으로의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다. 테스트된 혈청은 열-비활성화 (HI) NHS, MBL-/-, NHS +항-MASP-2 항체 및 NHS 대조군을 포함하였다;

도 43은 실시예 34에서 기술되는 것과 같이, 대조군 마우스 및 항-인간 MASP-2 항체 (mAbH6)로 처리된 마우스에서 8.0 Gy 방사선에 노출된 후 시간 (일)에 따른 생존율을 그래프로 도시한다;

도 44는 실시예 35에서 기술되는 것과 같이, 혈전 형성이 WT 마우스에서 15분 후에 검출되고, 최대 80%의 WT 마우스가 60분 전에 혈전 형성을 나타냈으며; 대조적으로, MASP-2 -/- 마우스는 어느 것도 60분 기간 중에 혈전 형성을 나타내지 않았음 (로그 순위: $p=0.0005$)을 입증하는, 60분에 걸쳐 측정된 마우스의 혈전 형성의 백분율을 보여주는, MASP-2 -/- 및 WT 마우스에서의 LPS 주사 후 미세혈관 폐색(microvascular occlusion)이 시작되기까지의 시간을 그래프로 도시한다;

도 45는 실시예 36에서 기술되는 것과 같이, 모든 대조군 마우스가 42시간 후에 사망한 반면, 대조적으로, 항-MASP-2 항체-처리된 마우스는 100%가 실험 기간 내내 생존한 것을 입증하는, 시간(시간)에 따른 HUS의 STX/LPS-

유도 모델에서 식염수 처리된 대조군 마우스 (n=5) 및 항-MASP-2 항체 처리 마우스 (n=5)의 생존율을 그래프로 도시한다;

도 46은 실시예 37에서 기술되는 것과 같이, FITC/텍스트란의 주사 전 16시간 및 1시간 전에 아이소타입 대조군 또는 인간 MASP-2 항체 mAbH6 (10 mg/kg)으로 처리 후 FITC/텍스트란 UV 모델에서 미세혈관 폐색을 보인 마우스의 백분율을, 손상 유도 후 시간의 함수로서 그래프로 도시한다;

도 47은 실시예 37에서 기술되는 것과 같이, 인간 MASP-2 항체 (mAbH6) 및 아이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에 대한, 분으로 표시되는 폐색 시간을 그래프로 도시하며, 여기서 데이터는 평균 값 (수평 막대) 및 표준 오차 막대 (수직 막대)를 포함한 산점도로서 기록된다. 분석을 위해 사용된 통계적 테스트는 독립표본 t 테스트였고; 여기서 기호 "*"는 $p=0.0129$ 를 나타낸다; 그리고

도 48은 실시예 37에서 기술되는 것과 같이, 혈전증의 FITC-텍스트란/광 유도 내피 세포 손상 모델에서 낮은 광강도 (800-1500)로 혈전증을 유도하기 전 16시간 전, 및 다시 1시간 전에 10 mg/kg으로 복강내 투여된 야생형 마우스, MASP-2 KO 마우스, 및 인간 MASP-2 항체 (mAbH6)로 사전 처리된 야생형 마우스에 대한, 분으로 표시되는, 폐색까지 걸리는 시간을 그래프로 도시한다;

도 49는 실시예 39에서 기술되는 것과 같이, 증가하는 용량의 인간 MASP-2 억제 항체 (mAbH6) 또는 아이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에서 FITC-텍스트란 유도된 혈전성 미세혈관병증(thrombotic microangiopathy)에서의 시간의 함수로서 혈전을 보인 마우스의 백분율을 보여주는 카플란-마이어 도표이다;

도 50은 실시예 39에서 기술되는 것과 같이, mAbH6 용량의 함수로서의 혈전 형성의 개시까지의 중간 시간 (분)을 그래프로 도시한다 (* 대조군에 비교하여 $p<0.01$);

도 51은 실시예 39에서 기술되는 것과 같이, 증가하는 용량의 인간 MASP-2 억제 항체 (mAbH6) 또는 아이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에서 FITC-텍스트란 유도 혈전성 미세혈관병증에서의 시간의 함수로서 미세혈관 폐색을 보이는 마우스의 백분율을 보여주는 카플란-마이어 도표이다;

도 52는 실시예 39에서 기술되는 것과 같이, mAbH6 용량의 함수로서 미세혈관 폐색까지의 중간 시간을 그래프로 도시한다 (* 대조군과 비교하여 $p<0.05$);

도 53A는 실시예 40에서 기술되는 것과 같이, OMS646이 대략 1 nM의 IC_{50} 값으로 렉틴-매개 MAC 침착을 억제하는 것을 입증하는, 렉틴 경로-특이적 검정 조건 하에서 인간 MASP-2 단클론성 항체 (OMS646)의 존재 또는 부재 시의 MAC 침착의 수준을 그래프로 도시한다;

도 53B는 실시예 40에서 기술되는 것과 같이, OMS646이 고전적 경로-매개 MAC 침착을 억제하지 못하는 것을 입증하는, 고전적 경로-특이적 검정 조건 하에서 인간 MASP-2 단클론성 항체 (OMS646)의 존재 또는 부재 시의 MAC 침착의 수준을 그래프로 도시한다;

도 53C는 실시예 40에서 기술되는 것과 같이, OMS646이 대체 경로-매개 MAC 침착을 억제하지 못하는 것을 입증하는, 대체 경로-특이적 검정 조건 하에서 인간 MASP-2 단클론성 항체 (OMS646)의 존재 또는 부재 시의 MAC 침착의 수준을 그래프로 도시한다;

도 54는 실시예 40에서 기술되는 것과 같이, 표시된 용량에서 투여 후 시간의 함수로서 OMS646 농도 (n=3마리 동물/그룹의 평균)를 보여주는, 마우스에서 인간 MASP-2 단클론성 항체 (OMS646)의 약동학 (PK) 프로파일을 그래프로 도시한다;

도 55A는 실시예 40에서 기술되는 것과 같이, 정맥내 투여 후 마우스에서 전신적인 렉틴 경로 활성화의 강하로서 측정된, 인간 MASP-2 단클론성 항체 (OMS646)의 약력학적 (PD) 반응을 그래프로 도시한다;

도 55B는 실시예 40에서 기술되는 것과 같이, 피하 투여 후 마우스에서 전신적인 렉틴 경로 활성화의 강하로서 측정된, 인간 MASP-2 단클론성 항체 (OMS646)의 약력학적 (PD) 반응을 그래프로 도시한다;

도 56은 실시예 41에서 기술되는 것과 같이, ADP-활성화된 HMEC-1 세포 상의 aHUS 혈청-유도된 C5b-9 침착에 미치는 sCR1에 비교된 MASP-2 항체 (OMS646)의 억제 효과를 그래프로 도시한다;

도 57은 실시예 42에서 기술되는 것과 같이, ADP-활성화된 HMEC-1 세포 상의 aHUS 혈청-유도된 혈전 형성에 미치는 sCR1에 비교된 MASP-2 항체 (OMS646)의 억제 효과를 그래프로 도시한다;

도 58은 실시예 46에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 억제 항체 (OMS646)로 치료된 후 지속적인 조혈 줄기 세포

이식-관련 혈전성 미세혈관병증 (HSCT-TMA)을 앓고 있는 대상체에서 시간 (주)에 따른 기준선으로부터의 혈소판 수의 평균 변화를 그래프로 도시한다;

도 59는 실시예 46에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 억제 항체 (OMS646)로 치료된 후 지속적인 (HSCT-TMA)를 앓고 있는 대상체에서 시간 (주)에 따른 기준선으로부터의 LDH의 평균 변화를 그래프로 도시한다;

도 60은 실시예 46에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 억제 항체 (OMS646)로 치료된 후 지속적인 (HSCT-TMA)를 앓고 있는 대상체에서 시간 (주)에 따른 기준선으로부터의 합토클로빈의 평균 변화를 그래프로 도시한다;

도 61은 실시예 47에서 기술되는 것과 같이, MASP-2 억제 항체 (OMS646)로 치료된 후 HSCT-TMA, GVHD의 개선 및 신경학적 증상의 개선을 입증하는, HSCT-TMA 및 이식편대숙주병 (GVHD)이 발병된 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 후 환자의 임상 과정을 도시한다;

도 62A는 실시예 48에서 기술되는 것과 같이, 동정적 사용(compassionate use) 환자 #1에서의 시간에 따른 크레아티닌의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다;

도 62B는 실시예 48에서 기술되는 것과 같이, 동정적 사용 환자 #1에서의 시간에 따른 합토클로빈의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다;

도 62C는 실시예 48에서 기술되는 것과 같이, 동정적 사용 환자 #1에서의 시간에 따른 헤모글로빈의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다;

도 62D는 실시예 48에서 기술되는 것과 같이, 동정적 사용 환자 #1에서의 시간에 따른 LDH의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다; 그리고

도 62E는 실시예 48에서 기술되는 것과 같이, 동정적 사용 환자 #1에서의 시간에 따른 혈소판의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 서열 목록의 설명
- [0035] SEQ ID NO:1 인간 MAp19 cDNA
- [0036] SEQ ID NO:2 인간 MAp19 단백질 (리더 포함)
- [0037] SEQ ID NO:3 인간 MAp19 단백질 (성숙)
- [0038] SEQ ID NO:4 인간 MASP-2 cDNA
- [0039] SEQ ID NO:5 인간 MASP-2 단백질 (리더 포함)
- [0040] SEQ ID NO:6 인간 MASP-2 단백질 (성숙)
- [0041] SEQ ID NO:7 인간 MASP-2 gDNA (엑손 1-6)
- [0042] 항원: (MASP-2 성숙 단백질에 대한 참고문헌에서)
- [0043] SEQ ID NO:8 CUBI 서열 (aa 1-121)
- [0044] SEQ ID NO:9 CUBEGF 서열 (aa 1-166)
- [0045] SEQ ID NO:10 CUBEGFCUBII (aa 1-293)
- [0046] SEQ ID NO:11 EGF 영역 (aa 122-166)
- [0047] SEQ ID NO:12 세린 프로테아제 도메인 (aa 429 - 671)
- [0048] SEQ ID NO:13 세린 프로테아제 도메인 비활성 (Ser618의 Ala 돌연변이를 포함한 aa 610-625)
- [0049] SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL (CUB1 펩타이드)
- [0050] SEQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (CUBI 펩타이드)
- [0051] SEQ ID NO:16 TFRSDYSN (MBL 결합 영역 코어)

- [0052] SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL 결합 영역)
- [0053] SEQ ID NO:18 IDECQVAPG (EGF 펩타이드)
- [0054] SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDCRGDSGGALV (세린 프로테아제 결합 코어)
- [0055] 펩타이드 억제제:
- [0056] SEQ ID NO:20 MBL 전장 cDNA
- [0057] SEQ ID NO:21 MBL 전장 단백질
- [0058] SEQ ID NO:22 OGK-X-GP (공통 결합)
- [0059] SEQ ID NO:23 OGKLG
- [0060] SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G
- [0061] SEQ ID NO:25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO
- [0062] SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG
- [0063] SEQ ID NO:27 GAOGSOGKEGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO (인간 h-피콜린)
- [0064] SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (인간 피콜린 p35)
- [0065] SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (C4 절단 부위)
- [0066] 발현 억제제:
- [0067] SEQ ID NO:30 CUBI-EGF 도메인의 cDNA (SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 22-680)
- [0068] SEQ ID NO:31
- [0069] 5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCTCCTGGGC 3' MASP-2 번역 시작 부위 (센스)를 포함하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 12-45
- [0070] SEQ ID NO:32
- [0071] 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' MASP-2 MBL 결합 부위 (센스)를 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 361-396
- [0072] SEQ ID NO:33
- [0073] 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3' CUBII 도메인을 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 610-642
- [0074] 클로닝 프라이머:
- [0075] SEQ ID NO:34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCTC (CUB에 대한 5' PCR)
- [0076] SEQ ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (CUB에 대한 3' PCR)
- [0077] SEQ ID NO:36 GGAATTCCTACAGGGCGCT (CUBIEGF에 대한 3' PCR)
- [0078] SEQ ID NO:37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (CUBIEGFCUBII에 대한 3' PCR)
- [0079] SEQ ID NOS:38-47은 인간화된 항체에 대한 클로닝 프라이머이다
- [0080] SEQ ID NO:48은 9 aa 펩타이드 결합이다
- [0081] 발현 벡터:
- [0082] SEQ ID NO:49는 MASP-2 미니유전자 삽입이다
- [0083] SEQ ID NO: 50은 쥐과 MASP-2 cDNA이다
- [0084] SEQ ID NO: 51은 쥐과 MASP-2 단백질 (w/리더)이다

- [0085] SEQ ID NO: 52는 성숙한 쥐과 MASP-2 단백질이다
- [0086] SEQ ID NO: 53은 래트 MASP-2 cDNA이다
- [0087] SEQ ID NO: 54는 래트 MASP-2 단백질 (w/ 리더)이다
- [0088] SEQ ID NO: 55는 성숙한 래트 MASP-2 단백질이다
- [0089] SEQ ID NO: 56-59는 인간 MASP-2A를 생성하기 위해 사용된 인간 MASP-2A의 부위 지정 돌연변이생성을 위한 올리고뉴클레오타이드이다
- [0090] SEQ ID NO: 60-63은 쥐과 MASP-2A를 생성하기 위해 사용된 쥐과 MASP-2A의 부위 지정 돌연변이생성을 위한 올리고뉴클레오타이드이다
- [0091] SEQ ID NO: 64-65는 래트 MASP-2A를 생성하기 위해 사용된 래트 MASP-2A의 부위 지정 돌연변이생성을 위한 올리고뉴클레오타이드이다
- [0092] SEQ ID NO: 66 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 중쇄 가변 영역 (VH) (신호 펩타이드 없음)을 암호화하는 DNA
- [0093] SEQ ID NO: 67 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 중쇄 가변 영역 (VH) 폴리펩타이드
- [0094] SEQ ID NO: 68 17N16mc 중쇄 가변 영역 (VH) 폴리펩타이드
- [0095] SEQ ID NO: 69: 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 경쇄 가변 영역 (VL)을 암호화하는 DNA
- [0096] SEQ ID NO: 70: 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 경쇄 가변 영역 (VL) 폴리펩타이드
- [0097] SEQ ID NO: 71: 17N16_dc17N9 경쇄 가변 영역 (VL) 폴리펩타이드
- [0098] 상세한 설명
- [0099] 본 발명은 고전적 경로를 온전하게 놓아두면서 렉틴 매개된 MASP-2 경로를 억제하는 것이 가능하다는 본 발명가들에 의한 놀라운 발견을 토대로 한다. 본 발명은 또한 면역 체계의 고전적 (C1q-의존성) 경로 구성요소를 온전하게 놓아두면서 렉틴-매개 보체 경로 활성화와 관련된 세포 손상을 억제하기 위한 치료제로서의 MASP-2의 용도를 기술한다.
- [0100] **I. 정의**
- [0101] 본원에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 용어는 본 발명의 기술분야의 통상적인 지식을 가진 사람들에 의해 이해되는 것과 같은 의미를 가진다. 다음의 정의는 용어가 본 발명을 기술하기 위해 명세서 및 특허청구범위에서 사용된 대로의 용어와 관련하여 명료성을 제공하기 위해 제공된다.
- [0102] 본원에서 사용되는 바, 용어 "MASP-2-의존성 보체 활성화"는 렉틴 경로 C3 전환효소 C4b2a의 형성 및 C3 절단 생성물 C3b의 축적시 계속해서, 주로 옵소닌화를 유발하는 것으로 측정된 C5 전환효소 C4b2a(C3b)n의 형성으로 이어지는, 생리적 조건 하에서 (즉, Ca^{++} 의 존재 하에) 발생하는 MASP-2-의존성 렉틴 경로의 활성화를 포함한다.
- [0103] 본원에서 사용되는 바, 용어 "대체 경로"는 예를 들어, 진균 및 효모 세포벽으로부터의 지모산, 그람 음성균 외막으로부터의 리포다당 (LPS), 및 토끼 적혈구에 의해서뿐만 아니라 많은 순수 다당, 토끼 적혈구, 바이러스, 박테리아, 동물 종양 세포, 기생충 및 손상된 세포로부터 촉발되고, 전통적으로 보체 인자 C3으로부터의 C3b의 자발적인 단백질분해성 생성으로부터 발생하는 것으로 여겨지는 보체 활성화를 나타낸다.
- [0104] 본원에서 사용되는 바, 용어 "렉틴 경로"는 만nan-결합 렉틴 (MBL), CL-11 및 피콜린 (H-피콜린, M-피콜린, 또는 L-피콜린)을 포함한 혈청 및 비-혈청 탄수화물-결합 단백질의 특이적 결합을 통해 발생하는 보체 활성화를 나타낸다.
- [0105] 본원에서 사용되는 바, 용어 "고전적 경로"는 외래 입자에 결합된 항체에 의해 촉발되고 인식 분자 C1q의 결합을 필요로 하는 보체 활성화를 나타낸다.
- [0106] 본원에서 사용되는 바, 용어 "MASP-2 억제제"는 항-MASP-2 항체 및 그것의 MASP-2 결합 단편, 천연 및 합성 펩타이드, 소분자, 가용성 MASP-2 수용체, 발현 억제제 및 분리된 천연 억제제를 포함한, MASP-2에 결합하거나 직접 상호작용하고 MASP-2-의존성 보체 활성화를 효과적으로 억제하는 임의의 작용제를 나타내고, 또한 렉틴 경로의 또 다른 인식 분자 (예컨대, MBL, H-피콜린, M-피콜린, 또는 L-피콜린)에 대한 결합에 대해 MASP-2와 경쟁하

는 펩타이드를 포함하지만, 그런 다른 인식 분자에 결합하는 항체는 포함하지 않는다. 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 20% 이상, 예컨대 50% 이상, 예컨대 90% 이상 감소시킬 수 있다. 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 90% 이상 감소시킨다 (즉, 단지 10% 이하의 MASP-2 보체 활성화를 초래한다).

[0107] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 표적 폴리펩타이드, 예컨대, 예를 들면, MASP-2, 폴리펩타이드 또는 그것의 일부에 특이적으로 결합하는, 임의의 항체-생성 포유류 (예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 및 인간을 포함한 영장류)로부터, 또는 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현 또는 형질전환 동물 (또는 다른 항체 또는 항체 단편의 제조 방법)로부터 유래된 항체 및 그것의 항체 단편을 포함한다. 용어 "항체"는 항체의 근원 또는 그것이 만들어지는 방식 (예컨대, 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현, 형질전환 동물, 펩타이드 합성, 등에 의한 방식)과 관련하여 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 예시의 항체로는 다클론성, 단클론성 및 재조합 항체; pan-특이적, 다중특이적 항체 (예컨대, 이중특이적 항체, 삼중특이적 항체); 인간화된 항체; 쥐과 항체; 키메라, 마우스-인간, 마우스-영장류, 영장류-인간 단클론성 항체; 및 항-이디오타입 항체를 들 수 있고, 임의의 온전한 항체 또는 그것의 단편일 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체"는 온전한 다클론성 또는 단클론성 항체 뿐만 아니라, 그것의 단편 (예컨대 dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬 (ScFv), 그것의 합성 변이체, 자연적으로 발생하는 변이체, 필요한 특이성의 항원 결합 단편을 가진 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화된 항체, 키메라 항체, 및 필요한 특이성의 항원 결합 부위 또는 단편 (에피토프 인식 부위)을 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함한다.

[0108] "단클론성 항체"는 단클론성 항체가 에피토프의 선택적 결합에 관여하는 (자연적으로 발생하는 및 자연적으로 발생하지 않는) 아미노산으로 구성되는 균일한 항체 집단을 나타낸다. 단클론성 항체는 표적 항원에 대해 고도로 특이적이다. 용어 "단클론성 항체"는 온전한 단클론성 항체 및 전장 단클론성 항체뿐만 아니라, 그것의 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬 (ScFv), 그것의 변이체, 항원 결합 부분을 포함하는 융합 단백질, 인간화된 단클론성 항체, 키메라 단클론성 항체, 및 필요한 특이성의 항원 결합 단편 (에피토프 인식 부위) 및 에피토프에 결합하는 능력을 포함하는 면역글로불린 분자의 임의의 다른 변형된 구성을 포함한다. 항체의 근원 또는 그것이 만들어지는 방식 (예컨대, 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현, 형질전환 동물, 등에 의한 방식)과 관련해서 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 용어는 전체 면역글로불린뿐만 아니라 위에서 "항체"의 정의 하에 기술된 단편 등을 포함한다.

[0109] 본원에서 사용되는 바, 용어 "항체 단편"은 일반적으로 항원 결합 또는 그것의 가변 영역을 포함하는, 전장 항체로부터 유래된 또는 그것과 관련된 부분, 예컨대, 예를 들면 항-MASP-2 항체를 나타낸다. 항체 단편의 예시적인 예로는 Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ 및 Fv 단편, scFv 단편, 디아바디, 선형 항체, 단일 사슬 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 들 수 있다.

[0110] 본원에서 사용되는 바, "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하며, 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩타이드는 V_H과 V_L 도메인 사이에 scFv가 항원 결합을 위해 바람직한 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다.

[0111] 본원에서 사용되는 바, "키메라 항체"는 비-인간 종 (예컨대, 설치류) 항체로부터 유래된 가변 도메인 및 상보성 결정 영역을 함유하는 한편, 항체 분자의 나머지는 인간 항체로부터 유래된 재조합 단백질이다.

[0112] 본원에서 사용되는 바, "인간화된 항체"는 인간 항체 프레임워크에 이식된 비-인간 면역글로불린로부터 유래된 특정 상보성 결정 영역에 따르는 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 인간화된 항체는 전형적으로 항체 상보성 결정 영역만이 비-인간 기원의 것인 재조합 단백질이다.

[0113] 본원에서 사용되는 바, 용어 "만난-결합 력" ("MBL")은 만난-결합 단백질 ("MBP")에 동등하다.

[0114] 본원에서 사용되는 바, "막 공격 복합체" ("MAC")는 막에 삽입되어 막을 공격하는 말단의 5개의 보체 구성요소 (C6, C7, C8 및 C-9와 조합된 C5b)의 복합체를 나타낸다 (또한 C5b-9로도 언급됨).

[0115] 본원에서 사용되는 바, "대상체"는 제한 없이 인간, 비-인간 영장류, 개, 고양이, 말, 양, 염소, 소, 토끼, 돼지 및 설치류를 포함한 모든 포유류를 포함한다.

[0116] 본원에서 사용되는 바, 아미노산 잔기는 다음과 같이 약칭된다: 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), 아이소류신 (Ile;I), 류신 (Leu;L), 리신 (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).

- [0117] 가장 넓은 의미로, 자연적으로 발생하는 아미노산은 각각의 아미노산의 측쇄의 화학적 특성을 토대로 여러 그룹으로 나누어질 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. 아미노산의 이런 그룹화는 추가로 다음과 같이 세분화될 수 있다. "대전되지 않은 친수성" 아미노산은 Ser, Thr, Asn 또는 Gln을 의미한다. "산성" 아미노산은 Glu 또는 Asp를 의미한다. "염기성" 아미노산은 Lys, Arg 또는 His를 의미한다.
- [0118] 본원에서 사용되는 용어 "보존성 아미노산 치환"은 다음의 각각의 그룹 내에 있는 아미노산 중에서의 치환에 의해 예시된다: (1) 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 아이소류신, (2) 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판, (3) 세린 및 트레오닌, (4) 아스파테이트 및 글루타메이트, (5) 글루타민 및 아스파라긴, 및 (6) 리신, 아르기닌 및 히스티딘.
- [0119] 본원에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 중합체 또는 그것들의 모방물을 나타낸다. 이 용어는 또한 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드, 당 및 공유 뉴클레오사이드간 (백본) 결합으로 구성된 올리고핵염기뿐만 아니라 자연적으로 발생하지 않는 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0120] 본원에서 사용되는 바, "에피토프"는 항체에 의해 결합되는 단백질 (예컨대, 인간 MASP-2 단백질) 상의 부위를 나타낸다. "중복하는 에피토프"는 선형 및 비-선형 에피토프를 포함하여, 적어도 하나 (예컨대, 2, 3, 4, 5, 또는 6개)의 공통 아미노산 잔기(들)를 포함한다.
- [0121] 본원에서 사용되는 바, 용어 "펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 상호교환 가능하게 사용되며 길이 또는 번역후 변형과 관계없이 아미노산의 임의의 펩타이드-결합 사슬을 의미한다. 본원에 기술된 MASP-2 단백질은 야생형 단백질을 함유하거나 야생형 단백질일 수 있거나 또는 50개 이하 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 50개 이하)의 보존성 아미노산 치환을 가지는 변이체일 수 있다. 보존성 치환은 전형적으로 다음 그룹 내에서의 치환을 포함한다: 글리신 및 알라닌; 발린, 아이소류신, 및 류신; 아스파르트산 및 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민, 세린 및 트레오닌; 리신, 히스티딘 및 아르기닌; 및 페닐알라닌 및 티로신.
- [0122] 일부 구체예에서, 인간 MASP-2 단백질은 SEQ ID NO: 5에 제시된 아미노산 서열을 가지는 인간 MASP-2 단백질에 대해 70 (예컨대, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100)%, 또는 그 이상 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0123] 일부 구체예에서, 펩타이드 단편은 길이가 적어도 6개 (예컨대, 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 또는 600개 또는 그 이상)의 아미노산 잔기일 수 있다 (예컨대, SEQ ID NO: 5의 적어도 6개의 연속적인 아미노산 잔기). 일부 구체예에서, 인간 MASP-2 단백질의 항원성 펩타이드 단편은 길이가 500개보다 적은 (예컨대, 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 또는 6개보다 적은) 아미노산이다 (예컨대, SEQ ID NOS: 5 중 어느 하나의 500개의 연속적인 아미노산 잔기보다 적다).
- [0124] 퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성은 필요하다면, 최대 퍼센트 서열 동일성을 이루기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후에, 참조 서열의 아미노산과 동일한 후보 서열의 아미노산의 백분율로서 정의된다. 퍼센트 서열 동일성을 측정할 목적의 정렬은 기술분야의 숙련된 지식 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공공연하게 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 비교되는 전장 서열에 대해 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 포함한 적절한 파라미터는 공지된 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0125] **II. 발명의 개요**
- [0126] 렉틴 (MBL, M-피콜린, H-피콜린, L-피콜린 및 CL-11)은 선천성 보체 시스템을 촉발시키는 특정 인식 분자이며

시스템은 렉틴 개시 경로 및 말단 보체 이펙터 분자의 렉틴-개시된 활성화를 증폭시키는 관련된 말단 경로 증폭 루프를 포함한다. C1q는 후천적 보체 시스템을 촉발시키는 특정 인식 분자이며 시스템은 고전적 개시 경로 및 말단 보체 이펙터 분자의 C1q-개시된 활성화를 증폭시키는 관련된 말단 경로 증폭 루프를 포함한다. 본 발명자들은 이들 두 주요 보체 활성화 시스템을 각각 렉틴-의존성 보체 시스템 및 C1q-의존성 보체 시스템으로서 언급한다.

[0127] 면역 방어에서의 본질적인 역할 외에, 보체 시스템은 많은 임상 조건에서 조직 손상에 기여한다. 그러므로, 이들 부작용을 방지하기 위해 치료적으로 효과적인 보체 억제제를 개발할 급박한 필요성이 있다. 고전적 경로를 온전하게 남겨두면서 렉틴 매개 MASP-2 경로를 억제하는 것이 가능하다는 인식으로 보체의 면역 방어 능력을 온전하게 정지시키지 않으면서 특정 병리를 유발하는 보체 활성화 시스템만을 특이적으로 억제하는 것이 매우 바람직할 것임을 깨닫게 된다. 예를 들어, 보체 활성화가 렉틴-의존성 보체 시스템에 의해 우선적으로 매개되는 질환 상태에서, 이 시스템만을 특이적으로 억제하는 것이 유리할 것이다. 이것은 면역 복합체 프로세스를 다루고 감염에 대한 숙주 방어를 보조하기 위해 C1q-의존성 보체 활성화 시스템을 온전하게 남겨둘 것이다.

[0128] 렉틴-의존성 보체 시스템을 특이적으로 억제하기 위한 치료제의 개발에서 표적에 대해 바람직한 단백질 구성요소는 MASP-2이다. 렉틴-의존성 보체 시스템의 알려져 있는 모든 단백질 구성요소 (MBL, H-피콜린, M-피콜린, L-피콜린, MASP-2, C2-C9, 인자 B, 인자 D, 및 프로퍼딘) 중에서, MASP-2만이 렉틴-의존성 보체 시스템에 대해 독특하고 시스템이 기능하는 데 필요하다. 렉틴 (MBL, H-피콜린, M-피콜린, L-피콜린 및 CL-11)은 또한 렉틴-의존성 보체 시스템의 독특한 구성요소이다. 그러나, 렉틴 구성요소 중 어느 하나의 손실은 렉틴 중복성 (redundancy)으로 인해 시스템의 활성화를 반드시 억제하지는 않을 것이다. 렉틴-의존성 보체 활성화 시스템의 억제를 보장하기 위해서는 모두 5개의 렉틴을 억제하는 것이 필요할 것이다. 나아가, MBL 및 피콜린이 또한 보체와 무관하게 옅소닌 활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 렉틴 기능의 억제는 감염에 대한 이런 유익한 숙주 방어 메커니즘의 상실을 초래할 것이다. 대조적으로, 이 보체-무관한 렉틴 옅소닌 활성은 만약 MASP-2가 억제 표적이었다면 온전하게 유지되었을 것이다. 렉틴-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하기 위한 치료 표적으로서 MASP-2의 부가된 이익은 MASP-2의 혈장 농도가 임의의 보체 단백질 중에서 가장 낮고 (약 500 ng/ml); 따라서, 완전한 억제를 얻기 위해 상응하게 낮은 농도의 MASP-2의 고친화도 억제제가 충분할 수 있다는 것이다 (Moller-Kristensen, M., et al., *J. Immunol Methods* 282:159-167, 2003).

[0129] III. 혈전성 미세혈관병증에서 MASP-2의 역할 및 MASP-2 억제제를 사용하는 치료 방법

[0130] 개요

[0131] 혈전성 미세혈관병증 (TMA)은 작은 혈관에서의 혈액 응고를 특징으로 하는 병리이다 (Benz, K.; et al., *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19(3):242-7 (2010)). 근본적인 혈관 내피에 대한 스트레스 또는 손상이 주요 동인인 것으로 여겨진다. TMA의 임상적 및 실험실 결과로는 혈소판 감소증(thrombocytopenia), 빈혈(anemia), 자반증(purpura), 및 신부전(renal failure)을 들 수 있다. 고전적 TMA는 용혈성 요독 증후군 (HUS) 및 및 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP)이다. TMA의 특징적인 근본적인 병리적 특징은 혈소판 활성화 및 작은 세동맥 및 정맥에서의 미세혈전의 형성이다. 적어도 부분적으로, 미세혈관 내피에 대한 손상 또는 스트레스에 의해 개시된 보체 활성화는 또한 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS), 전신성 디고스병(systemic Degos disease), 및 암, 암 화학요법 및 이식에 이차적인 TMA를 포함한 다른 TMA에 연루된다.

[0132] 신염군(nephritides)의 숙주에서의 보체의 병리적 역할에 대한 직접적인 증거는 특정 보체 구성요소에 유전적 결핍이 있는 환자의 연구에 의해 제공된다. 많은 보고서가 신장 손상과 보체 조절 인자 H의 결핍의 연관성을 입증하였다 (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet.* 31:424-8, 2002). 인자 H 결핍은 인자 B 및 C3의 활성화-관련 소모로 인해 이들 구성요소의 낮은 혈장 수준을 초래한다. C5b-9의 순환하는 수준 또한 이들 환자의 혈청에서 상승되는데, 이는 보체 활성화를 시사한다.

[0133] 막증식성 사구체신염 (MPGN) 및 특발성 용혈성 요독 증후군 (HUS)은 인자 H 결핍 또는 인자 H의 돌연변이와 관련된다. 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 MPGN-유사 증상을 나타내는데, 이것은 보체 조절에서 인자 H의 중요성을 확인시켜준다. 다른 보체 구성요소의 결핍은 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)의 발병에 이차적인 신장 질환과 관련된다 (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997). C1q, C4 및 C2에 대한 결핍은 면역 복합체 및 세포자멸성 물질의 결함이 있는 제거와 관련된 메커니즘을 통해 SLE의 발병에 대해 강력하게 취약하다. 이들 SLE 환자 중 많은 환자에서 사구체 전체에서 면역복합체의 침착을 특징으로 하는 루푸스 신염이

발생한다.

[0134] aHUS

[0135] 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)은 "혈전성 미세혈관병증(Thrombotic microangiopathies)"으로 불리는 상태군의 일부이다. HUS의 비정형 형태 (aHUS)에서, 질환은 결합이 있는 보체 조절과 관련이 있고 산발적이거나 가족적일 수 있다. aHUS의 가족적인 경우는 보체 인자 H, 인자 I, 인자 B, 막 보조인자 CD46, 뿐만 아니라 보체 인자 H-관련 단백질 1 (CFHR1) 및 보체 인자 H-관련 단백질 3 (CFHR3)을 포함한, 보체 활성화 또는 보체 조절 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이와 관련이 있다 (Zipfel, P.F., et al., *PloS Genetics* 3(3):e41 (2007)). aHUS와 관련된 이런 다양한 배열의 유전자 돌연변이를 통합하는 특징은 세포 또는 조직 표면 상에서의 향상된 보체 활성화 소인이다. 그러므로, 본 발명의 한 측면은 유효량의 MASP-2 억제제를 투여함으로써 인자 H 결핍과 관련된 aHUS를 앓고 있는 환자를 치료하는 것을 포함한다. 본 발명의 또 다른 측면은 유효량의 MASP-2 억제제를 투여함으로써 인자 I, 인자 B, 막 보조인자 CD46, CFHR1 또는 CFHR3 결핍과 관련된 HUS를 앓고 있는 환자를 치료하는 것을 포함한다.

[0136] 다양한 세트의 돌연변이 보체 인자에 의해 유발된 aHUS에서 증강된 보체 활성화의 근본적인 분자 병태생리학을 이해하기 위한 상당한 진전이 최근에 이루어졌다. 이 메커니즘은 인자 H 돌연변이에 대해 가장 잘 이해된다. 인자 H는 숙주 세포 표면에서뿐만 아니라 용액에서 모두 보체 활성화의 음성 조절자로서 작용하는 20개의 짧은 공통 반복 (SCR) 도메인을 포함하는 풍부한 혈청 단백질이다. 그것은 C3의 활성화 형태를 표적으로 하고, 인자 I 및 다른 보조인자와 함께 그것의 비활성화를 촉진하여 추가의 보체 활성화를 미연에 방지한다. 숙주 세포 표면 상에서 보체 활성화를 효과적으로 제어하기 위하여, 인자 H는 숙주 세포와 상호작용할 것을 필요로 하며, 그것은 SCR 도메인 16-20에 의해 매개된다. 지금까지 기술된 aHUS와 관련된 모든 인자 H 돌연변이는 (SCR) 도메인 16-20을 포함하는 C-말단 영역에서 클러스터링된다. 이들 돌연변이 인자 H 단백질은 용액에서 C3 활성화를 제어하는 데 전체적으로 기능적이지만, 숙주 세포 표면과 상호작용할 수 없고 따라서 세포 표면에서 C3 활성화를 제어할 수 없다 (Exp Med 204(6):1249-56 (2007)). 그러므로, 인자 H의 특정 돌연변이는 돌연변이 인자 H 단백질이 숙주 세포 표면과 상호작용하지 못하고 그로써 미세혈관 내피를 포함한 숙주 세포 표면 상에서 보체 활성화를 효과적으로 하향 조절할 수 없기 때문에 aHUS와 관련된다. 그 결과로서, 초기 C3 활성화가 발생한 후에, 후속되는 미세혈관 내피 표면 상에서의 보체 활성화는 인자 H 돌연변이를 가진 환자에서 수그러들지 않고 진행된다. 이런 제어되지 않은 보체 활성화는 결국 혈관 내피에 대한 진행성 손상, 후속되는 혈소판 응집 및 미세혈관 응고, 및 부분적으로 폐색된 미세혈관을 통한 RBC 통과와 진단 능력에 의해 유발된 용혈로 이어진다. 그러므로, aHUS 질환 징후 및 임상적 및 실험실 결과는 미세혈관 내피 표면 상에서 보체의 음성 조절의 결핍과 직접적으로 연결된다.

[0137] 인자 H 돌연변이와 유사하게, 음성 보체 조절 인자 I 및 막 보조인자 단백질 (CD46)에서의 기능 상실(loss-of-function) 돌연변이는 또한 aHUS와 연결된다. aHUS가 이들 단백질의 기능 획득(gain-of-function) 돌연변이와 관련이 있는 것으로 발견되었다는 점에서 그 반대가 인자 B C3 단백질에 대해 관찰되었다 (Pediatr Nephrol 25(12):2431-42 (2010)). 그러므로, 수렴하는 데이터의 숙주는 aHUS 발병에서 보체 활성화가 연루된 것을 시사한다. 이런 생각은 aHUS의 치료에서 말단 보체 단백질 C5를 차단하는 단클론성 항체인 치료 효능 오페쿨리주맵(ofeculizumab)에 의해 가장 설득력있게 지지된다.

[0138] aHUS에서 이펙터 메커니즘으로서의 보체의 중심 역할이 널리 수용된 한편, 보체 활성화를 개시하는 촉발요인 및 연루된 분자 경로는 해결되지 않고 있다. 위에서 기술된 돌연변이를 갖고 있는 모든 개체가 aHUS를 발병시키는 것은 아니다. 실제로, 가족력 연구는 aHUS의 침투도가 겨우 약 50%라고 시사하였다 (Ann Hum Genet 74(1):17-26 (2010)). 질환의 자연적인 이력은 aHUS가 감염성 에피소드 또는 손상과 같은 개시 사건 후에 가장 자주 발생하는 것을 시사한다. 감염원은 보체 시스템을 활성화시키는 것으로 잘 알려져 있다. 기존의 적응 면역이 없을 때, 감염원에 의한 보체 활성화는 렉틴 경로를 통해 주로 개시될 수 있다. 그러므로, 감염에 의해 촉발된 렉틴 경로 활성화는 aHUS-성향의 개체에서 궁극적으로 질환 진행으로 이어지는 보체 활성화의 후속되는 병리적 증폭에 대한 개시 촉발요인을 나타낼 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 유효량의 MASP-2 억제제를 투여함으로써 감염에 이차적인 aHUS를 앓고 있는 환자를 치료하는 것을 포함한다.

[0139] 숙주 조직에 대한 손상, 특히 혈관 내피에 대한 손상의 다른 형태는 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화할 것이다. 산화성 스트레스를 받는 인간 혈관 내피 세포는 예를 들어 렉틴에 결합하여 보체의 렉틴 경로를 활성화하는 표면 모이어티를 발현함으로써 반응한다 (Am J. Pathol 156(6):1549-56 (2000)). 허혈/재관류 후의 혈관 손상 또한 생체내에서 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화한다 (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). 이런 환경에서

렉틴 경로 활성화는 숙주에 대해 병리적 결과를 가져오고, MASP-2를 차단함에 의한 렉틴 경로의 억제는 추가의 숙주 조직 손상 및 불리한 결과를 방지한다 (Schwaebler PNAS 2011).

- [0140] 그러므로, aHUS를 떨어뜨리는 다른 과정은 또한 보체의 렉틴 경로를 활성화하는 것으로 알려진다. 그러므로 렉틴 경로는 유전적으로 aHUS의 성향이 있는 개체에서 규제되지 않은 방식으로 부적절하게 증폭되고, 그로써 aHUS 발병을 개시할 수 있는 초기 보체 활성화 메커니즘을 나타낼 수 있을 가능성이 있다. 추론하면, 항-MASP-2 항체를 포함하여, 렉틴 경로를 통해 보체의 활성화를 차단하는 작용제는 aHUS가 의심되는 개체에서 질환 진행을 방지하거나 악화를 감소시킬 것으로 예상된다.
- [0141] 이 개념을 추가로 지지하는 것으로, 최근 연구는 aHUS의 소아 사례에서 중요한 병인으로서 폐렴구균(*S. pneumoniae*)을 확인하였다 (Nephrology (Carlton), 17:48-52 (2012); Pediatr Infect Dis J. 30(9):736-9 (2011)). 이 특별한 병인학은 유의미한 사망률 및 장기간 이환율과 함께 불리한 예후를 갖는 것으로 나타난다. 특히, 이들 사례는 aHUS에 걸리기 쉬운 것으로 알려져 있는 보체 유전자의 동시 돌연변이의 증거 없이 미세혈관 병증, 요독증(uremia) 및 용혈의 징후로 이어지는 비-장 감염을 포함하였다. 폐렴구균이 특히 보체를 활성화하는 데 효과적이고, 렉틴 경로를 통해 우선적으로 그렇게 한다는 것을 지지하는 것이 중요하다. 그러므로, 폐렴구균 감염과 관련된 비-장 HUS의 경우에, 미세혈관병증, 요독증 및 용혈의 징후는 렉틴 경로의 활성화에 의해 우세하게 구동되며, 항-MASP-2 항체를 포함한, 렉틴 경로를 차단하는 작용제는 이들 환자에서 aHUS의 진행을 방지하거나 질환 중증도를 감소시킬 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 유효량의 MASP-2 억제제를 투여함으로써 폐렴구균과 관련된 비-장 aHUS를 앓고 있는 환자를 치료하는 것을 포함한다.
- [0142] 전술한 설명에 따르면, 일부 구체예에서, aHUS와 관련된 신부전이 발병할 위험이 있는 대상체의 환경에서, 대상체에서 신부전을 개선하거나 방지하기에 효과적인 기간 동안 효과적인 양의 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, aHUS가 발병하거나, aHUS와 관련된 신부전이 발병할 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 방법은 대상체가 aHUS와 관련된 임의의 증상이 시작되기 전에 aHUS가 발병할 위험이 있는지의 여부를 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 구체예에서, 방법은 대상체가 aHUS를 나타내는 적어도 하나의 증상 (예컨대, 빈혈, 혈소판 감소증 및/또는 신부전(renal insufficiency)의 존재)이 시작될 때 및/또는 대상체로부터 얻어진 생검에서 혈전성 미세혈관병증이 존재할 때 aHUS가 발병할 위험이 있는지의 여부를 측정하는 단계를 포함한다. 대상체가 aHUS가 발병할 위험이 있는지의 여부를 측정하는 것은 대상체가 aHUS가 발병할 유전적 성향을 가졌는지를 측정하는 단계를 포함하며, 그것은 (예컨대 대상체의 유전자형을 함유한 데이터베이스로부터) 유전자 정보를 평가함으로써, 또는 게놈 서열분석 또는 유전자-특이적 분석 (예컨대, PCR 분석)을 통해 대상체에 대해 적어도 하나의 유전자 스크리닝 테스트를 수행하여 aHUS와 관련된 유전자 마커의 존재 또는 부재를 측정함으로써 (즉, 보체 인자 H (CFH), 인자 I (CFI), 인자 B (CFB), 막 보조인자 CD46, C3, 보체 인자 H-관련 단백질 1 (CFHR1), 또는 THBD (항응고 단백질 트롬보모듈린을 암호화함) 또는 보체 인자 H-관련 단백질 3 (CFHR3), 또는 보체 인자 H-관련 단백질 4 (CFHR4)를 암호화하는 유전자에서 aHUS와 관련된 유전자 돌연변이의 존재 또는 부재를 측정함으로써), 및/또는 대상체가 aHUS의 가족력을 가졌는지의 여부를 측정함으로써 수행될 수 있다. aHUS와 관련된 유전자 돌연변이의 존재 또는 부재에 대해 유전자 스크리닝하는 방법은 잘 확립되어 있고, 예를 들어, Noris M et al. "Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome", 2007 Nov 16 [Updated 2011 Mar 10]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™, Seattle (WA): University of Washington, Seattle을 참고한다.
- [0143] 예를 들어, 보체 인자 H (CFH)의 돌연변이가 있는 사람들에서 질환의 전체 침투도는 48%이고, CD46의 돌연변이의 경우 침투도는 53%이며, CFI의 돌연변이의 경우 50%이고, C3의 돌연변이의 경우 56%이며 THBD의 돌연변이의 경우 64%이다 (Caprioli J. et al., Blood, 108:1267-79 (2006); Noris et al., Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59 (2010)). Caprioli et al., (2006), supra에서 기술되는 것과 같이, 보체 인자 H (CFH)에 돌연변이가 있는 개체의 상당한 수는 aHUS를 결코 발병시키지 않으며, 이들 개체에서 차선적인 CFH 활성이 생리적 조건에서 숙주를 보체 활성화의 영향으로부터 보호하기에 충분한 것으로 가정되지만, 차선적인 CFH 활성화는 보체를 활성화하는 작용제에 대한 노출로 C3b의 정상적인 양보다 많이 생성될 때 C3b가 혈관 내피 세포 상에 침착되는 것을 방지하기에는 충분하지 않다.
- [0144] 따라서, 한 구체예에서, MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제제를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 비-인자 H-의존성 비정형 용혈성 요독 증후군을 앓고 있거나, 또는 발병할 위험이 있는 대상체에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법이 제공된다. 또 다른 구체예에서, 빈혈, 혈소판 감소증 또는 상승하는 크레아티닌의 존재 또는 부재를 측정하기 위해 대상체를 주기적으로 모

니터링하는 단계, 및 빈혈, 혈소판 감소증, 또는 상승하는 크레아티닌의 존재가 측정될 때 MASP-2 억제제로 치료하는 단계를 포함하는, 인자 H-의존성 비정형 용혈성 요독 증후군이 발병할 위험이 있는 대상체에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법이 제공된다. 또 다른 구체예에서, aHUS 임상 증상을 촉발시키는 것과 관련된 것으로 알려져 있는 사건 전에, 또는 중에, 또는 후에, 예를 들어, 노출 (예컨대, 화학요법), 감염 (예컨대, 박테리아 감염), 악성 종양, 손상, 장기 또는 조직 이식, 또는 임신 중에 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 인자 H-의존성 aHUS가 발병할 위험이 있는 대상체가 aHUS와 관련된 임상 증상을 겪을 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0145] 한 구체예에서, 빈혈, 혈소판 감소증 또는 상승하는 크레아티닌의 존재 또는 부재를 측정하기 위해 대상체를 주기적으로 모니터링하는 단계, 및 빈혈, 혈소판 감소증, 또는 상승하는 크레아티닌의 존재가 측정될 때 MASP-2 억제제로 치료하는 단계를 포함하는, aHUS가 발병할 위험이 있는 대상체가 aHUS와 관련된 임상 증상을 겪을 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0146] 또 다른 구체예에서, aHUS 임상 증상을 촉발시키는 것과 관련된 것으로 알려져 있는 사건 전에, 또는 중에, 또는 후에, 예를 들어, 노출 (예컨대, 화학요법), 감염 (예컨대, 박테리아 감염), 악성 종양, 손상, 장기 또는 조직 이식, 또는 임신 중에 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, aHUS가 발병할 위험이 있는 대상체가 aHUS와 관련된 임상 증상을 겪을 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0147] 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 aHUS 임상 증상을 촉발시키는 것과 관련된 것으로 알려져 있는 사건 전에, 또는 중에, 또는 후에, 적어도 1, 2, 3, 4일, 또는 그 이상의 기간 동안 투여되며 상태가 해소될 때까지 또는 제어될 때까지 의사에 의해 결정된 대로 반복될 수 있다. 사전-aHUS 환경에서, MASP-2 억제제는 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0148] 일부 구체예에서, aHUS의 초기 진단된 환경에서, 또는 aHUS의 진단과 일치하는 하나 이상의 증상 (예컨대, 빈혈, 혈소판 감소증 및/또는 신부전의 존재)을 나타내는 대상체에서, 대상체는 혈장분리교환술(plasmapheresis)의 부재 하에, 또는 혈장분리교환술과 함께 제1선 치료법으로서 유효량의 MASP-2 억제제 (예컨대, 항-MASP-2 항체)로 치료된다. 제1선 치료법으로서, MASP-2 억제제는 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 출혈, 감염, 및 혈장 기증자에게 고유한 장애 및/또는 알레르기에 대한 노출을 포함한 혈장분리교환술의 잠재적 합병증을 피하기 위해 혈장분리교환술의 부재 하에, 또는 그렇지 않으면 혈장분리교환술을 싫어하는 대상체에서, 또는 혈장분리교환술을 이용할 수 없는 환경에서 제1선 치료법으로서 대상체에게 투여된다.

[0149] 일부 구체예에서, 방법은 aHUS를 앓고 있는 대상체에게 MASP-2 억제제를 제1 기간 (예컨대, 적어도 1일 내지 1주 또는 2주) 동안 카테터를 통해 (예컨대, 정맥내로) 투여한 후 MASP-2 억제제를 대상체에게 제2 기간 (예컨대, 적어도 2주 또는 그 이상의 만성 단계) 동안 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 시간 내의 투여는 혈장분리교환술의 부재 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 방법은 치료 전에, 선택적으로 치료 중에 적어도 하나의 보체 인자 (예컨대, C3, C5)의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하며, 표준 값 또는 건강한 대조군 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 측정은 MASP-2 억제제로의 지속적인 치료에 대한 필요성을 나타낸다.

[0150] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체를 aHUS를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 정맥내로, 근육내로, 또는 바람직하게는 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 만성적일 수 있고 매일 내지 월별로, 바람직하게는 2주마다 투여될 수 있다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 C5 억제제, 예컨대 에쿨리주맙과 함께 투여될 수 있다.

[0151] HUS

[0152] 비정형 HUS와 같이, 전형적인 형태의 HUS는 TMA의 모든 임상적 및 실험실 결과를 나타낸다. 그러나, 전형적인 HUS는 자주 소아과 질환이며 일반적으로 가족적인 구성요소나 보체 유전자의 돌연변이와의 직접적인 연관성이 없다. 전형적인 HUS의 병인은 특정 장 병원체로의 감염과 밀접하게 관련된다. 환자는 전형적으로 일반적으로 출혈성 설사의 에피소드가 이어지는 급성 신부전, 헤모글로빈뇨(hemoglobinuria), 및 혈소판 감소증을 나타낸다. 상태는 시겔라 디센테리아(*Shigella dysenteriae*), 살모넬라(*Salmonella*) 또는 대장균 O157:H7과 같은 대장균의 시가 독소(Shiga toxin)-유사 생성 장출혈 스트레인으로의 장 감염에 의해 유발된다. 병원체는 오염된 식품이나 급수로부터 획득된다. HUS는 의학적 응급상태이고 5-10%의 사망률을 나타낸다. 상당 부분의 생존자가 만성

신장 질환이 발생하고 (Corrigan and Boineau, *Pediatr Rev* 22 (11): 365-9 (2011)) 신장 이식을 필요로 할 수 있다.

[0153] 전형적인 HUS에서 미세혈관 응고는, 독점적이지는 않지만, 주로 신장 미세혈관에서 일어난다. 근본적인 병태생리학은 시가 독소 (STX)에 의해 매개된다. 장질환 미생물에 의해 장 루멘으로 분비된 STX는 장의 장벽일 가로질러 혈류로 진입하여, 사구체 내피 상에서 우선적으로 발현되고 STX의 독성 효과를 매개하는 블로보트라이아오실 세라마이드 수용체 CD77을 통하여 혈관 내피 세포에 결합한다 (Boyd and Lingwood *Nephron* 51:207 (1989)). 내피에 결합된 후에, STX는 혈관 내피를 손상시키고, 백혈구를 활성화하며 vWF-의존성 혈전 형성을 유발하는 일련의 사건을 유도한다 (Forsyth et al., *Lancet* 2: 411-414 (1989); Zoja et al., *Kidney Int.* 62: 846-856 (2002); Zanchi et al., *J. Immunol.* 181:1460-1469 (2008); Morigi et al., *Blood* 98: 1828-1835 (2001); Guessou et al., *Infect. Immun.*, 73: 8306-8316 (2005)). 이들 미세혈전은 신장 및 다른 장기의 세동맥 (arterioles) 및 모세혈관을 방해하고 차단한다. 세동맥 및 모세혈관에서 미세혈전에 의한 혈류의 방해는 그것이 좁아진 혈관을 통해 쥐어짜기 때문에 RBC에 인가된 전단력을 증가시킨다. 이것은 전단력에 의한 RBC의 파괴 및 소위 분열적혈구(schistocytes)로 불리는 RBC 단편의 형성을 초래한다. 분열적혈구의 존재는 HUS의 특징적인 결과이다. 이 메커니즘은 미세혈관병증성 용혈(microangiopathic hemolysis)로서 알려졌다. 더불어, 혈류의 방해는 영향을 받은 장기에 대한 추가 손상을 유발하는 보체-매개 염증 반응을 시작하는 허혈을 초래한다.

[0154] 보체의 렉틴 경로는 2개의 주된 메커니즘에 의해 HUS의 병인에 기여한다: 1) 내피 손상에 의해 유발된 응고 캐스케이드의 MASP-2-매개 직접 활성화, 및 2) 미세혈관 혈류의 초기 폐색으로부터 유발된 허혈에 의해 유도된 렉틴-매개 후속 보체 활성화.

[0155] STX는 미세혈관 내피 세포를 손상시키고, 손상된 내피 세포는 보체 시스템을 활성화하는 것으로 알려져 있다. 위에서 상세하게 설명된 것과 같이, 내피 세포 손상 후의 보체 활성화는 주로 렉틴 경로에 의해 구동된다. 산화성 스트레스를 받은 인간 혈관 내피 세포는 렉틴에 결합하여 보체의 렉틴 경로를 활성화하는 표면 모이어티를 발현함으로써 반응한다 (Collard et al., *Am J Pathol.* 156(5):1549-56 (2000)). 허혈 재관류 후의 혈관 손상 또한 생체내에서 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화한다 (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). 이런 환경에서 렉틴 경로 활성화는 숙주에 대한 병리적 결과를 가지며, MASP-2의 차단에 의한 렉틴 경로의 억제제는 추가의 숙주 조직 손상 및 불리한 결과를 방지한다 (Schwaeble et al., *PNAS* (2011)). 보체 활성화 외에, MASP-2의 렉틴-의존성 활성화는 트롬빈을 형성하고 응고를 촉진하기 위한 프로트롬빈의 절단을 초래하는 것으로 나타났다. 그러므로, 손상된 내피 세포에 의한 보체의 렉틴 경로의 활성화는 응고 시스템을 직접적으로 활성화할 수 있다. 그러므로, MASP-2-매개 프로트롬빈 활성화에 의한 보체의 렉틴 경로는 STX에 의한 초기 내피 손상을 HUS에서 발생하는 응고 및 미세혈관 혈전증(thrombosis)에 연결시키는 우세한 분자 경로일 가능성이 있다. 그러므로 한정하는 것은 아니지만, MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하여 렉틴 경로 억제제는 HUS를 앓고 있는 환자에서 미세혈관 응고, 혈전증 및 용혈을 방지하거나 완화시킬 것으로 예상된다. 실제로, 항-MASP-2 항체의 투여는 전형적인 HUS의 모델에서 마우스를 완전히 보호한다. 실시예 36에서 기술되고 도 45에서 나타난 것과 같이, STX 및 LPS에 노출된 대조군 마우스는 전부 중증의 HUS를 발병하였고 48시간 이내에 빈사 상태가 되거나 사망하였다. 다른 한편으로, 추가로 도 45에서 나타난 것과 같이, 항-MASP-2 항체로 처리된 후 STX 및 LPS에 노출된 마우스는 전부 생존하였다 (피서 정확 검정 $p < 0.01$; $N=5$ 마리). 그러므로, 항-MASP-2 치료는 이 HUS 모델에서 마우스를 완전히 보호한다. MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 항체의 투여는 HUS 환자의 치료에 효과적일 것이고 미세혈관 응고, 혈전증, 및 장벽원성 대장균 또는 다른 STX-생성 병원체로의 감염에 의해 유발된 용혈로부터의 보호를 제공할 것이다.

[0156] STX에 의해 유발된 HUS에 대해 여기서 나타냈지만, 항-MASP-2 치료법은 또한 다른 독성 작용제에 의해 유발된 내피 손상으로 인한 HUS-유사 증후군에도 유효할 것으로 예상된다. 이런 것으로는 미토마이신, 티클로피딘, 시스플라틴, 퀴닌, 사이클로스포린, 블레오마이신 뿐만 아니라 다른 화학요법 약물 및 면역억제 약물과 같은 작용제를 들 수 있다. 그러므로, 항-MASP-2 항체 요법, 또는 MASP-2 활성을 억제하는 다른 양상은 응고, 혈전 형성, 및 RBC 파괴를 효과적으로 방지하거나 제한하고 HUS 및 다른 TMA 관련 질환 (즉, aHUS 및 TTP)에서 신부전을 방지할 것으로 예상된다.

[0157] HUS를 앓고 있는 환자는 자주 설사 및 구토를 나타내고, 그들의 혈소판 수는 보통 감소되며 (혈소판 감소증), RBC는 감소된다 (빈혈). 전-HUS 설사 단계는 전형적으로 약 4일 동안 지속되며, 그 와중에 HUS를 발병할 위험이 있는 대상체는 전형적으로 중증의 설사 외에 다음 증상 중 하나 이상을 나타낸다: 혈관내 적혈구 파괴의 도말 증거를 포함하여 30% 미만의 헤마토크릿 수준, 혈소판 감소증 (혈소판 수 $< 150 \times 10^3/\text{mm}^3$), 및/또는 손상된 신장

기능의 존재 (연령대 기준의 상한보다 더 큰 혈청 크레아티닌 농도). 희소뇨증(oligoanuria) (1일 이상 동안 소변 배출 ≤ 0.5 mL/kg/시간)의 존재는 HUS 발병을 향한 진행에 대한 척도로서 사용될 수 있다 (C. Hickey et al., *Arch Pediatr Adolesc Med* 165(10):884-889 (2011) 참고). 테스트는 전형적으로 대장균 박테리아 (대장균 O157:H7), 또는 시겔라 또는 살모넬라 종으로의 감염의 존재에 대해 수행된다. 장내 대장균 (예컨대, 대장균 O157:H7)으로의 감염에 대해 양성으로 테스트된 대상체에서, 항생물질의 사용이 증가된 STX 생성을 통해 HUS를 발병시킬 위험을 증가시킬 수 있기 때문에 항생물질의 사용은 금기이다 (Wong C. et al., *N Engl J. Med* 342:1930-1936 (2000) 참고). 시겔라 또는 살모넬라에 대해 양성으로 테스트된 대상체의 경우, 항생물질은 전형적으로 감염을 제거하기 위해 투여된다. HUS에 대한 다른 잘 확립된 제1선 치료법으로는 부피 팽창, 투석 및 혈장분리교환술을 들 수 있다.

[0158] 전술한 설명에 따르면, 일부 구체예에서, 전-HUS 단계와 관련된 하나 이상의 증상을 앓고 있거나 HUS가 발병할 위험이 있는 (즉, 대상체는 다음 중 하나 이상을 나타냄: 설사, 혈관내 적혈구 파괴의 도말 증거가 있는 30% 미만의 헤마토크릿 수준, 혈소판 감소증 ($150 \times 10^3/\text{mm}^3$ 미만의 혈소판 수), 및/또는 손상된 신장 기능의 존재 (연령별 기준의 상한보다 큰 혈청 크레아티닌 농도)) 대상체의 환경에서, 손상된 신장 기능을 개선하거나 방지하기에 효과적인 기간 동안 효과적인 양의 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 HUS가 발병할 위험을 감소시키거나, 또는 신부전의 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 적어도 1, 2, 3, 4일 또는 그 이상의 기간 동안 투여되며, 상태가 해소되었거나 제어될 때까지 의사에 의해 결정된 대로 반복될 수 있다. 전-HUS 환경에서, MASP-2 억제제는 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 코, 경구, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0159] 대장균 O157:H7 감염의 살균 항생제, 특히 β -락탐으로의 치료는 증가된 HUS 발병 위험과 관련되었다 (Smith et al., *Pediatr Infect Dis J* 31(1):37-41 (2012)). 일부 구체예에서, 대상체가 장내 대장균으로 감염된 것으로 알려져 있고 그에 대한 항생제 사용이 금기되어 있는 (예컨대, 대장균 O157:H7) 전-HUS 단계와 관련된 증상을 앓고 있는 대상체의 환경에서, 대상체에서 희소뇨증의 존재를 억제하거나 방지하기에 효과적인 제1 기간 (예컨대, 적어도 1, 2, 3 또는 4일) 동안 효과적인 양의 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 HUS가 발병할 위험을 감소시키거나, 또는 신부전의 가능성을 감소시키는 방법이 제공되며, 제1 기간 중의 MASP-2 억제제의 투여는 항생제의 부재 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 제2 기간 (예컨대 적어도 1 내지 2주) 동안 항생제와 함께 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0160] 다른 구체예에서, 대상체가 시겔라 또는 살모넬라로 감염된 것으로 알려져 있는 (예컨대, 대장균 O157:H7) 전-HUS 단계와 관련된 증상을 앓고 있는 대상체의 환경에서, 대상체에서 희소뇨증의 존재를 억제하거나 방지하기에 효과적인 기간 동안 효과적인 양의 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 HUS가 발병할 위험을 감소시키거나, 또는 신부전의 가능성을 감소시키는 방법이 제공되며, MASP-2 억제제의 투여는 적합한 항생제의 존재 또는 부재 하에 일어난다.

[0161] 일부 구체예에서, HUS의 초기 진단의 환경에서, 또는 HUS의 진단과 일치하는 하나 이상의 증상 (예컨대, 신부전의 존재, 또는 낮은 피브리노겐의 부재 하에 미세혈관병증성 용혈성 빈혈, 또는 혈소판 감소증)을 나타내는 대상체에서, 대상체는 혈장분리교환술의 부재 하에, 또는 혈장분리교환술과 함께 제1선 치료법으로서 유효량의 MASP-2 억제제 (예컨대 항-MASP-2 항체)로 치료된다. 제1선 치료법으로서, MASP-2 억제제는 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 출혈, 감염, 및 혈장 기증자에게 고유한 장애 및/또는 알레르기에 대한 노출과 같은 혈장분리교환술의 합병증을 피하기 위해 혈장분리교환술의 부재 하에, 또는 그렇지 않으면 혈장분리교환술을 싫어하는 대상체에서, 또는 혈장분리교환술을 이용할 수 없는 환경에서 제1선 치료법으로서 대상체에게 투여된다.

[0162] 일부 구체예에서, 방법은 HUS를 앓고 있는 대상체에게 MASP-2 억제제를 제1 기간 (예컨대, 적어도 1일 내지 1주 또는 2주 지속되는 급성 단계) 동안 카테터를 통해 (예컨대, 정맥내로) 투여한 후 MASP-2 억제제를 대상체에게 제2 기간 (예컨대, 적어도 2주 또는 그 이상의 만성 단계) 동안 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 시간 내의 투여는 혈장분리교환술의 부재 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 방법은 치료 전에, 선택적으로 치료 중에 적어도 하나의 보체 인자 (예컨대, C3, C5)의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하며, 표준 값 또는 건강한 대조군 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 측정은 치료에 대한 필요성을 나타내고, 정상 수준의 측정은 개선을 나타낸다.

[0163] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체를 HUS를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 피하로 또는 정맥내로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 바람직하게는 매일 하지만, 매주 또는 매

윌처럼 드물 수 있다. 치료는 적어도 1주 동안 및 길게는 3개월 동안 계속될 수 있다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 C5 억제제, 에컨대 에컬리주맙과 함께 투여될 수 있다.

[0164] **TTP:**

[0165] 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP)은 응고 캐스케이드 또는 보체 시스템을 활성화하는 자가면역 또는 유전적 기능장애에 의해 유발된 혈류 시스템의 생명을 위협하는 장애이다 (George, JN, *N Engl J Med*; 354:1927-35 (2006)). 이것은 신체 전체의 작은 혈관에서 수많은 미세한 응고물, 또는 혈전을 초래한다. 적혈구는 막을 손상시키는 전단 응력을 받아 혈관내 용혈로 이어진다. 결과적으로 생성된 감소된 혈류 및 내피 손상을 뇌, 심장, 및 신장을 포함한 장기 손상을 초래한다. TTP는 임상적으로 혈소판 감소증, 미세혈관병증성 용혈성 빈혈, 신경학적 변화, 신부전 및 열을 특징으로 한다. 혈장 교환 이전 시대에, 치명률은 급성 에피소드 동안 90%였다. 혈장 교환을 사용하여도, 6개월째 생존율은 약 80%이다.

[0166] TTP는 폰 빌레브란트 인자 (vWF)의 큰 멀티머의 작은 유닛으로의 절단을 담당하는 메탈로프로테아제인 효소 ADAMTS-13의 유전적 또는 후천적 억제로부터 발생할 수 있다. ADAMTS-13 억제 또는 결핍은 궁극적으로 증가된 응고를 초래한다 (Tsai, H. *J Am Soc Nephrol* 14: 1072-1081, (2003)). ADAMTS-13은 vWF의 활성을 조절하며; 그것의 부재시, vWF는 혈소판에 결합할 가능성이 더 많은 큰 멀티머를 형성하고 환자가 미세혈관에서 혈소판 응집 및 혈전증을 일으키기 쉽게 만든다.

[0167] 업쇼-슐만 증후군 (Upshaw-Schulman syndrome, USS, 또한 선천적 TTP로도 기술됨)은 ADAMTS13 유전자 돌연변이로 인한 ADAMTS13 활성의 선천적 결핍이다 (Schulman et al., *Blood*, 16(1):943-57, 1960; Upshaw et al., *New Engl. J. Med*, 298 (24):1350-2, 1978). ADAMTS13의 수많은 돌연변이가 선천적 TTP를 가진 개인에서 확인되었다 (Kinoshita et al., *International Journal of Hematology*, 74:101-108 (2001); Levy et al., *Nature*, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame et al., *PNAS* 99(18):11902-11907 (2002); Savasan et al., *Blood*, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto et al., *Blood*, 103:1305-1310 (2004) 및 Fujimura et al., *Brit. J. Haemat* 144:742-754 (2008)). USS를 가진 대상체는 전형적으로 정상 ADAMTS13 활성의 5-10%를 가진다 (Kokame et al., *PNAS* 99(18):11902-11907, 2002). 비록 후천적 TTP 및 USS가 약간의 유사성이 있지만, USS는 임상적 특징에 일부 중요한 차이를 가진다. USS는 일반적으로 유아 또는 아동에게서 나타나며 출생 직후 콕스 테스트(Coombs test) 음성, 신선한 혈장 주입에 대한 반응, 및 빈번한 재발과 함께 중증의 고빌리루빈혈증(hyperbilirubinemia)을 특징으로 한다 (Savasan et al., *Blood*, 101:4449-4451, 2003). 일부 경우에, 이 유전성 ADAMTS13 결핍을 가진 환자는 출생시 경미한 표현형을 나타내며 폰 빌레브란트 인자 수준이 증가된 임상 상황, 예컨대 감염 또는 임신시에만 TTP와 관련된 증상을 발달시킨다. 예를 들어, Fujimura 등은 유전적으로 확인된 USS를 가진 6 가족으로부터 9명의 일본 여성이 첫 번째 임신 중에 이 장애로 진단받은 것을 보고하였다. 혈소판 감소증은 15번의 임신의 각각에서 임신 2개월 내지 3개월 중에 발생하였고, 종종 TTP가 이어졌다. 이들 여성은 전부 ADAMTS13 활성이 심각하게 결핍된 것으로 나타났다 (Fujimura et al., *Brit. J. Haemat* 144:742-754, 2008).

[0168] 전술한 설명에 따르면, 일부 구체예에서, 업쇼-슐만 증후군 (USS)을 가진 대상체 (즉, 대상체는 ADAMTS13 활성이 결핍된 것으로 알려져 있거나 및/또는 대상체는 하나 이상의 ADAMTS13 유전자 돌연변이(들)를 가진 것으로 알려져 있음)의 환경에서, TTP와 관련된 하나 이상의 임상 증상을 개선 또는 방지하기에 효과적인 기간 동안 효과적인 양의 MASP-2 억제제 (예컨대, MASP-2 항체)를 투여하는 단계를 포함하는, 선천적 TTP와 관련된 임상 증상 (예컨대, 혈소판 감소증, 빈혈, fever, 및/또는 신부전)이 발생할 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 방법은 TTP와 관련된 임의의 증상이 개시되기 전에, 또는 TTP를 나타내는 적어도 하나 이상의 증상 (예컨대, 빈혈, 혈소판 감소증 및/또는 신부전의 존재)이 개시될 때 대상체가 선천적 TTP와 관련된 증상을 발병할 위험이 있는지를 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 대상체가 선천적 TTP와 관련된 증상을 발병할 위험이 있는지 (즉, 대상체가 USS를 가지는지)의 측정은 대상체가 ADAMTS13을 암호화하는 유전자에 돌연변이를 가지는지를 측정하는 단계, 및/또는 대상체가 ADAMTS13 활성이 결핍되어 있는지를 측정하는 단계, 및/또는 대상체가 USS의 가족력이 있는지를 측정하는 단계를 포함한다. USS와 관련된 유전자 돌연변이의 존재 또는 부재에 대한 유전자 스크리닝 방법은 잘 확립되어 있고, 예를 들어 Kinoshita et al., *International Journal of Hematology*, 74:101-108 (2001); Levy et al., *Nature*, 413 (6855):488-494 (2001); Kokame et al., *PNAS* 99(18):11902-11907 (2002); Savasan et al., *Blood*, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto et al., *Blood*, 103:1305-1310 (2004) 및 Fujimura et al., *Brit. J. Haemat* 144:742-754 (2008)을 참고한다.

[0169] 한 구체예에서, 빈혈, 혈소판 감소증 또는 상승하는 크레아티닌의 존재 또는 부재를 측정하기 위하여 대상체를

주기적으로 모니터링하는 단계, 및 빈혈, 혈소판 감소증 또는 상승하는 크레아티닌의 존재가 측정될 때, 또는 TTP 임상 증상을 촉발시키는 것과 관련된 것으로 알려져 있는 사건, 예를 들어, 약물 노출 (예컨대, 화학요법), 감염 (예컨대 박테리아 감염), 악성 종양, 손상, 이식, 또는 임신의 존재시에 MASP-2 억제제 (예컨대, MASP-2 항체)로 치료하는 단계를 포함하는, USS로 진단된 대상체가 TTP와 관련된 임상 증상을 앓을 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0170] 또 다른 구체예에서, TTP와 관련된 하나 이상의 임상 증상을 개선 또는 방지하기에 효과적인 기간 동안 효과적인 양의 MASP-2 억제제 (예컨대, MASP-2 항체)를 투여하는 단계를 포함하는, USS를 가지며 TTP와 관련된 임상 증상을 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법이 제공된다.

[0171] TTP는 또한 ADAMTS-13에 대한 자가항체로 인해 발생할 수 있다. 더불어, TTP는 유방암, 위장관암, 또는 전립선암 중에 (George JN., *Oncology* (Williston Park). 25:908-14 (2011)), 임신 중에 (두번째 삼분기 또는 출산 후) (George JN., *Curr Opin Hematol* 10:339-344 (2003)) 발생할 수 있거나, 또는 질환, 예컨대 HIV 또는 전신성 홍반성 루푸스와 같은 자가면역 질환과 관련된다 (Hamasaki K, et al., *Clin Rheumatol*.22:355-8 (2003)). TTP는 또한 해파린, 퀴닌, 면역매개된 성분, 암 화학요법제 (블레오마이신, 시스플라틴, 시토신 아라비노시드, 다우노마이신 겐시타빈, 미토마이신 C, 및 타목시펜), 사이클로스포린 A, 경구용 피임제, 페니실린, 리파민 및 티클로피딘(ticlopidine) 및 클로피도그렐(clopidogrel)을 포함한 항-혈소판 약물을 포함한, 특정 약물 요법에 의해 유발될 수 있다 (Azarm, T. et al., *J Res Med Sci.*, 16: 353-357 (2011)). TTP와 관련된 다른 인자 또는 상태는 봉독과 같은 독소, 패혈증, 비장 격리, 이식, 혈관염(vasculitis), 혈관 수술, 및 폐렴구균 및 사이토메갈로바이러스같은 감염이다 (Moake JL., *N Engl J Med.*, 347:589-600 (2002)). 일시적인 기능성 ADAMTS-13 결핍으로 인한 TTP는 폐렴구균 감염과 관련된 내피 세포 손상의 결과로서 발생할 수 있다 (*Pediatr Nephrol.*, 26:631-5 (2011)).

[0172] 혈장 교환은 TTP에 대한 표준 치료이다 (Rock GA, et al., *N Engl J Med* 325:393-397 (1991)). 혈장 교환은 유전자 결함이 있는 환자에서 ADAMTS-13 활성을 대체하며 후천적 자가면역 TTP가 있는 그런 환자에서 ADAMTS-13 자가항체를 제거한다 (Tsai, H-M, *Hematol Oncol Clin North Am.*, 21(4): 609-v (2007)). 면역억제 약물과 같은 추가적인 작용제가 치료법에 일상적으로 첨가된다 (George, JN, *N Engl J Med*, 354:1927-35 (2006)). 그러나, 혈장 교환은 약 20%의 환자의 경우 성공적이지 못하고, 환자의 1/3 이상에서 재발이 발생하며, 혈장분리교환술은 비싸고 기술적으로 까다롭다. 나아가, 많은 환자가 혈장 교환을 견딜 수 없다. 따라서, TTP에 대한 추가적이고 더 나은 치료에 대한 중요한 필요성이 남아 있다.

[0173] TTP가 혈액 응고 캐스케이드의 장애이기 때문에, 보체 시스템의 길항물질을 사용한 치료가 질환을 안정화시키고 교정하는 데 도움이 될 수 있다. 대체 보체 경로의 병리적 활성화가 aHUS에 연관되지만, TTP에서 보체 활성화의 역할은 덜 분명하다. ADAMTS13의 기능 결핍은 TTP의 감수성에 중요하지만, 급성 에피소드를 유발하기에는 충분하지 않다. 환경적 요인 및/또는 다른 유전자 변이가 TTP의 징후에 기여할 수 있다. 예를 들어, 응고 캐스케이드, vWF, 혈소판 기능, 내피 혈관 표면의 구성요소, 또는 보체 시스템의 조절에 관여하는 단백질을 암호화하는 유전자는 급성 혈전성 미세혈관병증의 발생에 연루될 수 있다 (Galbusera, M. et al., *Haematologica*, 94: 166-170 (2009)). 특히, 보체 활성화는 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다; ADAMTS-13 결핍과 관련된 혈전성 미세혈관병증으로부터의 혈청은 C3 및 MAC 침착 및 보체 비활성화에 의해 없어질 수 있는 후속되는 호중구 활성화를 유발하는 것으로 나타났다 (Ruiz-Torres MP, et al., *Thromb Haemost*, 93:443-52 (2005)). 더불어, 최근에 TTP의 급성 에피소드 중에 C4d, C3bBbP, 및 C3a의 수준이 증가되는 것으로 나타났고 (M. Reti et al., *J Thromb Haemost*. Feb 28.(2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x. [Epub ahead of print]), 이것은 고전적/렉틴 및 대체 경로의 활성화와 일치한다. 급성 에피소드 중의 이런 증가된 양의 보체 활성화는 말단 경로 활성화를 개시할 수 있고 TTP의 추가 악화의 원인이 될 수 있다.

[0174] TTP에서 ADAMTS-13 및 vWF의 역할은 분명하게 혈소판의 활성화 및 응집의 원인이 되고 그것들의 후속 역할은 미세혈관병증에서 전단 응력 및 침착에 있다. 활성화된 혈소판은 보체의 고전적 및 대체 경로 둘 다와 상호작용하여 그것들을 촉발시킨다. 혈소판 매개된 보체 활성화는 염증 매개체 C3a 및 C5a를 증가시킨다 (Peerschke E et al., *Mol Immunol*, 47:2170-5 (2010)). 그러므로 혈소판은 유전된 또는 자가면역 TTP에서 고전적 보체 활성화의 표적으로서 작용할 수 있다.

[0175] 위에서 기술된 것과 같이, MASP-2 매개된 프로트롬빈 활성화에 의한 보체의 렉틴 경로는 내피 손상을 응고 및 HUS에서 발생하는 미세혈관 혈전증에 연결시키는 우세한 분자 경로이다. 유사하게, 보체의 렉틴 경로의 활성화는 TTP의 응고 시스템을 직접 구동시킬 수 있다. 렉틴 경로 활성화는 TTP의 ADAMTS-13 결핍에 의해 유발된 초기

내피 손상에 대한 반응으로 시작될 수 있다. 그러므로 한정하는 것은 아니지만 MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하여, 렉틴 경로 억제제는 TTP를 앓고 있는 환자에서 미세혈관 응고, 혈전증, 및 용혈과 관련된 미세혈관병증을 완화시킬 것으로 예상된다.

- [0176] TTP를 앓고 있는 환자는 전형적으로 다음 중 하나 이상으로 응급실에 온다: 자반증, 신부전, 낮은 혈소판, 빈혈 및/또는 뇌졸중을 포함한, 혈전증. TTP에 대한 현재 치료 기준은 2주 이상의 기간 동안, 전형적으로 주 3회, 그러나 최대 매일 대체 혈장분리교환술의 카테터내 전달 (예컨대, 정맥내 또는 다른 형태의 카테터)을 포함한다. 만약 대상체가 ADAMTS13의 억제제 (즉, ADAMTS13에 대한 내인성 항체)의 존재에 대해 양성으로 테스트되면, 혈장분리교환술이 면역억제 요법 (예컨대, 코르티코스테로이드, 리툭산, 또는 사이클로스포린)과 함께 수행될 수 있다. 불응성 TTP를 가진 대상체 (대략 20%의 TTP 환자)는 적어도 2주의 혈장분리교환술 요법에 반응하지 않는다.
- [0177] 전술한 설명에 따르면, 한 구체예에서, TTP의 초기 진단의 환경에서 또는 TTP의 진단과 일치하는 하나 이상의 증상 (예컨대, 중추신경계 침범, 중증의 혈소판 감소증 (아스피린을 끊으면 $5000/\mu\text{L}$ 이하, 아스피린을 복용 중이면 $20,000/\mu\text{L}$ 이하의 혈소판 수), 중증의 심장 침범, 중증의 폐 침범, 위장 경색 또는 괴저(gangrene))을 나타내는 대상체에서, 혈장분리교환술의 부재 하에, 또는 혈장분리교환술과 함께 제1선 치료법으로서 유효량의 MASP-2 억제제 (예컨대, 항-MASP-2 항체)로 대상체를 치료하는 방법이 제공된다. 제1선 치료법으로서, MASP-2 억제제는 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 혈장분리교환술의 잠재적 합병증, 예컨대 출혈, 감염, 및 혈장 기증자에 고유한 장애 및/또는 알레르기에 대한 노출을 피하기 위하여, 또는 그렇지 않으면 혈장분리교환술을 싫어하는 대상체에서, 또는 혈장분리교환술을 이용할 수 없는 환경에서 혈장분리교환술의 부재 하에 제1선 치료법으로서 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 TTP를 앓고 있는 대상체에게 면역억제제 (예컨대, 코르티코스테로이드, 리툭산 또는 사이클로스포린)와 함께 (공동 투여를 포함함) 및/또는 농축된 ADAMTS-13과 함께 투여된다.
- [0178] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 TTP를 앓고 있는 대상체에게 카테터를 통해 (예컨대, 정맥내로) 제1기간 (예컨대, 적어도 1일 내지 1주 또는 2주 지속되는 급성 단계) 동안 투여한 후 MASP-2 억제제를 대상체에게 피하로 제2기간 (예컨대, 적어도 2주 이상의 만성 단계) 동안 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2기간의 투여는 혈장분리교환술의 부재 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 방법은 대상체가 TTP와 관련된 하나 이상의 증상을 앓는 것을 방지하도록 대상체를 유지하기 위해 사용된다.
- [0179] 또 다른 구체예에서, TTP의 하나 이상의 증상을 감소시키기에 효과적인 양의 MASP-2 억제제를 투여함으로써, 불응성 TTP를 앓고 있는 대상체 (즉, 적어도 2주의 혈장교환 요법에 반응하지 않는 대상체)를 치료하는 방법이 제공된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제제 (예컨대, 항-MASP-2 항체)는 만성적으로 불응성 TTP를 가진 대상체에게 적어도 2주 이상의 기간 동안 피하 또는 다른 비경구 투여를 통해 투여된다. 투여는 상태가 해소되었거나 제어될 때까지 의사에 의해 결정된 대로 반복될 수 있다.
- [0180] 일부 구체예에서, 방법은 치료 전, 및 선택적으로 치료 중에, 대상체의 적어도 하나의 보체 인자 (예컨대, C3, C5)의 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하며, 표준 값 또는 건강한 대조군 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 측정은 MASP-2 억제제로의 지속적인 치료에 대한 필요성을 나타낸다.
- [0181] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체를 TTP를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 피하로 또는 정맥내로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 바람직하게 매일이지만, 격주와 같이 빈번하지 않을 수 있다. 치료는 대상체의 혈소판 수가 적어도 연속 2일 동안 $150,000/\text{mL}$ 보다 클 때까지 계속된다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.
- [0182] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ 및 $F(ab')_2$ 로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함하고, 및/또는 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하

며 고전적 경로 또는 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 및 대체 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).

- [0183] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 TTP를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 TTP를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을 혈청의 C5b-9 침착에 미치는 억제 효과보다 더 많이 적어도 20 퍼센트 이상 (예컨대 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%)의 수준으로 억제한다.
- [0184] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 TTP 환자로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.
- [0185] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 정맥내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 대상체에게 투여된다.
- [0186] 한 구체예에서, 발명은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, TTP를 앓고 있는 대상체에서 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0187] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0188] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0189] **디고스병**
- [0190] 악성 위축성 구진증(malignant atrophic papulosis)으로도 알려져 있는 디고스병은 피부의 소혈관, 위장관, 및 CNS의 내피를 병들게 하는 매우 드문 TMA이다. 이 혈관병은 세정맥 및 세동맥의 폐색을 유발하여 피부 병변, 장의 허혈, 및 뇌졸중, 간질 및 인지 장애를 포함한 CNS 장애를 초래한다. 피부에서, 결합 조직 괴사는 작은 동맥의 혈전성 폐색으로 인한 것이다. 그러나, 디고스병의 원인은 알려져 있지 않다. 혈관염, 응고병, 또는 내피 세포의 일차 기능장애가 연루되어 있다. 디고스병은 불과 2 내지 3년의 50% 생존율을 가진다. 디고스병에 대한 효과적인 치료는 없지만 항혈소판 약물, 항응고제, 및 면역억제제가 증상을 경감시키기 위해 사용된다.
- [0191] 디고스병의 메커니즘은 알려져 있지 않지만, 보체 경로가 연루되어 있다. Margo 등은 4명의 디고스병 말기 환자의 피부, 위장관 및 뇌 혈관에서 현저한 C5b-9 침착을 확인하였다 (Margo et al., *Am J Clin Pathol* 135(4):599-610, 2011). 에쿨리주맙을 사용한 실험적 치료가 피부 및 장 병변의 치료에서 초기에는 효과적이었지만, 전신적 질환의 진행을 막지는 못하였다 (Garrett-Bakelman F. et al., "C5b-9 is a potential effector in the pathophysiology of Degos disease; a case report of treatment with eculizumab" (Abstract), Jerusalem: International Society of Hematology; 2010, Poster #156; 및 Polito J. et al, "Early detection of Systemic Degos disease (DD) or malignant atrophic papulosis (MAP) may increase survival" (Abstract), San Antonio, TX: American College of Gastroenterology; 2010, Poster #1205 참고).
- [0192] 디고스병을 앓고 있는 많은 환자가 혈액 응고가 결핍되어 있다. 피부의 작은 동맥의 혈전성 폐색이 질환의 특징이다. 보체 경로가 이 질환에 연루되기 때문에, 다른 TMA에 대해 본원에서 기술된 것과 같이, 한정하는 것은 아

하지만 MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하여 렉틴 경로 억제제가 디고스병을 앓고 있는 환자를 치료하는 데 유익할 것으로 예상된다.

- [0193] 따라서, 또 다른 구체예에서, 발명은 치료적 유효량의 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 항체를 제약학적 담체에 포함하고 있는 조성물을 디고스병 또는 디고스병으로부터 유발된 상태를 앓고 있는 대상체에게 투여함으로써 디고스병을 치료하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 디고스병 또는 디고스병으로부터 유발된 상태를 앓고 있는 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 잠재적으로 비-펩타이드성 작용제의 경우 경구 투여에 의해 투여된다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 에콜리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.
- [0194] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함하고, 및/또는 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로 또는 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 및 대체 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).
- [0195] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 디고스병을 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 디고스병을 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을 혈청의 C5b-9 침착에 미치는 억제 효과보다 더 많이 적어도 20 퍼센트 이상 (예컨대 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%)의 수준으로 억제한다.
- [0196] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 디고스병 환자로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.
- [0197] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 정맥내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 대상체에게 투여된다.
- [0198] 한 구체예에서, 발명은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, TTP를 앓고 있는 대상체에서 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0199] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0200] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS64에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는

MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0201] **치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)**

[0202] 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)은 항인지질 항체 (APLA) 증후군의 극단적인 변이체이다. CAPS는 병원성 항체로 인한 정맥 및 동맥 혈전증을 특징으로 한다. CAPS는 다중 장기 혈전증, 허혈, 및 장기 부전이 있는 TMA이다. 다른 TMA와 같이, 다양한 장기의 소혈관의 폐색이 특징적이다. CAPS는 약 50%의 높은 사망률을 가지며 자주 감염 또는 외상과 관련된다. 환자는 항인지질 항체, 일반적으로 IgG를 가진다.

[0203] 임상적으로, CAPS는 소혈관이 폐색된 조직병리학적 증거가 있는 적어도 3개의 장기 또는 조직을 포함한다. 말초 혈전증은 CNS, 심혈관, 신장, 또는 폐 시스템의 정맥 및 동맥을 포함할 수 있다. 환자는 항생물질, 항응고제, 코르티코스테로이드, 혈장 교환, 및 정맥내 면역글로불린으로 치료된다. 그럼에도 불구하고, 다중 장기 부전으로부터 사망이 발생할 수 있다.

[0204] 보체 경로가 CAPS에 연루될 수 있다. 예를 들어, 동물 모델에서의 연구는 보체 억제가 CAPS와 관련된 혈전증을 방지하기 위한 효과적인 수단일 수 있음을 나타낸다 (Shapira L. et al., Arthritis Rheum 64(8):2719-23, 2012). 더욱이, Shapira 등에 의해 추가로 보고된 것과 같이, CAPS를 앓고 있는 대상체에게 보체 경로를 차단하는 용량으로 에쿨리주맙을 투여하여 급성 진행성 혈전성 사건을 중단시키고 혈소판 감소증을 반전시켰다 (또한 Lim W., Curr Opin Hematol 18(5):361-5, 2011 참고). 그러므로, 본원에서 다른 TMA에 대해 기술된 것과 같이, 한정하는 것은 아니지만 MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하여, 렉틴 경로 억제제가 CAPS를 앓고 있는 환자를 치료하는 데 유익할 것이라고 예상된다.

[0205] 따라서, 또 다른 구체예에서, 발명은 치료적 유효량의 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 항체를 제약학적 담체에 포함하고 있는 조성물을 CAPS 또는 CAPS로부터 유발된 상태를 앓고 있는 대상체에게 투여함으로써 CAPS를 치료하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 CAPS 또는 CAPS로부터 유발된 상태를 앓고 있는 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 잠재적으로 비-캡타이드성 작용제의 경우 경구 투여에 의해 투여된다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.

[0206] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함하고, 및/또는 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로 또는 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 및 대체 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).

[0207] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 CAPS를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 CAPS를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을 혈청의 C5b-9 침착에 미치는 억제 효과보다 더 많이 적어도 20 퍼센트 이상 (예컨대 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%)의 수준으로 억제한다.

[0208] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 CAPS 환자로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.

[0209] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 정맥내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 대상체에게 투여된다.

[0210] 한 구체예에서, 발명은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ

ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, CAPS를 앓고 있는 대상체에서 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다.

[0211] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0212] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0213] 암에 이차적인 TMA

[0214] 임의의 유형의 전신성 악성 종양이 TMA의 임상적 및 병리적 징후로 이어질 수 있다 (예컨대, Batts and Lazarus, *Bone Marrow Transplantation* 40:709-719, 2007 참고). 암 관련 TMA는 자주 폐에서 발견되고 종양 색전과 관련되는 것으로 여겨진다 (Francis KK et al., *Commun Oncol* 2:339-43, 2005). 종양 색전은 혈류를 감소시킬 수 있고 그로써 영향을 받은 세동맥 및 세정맥에서 저관류 상태로 이어질 수 있다. 결과적으로 생성된 조직 스트레스 및 손상은 보체의 렉틴 경로를 국지화된 양상으로 활성화할 것으로 예상된다. 활성화된 렉틴 경로는 계속해서 프로트롬빈의 트롬빈으로의 MASP-2 의존성 절단을 통해 응고 캐스케이드를 활성화하여 TMA의 특징인 전혈전 상태로 이어질 수 있다. 이런 환경에서 MASP-2 억제는 트롬빈의 국지화된 활성화를 감소시키고 따라서 전혈전 상태를 경감시킬 것으로 예상된다.

[0215] 그러므로, 다른 TMA에 대해 본원에서 기술되는 것과 같이, 한정하는 것은 아니지만, MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하여 렉틴 경로 억제제가 암에 이차적인 TMA를 앓고 있는 환자를 치료하는 데 유익할 것으로 예상된다.

[0216] 따라서, 또 다른 구체예에서, 발명은 치료적 유효량의 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 항체를 제약학적 담체에 포함하고 있는 조성물을 암에 이차적인 TMA를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 투여함으로써 암에 이차적인 TMA를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 암에 이차적인 TMA를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 잠재적으로 비-펩타이드성 작용제의 경우 경구 투여에 의해 투여된다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.

[0217] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함하고, 및/또는 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로 또는 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 및 대체 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).

[0218] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 암에 이차적인 TMA를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.

- [0219] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 암에 이차적인 TMA를 앓고 있는 환자로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.
- [0220] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 정맥내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 대상체에게 투여된다.
- [0221] 한 구체예에서, 발명은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암에 이차적인 TMA를 앓고 있는 대상체에서 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0222] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0223] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0224] **암 화학요법에 이차적인 TMA**
- [0225] 화학요법-관련 TMA는 겐시타빈, 미토마이신, 옥살리플라틴 및 기타와 같은 화학요법제로 치료된 악성 신생물의 이력을 가진 환자의 2-10%에서 발생하는 혈소판 감소증, 미세혈관병증성 용혈성 빈혈, 및 신부전을 포함하는 상태이다. 화학요법-관련 TMA는 높은 사망률과 불량한 임상 결과와 결부된다 (예컨대, Blake-Haskins et al., *Clin Cancer Res* 17(18):5858-5866, 2011 참고).
- [0226] 화학요법-관련 TMA의 병인은 미세혈관 내피에 대한 비특이적, 독성 손상을 포함하는 것으로 여겨진다. 내피 세포에 대한 직접적인 손상은 미토마이신-유도 TMA의 동물 모델에서 밝혀졌다 (Dlott J. et al., *Ther Apher Dial* 8:102-11, 2004). 다양한 메커니즘을 통한 내피 세포 손상은 보체의 렉틴 경로를 활성화하는 것으로 나타났다. 예를 들어, Stahl 등은 산화성 스트레스에 노출된 내피 세포가 시험관내 및 생체내에서 모두 보체의 렉틴 경로를 활성화시키는 것을 밝혔다 (Collard et al., *Am J Pathol.* 156(5):1549-56, 2000; La Bonte et al., *J Immunol.* 15;188(2):885-91, 2012). 생체내에서, 이 과정은 혈전증으로 이어지며, 렉틴 경로의 억제는 혈전증을 방지하는 것으로 나타났다 (La Bonte et al., *J Immunol.* 15;188(2):885-91, 2012). 나아가, 본원의 실시예 37-39에서 입증되는 바, FITC-Dex의 국지화된 광여기가 사용되어 미세혈관에 대한 국지화된 손상 및 계속해서 TMA 반응의 발생을 유도하는 TMA의 마우스 모델에서, 본 발명자들은 MASP-2의 억제가 TMA를 방지할 수 있는 것을 밝혔다. 그러므로, 화학요법에 의한 미세혈관 내피 손상은 보체의 렉틴 경로를 활성화시킬 수 있고, 그것은 국지화된 전혈전 상태를 생성하며 TMA 반응을 촉진한다. 렉틴 경로의 활성화 및 전혈전 상태의 생성이 MASP-2의 존재이기 때문에, 한정하는 것은 아니지만, MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하여, MASP-2 억제제가 TMA 반응을 경감시키고 암 화학요법-관련 TMA의 위험을 감소시킬 것으로 예상된다.
- [0227] 따라서, 또 다른 구체예에서, 발명은 치료적 유효량의 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 항체를 제약학적 담체에 포함하고 있는 조성물을 화학요법에 이차적인 TMA를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 투여함으로써 화학요법에 이차적인 TMA를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 화학요법이 진행되었거나, 진행 중이거나, 또는 진행할 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 잠재적으로 비-펩타이드성 작용제의 경우 경구 투여에 의해 투여된다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.

- [0228] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함하고, 및/또는 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로 또는 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 및 대체 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).
- [0229] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 암 화학요법에 이차적인 TMA를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.
- [0230] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 암 화학요법에 이차적인 TMA를 앓고 있는 환자로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.
- [0231] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 정맥내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 대상체에게 투여된다.
- [0232] 한 구체예에서, 발명은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암 화학요법에 이차적인 TMA를 앓고 있는 대상체에서 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0233] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 70로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0234] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0235] **이식에 이차적인 TMA**
- [0236] 이식-관련 TMA (TA-TMA)는 이식 환자, 예컨대 동종 조혈 줄기 세포 이식 수령체에서 발생할 수 있는 파괴적인 증후군이다 (예컨대, Batts and Lazarus, *Bone Marrow Transplantation* 40:709-719, 2007 참고). 이 상태의 발병에 대해서는 잘 이해되지 않지만, 결국 내피 세포 손상에 도달하는 반응들의 합류를 포함할 가능성이 있다 (Laskin B.L. et al., *Blood* 118(6):1452-62, 2011). 위에서 논의된 것과 같이, 내피 세포 손상은 렉틴 경로 활성화 및 전혈전 환경의 생성에 대한 원형(prototypic) 자극이다.
- [0237] 최근의 데이터는 TA-TMA의 발병에서 렉틴 경로를 통한 보체 활성화의 역할을 한층 더 지지한다. Laskin 등은 신

장 세동맥의 C4d 침착이 대조군 (8%)과 비교하여 조직학적 TA-TMA가 있는 대상체에서 (75%) 훨씬 더 일반적이었음을 입증하였다 (Laskin B.L., et al., *Transplantation*, 27; 96(2):217-23, 2013). 그러므로, C4d는 TA-TMA의 병리적 마커일 수 있고, 이것은 렉틴 또는 고전적 경로를 통한 국지화된 보체 고정을 함축한다.

[0238] 렉틴 경로의 활성화 및 전혈전 상태의 생성이 MASP-2-의존적이기 때문에, 한정하는 것은 아니지만, MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하여, MASP-2 억제제가 TMA 반응을 경감시키고 이식-관련 TMA (TA-TMA)의 위험을 감소시킬 것으로 예상된다.

[0239] 따라서, 또 다른 구체예에서, 발명은 치료적 유효량의 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 항체를 제약학적 담체에 포함하고 있는 조성물을 이식에 이차적인 TMA를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 투여함으로써 이식에 이차적인 TMA를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 이식 과정이 진행되었거나, 진행 중이거나, 또는 진행할 대상체에게 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 잠재적으로 비-펩타이드성 작용제의 경우 경구 투여에 의해 투여된다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 발명은 동종 줄기 세포 이식이 진행되기 전에, 중에 또는 후에 대상체에게 일정량의 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 동종 줄기 세포 이식에 이차적인 TMA를 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0240] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함하고, 및/또는 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로 또는 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 및 대체 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).

[0241] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 이식에 이차적인 TMA를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.

[0242] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 이식에 이차적인 TMA를 앓고 있는 환자로부터의 혈청의 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다.

[0243] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 정맥내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 대상체에게 투여된다.

[0244] 한 구체예에서, 발명은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 이식에 이차적인 TMA를 앓고 있는 대상체에서 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다.

[0245] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단

계를 포함한다.

[0246] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0247] **IV. 다른 질환 및 상태에서 MASP-2의 역할 및 MASP-2 억제제를 사용하는 치료 방법**

[0248] **신장 상태**

[0249] 보체 시스템의 활성화는 광범위한 신장 질환: 이를테면, 메산지움 증식성(mesangioproliferative) 사구체신염 (IgA-신장병, 버거병(Berger's disease)) (Endo, M., et al., *Clin. Nephrology* 55:185-191, 2001), 막성 사구체신염 (Kerjashki, D., *Arch B Cell Pathol.* 58:253-71, 1990; Brenchley, P.E., et al., *Kidney Int.*, 41:933-7, 1992; Salant, D.J., et al., *Kidney Int.* 35:976-84, 1989), 막증식성 사구체신염 (메산지움 모세혈관성 사구체신염) (Bartlow, B.G., et al., *Kidney Int.* 15:294-300, 1979; Meri, S., et al., *J. Exp. Med.* 175:939-50, 1992), 급성 감염후 사구체신염 (연쇄상구균 감염후 사구체신염), 한랭글로불린혈증성 사구체신염 (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol.* 101:59-66, 2001), 루푸스 신염 (Gatenby, P.A., *Autoimmunity* 11:61-6, 1991), 및 헤노흐-췌라인 자반증 신염 (Endo, M., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000)에 연루되어 있다. 신장 질환에 보체의 개입은 수십년 동안 인식되어 왔지만 신장 질환의 개시, 발달 및 분해 단계에서 그것의 정확한 역할에 대해서 여전히 주요 논의가 있다. 정상 조건 하에서 보체의 기여는 숙주에게 유리하지만, 보체의 부적절한 활성화 및 침착은 조직 손상에 기여할 수 있다.

[0250] 사구체의 염증인 사구체신염이 자주 사구체 또는 관형 구조 상으로의 면역 복합체의 침착에 의해 개시된 후 보체 활성화, 염증 및 조직 손상을 촉발시킨다는 실질적인 증거가 있다. Kahn 및 Sinniah는 다양한 형태의 사구체신염 환자로부터 취한 생검의 관련 기저막에서 C5b-9의 증가된 침착을 입증하였다 (Kahn, T.N., et al., *Histopath.* 26:351-6, 1995). IgA 신장병 환자의 연구에서 (Alexopoulos, A., et al., *Nephrol. Dial. Transplant* 10:1166-1172, 1995), 관형 내피/기저막 구조의 C5b-9 침착은 혈장 크레아티닌 수준과 상관이 있었다. 막성 신장병의 또 다른 연구는 임상 결과와 소변의 sC5b-9 사이의 관계를 입증하였다 (Kon, S.P., et al., *Kidney Int.* 48:1953-58, 1995). 상승된 sC5b-9 수준은 불량한 예후와 긍정적으로 상관이 있었다. Lehto 등은 원형질 막의 막 공격 복합체를 억제하는 보체 조절 인자인 CD59뿐만 아니라, 막성 사구체신염 환자의 소변 중의 C5b-9의 상승된 수준을 측정하였다 (Lehto, T., et al., *Kidney Int.* 47:1403-11, 1995). 이들 동일한 환자로부터 취한 생검 샘플의 조직병리학적 분석은 사구체에서 C3 및 C9 단백질의 침착을 입증한 반면, 이들 조직에서 CD59의 발현은 정상 신장 조직의 그것과 비교하여 감소하였다. 이들 다양한 연구는 진행 중인 보체-매개 사구체신염이 조직 손상 및 질환 예후의 정도와 상관이 있는 보체 단백질의 소변 배설을 초래하는 것을 시사한다.

[0251] 사구체신염의 다양한 동물 모델에서 보체 활성화의 억제는 또한 질환의 병인에서 보체 활성화의 중요성을 입증하였다. 막증식성 사구체신염 (MPGN)의 모델에서, C6-결핍 래트 (C5b-9를 형성할 수 없음)에서 항-Thy1 항혈청의 주입은 C6+ 정상 래트에서보다 90% 더 적은 사구체 세포 증식, 혈소판 및 대식세포 침윤의 80% 감소, 감소된 콜라겐 타입 IV 합성 (메산지움 매트릭스 확장에 대한 마커), 및 50% 더 적은 단백뇨를 초래하였다 (Brandt, J., et al., *Kidney Int.* 49:335-343, 1996). 이들 결과는 이 래트 항-흉선 세포 혈청 모델에서 보체에 의한 조직 손상의 주요 매개체로서 C5b-9가 연루된 것을 보여준다. 사구체신염의 또 다른 모델에서, 토끼 항-래트 사구체 기저막의 단계별 투여량의 주입은 코브라 독 인자 (보체를 소모시키기 위함)로의 전처리에 의해 감소된 다형핵 백혈구 (PMN)의 용량-의존성 유입을 유발하였다 (Scandrett, A.L., et al., *Am. J. Physiol.* 268:F256-F265, 1995). 코브라 독 인자-처리된 래트는 또한 대조군 래트보다 감소된 조직병리학, 감소된 장기 단백질, 및 더 낮은 크레아티닌 수준을 보였다. 래트에서 GN의 3가지 모델 (항-흉선 세포 혈청, Con A 항-Con A, 및 수동 헤이만 신염)을 사용하여, Couser 등은 재조합 sCR1 단백질을 사용함으로써 보체를 억제하는 접근법의 잠재적 치료 효능을 입증하였다 (Couser, W.G., et al., *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1888-94, 1995). sCR1로 처리된 래트는 대조군 래트 대비 상당히 감소된 PMN, 혈소판 및 대식세포 유입, 감소된 메산지움 용해, 및 단백뇨를 보였다. 사구체신염에서 보체 활성화의 중요성에 대한 추가의 증거는 NZB/W F1 마우스 모델에서 항-C5 MoAb를 사용함으로써 제공되었다. 항-C5 MoAb는 C5의 절단을 억제하고, 그로써 C5a 및 C5b-9의 생성을 차단한다. 6개월 동안 항-C5 MoAb를 사용한 연속 치료법은 사구체신염 과정의 상당한 개선을 초래하였다. 인간 보체 구성요소 C5의 전염증성 구성요소로서의 절단을 방지하는 인간화된 항-C5 MoAb 단클론성 항체 (5G1.1)는 Alexion Pharmaceuticals, Inc.사 (New Haven, Connecticut)에 의해 사구체신염에 대한 잠재적 치료제로서 개발

중이다.

[0252] 신장 손상에서 보체의 병리적 역할에 대한 직접적인 증거는 특정 구성요소가 유전적으로 결핍된 환자의 연구에 의해 제공된다. 많은 보고서가 신장 질환과 보체 조절 인자 H의 결핍과의 연관성을 입증하였다 (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet.* 31:424-8, 2002). 인자 H 결핍은 인자 B 및 C3의 낮은 혈장 수준 및 C5b-9의 소모를 초래한다. 비정형 막증식성 사구체신염 (MPGN) 및 특발성 용혈성 요독 증후군 (HUS)은 둘 다 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 MPGN-유사 증상을 나타내, 보체 조절에서 인자 H의 중요성을 확인시켜주었다. 다른 보체 구성요소의 결핍은 전신성 홍반성 루푸스 (SLE)의 발생에 이차적인 신장 질환과 관련된다 (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997). C1q, C4 및 C2에 대한 결핍은 면역 복합체 및 세포자멸성 물질의 결합성 제거와 관련된 메커니즘을 통해 SLE를 발생시키려는 경향이 강하다. 이들 SLE 환자 중 많은 환자에서 사구체 전체에서 면역 복합체의 침착을 특징으로 하는 루푸스 신염이 발생한다.

[0253] 보체 활성화와 신장 질환을 연결시키는 추가의 증거는 환자에서 보체 구성요소에 대해 지시된 자가항체의 확인에 의해 제공되었고, 그것들 중 일부는 직접적으로 신장 질환과 관련되었다 (Trouw, L.A., et al., *Mol. Immunol.* 38:199-206, 2001). 많은 이들 자가항체가 신장 질환과 고도의 상관관계를 보이므로 이런 활성을 나타내기 위해 신염 인자 (NeF)라는 용어가 도입되었다. 임상 연구에서, 신염 인자에 대해 양성인 환자의 50%가 MPGN을 발생하였다 (Spitzer, R.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64:177-83, 1992). C3NeF는 대체 경로 C3 전환효소 (C3bBb)에 대해 지시된 자가항체이며 그것은 이 전환효소를 안정화시킴으로써, 대체 경로 활성화를 촉진한다 (Daha, M.R., et al., *J. Immunol.* 116:1-7, 1976). 유사하게, C4NeF로 불리는, 고전적 경로 C3 전환효소 (C4b2a)에 대한 특이성을 가진 자가항체는 이 전환효소를 안정화시키고 그로써 고전적 경로 활성화를 촉진한다 (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 환자에서 신염과 관련된 것으로 기술되었고 (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), 이들 항-C1q 자가항체의 역가의 상승은 신염의 발작(flare)을 예측하는 것으로 보고되었다 (Coremans, I.E., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 26:595-601, 1995). SLE 환자의 사후 신장으로부터 용출된 면역 침착은 이들 항-C1q 자가항체의 축적을 나타냈다 (Mannick, M., et al., *Arthritis Rheumatol.* 40:1504-11, 1997). 이들 사실은 전부 이들 자가항체의 병리적 역할을 가리킨다. 그러나, 항-C1q 자가항체를 가진 모든 환자가 신장 질환을 발병하지 않으며 또한 일부 건강한 개인도 낮은 역가의 항-C1q 자가항체를 가진다 (Siegert, C.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67:204-9, 1993).

[0254] 보체 활성화의 대체 및 고전적 경로 외에, 렉틴 경로는 또한 신장 질환에서 중요한 병리적 역할을 가질 수 있다. MBL, MBL-관련 세린 프로테아제 및 보체 활성화 생성물의 상승된 수준이 헤노흐-췌라인 자반증 신염 (Endo, M., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000), 한랭글로불린혈증성 사구체신염 (Ohsawa, I., et al., *Clin. Immunol.* 101:59-66, 2001) 및 IgA 신장병 (Endo, M., et al., *Clin. Nephrology* 55:185-191, 2001)을 포함하여, 여러 상이한 신장 질환으로 진단된 환자로부터 얻어진 신장 생검 물질에 대한 면역조직 화학적 기법에 의해 검출되었다. 그러므로, 보체와 신장 질환 사이의 연관성이 수십년 동안 알려져 왔다는 사실에도 불구하고, 보체가 어떻게 정확하게 이들 신장 질환에 영향을 미치는지에 대한 데이터는 아직 완전하지 않다.

[0255] 혈액 장애

[0256] 패혈증은 침입하는 미생물에 대한 환자의 압도적인 반응에 의해 유발된다. 보체 시스템의 주요 기능은 침입하는 박테리아 및 다른 병원체에 대한 염증 반응을 조정하는 것이다. 이런 생리적 역할과 일치하게, 보체 활성화는 수많은 연구에서 패혈증의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다 (Bone, R.C., *Annals. Internal. Med.* 115:457-469, 1991). 패혈증의 임상 증상의 정의는 계속 진화하고 있다. 패혈증은 일반적으로 감염에 대한 전신성 숙주 반응으로서 정의된다. 그러나, 많은 경우에, 패혈증 증상이 있는 환자에서 감염에 대한 임상적 증거 (예컨대, 양성 박테리아 혈액 배양)는 발견되지 않는다. 이런 불일치는 먼저 용어 "전신성 염증 반응 증후군" (SIRS)이라는 용어가 확립된 때인 1992년 합의 회의에서 처음 고려되었고, 그것에 대해 정의할 수 있는 박테리아 감염의 존재는 필요하지 않았다 (Bone, R.C., et al., *Crit. Care Med.* 20:724-726, 1992). 이제 패혈증과 SIRS에 염증 반응을 조절하지 못하는 무능력이 수반된다는 것에 일반적으로 동의한다. 이런 간단한 검토의 목적에 대해, 본 발명자들은 패혈증의 임상적 정의가 또한 중증의 패혈증, 패혈성 쇼크, 및 SIRS를 포함하는 것

으로 간주할 것이다.

- [0257] 1980년대 후반 이전에 패혈증 환자에서 감염의 우세한 공급원은 그람 음성균이었다. 그람 음성균의 세포벽의 주요 구성요소인 리포다당 (LPS)은 다양한 세포 유형으로부터 염증성 매개체의 방출을 자극하고 동물에게 주입되었을 때 급성 감염성 증상을 유도하는 것으로 알려졌다 (Haeney, M.R., et al., *Antimicrobial 화학요법* 41(Suppl. A):41-6, 1998). 흥미롭게도, 원인이 되는 미생물의 스펙트럼은 1970년대 후반 및 1980년대에 우세했던 그람 음성균으로부터, 현재로서는 불명확한 이유들로 현재 우세하게 그람 양성균으로 이동하였다 (Martin, G.S., et al., *N. Eng. J. Med.* 348:1546-54, 2003).
- [0258] 많은 연구가 염증을 매개하고 쇼크, 특히 패혈성 쇼크 및 출혈성 쇼크(hemorrhagic shock)의 특징에 기여하는 보체 활성화의 중요성을 보여주었다. 그람 음성 및 그람 양성 유기체 모두 일반적으로 패혈성 쇼크를 촉발시킨다. LPS는 주로 대체 경로를 통한 보체의 강력한 활성화이지만, 항체에 의해 매개된 고전적 경로 활성화가 또한 일어난다 (Fearon, D.T., et al., *N. Engl. J. Med.* 292:937-400, 1975). 그람 양성 세포벽의 주요 구성요소는 펩티도글리칸 및 리포테이코산으로, 이 두 구성요소 모두 대체 보체 경로의 강력한 활성화이지만, 특정 항체의 존재 하에서는 또한 고전적 보체 경로를 활성화시킬 수 있다 (Joiner, K.A., et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2:461-2, 1984).
- [0259] 보체 시스템은 처음에 연구자들에 의해 아나필라톡신 C3a 및 C5a가 패혈증 동안에도 또한 발생할 수 있는 다양한 염증 반응을 매개한다는 것이 주지되었을 때 패혈증의 발병에 연루되었다. 이들 아나필라톡신은 패혈성 쇼크에서 중심 역할을 하는 사건인 혈관확장 및 미세혈관 침투성의 증가를 유발한다 (Schumacher, W.A., et al., *Agents Actions* 34:345-349, 1991). 더불어, 아나필라톡신은 기관지 경련(bronchospasm), 비만 세포로부터의 히스타민 방출, 및 혈소판의 응집을 유도한다. 더욱이, 그것들은 과립구에 수많은 영향, 예컨대 화학주성, 응집, 부착, 리소솜 효소의 방출, 독성 슈퍼 옥사이드 음이온의 생성 및 류코트리엔의 형성을 나타낸다 (Shin, H.S., et al., *Science* 162:361-363, 1968; Vogt, W., *Complement* 3:177-86, 1986). 이들 생물학적 효과는 쇼크 또는 급성 호흡기 혼란 증후군 (ARDS)과 같은 패혈증의 합병증의 발병에 역할을 하는 것으로 여겨진다 (Hammerschmidt, D.E., et al., *Lancet* 1:947-949, 1980; Slotman, G.T., et al., *Surgery* 99:744-50, 1986). 나아가, 아나필라톡신 C3a의 상승된 수준은 패혈증의 치명적 결과와 관련된다 (Hack, C.E., et al., *Am. J. Med.* 86:20-26, 1989). 쇼크의 일부 동물 모델에서, 특정 보체-결핍 스트레인 (예컨대, C5-결핍 스트레인)이 LPS 투입의 효과에 대해 더 내성이다 (Hseuh, W., et al., *Immunol.* 70:309-14, 1990).
- [0260] 설치류에서 패혈증이 시작되는 동안 항체를 사용한 C5a 생성의 차단은 생존율을 크게 개선시키는 것으로 나타났다 (Czermak, B.J., et al., *Nat. Med.* 5:788-792, 1999). 유사한 결과가 항체 또는 소분자 억제제로 C5a 수용체 (C5aR)가 차단되었을 때 이루어졌다 (Huber-Lang, M.S., et al., *FASEB J.* 16:1567-74, 2002; Riedemann, N.C., et al., *J. Clin. Invest.* 110:101-8, 2002). 원숭이에서의 선행 실험 연구는 C5a의 항체 차단이 대장균-유도 패혈성 쇼크 및 성인 호흡 곤란 증후군을 악화시킨 것을 시사하였다 (Hangen, D.H., et al., *J. Surg. Res.* 46:195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., *J. Clin. Invest.* 77:1812-16, 1986). 패혈증이 있는 인간에서, C5a는 중증도가 덜한 패혈증 환자 및 생존자에서의 그것과 비교하여 상승되었고 다중 장기 부전과 함께 상당히 감소된 생존율과 관련이 있었다 (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). C5a가 패혈증 중에 그것의 해로운 영향을 발휘하게 되는 메커니즘은 아직 더 상세하게 조사되지는 않았지만, 최근의 데이터는 패혈증 중에 C5a의 생성은 혈액 호중구의 선천성 면역 기능 (Huber-Lang, M.S., et al., *J. Immunol.* 169:3223-31, 2002)), 그것들의 호흡 폭발을 표현하는 능력, 및 그것들의 사이토카인 생성 능력 (Riedemann, N.C., et al., *Immunity* 19:193-202, 2003)을 상당히 손상시키는 것을 시사한다. 더불어, 패혈증 중에 C5a의 생성은 응고촉진 효과를 가지는 것으로 나타난다 (Laudes, I.J., et al., *Am. J. Pathol.* 160:1867-75, 2002). 보체-매개 단백질 CI INH는 또한 패혈증 및 ARDS의 동물 모델에서 효능을 나타냈다 (Dickneite, G., *Behring Ins. Mitt.* 93:299-305, 1993).
- [0261] 렉틴 경로가 또한 패혈증의 발병에 역할을 할 수 있다. MBL은 그람 음성균 및 그람 양성균을 모두 포함하는 범위의 임상적으로 중요한 미생물에 결합하고, 렉틴 경로를 활성화하는 것으로 나타났다 (Neth, O., et al., *Infect. Immun.* 68:688, 2000). 리포테이코산 (LTA)은 점점 더 LPS의 그람 양성 대응물로서 간주되고 있다. 그것은 단핵 식세포 및 전혈로부터 사이토카인 방출을 유도하는 강력한 면역자극제이다 (Morath, S., et al., *J. Exp. Med.* 195:1635, 2002; Morath, S., et al., *Infect. Immun.* 70:938, 2002). 최근에 L-피콜린이 황색 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 포함한 수많은 그람 양성균 종으로부터 분리된 LTA에 특이적으로 결합하고, 렉틴 경로를 활성화하는 것이 입증되었다 (Lynch, N.J., et al., *J. Immunol.* 172:1198-02, 2004).

MBL은 또한 폴리글리세로포스페이트 사슬이 글리코실 기로 치환되어 있는 엔테로코커스 종(*Enterococcus spp*)으로부터의 LTA에 결합하지만, 황색 포도상구균을 포함한 9개의 다른 종으로부터의 LTA에는 결합하지 않는 것으로 나타났다 (Polotsky, V.Y., et al., *Infect. Immun.* 64:380, 1996).

[0262] 그러므로 발명의 한 측면은 치료적 유효량의 MASP-2 억제제를 제약학적 담체에 포함하는 조성물을 패혈증 또는 제한 없이 중증의 패혈증, 패혈성 쇼크, 패혈증으로부터 유발된 급성 호흡 곤란 증후군, 및 전신성 염증 반응 증후군을 포함한 패혈증으로부터 유발된 상태를 앓고 있는 대상체에게 투여함으로써, 패혈증 또는 패혈증으로부터 유발된 상태를 치료하는 방법을 제공한다. 출혈성 쇼크, 용혈성 빈혈, 자가면역 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP), 용혈성 요독 증후군 (HUS), 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS), 또는 다른 골수/혈액 파괴 상태를 포함한, 다른 혈액 장애의 치료를 위한 관련된 방법이, 치료적 유효량의 MASP-2 억제제를 제약학적 담체에 포함하는 조성물을 그러한 상태를 앓고 있는 대상체에게 투여함으로써 제공된다. MASP-2 억제제는 대상체에서 전신적으로, 예컨대 동맥내, 정맥내, 근육내, 흡입 (특히 ARDS의 경우에), 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 잠재적으로 비-펩타이드성 작용제의 경우 경구 투여에 의해 투여된다. MASP-2 억제제 조성물은 패혈증 및/또는 쇼크의 후유증에 대처하기 위한 하나 이상의 추가 치료제와 조합될 수 있다. 진행된 패혈증 또는 쇼크 또는 그것들로부터 유발된 곤란한 상태의 경우, MASP-2 억제 조성물이 속효성 투여 형태로, 예컨대 MASP-2 억제제 조성물을 함유한 용액의 일시 대용량의 정맥내 또는 동맥내 전달에 의해 적합하게 투여될 수 있다. 반복된 투여는 상태가 해소될 때까지 의사에 의해 결정된 대로 수행될 수 있다.

[0263] 응고병증(Coagulopathies)

[0264] 파종성 혈관내 응고 ("DIC"), 예컨대 유의한 신체적 외상에 이차적인 DIC에서 보체 시스템의 역할에 대한 증거가 개발되었다. 이전의 연구들은 C4-/- 마우스가 신장 재관류 손상으로부터 보호되지 않는 것을 보여주었다 (Zhou, W., et al., "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury", *J Clin Invest* 105:1363-1371 (2000)). C4-/- 마우스가 여전히 고전적 또는 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화할 수 있는지를 조사하기 위하여, C4-/- 혈장에서의 C3 전환이 고전적, 또는 렉틴 경로 활성화 경로에 특이적인 검정으로 측정되었다. 고전적 경로를 통해 활성화가 촉발될 때 C3 절단이 관찰되지 않았지만, C4 결핍 혈청에서 C3의 매우 효율적인 렉틴 경로-의존성 활성화가 관찰되었다 (도 30). 만난 및 지모산 상에서의 C3b 침착은, 실험 조건 하에서도, 대체 경로 활성화에 대한 이전에 공개된 많은 논문에 따르면, 3가지 경로 전부에 대해 허용적이어야 하는 MASP-2-/- 마우스에서 심각하게 손상되는 것을 알 수 있다. 만난 또는 지모산 대신 면역글로불린 복합체로 코팅된 웰에서 동일한 혈청을 사용했을 때, C3b 침착 및 인자 B 절단은 MASP-2+/+ 마우스 혈청 및 MASP-2-/- 혈청에서 볼 수 있지만, C1q 고갈 혈청에서는 볼 수 없다. 이것은 초기 C3b가 고전적 활성을 통해 제공될 때 대체 경로 활성화가 MASP-2-/- 혈청에서 촉진되는 것을 가리킨다. 도 30C는 C3이 C4 결핍 혈장에서 렉틴 경로-의존성 양상으로 효율적으로 활성화될 수 있다는 놀라운 발견을 도시한다.

[0265] 이런 "C4 우회"는 가용성 만난 또는 만노스와 함께 혈장의 사전 인큐베이션을 통한 렉틴 경로-활성화의 억제에 의해 없어진다.

[0266] 보체 시스템의 비정상적인, 비-면역, 활성화는 잠재적으로 사람에게 해롭고 혈액학적 경로 활성화, 특히 염증성 및 혈액학적 경로가 모두 활성화되어 있는 심각한 외상 상황에서 중요한 역할을 할 수 있다. 정상적인 건강 상태에서, C3 전환율은 총 혈장 C3 단백질의 <5%이다. 패혈증 및 면역 복합 질환을 포함한 만연한 감염에서, C3 전환은 증가된 이용 및 모음 분포의 변화로 인해 정상보다 종종 낮은 보체 수준으로 약 30%에서 자체적으로 재확립된다. 30%보다 큰 즉각적인 C3 경로 활성화는 일반적으로 혈관확장 및 조직으로의 유체 손실의 명백한 임상 증거를 유발한다. C3 전환율이 30%를 넘으면, 시작하는 메커니즘은 우세하게 비면역성이 되고 결과적으로 생성된 임상 증상은 환자에게 해롭다. 건강한 및 제어된 질환에서의 보체 C5 수준은 C3보다 훨씬 더 안정적인 것으로 나타난다. C5 수준의 상당한 감소 및 또는 전환은 비정상적인 다중 외상 (예컨대, 교통 사고) 및 아마도 쇼크 패 증후군의 발생에 대한 환자의 반응과 관련이 있다. 그러므로, 혈관 모음의 30%를 넘는 보체 C3 활성화 또는 임의의 C5 개입, 또는 둘 다의 임의의 증거는 환자에서의 해로운 병리학적 변화의 조짐일 가능성이 있는 것으로 여겨질 수 있다.

[0267] C3 및 C5는 둘 다 혈관확장성 화학물질을 방출하는 비만 세포 및 호염기성 세포에 대해 작용하는 아나필라톡신 (C3a 및 C5a)을 방출한다. 그것들은 다형핵 세포 (PMN)를 면역학적 장애 (유익한 반응)의 중심으로 안내하기 위한 화학주성 구배를 설정하지만, 여기서 그것들은 C5a가 이들 식작용 세포에 대해 특정 클렘핑 (응집) 효과를 나타내서, 반응 부위로부터의 무작위 이동을 방해하기 때문에 상이하다. 감염의 정상적인 제어시에는, C3은 C5를 활성화한다. 그러나, 다중 외상에서, C5는 광범위하게 활성화되어 C5a 아나필라톡신을 전신적으로 생성하는

것으로 여겨진다. 이런 제어되지 않은 활성화는 다형태가 혈관 시스템 내에 클럼핑되는 것을 유발하고, 이들 클럼프가 폐의 모세혈관으로 휩쓸려 들어가서, 폐색하고 슈퍼옥사이드 방출의 결과로서 국지적 손상 효과를 생성한다. 이론에 제한되기를 바라지 않지만, 메커니즘은 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS)의 발병에 중요할 가능성이 있지만, 이 견해는 최근에 도전을 받았다. 시험관내에서 C3a 아나필라톡신은 강력한 혈소판 응집제인 것으로 보일 수 있지만, 그것들의 생체내에서의 개입은 정의된 것이 별로 없고 상처 회복에서 혈소판 물질 및 플라스민의 방출만이 이차적으로 보체 C3을 포함한다. DIC를 생성하기 위해서는 C3활성화의 장기간의 상승이 필요할 수 있다.

[0268] 외상과 DIC와의 연결을 설명해줄 수 있는 위에서 개관된 활성화된 보체 구성요소의 세포 및 혈관 효과 외에, 부상하는 과학적 발견들이 보체와 응고 시스템 간의 직접적인 분자 연결 및 기능적 혼선(cross-talk)을 확인시켜 주었다. 지지하는 데이터는 C3 결핍 마우스에서의 연구로부터 얻어졌다. C3이 각각의 보체 경로에 대해 공유된 구성요소이기 때문에, C3 결핍 마우스는 모든 보체 기능이 결핍된 것으로 예측된다. 그러나, 놀랍게도, C3 결핍 마우스는 말단 보체 구성요소를 완벽하게 활성화할 수 있다 (Huber-Lang, M., et al., "Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway", *Nat. Med* 12:682-687 (2006)). 심층 연구에서 말단 보체 구성요소의 C3-의존성 활성화는 응고 캐스케이드의 속도 제한 효소인 트롬빈에 의해 매개되는 것으로 드러났다 (Huber et al., 2006). 초기 보체 활성화후에 트롬빈 활성화를 매개하는 분자 구성요소는 여전히 알기 어렵다.

[0269] 본 발명자들은 보체와 응고 캐스케이드 사이의 혼선에 대한 분자 기초인 것으로 여겨진 것이 무엇인지 설명하였고 두 시스템을 연결시키는 중심 제어 지점으로서 MASP-2를 확인하였다. MASP-2의 기질 특이성에 대한 생화학적 연구는 잘 알려져 있는 C2 및 C4 보체 단백질 외에 가능한 기질로서 트로트롬빈을 확인하였다. MASP-2는 기능적으로 관련된 부위에서 프로트롬빈을 특이적으로 절단하여 응고 캐스케이드의 속도 제한 효소인 트롬빈을 생성한다 (Krurup, A., et al., "Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2", *PLoS. ONE*. 2:e623 (2007)). MASP-2-생성된 트롬빈은 정의된 재구성된 시험관내 시스템에서 피브리린 침착을 촉진할 수 있고, 이것은 MASP-2 절단의 기능적 관련성을 입증한다 (Krurup et al., 2007). 아래의 실시예에서 논의되는 것과 같이, 발명자들은 렉틴 경로 활성화 후 정상적인 설치류 혈청에서 트롬빈 활성화를 증명함으로써 이 발견의 생리적 유의성을 추가로 입증하고, 이 과정이 MASP-2 단클론성 항체를 중화함으로써 차단되는 것을 입증하였다.

[0270] MASP-2는 보체 및 응고 시스템 둘 다의 활성화를 촉진할 수 있는, 렉틴 경로의 중심 분기점을 대표할 수 있다. 렉틴 경로 활성화가 많은 유형의 외상성 손상에 대한 생리적 반응이기 때문에, 본 발명자들은 동시적인 전신성 염증 (보체 구성요소에 의해 매개됨) 및 과중성 응고 (응고 경로를 통해 매개됨)가 두 경로를 모두 활성화하는 MASP-2의 능력에 의해 설명될 수 있다고 여긴다. 이들 발견은 분명하게 DIC 생성 및 DIC의 치료 또는 예방에서 MASP-2 억제제의 치료 유익에 대한 역할을 시사한다. MASP-2는 보체 및 응고 시스템 사이의 분자적 연결을 제공할 수 있고 렉틴 경로의 활성화는 그것이 외상 환경에서 일어나기 때문에 MASP-2-트롬빈 축을 통해 응고 시스템의 활성화를 직접 시작하여 외상과 DIC 사이의 기계적 연결을 제공한다. 본 발명의 측면에 따르면, MASP-2의 억제는 렉틴 경로 활성화를 억제할 것이고 아나필라톡신 C3a 및 C5a 둘 다의 생성을 감소시킨다. C3 활성화의 장기간 상승이 DIC를 생성하는 데 필요한 것으로 여겨진다.

[0271] 미세순환 응고 (모세혈관 및 소혈관에서의 불룩 응고)는 패혈성 쇼크와 같은 환경에서 발생한다. 실시예 17 및 18 및 19에서 기술된 패혈증의 의 보호된 표현형에 의해 증거되는 바와 같이 패혈성 쇼크에서 렉틴 경로의 역할이 확립된다. 나아가, 실시예 15 및 도 16A 및 16B에서 입증된 것과 같이, MASP-2 (-/-) 마우스는 미세혈관에서의 국지화된 응고의 모델인 과중성 혈관내 응고 (DIC)의 국지화된 슈바르츠만 반응 모델에서 보호된다.

[0272] V. MASP-2 억제제

[0273] 한 측면으로, 본 발명은 혈전성 미세혈관병증을 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 살아있는 대상체에서 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양으로 투여된다. 발명의 이런 측면의 실시에서, 대표적인 MASP-2 억제제로는: MASP-2가 렉틴 보체 경로를 활성화시키지 못하도록 방지하는 MASP-2의 생물학적 활성을 억제하는 분자 (예컨대 MASP-2와 상호작용하거나 단백질-단백질 상호작용을 간섭하는 소분자 억제제, 항-MASP-2 항체 또는 차단 펩타이드), 및 MASP-2의 발현을 감소시키는 분자 (예컨대 MASP-2 안티센스 핵산 분자, MASP-2 특이적 RNAi 분자 및 MASP-2 리보자임)를 들 수 있다. MASP-2 억제제는 일차 요법으로서 단독으로 또는 다른 의학적 치료의 치료 이익을 향상시키기 위한 보조 요법으로서 다른 치료제와 함께 사용될 수 있다.

[0274] MASP-2-의존성 보체 활성화의 억제는 발명의 방법에 따라 MASP-2 억제제의 투여의 결과로서 발생하는 보체 시스

템의 구성요소의 다음의 변화 중 적어도 하나를 특징으로 한다: MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템 생성물 C4b, C3a, C5a 및/또는 C5b-9 (MAC)의 생성 또는 제조의 억제 (예를 들어, 실시예 2에서 기술된 것과 같이 측정됨), 미감작 토끼 또는 기니아 피그 적혈구를 사용한 용혈성 검정으로 평가된 보체 활성화의 감소 (예를 들어, 실시예 33에서 기술된 것과 같이 측정됨), C4 절단 및 C4b 침착의 감소 (예를 들어, 실시예 2에서 기술된 것과 같이 측정됨), 또는 C3 절단 및 C3b 침착의 감소 (예를 들어, 실시예 2에서 기술된 것과 같이 측정됨).

[0275] 본 발명에 따르면, MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하는 데 효과적인 MASP-2 억제제가 사용된다. 발명의 이 측면의 실시예 유용한 MASP-2 억제제로는, 예를 들어, 항-MASP-2 항체 및 그것의 단편, MASP-2 억제 펩타이드, 소분자, MASP-2 가용성 수용체 및 발현 억제제를 들 수 있다. MASP-2 억제제는 MASP-2의 생물학적 기능을 차단함으로써 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제할 수 있다. 예를 들어, 억제제는 MASP-2 단백질-대-단백질 상호작용을 효과적으로 차단하거나, MASP-2 다이머화 또는 조립을 간섭하거나, Ca^{2+} 결합을 차단하거나, MASP-2 세린 프로테아제 활성 부위를 간섭하거나, 또는 MASP-2 단백질 발현을 감소시킬 수 있다.

[0276] 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2 보체 활성화를 선택적으로 억제하여, C1q-의존성 보체 활성화 시스템을 기능적으로 온전하게 남겨둔다.

[0277] 한 구체예에서, 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 SEQ ID NO:6을 포함하는 폴리펩타이드에 보체 시스템의 다른 항원에 대한 것보다 적어도 10배 더 큰 친화도로 특이적으로 결합하는 특이적 MASP-2 억제제이다. 또 다른 구체예에서, MASP-2 억제제는 SEQ ID NO:6을 포함하는 폴리펩타이드에 보체 시스템의 다른 항원에 대한 것보다 적어도 100배 더 큰 친화도로 특이적으로 결합한다. MASP-2 억제제의 결합 친화도는 적합한 결합 검정을 사용하여 측정될 수 있다.

[0278] MASP-2 폴리펩타이드는 MASP-1, MASP-3, 및 C1 보체 시스템의 프로테아제인 C1r 및 C1s와 유사한 분자 구조를 나타낸다. SEQ ID NO:4에 제시된 cDNA 분자는 MASP-2의 대표적인 예를 암호화하며 (SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열로 이루어짐) 분비 후에 절단되어 성숙한 형태의 인간 MASP-2 (SEQ ID NO:6)를 초래하는, 리더 서열 (aa 1-15)을 포함한 인간 MASP-2 폴리펩타이드를 제공한다. 도 2에서 나타난 것과 같이, 인간 MASP 2 유전자는 12개의 엑손을 포함한다. 인간 MASP-2 cDNA는 엑손 B, C, D, F, G, H, I, J, K 및 L에 의해 암호화된다. 대체 스플라이스는 도 2에서 도시된 것과 같이 엑손 B, C, D 및 E로부터 발생한 (SEQ ID NO:1)에 의해 암호화된, MBL-관련 단백질 19 ("Map19", 또한 "sMAP"로도 언급됨) (SEQ ID NO:2)로 명명된 20 kDa 단백질을 초래한다. SEQ ID NO:50에 제시된 cDNA 분자는 쥐과 MASP-2 (SEQ ID NO:51에 제시된 아미노산 서열로 이루어짐)를 암호화하고 분비 후에 절단되는 리더 서열을 가진 쥐과 MASP-2 폴리펩타이드를 제공하며, 성숙한 형태의 쥐과 MASP-2 (SEQ ID NO:52)를 초래한다. SEQ ID NO:53에 제시된 cDNA 분자는 래트 MASP-2 (SEQ ID NO:54에 제시된 아미노산 서열로 이루어짐)를 암호화하고 분비 후에 절단되는 리더 서열을 가진 래트 MASP-2 폴리펩타이드를 제공하며, 성숙한 형태의 래트 MASP-2 (SEQ ID NO:55)를 초래한다.

[0279] 기술분야에 숙련된 사람들은 SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:50 및 SEQ ID NO:53에 개시된 서열이 각각 인간, 쥐과 및 래트 MASP-2의 단일 대립유전자를 나타내며, 대립 유전자의 변이 및 대체 스플라이싱이 일어날 것으로 예상되는 것을 인식할 것이다. SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:50 및 SEQ ID NO:53에 제시된 뉴클레오타이드 서열의 대립 유전자 변이체는, 사일런트 돌연변이를 함유하는 것과 돌연변이가 아미노산 서열 변화를 초래하는 것들을 포함하여, 본 발명의 범주 내에 있다. MASP-2 서열의 대립 유전자 변이체는 상이한 개체로부터의 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 표준 과정에 따라 프로빙함으로써 클로닝될 수 있다.

[0280] 인간 MASP-2 단백질 (SEQ ID NO:6)의 도메인은 도 1 및 2A에 도시되며 N-말단 C1r/C1s/성체 Vegf/빠 형성 단백질 (CUB1) 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-121), 표피 성장 인자-유사 도메인 (aa 122-166), 제2 CUB1 도메인 (aa 167-293), 뿐만 아니라 보체 제어 단백질 도메인 및 세린 프로테아제 도메인의 탠덤을 포함한다. MASP 2 유전자의 대체 스플라이싱은 도 1에 도시된 Map19를 초래한다. Map19는 도 1에 도시된 것과 같이 엑손 E로부터 유래된 4개의 추가 잔기 (EQSL)가 있는 MASP-2의 N-말단 CUB1-EGF 영역을 함유하는 비효소적 단백질이다.

[0281] 여러 단백질이 단백질-대-단백질 상호작용을 통해 MASP-2에 결합하거나, 또는 상호작용하는 것으로 나타났다. 예를 들어, MASP-2는 렉틴 단백질 MBL, H-피콜린 및 L-피콜린에 결합하여 그것과 Ca^{2+} 의존성 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 각각의 MASP-2/렉틴 복합체는 단백질 C4 및 C2의 MASP-2-의존성 절단을 통해 보체를 활성화하는 것으로 나타났다 (Ikeda, K., et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., *J. Exp. Med.* 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). 연구 결과 MASP-2의 CUB1-EGF 도메인이 MASP-2와 MBL의 회합에 필수적인 것으로 나타났다 (Thielens, N.M., et

al., *J. Immunol.* 166:5068, 2001). 또한 CUB1EGFCUBII 도메인은 활성 MBL 복합체의 형성에 필요한 MASP-2의 다이머화를 매개한다 (Wallis, R., et al., *J. Biol. Chem.* 275:30962-30969, 2000). 그러므로, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화에 중요한 것으로 알려져 있는 MASP-2 표적 영역에 결합하거나 MASP-2 표적 영역을 간섭하는 것이 확인될 수 있다.

[0282] 항-MASP-2 항체

[0283] 본 발명의 이 측면의 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하는 항-MASP-2 항체를 포함한다. 발명의 이 측면에 유용한 항-MASP-2 항체는 임의의 항체 생성 포유류로부터 유래된 다클론성, 단클론성 또는 재조합 항체를 포함하며 다중특이적, 키메릭, 인간화된, 항-이디오타입, 및 항체 단편일 수 있다. 항체 단편은 본원에서 추가로 기술되는 바와 같이 Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv 단편, scFv 단편 및 단일 사슬 항체를 포함한다.

[0284] 여러 항-MASP-2 항체가 문헌에 기술되어 있고, 그 중 일부가 아래 표 1에 열거된다. 이전에 기술된 이들 항-MASP-2 항체는 본원에 기술된 검정을 사용하여 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하는 능력에 대해 스크리닝되었다. 예를 들어, 본원의 실시예 10 및 11에서 보다 상세하게 기술되는 바와 같이, MASP-2 의존성 보체 활성화를 차단하는 항 래트 MASP-2 Fab2 항체가 확인되었다. MASP-2 억제제로서 기능하는 항-MASP-2 항체가 확인된 후에, 그것은 아래에서 추가로 기술되는 것과 같이 항-이디오타입 항체를 생성하기 위해 사용되고 다른 MASP-2 결합 분자를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

표 1

[0285] 문헌으로부터의 MASP-2 특이적 항체

항원	항체 유형	참고문헌
재조합 MASP-2	래트 다클론성	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
재조합 인간 CCP1/2-SP 단편 (MoAb 8B5)	래트 MoAb (하위부류 IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
재조합 인간 MAP19 (MoAb 6G12) (MASP-2와 교차 반응함)	래트 MoAb (하위부류 IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
hMASP-2	마우스 MoAb (S/P) 마우스 MoAb (N-말단)	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 35:409, April 1998
hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP 도메인)	래트 MoAb: Nimoab101, 하이브리도마 세포주 03050904 (ECACC)에 의해 생성됨	WO 2004/106384
hMASP-2 (전장-his 태그)	쥐과 MoAb:NimoAb104, 하이브리도마 세포주 M0545YM035 (DSMZ)에 의해 생성됨 NimoAb108, 하이브리도마 세포주 M0545YM029 (DSMZ)에 의해 생성됨 NimoAb109, 하이브리도마 세포주 M0545YM046 (DSMZ)에 의해 생성됨 NimoAb110, 하이브리도마 세포주 M0545YM048 (DSMZ)에 의해 생성됨	WO 2004/106384

[0286] 이펙터 기능이 감소된 항-MASP-2 항체

[0287] 발명의 이 측면의 일부 구체예에서, 항-MASP-2 항체는 고전적 보체 경로의 활성화로부터 발생할 수 있는 염증을 감소시키기 위하여 이펙터 기능이 감소되었다. IgG 분자의 고전적 보체 경로를 촉발시키는 능력은 분자의 Fc 부분 내에 상주하는 것으로 나타났다 (Duncan, A.R., et al., *Nature* 332:738-740 1988). 분자의 Fc 부분이 효소적 절단에 의해 제거된 IgG 분자는 이런 이펙터 기능을 피할 수 있다 (Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). 따라서, 이펙터 기능이 감소된 항체가 이펙터 기능을 최소화한 유전자 조작된 Fc 서열을 가지거나, 인간 IgG₂ 또는 IgG₄ 아이소타입이 됨으로써 분자의 Fc 부분이 절편된 결과로서 생성될 수 있다.

[0288] 이펙터 기능이 감소된 항체는 본원의 실시예 9에서 기술된 것과 같이 또한 문헌: Jolliffe et al., *Int'l Rev. Immunol.* 10:241-250, 1993, 및 Rodrigues et al., *J. Immunol.* 151:6954-6961, 1998에서 기술된 것과 같이 IgG 중쇄의 Fc 부분의 표준 분자 생물학 조작에 의해 제조될 수 있다. 이펙터 기능이 감소된 항체는 또한 보체를 활성화하거나 및/또는 Fc 수용체와 상호작용하는 능력이 감소된 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.* 148:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., *Immunol. Today* 14:215-221, 1993). IgG2 또는 IgG4 아이소타입으로 구성된 인간 MASP-2에 특이적인 인간화된 또는 전체 인간 항체는 Vaughan, T.J., et al., *Nature Biotechnical* 16:535-539, 1998에서 기술된 것과 같이, 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에게 알려져 있는 여러 방법 중 하나에 의해 제조될 수 있다.

[0289] 항-MASP-2 항체의 제조

[0290] 항-MASP-2 항체는 MASP-2 폴리펩타이드 (예컨대, 전장 MASP-2)를 사용하거나 또는 항원성 MASP-2 에피토프-포함 펩타이드 (예컨대, MASP-2 폴리펩타이드의 부분)를 사용하여 제조될 수 있다. 면역원성 펩타이드는 5개 아미노산 잔기 정도로 작을 수 있다. 예를 들어, SEQ ID NO:6의 전체 아미노산 서열을 포함하는 MASP-2 폴리펩타이드가 발명의 방법에 유용한 항-MASP-2 항체를 유도하기 위해 사용될 수 있다. 단백질-단백질 상호작용에 관여하는 것으로 알려져 있는 특정 MASP-2 도메인, 예컨대 CUBI, 및 CUBIEGF 도메인, 뿐만 아니라 세린-프로테아제 활성 부위를 포함하는 영역은 실시예 3에서 기술된 재조합 폴리펩타이드로서 발현되고 항원으로서 사용될 수 있다. 더불어, MASP-2 폴리펩타이드 (SEQ ID NO:6)의 적어도 6개 아미노산의 부분을 포함하는 펩타이드는 또한 MASP-2 항체를 유도하는 데 유용하다. MASP-2 항체를 유도하기에 유용한 MASP-2 유래 항원의 추가적인 예가 아래 표 2에 제공된다. 항체를 발생시키기 위해 사용된 MASP-2 펩타이드 및 폴리펩타이드는 천연 폴리펩타이드, 또는 재조합 또는 합성 펩타이드로서 분리될 수 있고 실시예 5-7에서 추가로 기술되는 것과 같이, 재조합 폴리펩타이드, 예컨대 MASP-2A를 촉매적으로 비활성화한다. 발명의 이 측면의 일부 구체예에서, 항-MASP-2 항체는 실시예 8 및 9에서 기술되고 아래에서 한층 더 기술되는 것과 같이 유전자도입 마우스 스트레인을 사용하여 얻어진다.

[0291] 항-MASP-2 항체를 제조하는 데 유용한 항원은 또한 융합 폴리펩타이드, 예컨대 MASP-2 또는 그것의 부분과 면역글로불린 폴리펩타이드 또는 말토스-결합 단백질과의 융합을 포함한다. 폴리펩타이드 면역원은 전장 분자 또는 그것의 부분일 수 있다. 만약 폴리펩타이드 부분이 합텐과 유사하다면, 그러한 부분은 면역화를 위해 거대분자 담체 (예컨대 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 파상풍 독소)에 유리하게 연합되거나 연결될 수 있다.

표 2

[0292] MASP-2 유래 항원

SEQ ID NO:	아미노산 서열
SEQ ID NO:6	인간 MASP-2 단백질
SEQ ID NO:51	쥐 MASP-2 단백질
SEQ ID NO:8	인간 MASP-2의 CUBI 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	인간 MASP-2의 CUBIEGF 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	인간 MASP-2의 CUBIEGFCUBII 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	인간 MASP-2의 EGF 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 122-166)
SEQ ID NO:12	인간 MASP-2의 세린-프로테아제 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 429-671)
SEQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	세린-프로테아제 비활성화된 돌연변이 형태 (돌연변이된 Ser 618이 있는 SEQ ID NO:6의 aa 610-625)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	인간 CUBI 펩타이드
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGA KVLATLCGQ	인간 CUBI 펩타이드

SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	인간 CUBI 도메인의 MBL 결합 영역
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF	인간 CUBI 도메인의 MBL 결합 영역
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	EGF 펩타이드
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLES GGKDCRGDSGGALV	세린-프로테아제 활성 부위로부터의 펩타이드

[0293] 다클론성 항체

[0294] MASP-2에 대한 다클론성 항체는 동물을 MASP-2 폴리펩타이드 또는 그것의 면역원성 부분으로 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람들에게 잘 알려져 있는 방법을 사용하여 면역화함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera", in *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), page 105를 참고하며, 실시예 6에서 추가로 기술된 것과 같다. MASP-2 폴리펩타이드의 면역원성은 미네랄 겔, 예컨대 수산화 알루미늄 또는 프로인트 보조제 (완전 또는 불완전), 리소레시틴, 플루로닉 폴리올, 다가음이온, 오일 에멀션, 키흐 림펫 헤모시아닌 및 다이니트로페놀과 같은 표면 활성 물질을 포함한, 보조제의 사용을 통해 증가될 수 있다. 다클론성 항체는 전형적으로 말, 소, 개, 닭, 래트, 마우스, 토기, 기니아 피그, 염소, 또는 양과 같은 동물에서 상승된다. 대안으로, 본 발명에 유용한 항-MASP-2 항체는 또한 인간 이하의 영장류로부터 유래될 수 있다. 비비에서 진단적으로 및 치료적으로 유용한 항체를 발생시키기 위한 일반적인 기법은, 예를 들어, Goldenberg et al., 국제 특허 공개 번호 WO 91/11465, 및 Losman, M.J., et al., *Int. J. Cancer* 46:310, 1990에서 찾아볼 수 있다. 그런 후 면역학적으로 활성인 항체를 함유한 혈청이 그렇게 면역화된 동물의 혈액으로부터 기술분야에 잘 알려져 있는 표준 과정을 사용하여 제조된다.

[0295] 단클론성 항체

[0296] 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 단클론성 항체이다. 항-MASP-2 단클론성 항체는 매우 특이적이며, 단일 MASP-2 에피토프에 대해 지시된다. 본원에서 사용되는 바, 수식어 "단클론성"은 항체의 실질적으로 균일한 집단으로부터 얻어지는 것으로서 항체의 특징을 나타내며, 임의의 특정 방법에 의한 항체의 제조를 필요로 하는 것으로서 해석되지 않는다. 단클론성 항체는 배양 중의 연속 세포주에 의해 항체 분자의 생성을 제공하는 임의의 이 기법, 예컨대 Kohler, G., et al., *Nature* 256:495, 1975에 기술된 하이브리도마 방법을 사용하여 얻어지거나, 또는 그것은 재조합 DNA 방법에 의해 만들어질 수 있다 (예컨대, Cabilly에 부여된 미국 특허 제 4,816,567호 참고). 단클론성 항체는 또한 파지 항체 라이브러리로부터 Clackson, T., et al., *Nature* 352:624-628, 1991, 및 Marks, J.D., et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991에 기술된 기법을 사용하여 분리될 수 있다. 그러한 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD를 포함하는 임의의 면역글로불린 부류 및 그것의 임의의 하위부류의 것일 수 있다.

[0297] 예를 들어, 단클론성 항체는 적합한 동물 (예컨대, BALB/c 마우스)을 MASP-2 폴리펩타이드 또는 그것의 부분을 포함하는 조성물로 주입함으로써 얻어질 수 있다. 미리 정해진 시간 후에, 비장 세포가 마우스로부터 제거되고 세포 배양 배지에 현탁된다. 그런 후 비장 세포는 불멸 세포주와 융합되어 하이브리도마가 형성된다. 형성된 하이브리도마는 세포 배양에서 성장되고 MASP-2에 대한 단클론성 항체를 생성하는 능력에 대해 스크리닝된다. 항-MASP-2 단클론성 항체의 제조를 추가로 기술하는 예가 실시예 7에 제공된다. (또한 *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons, pages 2.5.1-2.6.7, 1991 참고).

[0298] 인간 단클론성 항체는 항원성 도전에 대한 반응으로 특정 인간 항체를 제조하도록 조작된 유전자도입 마우스의 사용을 통해 얻어질 수 있다. 이 기법에서, 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 요소들이 내인성 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 표적화된 파괴가 함유되어 있는 배아 줄기 세포주로부터 유래된 마우스의 스트레인에 도입된다. 유전자도입 마우스는 인간 항원, 예컨대 본원에서 기술된 MASP-2 항원에 특이적인 인간 항체를 합성할 수 있고, 마우스는 그러한 동물로부터의 B-세포를 적합한 골수종 세포주와, 추가로 실시예 7에서 기술된 것과 같은 종래의 켈러-미스타인 (Kohler-Milstein) 기술을 사용하여 융합시킴으로써 인간 MASP-2 항체-분비 하이브리도마를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 인간 면역글로불린 계능을 가진 유전자도입 마우스는 (예컨대, Abgenix, Inc.사 (Fremont, CA) 및 Medarex, Inc.사 (Annandale, N.J.)로부터) 상업적으로 이용 가능하다. 유전자도입 마우스로부터 인간 항체를 얻는 방법은 예를 들어 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 기술되어 있다.

- [0299] 단클론성 항체는 다양한 잘 확립된 기법에 의해 하이브리도마로부터 분리 및 정제될 수 있다. 그러한 분리 기법으로는 단백질-A 세파로스를 사용하는 친화성 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 및 이온 교환 크로마토그래피를 들 수 있다 (예를 들어, 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*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, pages 79-104, 1992 참고).
- [0300] 제조된 후, 다클론성, 단클론성 또는 파지-유래 항체는 먼저 특이적 MASP-2 결합에 대해 테스트된다. MASP-2에 특이적으로 결합하는 항체를 검출하기 위하여 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있는 다양한 검정이 활용될 수 있다. 예시의 검정으로는 표준 방법에 의한 웨스턴 블롯 또는 면역침전 분석 (예컨대, Ausubel 등에서 기술됨), 면역전기영동, 효소-결합 면역흡착 검정, 도트 블롯, 억제 또는 결합 검정 및 샌드위치 검정 (Harlow and Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988에 기술됨)을 들 수 있다. MASP-2에 특이적으로 결합하는 항체가 확인된 후, 항-MASP-2 항체는, 예를 들어, 액틴-특이적 C4 절단 검정 (실시예 2에서 기술됨), C3b 침착 검정 (실시예 2에서 기술됨) 또는 C4b 침착 검정 (실시예 2에서 기술됨)과 같은 여러 검정 중 하나로 MASP-2 억제제로서 기능하는 능력에 대해 테스트된다.
- [0301] 항-MASP-2 단클론성 항체의 친화도는 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에 의해 쉽게 측정될 수 있다 (예컨대, Scatchard, A., *NY Acad. Sci.* 51:660-672, 1949 참고). 한 구체예에서, 발명의 방법에 유용한 항-MASP-2 단클론성 항체는 <100 nM, 바람직하게 <10 nM 및 가장 바람직하게 <2 nM의 결합 친화도로 MASP-2에 결합한다. 일부 구체예에서, 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제 단클론성 항체는 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 단클론성 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편이다.
- [0302] 키메릭/인간화된 항체
- [0303] 발명의 방법에 유용한 단클론성 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 부분이 특정 종으로부터 유래된 또는 특정 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동하는 한편, 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유래된 또는 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체, 뿐만 아니라 그러한 항체의 단편의 상응하는 서열과 동일하거나 상동하는 키메릭 항체를 포함한다 (Cabilly에 부여된 미국 특허 제 4,816,567호; 및 Morrison, S.L., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:6851-6855, 1984).
- [0304] 발명에 유용한 한 형태의 키메릭 항체는 인간화된 단클론성 항-MASP-2 항체이다. 비-인간 (예컨대, 쥐) 항체의 인간화된 항체는 키메릭 항체로, 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유한다. 인간화된 단클론성 항체는 마우스 면역글로불린의 중쇄 및 경쇄 가변 사슬로부터의 비-인간 (예컨대, 마우스) 상보성 결정 영역 (CDR)을 인간 가변 도메인에 전달함으로써 제조된다. 전형적으로, 그런 후 인간 항체의 잔기는 비-인간 대응물의 프레임워크 영역에서 돌연변이된다. 나아가, 인간화된 항체는 수령체 항체 또는 도너 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 한층 더 개선하기 위해 만들어진다. 일반적으로, 인간화된 항체는 적어도 하나, 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 전부 포함할 것이며, 이때 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 그것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 Fv 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화된 항체는 또한 선택적으로 면역글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 면역글로불린의 그것의 적어도 일부를 포함할 것이다. 추가의 상세한 설명에 대해서는 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 참고한다.
- [0305] 발명에 유용한 인간화된 항체는 적어도 MASP-2 결합 CDR3 영역을 포함하는 인간 단클론성 항체를 포함한다. 더불어, Fc 부분은 인간 IgG 항체뿐만 아니라 IgA 또는 IgM을 생성하기 위하여 대체될 수 있다. 그러한 인간화된

항체는 인간 MASP-2를 특이적으로 인식하겠지만 항체 자체에 대해 인간에서 면역 반응을 불러 일으키진 않을 것이기 때문에 특별한 임상적 유용성을 가질 것이다. 따라서, 그것은 특히 반복 또는 장기간 투여가 필요할 때 인간에서 생체내 투여에 더 잘 맞는다.

- [0306] 쥐과 항-MASP-2 단클론성 항체로부터 인간화된 항-MASP-2 항체의 생성의 예가 본원의 실시예 6에 제공된다. 인간화된 단클론성 항체를 제조하는 기법은 또한, 예를 들어, Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522, 1986; Carter, P., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:4285, 1992; Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, 1992; Singer, I.I., et al., *J. Immun.* 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies", in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pages 399-434, 1996; 및 Queen에 부여된 미국 특허 제 5,693,762호에 기술되어 있다. 더불어, 특정 쥐과 항체 영역으로부터 인간화된 항체를 합성할 상업적 실체, 예컨대 단백질 Design Labs (Mountain View, CA)이 있다.
- [0307] 재조합 항체
- [0308] 항-MASP-2 항체는 또한 재조합 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 예를 들어, 인간 항체는 인간 항체의 단편 (V_H , V_L , F_v , F_d , Fab 또는 $F(ab')_2$)을 제조하기 위하여 인간 면역글로불린 발현 라이브러리 (예를 들어 Stratagene, Corp. (La Jolla, CA)로부터 이용 가능함)를 사용하여 만들어질 수 있다. 그런 후 이들 단편은 키메릭 항체의 제조 기법과 유사한 기법을 사용하여 전체 인간 항체를 구성하는 데 사용된다.
- [0309] 항-이디오타입 항체
- [0310] 원하는 억제 활성을 가진 항-MASP-2 항체가 확인된 후, 이들 항체는 기술분야에 잘 알려져 있는 기법을 사용하여 MASP-2의 부분을 닮은 항-이디오타입 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 예컨대, Greenspan, N.S., et al., *FASEB J.* 7:437, 1993 참고. 예를 들어, MASP-2에 결합하고 보체 활성화에 필요한 MASP-2 단백질 상호작용을 경쟁적으로 억제하는 항체가 MASP-2 단백질 상의 MBL 결합 부위를 닮아서 MASP-2의 결합 리간드, 예컨대 MBL에 결합하여 중화시키는 항-이디오타입을 생성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0311] 면역글로불린 단편
- [0312] 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 온전한 면역글로불린 분자뿐만 아니라 Fab , Fab' , $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ 및 F_v 단편, scF_v 단편, 디아바디, 선형 항체, 단일 사슬 항체 분자 및 항체 단편으로부터의 다중특이적 항체를 포함한 잘 알려져 있는 단편들을 포함한다.
- [0313] 항체 분자의 작은 부분인 과라토프만이 항체의 에피토프에의 결합에 관여하는 것은 기술분야에 잘 알려져 있다 (예컨대, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986 참고). 항체의 pFc' 및 Fc 영역은 고전적 보체 경로의 이펙터지만, 항원 결합에는 관여하지 않는다. pFc' 영역이 효소적으로 절단되었거나, 또는 pFc' 영역이 없이 제조된 항체는 $F(ab')_2$ 단편으로 표시되며 온전한 항체의 항원 결합 부위를 둘 다 보유한다. 분리된 $F(ab')_2$ 단편은 그것의 2개의 항원 결합 부위로 인해 이가 단클론성 단편으로서 언급된다. 유사하게, Fc 영역이 효소적으로 절단되었거나, 또는 Fc 영역이 없이 제조된 항체는 Fab 단편으로서 표시되며, 온전한 항체 분자의 항원 결합 부위 중 하나를 보유한다.
- [0314] 항체 단편은 단백질 분해성 가수분해에 의해, 예컨대 종래 방법에 의한 전체 항체의 펩신 또는 파파인 분해에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 펩신을 사용한 항체의 효소적 절단에 의해 $F(ab')_2$ 로 표시된 5S 단편이 제공됨으로써 제조될 수 있다. 이 단편은 티올 환원제를 사용하여 추가로 절단되어 3.5S Fab' 일가 단편이 생성될 수 있다. 선택적으로, 절단 반응은 이황화 결합의 절단으로부터 생성된 설프하이드릴기에 대한 차단기를 사용하여 수행될 수 있다. 대안으로서, 펩신을 사용하는 효소적 절단은 2개의 일가 Fab 단편 및 Fc 단편을 직접 생성한다. 이들 방법은, 예를 들어, Goldenberg에게 부여된 미국 특허 제 4,331,647호; 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 Coligan, pages 2.8.1-2.8.10 및 2.10.-2.10.4에서 기술된다.
- [0315] 일부 구체예에서, Fc 영역이 없는 항체 단편의 사용은 Fc 가 $Fc\gamma$ 수용체에 결합될 때 시작되는 고전적 보체 경로의 활성화를 피하기 위해 바람직하다. 당업자가 $Fc\gamma$ 수용체 상호작용을 피하는 MoAb를 제조할 수 있는 여러 방법이 있다. 예를 들어, 단클론성 항체의 Fc 영역은 단백질 분해 효소에 의한 부분 분해 (예컨대 피신 분해)를

사용하여 화학적으로 제거될 수 있고, 그로써, 예를 들어, Fab 또는 F(ab)₂ 단편과 같은 항원 결합 항체 단편이 생성될 수 있다 (Mariani, M., et al., *Mol. Immunol.* 28:69-71, 1991). 대안으로, Fc γ 수용체에 결합하지 않는 인간 γ 4 IgG 아이소타입이 본원에 기술된 것과 같이 인간화된 항체의 구성 중에 사용될 수 있다. Fc 도메인이 없는 항체, 단일 사슬 항체 및 항원 결합 도메인은 또한 본원에 기술된 재조합 기법을 사용하여 조작될 수 있다.

[0316] 단일 사슬 항체 단편

[0317] 대안으로, 당업자는 중쇄 및 경쇄 Fv 영역이 연결되어 있는, MASP-2에 대해 특이적인 단일 펩타이드 사슬 결합 분자를 생성할 수 있다. Fv 단편은 펩타이드 링커에 의해 연결되어 단일 사슬 항원 결합 단백질 (scFv)을 형성할 수 있다. 이들 단일 사슬 항원 결합 단백질은 올리고뉴클레오타이드에 의해 연결된 V_H 및 V_L 도메인을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 구조적 유전자를 구성함으로써 제조된다. 구조적 유전자는 발현 벡터에 삽입되고, 그것은 후속적으로 숙주 세포, 예컨대 대장균에 도입된다. 재조합 숙주 세포는 2개의 V 도메인을 연결시키는 링커 펩타이드를 사용하여 단일 폴리펩타이드 사슬을 합성한다. scFv를 제조하는 방법은 예를 들어, Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., *Science* 242:423, 1988; Ladner에게 부여된 미국 특허 제 4,946,778호; Pack, P., et al., *Bio/Technology* 11:1271, 1993에서 기술된다.

[0318] 예시적인 예로서, MASP-2 특이적 scFv는 림프구를 시험관내에서 MASP-2 폴리펩타이드에 노출시키고 파지 또는 유사한 벡터에서 항체 디스플레이 라이브러리를 선택함으로써 (예를 들어, 고정된 또는 표지화된 MASP-2 단백질 또는 펩타이드의 사용을 통해) 얻어질 수 있다. 잠재적 MASP-2 폴리펩타이드 결합 도메인을 가지는 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자는 파지 또는 대장균과 같은 박테리아 상에 나타난 무작위 펩타이드 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻어질 수 있다. 이들 무작위 펩타이드 디스플레이 라이브러리는 MASP-2와 상호작용하는 펩타이드에 대해 스크리닝하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 무작위 펩타이드 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하기 위한 기법은 기술분야에 잘 알려져 있고 (Lardner에게 부여된 미국 특허 제 5,223,409호; Lardner에게 부여된 미국 특허 제 4,946,778호; Lardner에게 부여된 미국 특허 제 5,403,484호; Lardner에게 부여된 미국 특허 제 5,571,698호; 및 Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996) 무작위 펩타이드 디스플레이 라이브러리 및 그러한 라이브러리를 스크리닝하기 위한 키트는, 예를 들어 CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.), 및 Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.)로부터 상업적으로 입수 가능하다.

[0319] 발명의 이 측면에 유용한 항-MASP-2 항체 단편의 또 다른 형태는 MASP-2 항원 상의 에피토프에 결합하여 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 단일 상보성 결정 영역 (CDR)을 코딩하는 펩타이드이다. CDR 펩타이드 ("최소 인식 단위")는 관심 있는 항체의 CDR을 암호화하는 유전자를 구성함으로써 얻어질 수 있다. 그러한 유전자는, 예를 들어, 항체 생성 세포의 RNA로부터 가변 영역을 합성하기 위한 중합효소 연쇄 반응을 사용함으로써 제조된다 (예를 들어, Larrick et al., *Methods: 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 Expression of Antibodies", in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc., 1995 참고).

[0320] 본원에 기술된 MASP-2 항체는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는 것을 필요로 하는 대상체에게 투여된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 이펙터 기능이 감소된 고친화도 인간 또는 인간화된 단클론성 항-MASP-2 항체이다.

[0321] 펩타이드 억제제

[0322] 발명의 이 측면의 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템을 억제하는 분리된 천연 펩타이드 억제제 및 합성 펩타이드 억제제를 포함하여, 분리된 MASP-2 펩타이드 억제제를 포함한다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "분리된 MASP-2 펩타이드 억제제"는 렉틴 경로에서 또 다른 인식 분자 (예컨대, MBL, H-피콜린, M-피콜린, 또는 L-피콜린)에 대한 결합에 대해 MASP-2와 경쟁하는, 및/또는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기 위하여 MASP-2와 직접 상호작용하는 결합에 의해 MASP-2 의존성 보체 활성화를 억제하는, 실질적으로 순수하고 의도된 용도에 대해 실제적이고 적절한 정도로 그것들과 함께 자연계에서 발견될 수 있는 다른 물

질이 본질적으로 없는 펩타이드를 나타낸다.

[0323] 펩타이드 억제제는 단백질-단백질 상호작용 및 촉매적 부위를 간섭하기 위해 생체내에서 성공적으로 사용되었다. 예를 들어, LFA-1에 구조적으로 관련된 부착 분자에 대한 펩타이드 억제제가 최근에 응고병증에서의 임상적 용도에 대해 승인되었다 (Ohman, E.M., et al., *European Heart J.* 16:50-55, 1995). 인테그린-의존성 부착을 방지 또는 간섭하는 더 짧은 선형 펩타이드 (<30개 아미노산)가 기술되었다 (Murayama, O., et al., *J. Biochem.* 120:445-51, 1996). 25 내지 200개 아미노산 잔기의 범위의 길이를 가진 더 긴 펩타이드가 또한 인테그린-의존성 부착을 차단하는 데 성공적으로 사용되었다 (Zhang, L., et al., *J. Biol. Chem.* 271(47):29953-57, 1996). 일반적으로, 더 긴 펩타이드가 짧은 펩타이드보다 더 높은 친화도 및/또는 더 느린 오프 속도를 가지며 따라서 더 강력한 억제제이다. 고리형 펩타이드 억제제 또한 인간 염증 질환의 치료에 대해 생체내에서 인테그린의 효과적인 억제제인 것으로 나타났다 (Jackson, D.Y., et al., *J. Med. Chem.* 40:3359-68, 1997). 고리형 펩타이드를 생성하는 한 가지 방법은 펩타이드의 말단 아미노산이 시스테인이고, 그로써 펩타이드가 말단 아미노산 사이의 이황화 결합에 의해, 조혈 신생물의 치료를 위해 생체내에서 친화도 및 반감기를 개선시키는 것으로 밝혀진 고리형 형태로 존재하는 것을 허용하는 펩타이드의 합성을 포함한다 (예컨대, Larson에게 부여된 미국 특허 제 6,649,592호).

[0324] 합성 MASP-2 펩타이드 억제제

[0325] 발명의 이 측면의 방법에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드는 MASP-2 기능에 중요한 표적 영역을 모방하는 아미노산 서열에 의해 예시된다. 발명의 방법의 실시예에 유용한 억제 펩타이드는 크기가 약 5개 아미노산 내지 약 300개 아미노산 범위이다. 표 3은 본 발명의 이 측면의 실시예에 유용할 수 있는 예시의 억제 펩타이드의 목록을 제공한다. 후보 MASP-2 억제 펩타이드가, 예를 들어, 렉틴 특이적 C4 절단 검정 (실시예 2에서 기술됨), 및 C3b 침착 검정 (실시예 2에서 기술됨)을 포함한 여러 검정 중 하나로 MASP-2 억제제로서 기능하는 능력에 대해 테스트될 수 있다.

[0326] 일부 구체예에서, MASP-2 억제 펩타이드는 MASP-2 폴리펩타이드로부터 유래되고 전장 성숙한 MASP-2 단백질 (SEQ ID NO:6)로부터, 또는, 예를 들어, 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)과 같은 MASP-2 단백질의 특정 도메인으로부터 선택된다. 앞서 기술된 것과 같이, CUBIEGF/CUBII 영역은 다이머화 및 MBL과의 결합에 필요한 것으로 나타났다 (Thielens et al., *supra*). 특히, MASP-2의 CUBI 도메인의 펩타이드 서열 TFRSDYN (SEQ ID NO:16)은 Asp105에서 Gly105로의 동형접합성 돌연변이를 내포하여 MBL 복합체로부터 MASP-2의 상실을 초래하는 인간을 확인한 연구에서 MBL에 대한 결합에 관여하는 것으로 나타났다 (Stengaard-Pedersen, K., et al., *New England J. Med.* 349:554-560, 2003).

[0327] 일부 구체예에서, MASP-2 억제 펩타이드는 MASP-2에 결합하고 렉틴 보체 경로에 관여하는 렉틴 단백질로부터 유래된다. 만난-결합 렉틴 (MBL), L-피콜린, M-피콜린 및 H-피콜린을 포함하여, 이 경로에 관여하는 여러 상이한 렉틴이 확인되었다 (Ikeda, K., et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., *J. Exp. Med.* 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). 이들 렉틴은 혈청에, 각각이 탄수화물 인식 도메인을 포함한 N-말단 콜라겐-유사 섬유를 가지고 있는 단일트라이머 하위유닛의 올리고머로서 존재한다. 이들 상이한 렉틴은 MASP-2에 결합하는 것으로 나타났고, 렉틴/MASP-2 복합체는 단백질 C4 및 C2의 절단을 통해 보체를 활성화한다. H-피콜린은 24개 아미노산의 아미노-말단 영역, 11개의 Gly-Xaa-Yaa 반복부가 있는 콜라겐-유사 도메인, 12개 아미노산의 넥(neck) 도메인, 및 207개 아미노산의 피브리노겐-유사 도메인을 가진다 (Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 168:3502-3506, 2002). H-피콜린은 GlcNAc에 결합하여 살모넬라 타이피뮤리움(*S. typhimurium*), 살모넬라 미네소타(*S. minnesota*) 및 대장균으로부터 유래된 LPS로 코팅된 인간 적혈구를 응집시킨다. H-피콜린은 MASP-2 및 MAP19와 회합되는 것으로 나타났고 렉틴 경로를 활성화한다. Id. L-피콜린/P35 또한 GlcNAc에 결합하여 인간 혈청에서 MASP-2 및 MAP19와 회합되는 것으로 나타났고 이 복합체는 렉틴 경로를 활성화하는 것으로 나타났다 (Matsushita, M., et al., *J. Immunol.* 164:2281, 2000). 따라서, 본 발명에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드는 MBL 단백질 (SEQ ID NO:21), H-피콜린 단백질 (Genbank 수탁 번호 NM_173452), M-피콜린 단백질 (Genbank 수탁 번호 000602) 및 L-피콜린 단백질 (Genbank 수탁 번호 NM_015838)으로부터 선택된 적어도 5개 아미노산의 영역을 포함할 수 있다.

[0328] 보다 구체적으로, 과학자들은 MBP의 힌지와 콜라겐-유사 도메인의 C-말단 부분의 넥 사이에 있는 12개의 Gly-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) 내에 있는 MBL 상의 MASP-2 결합 부위를 확인하였다. 이 MASP-2 결합 부위 영역은 또한 인간 H-피콜린 및 인간 L-

피콜린에서 고도로 보존된다. 아미노산 서열 "OGK-X-GP" (SEQ ID NO:22)을 포함하는 공통 결합 부위가 3개의 렉틴 단백질 전체에 존재하는 것으로 기술되었고 서열에서 문자 "O"는 하이드록시프롤린을 나타내고 문자 "X"는 소수성 잔기이다 (Wallis et al., 2004, *supra*). 따라서, 일부 구체예에서, 발명의 이 측면에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드는 길이가 적어도 6개 아미노산이며 SEQ ID NO:22를 포함한다. 아미노산 서열 "GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SEQ ID NO:24)를 포함하는 MBL로부터 유래된 펩타이드는 시험관내에서 MASP-2에 결합하는 것으로 나타났다 (Wallis, et al., 2004, *supra*). MASP-2에 대한 결합을 향상시키기 위하여, 천연 MBL 단백질에서 발견되는 것과 같이 삼중 나선의 형성을 향상시키기 위해 각 단부에서 2개의 GPO 트리플렛에 의해 플랭킹되어 있는 펩타이드가 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, 2004에서 한층 더 기술됨).

[0329] MASP-2 억제 펩타이드는 또한 H-피콜린의 공통 MASP-2 결합 영역으로부터의 서열 "GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO" (SEQ ID NO:27)를 포함하는 인간 H-피콜린으로부터 유래될 수 있다. 또한 L-피콜린의 공통 MASP-2 결합 영역으로부터의 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 유래된 펩타이드가 포함된다.

[0330] MASP-2 억제 펩타이드는 또한 항트롬빈 III의 C-말단 부분에 연결된 C4 절단 부위인 "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEQ ID NO:29)와 같은 C4 절단 부위로부터 유래될 수 있다 (Glover, G.I., et al., *Mol. Immunol.* 25:1261 (1988)).

표 3

[0331] 예시의 MASP-2 억제 펩타이드

SEQ ID NO	공급원
SEQ ID NO:6	인간 MASP-2 단백질
SEQ ID NO:8	MASP-2의 CUBI 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	MASP-2의 CUBIEGF 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	MASP-2의 CUBIEGFCUBII 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-293)
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-2의 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" = 하이드록시 프롤린이고 "X"는 소수성 아미노산 잔기임	인간 MBL 및 인간 피콜린으로부터의 합성 펩타이드 공통 결합 부위
SEQ ID NO:23 OGKLG	인간 MBL 코어 결합 부위
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	인간 MBP 트리플렛 6-10- MASP-2에 대한 결합을 입증함
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPQGPOGPO	삼중 나선의 형성을 향상시키기 위해 첨가된 GPO를 가지는 인간 MBP 트리플렛
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTGKEKGPQGLRGLQGPOGKLGPQ NOGPSGSGPKGQKGDGKS	인간 MBP 트리플렛 1-17
SEQ ID NO:27 GAOGSOGKEGAOGPQGPQPOGKMGPKGEOGDO	인간 H-피콜린 (Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKA GPOGPNGAOGEO	인간 L-피콜린 P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI	인간 C4 절단 부위

[0332] 주: 문자 "O"는 하이드록시프롤린을 나타낸다. 문자 "X"는 소수성 잔기이다.

[0333] C4 절단 부위뿐만 아니라 MASP-2 세린 프로테아제 부위를 억제하는 다른 펩타이드로부터 유래된 펩타이드는 비

가역적인 프로테아제 억제제가 되도록 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 적절한 변형으로는, 반드시 한정하는 것은 아니지만, C-말단에서 할로메틸 케톤 (Br, Cl, I, F), Asp 또는 Glu, 또는 기능성 측쇄에 대한 첨부; 아미노기 또는 다른 기능성 측쇄 상의 할로아세틸 (또는 다른 α -할로아세틸) 기; 아미노 또는 카르복시 말단 상의 또는 기능성 측쇄 상의 에폭사이드 또는 이민 함유 기; 또는 아미노 또는 카르복시 말단 상의 또는 기능성 측쇄 상의 이미네이트 에스테르를 들 수 있다. 그러한 변형은 펩타이드의 공유 부착에 의해 효소를 영구적으로 억제하는 장점을 제공할 수 있다. 이것은 낮은 유효 용량 및/또는 펩타이드 억제제의 더 적은 빈도의 투여에 대한 필요성을 초래할 수 있을 것이다.

[0334] 위에서 기술된 억제 펩타이드 외에, 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드로는 본원에 기술된 것과 같이 얻어진 항-MASP-2 MoAb의 MASP-2-결합 CDR3 영역을 함유하는 펩타이드를 들 수 있다. 펩타이드의 합성에 사용하기 위한 CDR 영역의 서열은 기술분야에 알려져 있는 방법에 의해 결정될 수 있다. 중쇄 가변 영역은 일반적으로 길이가 100 내지 150 아미노산의 범위인 펩타이드이다. 경쇄 가변 영역은 일반적으로 길이가 80 내지 130 아미노산의 범위인 펩타이드이다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 내의 CDR 서열은 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에 의해 쉽게 서열이 분석될 수 있는 대략 3-25개 아미노산 서열만을 포함한다.

[0335] 기술분야에 숙련된 사람은 위에서 기술된 MASP-2 억제 펩타이드의 실질적으로 상동성인 변이가 또한 MASP-2 억제 활성을 나타낼 것임을 인식할 것이다. 예시의 변이로는, 반드시 한정하는 것은 아니지만, 삽입, 결실, 대체, 및/또는 대상체 펩타이드 및 그것의 혼합물의 카르복시 말단 또는 아미노 말단 부분 상에 추가적인 아미노산을 가지는 펩타이드를 들 수 있다. 따라서, MASP-2 억제 활성을 가지는 상동성 펩타이드는 본 발명의 방법에 유용한 것으로 간주된다. 기술된 펩타이드는 또한 복제하는 모티프 및 보존성 치환이 있는 다른 변형을 포함할 수 있다. 보존성 변이체는 본원의 다른 곳에서 기술되며, 유사한 전하, 크기 또는 소수성 등의 또 다른 아미노산에 대한 아미노산의 교환을 포함한다.

[0336] MASP-2 억제 펩타이드는 용해도를 증가시키거나 및/또는 온전한 단백질의 분해를 보다 밀접하게 닮기 위하여 양전하 또는 음전하를 최대화하기 위하여 변형될 수 있다. 유도체는 그것이 MASP-2 억제제의 원하는 특성을 기능적으로 보유하는 한 본원에 개시된 펩타이드의 정확한 일차 아미노산 구조를 가질 수 있거나 갖지 않을 수 있다. 변형은 일반적으로 알려져 있는 20개의 아미노산 중 하나로 또는 또 다른 아미노산으로, 부수적으로 바람직한 특성, 예컨대 효소적 분해에 대한 내성을 가진 유도체화된 또는 치환된 아미노산으로 또는 D-아미노산 또는 아미노산, 아미노산들 또는 펩타이드의 천연 입체구조 및 기능을 모방하는 또 다른 분자 또는 화합물, 예컨대 탄수화물로의 치환으로의 아미노산 치환; 아미노산 결실; 일반적으로 알려져 있는 20개의 아미노산 중 하나로 또는 또 다른 아미노산으로, 부수적으로 바람직한 특성, 예컨대 효소적 분해에 대한 내성을 가진 유도체화된 또는 치환된 아미노산으로 또는 D-아미노산 또는 아미노산, 아미노산들 또는 펩타이드의 천연 입체구조 및 기능을 모방하는 또 다른 분자 또는 화합물, 예컨대 탄수화물로의 치환이 있는 아미노산 삽입; 또는 또 펩타이드의 천연 입체구조, 전하 분포 및 기능을 모방하는 또 다른 분자 또는 화합물, 예컨대 탄수화물 또는 핵산 모노머로의 치환을 들 수 있다. 펩타이드는 또한 아세틸화 또는 아미드화에 의해 변형될 수 있다.

[0337] 유도체 억제 펩타이드의 합성은 펩타이드 생합성, 탄수화물 생합성 등의 알려져 있는 기법에 의존할 수 있다. 출발 지점으로서, 전문가가 관심 있는 펩타이드의 입체구조를 결정하기 위해 적합한 컴퓨터 프로그램에 의존할 수 있다. 본원에 개시된 펩타이드의 입체구조가 알려진 후에는, 전문가가 모 펩타이드의 기본적인 입체구조 및 전하 분포를 유지하지만 모 펩타이드에서 존재하지 않거나 발견되는 것보다 향상된 특성을 가질 수 있는 유도체를 만들기 위해 어떤 종류의 치환이 하나 이상의 부위에서 만들어질 수 있는지를 합리적인 설계 방식으로 결정할 수 있다. 후보 유도체 분자가 확인된 후에는, 유도체는 본원에 기술된 검정을 사용하여 그것이 MASP-2 억제제로서 기능하는지를 측정하기 위해 테스트될 수 있다.

[0338] MASP-2 억제 펩타이드에 대한 스크리닝

[0339] 당업자는 또한 MASP-2의 핵심 결합 영역의 분자 구조를 모방하고 MASP-2의 보체 활성을 억제하는 펩타이드를 생성하고 스크리닝하기 위하여 분자 모델링 및 합리적 분자 설계를 사용할 수 있다. 모델링에 사용된 분자 구조는 항-MASP-2 단클론성 항체의 CDR 영역뿐만 아니라, 앞서 기술된 것과 같이 다이머화에 필요한 영역, MBL에의 결합에 관여하는 영역, 및 세린 프로테아제 활성 부위를 포함한 MASP-2 기능에 중요한 것으로 알려져 있는 표적 영역을 포함한다. 특정 표적에 결합하는 펩타이드를 확인하는 방법은 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 분자 각인(molecular imprinting)이 특정 분자에 결합하는 펩타이드와 같은 거대분자 구조의 드노보 구성을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites", *TRIP* 2(5) 1994 참고.

- [0340] 예시적인 예로서, MASP-2 결합 펩타이드의 모방물을 제조하는 한 가지 방법은 다음과 같다. MASP-2 억제제를 나타내는 공지된 MASP-2 결합 펩타이드의 기능성 단량체 또는 항-MASP-2 항체의 결합 영역 (주형)이 중합된다. 그런 후 주형은 제거되고, 이어서 주형에 의해 남겨진 보이드의 제2 부류의 단량체가 중합되어 주형과 유사한 하나 이상의 원하는 특성을 나타내는 새로운 분자가 제공된다. 이런 방식으로 펩타이드를 제조하는 것 외에, 당당, 뉴클레오사이드, 약물, 핵단백질, 리포단백질, 탄수화물, 당단백질, 스테로이드, 지질 및 다른 생물학적 활성 물질과 같은 MASP-2 억제제인 다른 MASP-2 결합 분자가 또한 제조될 수 있다. 이 방법은 전형적으로 기능 단량체의 유리 라디칼 중합에 의해 제조되어 생분해되지 않는 백본을 가진 화합물을 초래하기 때문에 천연 대응물보다 더 안정적인 광범위한 생물학적 모방물을 설계하는 데 유용하다.
- [0341] 펩타이드 합성
- [0342] MASP-2 억제 펩타이드는 기술분야에 잘 알려져 있는 기법, 예컨대 처음에 Merrifield, in *J. Amer. Chem. Soc.* 85:2149-2154, 1963에서 기술된 고상 합성 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 자동 합성은, 예를 들어, Applied Biosystems 431A 펩타이드 합성기 (Foster City, Calif.)를 사용하여 제조사에 의해 제공된 설명서를 따라 달성될 수 있다. 다른 기법은, 예를 들어, Bodanszky, M., et al., *Peptide Synthesis*, second edition, John Wiley & Sons, 1976, 뿐만 아니라 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있는 다른 참조 작업에서 찾아볼 수 있다.
- [0343] 펩타이드는 또한 기술분야에 숙련된 사람들에게 알려져 있는 표준 유전자 조작 기법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 펩타이드를 암호화하는 핵산을 발현 벡터에 삽입하고, DNA를 발현시키고, DNA를 필요한 아미노산의 존재 하에 펩타이드로 번역함으로써 효소적으로 제조될 수 있다. 그런 후 펩타이드는 크로마토그래피 또는 전기영동 기법을 사용하여, 또는 담체 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 펩타이드를 암호화하는 서열과 보조를 맞추어 발현 벡터에 삽입함으로써 펩타이드에 융합된 후, 계속해서 펩타이드로부터 절단될 수 있는 담체 단백질에 의해 정제된다. 융합 단백질-펩타이드는 크로마토그래피, 전기영동 또는 면역학적 기법 (예컨대 담체 단백질에 대한 항체를 통해 수지에 결합됨)을 사용하여 분리될 수 있다. 펩타이드는 화학적 방법을 사용하여 또는 효소적으로, 예를 들어, 가수분해효소에 의해 절단될 수 있다.
- [0344] 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제 펩타이드는 또한 종래 기법을 따라 재조합 숙주 세포에서 제조될 수 있다. MASP-2 억제 펩타이드를 암호화하는 서열을 발현하기 위하여, 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 발현 벡터에서 전사 발현을 제어하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 후 숙주 세포에 도입되어야 한다. 전사 조절 서열, 예컨대 프로모터 및 인핸서 외에, 발현 벡터는 발현 벡터를 운반하는 세포의 선택에 적합한 전사 조절 서열 및 마커 유전자를 포함할 수 있다.
- [0345] MASP-2 억제 펩타이드를 암호화하는 핵산 분자는 포스포라미다이트 방법과 같은 프로토콜을 사용하여 "유전자 기계"로 합성될 수 있다. 만약 화학적으로 합성된 이중 가닥 DNA가 유전자 또는 유전자 단편의 합성과 같은 적용에 필요하다면, 각각의 상보하는 가닥이 별도로 만들어진다. 짧은 유전자 (60 내지 80 염기쌍)의 제조는 기술적으로 간단하며 상보하는 가닥을 합성한 후 그것들을 어닐링함으로써 이루어질 수 있다. 더 긴 유전자의 제조의 경우, 합성 유전자 (이중 가닥)가 길이가 20 내지 100개 뉴클레오타이드인 단일 가닥 단편으로부터 모듈식으로 조립된다. 폴리뉴클레오타이드 합성에 대한 검토에 대해서는, 예를 들어, 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, 1990 참조.
- [0346] 소분자 억제제
- [0347] 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 저분자량을 가지는 천연 및 합성 물질을 포함한 소분자 억제제, 예컨대 예를 들어, 펩타이드, 펩타이드 모방물 및 비펩타이드 억제제 (올리고뉴클레오타이드 및 유기 화합물을 포함함)이다. MASP-2의 소분자 억제제는 항-MASP-2 항체의 가변 영역의 분자 구조를 토대로 생성될 수 있다.
- [0348] 소분자 억제제는 또한 컴퓨터 약물 설계를 사용하여 MASP-2 결정 구조를 토대로 설계되고 생성될 수 있다 (Kuntz I.D., et al., *Science* 257:1078, 1992). 래트 MASP-2의 결정 구조가 기술되어 있다 (Feinberg, H., et al., *EMBO J.* 22:2348-2359, 2003). Kuntz 등에 의해 기술된 방법을 사용하여, MASP-2 결정 구조 좌표가 DOCK와 같은 컴퓨터 프로그램에 대한 입력값으로서 사용되고, MASP-2에 결합하는 것으로 예상되는 소분자 구조의 목록이 출력된다. 그러한 컴퓨터 프로그램의 사용은 기술분야에 숙련된 사람에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, HIV-1 프로테아제 억제제의 결정 구조는 프로그램 DOCK를 사용하여 캠브리지 결정학 데이터베이스에서 찾

은 화합물의 효소의 결합 부위에 대한 피팅을 평가함으로써 HIV-1 프로테아제 억제제인 독특한 비펩타이드 리간드를 확인하는 데 사용되었다 (Kuntz, I.D., et al., *J. Mol. Biol.* 161:269-288, 1982; DesJarlais, R. L., et al., *PNAS* 87:6644-6648, 1990).

- [0349] 컴퓨터 방법에 의해 잠재적 MASP-2 억제제로서 확인된 소분자 구조의 목록은 실시예 10에서 기술된 것과 같은 MASP-2 결합 검정을 사용하여 스크리닝된다. 그런 후 MASP-2에 결합하는 것으로 나타난 소분자는 실시예 2에서 기술된 것과 같은 기능성 검정으로 검정되어 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하는지가 측정된다.
- [0350] MASP-2 가용성 수용체
- [0351] 다른 적합한 MASP-2 억제제는 기술분야에 통상적인 지식을 가진 사람에게 알려져 있는 기법을 사용하여 제조될 수 있는 MASP-2 가용성 수용체를 포함하는 것으로 여겨진다.
- [0352] MASP-2의 발현 억제제
- [0353] 발명의 이 측면의 또 다른 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제할 수 있는 MASP-2 발현 억제제이다. 발명의 이 측면의 실시에서, 대표적인 MASP-2 발현 억제제로는 MASP-2 안티센스 핵산 분자 (예컨대 안티센스 mRNA, 안티센스 DNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드), MASP-2 리보자임 및 MASP-2 RNAi 분자를 들 수 있다.
- [0354] 안티센스 RNA 및 DNA 분자는 MASP-2 mRNA에 혼성화하여 MASP-2 단백질의 번역을 방지함으로써 MASP-2 mRNA의 번역을 직접적으로 차단하는 작용을 한다. 안티센스 핵산 분자는 MASP-2의 발현을 간접할 수 있는 많은 상이한 방법으로 구성될 수 있다. 예를 들어, 안티센스 핵산 분자는 전사에 대한 정상적인 방향과 관련하여 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4)의 코딩 영역 (또는 그것의 일부)을 거꾸로 하여 그것의 보체의 전사를 허용함으로써 구성될 수 있다.
- [0355] 안티센스 핵산 분자는 일반적으로 표적 유전자 또는 유전자들의 적어도 일부에 실질적으로 동일하다. 그러나, 핵산은 발현을 억제하기 위해 완벽하게 동일할 필요는 없다. 일반적으로, 더 높은 상동성이 더 짧은 안티센스 핵산 분자의 사용을 보상하기 위해 사용될 수 있다. 최소 퍼센트 동일성은 전형적으로 약 65%보다 크지만, 더 높은 퍼센트 동일성이 내인성 서열의 발현의 보다 효과적인 억제를 발휘할 수 있다. 실질적으로 약 80%의 더 큰 퍼센트 동일성이 바람직하지만, 약 95% 내지 절대 동일성이 전형적으로 가장 바람직하다.
- [0356] 안티센스 핵산 분자는 표적 유전자와 동일한 인트론 또는 엑손 패턴을 가질 필요가 없으며, 표적 유전자의 비코딩 분절은 표적 유전자 발현의 안티센스 억제를 이루는데 코딩 분절과 동등하게 효과적일 수 있다. 적어도 약 8개 정도의 뉴클레오타이드의 DNA 서열이 안티센스 핵산 분자로서 사용될 수 있지만, 더 긴 서열이 바람직하다. 본 발명에서, MASP-2의 유용한 억제제의 대표적인 예는 SEQ ID NO:4에 제시된 핵산 서열로 이루어지는 MASP-2 cDNA에 대해 적어도 90 퍼센트 동일한 안티센스 MASP-2 핵산 분자이다. SEQ ID NO:4에 제시된 핵산 서열은 SEQ ID NO:5에 제시된 아미노산 서열로 이루어지는 MASP-2 단백질을 암호화한다.
- [0357] MASP-2 mRNA에 결합하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적화는 MASP-2 단백질 합성의 수준을 감소시킬 수 있는 또 다른 메커니즘이다. 예를 들어, 폴리갈락투로나제 및 무스카린 유형 2 아세틸콜린 수용체의 합성은 그들 각각의 mRNA 서열에 대해 지시된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 억제된다 (Cheng에게 부여된 미국 특허 제 5,739,119호, 및 Shewmaker에게 부여된 미국 특허 제 5,759,829,호). 나아가, 안티센스 억제제의 예는 핵 단백질 사이클린, 다중 약물 내성 유전자 (MDG1), ICAM-1, E-선택틴, STK-1, 선조체 GABA_A 수용체 및 인간 EGF로 입증되었다 (예컨대, Baracchini에게 부여된 미국 특허 제 5,801,154호; Baker에게 부여된 미국 특허 제 5,789,573호; Considine에게 부여된 미국 특허 제 5,718,709호; 및 Reubenstein에게 부여된 미국 특허 제 5,610,288호 참고).
- [0358] 올리고뉴클레오타이드가 발명에 유용한지를 당업자가 측정하는 것을 허용하고, 전사체 내의 서열의 접근성에 대한 지표로서 Rnase H 절단을 사용하여 표적 mRNA의 적합한 부위를 프로빙하는 것을 포함하는 시스템이 기술되었다. Scherr, M., et al., *Nucleic Acids Res.* 26:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., *Nucleic Acids Res.* 29:3665-3673, 2001. MASP-2 전사체의 특정 영역에 상보하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 혼합물이 MASP-2를 발현하는 세포 추출물, 예컨대 간세포에 첨가되고, 혼성화되어 RNaseH 취약 부위가 생성된다. 이 방법은 다이머, 헤어핀, 또는 숙주 세포에서 표적 mRNA에 대한 특이적 결합을 감소시키거나 금지할 다른 이차 구조를 형성하는 상대적인 능력을 토대로 안티센스 조성물에 대한 최적의 서열 선택을 예측할 수 있는 컴퓨터-보조 서열 선택과 조합될 수 있다. 이들 이차 구조 분석 및 표적 부위 선택 고려는 올리고 프라이머 분석 소프트웨어

(Rychlik, I., 1997) 및 BLASTN 2.0.5 알고리즘 소프트웨어 (Altschul, S.F., et al., *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402, 1997)를 사용하여 수행될 수 있다. 표적 서열에 대해 지시된 안티센스 화합물은 바람직하게 약 8 내지 약 50개 뉴클레오타이드의 길이를 포함한다. 약 9 내지 약 35개 정도의 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 35개 정도의 염기의 길이의 것)이 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드-기반 방법의 실시예에 매우 바람직하다고 여긴다. MASP-2 mRNA의 매우 바람직한 표적 영역은 AUG 번역 개시 코돈에 또는 근처에 있는 영역, 및 mRNA의 5' 영역, 예컨대, MASP-2 유전자 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO:4)의 -10 내지 +10 영역 사이에 실질적으로 상보하는 그런 서열이다. 예시적인 MASP-2 발현 억제제가 표 4에 제공된다.

표 4

예시의 MASP-2의 발현 억제제

SEQ ID NO:30 (SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 22-680)	CUBIEGF를 암호화하는 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4)의 핵산 서열
SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCTCCTGGGC3	MASP-2 번역 시작 부위 (센스)를 포함하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 12-45
SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTTCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'	MASP-2 MBL 결합 부위 (센스)를 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 361-396
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3'	CUBII 도메인을 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 610-642

위에서 주지된 것과 같이, 본원에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 그것들의 모방물의 올리고머 또는 중합체를 나타낸다. 이 용어는 또한 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드, 당 및 공유 뉴클레오사이드간 (백본) 결합으로 구성된 올리고핵염기뿐만 아니라 자연적으로 발생하지 않는 변형을 가진 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 이들 변형은 당염자가 자연적으로 발생하는 올리고뉴클레오타이드를 통해 제공되지 않는 특정한 바람직한 특성, 예컨대 감소된 독성 특성, 뉴클레아제 분해에 대해 증가된 안정성 및 향상된 세포 흡수력을 도입하는 것을 허용한다. 예시적인 구체예에서, 발명의 안티센스 화합물은 포스페이트 치환기가 포스포로티오에이트로 대체되어 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 수명을 연장시키기 위한 포스포다이에스테르 백본의 변형에 의해 천연 DNA와 상이하다. 마찬가지로, 올리고뉴클레오타이드의 한 쪽 또는 양 단부는 핵산 가닥 내의 인접한 염기쌍 사이에 삽입되는 하나 이상의 아크리딘 유도체에 의해 치환될 수 있다.

안티센스에 대한 또 다른 대안은 "RNA 간섭" (RNAi)의 사용이다. 이중 가닥 RNA (dsRNA)는 생체내에서 포유류의 유전자 사일런싱을 유발할 수 있다. RNAi의 자연적인 기능 및 공동 억제제 레트로트랜스포존 및 활성이 되었을 때 숙주 세포에서 비정상적인 RNA 또는 dsRNA를 생성하는 바이러스와 같은 이동하는 유전자 요소에 의한 침입에 대해 계능을 보호하는 것으로 여겨진다 (예컨대, Jensen, J., et al., *Nat. Genet.* 21:209-12, 1999 참고). 이중 가닥 RNA 분자는 이중 가닥 RNA 분자를 형성할 수 있는, 각각이 약 19 내지 25개 (예컨대, 19-23개 뉴클레오타이드)의 길이를 가지는 2개의 RNA 가닥을 합성함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 발명의 방법에 유용한 dsRNA 분자는 표 4에 열거된 서열 및 그것의 보체에 상응하는 RNA를 포함할 수 있다. 바람직하게, RNA의 적어도 하나의 가닥은 1-5개 뉴클레오타이드로부터의 3' 돌출을 가진다. 합성된 RNA 가닥은 이중 가닥 분자를 형성하는 조건 하에서 조합된다. RNA 서열은 SEQ ID NO:4의 적어도 8개의 뉴클레오타이드 부분을 포함할 수 있고 총 길이는 25개 뉴클레오타이드 이하이다. 주어진 표적에 대한 siRNA 서열의 설계는 기술분야의 당업자의 통상적인 지식 내에 있다. siRNA 서열을 설계하고 발현의 적어도 70%의 knockdown을 보장하는 상업적 서비스가 이용 가능하다 (Qiagen, Valencia, Calif).

dsRNA는 제약학적 조성물로서 투여될 수 있고 공지된 방법에 의해 수행될 수 있으며, 이때 핵산은 원하는 표적 세포로 도입된다. 일반적으로 사용되는 유전자 전달 방법으로 인산 칼슘, DEAE-덱스트란, 전기천공, 미세주입 및 바이러스 방법을 들 수 있다. 그러한 방법은 Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1993에서 교시된다.

MASP-2 mRNA를 표적으로 하는 리보자임과 같이, 리보자임이 또한 MASP-2의 양 및/또는 생물학적 활성을 감소시

키기 위해 활용될 수 있다. 리보자임은 리보자임의 서열에 완전히 또는 부분적으로 상동하는 서열을 갖는 핵산 분자를 절단할 수 있는 촉매적 RNA 분자이다. 표적 RNA와 특이적으로 쌍을 형성하고 특정 위치에서 포스포다이에스테르 백본을 절단함으로써 표적 RNA를 기능적으로 비활성화시키는 RNA 리보자임을 암호화하는 리보자임 도입유전자를 설계하는 것이 가능하다. 이런 절단을 수행할 때, 리보자임은 자체가 변화하지 않으며, 따라서 다른 분자를 재순환시키고 절단할 수 있다. 안티센스 RNA 내에 리보자임 서열을 포함시킴으로써, 그것에 RNA-절단 활성을 부여하고 그로써 안티센스 구성물의 활성이 증가한다.

[0364] 발명의 실시예에 유용한 리보자임은 전형적으로, 표적 MASP-2 mRNA의 적어도 일부에 대해 뉴클레오타이드서열에서 상보하는 적어도 약 9개 뉴클레오타이드의 혼성화 영역, 및 표적 MASP-2 mRNA를 절단하기 위해 적용된 촉매적 영역을 포함한다 (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 참고).

[0365] 리보자임은 리보자임 서열을 통합하는 RNA 올리고뉴클레오타이드의 형태로 세포에 대해 직접 표적화되거나, 또는 원하는 리보자임 RNA를 암호화하는 발현 벡터로서 세포에 도입될 수 있다. 리보자임은 안티센스 폴리뉴클레오타이드에 대해 기술된 것과 거의 같은 방식으로 사용되고 적용될 수 있다.

[0366] 발명의 방법에 유용한 안티센스 RNA 및 DNA, 리보자임 및 RNAi 분자는 DNA 및 RNA 분자의 합성에 대해 기술분야에 알려져 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 이것들로는 기술분야에 잘 알려져 있는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 및 올리고리보뉴클레오타이드를 화학적으로 합성하기 위한 기법, 예컨대 예를 들어 고상 포스포라미다이트 화학적 합성을 들 수 있다. 대안으로, RNA 분자는 안티센스 RNA 분자를 암호화하는 DNA 서열의 시험관내 및 생체내 전사에 의해 생성될 수 있다. 그러한 DNA 서열은 T7 또는 SP6 중합효소 프로모터와 같은 적합한 RNA 중합효소 프로모터를 통합하는 광범위한 벡터에 통합될 수 있다. 대안으로, 사용된 프로모터에 따라 안티센스 RNA를 구성적으로 또는 유도적으로 합성하는 안티센스 cDNA 구성물이 세포주에 안정적으로 도입될 수 있다.

[0367] DNA 분자의 잘 알려져 있는 다양한 변형이 증가하는 안정성 및 반감기의 수단으로서 도입될 수 있다. 유용한 변형으로는, 한정하는 것은 아니지만, 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드의 플랭킹 서열의 분자의 5' 및/또는 3' 단부의 첨가 또는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 백본 내에서 포스포다이에스테라제 결합보다는 포스포로티오에이트 또는 2' O-메틸의 사용을 들 수 있다.

[0368] VI. 제약학적 조성물 및 전달 방법

[0369] 투약

[0370] 또 다른 측면으로, 발명은 대상체에게 치료적 유효량의 MASP-2 억제제 및 제약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 본원에 개시된 질환 또는 상태를 앓고 있는 대상체에서 MASP-2-의존성 보체 활성화의 부작용을 억제하기 위한 조성물을 제공한다. MASP-2 억제제는 MASP-2-의존성 보체 활성화와 관련된 상태를 치료 또는 개선하기 위하여 치료적 유효 용량으로 그것을 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 치료적 유효 용량은 질환 또는 상태와 관련된 증상의 개선을 초래하기에 충분한 MASP-2 억제제의 양을 나타낸다.

[0371] MASP-2 억제제의 독성 및 치료 효능은 실험 동물 모델, 예컨대 실시예 1에서 기술된 인간 MASP-2 도입유전자를 발현하는 쥐와 MASP-2 -/- 마우스 모델을 사용하여 표준 제약학적 과정에 의해 측정될 수 있다. 그러한 동물 모델을 사용하여, NOEL (관찰된 부작용 수준이 없음) 및 MED (최소한의 유효 용량)는 표준 방법을 사용하여 측정될 수 있다. NOEL과 MED 효과 사이의 용량 비는 NOEL/MED 비율로서 표시되는 치료적 비율이다. 큰 치료적 비율 또는 지수를 나타내는 MASP-2 억제제가 가장 바람직하다. 세포 배양 검증 및 동물 연구로부터 얻어진 데이터는 인간에서 사용하기 위한 범위의 투여량을 공식화하는 데 사용될 수 있다. MASP-2 억제제의 투여량은 바람직하게 거의 또는 전혀 독성이 없는 MED를 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 활용된 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 다양할 수 있다.

[0372] 임의의 화합물 제형에 대해, 치료적 유효 용량은 동물 모델을 사용하여 추정될 수 있다. 예를 들어, 용량은 MED를 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 이루기 위하여 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 혈장 중의 MASP-2 억제제의 정량적 수준이 또한, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0373] 독성 연구 외에, 효과적인 투여량은 또한 살아있는 대상체에 존재하는 MASP-2 단백질의 양 및 MASP-2 억제제의 결합 친화도를 토대로 하여 추정될 수 있다. 정상적인 인간 대상체의 MASP-2 수준은 혈청에 500 ng/ml의 범위의 저수준으로 존재하는 것으로 나타났으며, 특정 대상체에서 MASP-2 수준은 Moller-Kristensen M., et al.,

J. Immunol. Methods 282:159-167, 2003에서 기술된 MASP-2에 대한 정량적 검정을 사용하여 측정될 수 있다.

- [0374] 일반적으로, MASP-2 억제제를 포함하는 투여된 조성물의 투여량은 대상체의 연령, 체중, 신장, 성별, 일반적인 의학적 상태, 및 이전의 병력과 같은 인자에 따라 달라진다. 예시로서, MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체는 약 0.010 내지 10.0 mg/kg, 바람직하게 0.010 내지 1.0 mg/kg, 보다 바람직하게 0.010 내지 0.1 mg/kg의 대상체 체중의 투여량 범위로 투여될 수 있다. 일부 구체예에서 조성물은 항-MASP-2 항체 및 MASP-2 억제 펩타이드의 조합을 포함한다.
- [0375] 주어진 대상체에서 본 발명의 MASP-2 억제 조성물 및 방법의 치료적 효능, 및 적절한 투여량은 기술분야에 숙련된 사람들에게 잘 알려져 있는 보체 검정에 따라 측정될 수 있다. 보체는 수많은 특정 생성물을 생성한다. 지난 십년 동안, 민감하고 특이적인 검정이 개발되었고 작은 활성화 단편 C3a, C4a, 및 C5a 및 큰 활성화 단편 iC3b, C4d, Bb, 및 sC5b-9를 포함한 이들 활성화 생성물 중 대부분에 대해 상업적으로 이용 가능하다. 이들 검정의 대부분은 새로운 항원이 형성되는 천연 단백질 상이 아닌, 단편 상에 노출된 새로운 항원 (네오항원)과 반응하여 이들 검정을 매우 단순하고 특이적으로 만드는 단클론성 항체를 활용한다. 대부분은 ELISA 기술에 의존하지만, 방사선 면역검정은 여전히 때때로 C3a 및 C5a에 대해 사용된다. 이들 후자의 검정은 순환에서 발견되는 주요 형태인 미처리된 단편 및 그것의 'desArg' 단편을 모두 측정한다. 미처리된 단편 및 C5a_{desArg}은 세포 표면 수용체와의 결합에 의해 신속하게 제거되며 따라서 매우 낮은 농도로 존재하는 반면, C3a_{desArg}은 세포에 결합하지 않고 혈장에 축적된다. C3a의 측정은 보체 활성화의 민감한, 경로-무관한 지표를 제공한다. 대체 경로 활성화는 Bb 단편을 측정함으로써 평가될 수 있다. 막 공격 경로 활성화의 유동상 생성물인 sC5b-9의 검출은 보체가 완료되기 위하여 활성화되고 있다는 증거를 제공한다. 렉틴 및 고전적 경로가 둘 다 동일한 활성화 생성물인 C4a 및 C4d를 생성하기 때문에, 이들 두 단편의 측정은 이들 두 경로 중 어느 것이 활성화 생성물을 생성했는지에 대한 어떠한 정보도 제공하지 못한다.
- [0376] MASP-2-의존성 보체 활성화의 억제는 발명의 방법에 따라 MASP-2 억제제의 투여의 결과로서 발생하는 보체 시스템의 구성요소의 다음 변화 중 적어도 하나를 특징으로 한다: MASP-2-의존성 보체 활성화 시스템 생성물 C4b, C3a, C5a 및/또는 C5b-9 (MAC)의 생성 또는 생산의 억제 (예를 들어, 실시예 2에서 기술된 것과 같이 측정됨), C4 절단 및 C4b 침착의 감소 (예를 들어 실시예 10에서 기술된 것과 같이 측정됨), 또는 C3 절단 및 C3b 침착의 감소 (예를 들어, 실시예 10에서 기술된 것과 같이 측정됨).
- [0377] 추가 작용제
- [0378] MASP-2 억제제를 포함하는 조성물 및 방법은 MASP-2 억제제의 활성을 증대시킬 수 있거나 또는 추가적인 또는 상조적 방식으로 관련된 치료 기능을 제공하는 하나 이상의 추가 치료제를 선택적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, TTP를 앓고 있는 대상체를 치료하는 맥락에서, 여기서 대상체는 ADAM-TS13의 억제제에 대해 양성인 경우에, 하나 이상의 MASP-2 억제제는 하나 이상의 면역억제제와 함께 투여될 수 있다 (공동 투여를 포함함). 적합한 면역억제제로는: 코르티코스테로이드, 리툭산, 사이클로스포린, 등을 들 수 있다. HUS 또는 aHUS를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 맥락에서, 하나 이상의 MASP-2 억제제는 적합한 항생물질과 함께 투여될 수 있다 (공동 투여를 포함함). aHUS를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체를 치료하는 맥락에서, 하나 이상의 MASP-2 억제제는 에콜리주맙 (Soliris), TT-30, 인자 B에 대한 항체, 또는 말단 보체 구성요소 또는 대체 경로 증폭을 억제하는 다른 작용제와 같은 다른 보체 억제제와 함께 투여될 수 있다 (공동 투여를 포함함).
- [0379] 추가 작용제(들)의 포함 및 선택은 원하는 치료 결과를 이루기 위해 결정될 것이다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 하나 이상의 항염증제 및/또는 진통제와 함께 투여될 수 있다. 적합한 항염증제 및/또는 진통제로는: 세로토닌 수용체 길항물질; 세로토닌 수용체 작용물질(agonists); 히스타민 수용체 길항물질(antagonist); 브래디키닌(bradykinin) 수용체 길항물질; 칼리크레인(kallikrein) 억제제; 타키키닌(tachykinin) 수용체 길항물질, 이틀테면 뉴로키닌₁ 및 뉴로키닌₂ 수용체 하위유형 길항물질; 칼시토닌 유전자 관련 펩타이드 (CGRP) 수용체 길항물질; 인터류킨 수용체 길항물질; 아라키돈산 대사산물에 대한 합성 경로에서 활성인 효소의 억제제, 이틀테면 포스포리파제 억제제, 이틀테면 PLA₂ 동형 억제제 및 PLC_β 동형 억제제, 사이클로옥시게나제 (COX) 억제제 (COX-1, COX-2, 또는 비선택적 COX-1 및 -2 억제제일 수 있음), 리포옥시게나제 억제제; 에이코사노이드 EP-1 및 EP-4 수용체 하위유형 길항물질 및 트롬복산 수용체 하위유형 길항물질을 포함한 프로스타노이드 수용체 길항물질; 류코트리엔 B₄ 수용체 하위유형 길항물질 및 류코트리엔 D₄ 수용체 하위유형 길항물질을 포함한 류코트리엔 수용체 길항물질; m-오피오이드, d-오피오이드, 및 k-오피오이드 수용체 하위유형 작용

물질을 포함한 오피오이드 수용체 작용물질; P_{2X} 수용체 길항물질 및 P_{2Y} 수용체 작용물질을 포함한 퓨리노셉터 작용물질 및 길항물질; 아데노신 트라이포스페이트 (ATP)-민감성 칼륨 채널 오프너; MAP 키나제 억제제; 니코틴 성 아세틸콜린 억제제; 및 알파 아드레날린성 수용체 작용물질 (알파-1, 알파-2, 및 비선택적 알파-1 및 2 작용물질)을 들 수 있다.

[0380] 본 발명의 MASP-2 억제제는 또한 하나 이상의 다른 보체 억제제, 예컨대 C5의 억제제와 함께 투여될 수 있다. 지금까지, C5에 대한 항체인 에쿨리주맙 (Solaris®)은 인간에게 사용이 승인된 유일한 보체-표적화 약물이다. 그러나, 일부 약리학적 작용제가 생체내에서 보체를 차단하는 것으로 나타났다. K76C00H 및 나팜스타트 메실레이트(nafamstat mesilate)는 이식의 동물 모델에서 일부 유효성을 보인 2가지 작용제이다 (Miyagawa, S., et al., *Transplant Proc.* 24:483-484, 1992). 저분자량 헤파린은 또한 보체 활성을 조절하는 데 효과적인 것으로 나타났다 (Edens, R.E., et al., *Complement Today*, pp. 96-120, Basel: Karger, 1993). 이들 소분자 억제제는 본 발명의 MASP-2 억제제와 함께 사용하기 위한 작용제로서 유용할 수 있는 것으로 여겨진다.

[0381] 다른 자연적으로 발생하는 보체 억제제는 본 발명의 MASP-2 억제제와 함께 유용할 수 있다. 보체의 생물학적 억제제는 보체 인자 1 (sCR1)을 포함한다. 이것은 인간 세포의 외막에서 발견될 수 있는 자연적으로 발생하는 억제제이다. 다른 막 억제제로는 DAF, MCP, 및 CD59를 들 수 있다. 재조합 형태는 시험관내 및 생체내에서 그것의 항-보체 활성에 대해 테스트되었다. sCR1은 이종이식에서 효과적인 것으로 나타났으며, 이때 보체 시스템 (대체 및 고전적 둘 다)은 새롭게 이식된 장기를 통해 관류한 지 수분 내에 과잉반응성 거부반응 증후군에 대한 촉발요인을 제공한다 (Platt, J.L., et al., *Immunol. Today* 11:450-6, 1990; Marino, I.R., et al., *Transplant Proc.* 1071:6, 1990; Johnstone, P.S., et al., *Transplantation* 54:573-6, 1992). sCR1의 사용은 이식된 장기를 보호하고 그것의 생존 시간을 연장하여, 장기 생존의 병인에서 보체 경로를 연루시킨다 (Leventhal, J.R., et al., *Transplantation* 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K., et al., *Transplantation* 57:363-70, 1994).

[0382] 본 발명의 조성물과 함께 사용하기에 적합한 추가 보체 억제제로는 또한, 예를 들자면, Alexion Pharmaceuticals, Inc. (New Haven, Connecticut)사에 의해 개발 중인 항-C5 항체 (예컨대, 에쿨리주맙)와 같은 MoAb, 및 항-프로퍼딘 MoAb를 들 수 있다.

[0383] 제약학적 담체 및 전달 비히클

[0384] 일반적으로, 임의의 다른 선택된 치료제와 조합된 본 발명의 MASP-2 억제제 조성물은 제약학적으로 허용되는 담체에 적합하게 함유된다. 담체는 무독성, 생체적합하며 MASP-2 억제제 (및 그것과 조합된 임의의 다른 치료제)의 생물학적 활성에 유해하게 영향을 미치지 않도록 선택된다. 펩타이드에 대한 예시의 제약학적으로 허용되는 담체는 Yamada에 대해 부여된 미국 특허 제 5,211,657호에서 기술된다. 발명에 유용한 항-MASP-2 항체 및 억제 펩타이드는 경구, 비경구 또는 외과용 투여를 가능하게 하는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 기탁제, 흡입제 및 주사제와 같은 고체, 반고체, 겔, 액체 또는 수성 형태의 제제로 제형화될 수 있다. 발명은 또한 의료 장치 등의 코팅에 의한 조성물의 국소 투여를 고려한다.

[0385] 주사 가능한, 주입 또는 관개 및 국소 전달을 통한 비경구 전달에 적합한 담체로는 증류수, 생리학적 인산염-완충 식염수, 일반적인 또는 락테이트 첨가 링거액, 텍스트로스 용액, 헵크 용액, 또는 프로판다이올을 들 수 있다. 더불어, 멸균된, 고정 오일이 용매 또는 현탁 매질로서 사용될 수 있다. 이 목적에 대해 합성 모노- 또는 다이글리세라이드를 포함한 임의의 생체적합성 오일이 사용될 수 있다. 더불어, 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에 사용될 수 있다. 담체 및 작용제는 액체, 현탁액, 중합 가능한 또는 비-중합성 겔, 페이스트 또는 고약으로서 합성될 수 있다.

[0386] 담체는 또한 작용제(들)의 전달을 지속 (즉, 연장, 지연 또는 조절)시키기 위하여 또는 치료제(들)의 전달, 흡수, 안정성 또는 약동학을 향상시키기 위하여 전달 비히클을 포함할 수 있다. 그러한 전달 비히클로는, 비제한적인 예를 들자면, 단백질로 구성된 미세입자, 마이크로스피어, 나노스피어 또는 나노입자, 리포솜, 탄수화물, 합성 유기 화합물, 무기 화합물, 중합체 또는 공중합체 하이드로겔 및 중합체 미셀을 들 수 있다. 적합한 하이드로겔 및 미셀 전달 시스템으로는 WO 2004/009664 A2에서 개시된 PEO:PHB:PEO 공중합체 및 공중합체/사이클로텍스트린 복합체 및 미국 특허 출원 공개 공보 2002/0019369 A1에서 개시된 PEO 및 PEO/사이클로텍스트린을 들 수 있다. 그러한 하이드로겔은 의도된 작용 부위에 국소적으로, 또는 지속적인 방출 데포를 형성하기 위하여 피하로 또는 근육내로 주입될 수 있다.

[0387] 관절내 전달의 경우, MASP-2 억제제는 주사 가능한 상기 기술된 액체 또는 겔 담체, 주사 가능한 상기 기술된

지속성 방출 전달 비히클, 또는 히알루론산 또는 히알루론산 유도체로 운반될 수 있다.

- [0388] 비-펩타이드성 작용제의 경구 투여의 경우, MASP-2 억제제는 수크로스, 옥수수 전분, 또는 셀룰로스와 같은 비활성 충전제 또는 희석제로 운반될 수 있다.
- [0389] 국소 투여의 경우, MASP-2 억제제는 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭, 좌제, 스프레이, 액체 또는 분말로, 또는 경피 패치를 통한 젤 또는 마이크로캡슐 전달 시스템으로 운반될 수 있다.
- [0390] 에어로졸, 계량-용량 흡입기, 건조 분말 흡입기, 및 분무기를 포함한 다양한 코 및 폐 전달 시스템이 개발 중이며 각각 에어로졸, 흡입제, 또는 분무된 전달 비히클로 본 발명의 전달을 위해 적합하게 적응될 수 있다.
- [0391] 척수강내 (IT) 또는 뇌실내 (ICV) 전달의 경우, 적절하게 멸균된 전달 시스템 (예컨대, 액체; 젤, 현탁액, 등)이 본 발명을 투여하기 위해 사용될 수 있다.
- [0392] 본 발명의 조성물은 또한 생체적합성 부형제, 예컨대 분산 또는 습윤제, 현탁제, 희석제, 완충제, 침투 증강제, 유화제, 결합제, 증점제, 풍미제 (경구 투여용)를 포함할 수 있다.
- [0393] 항체 및 펩타이드를 위한 제약학적 담체
- [0394] 항-MASP-2 항체 및 억제 펩타이드와 관련하여 보다 구체적으로, 예시의 제형은 물, 오일, 식염수, 글리세롤 또는 에탄올과 같이 멸균된 액체일 수 있는 제약학적 담체와 함께 생리적으로 허용되는 희석제 중의 화합물의 용액 또는 현탁액의 주사 가능한 투여량으로서 비경구로 투여될 수 있다. 추가적으로, 습윤 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등과 같은 보조 물질이 항-MASP-2 항체 및 억제 펩타이드를 포함하는 조성물에 존재할 수 있다. 제약학적 조성물의 추가 구성요소로는 석유 (예컨대 동물, 식물성 또는 합성 기원의 석유), 예를 들어, 대두 오일 및 미네랄 오일을 들 수 있다. 일반적으로, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 주사용 용액에 대해 바람직한 액체 담체이다.
- [0395] 항-MASP-2 항체 및 억제 펩타이드는 또한 활성제의 지속적인 또는 박동성 방출을 허용하기 위한 것과 같은 방식으로 제형화될 수 있는 데포 주사 또는 임플란트 제제의 형태로 투여될 수 있다.
- [0396] 발현 억제제를 위한 제약학적으로 허용되는 담체
- [0397] 발명의 방법에 유용한 발현 억제제와 관련하여 보다 구체적으로, 위에서 기술된 발현 억제제 및 제약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물이 제공된다. 조성물은 추가로 콜로이드 분산 시스템을 포함할 수 있다.
- [0398] 발현 억제제를 포함하는 제약학적 조성물로는, 한정하는 것은 아니지만, 용액, 에멀션, 및 리포솜-함유 제형을 들 수 있다. 이들 조성물은, 한정하는 것은 아니지만, 사전 형성된 액체, 자기 유화 고체 및 자기 유화 반고체로부터 생성될 수 있다. 그러한 조성물의 제조는 전형적으로 발현 억제제를 다음 중 하나 이상과 조합하는 것을 포함한다: 완충제, 항산화제, 저분자량 폴리펩타이드, 단백질, 아미노산, 글루코스, 수크로스 또는 텍스트린을 포함한 탄수화물, EDTA와 같은 킬레이트화제, 글루타티온 및 기타 안정화제 및 부형제. 중성 완충 식염수 또는 비특이적 혈청 알부민과 혼합된 식염수가 적합한 희석제의 예이다.
- [0399] 일부 구체예에서, 조성물은 전형적으로 액체의 형태로 또 다른 액체에 분산된 한 액체의 이질적 시스템인 에멀션으로서 제조되고 제형화될 수 있다 (Idson, in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1, Rieger and Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988 참고). 에멀션 제형에 사용된 자연적으로 발생하는 유화제의 예로는 아카시아, 밀랍, 라놀린, 레시틴 및 포스파타이드를 들 수 있다.
- [0400] 한 구체예에서, 핵산을 포함하는 조성물은 마이크로에멀션으로서 제형화될 수 있다. 본원에서 사용되는 바 마이크로에멀션은 물, 오일, 및 양친매성 용매의 시스템을 나타내며, 광학적으로 단일 등방성이며 열역학적으로 안정적인 액체 용액이다 (Rosoff in *Pharmaceutical Dosage Forms*, Vol. 1 참고). 발명의 방법은 또한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 원하는 부위로의 이동 및 전달을 위해 리포솜을 사용할 수 있다.
- [0401] 국소 투여를 위한 발현 억제제의 제약학적 조성물 및 제형으로는 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 드롭, 좌제, 스프레이, 액체 및 분말을 들 수 있다. 종래의 제약학적 담체뿐만 아니라, 수성, 분말 또는 유성 염기 및 증점제 등이 사용될 수 있다.
- [0402] 투여 방식
- [0403] MASP-2 억제제를 포함하는 제약학적 조성물은 국소적인 또는 전신성 방식의 투여가 치료되는 상태에 가장 적절

한지에 따라 많은 방법으로 투여될 수 있다. 추가적으로, 본원에서 체외 재관류 과정과 관련하여 위에서 기술된 것과 같이, MASP-2 억제제는 본 발명의 조성물의 순환하는 혈액 또는 혈장액에의 도입을 통해 투여될 수 있다. 추가로, 본 발명의 조성물은 이식된 의료 장치 상에 또는 그 안으로 조성물을 코팅하거나 통합시킴으로써 전달될 수 있다.

[0404] 전신성 전달

[0405] 본원에서 사용되는 바, 용어 "전신성 전달" 및 "전신성 투여"는 한정하는 것은 아니지만 근육내 (IM), 피하, 정맥내 (IV), 동맥내, 흡입, 허밀, 볼, 국소적, 경피, 코, 직장, 질 및 전달된 작용제의 의도된 치료 작용의 단일 또는 다중 부위로의 분산을 효과적으로 초래하는 다른 경로를 포함한 경구 및 비경구 경로를 포함하는 것으로 의도된다. 본 발명의 조성물을 위한 전신성 전달의 바람직한 경로로 정맥내, 근육내, 피하 및 흡입을 들 수 있다. 특히 본 발명의 조성물에 활용된 선택된 작용제를 위한 정확한 전신성 투여 경로는 부분적으로 주어진 투여 경로와 관련된 대사 변환 경로에 대한 작용제의 민감성을 고려하여 결정될 것임이 인지될 것이다. 예를 들어, 펩타이드성 작용제는 경구 이외의 경로에 의해 가장 적합하게 투여될 수 있다.

[0406] MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드는 임의의 적합한 수단에 의해 그것을 필요로 하는 대상체에게 전달될 수 있다. MASP-2 항체 및 폴리펩타이드의 전달 방법으로는 경구, 폐, 비경구 (예컨대, 근육내, 복강내, 정맥내 (IV) 또는 피하 주사), 흡입 (예컨대 미세 분말 제형을 통한), 경피, 코, 질, 직장, 또는 허밀 투여 경로를 들 수 있고, 각각의 투여 경로에 적절한 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0407] 대표적인 예를 들면, MASP-2 억제 항체 및 펩타이드는 폴리펩타이드를 흡수할 수 있는 신체 막, 예를 들어 코, 위장 및 직장의 막에의 적용에 의해 살아있는 신체에 도입될 수 있다. 폴리펩타이드는 전형적으로 투과 증강제와 함께 흡수성 막에 적용된다 (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, 참고) 예를 들어, STDHF는 담즙 염과 구조가 유사한 스테로이드 계면활성제인 후시드산의 합성 유도체로, 코 전달을 위한 투과 증강제로서 사용되었다 (Lee, W.A., *Biopharm.* 22, Nov./Dec. 1990).

[0408] MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드는 효소적 분해로부터 폴리펩타이드를 보호하기 위하여 또 다른 분자, 예컨대 지질과 회합되어 도입될 수 있다. 예를 들어, 중합체, 특히 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 공유 부착이 신체에서의 효소적 가수분해로부터 특정 단백질을 보호하고 그로써 반감기를 연장시키기 위해 사용되었다 (Fuertges, F., et al., *J. Controlled Release* 11:139, 1990). 단백질 전달을 위한 많은 중합체 시스템이 보고되었다 (Bae, Y.H., et al., *J. Controlled Release* 9:271, 1989; Hori, R., et al., *Pharm. Res.* 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., *J. Pharm. Sci.* 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., *J. Controlled Release* 10:195, 1989; Asano, M., et al., *J. Controlled Release* 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., *J. Controlled Release* 9:195, 1989; Makino, K., *J. Controlled Release* 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., *J. Pharm. Sci.* 78:219, 1989).

[0409] 최근에, 혈청 안정성 및 순환 반감기가 개선된 리포솜이 개발되었다 (예컨대, Webb에게 부여된 미국 특허 제 5,741,516호 참고). 나아가, 잠재적 약물 담체로서의 리포솜 및 리포솜-유사 제조의 다양한 방법이 검토되었다 (예컨대, Szoka에게 부여된 미국 특허 제 5,567,434호; Yagi에게 부여된 미국 특허 제 5,552,157호; Nakamori에게 부여된 미국 특허 제 5,565,213호; Shinkarenko에게 부여된 미국 특허 제 5,738,868호; 및 Gao에게 부여된 미국 특허 제 5,795,587호 참고).

[0410] 경피 적용의 경우, MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드는 다른 적합한 성분, 예컨대 담체 및/또는 보조제와 조합될 수 있다. 그러한 다른 성분의 본질에 대한 제한은 없지만, 그것은 그것의 의도된 투여에 대해 제약학적으로 허용되어야 하며, 조성물의 활성 성분의 활성을 저하시킬 수 없다. 적합한 비히클의 예로는 정제된 콜라겐이 있거나 없는, 연고, 크림, 젤, 또는 현탁액을 들 수 있다. MASP-2 억제 항체 및 폴리펩타이드는 또한 경피 패치, 고약, 및 봉대에, 바람직하게 액체 또는 반액체 형태로 스며들 수 있다.

[0411] 본 발명의 조성물은 원하는 치료 효과 수준을 유지하기 위해 결정된 간격으로 주기적으로 전신적으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은, 예컨대 피하 주사에 의해, 2주 내지 4주마다 또는 더 적은 빈도 간격으로 투여될 수 있다. 투여 요법은 작용제들의 조합의 작용에 영향을 미칠 수 있는 다양한 인자를 고려하여 의사에 의해 결정될 것이다. 이들 인자로는 치료되는 상태의 진행 정도, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 기타 임상 인자를 들 수 있을 것이다. 각각의 개별 작용제에 대한 투여량은 조성물에 포함되는 MASP-2 억제제의 기능뿐만 아니라,

임의의 약물 전달 비히클 (예컨대, 지속성 방출 전달 비히클)의 존재 및 본질에 따라 달라질 것이다. 더불어, 투여량은 투여 빈도의 변화 및 전달된 작용제(들)의 약동학적 거동을 고려하여 조정될 수 있다.

[0412] 국소적 전달

[0413] 본원에서 사용되는 바, 용어 "국소적"은 의도된 국소적 작용 부위에 또는 그 주변에 약물의 적용을 포함하여, 예를 들어 피부 또는 다른 영향을 받은 조직에의 국소적 전달, 안과적 전달, 척수강내 (IT), 뇌실내(ICV), 관절 내, 체강내, 두개내 또는 방광내 투여, 배치 또는 관개를 포함할 수 있다. 국소 투여는 더 적은 양의 투여를 가능하게 하기 위하여, 전신성 부작용을 피하기 위하여, 그리고 국소 전달 부위에서 활성제의 전달 타이밍 및 농도의 보다 정확한 제어를 위하여 바람직할 수 있다. 국소 투여는 대사, 혈류, 등에서 시간간 가변성과 관계 없이 표적 부위에서 알려진 농도를 제공한다. 또한 직접적인 전달 방식에 의해 개선된 투여량 제어가 제공된다.

[0414] MASP-2 억제제의 국소적 전달은 질환 또는 상태를 치료하는 외과적 방법의 맥락에서, 예컨대 예를 들어 동맥 우회술, 죽종 제거술, 레이저 시술, 조음과 시술, 풍선 혈관 성형술 및 스텐트 배치와 같은 시술 중에 이루어질 수 있다. 예를 들어, MASP-2 억제제는 풍선 혈관 성형술과 함께 대상체에 투여될 수 있다. 풍선 혈관 성형술은 수축된 풍선을 가진 카테터를 동맥에 삽입하는 것을 포함한다. 수축된 풍선은 죽상 동맥경화반 가까이 배치되고 경화반이 혈관 벽에 대해 압착되도록 팽창된다. 그 결과로서, 풍선 표면은 혈관 표면의 혈관 내피 세포 층과 접촉하게 된다. MASP-2 억제제는 죽상 동맥경화반의 부위에서 작용제의 방출을 허용하는 방식으로 풍선 혈관성형 카테터에 부착될 수 있다. 작용제는 기술분야에 알려져 있는 표준 과정을 따라 풍선 카테터에 부착될 수 있다. 예를 들어, 작용제는 풍선이 팽창될 때까지 풍선 카테터의 구획에 보관될 수 있고, 그 지점에서 국소 환경으로 작용제가 방출된다. 대안으로, 작용제는 풍선 표면 상에 스며들어 있을 수 있어서, 풍선이 팽창함에 따라 동맥 벽의 세포와 접촉하게 된다. 작용제는 또한 Flugelman, M.Y., et al., *Circulation* 85:1110-1117, 1992에서 개시된 것과 같은 천공된 풍선 카테터로 전달될 수 있다. 또한 풍선 혈관성형 카테터에 치료 단백질을 부착시키는 예시적인 과정에 대해서는 공개된 PCT 출원 WO 95/23161을 참고한다. 유사하게, MASP-2 억제제는 스텐트에 적용되는 겔 또는 중합체 코팅에 포함되거나, 또는 스텐트의 물질로 통합되어서, 스텐트가 혈관 배치 후에 MASP-2 억제제를 용출할 수 있게 된다.

[0415] 관절염 및 다른 근골격 장애의 치료에 사용되는 MASP-2 억제 조성물은 관절내 주사에 의해 국소적으로 전달될 수 있다. 그러한 조성물은 적합하게 지속성 방출 전달 비히클을 포함할 수 있다. 국소적 전달이 바람직할 수 있는 경우의 추가 예로서, 비노생식기 상태의 치료에 사용되는 MASP-2 억제 조성물은 방광내로 또는 또 다른 비노생식기 구조 내로 적합하게 주입될 수 있다.

[0416] 의료 장치 상의 코팅

[0417] 항체 및 억제 펩타이드와 같은 MASP-2 억제제는 이식 가능한 또는 부착 가능한 의료 장치의 표면 상에 (또는 내에) 고정될 수 있다. 변형된 표면은 전형적으로 동물 신체에 이식 후 살아있는 조직과 접촉할 것이다. "이식 가능한 또는 부착 가능한 의료 장치"는 장치 (예컨대, 스텐트 및 이식가능한 약물 전달 장치)의 정상적인 작동 중에 동물 신체의 조직에 이식되거나, 부착되는 임의의 장치를 의도한다. 그러한 이식 가능한 또는 부착 가능한 의료 장치는 예를 들어, 니트로셀룰로스, 다이아조셀룰로스, 유리, 폴리스티렌, 폴리비닐클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 세파로스, 아가, 전분, 나일론, 스테인레스 강, 티타늄 및 생체분해성 및/또는 생체적합성 중합체로부터 만들어질 수 있다. 단백질의 장치에의 연결은 연결된 단백질의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 임의의 기법에 의해, 예를 들어 단백질의 N- 또는 C-말단 잔기 중 하나 또는 둘 다를 장치에 부착시킴으로써 달성될 수 있다. 부착은 또한 단백질의 하나 이상의 내부 부위에서 만들어질 수 있다. 다중 부착 (단백질 내부 및 단부 둘 다를 포함함)이 또한 사용될 수 있다. 이식 가능한 또는 부착 가능한 의료 장치의 표면은 그곳에서의 단백질 고정화를 위해 작용기 (예컨대, 카르복실, 아미드, 아미노, 에테르, 하이드록실, 시아노, 니트리도, 설파아미도, 아세틸린, 에폭시드, 실란, 무수성, 석신산, 아지도)를 포함하도록 변형될 수 있다. 결합 화학은, 한정하는 것은 아니지만, 에스테르, 에테르, 아미드, 아지도 및 설파아미도 유도체, 시아네이트 및 MASP-2 항체 또는 억제 펩타이드에 대해 활용 가능한 작용기에 대한 다른 결합을 포함한다. MASP-2 항체 또는 억제 단편은 또한 친화성 태그 서열, 예컨대 GST (D.B. Smith and K.S. Johnson, *Gene* 67:31, 1988), 폴리히스티딘 (E. Hochuli et al., *J. Chromatog.* 411:77, 1987), 또는 비오틴의 단백질에의 첨가에 의해 비공유적으로 부착될 수 있다. 그러한 친화성 태그는 장치에 대한 단백질의 가역적 부착에 사용될 수 있다.

[0418] 단백질은 또한 장치 본체의 표면에, 예를 들어, 의료 장치의 표면의 공유 활성화에 의해 공유 부착될 수 있다. 대표적인 예를 들면, 모세포 단백질(들)이 장치 본체에 다음의 반응기 쌍 중 어느 것에 의해 부착될 수 있다 (상의 한 구성원은 장치 모통의 표면에 존재하고, 쌍의 다른 구성원은 모세포 단백질(들) 상에 존재함): 에스테

르 결합을 생성하는 하이드록실/카르복실산; 에스테르 결합을 생성하는 하이드록실/무수물; 우레탄 결합을 생성하는 하이드록실/이소시아나이트. 유용한 반응기를 갖지 않는 장치 본체의 표면은 모세포 단백질(들)의 침착을 허용하기 위하여 반응기를 생성하기 위해 무선 주파수 방전 플라즈마 (EFGD) 에칭으로 처리될 수 있다 (예컨대, 산소-함유 기를 도입하기 위한 산소 플라즈마로의 처리; 아민 기를 도입하기 위한 프로필 아미노 플라즈마로의 처리).

[0419] 안티센스, RNAi- 또는 DNA-암호화 펩타이드 억제제와 같은 핵산 분자를 포함하는 MASP-2 억제제는 장치 본체에 부착된 다공성 매트릭스에 삽입될 수 있다. 표면층을 만들기에 유용한 대표적인 다공성 매트릭스는 다양한 상업적 공급원 (예컨대, Sigma and Collagen Corporation)으로부터 얻어질 수 있는 것과 같이, 힘줄 또는 진피 콜라겐으로부터 제조된 것들, 또는 Jefferies에게 부여된 미국 특허 제 4,394,370호, 및 Koezuka에게 부여된 제 4,975,527호에 기술된 것과 같이 제조된 콜라겐 매트릭스이다. 한 가지 콜라겐성 물질이 UltraFiberTM으로 명명되고 Norian Corp. (Mountain View, California)사로부터 얻을 수 있다.

[0420] 특정 중합체 매트릭스가 또한 필요에 따라 사용될 수 있고, 예를 들어 Urist에게 부여된 미국 특허 제 4,526,909호 및 제 4,563,489호에서 개시된 것과 같이, 아크릴 에스테르 중합체 및 락탄 중합체를 예로 들 수 있다. 유용한 중합체의 특정 예는 오르토에스테르, 무수물, 프로필렌-코푸마레이트, 또는 하나 이상의 α -하이드록시 카르복실산 단량체 (예컨대, α -하이드록시 아세트산 (글리콜산) 및/또는 α -하이드록시 프로피온산 (락탄))의 중합체이다.

[0421] 치료 요법

[0422] 예방적 적용에서, 제약학적 조성물은 MASP-2-의존성 보체 활성화와 관련된 상태에 취약한, 또는 그렇지 않으면 상태의 위험이 있는 대상체에게, 상태의 증상이 발생할 위험을 제거 또는 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다. 치료적 적용에서, 제약학적 조성물은 MASP-2-의존성 보체 활성화와 관련된 상태로 의심되거나, 또는 이미 상태를 앓고 있는 대상체에게 상태의 증상을 완화시키거나, 또는 적어도 부분적으로 감소시키기에 충분한 치료적 유효량으로 투여된다. 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료 결과가 이루어질 때까지 여러 투여량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 급성 상태, 예컨대 재관류 손상 또는 다른 외상성 손상의 치료를 위해 조성물의 단일 투여에 의해, 또는 제한된 순서의 투여에 의해 수행될 수 있다. 대안으로, 조성물은 만성 상태, 예컨대, 관절염 또는 건선의 치료를 위해 연장된 기간 동안 주기적인 간격으로 투여될 수 있다.

[0423] 본 발명의 방법 및 조성물은 전형적으로 진단 및 치료적 의학적 및 외과적 기술로부터 유발된 염증 및 관련 과정을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 과정을 억제하기 위하여, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 시술 전후로 적용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바 "시술 전후로"는 시술 전에 및/또는 시술 중에 및/또는 시술 후에, 즉, 시술 전에, 시술 전과 중에, 시술 전과 후에, 시술 전, 중 및 후에, 시술 중에, 시술 중과 후에, 또는 시술 후에 억제 조성물의 투여를 나타낸다. 시술 전후 적용은 조성물의 수술 또는 시술 부위에서의 국소적 투여에 의해, 예컨대 주사 또는 연속적인 또는 간헐적인 부위의 관개에 의해 또는 전신성 투여에 의해 수행될 수 있다. MASP-2 억제제 용액의 국소적 시술 전후 전달에 적합한 방법은 Demopoulos에게 부여된 미국 특허 제 6,420,432호 및 Demopoulos에게 부여된 제 6,645,168호에서 개시된다. MASP-2 억제제(들)를 포함하는 연골보호 조성물의 국소 전달에 적합한 방법은 국제 PCT 특허 출원 WO 01/07067 A2에서 개시된다. MASP-2 억제제(들)를 포함하는 연골 보호 조성물의 표적화된 전신성 전달에 적합한 방법 및 조성물은 국제 PCT 특허 출원 WO 03/063799 A2에서 개시된다.

[0424] 발명의 한 측면으로, 제약학적 조성물은 혈전성 미세혈관병증 (TMA)을 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 투여된다. 한 구체예에서, TMA는 용혈성 요독 증후군 (HUS), 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP) 및 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, TMA는 aHUS이다. 한 구체예에서, 조성물은 질환의 급성 단계 중에 aHUS 환자에게 투여된다. 한 구체예에서, 조성물은 차도 단계 중의 aHUS 환자에게 투여된다 (즉, 급성 단계 aHUS의 에피소드로부터 회복된 또는 부분적으로 회복된 대상체에서, 그러한 차도는 예를 들어, 증가된 혈소판 수 및/또는 감소된 혈청 LDH 농도에 의해 증명됨, 예를 들어 Loirat C et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:60, 2011 (참조로 본원에 포함됨)에서 기술됨). 한 구체예에서, 대상체는 (i) 암에 이차적인 TMA; (ii) 화학요법에 이차적인 TMA; 또는 (iii) 이식 (예컨대, 장기 이식, 예컨대 신장 이식 또는 동종 조혈 줄기 세포 이식)에 이차적인 TMA인 TMA를 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 한 구체예에서, 대상체는 업쇼-술만 증후군 (USS)을 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 한 구체예에서, 대상체는 디고스병을 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 한 구체예에서, 대상체는 치명적인 항인지질 증후군

(CAPS)을 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 치료적 적용에서, 제약학적 조성물은 TMA를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 혈전 형성을 억제하고, 상태의 증상을 완화, 또는 적어도 부분적으로 감소시키기에 충분한 치료적 유효량으로 투여된다.

[0425] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료 결과가 이루어질 때까지 여러 투여량으로 투여될 수 있다. 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하며, 적합하게 성인 환자 (예컨대, 평균 성인 체중은 70 kg임)에게 0.1 mg 내지 10,000 mg, 보다 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 보다 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 보다 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 여전히 보다 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투여량으로 투여될 수 있다. 소아 환자의 경우, 투여량은 환자 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 TMA의 치료를 위해 조성물의 단일 투여에 의해, 또는 제한된 순서의 투여에 의해 수행될 수 있다. 대안으로, 조성물은 TMA의 치료를 위해 연장된 기간 동안 매일, 주 2회, 주마다, 격주마다, 월마다 또는 격월과 같은 주기적 간격으로 투여될 수 있다.

[0426] 일부 구체예에서, TMA를 앓고 있거나 또는 발병 위험이 있는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로의 치료가 이전에 진행되었거나, 또는 현재 진행 중이다. 일부 구체예에서, 방법은 대상체에게 MASP-2 억제제를 포함하는 발명의 조성물을 투여하는 단계 및 추가로 대상체에게 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 인간화된 항-C5 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에콜리주맙이다.

[0427] 발명의 한 측면으로, 제약학적 조성물은 aHUS에 취약하거나, 또는 그렇지 않으면 발병 위험이 있는 대상체에게 상태의 증상이 발병할 위험을 제거 또는 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다. 치료적 적용에서, 제약학적 조성물은 aHUS가 의심되거나, 또는 이미 aHUS를 앓고 있는 대상체에게 상태의 증상을 완화, 또는 적어도 부분적으로 감소시키기에 충분한 치료적 유효량으로 투여된다. 발명의 한 측면으로, 투여 전에, 대상체는 대상체가 (i) 빈혈, (ii) 혈소판 감소증, (iii) 신부전 및 (iv) 상승하는 크레아티닌을 포함하여 aHUS의 하나 이상의 증상을 나타내는지를 측정하기 위하여 조사될 수 있고, 본 발명의 조성물은 그런 후에 이들 증상(들)을 개선하기에 충분한 시간 동안 충분한 유효량으로 투여된다.

[0428] 발명의 또 다른 측면으로, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 aHUS를 발병할 위험이 상승된 대상체에게 예방적으로 치료하기 위해 및 그로써 대상체가 aHUS를 전달할 가능성을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. aHUS와 관련된 것으로 알려져 있는 대상체에서 유전자 마커의 존재는 먼저 대상체로부터 얻어진 샘플에 대해 유전자 스크리닝 테스트를 수행하고 aHUS와 관련된 적어도 하나의 유전자 마커, 보체 인자 H (CFH), 인자 I (CFI), 인자 B (CFB), 막 보조인자 CD46, C3, 보체 인자 H-관련 단백질 (CFHR1), 항응고 단백질 트롬보스폰 (THBD), 보체 인자 H-관련 단백질 3 (CFHR3) 또는 보체 인자 H-관련 단백질 4 (CFHR4)의 존재를 확인하는 단계에 의해 측정된다. 그런 후 대상체는 주기적으로 (예컨대, 월마다, 분기별로, 년 2회 또는 해마다) 모니터링되어 aHUS의 적어도 한 가지 증상, 예컨대 빈혈, 혈소판 감소증, 신부전 및 상승하는 크레아티닌의 존재 또는 부재가 측정된다. 이들 증상 중 적어도 하나의 존재가 측정될 때, 대상체는 MASP-2 의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 MASP-2 억제제의 양이 상기 하나 이상의 증상을 개선하기에 충분한 시간 동안 충분한 유효량으로 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 스크리닝되고 aHUS와 관련된 유전자 마커 중 하나를 가진 것으로 측정됨으로 인해 aHUS를 발병할 위험이 증가된 대상체는 약물 노출, 감염 (예컨대, 박테리아 감염), 악성 종양, 손상, 장기 또는 조직 이식 및 임신을 포함한, aHUS 임상 증상을 촉발시키는 것과 관련된 사건의 발생에 대해 모니터링될 수 있다.

[0429] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, MASP-2 의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 감염에 이차적인 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)을 앓고 있거나 또는 발병 위험이 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 폐렴구균 감염과 관련된 비-장내 aHUS를 앓고 있거나 또는 발병 위험이 있는 환자는 본 발명의 조성물로 치료될 수 있다.

[0430] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, aHUS를 앓고 있는 대상체는 카테터 라인, 예컨대 정맥내 카테터 라인 또는 피하 카테터 라인을 통해 1시간, 12시간, 1일, 2일 또는 3일과 같은 제1 기간 동안 투여되는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 초기에 치료될 수 있다. 대상체는 그런 후 제2 기간 동안 규칙적인 피하 주사, 예컨대 매일, 주 2회, 주마다, 격주마다, 매일 또는 격월의 주사를 통해 투여되는 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수 있다.

[0431] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 출혈, 감염, 및 혈장 기증자에게 고유한 장애 및/또는 알레르기에 대한 노출을 포함한 혈장분리교환술의 잠재적 합병증을 피하기 위하여, 또는 그렇지 않으면 혈장분리교환술을 싫어하는 대상체에서, 또는 혈장분리교환술을 이용할 수 없는 환경에서 혈장분리교환술

의 부재 하에 aHUS를 앓고 있는 대상체 (즉, aHUS 증상이 혈장분리교환술로 치료된 적이 없고 MASP-2 억제 조성물로의 치료시 혈장분리교환술로 치료되지 않은 대상체)에게 투여될 수 있다.

[0432] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 혈장분리교환술로 환자를 치료하는 것과 동시에 aHUS를 앓고 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 혈장분리교환술 치료를 받은 대상체는 그런 후 혈장 교환 후에 또는 혈장 교환과 교대로 MASP-2 억제 조성물이 투여될 수 있다.

[0433] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, aHUS를 앓고 있거나 또는 발병의 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되고 있는 대상체는 주기적으로, 예컨대 12시간마다 또는 매일 기준으로 적어도 하나의 보체 인자의 수준을 측정함으로써 모니터링되고, 이때 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 측정은 조성물로의 지속적인 치료에 대한 필요성을 나타낸다.

[0434] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료 결과가 달성될 때까지 여러 투여량으로 투여될 수 있다. 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하고, 적합하게 성인 환자 (예컨대, 평균 성인 체중은 70 kg임)에게 0.1 mg 내지 10,000 mg, 보다 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 보다 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 보다 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 여전히 보다 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투여량으로 투여될 수 있다. 소아 환자의 경우, 투여량은 환자 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 aHUS의 치료를 위해 조성물의 단일 투여에 의해, 또는 제한된 순서의 투여에 의해 수행될 수 있다. 대안으로, 조성물은 aHUS의 치료를 위해 연장된 기간 동안 매일, 주 2회, 주마다, 격주마다, 월마다 또는 격월과 같은 주기적 간격으로 투여될 수 있다.

[0435] 일부 구체예에서, aHUS를 앓고 있는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로의 치료가 이전에 진행되었거나, 또는 현재 진행 중이다. 일부 구체예에서, 방법은 대상체에게 MASP-2 억제제를 포함하는 발명의 조성물을 투여하는 단계 및 추가로 대상체에게 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 인간화된 항-C5 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에콜리주맙이다.

[0436] 발명의 한 측면으로, 제약학적 조성물은 HUS에 취약하거나, 또는 그렇지 않으면 발병 위험이 있는 대상체에게 상태의 증상이 발병할 위험을 제거 또는 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다. 치료적 적용에서, 제약학적 조성물은 HUS가 의심되거나, 또는 이미 aHUS를 앓고 있는 대상체에게 상태의 증상을 완화, 또는 적어도 부분적으로 감소시키기에 충분한 치료적 유효량으로 투여된다.

[0437] 발명의 또 다른 측면으로, HUS가 발병할 위험이 있는 대상체에서 손상된 신장 기능이 발병할 가능성은 대상체에게 본 발명의 MASP-2 억제 조성물을 MASP-2 의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양으로 투여함으로써 감소될 수 있다. 예를 들어, HUS가 발병할 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 설사, 혈관내 적혈구 파괴의 도말 증거로 30% 미만의 헤마토크릿 수준, 혈소판 감소증 및 상승하는 크레아티닌 수준을 포함하여 HUS와 관련된 하나 이상의 증상을 나타낼 수 있다. 추가의 예로서, HUS가 발병할 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 대장균, 시겔라 또는 살모넬라로 감염될 수 있다. 대장균, 시겔라 또는 살모넬라로 감염된 그러한 대상체는 항생물질 치료와 동시에 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수 있거나, 또는 대안으로, 특히 항생물질 치료가 금기되는 장내 대장균의 경우, 항생물질로의 동시 치료 없이 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수 있다. 항생물질로 치료된 장내 대장균으로 감염된 대상체는 HUS가 발병할 위험이 증가할 수 있고, 그 위험을 감소시키기 위해 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 적합하게 치료될 수 있다. 장내 대장균으로 감염된 대상체는 제1 기간 동안 항생물질의 부재 하에 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료된 후 제2 기간 동안 본 발명의 MASP-2 억제 조성물 및 항생물질 둘 다로 치료될 수 있다.

[0438] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, HUS를 앓고 있는 대상체는 카테터 라인, 예컨대 정맥내 카테터 라인 또는 피하 카테터 라인을 통해 1시간, 12시간, 1일, 2일 또는 3일과 같은 제1 기간 동안 투여되는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 초기에 치료될 수 있다. 대상체는 그런 후 제2 기간 동안 규칙적인 피하 주사, 예컨대 매일, 주 2회, 주마다, 격주마다, 매월 또는 격월의 주사를 통해 투여되는 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수 있다.

[0439] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 출혈, 감염, 및 혈장 기증자에게 고유한 장애 및/또는 알레르기에 대한 노출을 포함한 혈장분리교환술의 잠재적 합병증을 피하기 위하여, 또는 그렇지 않으면 혈장분리교환술을 싫어하는 대상체에서, 또는 혈장분리교환술을 이용할 수 없는 환경에서 혈장분리교환술의 부재 하에 HUS를 앓고 있는 대상체 (즉, HUS 증상이 혈장분리교환술로 치료된 적이 없고 MASP-2 억제 조성물로의 치료시 혈장분리교환술로 치료되지 않은 대상체)에게 투여될 수 있다.

- [0440] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 혈장분리교환술로 환자를 치료하는 것과 동시에 HUS를 앓고 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 혈장분리교환술 치료를 받은 대상체는 그런 후 혈장 교환 후에 또는 혈장 교환과 교대로 MASP-2 억제 조성물이 투여될 수 있다.
- [0441] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, HUS를 앓고 있거나 또는 발병의 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되고 있는 대상체는 적어도 하나의 보체 인자의 수준을 주기적으로, 예컨대 12시간마다 또는 매일 기준으로 측정함으로써 모니터링되고, 이때 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 측정은 조성물로의 지속적인 치료에 대한 필요성을 나타낸다.
- [0442] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료 결과가 달성될 때까지 여러 투여량으로 투여될 수 있다. 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하고, 적합하게 성인 환자 (예컨대, 평균 성인 체중은 70 kg임)에게 0.1 mg 내지 10,000 mg, 보다 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 보다 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 보다 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 여전히 보다 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투여량으로 투여될 수 있다. 소아 환자의 경우, 투여량은 환자 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 HUS의 치료를 위해 조성물의 단일 투여에 의해, 또는 제한된 순서의 투여에 의해 수행될 수 있다. 대안으로, 조성물은 HUS의 치료를 위해 연장된 기간 동안 주기적 간격으로, 예컨대 매일, 주 2회, 주마다, 격주마다, 월마다 또는 격월로 투여될 수 있다.
- [0443] 일부 구체예에서, HUS를 앓고 있는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로의 치료가 이전에 진행되었거나, 또는 현재 진행 중이다. 일부 구체예에서, 방법은 대상체에게 MASP-2 억제제를 포함하는 발명의 조성물을 투여하는 단계 및 추가로 대상체에게 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 인간화된 항-C5 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에컬리주맙이다.
- [0444] 발명의 한 측면으로, 제약학적 조성물은 TTP에 취약하거나, 또는 그렇지 않으면 발병 위험이 있는 대상체에게 상태의 증상이 발병할 위험을 제거 또는 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다. 치료적 적용에서, 제약학적 조성물은 TTP가 의심되거나, 또는 이미 TTP를 앓고 있는 대상체에게 상태의 증상을 완화, 또는 적어도 부분적으로 감소시키기에 충분한 치료적 유효량으로 투여된다.
- [0445] 발명의 또 다른 측면으로, 중추신경계 침범, 혈소판 감소증, 중증의 심장 침범, 중증의 폐 침범, 위장 경색 및 괴저를 포함한, TTP의 하나 이상의 증상을 나타내는 대상체는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수 있다. 본 발명의 또 다른 측면으로, 저하된 수준의 ADAMTS13을 가지는 것으로 측정되고 또한 ADAMTS13의 억제제 (즉, 항체)의 존재에 대해 양성으로 테스트된 대상체는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수 있다. 또한 본 발명의 추가의 측면으로, ADAMTS13의 억제제의 존재에 대해 양성으로 테스트된 대상체는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로의 치료와 동시에 면역억제제 (예컨대, 코르티코스테로이드, 리툭산, 또는 사이클로스포린)로 치료될 수 있다. 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 감소된 수준의 ADAMTS13을 가지는 것으로 측정되고 ADAMTS13의 억제제의 존재에 대해 양성으로 테스트된 대상체는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로의 치료와 동시에 ADAMTS13으로 치료될 수 있다.
- [0446] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, TTP를 앓고 있는 대상체는 카테터 라인, 예컨대 정맥내 카테터 라인 또는 피하 카테터 라인을 통해 1시간, 12시간, 1일, 2일 또는 3일과 같은 제1 기간 동안 투여되는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 초기에 치료될 수 있다. 대상체는 그런 후 제2 기간 동안 규칙적인 피하 주사, 예컨대 매일, 주 2회, 주마다, 격주마다, 매월 또는 격월의 주사를 통해 투여되는 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수 있다.
- [0447] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 출혈, 감염, 및 혈장 기증자에게 고유한 장애 및/또는 알레르기에 대한 노출을 포함한 혈장분리교환술의 잠재적 합병증을 피하기 위하여, 또는 그렇지 않으면 혈장분리교환술을 싫어하는 대상체에서, 또는 혈장분리교환술을 이용할 수 없는 환경에서 혈장분리교환술의 부재 하에 HUS를 앓고 있는 대상체 (즉, TTP 증상이 혈장분리교환술로 치료된 적이 없고 MASP-2 억제 조성물로의 치료시 혈장분리교환술로 치료되지 않은 대상체)에게 투여될 수 있다.
- [0448] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 혈장분리교환술로 환자를 치료하는 것과 동시에 TTP를 앓고 있는 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 혈장분리교환술 치료를 받고 있는 대상체는 그런 후 혈장 교환 후에 또는 혈장 교환과 교대로 MASP-2 억제 조성물이 투여될 수 있다.
- [0449] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, 불응성 TTP, 즉, 혈장분리교환술과 같은 다른 치료에 적절하게 반응하지 않은 TTP 증상을 앓고 있는 대상체는 추가의 혈장분리교환술이 있거나 없이 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될

수 있다.

- [0450] 또한 본 발명의 추가의 측면으로, TTP를 앓고 있거나 발병의 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되고 있는 대상체는 적어도 하나의 보체 인자의 수준을 주기적으로, 예컨대 12시간마다 또는 매일 기준으로 측정함으로써 모니터링될 수 있고, 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 측정은 조성물로의 지속적인 치료에 대한 필요성을 나타낸다.
- [0451] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료 결과가 달성될 때까지 여러 투여량으로 투여될 수 있다. 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하고, 적합하게 성인 환자 (예컨대, 평균 성인 체중은 70 kg임)에게 0.1 mg 내지 10,000 mg, 보다 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 보다 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 보다 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 여전히 보다 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투여량으로 투여될 수 있다. 소아 환자의 경우, 투여량은 환자 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 TTP의 치료를 위해 조성물의 단일 투여에 의해, 또는 제한된 순서의 투여에 의해 수행될 수 있다. 대안으로, 조성물은 TTP의 치료를 위해 연장된 기간 동안 주기적 간격으로, 예컨대 매일, 주 2회, 주마다, 격주마다, 월마다 또는 격월로 투여될 수 있다.
- [0452] 일부 구체예에서, TTP를 앓고 있는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로의 치료가 이전에 진행되었거나, 또는 현재 진행 중이다. 일부 구체예에서, 방법은 대상체에게 MASP-2 억제제를 포함하는 발명의 조성물을 투여하는 단계 및 추가로 대상체에게 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 인간화된 항-C5 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에콜리주맙이다.
- [0453] VI. 실시예
- [0454] 다음의 실시예는 단지 발명을 실시하기 위해 현재 고려되는 최상의 방식을 예시하지만, 발명을 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다. 본원의 모든 문헌 인용은 분명히 참조로 포함된다.
- [0455] **실시예 1**
- [0456] 이 실시예는 MASP-2는 결핍 (MASP-2^{-/-})이지만 Map19는 충분한 (Map19^{+/+}) 마우스 스트레인의 생성을 기술한다.
- [0457] **물질 및 방법:** 도 3에서 도시한 것과 같이, 세린 프로테아제 도메인을 암호화하는 엑손을 포함한, 쥐과 MASP-2의 C-말단부를 코딩하는 3개의 엑손을 파괴하기 위하여 표적화 벡터 pKO-NTKV 1901을 설계하였다. 쥐과 ES 세포주 E14.1a (SV129 O1a)를 트랜스펙션하기 위하여 pKO-NTKV 1901을 사용하였다. 네오마이신-내성 및 티미딘 키나제-민감성 클론을 선택하였다. 600개의 ES 클론을 스크리닝하였고, 그 중에서 4개의 상이한 클론을 서던 블롯에 의하여 도 3에서 도시한 것과 같이 예상된 선택적 표적화 및 재조합 사건을 함유하는 것으로 확인하고 검증하였다. 이들 4개의 양성 클론으로부터 배아 전달에 의해 키메라를 생성하였다. 그런 후 키메라를 유전자 배경 C57/BL6에서 역교배하여 유전자도입 수컷을 생성하였다. 유전자도입 수컷을 암컷과 교배하여 새끼의 50%가 파괴된 MASP-2 유전자에 대해 이형접합성을 보이는 F1을 생성하였다. 이형접합성 마우스를 이중교배하여 동형접합성 MASP-2 결핍 새끼를 생성하여, 이형접합성 및 야행성 마우스가 각각 1:2:1의 비율이 되는 결과를 초래하였다.
- [0458] **결과 및 표현형:** 결과적으로 생성된 동형접합성 MASP-2^{-/-} 결핍 마우스는 생존 가능하고 생식력이 있는 것으로 나타났으며 정확한 표적화 사건을 확인하기 위한 서던 블롯에 의해, MASP-2 mRNA의 부재를 확인하기 위한 노던 블롯에 의해, 및 MASP-2 단백질의 부재를 확인하기 위한 웨스턴 블롯에 의해 (데이터 미제시) MASP-2 결핍인 것으로 검증되었다. Map19 mRNA의 존재 및 MASP-2 mRNA의 부재는 LightCycler 기계 상에서 시간-분해 RT-PCR을 사용하여 추가로 확인하였다. MASP-2^{-/-} 마우스는 예상했던 것과 같이 계속해서 Map19, MASP-1, 및 MASP-3 mRNA 및 단백질을 발현하였다 (데이터 미제시). 프로퍼딘, 인자 B, 인자 D, C4, C2, 및 C3에 대해 MASP-2^{-/-} 마우스에서 mRNA의 존재 및 부재를 LightCycler 분석에 의해 평가하였고 야생형 한배 새끼 대조군의 그것과 동일한 것으로 나타났다 (데이터 미제시). 동형접합성 MASP-2^{-/-} 마우스로부터의 혈장은 전체적으로 실시예 2에서 추가로 기술된 것과 같이 렉틴 경로-매개 보체 활성화가 결핍되었다.
- [0459] 순수한 C57BL6 배경에서 MASP-2^{-/-} 스트레인의 생성: MASP-2^{-/-} 마우스를 순수한 C57BL6 라인과 9 세대 동안 역교배한 후 MASP-2^{-/-} 스트레인을 실험 동물 모델로서 사용하였다.
- [0460] 쥐과 MASP-2^{-/-}, Map19^{+/+}이고 인간 MASP-2 도입유전자 (쥐과 MASP-2 녹아웃(knock-out) 및 인간 MASP-2 녹인(knock-in))을 발현하는 유전자도입 마우스 스트레인을 또한 다음과 같이 생성하였다:

- [0461] **물질 및 방법:** 도 4에서 도시된 것과 같이 "미니 hMASP-2" (SEQ ID NO:49)로 불리는, 인간 *MASP 2* 유전자의 프로모터 영역을 포함하며, 처음 3개의 엑손 (엑손 1 내지 엑손 3)과 이어서 다음의 8개 엑손의 코딩 서열을 나타내는 cDNA 서열을 포함하고, 그로써 그것의 내인성 프로모터에 의해 구동되는 전장 MASP-2 단백질을 암호화하는, 인간 MASP-2를 암호화하는 미니유전자를 구성하였다. 미니 hMASP-2 구성물을 결핍 쥐와 *MASP 2* 유전자를 형질전환 발현된 인간 MASP-2에 의해 대체하기 위해 MASP-2^{-/-}의 수정란에 주입하였다.
- [0462] **실시예 2**
- [0463] 이 실시예는 MASP-2가 렉틴 경로를 통한 보체 활성화에 필요한 것을 입증한다.
- [0464] **물질 및 방법:**
- [0465] **렉틴 경로 특이적 C4 절단 검정:** C4 절단 검정은 Petersen, 등에 의해 기술된 것으로 (*J. Immunol. Methods* 257:107 (2001)) L-피콜린에 결합하는, 황색 포도상구균으로부터의 리포테이코산 (LTA)으로부터 유발된 렉틴 경로 활성화를 측정한다. Petersen 등 (2001)에 의해 기술된 검정을 적응하여 아래에서 기술되는 것과 같이 MASP-2^{-/-} 마우스로부터의 혈청을 첨가하기 전에 플레이트를 LPS 및 만난 또는 지모산으로 코팅함으로써 MBL을 통한 렉틴 경로 활성화를 측정하였다. 검정을 또한 고전적 경로로 인한 C4 절단의 가능성을 제거하도록 변형하였다. 이것은 1 M NaCl을 함유한 샘플 희석 완충액을 사용함으로써 이루어졌고, 렉틴 경로 인식 구성요소의 리간드에의 고친화도 결합을 허용하지만 내인성 C4의 활성화를 방지함으로써 C1 복합체 분해로 인한 고전적 경로의 참여를 배제시키는 것을 허용한다. 간단히 설명하면, 변형된 검정에서 혈청 샘플 (고농도 염 (1 M NaCl) 완충액으로 희석됨)을 리간드-코팅된 플레이트에 첨가한 후, 생리적 염 농도를 가진 완충액 중의 일정량의 정제된 C4를 첨가한다. 결합된 MASP-2를 함유한 인식 복합체는 C4를 절단하여 C4b 침착을 초래한다.
- [0466] 검정 방법:
- [0467] 1) Nunc Maxisorb 미세적정 플레이트 (Maxisorb, Nunc, Cat. No. 442404, Fisher Scientific)를 코팅 완충액 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)에 희석된 1 µg/ml 만난 (M7504 Sigma) 또는 임의의 다른 리간드 (예컨대, 하기 열거된 것과 같음)로 코팅하였다.
- [0468] 다음의 시약을 검정에 사용하였다:
- [0469] a. 만난 (100 µl 코팅 완충액 중의 1 µg/웰 만난 (M7504 Sigma));
- [0470] b. 지모산 (100 µl 코팅 완충액 중의 1 µg/웰 지모산 (Sigma));
- [0471] c. LTA (100 µl 코팅 완충액 중의 1 µg/웰 또는 20 µl 메탄올 중의 2 µg/웰);
- [0472] d. 코팅 완충액 중의 1 µg의 H-피콜린 특이적 Mab 4H5;
- [0473] e. *Aerococcus viridans*로부터의 PSA (100 µl 코팅 완충액 중의 2 µg/웰);
- [0474] f. 코팅 완충액 중의 100 µl/웰의 포르말린-고정 황색 포도상구균 DSM20233 (OD₅₅₀=0.5).
- [0475] 2) 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.
- [0476] 3) 밤새 인큐베이션한 후, 플레이트를 0.1% HSA-TBS 차단 완충액 (10 mM Tris-CL, 140 mM NaCl, 1.5 mM NaN₃, pH 7.4 중의 0.1% (중량/부피) HSA)과 1-3시간 동안 인큐베이션함으로써 잔류하는 단백질 결합 부위를 포화시킨 후, 플레이트를 TBS/tween/Ca²⁺ (0.05% Tween 20 및 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4가 포함된 TBS)로 3회 세척하였다.
- [0477] 4) 테스트할 혈청 샘플을 MBL-결합 완충액 (1 M NaCl)으로 희석하고 희석된 샘플을 플레이트에 첨가하고 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 완충액만을 넣은 웰을 음성 대조군으로서 사용하였다.
- [0478] 5) 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 플레이트를 TBS/tween/Ca²⁺로 3회 세척하였다. 그런 후 인간 C4 (BBS (4 mM 바르비탈, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4)에 희석된 1 µg/ml의 100 µl/웰)를 플레이트에 첨가하고 90분 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 TBS/tween/Ca²⁺로 3회 세척하였다.
- [0479] 6) C4b 침착을 플레이트에 첨가하고 실온에서 90분 동안 인큐베이션한 알칼리 포스파타제-콘주게이션된 닭 항-인간 C4c (TBS/tween/Ca²⁺에 1:1000 희석됨)로 검출하였다. 그런 후 플레이트를 다시 TBS/tween/Ca²⁺로 3회 세

적하였다.

[0480] 7) 100 μ l의 *p*-니트로페닐 포스페이트 기질 용액을 첨가하고, 실온에서 20분 동안 인큐베이션하고, 미세적정 플레이트 판독기에서 OD₄₀₅를 판독함으로써 알칼리 포스파타제를 검출하였다.

[0481] **결과:** 도 5A-B는 MASP-2+/+ (십자형), MASP-2+/- (단한 원형) 및 MASP-2-/- (단한 삼각형)로부터의 혈청 회석 중의 만난 (도 5A) 및 지모산 (도 5B) 상의 C4b 침착의 양을 도시한다. 도 5C는 야생형 혈청에 대해 표준화된 C4b 침착의 양의 측정을 토대로 한 야생형 마우스 (n=5마리)에 비해 MASP-2-/+ 마우스 (n=5마리) 및 MASP-2-/- 마우스 (n=4마리)로부터의 지모산 (백색 막대) 또는 만난 (음영 막대)으로 코팅된 플레이트 상의 상대적인 C4 전환효소 활성을 도시한다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 도 5A-C에서 알 수 있는 것과 같이, MASP-2-/- 마우스로부터의 혈장은 만난 및 지모산 코팅 플레이트 상에서의 렉틴 경로-매개 보체 활성화가 전체적으로 결핍된다. 이들 결과는 MASP-2가 렉틴 경로의 이펙터 구성요소인 것을 분명하게 입증한다.

[0482] **제조합 MASP-2는 MASP-2-/- 마우스로부터의 혈청에서 렉틴 경로-의존성 C4 활성화를 재구성한다**

[0483] MASP-2의 부재가 MASP-2-/- 마우스에서 렉틴 경로-의존성 C4 활성화의 상실의 직접적인 원인인지를 확립하기 위하여, 제조합 MASP-2 단백질을 혈청 샘플에 첨가하는 효과를 위에서 기술된 C4 절단 검정으로 조사하였다. 기능적으로 활성인 쥐과 MASP-2 및 촉매적으로 비활성인 쥐과 MASP-2A (세린 프로테아제 도메인의 활성 부위 세린 잔기가 알라닌 잔기로 치환되어 있음) 제조합 단백질을 아래의 실시예 3에서 기술하는 것과 같이 제조하고 정제하였다. 4마리의 MASP-2 -/- 마우스로부터 모아진 혈청을 증가하는 단백질 농도의 제조합 쥐과 MASP-2 또는 비활성 제조합 쥐과 MASP-2A와 사전 인큐베이션하고 C4 전환효소 활성을 위에서 기술한 것과 같이 검정하였다.

[0484] **결과:** 도 6에서 나타난 것과 같이, MASP-2 -/- 마우스로부터 얻어진 혈청에 기능적으로 활성인 쥐과 제조합 MASP-2 단백질 (개방 삼각형으로 표시됨)의 첨가는 렉틴 경로-의존성 C4 활성화를 단백질 농도 의존성 방식으로 복원시킨 반면, 촉매적으로 비활성인 쥐과 MASP-2A 단백질 (별표로 표시됨)은 C4 활성화를 복원시키지 못하였다. 도 6에 도시된 결과를 모아진 야생형 마우스 혈청으로 관찰된 C4 활성화 (점선으로 표시됨)에 대해 표준화한다.

[0485] **실시예 3**

[0486] 이 실시예는 제조합 전장 인간, 래트 및 쥐과 MASP-2, MASP-2 유래 폴리펩타이드, 및 MASP-2의 촉매적으로 비활성화된 돌연변이 형태의 제조합 발현 및 단백질 생성을 기술한다.

[0487] **전장 인간, 쥐과 및 래트 MASP-2의 발현:**

[0488] 인간 MASP-2 (SEQ ID NO: 4)의 전장 cDNA 서열을 또한, CMV 인핸서/프로모터 영역의 제어 하에 진핵 발현을 유도하는 포유류 발현 벡터 pCI-Neo (Promega)에 하위클로닝하였다 (Kaufman R.J. et al., *Nucleic Acids Research* 19:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537-66 (1991)에서 기술됨). 전장 마우스 cDNA (SEQ ID NO:50) 및 래트 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:53)를 각각 pED 발현 벡터에 하위클로닝하였다. 그런 후 MASP-2 발현 벡터를 Maniatis et al., 1989에 기술된 표준 칼슘 포스페이트 트랜스펙션 과정을 사용하여 부착 차이니즈 햄스터 난소 세포주 DXB1에 트랜스펙션하였다. 이들 구성물로 트랜스펙션된 세포는 매우 느리게 성장하였고, 이것은 암호화된 프로테아제가 세포독성인 것을 시사한다.

[0489] 또 다른 접근법으로, 내인성 프로모터에 의해 구동된 MASP-2의 인간 cDNA를 함유한 미니유전자 구성물 (SEQ ID NO:49)을 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO)에 일시적으로 트랜스펙션한다. 인간 MASP-2 단백질이 배양 배지로 분비되고 아래에서 기술하는 것과 같이 분리된다.

[0490] **전장 촉매적 비활성 MASP-2의 발현:**

[0491] 근거: MASP-2는 인식 하위구성요소인 MBL 또는 피콜린 (L-피콜린, H-피콜린 또는 M-피콜린 중 어느 하나)이 그것들의 각각의 탄수화물 패턴에 결합된 후에 자가촉매적 절단에 의해 활성화된다. MASP-2의 활성화를 초래하는 자가촉매적 절단은 자주 혈청으로부터 MASP-2가 분포되는 과정 중에, 또는 제조합 발현 후 정제 중에 일어난다. 항원으로서 사용하기 위해 보다 안정적인 단백질 제제를 얻기 위하여, MASP-2A로서 표시되는, MASP-2의 촉매적 비활성 형태를 프로테아제 도메인의 촉매적 트라이애드에 존재하는 세린 잔기를 래트에서 (SEQ ID NO:55 Ser617에서 Ala617으로); 마우스에서 (SEQ ID NO:52 Ser617에서 Ala617으로); 또는 인간에서 (SEQ ID NO:3 Ser618에서 Ala618으로) 알라닌 잔기로 대체함으로써 생성하였다.

[0492] 촉매적 비활성 인간 및 쥐과 MASP-2A 단백질을 생성하기 위하여, 부위 지정 돌연변이생성을 표 5에서 제시한 올

리고뉴클레오타이드를 사용하여 수행하였다. 표 5의 올리고뉴클레오타이드는 세린 코돈을 알라닌 코돈으로 바꾸기 위하여 미스매치를 함유하는 올리고뉴클레오타이드와 효소적 활성 세린을 암호화하는 인간 및 쥐과 cDNA의 영역을 어닐링하도록 설계되었다. 예를 들어, PCR 올리고뉴클레오타이드 SEQ ID NOS:56-59를 인간 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4)와 조합하여 사용하여 출발 코돈으로부터 효소적 활성 세린까지의 영역 및 세린부터 중단 코돈까지의 영역을 증폭시켜서 Ser618에서 Ala618로의 돌연변이를 함유하는 돌연변이된 MASP-2의 완전한 오픈 리딩 프레임 생성하였다. 아가로스 겔 전기영동 및 밴드 제조 후에 PCR 생성물을 정제하고 단일 아테노신 오버랩을 표준 테일링 과정을 사용하여 생성하였다. 그런 후 아테노신 테일링된 MASP-2를 pGEM-T 용이 벡터(easy vector)에 클로닝하고, 대장균에 형질전환시켰다.

[0493] 촉매적 비활성 래트 MASP-2A 단백질을 SEQ ID NO:64 및 SEQ ID NO:65를, 이들 두 올리고뉴클레오타이드를 등몰량으로 조합하고, 100℃에서 2분 동안 가열하고 서서히 실온으로 냉각시킴으로써 키나제 처리하고 어닐링함으로써 생성하였다. 결과적으로 생성된 어닐링된 단편은 Pst1 및 Xba1 양립성 단부를 가지며 야생형 래트 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:53)의 Pst1-Xba1 단편 대신 삽입되어 래트 MASP-2A가 생성되었다.

[0494] 5' 'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3' (SEQ ID NO:64)

[0495] 5' CTAGAAACACTAATGCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO:65)

[0496] 인간, 쥐과 및 래트 MASP-2A를 각각 추가로 포유류 발현 벡터 pED 또는 pCI-Neo에 하위클로닝하고 차이니즈 햄스터 난소 세포주 DXB1에 아래에서 기술되는 것과 같이 트랜스펙션하였다.

[0497] 또 다른 접근법으로, MASP-2의 촉매적 비활성 형태는 Chen et al., *J. Biol. Chem.*, 276(28):25894-25902, 2001에 기술된 방법을 사용하여 구성된다. 간단히 설명하면, 전장 인간 MASP-2 cDNA를 함유하는 플라스미드 (Thiel et al., *Nature* 386:506, 1997에 기술됨)를 *Xho1* 및 *EcoR1*로 분해하고 MASP-2 cDNA (본원에서 SEQ ID NO:4로서 기술됨)를 pFastBac1 배컬로바이러스 전달 벡터 (Life Technologies, NY)의 상응하는 제한 부위에 클로닝한다. 그런 후 펩타이드 영역 아미노산 610-625 (SEQ ID NO:13)를 암호화하는 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드를 천연 영역 아미노산 610 내지 625로 대체시킴으로써 Ser618의 MASP-2 세린 프로테아제 활성 부위를 Ala618로 변경시켜서 비활성 프로테아제 도메인을 가진 MASP-2 전장 폴리펩타이드를 생성한다. 인간 Masp-2로부터 유래된 폴리펩타이드 영역을 함유하는 발현 플라스미드의 구성.

[0498] 다음의 구성물을 MASP-2의 다양한 도메인을 분비하도록 MASP-2 신호 펩타이드 (SEQ ID NO:5의 잔기 1-15)를 사용하여 제조한다. 인간 MASP-2 CUB1 도메인 (SEQ ID NO:8)을 발현하는 구성물을 MASP-2 (SEQ ID NO:6)의 잔기 1-121 (N-말단 CUB1 도메인에 상응함)을 암호화하는 영역을 PCR 증폭시킴으로써 만든다. 인간 MASP-2 CUBIEGF 도메인 (SEQ ID NO:9)을 발현하는 구성물을 MASP-2 (SEQ ID NO:6)의 잔기 1-166 (N-말단 CUBIEGF 도메인에 상응함)을 암호화하는 영역을 PCR 증폭시킴으로써 만든다. 인간 MASP-2 CUBIEGFCUBII 도메인 (SEQ ID NO:10)을 발현하는 구성물을 MASP-2 (SEQ ID NO:6)의 잔기 1-293 (N-말단 CUBIEGFCUBII 도메인에 상응함)을 암호화하는 영역을 PCR 증폭시킴으로써 만든다. 위에서 언급된 도메인은 Vent_R 중합효소 및 주형으로서 pBS-MASP-2를 사용하여, 확립된 PCR 방법을 따라 증폭된다. 센스 프라이머의 5' 프라이머 서열 (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' SEQ ID NO:34)은 PCR 생성물의 5' 단부에 *Bam*HI 제한 부위 (밀줄)를 도입시킨다. 아래의 표 5에 제시된 각각의 MASP-2 도메인에 대한 안티센스 프라이머를 각각의 PCR 생성물의 단부에서 중간 코돈 (굵게 표시)과 이어서 *Eco*RI 부위 (밀줄)가 도입되도록 설계한다. 증폭된 후에는, DNA 단편을 *Bam*HI 및 *Eco*RI로 분해하고 pFastBac1 벡터의 상응하는 부위로 클로닝한다. 결과적으로 생성된 구성물을 제한 지도화에 의해 특성화하고 dsDNA 서열분석에 의해 확인한다.

표 5

[0499] MASP-2 PCR 프라이머

MASP-2 도메인	5' PCR 프라이머	3' PCR 프라이머
SEQ ID NO:8 CUB1 (SEQ ID NO:6의 aa 1-121)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (SEQ ID NO:6의 aa 1-166)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGCT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10CUBIEGFCUBII (SEQ ID NO:6의 aa 1-293)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGAT 3' (SEQ ID NO:37)

SEQ ID NO:4 인간 MASP-2	5' ATGAGGCTGCTGACCTCCTGGGCCT TC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_전방향	5' TTAATACTACTAATTATGTTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_역방향
SEQ ID NO:4 인간 MASP-2 cDNA	5' CAGAGGTGACGAGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_전방향	5' GTGCCCTCCTGCGTCACCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_역방향
SEQ ID NO:50 쥐과 MASP-2 cDNA	5' ATGAGGCTACTCATCTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_전방 향	5' TTAGAAATTACTTATTATGTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_역방향
SEQ ID NO:50 쥐과 MASP-2 cDNA	5' CCCCCCTGCGTCACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_전방향	5' CTGCAGAGGTGACGAGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_역방향

[0500] 효소적 비활성 마우스, 래트, 및 인간 MASP-2A의 MASP-2의 재조합 진행 발현 및 단백질 생성.

[0501] 위에서 기술된 MASP-2 및 MASP-2A 발현 구성물을 표준 칼슘 포스페이트 트랜스펙션 과정 (Maniatis et al., 1989)을 사용하여 DXB1 세포에 트랜스펙션하였다. MASP-2A를 혈청-유리 배지에서 생성하여 제제가 다른 혈청 단백질로 오염되지 않도록 보장하였다. 배지를 합류 세포로부터 2일마다 수득하였다 (총 4회). 재조합 MASP-2A의 수준은 3개 중 각각에 대해 평균 약 1.5 mg/배양 배지의 리터였다.

[0502] **MASP-2A 단백질 정제:** MASP-2A (위에서 기술된 Ser-Ala 돌연변이체)를 MBP-A-아가로스 칼럼 상의 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 이 전략은 외인성 태그를 사용하지 않으면서 신속한 정제를 가능하게 하였다. MASP-2A (동등한 부피의 로딩 완충액 (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 150 mM NaCl 및 25 mM CaCl₂를 함유함)으로 희석된 배지의 100-200 ml)를 10 ml의 로딩 완충액으로 사전 평형화된 MBP-아가로스 친화성 칼럼 (4 ml) 상에 로딩하였다. 추가의 10 ml의 로딩 완충액으로 세척한 후, 단백질을 1.25 M NaCl 및 10 mM EDTA를 함유한 50 mM Tris-Cl, pH 7.5로 1 ml 분획으로 용출하였다. MASP-2A를 함유한 분획을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 확인하였다. 필요에 따라, MASP-2A를 MonoQ 칼럼 상의 이온 교환 크로마토그래피 (HR 5/5)에 의해 추가로 정제하였다. 단백질을 50 mM NaCl을 함유한 50 mM Tris-Cl pH 7.5로 투석하고 동일한 완충액으로 평형화된 칼럼 상에 로딩하였다. 세척 후, 결합된 MASP-2A를 10 ml에 대해 0.05-1 M NaCl 구배로 용출하였다.

[0503] **결과:** MASP-2A 단백질의 0.25-0.5 mg의 수율을 200 ml의 배지로부터 얻었다. MALDI-MS에 의해 측정된 77.5 kDa의 분자량은 글리코실화로 인해 비변형 폴리펩타이드의 계산값 (73.5 kDa)보다 더 크다. 각각의 N-글리코실화 부위에서의 글리칸의 부착은 관찰된 질량을 설명해준다. MASP-2A는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 단일 밴드로서 이동하여, 그것이 생합성 중에 단백질 분해적으로 처리되지 않은 것을 입증한다. 평형 초원심분리에 의해 측정된 중량 평균 분자량은 글리코실화된 폴리펩타이드의 호모다이머에 대한 계산값과 일치한다.

[0504] 재조합 인간 Masp-2 폴리펩타이드의 제조

[0505] 재조합 MASP-2 및 MASP2A 유래 폴리펩타이드를 제조하는 또 다른 방법이 Thielens, N.M., et al., *J. Immunol.* 166:5068-5077, 2001에 기술되어 있다. 간단히 설명하면, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 곤충 세포 (Novagen (Madison, WI)로부터 얻어진 Ready-Plaque Sf9 세포)를 50 IU/ml 페니실린 및 50 mg/ml 스트렙토마이신 (Life Technologies)이 보충된 Sf900II 혈청-유리 배지 (Life Technologies)에서 성장시키고 유지시킨다. 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*) (High Five) 곤충 세포 (Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale (Grenoble, France)에서 제공됨)를 50 IU/ml 페니실린 및 50 mg/ml 스트렙토마이신이 보충된 10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France)를 함유한 TC100 배지 (Life Technologies)에서 유지한다. 재조합 배컬로바이러스를 Bac-to-Bac 시스템 (Life Technologies)을 사용하여 생성한다. 백미드(bacmid) DNA를 Qiagen 미디프랩 정제 시스템 (Qiagen)을 사용하여 정제하고 제조사 프로토콜에 기술된 것과 같이 Sf900 II SFM 배지 (Life Technologies)에서 셀렉틴을 사용하여 Sf9 곤충 세포를 트랜스펙션하는 데 사용한다. 재조합 바이러스 입자를 4일 후 수집하여, 바이러스 플라크 검정에 의해 적정하고, King 및 Possee에 의해 기술된 것과 같이 증폭시킨다, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Chapman and Hall Ltd., London, pp. 111-114, 1992.

[0506] High Five 세포 (1.75×10^7 세포/175-cm² 조직 배양 플라스크)를 Sf900 II SFM 배지에서 28°C에서 96시간 동안 2의 감염 다중도로 MASP-2 폴리펩타이드를 함유한 재조합 바이러스로 감염시킨다. 원심분리에 의해 상층액을 수집하고 다이아이소프로필 포스포로플루오라이데이트를 1 mM의 최종 농도로 첨가한다.

- [0507] MASP-2 폴리펩타이드는 배양 배지에 분비된다. 배양 상층액을 50 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 50 mM 트라이에탄올아민 염산염 pH 8.1에 대해 투석하고, 1.5 ml/분으로 동일한 완충액으로 평형화된 Q-세파로스 패스트 플로우 칼럼 (Amersham Pharmacia Biotech) (2.8 x 12 cm) 상에 로딩한다. 동일한 완충액 중의 350 mM NaCl까지의 대략 2 리터의 선형 구배를 적용함으로써 용출을 수행한다. 재조합 MASP-2 폴리펩타이드를 함유한 분획을 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인하고, (NH₄)₂SO₄를 60% (중량/부피)까지 첨가하여 침전시키고, 밤새 4℃에서 방치하였다. 펠렛을 145 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 50 mM 트라이에탄올아민 염산염 pH 7.4에 재현탁하고, 동일한 완충액으로 평형화된 TSK G3000 SWG 칼럼 (7.5 x 600 mm) (Tosohaas, Montgomeryville, PA) 위로 적용하였다. 그런 후 정제된 폴리펩타이드를 Microsep 미세농축기 상에서의 한외여과에 의해 0.3 mg/ml로 농축한다 (분자량 컷 오프 = 10,000) (Filtron, Karlstein, Germany).
- [0508] **실시예 4**
- [0509] 이 실시예는 MASP-2 폴리펩타이드에 대해 다클론성 항체를 제조하는 방법을 기술한다.
- [0510] **물질 및 방법:**
- [0511] **MASP-2 항원:** 다클론성 항-인간 MASP-2 항혈청을 다음의 분리된 MASP-2 폴리펩타이드로 토끼를 면역화함으로써 생성한다: 혈청으로부터 분리된 인간 MASP-2 (SEQ ID NO:6); **실시예 3**에서 기술된, 비활성 프로테아제 도메인 (SEQ ID NO:13)을 함유한 MASP-2A인 재조합 인간 MASP-2 (SEQ ID NO:6); 및 **실시예 3**에서 기술된 것과 같이 발현된 재조합 CUBI (SEQ ID NO:8), CUBEGFI (SEQ ID NO:9), 및 CUBEGFCUBII (SEQ ID NO:10).
- [0512] **다클론성 항체:** BCG (바실루스 Calmette-Guerin 백신)로 프라이밍된 생후 6주령의 토끼를 100 µg의 MASP-2 폴리펩타이드를 멸균 식염수 용액 중의 100 µg/ml로 주사함으로써 면역화한다. 주사는 **실시예 5**에서 기술된 것과 같이 ELISA 검정에 의해 모니터링되는 항체 역가로 4주마다 실시한다. 배양 상층액을 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의한 항체 정제를 위해 수집한다.
- [0513] **실시예 5**
- [0514] 이 실시예는 래트 또는 인간 MASP-2 폴리펩타이드에 대해 쥐과 다클론성 항체를 제조하는 방법을 기술한다.
- [0515] **물질 및 방법:**
- [0516] 생후 8-12주령의 수컷 A/J 마우스 (Harlan, Houston, Tex.)를 200 µl의 인산염 완충 식염수 (PBS) pH 7.4 중의 완전 프로인트 보조제 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 중의 100 µg 인간 또는 래트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩타이드 (**실시예 3**에서 기술된 대로 제조됨)로 피하 주사한다. 2주 간격으로 마우스를 불완전 프로인트 보조제 중의 50 µg의 인간 또는 래트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩타이드로 2회 피하 주사한다. 4주차에 마우스에게 PBS 중의 50 µg의 인간 또는 래트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩타이드를 주사하고 4일 후에 융합한다.
- [0517] 각각의 융합에 대해, 단일 세포 현탁액을 면역화된 마우스의 비장으로부터 준비하여 Sp2/0 골수종 세포와의 융합에 사용한다. 5x10⁸개의 Sp2/0 및 5x10⁸개의 비장 세포를 50% 폴리에틸렌 글리콜 (분자량 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) 및 5% 다이메틸설폭사이드 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)를 함유한 배지에서 융합한다. 그런 후 세포를 10% 태아 소 혈청, 100 유닛/ml의 페니실린, 100 µg/ml의 스트렙토마이신, 0.1 mM 하이포크산틴, 0.4 µM 아미노프테린 및 16 µM 티미딘이 보충된 이스코프 배지 (Gibco, Grand Island, N.Y.)에서 200 µl의 현탁액당 1.5x10⁵ 비장 세포의 농도로 조정한다. 200 마이크로리터의 세포 현탁액을 약 20개의 96-웰 미세배양 플레이트의 각 웰에 첨가한다. 약 10일 후에 배양 상층액을 정제된 인자 MASP-2와의 반응성에 대해 ELISA 검정으로 스크리닝하기 위해 회수한다.
- [0518] **ELISA 검정:** Immulon 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) 마이크로테스트 플레이트의 웰에 50 µl의 정제된 hMASP-2를 50 ng/ml로 또는 래트 rMASP-2 (또는 rMASP-2A)를 밤새 실온에서 첨가함으로써 코팅한다. 코팅을 위해 저농도의 MASP-2는 고친화성 항체의 선택을 가능하게 한다. 플레이트를 텅김으로써 코팅 용액을 제거한 후, PBS 중의 200 µl의 BLOTTO (무지방 분유)를 각 웰에 1시간 동안 첨가하여 비특이적 부위를 차단한다. 1시간 후에, 웰을 완충액 PBST (0.05% Tween 20을 함유한 PBS)로 세척한다. 각각의 융합 웰로부터 50 마이크로리터의 배양 상층액을 수집하고 50 µl의 BLOTTO와 혼합한 후 마이크로테스트 플레이트의 개별 웰에 첨가한다. 1시간의 인큐베이션 후, 웰을 PBST로 세척한다. 그런 후 결합된 쥐과 항체를 양고추냉이 과산화효소 (HRP)와 콘

쥬게이션되고 BLOTTO에서 1:2,000으로 희석된 염소 항-마우스 IgG (Fc 특이적) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.)와의 반응에 의해 검출한다. 색 발생을 위해 0.1% 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 (Sigma, St. Louis, Mo.) 및 0.0003% 과산화 수소 (Sigma)를 함유한 과산화효소 기질 용액을 30분 동안 웰에 첨가한다. 웰당 50 μ l의 2 M H₂SO₄를 첨가함으로써 반응을 종결한다. 반응 혼합물의 450 nm에서의 광학 밀도를 BioTek ELISA 판독기 (BioTek Instruments, Winooski, Vt.)에서 판독한다.

[0519] **MASP-2 결합 검정:**

[0520] 위에서 기술한 MASP-2 ELISA 검정에서 테스트 양성인 배양 상층액을 결합 검정으로 테스트하여 MASP-2 억제제가 MASP-2에 대해 결합 친화성을 갖는지를 측정할 수 있다. 억제제가 보체 시스템의 다른 항원에 결합하는지를 측정하기 위하여 유사한 검정을 또한 사용할 수 있다.

[0521] 폴리스티렌 미세적정 플레이트 웰 (96-웰 배지 결합 플레이트, Corning Costar, Cambridge, MA)을 인산염 완충 식염수 (PBS) pH 7.4에서 MASP-2 (20 ng/100 μ l/웰, Advanced Research Technology, San Diego, CA)로 밤새 4°C에서 코팅한다. MASP-2 용액을 흡인한 후, 웰을 1% 소 혈청 알부민 (BSA; Sigma Chemical)을 함유한 PBS로 2시간 동안 실온에서 차단한다. MASP-2 코팅이 없는 웰은 배경 대조군으로서 작용한다. 차단 용액 중의 다양한 농도의 하이브리도마 상층액 또는 정제된 항-MASP-2 MoAb의 부분표본을 웰에 첨가한다. 실온에서 2시간 인큐베이션한 후, 웰을 PBS로 집중적으로 세정한다. MASP-2-결합된 항-MASP-2 MoAb를 차단 용액 중의 과산화효소-콘쥬게이션된 염소 항-마우스 IgG (Sigma Chemical)를 첨가한 후, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션함으로써 검출한다. 플레이트를 다시 PBS로 철저히 세정하고, 100 μ l의 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 (TMB) 기질 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)을 첨가한다. TMB의 반응을 100 μ l의 1 M 인산을 첨가함으로써 퀀칭하고, 플레이트를 마이크로플레이트 판독기 (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 450 nm에서 판독한다.

[0522] 그런 후 양성 웰로부터의 배양 상층액을 보체 활성화를 억제하는 능력에 대해 **실시예 2**에서 기술된 것과 같은 C4 절단 검정과 같은 기능성 검정으로 테스트한다. 그런 후 양성 웰의 세포를 제한 희석에 의해 클로닝한다. MoAb를 다시 hMASP-2와의 반응성에 대해 위에서 기술한 것과 같이 ELISA 검정으로 테스트한다. 선택된 하이브리도마를 스피너 플라스크에서 성장시키고 사용한 배양 상층액을 단백질 A 친화성 크로마토그래피에 의한 항체 정제를 위해 수집한다.

[0523] **실시예 6**

[0524] 이 실시예는 인간화된 쥐과 항-MASP-2 항체 및 항체 단편의 생성 및 생산을 기술한다.

[0525] 쥐과 항-MASP-2 단클론성 항체를 **실시예 5**에서 기술한 것과 같이 수컷 A/J 마우스에서 생성한다. 그런 후 쥐과 항체를 그것의 면역원성을 감소시키기 위해 아래에서 기술하는 것과 같이 쥐과 불변 영역을 그것의 인간 대응물로 대체하여 키메릭 Ig 및 항체의 Fab 단편을 생성함으로써 인간화하며, 그것은 본 발명에 따라 인간 대상체에서 MASP-2-의존성 보체 활성화의 불리한 효과를 억제하는 데 유용하다.

[0526] **1. 쥐과 하이브리도마 세포로부터의 항-MASP-2 가변 영역 유전자의 클로닝.** 총 RNA를 항-MASP-2 MoAb를 분리하는 하이브리도마 세포 (실시예 7에서 기술된 것과 같이 얻어짐)로부터 RNazol을 사용하여 제조사 (Biotech, Houston, Tex.)의 프로토콜을 따라 분리한다. 첫 번째 가닥의 cDNA를 총 RNA로부터 프라이머로서 올리고 dT를 사용하여 합성한다. PCR을 면역글로불린 불변 C 영역-유래 3' 프라이머 및 리더 펩타이드로부터 유래된 축퇴성 프라이머 세트를 사용하여 또는 쥐과 V_H 또는 V_K 유전자의 첫 번째 프레임워크 영역을 5' 프라이머로서 사용하여 수행한다. 고정된 PCR을 Chen 및 Platsucas (Chen, P.F., *Scand. J. Immunol.* 35:539-549, 1992)에 의해 기술된 것과 같이 수행한다. V_K 유전자의 클로닝을 위해, 이중 가닥 cDNA를 Not1-MAK1 프라이머 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO:38)를 사용하여 제조한다. 어닐링된 어댑터 AD1 (5'-GGAATTCACGCTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO:39) 및 AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO:40)를 이중 가닥 cDNA의 양 5' 및 3' 말단에 결합시킨다. 3' 단부의 어댑터를 Not1 분해에 의해 제거한다. 그런 후 분해된 생성물을 PCR에서 주형으로서 사용하는데, AD1 올리고뉴클레오타이드는 5' 프라이머로서 사용되고 MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTC-3' SEQ ID NO:41)는 3' 프라이머로서 사용된다. 대략 500 bp의 DNA 단편을 pUC19에 클로닝한다. 여러 클론을 서열 분석을 위해 선택하여 클로닝된 서열이 예상된 쥐과 면역글로불린 불변 영역을 포함하는 것을 검증한다. Not1-MAK1 및 MAK2 올리고뉴클레오타이드는 V_K 영역으로부터 유래하며 각각 C 카와 유전자의 첫 번째 염기쌍으로부터 하류로 182 및 84 bp에 있다. 완전한 V_K 및 리더 펩타이드를 포함하는

클론을 선택한다.

[0527] V_H 유전자의 클로닝을 위해, 이중 가닥 cDNA를 NotI MAG1 프라이머 (5'-CGCGGCCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO:42)를 사용하여 제조한다. 어닐링된 어댑터 AD1 및 AD2를 이중 가닥 cDNA의 양 5' 및 3' 말단에 결합시킨다. 3' 단부의 어댑터를 NotI 분해에 의해 제거한다. 분해된 생성물을 PCR에서 주형으로서 사용하는데, AD1 올리고뉴클레오타이드 및 MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGAAATA-3' SEQ ID NO:43)를 프라이머로서 사용한다. 500 내지 600 bp 길이의 DNA 단편을 pUC19에 클로닝한다. NotI-MAG1 및 MAG2 올리고뉴클레오타이드는 쥐과 Cg.7.1 영역으로부터 유래하며, 각각 쥐과 Cg.7.1 유전자의 첫 번째 bp로부터 하류로 180 및 93 bp에 있다. 완전한 V_H 및 리더 펩타이드를 포함하는 클론을 선택한다.

[0528] **2. 키메라 MASP-2 IgG 및 Fab에 대한 발현 벡터의 구성.** 위에서 기술된 클로닝된 V_H 및 V_K 유전자를, 뉴클레오타이드 서열의 5' 단부에 Kozak 공통 서열을 첨가하고 스플라이스 도너를 3' 단부에 첨가하기 위한 PCR 반응에서 주형으로 사용한다. 서열을 분석하여 PCR 에러의 부재를 확인한 후, V_H 및 V_K 유전자를 각각 인간 C. γ 1 및 C. 카파를 함유하는 발현 벡터 카세트에 삽입하여 pSV2neo V_H -huC γ 1 및 pSV2neoV-huC γ 를 얻는다. 중쇄 및 경쇄 벡터의 CsCli 구배-정제된 플라스미드 DNA를 사용하여 전기천공에 의해 COS 세포를 트랜스펙션한다. 48시간 후, 배양 상층액을 대략 200 ng/ml의 키메라 IgG의 존재를 확인하기 위해 ELISA에 의해 테스트한다. 세포를 수득하고 총 RNA를 제조한다. 첫 번째 가닥의 cDNA를 총 RNA로부터 올리고 dT를 프라이머로서 사용하여 합성한다. 이 cDNA를 PCR에서 주형으로서 사용하여 Fd 및 카파 DNA 단편을 생성한다. Fd 유전자에 대해, PCR을 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAGT-3' (SEQ ID NO:44)를 5' 프라이머로서 사용하고 CH1-유래 3' 프라이머 (5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO:45)를 사용하여 수행한다. DNA 서열을 인간 IgG1의 완전한 V_H 및 CH1 도메인을 함유하는지 확인한다. 적절한 효소로 분해한 후, Fd DNA 단편을 발현 벡터 카세트 pSV2dhfr-TUS의 HindIII 및 BamHI 제한 부위에 삽입하여 pSV2dhfrFd를 얻는다. pSV2 플라스미드는 상업적으로 이용 가능하며 다양한 공급처로부터의 DNA 분절로 이루어진다: pBR322 DNA (얇은 선)는 pBR322 DNA 복제 기원 (pBR ori) 및 락타마제 암호화된 내성 유전자 (Amp)를 함유하고; 더 넓은 해칭으로 표시되고 마킹된 SV40 DNA는 SV40 DNA 복제 기원 (SV40 ori), 초기 프로모터 (dhfr 및 neo 유전자에 대해 5'), 및 폴리아데닐화 신호 (dhfr 및 neo 유전자에 대해 3')를 함유한다. SV40-유래 폴리아데닐화 신호 (pA)가 또한 Fd 유전자의 3' 단부에 위치한다.

[0529] 카파 유전자의 경우, PCR을 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCTACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO:46)를 5' 프라이머로서 사용하고 C $_K$ -유래 3' 프라이머 (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO:47)를 사용하여 수행한다. DNA 서열을 완전한 V_K 및 인간 C $_K$ 영역을 함유하는지 확인한다. 적절한 제한 효소로 분해한 후, 카파 DNA 단편을 발현 벡터 카세트 pSV2neo-TUS의 HindIII 및 BamHI 제한 부위에 삽입하여 pSV2neoK를 얻는다. Fd 및 카파 유전자 둘 다의 발현은 HCMV-유래 인핸서 및 프로모터 요소에 의해 구동된다. Fd 유전자가 사슬간 이황화 결합에 관여하는 시스테인 아미노산 잔기를 포함하지 않기 때문에, 이 재조합 키메라 Fab는 비-공유 결합된 중쇄 및 경쇄를 함유한다. 이 키메라 Fab는 cFab로서 표시된다.

[0530] 중쇄와 경쇄간 이황화 결합을 가지는 재조합 Fab를 얻기 위해, 상기 Fd 유전자는 인간 IgG1의 힌지 영역으로부터의 추가의 9개 아미노산 (EPKSCDKTH SEQ ID NO:48)에 대한 코딩 서열을 포함하기 위해 연장될 수 있다. Fd 유전자의 3' 단부에 있는 30개 아미노산을 암호화하는 BstEII-BamHI DNA 분절은 연장된 Fd를 암호화하는 DNA 분절로 대체되어 결과적으로 pSV2dhfrFd/9aa가 생성될 수 있다.

[0531] **3. 키메라 항-MASP-2 IgG의 발현 및 정제**

[0532] 키메라 항-MASP-2 IgG를 분비하는 세포주를 생성하기 위하여, NSO 세포를 pSV2neo V_H -huC. γ 1 및 pSV2neoV-huC 카파의 정제된 플라스미드 DNA로 전기천공에 의해 트랜스펙션한다. 트랜스펙션된 세포를 0.7 mg/ml G418의 존재 하에 선택한다. 세포를 250 ml 스피너 플라스크에서 혈청-함유 배지를 사용하여 성장시킨다.

[0533] 100 ml 스피너 배양의 배양 상층액을 10-ml PROSEP-A 칼럼 (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.) 상에 로딩한다. 칼럼을 10배 배드 부피의 PBS로 세척한다. 결합된 항체를 50 mM 시트레이트 완충액, pH 3.0으로 용출한다. 동일한 부피의 1 M HEPES, pH 8.0을 정제된 항체를 함유하고 있는 분획에 첨가하여 pH를 7.0으로 조정한다. 잔류하는 염을 PBS를 사용하는 완충액 교환에 의해 Millipore 막 한외여과 (분자량 컷오프: 3,000)에 의해 제거한다. 정제된 항체의 단백질 농도를 BCA 방법 (Pierce)에 의해 측정한다.

- [0534] **4. 키메릭 항-MASP-2 Fab의 발현 및 정제**
- [0535] 키메릭 항-MASP-2 Fab를 분비하는 세포주를 생성하기 위하여, CHO 세포를 pSV2dhfrFd (또는 pSV2dhfrFd/9aa) 및 pSV2neo카파의 정제된 플라스미드 DNA로 전기천공에 의해 트랜스펙션한다. 트랜스펙션된 세포를 G418의 존재 하에 선택한다. 선택된 세포주를 증가하는 농도의 메토포렉세이트에서 증폭시킨다. 세포를 제한 희석에 의해 단일 세포 하위클로닝한다. 그런 후 고-생성 단일 세포 하위클로닝된 세포주를 100 ml 스피너 배양으로 혈청-유리 배지를 사용하여 성장시킨다.
- [0536] 키메릭 항-MASP-2 Fab를 MASP-2 MoAb에 대한 마우스 항-이디오타입 MoAb를 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 정제한다. 항-이디오타입 MASP-2 MoAb는 마우스를 키홀 림프 헤모시아닌 (KLH)과 콘쥬게이션된 쥐과 항-MASP-2 MoAb로 면역화하고 인간 MASP-2와 결합할 수 있는 특이적 MoAb 결합에 대해 스크리닝함으로써 만들어질 수 있다. 정제를 위해, cFab 또는 cFab/9aa를 생성하는 CHO 세포의 스피너 배양으로부터의 100 ml의 상층액을 항-이디오타입 MASP-2 MoAb와 결합된 친화성 칼럼 위에 로딩한다. 그런 후 칼럼을 PBS로 철저하게 세척한 후 결합된 Fab를 50 mM 다이에틸아민, pH 11.5로 용출한다. 잔류하는 염을 위에서 기술한 것과 같이 완충액 교환에 의해 제거한다. 정제된 Fab의 단백질 농도를 BCA 방법 (Pierce)에 의해 측정한다.
- [0537] 키메릭 MASP-2 IgG, cFab, 및 cFab/9aa의 MASP-2-의존성 보체 경로를 억제하는 능력을 **실시예 2** 또는 **실시예 7**에서 기술된 억제 검정을 사용함으로써 측정할 수 있다.
- [0538] **실시예 7**
- [0539] 이 실시예는 MASP-2 억제제가 L-피콜린/P35, H-피콜린, M-피콜린 또는 만난을 통해 MASP-2-의존성 보체 활성화를 차단할 수 있는지를 확인하기 위한 기능적 스크리닝으로서 사용된 시험관내 C4 절단 검정을 기술한다.
- [0540] **C4 절단 검정:** C4 절단 검정은 Petersen, S.V., 등에 의해 기술되었고 (*J. Immunol. Methods* 257:107, 2001), L-피콜린에 결합하는 황색 포도상구균으로부터의 리포테이코산 (LTA)으로부터 유발된 렉틴 경로 활성화를 측정한다.
- [0541] **시약:** 포르말린-고정된 황색 포도상구균 (DSM20233)을 다음과 같이 준비한다: 박테리아를 트립신 소이 혈액 배지에서 37°C에서 밤새 성장시키고, PBS로 3회 세척한 후, 1시간 동안 실온에서 PBS/0.5% 포르말린에 고정시키고, 추가로 PBS로 3회 세척한 후, 코팅 완충액 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)에 재현탁하였다.
- [0542] **검정:** Nunc MaxiSorb 미세적정 플레이트 (Nalgene Nunc International, Rochester, NY)의 웰을 코팅 완충액 중의 1 µg의 L-피콜린과 함께 코팅 완충액 중의 100 µl의 포르말린-고정된 황색 포도상구균 DSM20233 (OD₅₅₀ = 0.5)으로 코팅한다. 밤새 인큐베이션한 후, 웰을 TBS (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.4) 중의 0.1% 인간 혈청 알부민 (HSA)으로 차단한 다음, 0.05% Tween 20 및 5 mM CaCl₂를 함유한 TBS (세척 완충액)로 세척한다. 인간 혈청 샘플을 내인성 C4의 활성화를 방지하고 C1 복합체 (C1q, C1r 및 C1s로 구성됨)를 분해하는 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% Triton X-100, 0.1% HSA, pH 7.4로 희석한다. 항-MASP-2 MoAb 및 억제펩타이드를 포함한 MASP-2 억제제를 다양한 농도로 혈청 샘플에 첨가한다. 희석된 샘플을 플레이트에 첨가하고 4°C에서 밤새 인큐베이션한다. 24시간 후, 플레이트를 세척 완충액으로 철저하게 세척한 다음, 100 µl의 4 mM 바르비탈, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4 중의 0.1 µg의 정제된 인간 C4 (Dodds, A.W., *Methods Enzymol.* 223:46, 1993에서 기술된 것과 같이 얻음)를 각 웰에 첨가한다. 37°C에서 1.5 시간 후, 플레이트를 다시 세척하고 C4b 침착을 알칼리 포스파타제-콘쥬게이션된 닭 항-인간 C4c (Immunsystem (Uppsala, Sweden)사로부터 얻음)를 사용하여 검출하고 비색 기질(colorimetric substrate)인 p-니트로페닐 포스페이트를 사용하여 측정한다.
- [0543] **만난 상에서의 C4 검정:** 위에서 기술된 검정을 적응하여 LSP 또는 만난으로 플레이트를 코팅한 후 다양한 MASP-2 억제제와 혼합된 혈청을 첨가함으로써 MBL을 통한 렉틴 경로 활성화를 측정한다.
- [0544] **H-피콜린 (Hakata Ag) 상에서의 C4 검정:** 위에서 기술된 검정을 적응하여 LSP 및 또는 H-피콜린으로 플레이트를 코팅한 후 다양한 MASP-2 억제제와 혼합된 혈청을 첨가함으로써 H-피콜린을 통한 렉틴 경로 활성화를 측정한다.
- [0545] **실시예 8**
- [0546] 다음의 검정은 야생형 및 MASP-2-/- 마우스에서의 고전적 경로 활성화의 존재를 입증한다.

- [0547] **방법:** 미세적정 플레이트 (Maxisorb, Nunc, cat. No. 442404, Fisher Scientific)를 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.4 중의 0.1% 인간 혈청 알부민으로 1시간 동안 실온에서 코팅한 후 TBS/tween/Ca²⁺에 1:1000으로 희석된 양 항 전체 혈청 항혈청 (Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Scotland)과 함께 밤새 4℃에서 인큐베이션함으로써 면역 복합체를 생성하였다.
- [0548] 혈청 샘플을 야생형 및 MASP-2^{-/-} 마우스로부터 얻어서 코팅된 플레이트에 첨가하였다. C1q가 야생형 및 MASP-2^{-/-} 혈청 샘플로부터 고갈된 대조군 샘플을 제조하였다. C1q-고갈된 마우스 혈청을 토끼 항-인간 C1q IgG (Dako, Glostrup, Denmark)로 코팅된 단백질-A-결합 다이아비드 (Dynal Biotech, Oslo, Norway)를 사용하여 공급자의 설명서를 따라 제조하였다. 플레이트를 90분 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 결합된 C3b를 TBS/tw/Ca⁺⁺에 1:1000으로 희석된 다클론성 항-인간-C3c 항체 (Dako A 062)로 검출하였다. 이차 항체는 염소 항-토끼 IgG이다.
- [0549] **결과:** 도 7은 야생형 혈청, MASP-2^{-/-} 혈청, C1q-고갈된 야생형 및 C1q-고갈된 MASP-2^{-/-} 혈청 중의 IgG로 코팅된 플레이트 상에서의 상대적인 C3b 침착 수준을 보여준다. 이들 결과는 고전적 경로가 MASP-2^{-/-} 마우스 스트레인에서 온전한 것을 입증한다.
- [0550] **실시예 9**
- [0551] 다음의 검정을 사용하여 고전적 경로가 면역 복합체에 의해 개시되는 조건 하에서 MASP-2 억제제의 효과를 분석함으로써 MASP-2 억제제가 고전적 경로를 차단하는지의 여부를 테스트한다.
- [0552] **방법:** 고전적 경로가 면역 복합체에 의해 개시되는 보체 활성화 상태에 미치는 MASP-2 억제제의 영향을 테스트하기 위하여, 90% NHS를 함유하는 삼중의 50 μ l 샘플을 37℃에서 10 μ g/ml 면역 복합체 (IC) 또는 PBS의 존재 하에 인큐베이션하고, 37℃ 인큐베이션 중에 200 nM 항-프로퍼딘 다클론성 항체를 함유하는 병렬 삼중 샘플 (+/-IC)을 또한 포함시켰다. 37℃에서 2시간 인큐베이션한 후에, 13 mM EDTA를 모든 샘플에 첨가하여 추가의 보체 활성화를 중단시키고 샘플을 즉시 5℃로 냉각시킨다. 그런 후 샘플을 -70℃에서 보관한 후에 ELISA 키트 (Quidel, Catalog Nos. A015 및 A009)를 제조사의 설명서를 따라 사용하여 보체 활성화 생성물 (C3a 및 sC5b-9)에 대해 검정한다.
- [0553] **실시예 10**
- [0554] 이 실시예는 MASP-2 활성을 차단하는 고친화성 항-MASP-2 Fab2 항체 단편의 확인을 기술한다.
- [0555] **배경 및 근거:** MASP-2는 MBL 및 피콜린을 위한 결합 부위(들), 세린 프로테아제 촉매 부위, 단백질 분해성 기질 C2에 대한 결합 부위, 단백질 분해성 기질 C4에 대한 결합 부위, MASP-2 지모겐의 자가활성화를 위한 MASP-2 절단 부위, 및 2개의 Ca⁺⁺ 결합 부위를 포함한, 많은 별도의 기능성 도메인을 가진 복합체 단백질이다. MASP-2에 고친화성으로 결합하는 Fab2 항체 단편을 확인하고, 확인된 Fab2 단편을 기능성 검정으로 테스트하여 그것이 MASP-2 기능적 활성을 차단할 수 있는지 테스트하였다.
- [0556] MASP-2 기능적 활성을 차단하기 위하여, 항체 또는 Fab2 항체 단편은 MASP-2 기능적 활성화에 필요한 MASP-2 상의 구조적 에피토프에 결합하여 그것을 간섭하여야 한다. 그러므로, 고친화성 결합 항-MASP-2 Fab2 중 많은 또는 전부가 그것들이 MASP-2 기능적 활성화에 직접 관여하는 MASP-2 상의 구조적 에피토프에 결합하지 않는 한 MASP-2 기능적 활성을 억제할 수 없다.
- [0557] 렉틴 경로 C3 전환효소 형성의 억제를 측정하는 기능성 검정을 사용하여 항-MASP-2 Fab2의 "차단 활성"을 평가하였다. 렉틴 경로에서 MASP-2의 주된 생리적 역할이 렉틴-매개 보체 경로의 다음 기능적 구성요소, 즉 렉틴 경로 C3 전환효소를 생성하는 것으로 알려져 있다. 렉틴 경로 C3 전환효소는 C3을 C3a 및 C3b로 단백질 가수분해적으로 절단하는 중요한 효소적 복합체 (C4bC2a)이다. MASP-2는 렉틴 경로 C3 전환효소 (C4bC2a)의 구조적 구성요소가 아니다; 그러나, MASP-2 기능적 활성화는 렉틴 경로 C3 전환효소를 포함하는 2개의 단백질 구성요소 (C4b, C2a)를 생성하기 위해 필요하다. 나아가, 위에서 열거된 MASP-2의 별도의 기능적 활성화는 모두 MASP-2가 렉틴 경로 C3 전환효소를 생성하기 위해 필요한 것으로 나타난다. 이들 이유로, 항-MASP-2 Fab2의 "차단 활성"을 평가하는 데 사용하기 위한 바람직한 검정은 렉틴 경로 C3 전환효소 형성의 억제를 측정하는 기능성 검정인 것으로 여겨진다.
- [0558] **고친화성 Fab2의 생성:** 인간 가변 경쇄 및 중쇄 항체 서열의 파지 디스플레이 라이브러리 및 관심 있는 선택된 리간드와 반응하는 Fab2를 확인하기 위한 자동화된 항체 선택 기술을 사용하여 래트 MASP-2 단백질 (SEQ ID

NO:55)에 대한 고친화성 Fab2를 생성하였다. 공지된 양의 래트 MASP-2 (~1 mg, >85% 순수) 단백질을 항체 스크리닝에 사용하였다. 최상의 친화성을 가진 항체의 선택을 위해 3회기의 증폭을 사용하였다. 항체 단편을 발현하는 대략 250개의 상이한 히트를 ELISA 스크리닝을 위해 선택하였다. 고친화성 히트를 계속해서 서열분석하여 상이한 항체의 독특성을 측정하였다.

[0559] 50개의 독특한 항-MASP-2 항체를 정제하였고 250 µg의 각각의 정제된 Fab2 항체를 아래에서 보다 상세하게 기술하는 것과 같이, MASP-2 결합 친화성의 특성화 및 보체 경로 기능성 테스트에 사용하였다.

[0560] **항-MASP-2 Fab2의 억제 (차단) 활성을 평가하기 위해 사용된 검정**

[0561] **1. 렉틴 경로 C3 전환효소의 형성의 억제를 측정하기 위한 검정:**

[0562] 배경: 렉틴 경로 C3 전환효소는 C3을 2개의 강력한 전염증성 단편인 아나필라톡신 C3a 및 옵소닌 C3b로 단백질 가수분해적으로 절단하는 효소적 복합체 (C4bC2a)이다. C3 전환효소의 형성은 염증을 매개하는 측면에서 렉틴 경로에서 핵심 단계인 것으로 나타난다. MASP-2는 렉틴 경로 C3 전환효소 (C4bC2a)의 구조적 구성요소가 아니다; 그러므로 항-MASP-2 항체 (또는 Fab2)는 기존의 C3 전환효소의 활성을 직접 억제하지는 못할 것이다. 그러나, 렉틴 경로 C3 전환효소를 포함하는 2개의 단백질 구성요소 (C4b, C2a)를 생성하기 위해서는 MASP-2 세린 프로테아제 활성이 필요하다. 그러므로, MASP-2 기능적 활성을 억제하는 (즉, 항-MASP-2 Fab2를 차단하는) 항-MASP-2 Fab2가 렉틴 경로 C3 전환효소의 새로운 형성을 억제할 것이다. C3은 비정상적이고 고도로 반응성인 티오에스테르 기를 그것의 구조의 일부분으로서 함유한다. 이 검정에서 C3 전환효소에 의해 C3가 절단될 때, C3b 상의 티오에스테르 기는 플라스틱 웰의 바닥에 고정된 거대분자 상의 하이드록실 또는 아미노 기와 에스테르 또는 아마이드 결합을 통해 공유 결합을 형성할 수 있으므로 ELISA 검정에서 C3b의 검출을 용이하게 해준다.

[0563] 효모 만남은 렉틴 경로의 공지된 활성화자이다. C3 전환효소의 형성을 측정하기 위한 다음의 방법에서, 만남으로 코팅된 플라스틱 웰을 30분 동안 37°C에서 희석된 래트 혈청과 함께 인큐베이션하여 렉틴 경로를 활성화하였다. 그런 후 웰을 세척하고 표준 ELISA 방법을 사용하여 웰 상에 고정된 C3b에 대해 검정하였다. 이 검정에서 생성된 C3b의 양은 렉틴 경로 C3 전환효소의 새로운 형성을 직접 반영한다. 선택된 농도의 항-MASP-2 Fab2를 그것의 C3 전환효소 형성 및 결과적으로 C3b 생성을 억제하는 능력에 대해 이 검정으로 테스트하였다.

[0564] **방법:**

[0565] 96-웰 Costar 배지 결합 플레이트를 50 mM 탄산염 완충액, pH 9.5에 희석된 만남과 함께 1 µg/50 T1/웰로 5°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 밤새 인큐베이션한 후, 각 웰을 200 T1 PBS로 3회 세척하였다. 그런 후 웰을 PBS 중의 100 T1/웰의 1% 소 혈청 알부민으로 차단하고 1시간 동안 실온에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 그런 후 각 웰을 200 T1의 PBS로 3회 세척하였다. 항-MASP-2 Fab2 샘플을 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 선택된 농도로 5°C에서 희석하였다. 상기 샘플에 5°C에서 0.5% 래트 혈청을 첨가하고 100 T1을 각 웰에 전달하였다. 플레이트를 덮고 30분 동안 37°C 수조에서 인큐베이션하여 보체 활성화를 허용하였다. 플레이트를 37°C 수조로부터 얼음-물 혼합물을 함유하고 있는 용기로 옮김으로써 반응을 중단하였다. 각 웰을 200 T1의 PBS-Tween 20 (PBS 중의 0.05% Tween)으로 5회 세척한 후 200 T1 PBS로 2회 세척하였다. 100 T1/웰의 이차 항체 (토끼 항-인간 C3c, DAKO A0062)의 1:10,000 희석을 2.0 mg/ml 소 혈청 알부민을 함유한 PBS에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 T1 PBS로 5회 세척하였다. 100 T1/웰의 이차 항체 (과산화효소-콘주게이션된 염소 항-토끼 IgG, American Qualex A102PU)의 1:10,000 희석을 2.0 mg/ml 소 혈청 알부민을 함유한 PBS에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 셰이커 상에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 T1 PBS로 5회 세척하였다. 100 T1/웰의 과산화효소 기질 TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)를 첨가하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 100 T1/웰의 1.0 M H_3PO_4 를 첨가함으로써 과산화효소 반응을 중단하고 OD₄₅₀을 측정하였다.

[0566] **2. MASP-2-의존성 C4 절단의 억제를 측정하기 위한 검정**

[0567] 배경: MASP-2의 세린 프로테아제 활성은 매우 특이적이고 MASP-2에 대한 2개의 단백질 기질만이 확인되어 있다; C2 및 C4. C4의 절단으로 C4a 및 C4b가 생성된다. 항-MASP-2 Fab2는 C4 절단에 직접 관여하는 MASP-2 상의 구조적 에피토프 (예컨대, C4에 대한 MASP-2 결합 부위; MASP-2 세린 프로테아제 촉매 부위)에 결합함으로써 MASP-2의 C4 절단 기능적 활성을 억제할 수 있다.

- [0568] 효모 만나는 랙틴 경로의 공지된 활성자이다. MASP-2의 C4 절단 활성을 측정하기 위한 다음의 방법에서, 만나는 코팅된 플라스틱 웰을 30분 동안 37°C에서 희석된 래트 혈청과 함께 인큐베이션하여 랙틴 경로를 활성화하였다. 이 ELISA 검정에서 사용된 일차 항체는 인간 C4만을 인식하기 때문에, 희석된 래트 혈청에 또한 인간 C4 (1.0 Tg/ml)로 보충하였다. 그런 후 웰을 세척하고 표준 ELISA 방법을 사용하여 웰 상에 고정된 인간 C4b에 대해 검정하였다. 이 검정에서 생성된 C4b의 양은 MASP-2 의존성 C4 절단 활성의 척도이다. 선택된 농도의 항-MASP-2 Fab2를 그것의 C4 절단을 억제하는 능력에 대해 이 검정으로 테스트하였다.
- [0569] **방법:** 96-웰 Costar 배지 결합 플레이트를 50 mM 탄산염 완충액, pH 9.5에 희석된 만나와 함께 1.0 Tg/50 Tl/웰로 5°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 3회 세척하였다. 그런 후 웰을 PBS 중의 100 Tl/웰의 1% 소 혈청 알부민으로 차단하고 1시간 동안 실온에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 Tl의 PBS로 3회 세척하였다. 항-MASP-2 Fab2 샘플을 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 선택된 농도로 5°C에서 희석하였다. 1.0 Tg/ml 인간 C4 (Quidel)를 또한 이들 샘플에 포함시켰다. 0.5% 래트 혈청을 상기 샘플에 5°C에서 첨가하고 100 Tl을 각 웰에 전달하였다. 플레이트를 덮고 30분 동안 37°C 수조에서 인큐베이션하여 보체 활성화를 허용하였다. 플레이트를 37°C 수조로부터 얼음-물 혼합물을 함유하고 있는 용기로 옮김으로써 반응을 중단하였다. 각 웰을 200 Tl의 PBS-Tween 20 (PBS 중의 0.05% Tween)으로 5회 세척한 후, 각 웰을 200 Tl PBS로 2회 세척하였다. 100 Tl/웰의 비오틴-콘주게이션된 닭 항-인간 C4c (Immunsystem AB, Uppsala, Sweden)의 1:700 희석을 2.0 mg/ml 소 혈청 알부민 (BSA)을 함유한 PBS에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 5회 세척하였다. 100 Tl/웰의 0.1 Tg/ml of 과산화효소-콘주게이션된 스트렙타비딘 (Pierce Chemical #21126)을 2.0 mg/ml BSA를 함유한 PBS에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 셰이커 상에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 5회 세척하였다. 100 Tl/웰의 과산화효소 기질 TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)를 첨가하고 실온에서 16분 동안 인큐베이션하였다. 100 Tl/웰의 1.0 M H_3PO_4 를 첨가함으로써 과산화효소 반응을 중단하고 OD_{450} 을 측정하였다.
- [0570] **3. '천연' 래트 MASP-2에 대한 항-래트 MASP-2 Fab2의 결합 검정**
- [0571] 배경: MASP-2는 일반적으로 혈장에, 또한 특이적 랙틴 분자 (만노스-결합 단백질 (MBL) 및 피콜린)를 포함하는 MASP-2 다이머 복합체로서 존재한다. 그러므로, 만약 당업자가 항-MASP-2 Fab2의 생리적으로 관련된 형태의 MASP-2에 대한 결합을 연구하는 데 관심이 있다면, 정제된 재조합 MASP-2보다는 혈장의 '천연' MASP-2와 Fab 사이의 상호작용이 사용되는 결합 검정을 개발하는 것이 중요하다. 이런 결합 검정에서 10% 래트 혈청으로부터의 '천연' MASP-2-MBL 복합체가 먼저 만나-코팅 웰 상에 고정시켰다. 그런 후에 고정된 '천연' MASP-2에 대한 다양한 항-MASP-2 Fab2의 결합을 표준 ELISA 방법을 사용하여 연구하였다.
- [0572] **방법:** 96-웰 Costar 고 결합 플레이트를 50 mM 탄산염 완충액, pH 9.5에 희석된 만나와 함께 1 Tg/50 Tl/웰로 5°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 3회 세척하였다. 그런 후 웰을 PBST (0.05% Tween 20이 첨가된 PBS)중의 100 Tl/웰의 0.5% 무지방 분유로 차단하고 1시간 동안 실온에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 각 웰을 5.0 mM $CaCl_2$, pH 7.4를 함유한 200 Tl의 TBS/Tween/ Ca^{++} 세척 완충액 (Tris-완충 식염수, 0.05% Tween 20)으로 3회 세척하였다. 고 염 결합 완충액 20 mM Tris, 1.0 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 0.05% Triton-X100, 0.1% (중량/부피) 소 혈청 알부민, pH 7.4) 중의 10% 래트 혈청을 얼음 상에서 준비하였다. 100 Tl/웰을 첨가하고 5°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 웰을 200 Tl의 TBS/Tween/ Ca^{++} 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 그런 후 웰을 200 Tl 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)에 희석된 선택된 농도의 항-MASP-2 Fab2의 100 Tl/웰을 첨가하고 1시간 동안 실온에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 5회 세척하였다. PBS 중의 2.0 mg/ml 소 혈청 알부민에 1:5000으로 희석된 100 Tl/웰의 HRP-콘주게이션된 염소 항-Fab2 (Biogenesis Cat No 0500-0099)를 첨가하고 1시간 동안 실온에서 부드럽게 혼합하면서 인큐베이션하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 5회 세척하였다. 100 Tl/웰의 과산화효소 기질 TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)를 첨가하고 실온에서 70분 동안 인큐베이션하였다. 100 Tl/웰의 1.0 M H_3PO_4 를 첨가함으로써 과산화효소 반응을 중단하고 OD_{450} 을 측정하였다.
- [0573] **결과:**

[0574] 래트 MASP-2 단백질에 고친화성으로 반응한 대략 250개의 상이한 Fab2를 ELISA 스크리닝을 위해 선택하였다. 이들 고친화성 Fab2를 서열분석하여 상이한 항체의 독특성을 측정하였고, 50개의 독특한 항-MASP-2 항체를 추가 분석을 위해 정제하였다. 250 μ g의 각각의 정제된 Fab2 항체를 MASP-2 결합 친화성의 특성화 및 보체 경로 기능성 테스트에 사용하였다. 이 분석의 결과를 아래의 표 6에 제시한다.

표 6

[0575] 렉틴 경로 보체 활성화를 차단하는 항-MASP-2 FAB2

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

[0576] 상기 표 6에서 나타난 것과 같이, 테스트된 50개의 항-MASP-2 Fab2 중에서, 17개의 Fab2를 10 nM Fab2과 동등하거나 더 적은 IC₅₀으로 C3 전환효소 형성을 강력하게 억제하는 MASP-2 차단 Fab2로서 확인하였다 (34% 양성 적 중률). 17개의 Fab2 중 8개가 나노몰 이하 범위의 IC₅₀을 가지는 것으로 확인되었다. 나아가, 표 6에 제시된 17개의 MASP-2 차단 Fab2는 전부 렉틴 경로 C3 전환효소 검정에서 C3 전환효소 형성의 본질적으로 완전한 억제를 제공하였다. 도 8A는 테스트되고 그 결과가 표 6에 제시된 다른 항체를 대표하는, Fab2 항체 #11에 대한 C3 전환효소 형성 검정의 결과를 그래프로 도시한다. 이것은 "차단" Fab2가 각각의 MASP-2 분자가 Fab2에 의해 결합 되었을 때에도 MASP-2 기능을 단기 기능적으로 억제할 수 있는 것이 이론적으로 가능하기 때문에 중요한 고려사항이다.

[0577] 비록 만만이 렉틴 경로의 공지된 활성사이지만, 래트 혈청 중의 항-만만 항체의 존재가 또한 고전적 경로를 활성화할 것이고 고전적 경로 C3 전환효소를 통해 C3b를 생성할 것임이 이론적으로 가능하다. 그러나, 이 실시예에서 열거된 17개의 차단 항-MASP-2 Fab2의 각각은 C3b 생성을 강력하게 억제하고 (>95%), 그로써 렉틴 경로 C3 전환효소에 대한 이 검정의 특이성을 입증한다.

[0578] 결합 검정을 또한 17개의 차단 Fab2 전부를 사용하여 각각에 대한 외관상 K_d를 계산하기 위하여 수행하였다. 차단 Fab2 중 6개에 대한 천연 래트 MASP-2에 대한 항-래트 MASP-2 Fab2의 결합 검정의 결과를 또한 표 6에 제시한다. 도 8B는 Fab2 항체 #11를 사용한 결합 검정의 결과를 그래프로 도시한다. 다른 Fab2에 대해서도 유사한 결합 검정을 수행하였고, 그 결과를 표 6에 제시한다. 일반적으로, 6개 Fab2의 각각의 '천연' MASP-2에 대한 결합에 대해 얻어진 외관상 K_d는 C3 전환효소 기능성 검정에서 Fab2에 대한 IC₅₀과 타당하게 잘 일치한다. MASP-2가 그것의 프로테아제 활성이 활성화될 때 '비활성' 형태로부터 '활성' 형태로 입체구조 변화를 진행한다는 증거가 있다 (Feinberg et al., *EMBO J* 22:2348-59 (2003); Gal et al., *J. Biol. Chem.* 280:33435-44 (2005)). C3 전환효소 형성 검정에서 사용된 정상 래트 혈장에서, MASP-2는 주로 '비활성' 지모겐 입체구조로 존재한다. 대조적으로, 결합 검정에서, MASP-2는 고정된 만만에 결합된 MBL과의 복합체의 일부로서 존재한다; 그러므로, MASP-2는 '활성' 입체구조로 있을 것이다 (Petersen et al., *J. Immunol Methods* 257:107-16, 2001). 따라서, 각각의 검정에서 Fab2가 MASP-2의 상이한 입체구조 형태와 결합할 것이기 때문에, 당업자는 이

들 두 기능성 검정으로 테스트된 17개의 차단 Fab2 각각에 대한 IC_{50} 과 K_d 사이의 정확한 대응성을 반드시 예상하지는 못할 것이다. 그럼에도 불구하고, Fab2 #88은 제외하고, 두 검정으로 테스트된 다른 16개의 Fab2의 각각에 대해 IC_{50} 과 외관상 K_d 사이에 타당하게 밀접한 대응성이 있는 것으로 나타난다 (표 6 참고).

[0579] 차단 Fab2 중 여러 개를 C4의 MASP-2 매개 절단의 억제에 대해 평가하였다. 도 8C는 C4 절단 검정의 결과를 그래프로 도시하며, Fab2 #41로 수행한 억제를 보여주며, $IC_{50}=0.81$ nM이다 (표 6 참고). 도 9에서 나타난 것과 같이, 테스트된 모든 Fab2는 C4 절단을 억제하는 것으로 나타났고 이때 IC_{50} 은 C3 전환효소 검정에서 얻어진 것과 유사하였다 (표 6 참고).

[0580] 비록 만남이 렉틴 경로의 공지된 활성화이지만, 래트 혈청 중의 항-만난 항체의 존재가 또한 고전적 경로를 활성화할 것이고 그로써 C4의 C1s-매개 절단에 의해 C4b를 생성할 것임이 이론적으로 가능하다. 그러나, 여러 개의 항-MASP-2 Fab2가 C4b 생성을 강력하게 억제하는 것으로 확인되었고 (>95%), 그로써 MASP-2 매개 C4 절단에 대한 이 검정의 특이성을 입증한다. C3과 같이 C4는 비정상적이고 매우 반응성인 티오에스테르 기를 그것의 구조의 일부분으로서 함유한다. 이 검정에서 MASP-2에 의해 C4가 절단될 때, C4b 상의 티오에스테르 기는 플라스틱 웰의 바닥에 고정된 거대분자 상의 하이드록실 또는 아미노 기와 에스테르 또는 아마이드 결합을 통해 공유 결합을 형성할 수 있음으로써, ELISA 검정에서 C4b의 검출을 용이하게 해준다.

[0581] 이들 연구는 C4 및 C3 전환효소 활성을 둘 다 기능적으로 차단하고, 그로써 렉틴 경로 활성화를 방지하는 래트 MASP-2 단백질에 대한 고친화성 FAB2의 생성을 분명하게 입증한다.

[0582] **실시예 11**

[0583] 이 실시예는 실시예 10에서 기술된 것과 같이 생성된 여러 차단 항-래트 MASP-2 Fab2 항체에 대한 에피토프 지도화를 기술한다.

[0584] 방법:

[0585] 도 10에서 나타난 것과 같이, 전부 N-말단 6X His 태그가 있는 다음의 단백질을 pED4 벡터를 사용하여 CHO 세포에서 발현시켰다:

[0586] 래트 MASP-2A, 활성 센터에서 세린을 알라닌으로 변경시킴으로써 (S613A) 비활성화된 전장 MASP-2 단백질;

[0587] 래트 MASP-2K, 자가활성화를 감소하도록 변경된 전장 MASP-2 단백질 (R424K);

[0588] CUBI-II, CUBI, EGF-유사 및 CUBI 도메인만을 함유한 래트 MASP-2의 N-말단 단편; 및

[0589] CUBI/EGF-유사, CUBI 및 EGF-유사 도메인만을 함유한 래트 MASP-2의 N-말단 단편.

[0590] 이들 단백질을 앞서 기술된 것과 같이 (Chen et al., *J. Biol. Chem.* 276:25894-02 (2001)), 배양 상층액으로부터 니켈-친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0591] CCP-II 및 래트 MASP-2의 세린 프로테아제 도메인을 함유한 C-말단 폴리펩타이드 (CCP-II-SP)를 대장균에서 pTrxFus (Invitrogen)를 사용하여 티오레독신 융합 단백질로서 발현시켰다. 단백질을 세포 용해물로부터 티오결합(Thiobond) 친화성 수지를 사용하여 정제하였다. 티오레독신 융합 파트너를 음성 대조군으로서 빈(empty) pTrxFus로부터 발현시켰다.

[0592] 모든 재조합 단백질을 TBS 완충액에 투석하였고 그것의 농도를 280 nm에서의 OD를 측정함으로써 측정하였다.

[0593] **도트 블롯 분석:**

[0594] 위에서 기술되고 도 10에 도시된 5개의 재조합 MASP-2 폴리펩타이드 (및 CCP-II-세린 프로테아제 폴리펩타이드에 대한 음성 대조군으로서 티오레독신 폴리펩타이드)의 연속 희석을 니트로셀룰로스 막 위에 스폿팅하였다. 스폿팅된 단백질의 양은 5배 단계에서 100 ng 내지 6.4 pg의 범위였다. 후기 실험에서, 스폿팅된 단백질의 양은 다시 5배 단계에서 50 ng에서 16 pg까지의 범위였다. 막을 TBS (차단 완충액) 중의 5% 탈지 분유로 차단한 후 차단 완충액 (5.0 mM Ca^{2+} 함유) 중의 1.0 μ g/ml 항-MASP-2 Fab2와 함께 인큐베이션하였다. 결합된 Fab2를 HRP-콘주게이션된 항-인간 Fab (AbD/Serotec; 1/10,000으로 희석됨) 및 ECL 검출 키트 (Amersham)를 사용하여 검출하였다. 한 개의 막을 양성 대조군으로서 다클론성 토끼-항 인간 MASP-2 Ab (described in Stover et al., *J Immunol* 163:6848-59 (1999))와 함께 인큐베이션하였다. 이 경우, 결합된 Ab를 HRP-콘주게이션된 염소

항-토끼 IgG (Dako; 1/2,000으로 희석됨)를 사용하여 검출하였다.

[0595] MASP-2 결합 검정

[0596] ELISA 플레이트를 탄산염 완충액 (pH 9.0) 중의 1.0 µg/웰의 재조합 MASP-2A 또는 CUBI-II 폴리펩타이드로 밤새 4℃에서 코팅하였다. 웰을 TBS 중의 1% BSA로 차단한 후, 5.0 mM Ca²⁺를 함유한 TBS 중의 항-MASP-2 Fab2의 연속 희석을 첨가하였다. 플레이트를 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. TBS/tween/Ca²⁺로 3회 세척한 후, TBS/ Ca²⁺에 1/10,000으로 희석된 HRP-콘주게이션된 항-인간 Fab (AbD/Serotec)를 첨가하고 플레이트를 다시 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 결합된 항체를 TMB 과산화효소 기질 키트 (Biorad)를 사용하여 검출하였다.

[0597] 결과:

[0598] Fab2와 다양한 MASP-2 폴리펩타이드과의 반응성을 입증하는 도트 블롯 분석의 결과를 아래의 표 7에 제공한다. 표 7에 제공된 수치는 최대 신호 강도의 대략 절반을 제공하기 위해 필요한 스폿팅된 단백질의 양을 나타낸다. 제시된 것과 같이, 모든 폴리펩타이드 (티오레독신 용합 파트너 단독은 제외됨)는 양성 대조군 Ab (토끼에서 발생된 다클론성 항-인간 MASP-2 혈청)에 의해 인식되었다.

표 7

도트 블롯 상에서의 다양한 재조합 래트 MASP-2 폴리펩타이드와의 반응성

Fab2 항체 #	MA SP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-유사	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 대조군	<0.032 ng	0.16 ng	0.16 ng	<0.032 ng	NR

[0600] 경로 활성을 제2 및 제3주 동안 관찰하였고, 항-MASP-2 MoAb를 투여하고 17일 후에 마우스에서 완전한 렉틴 경로 복원이 이루어졌다. NR = 반응 없음. 양성 대조군 항체는 토끼에서 발생된 다클론성 항-인간 MASP-2 혈청이다.

[0601] 모든 Fab2는 MASP-2A뿐만 아니라 MASP-2K와 반응하였다 (데이터 미제시). 대부분의 Fab2는 N-말단 단편이 아닌 CCPII-SP 폴리펩타이드를 인식하였다. 두 가지 예는 Fab2 #60 및 Fab2 #57이다. Fab2 #60은 MASP-2A 및 CUBI-II 단편을 인식하지만, CUBI/EGF-유사 폴리펩타이드 또는 CCPII-SP 폴리펩타이드를 인식하지 못하였고, 이것은 그것이 CUBI의 에피토프에 결합하거나, 또는 CUBI 및 EGF-유사 도메인에 걸쳐 있음을 시사한다. Fab2 #57은 MASP-2A를 인식하지만 테스트된 MASP-2 단편 중 어느 것도 인식하지 못하며, 이것은 이 Fab2가 CCP1의 에피토프를 인식하는 것을 나타낸다. Fab2 #40 및 #49는 완전한 MASP-2A에만 결합하였다. 도 11에 도시된 ELISA 결합 검정에서, Fab2 #60은 또한, 약간 더 낮은 외관상 친화도에도 불구하고 CUBI-II 폴리펩타이드에 결합하였다.

[0602] 이들 발견은 MASP-2 단백질의 다중 영역에 대한 독특한 차단 Fab2의 확인을 입증한다.

[0603] 실시예 12

- [0604] 이 실시예는 쥐과 신장 허혈/재관류 모델에서 MASP-2^{-/-} 마우스의 분석을 기술한다.
- [0605] **배경/근거:** 체온에서 신장의 허혈-재관류 (I/R) 손상은 저혈량성 쇼크, 신동맥 폐색 및 교차 클램핑 수술을 포함한 많은 임상 상태와 관련된다.
- [0606] 신장 허혈-재관류 (I/R)는 50%까지의 사망률과 관련된, 급성 신부전의 중요한 원인이다 (Levy et al., *JAMA* 275:1489-94, 1996; Thadhani et al., *N. Engl. J. Med.* 334:1448-60, 1996). 이식후 신부전은 신장 이식 후 흔하고 위협적인 합병증이다 (Nicholson et al., *Kidney Int.* 58:2585-91, 2000). 신장 I/R/ 손상에 대한 효과적인 치료법은 현재 이용 가능하지 않으며 혈액투석만이 유일한 이용 가능한 치료법이다. 신장 I/R/ 손상의 병태생리학은 복잡하다. 최근 연구는 보체의 렉틴 경로 활성화가 신장 I/R/ 손상의 발병에 중요한 역할을 할 수 있을 것임을 보였다 (deVries et al., *Am. J. Path.* 165:1677-88, 2004).
- [0607] **방법:**
- [0608] MASP-2^(-/-) 마우스를 **실시예 1**에서 기술한 것과 같이 생성하고 적어도 10 세대 동안 C57Bl/6과 역교배하였다. 22-25 g의 체중으로 측정된 6마리의 수컷 MASP-2^(-/-) 및 6마리의 야생형 (+/+) 마우스에 Hypnovel (6.64 mg/kg; Roche products Ltd, Welwyn Garden City, UK)의 복강내 주사를 투여하고, 계속해서 이소플루란 (Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK)을 흡입시켜 마취하였다. 이소플루란은 최소 간 독성을 가진 약한 흡입 마취제이고; 농도를 정확하게 산출할 수 있으며 장기간 마취 후에도 동물이 빠르게 회복되기 때문에 그것을 선택하였다. Hypnovel은 동물에서 신경이완진통(neuroleptanalgesia) 상태를 유발하고 그것은 더 적은 이소플루란이 투여될 필요가 있음을 의미하기 때문에 투여하였다. 따뜻한 패드를 동물의 아래에 배치하여 일정한 체온을 유지시켰다. 다음에, 중앙선 복부 절개를 수행하고 한 쌍의 견인기를 사용하여 체강을 개방 상태로 유지하였다. 결합 조직을 신장 정맥 및 좌우 양 신장의 동맥의 위 및 아래에서 제거하였고, 신장 욕경(renal pedicle)을 55분의 기간 동안 미세동맥류 클램프(microaneurysm clamp)를 적용함으로써 클램핑하였다. 이 허혈 기간은 초기에는 이 실험실에서 수행된 이전 연구를 기초로 하였다 (Zhou et al., *J. Clin. Invest.* 105:1363-71 (2000)). 더불어, 55분의 표준 허혈 시간을 허혈성 적정 후에 선택하였고 55분이 또한 가역적이고, 5% 미만으로 낮은 사망률을 가진 일정한 손상을 제공하는 것으로 나타났다. 폐색 후에, 0.4 ml의 따뜻한 식염수 (37°C)를 복강에 배치한 후 허혈 기간 동안 복부를 단았다. 미세동맥류 클램프를 제거한 후, 혈액이 신장으로 다시 흐르는 것을 나타내는 색의 변화가 있을 때까지 신장을 관찰하였다. 추가로 0.4 ml의 따뜻한 식염수를 복강에 배치하고 개구부를 봉합한 후, 동물을 우리로 복귀시켰다. 클램프를 제거한 후 24시간 췌에 꼬리 혈액 샘플을 채혈하고, 48시간 췌에 마우스를 희생시키고 추가의 혈액 샘플을 수집하였다.
- [0609] **신장 손상의 평가:** 6마리의 수컷 MASP-2^(-/-) 및 6마리의 WT (+/+) 마우스에서 재관류 후 24시간 및 48시간 후에 신장 기능을 평가하였다. 혈액 크레아티닌 측정을 질량 분광분석에 의해 측정하였는데, 그것은 신장 기능의 재생성 지수를 제공한다 (민감도 < 1.0 $\mu\text{mol/L}$). **도 12**는 재관류 후 24시간 및 48시간 췌의 야생형 C57Bl/6 대조군 및 MASP-2^(-/-)에 대한 혈액 요소 질소 제거를 그래프로 도시한다. **도 12**에서 나타난 것과 같이, MASP-2^(-/-) 마우스는 24시간 및 48시간 췌에 야생형 대조군 마우스와 비교하여 혈액 요소의 양의 상당한 감소를 나타냈고, 이것은 허혈 재관류 손상 모델에서 신장 손상으로부터 보호 기능 효과를 나타낸다.
- [0610] 전체적으로, 증가된 혈액 요소를 외과적 수술 및 허혈 손상 후 24시간 및 48시간 췌에 WT (+/+) 및 MASP-2^(-/-) 마우스에서 모두 볼 수 있었다. 비-허혈 WT (+/+) 수술 동물에서의 혈액 요소의 수준은 별도로 5.8 mmol/L인 것으로 측정되었다. **도 12**에 제시된 데이터 외에, 한 마리의 MASP-2^(-/-) 동물이 허혈 손상으로부터 새롭게 완전히 보호된 것을 보였는데, 24시간 및 48시간 췌에 각각 6.8 및 9.6 mmol/L의 값을 보였다. 이 동물은 잠재적 열외로서 그룹 분석으로부터 배제하였는데, 허혈 손상이 존재하지 않았다. 그러므로, **도 12**에 도시된 최종 분석은 5마리의 MASP-2^(-/-) 마우스 및 6마리의 WT (+/+) 마우스를 포함하였고 혈액 요소의 통계적으로 유의미한 감소를 MASP-2^(-/-) 마우스에서 24시간 및 48시간 췌에 볼 수 있었다 (학생 t-테스트 $p < 0.05$). 이들 발견은 MASP-2 활성의 억제자가 허혈 손상으로 인한 신장 손상으로부터 보호적 또는 치료적 효과를 가질 것으로 예상될 수 있음을 나타낸다.
- [0611] **실시예 13**
- [0612] 이 실시예는 쥐과 황반 변성 모델에서 MASP-2^{-/-}의 결과를 기술한다.
- [0613] **배경/근거:** 연령-관련 황반 변성 (AMD)은 산업화된 세계에서 55세 이후의 실명의 주된 원인이다. AMD는 2가지 주요 형태로 발생한다: 신생혈관성 (습성) AMD 및 위축성 (건성) AMD. AMD가 있는 개체의 단지 약 20%가 습성 형태를 발병함에도, 신생혈관성 (습성) 형태는 AMD와 관련된 중증의 시력 상실의 90%를 차지한다. AMD의 임상적

특징으로는 다중 드루젠(multiple drusen), 지도모양 위축(geographic atrophy), 및 맥락막 혈관신생(choroidal neovascularization, CNV)을 들 수 있다. 2004년 12월에, FDA는 AMD의 습성(신생혈관성) 형태의 치료를 위해, 혈관 내피 성장 인자(VEGF)를 특이적으로 표적화하여 그것의 효과를 차단하는 새로운 부류의 안과 약물인 마쿠젠(Macugen)(페갑타닙)을 승인하였다(Ng et al., *Nat Rev. Drug Discov* 5:123-32 (2006)). 비록 마쿠젠이 AMD 환자의 하위그룹에 대해 전도유망한 새로운 치료적 선택권을 나타내지만, 이 복잡한 질환에 대한 추가 치료제를 개발해야 할 절실한 필요성이 남아 있다. 다수의, 독립적인 라인의 연구조사는 AMD의 발병에 보체 활성화에 대한 중심 역할을 암시한다. AMD의 가장 중증 형태인 맥락막 혈관신생(CNV)의 발병은 보체 경로의 활성화를 포함할 수 있다.

[0614] 25년 전에, Ryan은 동물에서 CNV의 레이저-유도 손상 모델을 기술하였다(Ryan, S.J., *Tr. Am. Opth. Soc. LXXVII*:707-745, 1979). 모델은 처음에 레서스 원숭이를 사용하여 개발되었지만, 그 이후에 동일한 기술을 사용하여 마우스를 포함한 다양한 연구 동물에서 CNV의 유사한 모델을 개발하였다(Tobe et al., *Am. J. Pathol.* 153:1641-46, 1998). 이 모델에서, 레이저 광응고(laser photocoagulation)를 사용하여 브루흐 막(Bruch's membrane)을 파괴하고, 그 결과 CNV-유사 막이 형성된다. 레이저-유도 모델은 인간 상태의 많은 중요한 특징을 포착한다(최근 리뷰에 대해서는 Ambati et al., *Survey Ophthalmology* 48:257-293, 2003 참고). 레이저-유도 마우스 모델은 이제 잘 확립되었고, 대다수의, 계속 증가하는 수의 연구 프로젝트에서 실험 기초로서 사용된다. 일반적으로 레이저-유도 모델은 이 모델을 사용하는 발병 및 약물 억제의 전임상 연구는 인간의 CNV와 관련이 있는 인간의 CNV와 충분한 생물학적 유사성을 공유한다고 받아들여진다.

[0615] **방법:**

[0616] MASP-2-/- 마우스를 실시예 1에서 기술한 것과 같이 생성하고 적어도 10 세대 동안 C57B1/6과 역교배하였다. 본 연구는 MASP-2 (-/-) 및 MASP-2 (+/+) 수컷 마우스를, 레이저-유도 CNV의 부피에 초점을 맞춘 신생혈관성 AMD의 가속화된 모델인 레이저-유도 CNV 과정에서, 조직 손상의 척도로서 주사 레이저 공초점 현미경 검사 및 레이저 손상 후 ELISA에 의한 망막 색소 상피(RPE)/맥락막에서의, CNV에 연루된 강력한 혈관신생 인자인 VEGF의 수준의 측정에 의해 평가했을 때의 결과를 비교하였다.

[0617] **맥락막 혈관신생(CNV)의 유도:** 레이저 광응고(532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 μ m; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA)를 약물 그룹 배정에 대해 마스킹된 단일 개체에 의해 0일에 임의의 동물의 양 눈에 대해 수행하였다. 레이저 스폿을 슬릿 램프 전달 시스템 및 접촉 렌즈로서 커버슬립을 사용하여 표준화된 방식으로 시신경 주변에 적용하였다. 레이저 손상의 형태학적 증점은 브루흐 막의 파괴와 상관관계가 있는 것으로 여겨지는 신호인 공동현상(cavitation) 버블의 출현이었다. 상세한 방법 및 평가된 증점은 다음과 같다.

[0618] **플루오레세인 혈관조영술:** 레이저 광응고 후 1주 후에 플루오레세인 혈관조영술을 카메라 및 영상 시스템(TRC 50 1A 카메라; ImageNet 2.01 시스템; Topcon, Paramus, NJ)으로 수행하였다. 사진을 0.1 ml의 2.5% 플루오레세인 나트륨을 복강내 주사한 후 안저 카메라 렌즈와 접촉된 20-D 렌즈로 촬영하였다. 레이저 광응고 또는 혈관조영술에 관여하지 않은 망막 전문가가 마스킹된 방식으로 한 번에 플루오레세인 조영도를 평가하였다.

[0619] **맥락막 혈관신생(CNV)의 부피:** 레이저 손상 후 1주 후에, 눈을 적출하여 4°C에서 4% 파라포름알데하이드에 30분 동안 고정시켰다. 냉안배(eye cup)를 전방 부분을 제거하고 PBS로 3회 세척한 후, 탈수하고 메탄올 시리즈를 통해 재수화함으로써 얻었다. 완충액(1% 소 혈청알부민 및 0.5% Triton X-100을 함유한 PBS)으로 30분 동안 실온에서 2회 차단한 후, 냉안배를 0.2% BSA 및 0.1% Triton X-100을 함유한 PBS로 희석된, 내피 세포 표면 상의 말단 β -D-갈락토스 잔기와 결합하여 쥐과 혈관구조를 선택적으로 표지화하는 0.5% FITC-아이소렉틴 B4(Vector laboratories, Burlingame, CA)와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 0.1% Triton X-100을 함유한 PBS로 2회 세척한 후, 신경감각 망막은 시신경으로부터 부드럽게 분리 및 제거되었다. 4개의 이완된 방사상 절개를 만들었고, 나머지 RPE-맥락막-공막 복합체를 변색방지 매체(Immu-Mount Vectashield 장착 매체; Vector Laboratories)에 평평하게 장착하고 커버슬립을 덮었다.

[0620] 평평하게 장착된 것을 주사 레이저 공초점 현미경(TCS SP; Leica, Heidelberg, Germany)으로 조사하였다. 청색 아르곤 파장(488 nm)으로 여기시키고 515 nm와 545 nm 사이에서 방출을 포착함으로써 혈관을 시각화하였다. 40X 오일 침지 대물렌즈를 모든 영상 연구에 사용하였다. 수평 광학 섹션(1 μ m 단계)을 RPE-맥락막-공막 복합체 표면으로부터 얻었다. 병변에 연결되어 있는 주변의 맥락막 혈관 네트워크를 확인할 수 있는 가장 깊은 초점 평면을 병변의 바닥인 것으로 판단하였다. 레이저-표적화된 영역 및 이 참조 평면의 표면에 있는 임의의 혈관을 CNV로서 판단하였다. 각 섹션의 이미지를 디지털로 보관하였다. CNV-관련 형광 영역을 현미경 소프트웨어(TCS SP; Leica)를 사용하여 컴퓨터화된 이미지 분석에 의해 측정하였다. 각 수평 섹션에서 전체 형광 영역의

합을 CNV의 부피의 지수로서 사용하였다. 영상을 치료 그룹 배정에 대해 마스킹된 조작자에 의해 수행하였다.

[0621] 각각의 레이저 병변이 CNV로 발달될 가능성이 그것이 속한 그룹 (마우스, 눈, 및 레이저 스폿)에 의해 영향을 받기 때문에, 평균 병변 부피를 선형 혼합 모델을 사용하여 스플릿 플롯 반복 측정 설계와 비교하였다. 전체 플롯 인자는 동물이 속하는 유전자 그룹이었던 반면, 스플릿 플롯 인자는 눈이었다. 통계적 유의성을 0.05 수준에서 측정하였다. 평균의 사후 비교는 다중 비교를 위한 본페로니 조정(Bonferroni adjustment)으로 구성되었다.

[0622] **VEGF ELISA.** 12개의 레이저 스폿에 의한 손상 후 3일 후에, RPE-맥락막 복합체를 얼음 상의 용해 완충액 (프로테아제 억제제를 포함한 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)에서 15분 동안 초음파 처리를 하였다. 상층액 중의 VEGF 단백질 수준을 450 내지 570 nm (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 모든 스플라이스 변종을 인식하고, 총 단백질에 대해 표준화된 ELISA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN)에 의해 측정하였다. 중복 측정을 마스킹된 방식으로 광응고, 영상, 또는 조영술에 관여하지 않은 조작자에 의해 수행하였다. VEGF 수를 적어도 3회의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM으로서 표시하고 만-휘트니 U 테스트(Mann-Whitney U test)를 사용하여 비교하였다. 귀무 가설(null hypothesis)은 $P < 0.05$ 에서 거부되었다.

[0623] **결과:**

[0624] **VEGF 수준의 평가:**

[0625] **도 13A**는 0일에 C57B16 야생형 및 MASP-2(-/-) 마우스로부터 분리된 RPE-맥락막 복합체에서의 VEGF 단백질 수준을 그래프로 도시한다. **도 13A**에서 나타난 것과 같이, VEGF 수준의 평가는 C57b1 야생형 대조군 마우스 대비 MASP-2 (-/-) 마우스에서의 VEGF에 대한 기준선 수준의 감소를 나타낸다. **도 13B**는 레이저 유도 손상 후 3일째에 측정된 VEGF 단백질 수준을 그래프로 도시한다. **도 13B**에서 나타난 것과 같이, VEGF 수준은 레이저 유도 손상 후 3일 후에 야생형 (+/+) 마우스에서 상당히 증가하였고, 이것은 공개된 연구와 일치하였다 (Nozaki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:2328-33 (2006)). 그러나, 놀랍게도 매우 낮은 수준의 VEGF를 MASP-2 (-/-) 마우스에서 볼 수 있었다.

[0626] **맥락막 혈관신생 (CNV)의 평가:**

[0627] 레이저 유도된 황반 변성 후에 VEGF 수준의 감소 외에, CNV 영역을 레이저 손상 전과 후에 측정하였다. **도 14**는 레이저 유도 손상 후 7일째에 C57b1 야생형 마우스 및 MASP-2(-/-) 마우스에서 측정된 CNV 부피를 그래프로 도시한다. **도 14**에서 나타난 것과 같이, MASP-2 (-/-) 마우스는 레이저 유도 손상 후에 야생형 대조군 마우스와 비교하여 7일째에 CNV 영역의 약 30% 감소를 나타냈다.

[0628] 이들 발견은 야생형 (+/+) 대조군 대비 MASP (-/-) 마우스에서 볼 수 있는 것과 같이 VEGF 및 CNV의 감소 및 MASP-2의 억제제로의 차단이 황반 변성의 치료에서 예방적 또는 치료적 효과를 가질 수 있을 것임을 나타낸다.

[0629] **실시예 14**

[0630] 이 실시예는 트롬빈 활성화가 생리적 조건 하에서 렉틴 경로 활성화 후에 일어날 수 있는 것을 입증하고, MASP-2 개입의 정도를 입증한다. 정상적인 래트 혈청에서, 렉틴 경로의 활성화는 보체 활성화 (C4 침착으로서 평가됨)와 동시에 트롬빈 활성화 (트롬빈 침착으로서 평가됨)로 이어진다. **도 15A** 및 **15B**에서 알 수 있는 것과 같이, 이 시스템에서 트롬빈 활성화는 MASP-2 차단 항체 (Fab2 방식)에 의해 억제되고, 보체 활성화 (**도 15A**)에 대한 것과 평행한 억제 농도-반응 곡선 (**도 15B**)을 나타낸다. 이들 데이터는 렉틴 경로의 활성화가 외상에 따라 발생함에 따라 전적으로 MASP-2에 의존하는 과정으로 보체 및 응고 시스템 둘 다의 활성화로 이어질 것임을 나타낸다. 추론하면, MASP2 차단 항체는 주요 외상 원인에서 사망으로 이어지는 특징 중 하나인 과도한 전신성 응고, 예컨대, 파종성 혈관내 응고의 경우를 완화시키는 데 효과적인 것으로 증명될 수 있다.

[0631] **실시예 15**

[0632] 이 실시예는 파종성 혈관내 응고 ("DIC")에서의 렉틴 경로의 역할을 평가하기 위하여 MASP-2 -/- 결핍 및 MASP-2 +/+ 충분한 마우스에서 DIC의 국지화된 슈바르츠만 반응 모델을 사용하여 생성된 결과를 제공한다.

[0633] **배경/근거:**

[0634] 위에서 기술된 것과 같이, MASP-2의 차단은 렉틴 경로 활성화를 억제하고 아나필라톡신 C3a 및 C5a 둘 다의 생성을 감소시킨다. C3a 아나필라톡신은 시험관내에서 강력한 혈소판 응집요인인 것으로 나타날 수 있지만, 생체 내에서의 그것의 개입은 잘 정의되어 있지 않고 상처 수복에서 혈소판 물질 및 플라스민의 방출은 단지 이차적

으로 보체 C3을 포함할 수 있다. 이 실시예에서, C3 활성화의 연장된 상승이 파종성 혈관내 응고를 생성하기 위해 필요한지를 설명하기 위하여 렉틴 경로의 역할을 MASP-2 (-/-) 및 WT (+/+) 마우스에서 분석하였다.

[0635] **방법:**

[0636] 이 연구에서 사용된 MASP-2 (-/-) 마우스를 **실시예 1**에서 기술한 것과 같이 생성하고 적어도 10 세대 동안 C57B1/6과 역교배하였다.

[0637] 국지화된 슈바르츠만 반응 모델을 이 실험에서 사용하였다. 국지화된 슈바르츠만 반응 (LSR)은 선천성 면역 체계의 세포성 및 체액성 요소로부터 잘 특성화된 기여를 포함한 리포다당 (LPS)-유도 반응이다. 보체에 대한 LSR의 의존성은 잘 확립되어 있다 (Polak, L., et al., *Nature* 223:738-739 (1969); Fong J.S. et al., *J Exp Med* 134:642-655 (1971)). LSR 모델에서, 마우스를 TNF 알파 (500 ng, 음낭내)로 4시간 동안 프라임한 후, 마우스를 마취시키고 고환거근(cremaster muscle)의 생체내 현미경 검사를 준비하였다. 혈류가 양호한 (1-4 mm/초) 모세혈관 뒤 세정맥 (15-60 μ m 직경)의 네트워크를 관찰을 위해 선택하였다. 동물을 호중구, 또는 혈소판을 선택적으로 표지하기 위하여 형광 항체로 처리하였다. 혈관 네트워크를 순차적으로 스캔하고 모든 혈관의 이미지를 나중의 분석을 위해 디지털로 기록하였다. 미세혈관의 기준 상태를 기록한 후, 마우스에게 LPS (100 μ g)를 단독으로 또는 아래에서 열거하는 작용제와 함께 단일 정맥내 주사로 제공하였다. 그런 후에 동일한 혈관 네트워크를 1시간 동안 10분마다 스캔하였다. 발색단의 특이적 축적을 배경 형광을 뺀으로써 확인하고 이미지의 한계값을 설정함으로써 향상시켰다. 슈바르츠만 반응의 기본 측정은 집합 데이터였다.

[0638] 연구는 공지의 보체 경로 고갈제, 코브라 독 인자 (CVF), 또는 말단 경로 억제제 (C5aR 길항물질)에 노출된 MASP-2 +/- 충분한, 또는 야생형 마우스를 비교하였다. 결과 (**도 16A**)는 CVF뿐만 아니라 C5aR 길항물질이 모두 미세혈관에서의 응집의 출현을 방지했음을 입증한다. 더불어, MASP-2 -/- 결핍 마우스 (**도 16B**)도 또한 국지화된 슈바르츠만 반응의 완전한 억제를 입증하였고, 이것은 렉틴 경로 개입을 지지한다. 이들 결과는 DIC 발생에서 MASP-2의 역할을 분명하게 입증하며 DIC의 치료 및 예방을 위한 MASP-2 억제제의 사용을 지지한다.

[0639] **실시예 16**

[0640] 이 실시예는 쥐과 신장 이식 모델에서 MASP-2 (-/-) 마우스의 분석을 기술한다.

[0641] **배경/근거:**

[0642] 신장 이식의 기능적 결과에서 MASP-2의 역할을 마우스 모델을 사용하여 평가하였다.

[0643] **방법:**

[0644] 신장 이식의 기능적 결과를 한쪽 신장이 절제된 수령체 마우스, 6마리의 WT (+/+) 이식 수령체 (B6), 및 6마리의 MASP-2 (-/-) 이식 수령체로의 단일 신장 동종이식을 사용하여 평가하였다. 이식된 신장의 기능을 평가하기 위하여, 남아 있는 천연 신장을 이식 후 5일 후에 수령체로부터 제거하고, 신장 기능을 24시간 후에 혈액 요소 질소 (bun) 수준의 측정에 의해 평가하였다.

[0645] **결과:**

[0646] **도 17**은 WT (+/+) 수령체 및 MASP-2 (-/-) 수령체에서 신장 이식 후 6일 째에 신장의 혈액 요소 질소 (BUN) 수준을 그래프로 도시한다. **도 17**에서 나타난 것과 같이, 신부전을 나타내는, 강력하게 상승된 BUN 수준을 WT (+/+) (B6) 이식 수령체 (마우스에서 정상적인 BUN 수준은 < 5 mM)에서 관찰하였다. 대조적으로, MASP-2 (-/-) 동종이식 수령 마우스는 실질적으로 더 낮은 BUN 수준을 보였고, 이것은 개선된 신장 기능을 시사한다. 이들 결과는 WT (+/+) 신장 도너로부터의 이식편을 사용하여 얻어진 것이 주지되며, 이것은 이식 수령체에서 기능적 렉틴 경로 단독의 부재가 치료 이익을 달성하기에 충분한 것을 시사한다.

[0647] 함께 고려하면, 이들 결과는 MASP-2 억제를 통한 렉틴 경로의 일시적인 억제가 사망률 및 신장 이식에서 지연된 생착 기능을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 접근법이 다른 이식 환경에서 유용할 가능성이 있음을 나타낸다.

[0648] **실시예 17**

[0649] 이 실시예는 MASP-2 (-/-) 마우스가 쥐과 다균성 패혈성 복막염(Polymicrobial Septic Peritonitis) 모델에서 패혈성 쇼크에 대해 내성인 것을 입증한다.

[0650] **배경/근거:**

[0651] 감염에서의 MASP-2 (-/-)의 잠재적 영향을 평가하기 위하여, 다균성 패혈성 복막염의 모델인 맹장 결찰 및 천공

(CLP) 모델을 평가하였다. 이 모델은 인간 패혈성 복막염의 과정을 가장 정확하게 모방하는 것으로 여겨진다. 맹장 결찰 및 천공 (CLP) 모델은 맹장이 결찰되고 바늘에 의해 천공되어, 박테리아의 복강으로의 지속적인 누출로 이어져 림프 누출을 통해 혈액에 도달한 후 모든 복주 장기로 분포되어 다중 장기 부전 및 패혈성 쇼크로 이어지는 모델이다 (Eskandari et al., *J Immunol* 148(9):2724-2730 (1992)). CLP 모델은 환자에게서 관찰되는 패혈증 과정을 모방하며 초기 고염증 반응을 유도한 후 뚜렷한 저염증 단계가 이어진다. 이 단계 동안, 동물은 박테리아 도전에 매우 민감하다 (Wichterman et al., *J. Surg. Res.* 29(2):189-201 (1980)).

[0652] 방법:

[0653] 맹장 결찰 및 천공 CLP) 모델의 다균성 감염의 사망률을 WT (+/+) (n=18마리) 및 MASP-2 (-/-) (n=16마리) 마우스에서 측정하였다. 간단하게 기술하자면, MASP-2 결핍 마우스 및 그것들의 야생형 한배 새끼를 마취하고 맹장을 밖으로 꺼내어 말단부 위의 30%를 결찰하였다. 그런 후, 맹장을 0.4 mm 직경의 바늘로 한 번 천공하였다. 그런 다음 맹장을 복강에 재위치시키고 피부를 클램프로 닫았다. CLP를 받은 마우스의 생존을 CLP 후 14일 동안 모니터링하였다. CLP 후 16시간 후에 마우스의 복강 누출물을 수집하여 박테리아 로드를 측정하였다. 복강 누출물의 연속 희석을 PBS로 제조하고 Mueller Hinton 플레이트에 접종하고 계속해서 37°C에서 혐기 조건 하에 24시간 동안 인큐베이션한 후 박테리아 로드를 측정하였다.

[0654] 박테리아 감염에 대한 TNF-알파 사이토카인 반응을 또한 WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에서 폐 및 비장에서 CLP 후 16시간 후에 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응 (qRT-PCR)을 통해 측정하였다. WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에서 CLP 후 16시간 후 TNF-알파의 혈청 수준을 또한 샌드위치 ELISA에 의해 정량화하였다.

[0655] 결과:

[0656] 도 18은 CLP 수술 후 경과일의 함수로서 CLP 처리된 동물의 백분율 생존을 그래프로 도시한다. 도 18에서 나타난 것과 같이, MASP-2 (-/-) 마우스에서 렉틴 경로 결핍은 WT (+/+) 마우스와 비교하여 맹장 결찰 및 천공 모델을 사용한 다균성 감염 후에 마우스의 사망률을 증가시키지 않는다. 그러나, 도 19에서 나타난 것과 같이, MASP-2 (-/-) 마우스는 그들의 WT (+/+) 한배 새끼와 비교했을 때 CLP 후에 복강 누출물에서 상당히 더 높은 박테리아 로드 (박테리아 수에서 대략 1000배 증가)를 보였다. 이들 결과는 MASP-2 (-/-) 결핍 마우스가 패혈성 쇼크에 대해 내성인 것을 나타낸다. 이 모델에서 MASP-2 결핍 마우스의 감소된 박테리아 제거는, C3 침착이 MASP-2 의존적인 것으로 입증된 것과 같이, 손상된 C3b 매개 식세포작용으로 인한 것일 수 있다.

[0657] 박테리아 감염에 대한 TNF-알파 사이토카인 반응은 WT (+/+) 대조군과 비교하여 MASP-2 (-/-) 마우스에서 상승하지 않은 것으로 측정되었다 (테이터 미제시). 또한 MASP-2 (-/-) 마우스와는 대조적으로 CLP 후 16시간 후 WT (+/+) 마우스에서 TNF-알파의 상당히 더 높은 혈청 농도가 있었고, 여기서 TNF-알파의 혈청 수준은 건의 변하기 않고 유지된 것으로 측정되었다. 이들 결과는 패혈성 상태에 대한 강력한 염증 반응이 MASP-2 (-/-) 마우스에서 누그러졌고 동물이 더 높은 박테리아 수의 존재 하에서 생존할 수 있게 되었음을 시사한다.

[0658] 함께 고려하면, 이들 결과는 패혈증의 경우에 렉틴 경로 보체 활성화의 잠재적인 유해한 효과 및 압도적인 패혈증 환자에서 증가하는 사망률을 입증한다. 이들 결과는 추가로 MASP-2 결핍이 염증성 면역 반응을 조절하고 패혈증 동안 염증 매개체의 바뀐 수준을 감소시키는 것을 입증한다. 그러므로, MASP-2에 대한 억제제 단클론성 항체의 투여에 의한 MASP-2 (-/-)의 억제가 패혈성 쇼크를 앓고 있는 대상체에서의 염증 반응을 감소시키기에 효과적일 것이라고 여겨진다.

[0659] 실시예 18

[0660] 이 실시예는 쥐과 비강 감염 모델에서 MASP-2 (-/-) 마우스의 분석을 기술한다.

[0661] 배경/근거:

[0662] 녹농균은 특히 면역 손상된 개체에서 광범위한 감염을 유발하는 그람 음성 기회성 인간 박테리아 병원체이다. 그것은 획득된 병원성 감염, 특히 병원에서 획득된 폐렴의 주요 원천이다. 또한 그것은 낭포성 섬유증 (CF) 환자의 상당한 이환률 및 사망률의 원인이 된다. 녹농균(*P. aeruginosa*) 폐 감염은 강력한 호중구 모집 및 광범위한 조직 손상을 초래하는 상당한 폐 염증을 특징으로 한다 (Palanki M.S. et al., *J. Med. Chem* 51:1546-1559 (2008)).

[0663] 이 실시예에서, 연구는 MASP-2 (-/-) 마우스에서 렉틴 경로의 제거가 박테리아 감염에 대한 마우스의 민감성을 증가시키는지를 측정하기 위해 수행되었다.

- [0664] **방법:**
- [0665] 22마리의 WT (+/+) 마우스, 22마리의 MASP-2 (-/-) 마우스, 및 11마리의 C3 (-/-) 마우스를 녹농균 박테리아 스트레인의 비강내 투여로 도전시켰다. 마우스를 감염 후 6일 동안 모니터링하였고 카플란-마이어 플롯을 구성하여 생존율을 나타냈다.
- [0666] **결과:**
- [0667] 도 20은 감염 후 6일 후의 WT (+/+), MASP-2 (-/-) 또는 C3 (-/-) 마우스의 생존율의 카플란-마이어 플롯이다. 도 20에서 나타난 것과 같이, MASP-2 (-/-) 마우스 대비 WT (+/+) 마우스에서 차이는 관찰되지 않았다. 그러나, C3 (-/-) 마우스에서 고전적 (C1q) 경로의 제거는 박테리아 감염에 대한 중증의 민감성을 초래하였다. 이들 결과는 MASP-2 억제제가 박테리아 감염에 대한 민감성을 증가시키지 않는 것을 입증하며, 고전적 보체 경로를 사용하여 환자가 감염에 대항하는 능력을 손상시키지 않으면서 MASP-2를 억제함으로써 외상 환자에서 바람직하지 못한 염증 합병증을 감소시키는 것이 가능한 것을 나타낸다.
- [0668] **실시예 19**
- [0669] 이 실시예는 실시예 10에서 기술된 것과 같이 확인된 대표적인 고친화성 항-MASP-2 Fab2 항체의 약력학적 분석을 기술한다.
- [0670] **배경/근거:**
- [0671] 실시예 10에서 기술된 것과 같이, 래트 렉틴 경로를 차단하는 고친화성 항체를 확인하기 위하여, 래트 MASP-2 단백질을 활용하여 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하였다. 이 라이브러리를 높은 면역학적 다양성을 제공하기 위해 설계하였고 전체적으로 인간 면역글로불린 유전자 서열을 사용하여 구성하였다. 실시예 10에서 기술된 것과 같이, ELISA 스크리닝에 의해 래트 MASP-2 단백질에 고친화성으로 결합된 대략 250개의 개별 파지 클론을 확인하였다. 이들 클론의 서열분석으로 50개의 독특한 MASP-2 항체 암호화 파지를 확인하였다. 이들 클론으로부터 Fab2 단백질을 발현시키고, 정제하고 MASP-2 결합 친화성 및 렉틴 보체 경로 기능적 억제에 대해 분석하였다.
- [0672] 실시예 10의 표 6에서 나타난 것과 같이, 이 분석의 결과로서 기능적 차단 활성을 가진 17개의 항-MASP-2 Fab2를 확인하였다 (차단 항체에 대해 34% 적중률). Fab2에 의한 렉틴 보체 경로의 기능적 억제는 MASP-2에 의한 C4 절단의 직접적인 척도인 C4 침착의 수준에서 나타났다. 중요하게, 억제는 C3 전환효소 활성이 평가되었을 때 똑같이 분명하였고, 이것은 렉틴 보체 경로의 기능적 차단을 입증한다. 실시예 10에서 기술된 것과 같이 확인된 17개의 MASP-2 차단 Fab2는 10 nM 이하의 IC₅₀ 값으로 C3 전환효소 형성을 강력하게 억제한다. 확인된 17개의 Fab2 중 8개가 나노몰 이하 범위의 IC₅₀ 값을 가진다. 나아가, 17개의 MASP-2 차단 Fab2는 전부 도 8A-C에서 나타내고, 실시예 10의 표 6에서 요약한 것과 같이, 렉틴 경로 C3 전환효소 검정에서 C3 전환효소 형성의 본질적으로 완전한 억제를 제공하였다. 더욱이, 표 6에서 제시된 17개의 차단 항-MASP-2 Fab2는 C3b 생성을 강력하게 억제하며 (>95%), 그로써 렉틴 경로 C3 전환효소에 대한 이 검정의 특이성을 입증한다.
- [0673] 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 전장 항체 아이소타입 변이체를 Fab2 #11로부터 유도하였다. 이 실시예는 약력학적 파라미터에 대한 이들 아이소타입의 생체내 특성화를 기술한다.
- [0674] **방법:**
- [0675] 실시예 10에서 기술된 것과 같이, 래트 MASP-2 단백질을 활용하여 Fab 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하고, 그것으로부터 Fab2 #11을 확인하였다. 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 전장 항체 아이소타입 변이체를 Fab2 #11로부터 유도하였다. 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 전장 항체 아이소타입을 둘 다 다음과 같이 약력학적 파라미터에 대해 생체내에서 특성화하였다.
- [0676] **마우스에서의 생체내 연구:**
- [0677] 생체내에서 혈장 렉틴 경로 활성에 미치는 항-MASP-2 항체 투약의 영향을 조사하기 위하여 약력학적 연구를 마우스에서 수행하였다. 이 연구에서, C4 침착을 0.3 mg/kg 또는 1.0 mg/kg의 마우스 항-MASP-2 MoAb (Fab2 #11로부터 유래된 마우스 IgG2a 전장 항체 아이소타입)의 피하 (sc) 및 복강내 (ip) 투여 후 다양한 시점에서 렉틴 경로 검정으로 생체외에서 측정하였다.
- [0678] 도 21은 0.3 mg/kg 또는 1.0 mg/kg의 마우스 항-MASP-2 MoAb의 투여 후 다양한 시점에서 마우스 (n=3마리 마우스

스/그룹)로부터 취한 회석되지 않은 혈청 샘플에서 생체외에서 측정된 렉틴 경로 특이적 C4b 침착을 그래프로 도시한다. 항체 투여 전에 수집된 마우스로부터의 혈청 샘플은 음성 대조군 (100% 활성)으로서 작용하였고, 시험관내에서 100 nM의 동일한 차단 항-MASP-2 항체가 보충된 혈청은 양성 대조군 (0% 활성)으로서 사용하였다.

[0679] 도 21에 도시된 결과는 1.0 mg/kg 용량의 마우스 항-MASP-2 MoAb의 피하 투여 후 C4b 침착의 신속하고 완전한 억제에 입증한다. C4b 침착의 부분적인 억제는 0.3 mg/kg 용량의 마우스 항-MASP-2 MoAb의 피하 투여 후에 볼 수 있었다.

[0680] 렉틴 경로 회복의 시간 경과를 마우스에서 0.6 mg/kg으로 마우스 항-MASP-2 MoAb의 단일 복강내 투여 후에 3주 동안 이어졌다. 도 22에서 나타난 것과 같이, 렉틴 경로 활성의 급격한 하락이 항체 투여 후에 발생한 후 완전한 렉틴 경로 억제가 복강내 투여 후 약 7일 동안 지속되었다. 렉틴의 느린 복원.

[0681] 이들 결과는 Fab2 #11로부터 유래된 마우스 항-MASP-2 Moab가 전신적으로 전달될 때 용량-반응성 방식으로 마우스의 렉틴 경로를 억제하는 것을 입증한다.

[0682] **실시예 20**

[0683] 이 실시예는 연령-관련 황반 변성에 대한 마우스 모델에서의 효능에 대해 Fab2 #11로부터 유래된 마우스 항-MASP-2 Moab의 분석을 기술한다.

[0684] **배경/근거:**

[0685] 실시예 10에서 기술된 것과 같이, 래트 MASP-2 단백질을 활용하여 Fab 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하고, 그것으로부터 기능적으로 활성인 항체로서 Fab2 #11을 생성하였다. 마우스 IgG2a 아이소타입의 전장 항-MASP-2 항체를 실시예 19에서 기술된 것과 같이 약력학적 파라미터에 대해 특성화하였다. 이 실시예에서, Fab2 #11로부터 유래된 마우스 항-MASP-2 전장 항체를 Bora P.S. et al, *J Immunol* 174:491-497 (2005)에서 기술된, 연령-관련 황반 변성 (AMD)의 마우스 모델에서 분석하였다.

[0686] **방법:**

[0687] 실시예 19에서 기술된 것과 같이 Fab2 #11로부터 유래된 마우스 IgG2a 전장 항-MASP-2 항체 아이소타입을, 다음과 같은 변형을 포함하여 실시예 13에서 기술된 것과 같이 연령-관련 황반 변성 (AMD)의 마우스 모델에서 테스트하였다.

[0688] **마우스-항-MASP-2 MoAb의 투여**

[0689] 아이소타입 대조군 MoAb 치료와 함께 2가지 상이한 용량 (0.3 mg/kg 및 1.0 mg/kg)의 마우스 항-MASP-2 MoAb를 CNV 유도 전 16시간 전에 WT (+/+) 마우스 (n= 그룹당 8마리 마우스)에 복강내 주사하였다.

[0690] **맥락막 혈관신생 (CNV)의 유도**

[0691] 맥락막 혈관신생 (CNV)의 유도 및 CNV의 부피의 측정을 실시예 13에서 기술된 것과 같이 레이저 광응고를 사용하여 수행하였다.

[0692] **결과:**

[0693] 도 23은 아이소타입 대조군 MoAb, 또는 마우스 항-MASP-2 MoAb (0.3 mg/kg 및 1.0 mg/kg)로 처리된 마우스에서 레이저 손상 후 7일째에 측정된 CNV 면적을 그래프로 도시한다. 도 23에서 나타난 것과 같이, 1.0 mg/kg 항-MASP-2 MoAb로 사전 처리된 마우스에서, 통계적으로 유의미한 ($p < 0.01$) CNV의 대략 50%의 감소가 레이저 처리 후 7일 후에 관찰되었다. 도 23에서 추가로 나타난 것과 같이, 0.3 mg/kg 용량의 항-MASP-2 MoAb는 CNV를 감소시키는 데 효과적이지 않은 것으로 관찰되었다. 실시예 19에서 기술되고 도 21에서 나타난 것과 같이, 0.3 mg/kg 용량의 항-MASP-2 MoAb는 피하 투여 후 C4b 침착의 부분적이고 일시적인 억제를 가지는 것으로 나타난 것으로 유지된다.

[0694] 이 실시예에서 기술된 결과는 억제제, 예컨대 항-MASP-2 MoAb로의 MASP-2의 차단이 황반 변성의 치료에서 예방적 및/또는 치료적 효과를 가지는 것을 입증한다. 이들 결과는 실시예 13에서 기술된, MASP-2 (-/-) 마우스에서 수행된 연구에서 관찰된 결과와 일치하는 것으로 유지되며, 연구에서 레이저 치료 후 7일 후에 야생형 대조군 마우스와 비교하여 MASP-2 (-/-) 마우스에서 CNV의 30% 감소가 관찰되었다. 더욱이, 이 실시예의 결과는 전신적으로 전달된 항-MASP-2 항체가 눈에서 국소적인 치료 효과를 제공함으로써 MD 환자를 치료하기 위하여 전신성 투여 경로에 대한 잠재력을 강조하는 것을 추가로 입증한다. 요약하면, 이들 결과는 AMD의 치료에서 MASP-2

MoAb의 사용을 지지하는 증거를 제공한다.

[0695] 실시예 21

[0696] 이 실시예는 MASP-2 결핍 마우스가 수막염균으로의 감염 후 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 유도된 사망으로부터 보호되며 야생형 대조군 마우스와 비교하여 균혈증의 향상된 제거를 가지는 것을 입증한다.

[0697] 근거: 나이세리아 메닝기티디스는 수막염 및 수막알균혈증(meningococemia)과 같은 수막구균 질환의 다른 형태에서의 그것의 역할에 대해 알려져 있는 종속영양성 그람 음성 쌍구균 박테리아이다. 수막염균은 아동기 동안의 이환율 및 사망률의 주요 원인이다. 중증의 합병증으로는 패혈증, 워터하우스-프리데릭센 증후군(Waterhouse-Friderichsen syndrome), 부신 기능부전(adrenal insufficiency) 및 과중성 혈관내 응고 (DIC)를 들 수 있다. 예컨대, Rintala E. et al., *Critical Care Medicine* 28(7):2373-2378 (2000) 참고. 이 실시예에서, MASP-2 결핍 마우스가 수막염균 유도 사망률에 민감할 것인지를 해명하기 위하여 렉틴 경로의 역할을 MASP-2 (-/-) 및 WT (+/+) 마우스에서 분석하였다.

[0698] 방법:

[0699] MASP-2 녹아웃 마우스를 실시예 1에서 기술된 것과 같이 생성하고 적어도 10 세대 동안 C57Bl/6과 역교배하였다. 생후 10주령의 MASP-2 KO 마우스 (n=10마리) 및 야생형 C57/B6 마우스 (n=10마리)를 400 mg/kg 철 텍스트란 중의 5×10^8 cfu/100 μ l, 2×10^8 cfu/100 μ l 또는 3×10^7 cfu/100 μ l의 투여량의 나이세리아 메닝기티디스 혈청균 A Z2491로 정맥내 주사에 의해 접종하였다. 감염 후 마우스의 생존을 72시간 기간에 걸쳐 모니터링하였다. 혈액 샘플을 감염 후 1시간 간격으로 채혈하고 분석하여 감염을 검증하고 혈청으로부터 박테리아의 제거율을 측정하기 위하여 수막염균의 혈청 수준 (로그 cfu/ml)을 측정하였다.

[0700] 결과:

[0701] 도 24A는 5×10^8 /100 μ l cfu 수막염균의 감염성 용량의 투여 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 생존율을 그래프로 도시한다. 도 24A에서 나타난 것과 같이, 최고 용량의 5×10^8 /100 μ l cfu 수막염균으로의 감염 후, 100%의 MASP-2 KO 마우스가 감염 후 72시간 기간 내내 생존하였다. 대조적으로, WT 마우스의 20%만이 감염 후 24시간 후에 여전히 살아 있었다. 이들 결과는 MASP-2 결핍 마우스가 수막염균 유도 사망으로부터 보호된 것을 입증한다.

[0702] 도 24B는 5×10^8 cfu/100 μ l 수막염균으로 감염된 MASP-2 KO 및 WT 마우스로부터 취한 혈액 샘플에서 상이한 시점에 회수된 수막염균의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다. 도 24B에서 나타난 것과 같이, WT 마우스에서 혈중 수막염균의 수준은 감염 후 24시간 전에 약 6.5 로그 cfu/ml의 피크에 도달하였고 감염 후 48시간 전에 0으로 떨어졌다. 대조적으로, MASP-2 KO 마우스에서, 수막염균의 수준은 감염 후 6시간 전에 약 3.5 로그 cfu/ml의 피크에 도달하였고 감염 후 36시간 전에 0으로 떨어졌다.

[0703] 도 25A는 2×10^8 cfu/100 μ l 수막염균으로의 감염 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 생존율을 그래프로 도시한다. 도 25A에서 나타난 것과 같이, 2×10^8 cfu/100 μ l 용량의 수막염균으로의 감염 후, 100%의 MASP-2 KO 마우스가 감염 후 72시간 기간 내내 생존하였다. 대조적으로, WT 마우스의 80%만이 감염 후 24시간 후에 여전히 살아 있었다. 도 24A에 나타난 결과와 일치하게, 이들 결과는 MASP-2 결핍 마우스가 수막염균 유도 사망으로부터 보호된 것을 추가로 입증한다.

[0704] 도 25B는 2×10^8 cfu/100 μ l 수막염균으로 감염된 WT 마우스로부터 취한 혈액 샘플에서 상이한 시점에 회수된 수막염균의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다. 도 25B에서 나타난 것과 같이, 2×10^8 cfu로 감염된 WT 마우스의 혈액에서 수막염균의 수준은 감염 후 12시간 전에 약 4 로그 cfu/ml의 피크에 도달하였고 감염 후 24시간 전에 0으로 떨어졌다. 도 25C는 2×10^8 cfu/100 μ l 수막염균으로 감염된 MASP-2 KO 마우스로부터 취한 혈액 샘플에서 상이한 시점에 회수된 수막염균의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다. 도 25C에서 나타난 것과 같이, 2×10^8 cfu로 감염된 MASP-2 KO 마우스의 혈액에서 수막염균의 수준은 감염 후 2시간 전에 약 3.5 로그 cfu/ml의 피크 수준에 도달하였고 감염 후 3시간 전에 0으로 떨어졌다. 도 24B에서 나타난 결과와 일치하게, 이들 결과는 MASP-2 KO 마우스가 WT 마우스와 동일한 용량의 수막염균으로 감염되었지만, MASP-2 KO 마우스는 WT와 비교하여 향상

된 균혈증 제거를 가지는 것을 입증한다.

[0705] 3×10^7 cfu/100 μ l 수막염균의 최저 용량으로의 감염 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 생존율은 72시간 기간에 100%였다(데이터 미제시).

[0706] 논의

[0707] 이들 결과는 MASP-2 결핍 마우스가 수막염균 유도 사망으로부터 보호되며 WT와 비교하여 향상된 균혈증 제거를 가지는 것을 보여준다. 그러므로, 이들 결과의 관점에서, MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 MoAb의 치료적 적용이 수막염균 박테리아로의 감염 (즉, 패혈증 및 DIC)의 효과를 치료, 예방 또는 완화시키기에 효과적인 것으로 기대될 수 있을 것으로 예상된다. 추가로, 이들 결과는 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 MoAb의 치료적 적용이 대상체를 수막염균 감염에 걸릴 위험이 증가되도록 하는 경향이 없을 것임을 나타낸다.

[0708] 실시예 22

[0709] 이 실시예는 보체 C3의 신규한 렉틴 경로 매개된 및 MASP-2 의존성 C4-우회 활성화의 발견을 기술한다.

[0710] 근거:

[0711] 심근 허혈/재관류 손상 (MIRI)을 제한하기 위해 보체 활성화의 억제제를 사용하는 주요 치료적 이익은 이십년 전에 심근 경색의 실험 래트 모델에서 확실하게 입증되었다: 세포 표면 보체 수용체 유형-1 (CR1)의 가용성 절단 유도체인 재조합 sCR1을 정맥내로 제공하고 그것의 효과를 MIRI의 래트 생체내 모델에서 평가하였다. sCR1로의 치료는 경색 부피를 40% 이상 감소시켰다 (Weisman, H.F., et al., *Science* 249:146-151 (1990)). 이 재조합 억제제의 치료적 잠재력은 MI가 있는 환자에서 sCR1의 투여는 허혈 후 심장의 위축성 부전을 방지했음을 보여주는 임상 실험에서 계속해서 입증되었다 (Shandelya, S., et al., *Circulation* 87:536-546 (1993)). 그러나, 허혈 조직에서 보체의 활성화로 이어지는 일차 메커니즘은 주로 적절한 실험 모델의 부재, 산소 고갈 세포의 보체 활성화로 이어지는 분자 과정에 대한 제한된 이해, 및 상이한 보체 활성화 경로간 혼선 및 시너지로 인해 궁극적으로 규명되지 않았다.

[0712] 면역 반응의 기본 구성요소로서, 보체 시스템은 항체-의존성 및 항체-무관한 메커니즘 둘 다를 통해 침입하는 미생물에 대한 보호를 제공한다. 그것은 화학주성, 식세포작용, 세포 부착, 및 B-세포 분화를 포함한, 면역 반응 내의 많은 세포 및 체액성 상호작용을 조정한다. 3가지의 상이한 경로는 보체 캐스케이드를 시작한다: 고전적 경로, 대체 경로, 및 렉틴 경로. 고전적 경로 인식 하위 구성요소 C1q는 결합된 세린 프로테아제, C1r 및 C1s의 단계식 활성화를 개시하기 위하여 다양한 표적 - 가장 두드러지거는 면역 복합체 -에 결합하여 적응 면역 체계에 의한 결합 후 병원체 및 면역 복합체 제거에 대한 주요 메커니즘을 제공한다. C1q의 면역 복합체에의 결합은 C1r 지모겐 다이머를 그것의 활성 형태로 전환시켜서 절단하고 그로써 C1s를 활성화한다. C1s는 C1q 결합을 2개의 절단 단계로 보체 활성화로 번역한다: 먼저 그것은 C4를 C4a 및 C4b로 전환시킨 후 C4b-결합 C2를 절단하여 C3 전환효소 C4b2a를 형성한다. 이 복합체는 풍부한 혈장 구성요소 C3을 C3a 및 C3b로 전환시킨다. C4b2a 복합체와 아주 가까운 곳에서 C3b의 축적은 C3에 대한 기질 특이성을 C5로 이동시켜서 C5 전환효소 C4b2a(C3b)_n을 형성한다. 고전적 경로 활성화를 통해 생성된 C3 및 C5 전환효소 복합체는 렉틴 경로 활성화 경로를 통해 생성된 것과 동일하다. 대체 경로에서, 구성요소 C3의 자발적인 저수준 가수분해는 세포 표면 위로의 단백질 단편의 침착을 초래하여 외래 세포에서의 보체 활성화를 촉발시키는 한편, 숙주 조직 상에서의 세포-관련 조절 단백질은 활성화를 방지함으로써 자가 손상을 방지한다. 대체 경로와 마찬가지로, 렉틴 경로는 면역 복합체의 부재 하에 활성화될 수 있다. 활성화는 주로 박테리아, 진균 또는 바이러스 병원체 상에 존재하는 병원체-관련 분자 패턴(Pathogen-Associated Molecular Pattern, PAMP) 또는 세포자멸성, 괴사성, 악성 또는 산소-고갈 세포 상의 비정상적인 글리코실화 패턴에 대한 다중 분자 렉틴 경로 활성화 복합체의 결합에 의해 개시된다 (Collard, C.D., et al., *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556 (2000); Walport, M.J., *N. Engl. J. Med.* 344:1058-1066 (2001); Schwaebler, W., et al., *Immunobiology* 205:455-466 (2002); 및 Fujita, T., *Nat. Rev. Immunol.* 2:346-353 (2002)).

[0713] 만난-결합 렉틴 (MBL)은 MBL-관련 세린 프로테아제 (MASP)로 명명되고 그것의 발견 순서에 따라 번호가 매겨진 (즉, MASP-1, MASP-2 및 MASP-3) 신규한 세세린 프로테아제 군과 복합체를 형성하는 것으로 나타난 첫 번째 탄수화물 인식 하위 구성요소였다. 사람에게서, 렉틴 경로 활성화 복합체는 상이한 탄수화물 결합 특이성을 가진 4개의 대체 탄수화물 인식 하위 구성요소, 즉, MBL 2, 및 피콜린 패밀리의 3개의 상이한 구성원, 즉 L-피콜린, H-피콜린 및 M-피콜린 및 MASP로 형성될 수 있다. MBL의 2가지 형태인 MBL A 및 MBL C, 및 피콜린-A는 마우스

및 래트 혈장에서 MASP와 렉틴 활성화 경로 복합체를 형성한다. 본 발명자들은 이전에 MASP-2 및 Map19 또는 sAMP로 명명한, 19 kDa의 추가의 절단된 MASP-2 유전자 생성물을 인간, 마우스 및 래트에서 클로닝하고 특성화하였다 (Thiel, S., et al., *Nature* 386:506-510 (1997); Stover, C.M., et al., *J. Immunol.* 162:3481-3490 (1999); Takahashi, M., et al., *Int. Immunol.* 11:859-863 (1999); 및 Stover, C.M., et al., *J. Immunol.* 163:6848-6859 (1999)). Map19/sMAP는 프로테아제 활성이 없지만, MASP의 탄수화물 인식 복합체에 대한 결합에 결합함으로써 렉틴 경로 활성화를 조절할 수 있다 (Iwaki, D. et al., *J. Immunol.* 177:8626-8632 (2006)).

[0714] 3개의 MASP 중에서, MASP-2만이 렉틴 경로 인식 복합체의 결합을 보체 활성화로 번역하는 데 필요한 것을 시사하는 증거가 있다 (Thiel, S., et al. (1997); Vorup-Jensen, T., et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100 (2000); Thiel, S., et al., *J. Immunol.* 165:878-887 (2000); Rossi, V., et al., *J. Biol. Chem.* 276:40880-40887 (2001)). 이런 결론은 가장 최근에 기술된 MASP-1 및 MASP-3에서의 마우스 스트레인 결핍의 표현형에 의해 강조된다. 시험관내에서 렉틴 경로 매개 보체 활성화의 개시의 지연과 별도로 MASP-1/3 결핍 마우스는 렉틴 경로 기능적 활성을 유지한다. MASP-1 및 MASP-3 결핍 혈청의 재조합 MASP-1으로의 재구성은 렉틴 경로 활성화에서의 이런 지연을 극복하며 이것은 MASP-1이 MASP-2 활성화를 촉진할 수 있음을 시사한다 (Takahashi, M., et al., *J. Immunol.* 180:6132-6138 (2008)). 가장 최근의 연구는 MASP-1 (및 가능하게는 또한 MASP-3)이 대체 경로 활성화 효소 인자 D를 그것의 지모겐 형태로부터 그것의 효소적 활성 형태로 전환시키는 데 필요한 것을 나타냈다 (Takahashi, M., et al., *J. Exp. Med.* 207:29-37 (2010)). 이 과정의 생리적인 중요성은 MASP-1/3 결핍 마우스의 혈장에서 대체 경로 기능적 활성의 부재에 의해 강조된다.

[0715] 렉틴 경로 탄수화물 인식 하위 구성요소 MBL A 및 MBL C의 조합된 표적화된 결핍이 있는 최근에 생성된 마우스 스트레인은 남아 있는 쥐과 렉틴 경로 인식 하위 구성요소 피콜린 A를 통해 여전히 렉틴 경로 활성화를 개시할 수 있다 (Takahashi, K., et al., *Microbes Infect.* 4:773-784 (2002)). MASP-2 결핍 마우스에서 임의의 잔여 렉틴 경로 기능적 활성의 부재는 건강 및 질환에서 선천성 체액성 면역의 이 이펙터 암의 역할을 연구하기 위한 결정적인 모델을 제공한다.

[0716] C4 및 MASP-2 결핍 마우스 스트레인의 유용성은 본 발명자들이 보체 C3의 신규한 렉틴 경로 특이적이지만, MASP-2 의존적인, C4-우회 활성화 경로를 규정할 수 있게 해주었다. 이 신규한 렉틴 경로 매개된 C4-우회 활성화 경로의 허혈후 조직 상실을 향한 본질적인 기여는 MIRI에서 MASP-2 결핍의 현저한 보호성 표현형에 의해 강조되는 한편 동일한 모델에서 테스트된 C4-결핍 마우스는 보호를 나타내지 않는다.

[0717] 이 실시예에서, 본 발명자들은 보체 C3의 신규한 렉틴 경로 매개되고 MASP-2 의존적인 C4-우회 활성화를 기술한다. 이런 새로운 활성화 경로의 생리적 관련성은 C4 결핍 동물이 보호되지 않은, 심근 허혈/재관류 손상 (MIRI)의 실험 모델에서 MASP-2 결핍의 보호성 표현형에 의해 확립된다.

[0718] **방법:**

[0719] **MASP-2 결핍 마우스는 심한 비정상을 보이지 않는다.** MASP-2 결핍 마우스를 실시예 1에서 기술된 것과 같이 생성하였다. 이형접합성 ($^{+/-}$) 및 동형접합성 ($^{-/-}$) MASP-2 결핍 마우스는 모두 건강하고 생식능력이 있으며, 심한 비정상을 보이지 않는다. 그들의 기대 수명은 그들의 WT 한배 새끼의 기대 수명 (>18개월)과 유사하다. 이들 마우스의 표현형을 질환의 실험 모델에서 연구하기 전에, 본 발명자들의 MASP-2 $^{-/-}$ 라인을 7 세대 동안 C57BL/6 배경과 역교배시켰다. MASP-2 mRNA의 총 부재를 폴리 A+ 선택된 간 RNA 제제의 노던 블롯팅에 의해 확인한 한편, Map19 또는 sMAP (MASP2 유전자의 절단된 대체 스플라이싱 생성물)를 암호화하는 1.2 kb mRNA는 풍부하게 발현된다.

[0720] MASP-2의 세린 프로테아제 도메인에 대한 코딩 서열 (B 사슬) 또는 A 사슬에 대한 코딩 서열의 나머지에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 사용한 qRT-PCR 분석은 mRNA를 암호화하는 B 사슬을 MASP-2 $^{-/-}$ 마우스에서 검출할 수 없는 한편 파괴된 A 사슬 mRNA 전사체의 풍부성은 상당히 증가된 것을 보여주었다. 마찬가지로, Map19/sMAP 암호화 mRNA의 풍부성은 MASP-2 $^{+/-}$ 및 MASP-2 $^{-/-}$ 마우스에서 증가한다. 각각의 유전자형의 5마리씩의 동물에 대한 ELISA에 의해 측정된 혈장 MASP-2 수준은 대조군의 경우 300 ng/ml (260-330 ng/ml 범위), 이형접합성 마우스의 경우 360 ng/ml (330-395 ng/ml 범위)이며, MASP-2 $^{-/-}$ 마우스에서는 검출할 수 없었다. qRT-PCR을 사용하여, mRNA 발현 프로파일을 확립하였고, MASP-2 $^{-/-}$ 마우스가 그들의 MASP-2 충분한 한배 새끼의 것과 유사한 풍부성으로 MBL A, MBL C, 피콜린 A, MASP-1, MASP-3, C1q, C1rA, C1sA, 인자 B, 인자 D, C4, 및 C3에 대한

mRNA를 발현하는 것을 입증하였다 (데이터 미제시).

[0721] MASP-2^{-/-} (n=8마리) 및 MASP-2^{+/+} (n=7마리) 한배 새끼의 혈장 C3 수준을 상업적으로 이용 가능한 마우스 C3 ELISA 키트 (Kamiya, Biomedical, Seattle, WA)를 사용하여 측정하였다. MASP-2 결핍 마우스의 C3 수준 (평균 0.84 mg/ml, +/- 0.34)은 WT 대조군의 그것 (평균 0.92, +/- 0.37)과 유사하였다.

[0722] **결과:**

[0723] **MASP-2는 렉틴 경로 기능적 활성화에 필수적이다.**

[0724] 실시예 2에서 기술되고 도 5에서 도시된 것과 같이, MASP-2^{-/-} 혈장의 시험관내 분석은 C4의 활성화를 위해 만난 - 및 지모산-코팅 표면을 활성화하는 데 렉틴 경로 기능적 활성화가 총체적으로 부재한 것을 보여주었다. 마찬가지로, 렉틴 경로-의존성 C4 또는 C3 절단 중 어느 것도 MASP-2^{-/-} 혈장에서 MBL A, MBL C 및 피콜린 A를 통해 결합하여 활성화를 촉발시키는 N-아세틸 글루코사민으로 코팅된 표면 상에서 검출되지 않았다 (데이터 미제시).

[0725] MASP-2^{-/-}-마우스의 혈청 및 혈장의 분석은 MASP-2가 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화하는 데 필수적으로 필요한 것을 분명하게 입증한다. 그러나, 렉틴 경로 기능적 활성화의 총 결핍은 다른 보체 활성화 경로를 온전하게 남겨 둔다: MASP-2^{-/-} 혈장은 고전적 (도 26A) 및 대체 경로 (도 26B)를 통해 여전히 보체를 활성화할 수 있다. 도 26A 및 26B에서, 기호 "*"는 WT (MASP-2 (+/+))로부터의 혈청을 나타내고; 기호 "•"는 WT (C1q 고갈)로부터의 혈청을 나타내며; 기호 "□"는 MASP-2 (-/-)로부터의 혈청을 나타내고; 기호 "△"는 MASP-2 (-/-) (C1q 고갈)로부터의 혈청을 나타낸다.

[0726] 도 26A는 MASP-2^{-/-} 마우스가 기능적 고전적 경로를 유지하는 것을 그래프로 도시한다: C3b 침착을 면역 복합체 BSA로 코팅한 후 염소 항-BSA IgG를 첨가함으로써 생성됨)로 코팅된 미세적정 플레이트 상에서 검정하였다. 도 26B는 MASP-2 결핍 마우스가 기능적 대체 경로를 유지하는 것을 그래프로 도시한다: C3b 침착을 대체 경로 활성화만을 허용하는 조건 (Mg²⁺ 및 EGTA를 함유한 완충액) 하에서 지모산 코팅된 미세적정 플레이트 상에서 검정하였다. 도 26A 및 도 26B에 나타난 결과는 중복의 평균이며 3개의 독립적인 실험에 전형적이다. 혈청 공급원에 대한 동일한 기호를 전체에서 사용하였다. 이들 결과는 대체 경로를 직접 촉발시키는 한편, 고전적 경로 및 렉틴 경로를 모두 비활성화시키기 위해 설계된 실험 조건 하에서 도 26B에 도시된 결과에서 증명되는 바와 같이, 기능적 대체 경로가 MASP-2 결핍 마우스에 존재하는 것을 보여준다.

[0727] **보체의 렉틴 경로 활성화는 심근 허혈/재관류 손상 (MIRI)에서 염증성 조직 손실에 결정적으로 기여한다.**

[0728] 렉틴 경로 기능적 활성화의 MIRI에 대한 기여를 연구하기 위하여, 본 발명자들은 MASP-2^{-/-} 마우스 및 WT 한배 새끼 대조군을 관상 동맥의 좌측 전방 하행 가지 (LAD)의 일시적인 결찰 및 재관류 후에 MIRI의 모델에서 비교하였다. 보체 C4의 존재 또는 부재는 MIRI의 허혈성 조직 손실 정도에 영향을 미치지 않는다. 본 발명자들은 실험적 MIRI 후에 경색 크기에 미치는 C4 결핍의 영향을 평가하였다. 도 27A 및 도 27B에서 나타난 것과 같이, 동일한 경색 크기가 C4-결핍 마우스 및 그들의 WT 한배 새끼에서 모두 관찰되었다. 도 27A는 C4^{-/-} 마우스 (n=6마리) 및 매칭된 WT 한배 새끼 대조군 (n=7마리)에서 LAD 결찰 및 재관류 후의 MIRI-유도된 조직 손실을 그래프로 도시한다. 도 27B는 AAR의 함수로서의 INF를 그래프로 도시하며, C4^{-/-} 마우스가 그들의 WT 대조군처럼 MIRI가 의심되는 것을 분명하게 보여준다 (점선).

[0729] 이들 결과는 C4 결핍 마우스가 MIRI로부터 보호되지 않는 것을 입증한다. 이 결과는 주요 C4 활성화 단편인 C4b가 고전적 및 렉틴 경로 C3 전환효소 C4b2a의 필수적인 구성요소라는 광범위하게 받아들여진 견해와 상충하는 것이기 때문에 예상하지 못하던 것이었다. 그러므로 본 발명자들은 보체 C3의 잔여 렉틴 경로 특이적 활성화가 C4-결핍 마우스 및 인간 혈장에서 검출될 수 있는지를 평가하였다.

[0730] **렉틴 경로는 신규한 MASP-2 의존성 C4-우회 활성화 경로를 통해 C4의 부재 하에 보체 C3을 활성화한다.**

[0731] C4-결핍 기니아 피그 혈청에서 C4-우회 활성화 경로의 존재를 가리키는 과거 보고서에 고무되어 (May, J.E., 및 M. Frank, *J. Immunol.* 111:1671-1677 (1973)), 본 발명자들은 C4-결핍 마우스가 잔여 고전적 또는 렉틴 경로 기능적 활성을 가질 수 있는지를 분석하고 대체 경로의 기여를 배제하는 경로-특이적 검정 조건 하에서 C3의 활성화를 모니터링하였다.

[0732] C3b 침착을 대체 경로 활성화를 금지하는 혈장 농도 (1.25% 이하)에서 재석회화된 혈장을 사용하여 만난-코팅 미세적정 플레이트 상에서 검정하였다. 고전적 경로 활성화에 대해 테스트한 C4-결핍 혈장에서 C3의 절단은 검

출되지 않은 한편 (데이터 미제시), 강력한 잔여 C3 절단 활성이 렉틴 경로를 통해 보체 활성화가 개시되었을 때 C4-결핍 마우스 혈장에서 관찰되었다. 렉틴 경로 의존성을 C4-결핍 혈장 희석과 가용성 만난과의 사전 인큐베이션 후에 C3 절단의 경합성 억제에 의해 증명한다 (도 28A 참고). 도 28A-D에서 나타난 것과 같이, C3의 MASP-2 의존성 활성화를 C4의 부재 하에 관찰하였다. 도 28A는 C4+/+ (십자형) 및 C4-/- (개방 원형) 마우스 혈장에 의한 C3b 침착을 그래프로 도시한다. 검정 전에 과잉량 (1 µg/ml)의 유동상 만난과의 C4-/- 혈장의 사전 인큐베이션은 C3 침착을 완전히 억제한다 (단한 원형). 결과는 3개의 독립적인 실험에 전형적이다. 도 28B는 야생형, MASP-2 결핍 (개방 사각형) 및 C4-/-마우스 혈장 (1%)이 다양한 농도의 항-렉트 MASP-2 mAbM11 (가로 좌표)과 혼합되고 C3b 침착이 만난-코팅 플레이트 상에서 검정되는 실험 결과를 그래프로 도시한다. 결과는 4개 검정 (각 유형의 혈장의 2개의 이중)의 평균 (± SD)이다. 도 28C는 인간 혈장: 모아진 NHS (십자형), C4-/- 혈장 (개방 원형) 및 1 µg/ml 만난과 사전 인큐베이션된 C4-/- 혈장 (단한 원형)에서의 실험 결과를 그래프로 도시한다. 결과는 3개의 독립적인 실험을 나타낸다. 도 28D는 C4 충분한 및 C4 결핍 인간 혈장 (1%)에서 항-인간 MASP-2 mAbH3에 의한 C3b 침착의 억제를 그래프로 도시한다 (3개 실험의 평균 ± SD). 도 28B에서 나타난 것과 같이, 렉틴 경로-의존성 C3 활성화는 나란히 검정된 MASP-2-/-혈장에서 관찰되지 않았고, 이것은 C3의 이 C4-우회 활성화 경로가 MASP-2 의존성인 것을 시사한다.

[0733] 이들 발견을 추가로 확증하기 위하여, 본 발명자들은 재조합 인간 및 래트 MASP-2A에 대해 친화성 스크리닝에 의해 파지 디스플레이 항체 라이브러리로부터 분리된 일련의 재조합 억제 mAb를 확립하였다 (여기서 활성 프로테아제 도메인의 세린 잔기는 부위 지정 돌연변이생성에 의해 알려진 잔기에 의해 대체되어 항원의 자가용해성 분해가 방지됨). MASP-2에 대한 재조합 항체 (AbH3 및 AbM11)를 조합 항체 라이브러리로부터 (Knappik, A., et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86 (2000)), 항원으로서 재조합 인간 및 래트 MASP-2A를 사용하여 분리하였다 (Chen, C.B. 및 Wallis, *J. Biol. Chem.* 276:25894-25902 (2001)). 마우스 혈장 (IC50~1 nM)에서 C4 및 C3의 렉틴 경로-매개 활성화를 강력하게 억제하는 항-렉트 Fab2 단편은 전장 IgG2a 항체로 전환되었다. 다클론성 항-쥐과 MASP-2A 항혈청은 래트에서 상승되었다. 이들 도구는 본 발명자들이, 아래에서 추가로 기술되는 것과 같이, C3의 이런 신규한 렉틴 경로 특이적 C4-우회 활성화 경로의 MASP-2 의존성을 확인할 수 있도록 해주었다.

[0734] 도 28B에서 나타난 것과 같이, M211, 마우스 및 래트 MASP-2에 선택적으로 결합하는 억제성 단클론성 항체는 C4-결핍 마우스에서 C3의 C4-우회 활성화뿐만 아니라 WT 마우스 혈장의 C3 활성화를 유사한 IC50 값으로 농도의 의존성 방식으로 억제하였다. 모든 검정을 대체 경로 활성화 경로를 기능할 수 없게 만드는 높은 혈장 희석에서 수행하였다 (최고 혈장 농도는 1.25%임).

[0735] 인간에서 C3의 유사한 렉틴 경로 특이적 C4-우회 활성화의 존재를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 두 인간 C4 유전자 (즉, C4A 및 C4B)가 유전적으로 결핍되어, C4의 총체적인 부재를 초래하는 도너의 혈장을 분석하였다 (Yang, Y., et al., *J. Immunol.* 173:2803-2814 (2004)). 도 28C는 이 환자의 혈장이 높은 혈장 희석 (대체 활성화 경로를 기능부전으로 만들)에서 C3을 효율적으로 활성화하는 것을 보여준다. 만난 코팅 플레이트 상에서의 C3 활성화의 렉틴 경로 특이적 방식을 쥐과 C4-결핍 혈장 (도 28A) 및 인간 C4 결핍 혈장 (도 28C)에서, 과잉 농도의 유동상 만났을 첨가함으로써 입증한다. 인간 C4-결핍 혈장에서 C3의 이런 활성화 메커니즘의 MASP-2 의존성을 단클론성 항체 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하여 MASP-2 기능적 활성을 제거하는 AbH3를 사용하여 평가하였다. 도 28D에서 나타난 것과 같이, AbH3는 C4-충분한 및 C4-결핍 인간 혈장에서 모두 비슷한 효능으로 C3b (및 C3dg)의 침착을 억제하였다.

[0736] C3의 C4-우회 활성화에서 다른 보체 구성요소의 가능한 역할을 평가하기 위하여, 본 발명자들은 tested 혈장 of MASP-1/3-/- 및 Bf/C2-/-마우스와 함께 MASP-2-/-, C4-/- 및 C1q-/- 혈장 (대조군)의 혈장을 렉틴 경로 특이적 검정 및 고전적 경로 특이적 검정 조건 둘 다에서 테스트하였다. C3 절단의 상대적인 양을 WT 혈장을 사용할 때 침착된 C3의 양에 대해 플롯화하였다.

[0737] 도 29A는 렉틴 활성화 경로 또는 고전적 활성화 경로 특이적 검정 조건 하에서 테스트된 다양한 보체 결핍 마우스 스트레인으로부터의 혈장에서의 C3 전환효소 활성의 비슷한 분석을 그래프로 도시한다. WT 마우스 (n=6마리), MASP-2-/-마우스 (n=4마리), MASP-1/3-/- 마우스 (n=2마리), C4-/- 마우스 (n=8마리), C4/MASP-1/3-/- 마우스 (n=8마리), Bf/C2-/- (n=2마리) 및 C1q-/- 마우스 (n=2마리)의 희석된 혈장 샘플 (1%)을 나란히 테스트하였다. 2.5 µg/ml 재조합 래트 C2 (Bf/C2-/- +C2)로의 Bf/C2-/- 혈장의 재구성으로 C3b 침착이 복원되었다. 결과는 평균 (±SD)이다. **p<0.01 (WT 혈장과 비교하여). 도 29A에서 나타난 것과 같이, 실질적인 C3 침착을 고전적 경로 특이적 조건 하에서가 아닌, 렉틴 경로 특이적 검정 조건 하에서 테스트된 C4-/- 혈장에서 볼 수 있다. 다시 말하면, C3 침착을 렉틴 경로 활성화 경로를 통해 MASP-2 결핍 혈장에서 볼 수 없었던 한편, 동일한

혈장은 고전적 경로를 통해 C3을 침착시켰다. MASP-1/3-/- 혈장에서, C3 침착은 렉틴 및 고전적 경로 특이적 검정 조건에서 모두 발생하였다. C3 침착을 렉틴 경로 또는 고전적 경로 특이적 조건을 사용하여, C4 및 MASP-1/3의 조합된 결핍이 있는 혈장에서는 볼 수 없었다. C3 침착을 렉틴 경로를 통해, 또는 고전적 경로를 통해 C2/Bf-/- 혈장에서 검출할 수 없다. 그러나, 재조합 C2로의 C2/Bf-/- 마우스 혈장의 재구성은 렉틴 경로 및 고전적 경로-매개 C3 절단을 모두 복원시켰다. 검정 조건을 C1q-/- 혈장을 사용하여 검증하였다.

[0738] **도 29B**는 렉틴 활성화 경로 특이적 검정 조건 (1% 혈장, 결과는 3개의 독립적인 실험에 전형적임) 하에서 테스트된 다양한 보체 결핍 마우스 스트레인 WT, fB-/-, C4-/-, MASP-1/3-/-, 및 MASP-2-/- 혈장으로부터의 혈장에서 C3 전환효소 활성화의 시간 분해 동역학을 그래프로 도시한다. **도 29B**에서 나타난 것과 같이, C3 절단을 MASP-2-/-혈장에서 볼 수 없었지만, fB-/- 혈장은 WT 혈장과 유사한 동역학으로 C3을 절단하였다. C3의 C3b (및 C3dg)로의 렉틴 경로-의존성 전환의 상당한 지연을 MASP-1/3 결핍 혈장에서뿐만 아니라 C4-/-에서 볼 수 있었다. MASP-1/3-/- 혈장에서 C3 활성화의 이런 지연은 최근에 MASP-3 의존적이기보다는 MASP-1 의존적인 것으로 나타났다 (Takahashi, M., et al., *J. Immunol.* 180:6132-6138 (2008)).

[0739] **논의:**

[0740] 이 실시예에서 기술된 결과는 MASP-2 기능적 활성이 C4의 존재 및 부재 하에서 모두 렉틴 경로를 통한 C3의 활성화에 필수적인 것을 강력하게 시사한다. 나아가, C2 및 MASP-1은 C3의 이런 신규한 렉틴 경로 특이적 C4-우회 활성화 경로가 작업하는 데에 필요하다. MASP-2-/-뿐만 아니라 C4-/- 혈장에서의 렉틴 경로 기능적 활성화의 비슷한 분석은 보체 C3의 이전에 인식하지 못했던 C4-의존적이지만, MASP-2-의존성 활성화 경로의 존재를 드러냈고 C3이 C4의 총체적인 부재 하에서 렉틴 경로-의존성 방식으로 활성화될 수 있음을 나타냈다. 이런 신규한 MASP-2 의존성 C3 전환효소의 상세한 분자 조성 및 활성화 사건의 순서가 해명되어야 할 것으로 남아있지만, 본 발명자들의 결과는 이 C4-우회 활성화 경로가 추가적으로 보체 C2뿐만 아니라 MASP-1의 존재를 필요로 하는 것을 시사한다. 조합된 C4 및 MASP-1/3 결핍이 있는 마우스의 혈장에서 렉틴 경로-매개 C3 절단 활성화의 손실은 MASP-2의 직접적인 절단 및 활성화를 통해 MASP-2 의존성 보체 활성화를 향상시키는 MASP-1의 가장 최근에 기술된 역할에 의해 설명될 수 있다 (Takahashi, M., et al., *J. Immunol.* 180:6132-6138 (2008)). 마찬가지로, MASP-1은 그것의 C2 절단 능력을 통해 MASP-2 기능적 활성을 보조할 수 있다 (Moller-Kristensen, et al., *Int. Immunol.* 19:141-149 (2007)). 두 활성 모두 MASP-1/3 결핍 혈장이 렉틴 활성화 경로를 통해 C3을 절단하는 속도의 감소 및 MASP-1이 C4-우회 활성화 경로를 통해 C3 전환을 지속시키기 위해 필요할 수 있을 것인가에 대한 이유를 설명할 수 있다.

[0741] C2/fB-/- 혈장이 렉틴 경로를 통해 C3을 활성화하지 못하는 무능력은 재조합 래트 C2의 C2/fB-/- 혈장에의 첨가가 재구성된 혈장의 만난-코팅 플레이트 상에서 C3을 활성화하는 능력을 복원시켰기 때문에 C2-의존성인 것으로 나타났다.

[0742] C4 결핍이 고전적 보체 활성화 경로를 특이적으로 파괴하는 한편 렉틴 경로는 MASP-2 의존성 C4-우회 활성화 경로를 통해 C3 전환효소 활성화의 생리적으로 결정적인 수준을 보유한다는 발견은 실험적 폐렴구균 감염을 포함한 다양한 질환 모델에서 렉틴 경로의 역할에 대한 재평가를 요구한다 (Brown, J. S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:16969-16974 (2002); Experimental Allergic Encephalomyelitis (Boos, L.A., et al., *Glia* 49:158-160 (2005); 및 C3 의존성 쥐과 간 재생 모델 (Clark, A., et al., *Mol. Immunol.* 45:3125-3132 (2008)). 후자의 그룹은 인자 B 기능적 활성화의 항체-매개 고갈에 의한 대체 경로의 생체내 억제자 C4-/- 마우스에서 C3 절단-의존성 간 재생에 영향을 미치지 않았기 때문에 C4-결핍 마우스가 대체 경로 무관한 방식으로 C3를 활성화할 수 있음을 입증하였다 (Clark, A., et al. (2008)). 이런 C3의 렉틴 경로 매개 C4-우회 활성화 경로는 또한 본 발명자들의 MIRI 모델에서뿐만 아니라 이전에 기술된 신장 동종이식 거부반응 모델에서 C4 결핍의 보호성 표현형의 결핍을 설명해줄 수 있다 (Lin, T., et al., *Am. J. Pathol.* 168:1241-1248 (2006)). 대조적으로, 본 발명자들의 최근 결과는 독립적으로 신장 이식의 모델에서 MASP-2-/-마우스의 상당한 보호성 표현형을 입증하였다 (Farrar, C.A., et al., *Mol. Immunol.* 46:2832 (2009)).

[0743] 요약하면, 이 실시예의 결과는 C3의 MASP-2 의존성 C4-우회 활성화가, C4의 유용성이 C3 활성화를 제한하는 조건 하에서 중요할 수 있는 생리적으로 관련된 메커니즘이라는 견해를 지지한다.

[0744] **실시예 23**

[0745] 이 실시예는 WT (+/+), MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11/C4 (-/-) 및 C4 (-/-) 마우스에서 트롬빈 기질에 의한 C3의 활성화 및 만난 상에서의 C3 침착을 기술한다.

- [0746] **근거:**
- [0747] **실시예 14**에서 기술된 것과 같이, 트롬빈 활성화는 생리적 조건 하에서 렉틴 경로 활성화 후에 발생할 수 있고, MASP-2 개입 정도를 입증하는 것으로 측정되었다. C3은 보체 시스템의 활성화에서 중심 역할을 한다. C3 활성화는 고전적 및 대체 보체 활성화 경로에 모두 필요하다. C3이 트롬빈 기질에 의해 활성화되는지를 측정하기 위한 실험을 수행하였다.
- [0748] **방법:**
- [0749] **트롬빈 기질에 의한 C3 활성화**
- [0750] C3의 활성화를 다음의 트롬빈 기질의 활성화 형태의 존재 하에 측정하였다: 인간 FCXIIa, 인간 FVIIa, 소과 FXa, 인간 FXa, 인간 활성화된 단백질 C, 및 인간 트롬빈. C3을 다양한 트롬빈 기질과 함께 인큐베이션한 후, 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 환원 조건 하에서 분리시켰다. 셀룰로스 막을 사용하는 전기영동적 전달 후에, 막을 단클론성 비오틴-결합 래트 항-마우스 C3과 함께 인큐베이션하고, 스트렙타비딘-HRP 키트로 검출하고 ECL 시약을 사용하여 전개시켰다.
- [0751] **결과:**
- [0752] C3의 활성화는 온전한 a-사슬의 절단된 a' 사슬 및 가용성 C3a (도 30에서 도시되지 않음)로의 절단을 포함한다. 도 30은 인간 C3 by 트롬빈 기질에 의한 인간 C3의 활성화에 대한 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시하는데, 여기서 절단되지 않은 C3 알파 사슬, 및 활성화 생성물의 사슬은 화살표로 표시된다. 도 30에서 나타난 것과 같이, C3과 인간 응고 인자 XI 및 인자 X의 활성화된 형태, 뿐만 아니라 활성화된 소과 응고 인자 X와의 인큐베이션은 임의의 보체 프로테아제의 부재 하에 시험관내에서 C3을 절단할 수 있다.
- [0753] **만난 상에서의 C3 침착**
- [0754] C3 침착 검정을 WT, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4(-/-) 및 C4(-/-)로부터 얻어진 혈청 샘플에 대해 수행하였다. F11은 응고 인자 XI을 암호화하는 유전자이다. C3 활성화를 측정하기 위하여, 미세적정 플레이트를 만난 (1 µg/웰)으로 코팅한 후, TBS/tween/Ca²⁺ 중의 양 항-HSA 혈청 (2 µg/ml)을 첨가하였다. 플레이트를 TBS 중의 0.1% HSA로 차단하고 위에서와 같이 세척하였다. 혈장 샘플을 4 mM 바르비탈, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4로 희석하고, 플레이트에 첨가하고 1.5시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세척 후에, 결합된 C3b를 토끼 항-인간 C3c (Dako)와, 이어서 알칼리 포스파타제-콘주게이션된 염소 항-토끼 IgG 및 pNPP를 사용하여 검출하였다.
- [0755] **결과:**
- [0756] 도 31은 WT, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) 및 C4 (-/-)로부터 얻어진 혈청 샘플에 대한 C3 침착 검정의 결과를 도시한다. 도 31에서 나타난 것과 같이, C4의 완전한 부재 하에서도 기능적 렉틴 경로 사건이 있다. 도 31에서 추가로 나타난 것과 같이, 이런 신규한 렉틴 경로 의존성 보체 활성화는 응고 인자 XI을 필요로 한다.
- [0757] **논의:**
- [0758] 이 실험에서 얻어진 결과 전에, 기술분야에 숙련된 사람들에게 보체의 렉틴 경로는 활성을 위해 C4를 필요로 한다고 여겨졌었다. 따라서, C4 녹아웃 마우스 (및 C4 결핍 인간)로부터의 데이터는 그러한 유기체가 렉틴 경로 결핍 (고전적 경로 결핍 외에)이었다는 가정 하에 해석되었다. 본 결과는 이런 생각이 잘못되었음을 입증한다. 그러므로, 렉틴 경로가 C4 결핍 동물의 표현형을 토대로 한 특정 질환 환경에서 중요하지 않았음을 시사하는 과거 연구의 결론은 잘못된 것일 수 있다. 이 실시예에서 기술된 데이터는 또한 전체 혈청의 생리적 맥락에서 렉틴 경로가 응고 캐스케이드의 구성요소를 활성화할 수 있음을 보여준다. 그러므로, MASP-2를 포함하는 보체와 응고 사이에 혼선이 있음이 입증된다.
- [0759] **실시예 24**
- [0760] 이 실시예는 발작성 야간(Paroxysmal nocturnal) 헤모글로빈뇨 (PNH) 환자로부터 얻어진 혈액 샘플로부터의 적혈구의 용해에 미치는 항-MASP-2 항체의 영향을 평가하는 방법을 기술한다.
- [0761] **배경/근거:**

- [0762] 마르키아파바-미켈리 증후군(Marchiafava-Micheli syndrome)으로도 언급되는 발작성 야간 헤모글로빈뇨 (PNH)는 보체-유도된 혈관내 용혈성 빈혈을 특징으로 하는 후천적, 잠재적으로 생명을 위협하는 혈액 질환이다. PNH의 특징은 보체의 대체 경로의 조절되지 않은 활성화의 결과인 만성 혈관내 용혈이다. Lindorfer, M.A., et al., *Blood* 115(11) (2010). PNH에서의 빈혈은 혈류의 적혈구의 파괴로 인한 것이다. PNH의 증상으로는 소변에 헤모글로빈의 출현으로 인한 적색 소변, 및 혈전증을 들 수 있다. PNH는 "일차 PNH"로 언급되는 자체적으로 발생되거나, 또는 "이차 PNH"로서 언급되는 재생불량성 빈혈과 같은 다른 골수 장애의 맥락에서 발생할 수 있다. PNH의 치료는 빈혈에 대한 수혈, 혈정증에 대한 항응고 및 보체 시스템을 억제함으로써 면역 파괴에 대해 혈액 세포를 보호하는 단클론성 항체 에쿨리주맙 (Soliris)의 사용을 들 수 있다 (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med.* 350(6):552-9 (2004)). 그러나, 에쿨리주맙으로 치료된 PNH 환자의 상당수가 항체가 보체의 대체 경로의 활성화를 차단하지 못하기 때문에 임상적으로 유의미한 면역-매개 용혈성 빈혈이 남아 있다.
- [0763] 이 실시예는 ABO-매칭 산성화된 정상 인간 혈청과 함께 인큐베이션된 PNH 환자 (Soliris로 치료되지 않음)로부터 얻어진 혈액 샘플로부터의 적혈구의 용해에 미치는 항-MASP-2 항체의 영향을 평가하는 방법을 기술한다.
- [0764] **방법:**
- [0765] **시약:**
- [0766] 정상 도너 및 PNH를 앓고 있는 환자 (Soliris로 치료되지 않음)로부터의 적혈구를 정맥 천공에 의해 얻어서, Wilcox, L.A. 등에 의해 기술된 것과 같이 제조하였다 (*Blood* 78:820-829 (1991), 본원에 참조로 포함됨). 렉틴 경로의 기능적 차단 활성이 있는 항-MASP-2 항체를 실시예 10에서 기술된 것과 같이 생성하였다.
- [0767] **용혈 분석:**
- [0768] PNH 환자로부터의 적혈구의 용혈을 차단하는 능력에 미치는 항-MASP-2 항체의 영향을 측정하는 방법을 Lindorfer, M.A., et al., *Blood* 15(11):2283-91 (2010) 및 Wilcox, L.A., et al., *Blood* 78:820-829 (1991) (두 참고문헌 모두 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 방법을 사용하여 수행한다. Lindorfer 등이 기술한 것과 같이, PNH 환자 샘플로부터의 적혈구를 원심분리하고, 버피 코트를 흡인하고 세포를 젤라틴 베로날 완충액 (GVB)으로 세척한 후 각각의 실험을 하였다. 적혈구를 다음과 같이 APC-매개 용해에 대한 민감성에 대해 테스트한다. ABO-매칭 정상 인간 혈청을 0.15 mM CaCl₂ 및 0.5 mM MgCl₂ (GVB⁴²)를 함유한 GVB로 희석하고 pH 6.4로 산성화하여 (산성화된 NHS, aNHS) 적혈구를 50% aNHS로 1.6%의 헤마토크릿으로 재구성하는 데 사용하였다. 그런 후 혼합물을 37°C에서 인큐베이션하고, 1시간 후, 적혈구를 원심분리에 의해 펠릿화한다. 회수된 상층액의 부분표본의 광학 밀도를 405 nM에서 측정하고 용해율을 계산하는 데 사용한다. 산성화된 혈청-EDTA로 재구성된 샘플을 유사하게 처리하고 배경 비보체-매개 용해 (전형적으로 3% 미만)를 정의하기 위해 사용한다. 적혈구를 증류수에서 인큐베이션한 후에 완전한 용해 (100%)를 측정한다.
- [0769] PNH 적혈구의 용혈에 미치는 항-MASP-2 항체의 영향을 측정하기 위하여, PNH 환자로부터의 적혈구를 증분 농도의 항-MASP-2 항체의 존재 하에 aNHS에서 인큐베이션하고, 용혈의 존재/양을 계속해서 정량화한다.
- [0770] 항-MASP-2 항체가 대체 보체 경로의 후속 활성화를 차단한 것으로 밝혀진 사실의 견지에서, 항-MASP-2 항체는 PNH 적혈구의 대체 경로-매개 용혈을 차단하는 데 효과적인 것이고, PNH를 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 치료제로서 유용할 것이라고 예상된다.
- [0771] **실시예 25**
- [0772] 이 실시예는 한랭글로불린혈증(cryoglobulinemia)을 앓고 있는 환자로부터 얻어진 혈액 샘플에서 한랭글로불린(cryoglobulin)에 의한 보체 활성화에 미치는 항-MASP-2 차단 항체의 영향을 평가하는 방법을 기술한다.
- [0773] **배경/근거:**
- [0774] 한랭글로불린혈증은 혈청의 한랭글로불린의 존재를 특징으로 한다. 한랭글로불린은 저온에서 가역적인 응집을 진행하는 단일 또는 복합 면역글로불린 (전형적으로 IgM 항체)이다. 응집은 혈관 베드에서, 특히 말초에서 고전적 경로 보체 활성화 및 염증으로 이어진다. 한랭글로불린혈증의 임상적 표시로는 혈관염 및 사구체신염을 들 수 있다.
- [0775] 한랭글로불린혈증은 한랭글로불린 조성을 토대로 다음과 같이 분류될 수 있다: 유형 I 한랭글로불린혈증, 또는 단순 한랭글로불린혈증은 단클론성 면역글로불린, 보통 면역글로불린 M (IgM)의 결과이며; 유형 II 및 III 한랭글로불린혈증 (복합 한랭글로불린혈증)은 류머티스 인자 (RF)를 함유하고, 다클론성 IgG의 Fc 부분과의 복합체

에서 보통 IgM이다.

- [0776] 한랭글로불린혈증과 관련된 상태로는 C형 간염 감염, 림프증식성 장애 및 기타 자가면역 질환을 들 수 있다. 한랭글로불린-함유 면역 복합체는 아마도 보체를 활성화하는 능력으로 인해 전신성 염증의 임상 증후군을 초래한다. IgG 면역 복합체는 일반적으로 보체의 고전적 경로를 활성화하며, IgM 함유 복합체는 또한 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화할 수 있다 (Zhang, M., et al., *Mol Immunol* 44(1-3):103-110 (2007) 및 Zhang, M., et al., *J. Immunol.* 177(7):4727-34 (2006)).
- [0777] 면역조직학적 연구는 추가로 한랭글로불린 면역 복합체가 렉틴 경로의 구성요소를 함유하는 것을 입증하였고, 한랭글로불린혈증증 사구체신염 환자로부터의 생검은 제자리에서 렉틴 경로 활성화의 면역조직학적 증거를 보였다 (Ohsawa, I., et al., *Clin Immunol* 101(1):59-66 (2001)). 이들 결과는 렉틴 경로가 한랭글로불린혈증 질환에서 염증 및 불리한 결과에 기여할 수 있음을 시사한다.
- [0778] **방법:**
- [0779] 한랭글로불린혈증의 불리한 효과를 차단하는 능력에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 측정하는 방법을 Ng Y.C. et al., *Arthritis and Rheumatism* 31(1):99-107 (1988) (본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 것과 같이 유동상 C3 전환에 대한 검정을 사용하여 수행한다. Ng 등에 의해 기술된 것과 같이, 본태성 복합 한랭글로불린혈증 (EMC) 에서, 단클론성 류머티스 인자 (mRF), 일반적으로 IgM은 다클론성 IgG와 복합체를 형성하여 특징적인 한랭침전물 면역 복합체 (IC) (유형 II 한랭글로불린)를 형성한다. 면역글로불린 및 C3은 피부, 신경 및 신장과 같은 병 등 조직의 혈관 벽에서 침착되었다. Ng 등에 의해 기술된 것과 같이, ¹²⁵I-표지된 mRF를 혈청 (정상 인간 혈청 및 한랭글로불린혈증을 앓고 있는 환자로부터 얻어진 혈청)에 첨가하고, 37℃에서 인큐베이션하고, 적혈구에 대한 결합을 측정한다.
- [0780] 유동상 C3 전환율을 혈청 (정상 인간 혈청 및 한랭글로불린혈증을 앓고 있는 환자로부터 얻어진 혈청)에서 항-MASP-2 항체의 존재 또는 부재 하에 다음의 IC의 존재 또는 부재 하에 측정한다: BSA-항 BSA, mRF, mRF 플러스 IgG, 또는 한랭글로불린. C3 및 C4의 IC에 대한 고정된 F(ab')₂ 항-C3 및 F(ab')₂ 항-C4를 사용한 동시침전 검정을 사용하여 측정한다.
- [0781] 항-MASP-2 항체가 렉틴 경로의 활성화를 차단하는 것으로 밝혀진 사실의 견지에서 항-MASP-2 항체는 한랭글로불린혈증과 관련된 보체 매개된 부작용을 차단하는 데 효과적일 것이고, 한랭글로불린혈증을 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 치료제로서 유용할 것이라고 예상된다.
- [0782] **실시예 26**
- [0783] 이 실시예는 빈혈로서 나타나는 저온 응집소 질환(Cold Agglutinin Disease)이 있는 환자로부터 얻어진 혈액 샘플에 대한 항-MASP-2 항체의 영향을 평가하는 방법을 기술한다.
- [0784] **배경/근거:**
- [0785] 저온 응집소 질환 (CAD)은 자가면역 용혈성 빈혈의 유형이다. 저온 응집소 항체 (일반적으로 IgM)는 저온에 의해 활성화되고 적혈구에 결합하여 적혈구를 응집시킨다. 저온 응집소 항체는 보체와 조합하여 적혈구 표면 상의 항원을 공격한다. 이것은 망상 내피계에 의한 그것의 제거를 촉발시키는 적혈구의 옅소닌화 (용혈)로 이어진다. 응집이 일어나는 온도는 환자별로 달라진다.
- [0786] CAD는 빈혈로서 나타난다. 적혈구 파괴의 파괴 속도가 골수의 적당한 수의 산소 운반 세포 생성 능력을 초과하면 빈혈이 발생한다. CAD는 "이차 CAD"로서 언급되는 기저 질환 또는 장애, 예컨대 감염성 질환 (마이코플라스마 페렴(*mycoplasma pneumonia*), 유행성 이하선염(mumps), 단핵구증(mononucleosis)), 림프증식성 질환 (림프종, 만성 림프구성 백혈병), 또는 결합 조직 장애에 의해 유발될 수 있다. 일차 CAD 환자는 저등급 림프증식성 골수 장애를 가지는 것으로 여겨진다. 일차 및 이차 CAD 모두 후천적 상태이다.
- [0787] **방법:**
- [0788] **시약:**
- [0789] 정상 도너 및 CAD를 앓고 있는 환자로부터의 적혈구를 정맥 천공에 의해 얻는다. 렉틴 경로의 기능적 차단 활성을 가진 항-MASP-2 항체는 실시예 10에서 기술된 것과 같이 생성될 수 있다.
- [0790] 저온 응집소-매개 렉틴 경로의 활성화를 차단하는 항-MASP-2 항체의 효과를 다음과 같이 측정할 수 있다. 혈액

그룹 I 양성 환자로부터의 적혈구를 항-MASP-2 항체의 존재 또는 부재 하에 저온 응집소 (즉, IgM 항체)로 감작시킨다. 그런 후 적혈구를 C3 결합을 측정함으로써 력틴 경로를 활성화하는 능력에 대해 테스트한다.

[0791] 항-MASP-2 항체가 력틴 경로의 활성화를 차단하는 것으로 밝혀진 사실의 견지에서, 항-MASP-2 항체는 저온 응집소 질환과 관련된 보체 매개 부작용을 차단하는 데 효과적인 것이고, 저온 응집소 질환을 앓고 있는 환자를 치료하기 위한 치료제로서 유용할 것이라고 예상된다.

[0792] **실시예 27**

[0793] 이 실시예는 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)이 있는 마우스로부터 얻어진 혈액 샘플에서 적혈구의 용해에 미치는 항-MASP-2 항체의 영향을 평가하는 방법을 기술한다.

[0794] **배경/근거:**

[0795] 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)은 신장 및 다른 장기의 미세순환에서 용혈성 빈혈, 혈소판 감소증, 및 혈소판 혈전에 의해 유발된 신부전을 특징으로 한다. aHUS는 결합이 있는 보체 조절과 관련되고 산발적이거나 가족력이 있을 수 있다. aHUS는 보체 인자 H, 막 보조인자 B 및 인자 I, 뿐만 아니라 보체 인자 H-관련 1 (CFHR1) 및 보체 인자 H-관련 3 (CFHR3)을 포함한, 보체 활성화를 코딩하는 유전자의 돌연변이와 관련된다. Zipfel, P.F., et al., *PLoS Genetics* 3(3):e41 (2007). 이 실시예는 aHUS 마우스로부터 얻어진 혈액 샘플로부터의 적혈구의 용해에 미치는 항-MASP-2 항체의 영향을 평가하는 방법을 기술한다.

[0796] **방법:**

[0797] aHUS를 치료하는 항-MASP-2 항체의 효과는 내인성 마우스 fH 유전자가 aHUS 환자에서 자주 발견되는 fH의 돌연변이 형태를 암호화하는 인간 유사체로 대체되어 있는 이 질환의 마우스 모델에서 측정할 수 있다. Pickering M.C. et al., *J. Exp. Med.* 204(6):1249-1256 (2007) (참조로 본원에 포함됨) 참고. Pickering 등에 의해 기술된 것과 같이, 그러한 마우스는 aHUS 유사 병리를 나타낸다. aHUS의 치료를 위한 항-MASP-2 항체의 영향을 평가하기 위하여, 항-MASP-2 항체를 돌연변이 aHUS 마우스에 투여하고 항-MASP-2 ab 처리된 및 미처리 대조군으로부터 얻어진 적혈구의 용해를 비교한다. 항-MASP-2 항체가 력틴 경로의 활성화를 차단하는 것이 밝혀진 사실의 견지에서 항-MASP-2 항체는 aHUS를 앓고 있는 폐유류 대상체에서 적혈구의 용해를 차단하는 데 효과적인 것으로 예상된다.

[0798] **실시예 28**

[0799] 이 실시예는 녹내장(glaucoma)의 치료를 위한 항-MASP-2 항체의 효과를 평가하는 방법을 기술한다.

[0800] **근거/배경:**

[0801] 제어되지 않은 보체 활성화는 녹내장에서 망막 신경절 세포 (RGC), 그것의 시냅스 및 축삭에 대한 축퇴성 손상의 진행에 기여하는 것으로 밝혀졌다. Tezel G. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5071-5082 (2010) 참고. 예를 들어, 인간 조직의 조직병리학적 연구 및 상이한 동물 모델을 사용하는 생체내 연구는 C1q 및 C3을 포함한 보체 구성요소가 합성되고 말단 보체 복합체가 녹내장 망막에서 형성되는 것을 입증하였다 (Stasi K. et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1024-1029 (2006), Kuehn M.H. et al., *Exp Eye Res* 83:620-628 (2006) 참고). 추가로 Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research* 87:89-95 (2008)에서 기술된 것과 같이, 보체 합성 및 침착은 망막의 I/R에 의해 유도되고 보체 캐스케이드의 파괴는 RGC 변성을 지연시킨다. 이 연구에서, 보체 구성요소 C3의 표적화된 파괴를 내포하고 있는 마우스는 정상 동물과 비교했을 때 일시적인 망막 I/R 후에 지연된 RGC 변성을 나타내는 것으로 나타났다.

[0802] **방법:**

[0803] RGC 변성에 미치는 항-MASP-2 항체의 영향을 측정하는 방법을 Kuehn M.H. et al., *Experimental Eye Research* 87:89-95 (2008) (본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 것과 같이 망막 I/R의 동물 모델에서 수행한다. Kuehn 등이 기술한 것과 같이, 망막의 허혈은 동물을 마취시킨 후, 인산염 완충 식염수를 함유한 저장소에 연결된 30 게이지 바늘을 각막을 통해 눈의 전실로 삽입시킴으로써 유도된다. 식염수 저장소는 그런 후 망막 혈관구조를 통한 순환을 완전히 방지하기에 충분한 104 mmHg의 안내 압력을 생성하도록 상승된다. 상승된 안내 허혈을 홍채 및 망막의 창백현상(blanching)에 의해 확인하고 허혈을 좌측 눈에서만 45분 동안 유지시킨다; 우측 눈은 대조군으로서 작용하고 삽관을 받지 않는다. 그런 후 마우스를 허혈 손상 후 1주 또는 3주 후에 안락사시킨다. 항-MASP-2 항체를 마우스에 국소적으로 눈에 또는 전신적으로 투여하여 허혈 손상 전에 투여된 항-MASP 항체의 영

향을 평가한다.

- [0804] 눈의 면역조직화학을 C1q 및 C3에 대한 항체를 사용하여 수행함으로써 보체 침착을 검출한다. 시신경 손상은 또한 표준 전자 현미경 검사법을 사용하여 평가될 수 있다. 살아남은 망막 RGC의 정량화를 감마 시누클레인 표지화를 사용하여 수행한다.
- [0805] **결과:**
- [0806] Kuehn 등이 기술한 것과 같이, 정상 대조군 마우스에서, 일시적인 망막 허혈은 면역조직화학에 의해 검출할 수 있는 시신경 및 C1q 및 C3의 망막 침전물의 축퇴성 변화를 초래한다. 대조적으로, C3 결핍 마우스는 축삭 변성의 현저한 감소를 나타냈고, 유도 후 1주 후에 경미한 수준의 시신경 손상만을 나타냈다. 이들 결과를 토대로, 이 검정이 MASP-2 녹아웃 마우스에서 수행될 때, 그리고 항-MASP-2 항체가 허혈 손상 전에 정상 마우스에게 투여될 때 유사한 결과가 관찰될 수 있을 것으로 예상된다.
- [0807] **실시예 29**
- [0808] 이 실시예는 MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체가 방사선 노출의 치료를 위해 및/또는 급성 방사선 증후군 (acute radiation syndrome)의 치료, 개선 또는 예방을 위해 효과적인 것을 입증한다.
- [0809] **근거:**
- [0810] 고용량의 이온화 방사선에 대한 노출은 2가지 주요 메커니즘: 골수에 대한 독성 및 위장 증후군 (gastrointestinal syndrome)에 의해 사망을 유발한다. 골수 독성은 모든 혈액학적 세포의 강하를 초래하여 유기체를 감염 및 출혈에 의해 사망에 이르게 한다. 위장 증후군은 보다 중증이며 장 상피층의 붕괴로 인한 장 장벽 기능의 상실 및 장 내분비 기능의 상실에 의해 구동된다. 이것은 패혈증 및 사망을 초래할 수 있는 관련된 전신성 염증 반응 증후군으로 이어진다.
- [0811] 보체의 렉틴 경로는 조직 손상 및 외래 표면 (즉, 박테리아)에 대한 노출에 대한 반응으로 염증반응을 시작하는 선천성 면역 메커니즘이다. 이 경로의 차단은 허혈성 장 조직 손상 또는 패혈성 쇼크의 마우스 모델에서 더 나은 결과로 이어진다. 렉틴 경로는 방사선-유도 조직 손상에 대한 반응으로 과도하고 해로운 염증을 촉발할 수 있는 것으로 가설이 세워진다. 그러므로 렉틴 경로의 차단은 이차 손상을 줄일 수 있고 급성 방사선 노출 후 생존율을 증가시킬 수 있다.
- [0812] 이 실시예에서 기술된 연구 수행의 목적은 항-쥐과 MASP-2 항체를 투여함으로써 방사선 손상의 마우스 모델에서 생존율에 미치는 렉틴 경로 차단의 영향을 평가하는 것이었다.
- [0813] **방법 및 물질:**
- [0814] **물질.** 이 연구에서 사용된 테스트 물질은 트랜스펙션된 포유류 세포에서 생성된 렉틴 보체 경로의 MASP-2 단백질 구성요소를 차단하는 (i) 고친화성 항-쥐과 MASP-2 항체 (mAbM11) 및 (ii) 고친화성 항-인간 MASP-2 항체 (mAbH6)였다. 투약 농도는 1 mg/kg의 항-쥐과 MASP-2 항체 (mAbM11), 5 mg/kg의 항-인간 MASP-2 항체 (mAbH6), 또는 멸균 식염수였다. 각각의 투약 세션에 대해, 적당한 부피의 신선한 투약 용액을 제조하였다.
- [0815] **동물.** 젊은 성체 수컷 Swiss-Webster 마우스를 Harlan Laboratories (Houston, TX)로부터 얻었다. 동물을 알파-Dri 침구가 있는 딱딱한-바닥 케이지에 하우징하고 인증된 PMI 5002 설치류 다이어트 (Animal Specialties, Inc., Hubbard OR) 및 물을 임의로 제공하였다. 온도는 모니터링하고 동물 보유실을 12시간 조명/12시간 암광 사이클로 조작하였다.
- [0816] **방사선 조사.** 시설에서 2주간의 적응 후에, 마우스를 10마리씩의 그룹에서 320-kV 고안정성 X-선 발생기, 금속 세라믹 X-선 튜브, 가변 x-선 빔 콜리메이터 (beam collimator) 및 필터가 장착된 Therapax X-RAD 320 시스템 (Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT)을 사용하여 0.78 Gy/분의 선량률로 6.5 및 7.0 Gy에 전신 노출에 의해 방사선을 조사하였다. 선량 수준을 LD_{50/30}이 6.5 내지 7.0 Gy (데이터 미제시)였음을 나타내는 동일한 마우스 스트레인으로 수행한 선행 연구를 토대로 선택하였다.
- [0817] **약물 제형 및 투여.** 적절한 부피의 농축된 스톱 용액을 얼음처럼 저온의 식염수로 희석하여 프로토콜을 따라 0.2 mg/ml의 항-쥐과 MASP-2 항체 (mAbM11) 또는 0.5 mg/ml의 항-인간 MASP-2 항체 (mAbH6)의 투약 용액을 제조하였다. 항-MASP-2 항체 mAbM11 및 mAbH6의 투여는 1 mg/kg mAbM11, 5mg/kg mAbH6, 또는 식염수 비히클을 전달하기 위하여 동물 체중을 토대로 25 게이지 바늘을 사용한 복강내 주사를 통해 투여하였다.

[0818] 연구 설계. 마우스를 표 8에서 기술된 것과 같이 무작위로 그룹에 배정하였다. 매일 체중 및 체온을 측정하고 기록하였다. 그룹 7, 11 및 13의 마우스를 조사 후 7일 제에 희생시키고 깊은 마취 하에 심장 천공에 의해 혈액을 수집하였다. 조사 후 30일 후에 생존한 동물을 동일한 방식으로 희생시키고 혈액을 수집하였다. 혈장을 프로토콜에 따라 수집된 혈액 샘플로부터 제조하고 분석을 위해 스폰서에게 반환하였다.

표 8

[0819] 연구 그룹

그룹 ID	수	조사 수준 (Gy)	치료	용량 스케줄
1	20	6.5	비히클	조사 전 18시간 전, 조사 후 2시간 후, 주마다 부스터
2	20	6.5	항-쥐과 MASP-2 ab(mAbM11)	조사 전 18시간 전에만
3	20	6.5	항-쥐과 MASP-2 ab(mAbM11)	조사 전 18시간 전, 조사 후 2시간 후, 주마다 부스터
4	20	6.5	항-쥐과 MASP-2 ab(mAbM11)	조사 후 2시간 후, 주마다 부스터
5	20	6.5	항-인간 MASP-2 ab(mAbH6)	조사 전 18시간 전, 조사 후 2시간 후, 주마다 부스터
6	20	7.0	비히클	조사 전 18시간 전, 조사 후 2시간 후, 주마다 부스터
7	5	7.0	비히클	조사 후 2시간 후에만
8	20	7.0	항-쥐과 MASP-2 ab(mAbM11)	조사 전 18시간 전에만
9	20	7.0	항-쥐과 MASP-2 ab(mAbM11)	조사 전 18시간 전, 조사 후 2시간 후, 주마다 부스터
10	20	7.0	항-쥐과 MASP-2 ab(mAbM11)	조사 후 2시간 후, 주마다 부스터
11	5	7.0	항-쥐과 MASP-2 ab(mAbM11)	조사 후 2시간 후에만
12	20	7.0	항-인간 MASP-2 ab(mAbH6)	조사 전 18시간 전, 조사 후 2시간 후, 주마다 부스터
13	5	없음	없음	없음

[0820] 통계적 분석. 카플란-마이어 생존 곡선을 생성하여 로그 순위 및 윌콕슨 방법을 사용하여 치료 그룹간 평균 생존 시간을 계산하는 데 사용하였다. 표준 편차가 있는 평균, 또는 평균의 표준 오차가 있는 평균을 기록한다. 통계적 비교를 제어된 조사된 동물과 개별 치료 그룹 사이의 양측 쌍이 없는 t-테스트(two-tailed unpaired t-test)를 사용하여 비교하였다.

[0821] 결과

[0822] 7.0 및 6.5 Gy 노출 그룹에 대한 카플란-마이어 생존 플롯을 각각 도 32A 및 32B에 제공하며, 아래의 표 9에서 요약한다. 전체적으로, 조사 전 항-쥐과 MASP-2 ab (mAbM11)로의 치료는 6.5 (20% 증가) 및 7.0 Gy (30% 증가) 노출 수준에서 모두 비히클 처리되고 조사된 대조군 동물에 비교하여 조사된 마우스의 생존율을 증가시켰다. 6.5 Gy 노출 수준에서, 항-쥐과 MASP-2 ab로의 조사 후 치료는 비히클 대조군 조사된 동물에 비교하여 생존의 보통의 증가 (15%)를 초래하였다.

[0823] 비교하면, 7.0 Gy 노출 수준에서 치료된 모든 동물은 비히클 치료된 조사된 대조군 동물에 비교하여 생존율의 증가를 보였다. mAbH6을 받은 동물에서 발생한 생존율의 가장 큰 변화는 대조군 동물과 비교하여 45% 증가였다. 추가로, 7.0 Gy 노출 수준에서, mAbH6 치료된 그룹에서 사망은 비히클 치료된 조사된 대조군 동물의 경우 조사 후 8일 후와 비교하여 조사 후 15일 후에 처음 발생하였고, 대조군 동물보다 7일이 증가하였다. mAbH6을 받은 마우스의 경우 사망에 이르는 평균 시간 (27.3 ± 1.3 일)은 7.0 Gy 노출 수준에서 대조군 동물 (20.7 ± 2.0 일)에 비교하여 상당히 증가하였다 ($p = 0.0087$).

[0824] 조사 전 일 (-1일)과 비교하여 체중의 변화율을 연구 기간 내내 기록하였다. 일시적인 체중 손실이 모든 조사된 동물에서 발생하였고, 대조군과 비교하여 mAbM11 또는 mAbH6 치료로 인한 차등 변화의 증거는 없었다 (데이터 미제시). 연구를 종결했을 때, 모든 생존 동물은 출발 (-1일) 체중으로부터 체중의 증가를 보였다.

표 9

[0825] 방사선에 노출된 테스트 동물의 생존율

테스트 그룹	노출 수준	생존율 (%)	사망에 이르는 시간 (평균 ± 표준편차, 일)	최초/마지막 사망 (일)
대조군 조사	6.5 Gy	65 %	24.0 ± 2.0	9/16
mAbM11 노출 전	6.5 Gy	85 %	27.7 ± 1.5	13/17
mAbM11 노출 전 + 후	6.5 Gy	65 %	24.0 ± 2.0	9/15
mAbM11 노출 후	6.5 Gy	80 %	26.3 ± 1.9	9/13
mAbH6 노출 전 + 후	6.5 Gy	65 %	24.6 ± 1.9	9/19
대조군 조사	7.0 Gy	35 %	20.7 ± 2.0	8/17
mAbM11 노출 전	7.0 Gy	65 %	23.0 ± 2.3	7/13
mAbM11 노출 전 + 후	7.0 Gy	55 %	21.6 ± 2.2	7/16
mAbM11 노출 후	7.0 Gy	70 %	24.3 ± 2.1	9/14
mAbH6 노출 전 + 후	7.0 Gy	80 %	27.3 ± 1.3*	15/20

[0826] *p = 0.0087, 동일한 조사 노출 수준에서 제어된 조사된 동물과 치료 그룹 사이의 양측 쌍이 없는 t-테스트에 의함.

[0827] 논의

[0828] 급성 방사선 증후군은 3가지의 규명된 하위증후군으로 이루어진다: 조혈성, 위장, 및 뇌혈관. 관찰된 증후군은 방사선 용량에 좌우되며, 조혈 효과는 인간에서 1 Gy를 초과하는 상당한 부분적 또는 전신 방사선 노출로 관찰되었다. 조혈 증후군은 면역 체계에 대한 손상과 동시에 발생하는 혈액 카운트, 적혈구 및 백혈구, 및 혈소판의 변화가 있는 범혈구감소증(pancytopenia)으로 이어지는 골수 기능의 심각한 침체를 특징으로 한다. 최악의 순간(nadir)이 발생함에 따라, 말초혈, 호중구 감소증, 열, 패혈증의 합병증 및 제어할 수 없는 출혈에 존재하는 호중구 및 혈소판의 적은 수는 사망으로 이어진다.

[0829] 본 연구에서, mAbH6의 투여는 7.0 Gy에서 조사된 Swiss-Webster 수컷 마우스에서 전신 x-선 조사의 생존성을 증가시키는 것으로 나타났다. 특히, 7.0 Gy 노출 수준에서, 비히클 처리된 대조군 조사된 동물의 35%와 비교하여 mAbH6을 받은 동물의 80%가 30일까지 생존하였다. 중요하게, 이 치료 그룹에서 사망의 최초일은 조사 후 15일이 될 때까지 발생하지 않았고, 비히클 처리된 대조군 조사된 동물에서 관찰된 것보다 7일이 증가한 것이다. 흥미롭게도, 더 낮은 X-선 노출 (6.5 Gy)에서, mAbH6의 투여는 비히클 처리된 대조군 조사된 동물과 비교하여 생존성에 영향을 미치지거나 사망을 지연시키지는 않은 것으로 나타났다. 비록 임의의 가설의 검증이 미생물학적 배양 및 혈액학적 파라미터에 대한 잠정적 샘플 수집을 포함하여 추가 연구를 필요로 할 수 있겠지만, 노출 수준간 반응의 이런 차이에 대해서는 다수의 이유가 있을 수 있다. 한 가지 설명은 단순히 그룹에 배정된 동물의 수가 어떠한 미묘한 치료 관련 차이를 보는 것을 방해할 수 있다는 것일 수 있다. 예를 들어, n=20마리 크기의 그룹의 경우, 65% (6.5 Gy 노출에서 mAbH6)와 80% (7.0 Gy 노출에서 mAbH6) 사이의 생존의 차이는 3마리 동물이다. 다른 한편으로, the difference between 35% (7.0 Gy 노출에서 비히클 대조군)와 80% (7.0 Gy 노출에서 mAbH6) 사이의 차이는 9마리 동물이며, 치료 관련 차이의 확실한 증거를 제공한다.

[0830] 이들 결과는 항-MASP-2 항체가 급성 방사선 증후군의 발병 위험이 있거나, 또는 해로운 영향으로 고생하는 포유류 대상체를 치료하는 데 효과적인 것을 입증한다.

[0831] 실시예 30

[0832] 이 실시예는 MASP-2 결핍 마우스가 수막염군 혈청군 A 또는 나이세리아 메닝기티디스 혈청군 B로의 감염 후 나이세리아 메닝기티디스 유도 사망으로부터 보호되는 것을 입증한다.

[0833] 방법:

[0834] MASP-2 녹아웃 마우스 (MASP-2 KO 마우스)를 실시예 1에서 기술된 것과 같이 생성하였다. 생후 10주령의 MASP-2 KO 마우스 (n=10마리) 및 야생형 (WT) C57/BL6 마우스 (n=10마리)를 100 μ l의 부피 중의 2.6×10^7 cfu의 나이세리아 메닝기티디스 혈청군 A Z2491의 투여량으로 복강내 (i.p.) 주사에 의해 접종하였다. 감염 용량을 400 mg/kg의 최종 용량으로 철 텍스트란과 함께 마우스에게 투여하였다. 감염 후 마우스의 생존을 72시간 기간 동안 모니터링하였다.

[0835] 별도의 실험으로, 생후 10주령의 MASP-2 KO 마우스 (n=10마리) 및 야생형 C57/BL6 마우스 (n=10마리)를 100 μ l의 부피 중의 6×10^6 cfu의 나이세리아 메닝기티디스 혈청군 B 스트레인 MC58의 투여량으로 복강내 주사에 의해 접종하였다. 감염 용량을 400 mg/kg의 최종 용량으로 철 텍스트란과 함께 마우스에게 투여하였다. 감염 후 마우스의 생존을 72시간 기간 동안 모니터링하였다. 또한 감염 후 72시간 기간 동안의 질병 점수를, 아래의 표 10에 기술된, Fransen 등 (2010)의 계획을 토대로 하고 약간 변형시킨 질병 채점 파라미터를 토대로 WT 및 MASP-2 KO 마우스에 대해 측정하였다.

표 10

[0836] 감염된 마우스에서 임상 신호와 관련된 질병 채점

신호	점수
정상	0
약간 주름진 털	1
주름진 털, 느리고 달라붙는 눈	2
주름진 털, 무기력하고 눈을 감음	3
자극 후 매우 아프고 움직임이 없음	4
사망	5

[0837] 혈액 샘플을 감염 후 매시간마다 마우스로부터 취하여 수막염균의 혈청 수준 (로그 cfu/mL)을 측정하여 감염을 검증하고 혈청으로부터 박테리아의 제거율을 측정하였다.

[0838] 결과:

[0839] 도 33은 2.6×10^7 cfu의 수막염균 혈청군 A Z2491의 감염 용량의 투여 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 생존율을 그래프로 도시하는 카플란-마이어 플롯이다. 도 33에서 나타난 것과 같이, 100%의 MASP-2 KO 마우스가 감염 후 72시간 기간 내내 생존하였다. 대조적으로, WT 마우스의 80% ($p=0.012$)만이 감염 후 24시간까지 살아 있었고, WT 마우스의 50%만이 감염 후 72시간 내에 살아 있었다. 이들 결과는 MASP-2-결핍 마우스가 수막염균 혈청군 A Z2491-유도 사망으로부터 보호되는 것을 입증한다.

[0840] 도 34는 6×10^6 cfu의 수막염균 혈청군 B 스트레인 MC58의 감염 용량의 투여 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 생존율을 그래프로 도시하는 카플란-마이어 플롯이다. 도 34에서 나타난 것과 같이, 90%의 MASP-2 KO 마우스가 감염 후 72시간 기간 내내 생존하였다. 대조적으로, WT 마우스의 20% ($p=0.0022$)만이 감염 후 24시간까지 살아 있었다. 이들 결과는 MASP-2-결핍 마우스가 수막염균 혈청군 B 스트레인 MC58-유도 사망으로부터 보호되는 것을 입증한다.

[0841] 도 35는 6×10^6 cfu의 수막염균 혈청군 B 스트레인 MC58로의 복강내 감염 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스로부터 취한 혈액 샘플에서 상이한 시점에 회수된 수막염균 혈청군 B 스트레인 MC58의 로그 cfu/mL을 그래프로 도시한다 (두 그룹의 마우스에 대해 상이한 시점에 n=3마리). 결과를 평균 $\pm$ SEM으로서 표시한다. 도 35에서 나타난 것과 같이, WT 마우스에서 혈액 중의 수막염균의 수준은 감염 후 24시간 내에 약 6.0 로그 cfu/mL의 피크에 도달하였고 감염 후 36시간 후에는 약 4.0 로그 cfu/mL로 떨어졌다. 대조적으로, MASP-2 KO 마우스에서, 수막염균의 수준은 감염 후 12시간 내에 약 4.0 로그 cfu/mL의 피크에 도달하였고 감염 후 36시간 후에 약 1.0 로그 cfu/mL로 떨어졌다 (기호 "*"는 $p<0.05$ 를 나타내고; 기호 "***"는 $p=0.0043$ 을 나타냄). 이들 결과는 비록 MASP-2 KO 마우스가 WT 마우스와 동일한 용량의 수막염균 혈청군 B 스트레인 MC58로 감염되었을지라도, MASP-2 KO 마우스는 WT와 비교하여 향상된 균혈증의 제거율을 가졌음을 입증한다.

[0842] 도 36은 6×10^6 cfu의 수막염균 혈청군 B 스트레인 MC58로의 감염 후 3, 6, 12 및 24시간 내에 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 평균 질병 점수를 그래프로 도시한다. 도 36에서 나타난 것과 같이, MASP-2-결핍 마우스는 감염에 대해 높은 저항성을 보였으며, WT 마우스와 비교하여 감염 후 6시간 (기호 "*"는 $p=0.0411$ 을 나타냄), 12시간 (기호 "***"는 $p=0.0049$ 를 나타냄) 및 24시간 (기호 "****"는 $p=0.0049$ 를 나타냄) 내에 훨씬 더 낮은 질병 점수를 보였다. 도 36의 결과는 평균 $\pm$ SEM으로서 표시된다.

[0843] 요약하면, 이 실시예의 결과는 MASP-2-결핍 마우스가 수막염균 혈청군 A 또는 수막염균 혈청군 B로의 감염 후 나이세리아 메닝기티디스-유도 사망으로부터 보호되는 것을 입증한다.

- [0844] **실시예 31**
- [0845] 이 실시예는 수막염균으로의 감염 후 항-MASP-2 항체의 투여가 수막염균으로 감염된 마우스의 생존율을 증가시키는 것을 입증한다.
- [0846] **배경/근거:**
- [0847] 실시예 10에서 기술된 것과 같이, 래트 MASP-2 단백질을 활용하여 Fab 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하고, 그것으로부터 Fab2 #11을 기능적 활성 항체로서 확인하였다. 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 아이소타입의 전장 항체를 Fab2 #11로부터 생성하였다. 마우스 IgG2a 아이소타입의 전장 항-MASP-2 항체를 약력학적 파라미터에 대해 특성화하였다 (실시예 19에서 기술된 것과 같음).
- [0848] 이 실시예에서, Fab2 #11로부터 유래된 마우스 항-MASP-2 전장 항체를 수막염균 감염의 마우스 모델에서 분석하였다.
- [0849] **방법:**
- [0850] 상기와 같이 생성된, Fab2 #11로부터 유래된 마우스 IgG2a 전장 항-MASP-2 항체 아이소타입을 다음과 같이 수막염균 감염의 마우스 모델에서 테스트하였다.
- [0851] **감염 후 마우스-항-MASP-2 단클론성 항체 (MoAb) 의 투여**
- [0852] 생후 9주령의 Charles River 마우스를 고용량 (4×10^6 cfu)의 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58로 복강내 주사한 후 3시간 후에 억제 마우스 항-MASP-2 항체 (1.0 mg/kg) (n=12마리) 또는 대조군 아이소타입 항체 (n=10마리)로 처리하였다.
- [0853] **결과:**
- [0854] 도 37은 감염 용량의 4×10^6 cfu의 수막염균 혈청균 B 스트레인 MC58을 투여하고, 이어서 감염 후 3시간 후에 억제 항-MASP-2 항체 (1.0 mg/kg) 또는 대조군 아이소타입 항체를 투여한 후 마우스의 생존율을 그래프로 도시하는 카플란-마이어 플롯이다. 도 37에서 나타난 것과 같이, 항-MASP-2 항체로 처리된 마우스의 90%가 감염 후 72시간 기간 내내 생존하였다. 대조군으로, 아이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스의 50%만이 감염 후 72시간 기간 내내 생존하였다. 기호 "*"는 두 생존 곡선의 비교에 의해 측정된 바, $p=0.0301$ 을 나타낸다.
- [0855] 이들 결과는 항-MASP-2 항체의 투여가 수막염균으로 감염된 대상체를 치료하고 생존율을 개선하는 데 효과적인 것을 입증한다.
- [0856] 본원에서 입증된 것과 같이, 수막염균으로 감염된 대상체의 치료에서 항-MASP-2 항체의 사용은 감염 후 3시간 이내에 투여될 때 효과적이며, 감염 후 24시간 내지 48시간 내에 효과적일 것으로 예상된다. 수막구균성 질환 (수막알균혈증 또는 수막염)은 의료적 응급상황이고, 그러므로 전형적으로 수막구균성 질환이 의심되면 즉시 (즉, 수막염균이 병인으로서 양성으로 확인되기 전에) 치료가 시작될 것이다.
- [0857] 실시예 30에서 입증된 MASP-2 KO 마우스에서의 결과의 관점에서, 수막염균으로의 감염 전에 항-MASP-2 항체의 투여는 또한 감염의 중증도를 방지 또는 개선하는 데 효과적일 수 있을 것으로 여겨진다.
- [0858] **실시예 32**
- [0859] 이 실시예는 항-MASP-2 항체의 투여가 인간 혈청의 수막염균 감염을 치료하는 데 효과적인 것을 입증한다.
- [0860] **근거:**
- [0861] 기능적 MBL의 혈청 수준이 감소된 환자는 재발성 박테리아 및 진균 감염에 대해 증가된 민감성을 나타낸다 (Kilpatrick et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:401-413 (2002)). It is known that 수막염균은 MBL에 의해 인식되는 것으로 알려져 있고, MBL-결핍 혈청은 나이세리아를 용해시키지 못하는 것으로 나타났다.
- [0862] 실시예 30 및 31에서 기술된 결과의 관점에서, 보체-결핍 및 대조군 인간 혈청에서 항-MASP-2 항체의 투여의 수막염균 감염을 치료하는 효능을 측정하기 위하여 일련의 실험을 수행하였다. 실험을 보체 경로를 보존하기 위하여 고농도의 혈청 (20%)에서 수행하였다.
- [0863] **방법:**

1. 다양한 보체-결핍 인간 혈청 및 인간 항-MASP-2 항체로 처리된 인간 혈청에서의 혈청 박테리아 활성

다음의 보체-결핍 인간 혈청 및 대조군 인간 혈청을 이 실험에 사용하였다:

표 11

테스트된 인간 혈청 샘플 (도 38에서 나타난 것과 같음)

샘플	혈청 유형
A	정상 인간 혈청 (NHS) + 인간 항-MASP-2 Ab
B	NHS + 아이소타입 대조군 Ab
C	MBL -/- 인간 혈청
D	NHS
E	열-비활성화 (HI) NHS

인간 MASP-2에 대한 재조합 항체를 조합 항체 라이브러리 (Knappik, A., et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86 (2000))로부터, 항원으로서 재조합 인간 MASP-2A를 사용하여 분리하였다 (Chen, C.B. and Wallis, *J. Biol. Chem.* 276:25894-25902 (2001)). 인간 혈장에서 C4 및 C3의 렉틴 경로-매개 활성화를 강력하게 억제하는 (IC50~20 nM) 항-인간 scFv 단편을 확인하였고 전장 인간 IgG4 항체로 전환시켰다. 수막염균 혈청균 B-MC58을, 각각 억제 인간 항-MASP-2 항체 (3 µg in 100 µl total volume)의 첨가가 있거나 없이 20%의 혈청 농도에서 표 11에서 제시한 상이한 혈청과 함께 37℃에서 흔들어주면서 인큐베이션하였다. 샘플을 다음의 시점: 0-, 30-, 60- 및 90-분 간격으로 취하고, 플레이팅한 후 생존 가능한 카운트를 측정하였다. 열-비활성화 인간 혈청을 음성 대조군으로서 사용하였다.

결과:

도 38은 표 11에 제시된 인간 혈청 샘플에서 상이한 시점에 회수된 수막염균 혈청균 B-MC58의 생존 가능한 카운트의 로그 cfu/mL을 그래프로 도시한다. 표 12는 도 38에 대한 학생 t-테스트 결과를 제공한다.

표 12

도 38에 대한 학생 t-테스트 결과 (시점 60분)

	평균 차이 (Log)	유의성? P<0.05?	P 값 요약
A 대비 B	-0.3678	예	*** (0.0002)
A 대비 C	-1.1053	예	*** (p<0.0001)
A 대비 D	-0.2111	예	** (0.0012)
C 대비 D	1.9	예	*** (p<0.0001)

도 38 및 표 12에서 나타난 것과 같이, 인간 20% 혈청에서 수막염균의 보체-의존성 사멸은 인간 항-MASP-2 억제 항체의 첨가에 의해 상당히 향상되었다.

2. MASP-2가 결핍된 20% (v/v) 마우스 혈청에서 수막염균의 보체-의존성 사멸.

다음의 보체-결핍 마우스 혈청 및 대조군 마우스 혈청을 이 실험에 사용하였다:

표 13

테스트된 마우스 혈청 샘플 (도 39에서 나타난 것과 같음)

샘플	혈청 유형
A	WT
B	MAASP-2 -/-
C	MBL A/C -/-
D	WT 열-비활성화 (HIS)

수막염균 혈청균 B-MC58을, 각각 억제 20%의 혈청 농도에서 상이한 보체-결핍 마우스 혈청과 함께 37℃에서 혼

들어주면서 인큐베이션하였다. 샘플을 다음의 시점: 0-, 15-, 30-, 60-, 90- 및 120-분 간격으로 취하고, 플레이트잉한 후 생존 가능한 카운트를 측정하였다. 열-비활성화 인간 혈청을 음성 대조군으로서 사용하였다.

결과:

도 39는 표 13에 제시된 마우스 혈청 샘플에서 상이한 시점에 회수된 수막염균 혈청균 B-MC58의 생존 가능한 카운트의 로그 cfu/mL을 그래프로 도시한다. 표 14는 도 39에 대한 학생 t-테스트 결과를 제공한다. 도 39에서 나타난 것과 같이, MASP-2 -/- 마우스 혈청은 WT 마우스 혈청보다 더 높은 수준의 수막염균에 대한 살균 활성을 가진다. 기호 "*"는 $p=0.0058$ 을 나타내고, 기호 "***"는 $p=0.001$ 을 나타낸다.

표 14

도 39에 대한 학생 t-테스트 결과

비교	시점	평균 차이 (LOG)	유의성? ($p<0.05$)?	P 값 요약
A 대비 B	60분	0.39	예	** (0.0058)
A 대비 B	90분	0.6741	예	*** (0.001)

요약하면, 이 실시예의 결과는 MASP-2 -/- 혈청이 WT 혈청보다 더 높은 수준의 수막염균에 대한 살균 활성을 가지는 것을 입증한다.

실시예 33

이 실시예는 발작성 야간 헤모글로빈뇨 (PNH)의 마우스 모델로부터 얻어진 혈액 샘플로부터의 적혈구의 용혈에 미치는 MASP-2 결핍의 억제 효과를 입증한다.

배경/근거:

마르키아파바-미켈리 증후군으로도 언급되는 발작성 야간 헤모글로빈뇨 (PNH)는 보체-유도된 혈관내 용혈성 빈혈을 특징으로 하는 후천적, 잠재적으로 생명을 위협하는 혈액 질환이다. PNH의 특징은 PNH 적혈구 상의 보체 조절자 CD55 및 CD59의 부재로 인한 보체의 대체 경로의 조절되지 않은 활성화의 결과인 만성 보체-매개 혈관내 용혈과, 후속되는 헤모글로빈뇨 및 빈혈이다. Lindorfer, M.A., et al., *Blood* 115(11) (2010), Risitano, A.M., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11:528-535 (2011). PNH에서의 빈혈은 혈류의 적혈구의 파괴로 인한 것이다. PNH의 증상으로는 소변에 헤모글로빈의 출현으로 인한 적색 소변, 허리 통증, 피로, 호흡 곤란 및 혈전증을 들 수 있다. PNH는 "일차 PNH"로 언급되는 자체적으로 발생되거나, 또는 "이차 PNH"로서 언급되는 재생불량성 빈혈과 같은 다른 골수 장애의 맥락에서 발생할 수 있다. PNH에 대한 치료는 빈혈에 대한 수혈, 혈정증에 대한 항응고 및 보체 시스템을 억제함으로써 면역 파괴에 대해 혈액 세포를 보호하는 단클론성 항체 에쿨리주맙 (Soliris®)의 사용을 들 수 있다 (Hillmen P. et al., *N. Engl. J. Med.* 350(6):552-9 (2004)). 에쿨리주맙 (Soliris®)은 보체 구성요소 C5를 표적화하고, C5 전환효소에 의해 그것의 절단을 차단함으로써, C5a의 생성 및 MAC의 조립을 방지하는 인간화된 단클론성 항체이다. 에쿨리주맙을 이용한 PNH 환자의 치료는 락테이트 탈수소효소 (LDH)에 의해 측정되는 바, 환자의 약 절반에서 헤모글로빈 안정화 및 수혈 독립성으로 이어지는 혈관내 용혈의 감소를 초래한다 (Hillmen P. et al., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol 11(6) (2011)). 에쿨리주맙으로 치료가 진행 중인 거의 모든 환자가 (혈관내 용혈의 제어로 인해) 정상 또는 거의 정상 LDH 수준을 달성하는 한편, 약 1/3의 환자만이 11 gr/dL을 초과하는 헤모글로빈 값에 도달하며, 에쿨리주맙으로 치료되는 나머지 환자는 계속해서 거의 같은 비율로 보통 내지 중증 (즉, 수혈-의존성) 빈혈을 나타낸다 (Risitano A.M. et al., *Blood* 113:4094-100 (2009)). Risitano et al., *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 11:528-535 (2011)에서 기술된 것과 같이, 에쿨리주맙으로 치료되는 PNH 환자는 그들의 PNH 적혈구의 실질적인 부분에 결합된 C3 단편을 함유하여 (비치료 환자는 그렇지 않음), 막-결합 C3 단편이 PNH 적혈구 상의 옵소닌처럼 작용하여 특이적 C3 수용체를 통한 그것의 세망내피 세포에의 포획 및 후속되는 혈관내 용혈을 초래한다는 결론으로 이어지는 것이 입증되었다. 그러므로, 에쿨리주맙의 사용 외의 치료 전략은 C3 단편-매개 혈관내 용혈이 발생하는 환자의 경우, 그들이 계속해서 적혈구 수혈을 필요로 하기 때문에 필요하다.

이 실시예는 PNH의 마우스 모델로부터 얻어진 혈액 샘플로부터의 적혈구의 용혈에 미치는 MASP-2 결핍 혈청 및 MASP-2 억제제로 처리된 혈청의 영향을 평가하는 방법을 기술하며 PNH를 앓고 있는 대상체를 치료하는 MASP-2 억제제의 효능을 입증하고, 또한 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제를 사용한 치료법이 진행 중인 PNH 대상체에서 C3 단편-매개 혈관내 용혈의 효과를 개선하기 위한 MASP-2의 억제제의 사용을 지지한다.

- [0885] **방법:**
- [0886] **PNH 동물 모델:**
- [0887] 혈액 샘플을 Crry 및 C3이 결핍된 (Crry/C3-/-) 유전자-표적화된 마우스 및 CD55/CD59-결핍 마우스로부터 얻었다. 이들 마우스는 각각의 표면 보체 조절자가 없으므로, 그들의 적혈구는 PNH 인간 혈구처럼 자발적인 보체 자가용해에 민감하다.
- [0888] 이들 적혈구를 더욱 민감하게 만들기 위하여, 이들 세포를 만난에 의한 코팅과 함께 및 코팅 없이 사용한 후 WT C56/BL6 혈장, MBL 널(null) 혈장, MASP-2 -/- 혈장, 인간 NHS, 인간 MBL -/- 혈장, 및 인간 항-MASP-2 항체로 처리된 NHS에서 용혈에 대해 테스트하였다.
- [0889] **1. MASP-2-결핍/고갈된 혈청 및 대조군에서 Crry/C3 및 CD55/CD59 이중-결핍 쥐과 적혈구의 용혈 검정**
- [0890] **1일차.** 쥐과 RBC ($\pm$ 만난 코팅)의 제조
- [0891] 포함된 물질: 신선한 마우스 혈액, BBS/Mg²⁺/Ca²⁺ (4.4 mM 바르비투르산, 1.8 mM 나트륨 바르비톤, 145 mM NaCl, pH7.4, 5 mM Mg²⁺, 5 mM Ca²⁺), 염화 크로뮴, CrCl₃·6H₂O (BBS/Mg2+/Ca2+ 중의 0.5 mg/mL) 및 BBS /Mg2+/Ca2+ 중의 만난, 100 μ g/mL.
- [0892] 전혈 (2 mL)을 4°C의 냉장 원심분리기에서 1-2분 동안 2000xg에서 회전시켰다. 혈장 및 버피 코트를 흡인하였다. 그런 후 샘플을 RBC 펠릿을 2 mL의 얼음처럼 차가운 BBS/젤라틴/Mg2+/Ca2+에 재현탁하고 원심분리 단계를 반복함으로써 3회 세척하였다. 3번째 세척 후, 펠릿을 4 mL BBS/Mg2+/Ca2+에 재현탁하였다. RBC의 2 mL의 부분표본을 미코팅 대조군으로서 따로 두었다. 나머지 2 mL에, 2 mL CrCl3 및 2 mL 만난을 첨가하고 샘플을 부드럽게 혼합하면서 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 반응을 7.5 mL BBS/젤라틴/Mg2+/Ca2+를 첨가함으로써 종결시켰다. 샘플을 위와 같이 회전하고, 2 mL BBS/젤라틴/Mg2+/Ca2+에 재현탁하고 상기와 같이 추가로 2회 더 세척한 후, 4°C에서 보관하였다.
- [0893] **2일차.** 용혈 검정
- [0894] 물질은 BBS/젤라틴/Mg²⁺/Ca²⁺ (상기와 같음), 테스트 혈청, 96-웰 둥근 바닥 및 평평 바닥 플레이트 및 96-웰 플레이트를 410-414 nm에서 관독하는 분광기를 포함하였다.
- [0895] RBC의 농도를 먼저 측정하고, 세포를 10⁹/mL로 조정하고, 이 농도에서 보관하였다. 사용 전에, 검정 완충액을 10⁸/mL로 희석한 후, 웰당 100 μ l을 사용하였다. 용혈을 410-414 nm에서 측정하였다 (541 nm보다 더 큰 민감성을 허용함). 테스트 혈청의 희석을 얼음처럼 차가운 BBS/젤라틴/Mg2+/Ca2+에서 제조하였다. 100 μ l의 각각의 혈청 희석을 둥근 바닥 플레이트에 피펫팅하였다 (플레이트 레이아웃 참고). 100 μ l의 적절하게 희석된 RBC 제를 첨가하고 (즉, 10⁸ /mL) (플레이트 레이아웃 참고), 37°C에서 약 1시간 동안 인큐베이션하고, 용해를 관찰하였다. (플레이트를 이 시점에서 사진 촬영할 수 있음). 그런 후 플레이트를 최대 속도에서 5분 동안 회전시켰다. 유동상에서 100 μ l을 흡인하여 평평 바닥 플레이트에 옮기고, 410-414 nm에서 OD를 기록하였다. RBC 펠릿이 보유되었다 (이것들은 계속해서 물로 용해시켜 반전 결과를 얻을 수 있음).
- [0896] **실험 #1:**
- [0897] 신선한 혈액을 CD55/CD59 이중-결핍 마우스로부터 얻고 Crry/C3 이중-결핍 마우스의 혈액 및 적혈구를 상기 프로토콜에서 상세하게 기술한 것과 같이 제조하였다. 세포를 나누어 세포의 절반을 만난으로 코팅하고 다른 절반을 미처리로 남겨서, 최종 농도를 mL당 1x 10⁸으로 조정하고, 그 중 100 μ l을 상기 기술한 것과 같이 수행한 용혈 검정에 사용하였다.
- [0898] **실험 #1의 결과: 렉틴 경로는 PNH 동물 모델에서 적혈구 용해에 관여한다**
- [0899] 초기 실험에서, 비-코팅 WT 마우스 적혈구는 어떠한 마우스 혈청에서도 용해되지 않은 것으로 측정되었다. 추가로 만난-코팅 Crry-/- 마우스 적혈구는 WT 마우스 혈청에서 느리게 용해되었지만 (37도에서 3시간 이상), MBL 널 혈청에서는 용해되지 않은 것으로 측정되었다. (데이터 미제시).
- [0900] 만난-코팅 Crry-/- 마우스 적혈구는 인간 혈청에서 빠르게 용해되었지만 열-비활성화 NHS에서는 그렇지 않은 것으로 측정되었다. 중요하게, 만난-코팅 Crry-/- 마우스 적혈구는 1/640까지 희석된 NHS에서 용해되었다 (즉,

1/40, 1/80, 1/160, 1/320 및 1/640 희석에서 모두 용해됨). (데이터 미제시). 이 희석에서, 대체 경로는 작동하지 않는다 (AP 기능적 활성은 8% 혈청 농도 미만에서 상당히 감소됨).

[0901] **실험 #1로부터의 결론**

[0902] 만난-코팅 Crry-/- 마우스 적혈구는 MBL이 있는 고도로 희석된 인간 혈청에서는 매우 잘 용해되지만 MBL이 없는 혈청에서는 그렇지 않다. 테스트된 모든 혈청 농도에서 효율적인 용해는 대체 경로가 이 용해에 관여하지 않거나 필요하지 않은 것을 암시한다. 만난-코팅 Crry-/- 마우스 적혈구를 용해하지 못하는 MBL-결핍 마우스 혈청 및 인간 혈청의 무능력은 고전적 경로가 또한 관찰된 용해와 아무런 관련이 없음을 가리킨다. 렉틴 경로 인식 분자 (즉, MBL)가 필요하기 때문에, 이 용해는 렉틴 경로에 의해 매개된다.

[0903] **실험 #2:**

[0904] 신선한 혈액을 Crry/C3 및 CD55/CD59 이중-결핍 마우스로부터 얻고 만난-코팅 Crry-/- 마우스 적혈구를 상기에 서 기술한 것과 같이 다음의 인간 혈청의 존재 하에 용혈 검정으로 분석하였다: MBL 널; WT; 인간 항-MASP-2 항체로 사전 처리된 NHS; 및 대조군으로서 열-비활성화 NHS.

[0905] 실험 #2의 결과: MASP-2 억제제는 PNH 동물 모델에서 적혈구 용해를 방지한다

[0906] 만난-코팅 Crry-/- 마우스 적혈구와 함께, NHS를 1/640까지 (즉, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 및 1/640) 희석된 희석으로, 인간 MBL-/- 혈청, 항-MASP-2 mAb로 사전 처리된 NHS, 및 대조군으로서 열-비활성화 NHS를 인큐베이션하였다.

[0907] ELISA 미세적정 플레이트를 회전시켰고 용해되지 않은 적혈구가 둥근-웰 플레이트의 바닥에 수집되었다. 각 웰의 상층액을 수집하여 용해된 적혈구로부터 방출된 헤모글로빈의 양을 ELISA 판독기에서 OD415 nm를 판독함으로써 측정하였다.

[0908] 예상했던 것과 같이, 대조군 열-비활성화 NHS (음성 대조군)에서, 용해는 관찰되지 않았다. MBL-/- 인간 혈청은 만난-코팅 마우스 적혈구를 1/8 및 1/16 희석에서 용해하였다. 항-MASP-2-항체-사전 처리된 NHS는 만난-코팅 마우스 적혈구를 1/8 및 1/16 희석에서 용해하였지만 WT 인간 혈청은 1/32의 희석으로 가서야 만난-코팅 마우스 적혈구를 용해시켰다.

[0909] 도 40은 열-비활성화 (HI) NHS, MBL-/-, 항-MASP-2 항체로 사전 처리된 NHS, 및 NHS 대조군으로부터의 혈청에서 혈청 농도의 범위에 걸쳐 인간 혈청에 의한 만난-코팅 쥐과 적혈구의 용혈 (광도계에 의해 측정된 용해된 마우스 적혈구 (Crry/C3-/-)의 상층액으로의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다.

[0910] 도 40에 도시된 결과로부터, 항-MASP-2 항체로의 MASP-2 억제가 CH₅₀을 유의미하게 이동시켰고 자가 보체 활성화로부터의 보호가 결핍된 민감화된 적혈구의 보체-매개 용해를 억제한 것이 입증된다.

[0911] **실험 #3**

[0912] 비-코팅 Crry-/- 마우스 적혈구로 Crry/C3 및 CD55/CD59 이중-결핍 마우스로부터 얻어진 신선한 혈액을 상기에 서 기술한 것과 같이 용혈 검정으로 다음의 혈청의 존재 하에 분석하였다: MBL -/-; WT 혈청; 인간 항-MASP-2 항체로 사전 처리된 NHS 및 대조군으로서 열-비활성화 NHS.

[0913] 결과:

[0914] 도 41은 열 비활성화 (HI) NHS, MBL-/-, 항-MASP-2 항체로 사전 처리된 NHS, 및 NHS 대조군으로부터의 혈청에서 혈청 농도의 범위에 걸쳐 인간 혈청에 의한 비-코팅 쥐과 적혈구의 용혈 (광도계에 의해 측정된 상층액으로의 용해된 WT 마우스 적혈구의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다. 도 41에서 나타난 것과 같이, MASP-2를 억제하는 것은 민감화되지 않은 WT 마우스 적혈구의 보체-매개 용해를 억제하는 것이 입증된다.

[0915] 도 42는 열-비활성화 (HI) NHS, MBL-/-, 항-MASP-2 항체로 사전 처리된 NHS, 및 NHS 대조군으로부터의 혈청에서 혈청 농도의 범위에 걸쳐 인간 혈청에 의한 비-코팅 쥐과 적혈구의 용혈 (광도계에 의해 측정된 상층액으로의 용해된 마우스 적혈구 (CD55/59 -/-)의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다.

【표 12】

혈청 농도로서 표시된 CH₅₀ 값

혈청	WT	CD55/59 -/-
열-비활성화 NHS	용해 없음	용해 없음
MBL AO/XX 도너 (MBL 결핍)	7.2%	2.1%
NHS + 항-MASP-2 항체	5.4%	1.5%
NHS	3.1%	0.73%

주: "CH₅₀"은 보체 매개된 용혈이 50%에 도달하는 지점임.

요약하면, 이 실시예의 결과는 MASP-2를 억제하는 것이 자가 보체 활성화로부터의 보호가 결핍된 민감화된 및 민감화되지 않은 적혈구의 보체-매개 용해를 억제하는 것을 입증한다. 그러므로, MASP-2 억제제는 PNH를 앓고 있는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있고, 에쿨리주맙 (Soliris®)과 같은 C5 억제제로의 치료가 진행 중인 PNH 환자에서 혈관의 용혈을 개선 (즉, 억제, 예방 또는 중증도를 감소)하기 위해 사용될 수 있다.

실시예 34

이 실시예는 상기 실시예 29에서 기술된 연구에 대한 후속 연구를 기술하며, MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 항체가 방사선 노출의 치료 및/또는 급성 방사선 증후군의 치료, 개선 또는 예방에 효과적인 것을 확인하는 추가의 증거를 제공한다.

근거: 실시예 29에서 기술된 초기 연구에서, 마우스에서 항-MASP-2 항체로의 조사전 치료는 6.5 Gy 및 7.0 Gy 노출 수준에서 모두 비히클 치료된 조사된 대조군 동물에 비교하여 조사된 마우스의 생존율을 증가시킨 것이 입증되었다. 추가로 실시예 29에서 6.5 Gy 노출 수준에서, 항-MASP-2 항체로의 조사 후 치료는 비히클 대조군 조사된 동물과 비교하여 생존율의 중간 정도의 증가를 초래한 것이 입증되었다. 이 실시예는 제1 연구를 확인하기 위해 수행된 제2 방사선 연구를 기술한다.

방법:

연구 A의 설계:

Swiss Webster 마우스 (n=50마리)를 이온화 방사선 (8.0 Gy)에 노출시켰다. 방사선 노출 전 18시간 전 및 노출 후 2시간 후에, 그리고 그 후에 주마다 투여된 항-MASP-2 항체 요법 (mAbH6 5 mg/kg)의 사망률에 미치는 영향을 평가하였다.

연구 A의 결과:

도 43에서 나타난 것과 같이, 항-MASP-2 항체 mAbH6의 투여는 8.0 Gy에 노출된 마우스에서 생존율을 증가시켰는데, 비히클 대조군을 받은 마우스와 비교하여 4 내지 6일이 증가된 중앙 생존율로 조정되었고, 사망률은 비히클 대조군을 받은 마우스와 비교하여 12% 감소한 것으로 입증되었다 (로그-순위 테스트, p=0.040).

연구 B의 설계:

Swiss Webster 마우스 (n=50마리)를 다음의 그룹에서 이온화 방사선 (8.0 Gy)에 노출시켰다: (I: 비히클) 식염수 대조군; (II: 낮은) 조사 전 18시간 전 및 조사 후 2시간 후에 투여된 항-MASP-2 항체 mAbH6 (5 mg/kg); (III: 높은) 조사 전 18시간 전 및 조사 후 2시간 후에 투여된 mAbH6 (10 mg/kg); 및 (IV: 후기 높은) 조사 후 2시간 후에만 투여된 mAbH6 (10 mg/kg).

연구 B의 결과:

조사 전 및 후의 항-MASP-2 항체의 투여는 비히클 대조군을 받은 동물과 비교하여 평균 생존율을 4일에서 5일로 조정하였다. 항-MASP-2 항체-처리된 마우스의 사망률은 비히클 대조군 마우스와 비교하여 6-12% 감소하였다. 추가로 유의미한 해로운 치료 효과가 관찰되지 않은 것이 주지된다 (데이터 미제시).

요약하면, 이 실시예에서 제시된 결과는 실시예 29에서 제시된 결과와 일치하며 항-MASP-2 항체가 급성 방사선 증후군이 발병할 위험이 있는, 또는 그것의 해로운 효과로 고생하는 포유류 대상체를 치료하는 데 효과적인 것을 추가로 입증한다.

[0932] **실시예 35**

[0933] 이 연구는 LPS (리포다당)-유도 혈전증의 마우스 모델에서 MASP-2-결핍의 효과를 조사한다.

[0934] 근거:

[0935] 시가 독소-생성 대장균 감염에 의해 유발되는 용혈성 요독 증후군 (HUS)은 아동의 급성 신부전의 주된 원인이다. 이 실시예에서는, LPS-유도 혈전증 (미세혈관 응고)의 슈바르츠만 모델을 MASP-2-/- (KO) 마우스에서 수행하여 MASP-2 억제가 혈관내 혈전의 형성을 억제 또는 예방하는 데 효과적인지를 측정하였다.

[0936] 방법:

[0937] MASP-2-/- (n=9마리) 및 WT (n=10마리) 마우스를 LPS-유도 혈전증 (미세혈관 응고)의 슈바르츠만 모델로 분석하였다. 마우스에게 Serratia LPS를 투여하고 시간에 따른 혈전 형성을 모니터링하였다. 미세혈전 및 LPS-유도 미세혈관 응고의 발생률의 비교를 수행하였다.

[0938] 결과:

[0939] 특히, 테스트한 모든 MASP-2 -/- 마우스 (9마리/9마리)는 Serratia LPS 투여 후에 혈관내 혈전을 형성하지 않았다. 대조적으로, 미세혈전이 나타난 테스트된 10마리의 마우스 중 7마리에서 검출되었다 (p=0.0031, 피셔 정확). 도 44에서 나타난 것과 같이, LPS 감염 후 미세혈관 폐색이 시작될 때까지의 시간을 MASP-2-/- 및 WT 마우스에서 측정하였고, 60분 동안 측정된 혈전이 형성된 WT 마우스의 백분율을 보였으며, 혈전 형성은 약 15분 정도로 초기에 검출되었다. WT 마우스의 최대 80%는 60분에 혈전 형성을 나타냈다. 대조적으로, 도 44에서 나타난 것과 같이, MASP-2 -/- 중 어느 것도 60분 내에 혈전 형성을 보이지 않았다 (로그 순위: p=0.0005).

[0940] 이들 결과는 MASP-2 억제가 HUS 모델에서 혈관내 혈전의 발생에 대해 보호하는 것을 입증한다.

[0941] **실시예 36**

[0942] 이 실시예는 정제된 시가 독소 2 (STX2) 플러스 LPS의 복강내 동시 주사를 사용하는 HUS의 마우스 모델에서의 항-MASP-2 항체의 효과를 기술한다.

[0943] 배경:

[0944] HUS의 마우스 모델을 정제된 시가 독소 2 (STX2) 플러스 LPS의 복강내 동시 주사를 사용하여 개발하였다. 마우스 신장의 생화학적 및 마이크로어레이 분석으로 STX2 플러스 LPS 도전이 각각의 작용제 단독의 효과와 구별되는 것으로 나타났다. 이들 마우스의 혈액 및 혈청 분석은 호중구 증가증(neutrophilia), 혈소판 감소증, 적혈구 용혈, 및 감소된 혈청 크레아티닌 및 혈액 요소 질소를 보였다. 더불어, 마우스 신장의 조직학적 분석 및 전자현미경 검사는 사구체 피브린 침착, 적혈구 혼잡(congestion), 미세혈전 형성, 및 사구체 초구조적 변화를 나타냈다. 이 HUS 모델은 인간 질환을 규정하는 혈소판 감소증, 용혈성 빈혈, 및 신부전을 포함한 인간 HUS 병리의 모든 임상 증상을 C57BL/6 마우스에서 유도하는 것으로 확립되었다 (J. Immunol 187(1):172-80 (2011)).

[0945] 방법:

[0946] 체중이 18 내지 20 g인 C57BL/6 암컷 마우스를 Charles River Laboratories로부터 구매하여 2 그룹으로 나누었다 (각 그룹에 5마리 마우스). 한 그룹의 마우스에게 총 부피 150 μ l의 식염수에 희석된 재조합 항-MASP-2 항체 mAbM11 (마우스당 100 μ g; 5 mg/kg 체중의 최종 농도에 상응함)로 복강내 (i.p.) 주사에 의해 사전처리하였다. 대조군 그룹은 어떠한 항체 없이 식염수를 제공하였다. 항-MASP-2 항체 mAbM11의 복강내 주사 후 6시간 후에, 모든 마우스에게 총 부피 150 μ l에 준치사량 (3 μ g/동물; 150 μ g/kg 체중에 상응함)의 세라티아 마르세스센스(*Serratia marcescens*) (L6136; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)의 LPS 및 4.5 ng/동물 용량 (225 ng/kg에 상응함)의 STX2 (LD50 용량의 2배)의 조합된 복강내 주사를 제공하였다. 대조군에게는 식염수 주사를 사용하였다.

[0947] 마우스의 생존을 투약 후 6시간마다 모니터링하였다. 마우스를 그들이 HUS 병리의 무기력 단계에 도달하자마자 도태시켰다. 36시간 후, 모든 마우스를 도태시켰고 양쪽 신장을 면역조직화학 및 주사 전자 현미경 검사를 위해 제거하였다. 혈액 샘플을 실험이 종료되었을 때 심장 천공에 의해 취하였다. 혈청을 분리하고 치료 및 대조군 그룹에서 모두 BUN 및 혈청 크레아티닌 수준을 측정하기 위해 -80°C에서 냉동 유지하였다.

[0948] **면역조직화학**

- [0949] 각 마우스 신장의 1/3을 4% 파라포름알데하이드에 24시간 동안 고정시키고, 처리하고, 파라핀에 끼워넣었다. 3 마이크로미터 두께의 섹션을 절단하여 H & E 스테인으로의 후속 염색을 위해 대전된 슬라이드 상에 놓았다.
- [0950] **전자 현미경 검사**
- [0951] 신장의 중간 섹션을 대략 1 내지 2 mm³의 블록으로 절단하고, 밤새 4℃에서 1x PBS 중의 2.5% 글루타르알데하이드에서 고정시켰다. 고정된 조직을 계속해서 레스터 대학 전자 현미경 검사 시설에서 처리하였다.
- [0952] **저온 유지 장치 섹션**
- [0953] 신장의 또 다른 1/3을 대략 1 내지 2 mm³의 블록으로 절단하고 액체 질소에서 순간 냉동시켜서 저온 유지 장치 섹션 및 mRNA 분석을 위해 -80℃에서 보관하였다.
- [0954] **결과:**
- [0955] 도 45는 STX/LPS-유도 모델에서 시간(시간)에 따른 식염수-처리 대조군 마우스 (n=5마리) 및 항-MASP-2 항체-처리 마우스 (n=5마리)의 생존율을 그래프로 도시한다. 특히, 도 45에서 나타난 것과 같이, 대조군 마우스는 전부 42시간 내에 죽었다. 극명하게 대조적으로, 항-MASP-2 항체-처리 마우스는 실험 기간 내내 100% 생존하였다. 도 45에 도시된 결과와 일치하게, 죽었거나 중증 질환의 신호로 도태되어야 했던 미처리 마우스는 전부 상당한 사구체 손상이 있었지만, 모든 항-MASP-2-처리 마우스의 사구체는 정상으로 보였다 (데이터 미제시). 이들 결과는 MASP-2 억제제, 예컨대 항-MASP-2 항체가 혈전성 미세혈관병증 (TMA), 예컨대 용혈성 요독 증후군 (HUS), 비정형 HUS (aHUS), 또는 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP)을 앓고 있거나, 또는 발병의 위험에 있는 대상체를 치료하기 위하여 사용될 수 있음을 입증한다.
- [0956] **실시예 37**
- [0957] 이 실시예는 혈전증의 쥐과 FITC-텍스트란/광 유도 내피 세포 손상 모델에서 MASP-2 결핍 및 MASP-2 억제의 효과를 기술한다.
- [0958] **배경/근거:** 실시예 35 및 36에서 입증된 것과 같이, MASP-2 결핍 (MASP-2 KO) 및 (억제 MASP-2 항체의 투여를 통한) MASP-2 억제는 전형적인 HUS의 모델에서 마우스를 보호하는 반면, STX 및 LPS에 노출된 모든 대조군 마우스는 중증의 HUS를 발병하고 48시간 내에 죽어가거나 죽었다. 예를 들어, 도 54에서 나타난 것과 같이, MASP-2 억제 항체로 처리된 후 STX 및 LPS에 노출된 마우스는 모두 생존하였다 (피서 정확 p<0.01; N=5). 그러므로, 항-MASP-2 요법은 이 HUS 모델에서 마우스를 보호한다.
- [0959] HUS, aHUS, TTP, 및 다른 병인학을 가진 TMA의 치료를 위한 MASP-2 억제제의 추가의 이익을 입증하기 위하여 혈전성 미세혈관병증 (TMA)의 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)-텍스트란-유도 내피 세포 손상 모델에서 MASP-2 결핍 및 MASP-2 억제의 효과를 분석하기 위해 다음의 실험을 수행하였다.
- [0960] **방법:**
- [0961] **생체내 현미경 검사**
- [0962] 마우스를 Frommhold et al., *BMC Immunology* 12:56-68, 2011에 기술된 것과 같이 생체내 현미경 검사를 위해 준비하였다. 간단히 설명하면, 마우스를 케타민 (125 mg/kg 체중, Ketanest, Pfitzer GmbH, Karlsruhe, Germany) 및 자일라진 (12.5 mg/kg 체중; Rompun, Bayer, Leverkusen, Germany)의 복강내 (i.p.) 주사로 마취시키고 가열 패드에 배치하여 체온을 37℃에서 유지하였다. 생체내 현미경 검사를 식염수 침지 대물렌즈 (SW 40/0.75 numerical aperture, Zeiss, Jena, Germany)가 있는 직립 현미경 (Leica, Wetzlar, Germany) 상에서 수행하였다. 호흡을 용이하게 하기 위해, 마우스를 PE 90 튜빙 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA)을 사용하여 삽관하였다. 왼쪽 경동맥을 혈액 샘플링 및 전신성 단클론성 항체 (mAb) 투여를 위해 PE10 튜빙 (Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA)을 삽입하였다.
- [0963] **고환거근 제조**
- [0964] 생체내 현미경 검사를 위한 고환거근의 수술적 제조를 Sperandio et al., *Blood*, 97:3812-3819, 2001에서 기술된 것과 같이 수행하였다. 간단히 설명하면, 음낭을 개방하고 고환거근을 움직였다. 세로방향으로 절개하고 근육을 커버 글래스 위로 펼쳐놓은 후, 부고환 및 고환을 움직여 옆으로 고정시켜서, 현미경이 완전히 고환거근 미세순환에 접근할 수 있게 하였다. 고환거근 세정액을 Panasonic S-VHS 리코더 상의 CCD 카메라 (CF8/1; 카파, Gleichen, Germany)를 통해 기록하였다. 고환거근을 이전에 Frommhold et al., *BMC Immunology* 12:56-68,

20112011에서 기술된 것과 같이 온도 제어(35℃ 중탄산염 완충 식염수)로 쏟아부었다.

[0965] **광 여기 FITC 텍스트란 손상 모델**

[0966] 고환거근 세정맥 및 세동맥의 내피의 제어된, 광-용량-의존성 혈관 손상을 광독성 (FITC)-텍스트란 (Cat. No. FD150S, Sigma Aldrich, Poole, U.K.)의 광 여기에 의해 유도하였다. 이 과정은 국지화된 혈정증을 시작한다. 광독성 시약으로서, FITC-텍스트란의 60 μ L의 10% 중량/부피 용액을 좌측 경동맥 접근을 통해 주사하고 10분 동안 순환하는 혈액 전체에 균일하게 확산되도록 하였다. 잘 관류된 세정맥을 선택한 후, 낮은 강도 내지 중간 강도 (800-1500)의 할로겐 광을 관심 있는 혈관에 집중시켜서 FITC-텍스트란 형광을 유도하고 경미 내지 중간 광독성을 내피 표면에 유도하여 재생 가능하고, 제어된 방식으로 혈전증을 자극하였다. FITC-텍스트란의 여기를 위해 필요한 광독성 광 강도는 할로겐 램프 (12V, 100W, Zeiss, Oberkochen, Germany)를 사용하여 발생시켰다. 형광색소의 광 유도 여기로부터 발생된 광독성은 광강도 및/또는 조명 기간의 한계값을 필요로 하며 내피 표면의 직접적인 가열에 의해 또는 Steinbauer et al., *Langenbecks Arch Surg* 385:290-298, 2000에서 기술된 것과 같이 반응성 산소 라디칼의 생성에 의해 유발된다.

[0967] 각 혈관에 적용된 광 강도를 저전력 측정을 위한 파장-교정 다이오드 검출기 (Labmaster LM-2, Coherent, Auburn, USA)에 의한 조정에 대해 측정하였다. 비디오 스캔의 오프라인 분석을 컴퓨터 보조 미세순환 분석 시스템 (CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg)에 의해 수행하였고 적혈구 속도를 Zeintl et al., *Int J Microcirc Clin Exp*, 8(3):293-302, 2000에서 기술된 것과 같이 측정하였다.

[0968] **혈전증의 유도 전 단클론성 항-인간 MASP-2 억제 항체 (mAbH6) 및 비히클 대조군의 적용**

[0969] 맹검 연구 설계를 사용하여, 생후 9주령의 수컷 C57BL/6 WT 한배 새끼 마우스에게 MASP-2 기능적 활성의 억제제인 재조합 단클론성 인간 MASP-2 항체 (mAbH6) (10 mg/kg 체중의 최종 농도로 제공됨), 또는 동일한 양의 아이소타입 대조군 항체 (MASP-2 억제 활성 없음)를 생체내 현미경 검사의 고환거근 모델에서 혈전증의 광독성 유도 전 16시간 전에 복강내 주사로 제공하였다. 혈전증 유도 전 1시간 전에, 제2 용량의 mAbH6 또는 대조군 항체를 제공하였다. MASP-2 녹아웃 (KO) 마우스를 또한 이 모델에서 평가하였다.

[0970] mAbH6 (재조합 인간 MASP-2에 대해 확립됨)은 인간 MASP-2 기능적 활성의 강력한 억제제로, 마우스 MASP-2와 교차 반응하고, 결합하여 억제하지만 그것의 중 특이성으로 인해 낮은 친화도를 가진다 (데이터 미제시). mAbH6의 마우스 MASP-2에 대한 낮은 친화도를 보상하기 위하여, mAbH6를 고농도 (10 mg/kg 체중)로 제공하여 중 특이성의 변이, 및 마우스 MASP-2에 대한 더 적은 친화도를 극복하여 생체내 조건 하에서 쥐와 MASP-2 기능적 활성의 효과적인 차단을 제공하였다.

[0971] 이 맹검 연구에서, 테스트된 각각의 개별 세정맥 (선택 기준은 비슷한 직경 및 혈류 속도에 의해서임)이 완전히 폐색될 때까지 필요한 시간을 기록하였다.

[0972] 미세혈관 폐색이 있는 마우스의 백분율, 개시 시간, 및 폐색까지의 시간을 생체내 현미경 검사 비디오 기록을 사용하여 60분 관찰 주기에 걸쳐 평가하였다.

[0973] 결과:

[0974] 도 46은 FITC/텍스트란의 주사 전 16시간 및 1시간 전에 아이소타입 대조군 또는 인간 MASP-2 항체 mAbH6 (10 mg/kg)으로 처리 후 FITC/텍스트란 UV 모델에서 미세혈관 폐색을 보인 마우스의 백분율을, 손상 유도 후 시간의 함수로서 그래프로 도시한다. 도 46에서 나타난 것과 같이, 아이소타입 대조군 항체를 받은 야생형 마우스의 85%가 30분 이내에 폐색된 반면, 인간 MASP-2 항체 (mAbH6)로 사전 처리된 야생형 마우스는 19%만이 동일한 시간 내에 폐색되었고, 폐색까지의 시간은 인간 MASP-2 항체-처리 그룹에서 궁극적으로 폐색된 마우스에서 지연되었다. 추가로 MASP-2 mAbH6 처리된 마우스 중 3마리가 60분-관찰 기간 내에 전혀 폐색되지 않는 것(즉, 혈전성 폐색으로부터 보호되었음)이 유지된다.

[0975] 도 47은 인간 MASP-2 항체 (mAbH6) 및 아이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에 대한, 분으로 표시되는 폐색 시간을 그래프로 도시한다. 데이터는 평균 값 (수평 막대) 및 표준 오차 막대 (수직 막대)를 포함한 산점 (scatter-dot)으로서 기록된다. 이 도면은 폐색을 관찰할 수 있었던 마우스에에서의 폐색 시간을 도시한다. 그러므로, 60분 관찰 기간 중에 폐색되지 않은 3마리의 MASP-2 항체-처리 마우스는 이 분석에 포함되지 않았다 (폐색되지 않은 대조군 처리 마우스는 없었음). 분석에 사용한 통계학적 테스트는 독립표본 t 테스트였고; 여기서 기호 "*"는 $p=0.0129$ 를 나타낸다. 도 47에서 나타난 것과 같이, 폐색된 4마리의 MASP-2 항체 (mAbH6)-처리 마우스에서, MASP-2 항체로의 치료는 아이소타입 대조군 항체로 치료된 마우스와 비교하여 낮은 광 강도 (800-

1500)를 사용한 혈전증의 FITC-텍스트란/광 유도 내피 세포 손상 모델에서 정맥 폐색을 상당히 증가시켰다. 아이소타입 대조군의 완전한 폐색 시간의 평균은 19.75분이었고, MASP-2 항체 치료 그룹에 대한 완전한 폐색 시간의 평균은 32.5분이었다.

[0976] 도 48은 혈전증의 FITC-텍스트란/광 유도 내피 세포 손상 모델에서 낮은 광 강도 (800-1500)로 혈전증을 유도하기 전 16시간 전에 10 mg/kg으로 복강내 투여된 후, 다시 1시간 전에 정맥내 투여된 야생형 마우스, MASP-2 KO 마우스, 및 인간 MASP-2 항체 (mAbH6)로 사전 처리된 야생형 마우스에 대한, 분으로 표시되는, 폐색까지 걸리는 시간을 그래프로 도시한다. 폐색된 동물만을 도 48에 포함시켰다; 아이소타입 대조군 항체를 받은 야생형 마우스의 경우 n=2마리; MASP-2 KO의 경우 n=2마리; 및 인간 MASP-2 항체 (mAbH6)를 받은 야생형 마우스의 경우 n=4마리. 기호 "*"는 $p<0.01$ 을 나타낸다. 도 48에서 나타난 것과 같이, MASP-2 결핍 및 MASP-2 억제 (10 mg/kg의 mAbH6)는 낮은 광 강도 (800-1500)로의 혈전증의 FITC-텍스트란/광 유도 내피 세포 손상 모델에서 정맥 폐색 시간을 증가시켰다.

[0977] 결론:

[0978] 이 실시예의 결과는 렉틴 경로를 차단하는 MASP-2 억제제 (예컨대, MASP-2 기능을 차단하는 항체)가 TMA의 마우스 모델에서 다발성 미세혈관병증 장애(multiple microangiopathic disorder)의 특징인 미세혈관 응고 및 혈전증을 억제하는 것을 추가로 입증한다. 그러므로, MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 억제 항체의 투여는 HUS, aHUS, TTP, 또는 다른 미세혈관병증 장애를 앓고 있는 환자에서 효과적인 치료법일 것이고 미세혈관 응고 및 혈전증으로부터 보호를 제공할 것으로 예상된다.

[0979] 실시예 38

[0980] 이 실시예는 인간 MASP-2 억제 항체 (mAbH6)가 혈소판-풍부 인간 혈장에서 혈소판 기능에 영향을 미치지 않는 것을 입증하는 연구를 기술한다.

[0981] 배경/근거: 실시예 37에서 기술된 것과 같이, 인간 MASP-2 억제 항체 (mAbH6)로의 MASP-2 억제는 혈전증의 FITC-텍스트란/광 유도 내피 세포 손상 모델에서 정맥 폐색 시간을 증가시켰음이 입증되었다. MASP-2 억제 항체 (mAbH6)가 혈소판 기능에 영향을 미치는지를 측정하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

[0982] 방법: 인간 mAbH6 MASP-2 항체의 혈소판의 ADP-유도 응집에 미치는 영향을 다음과 같이 테스트하였다. 1 μ g/ml 또는 0.1 μ g/ml 농도의 인간 MASP-2 mAbH6를 360 μ L의 새롭게 제조한 혈소판-풍부 인간 혈장에 40 μ L 용액으로 첨가하였다. 아이소타입 대조군 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 항체를 혈장에 첨가한 후, ADP를 2 μ M의 최종 농도로 첨가함으로써 혈소판 활성화를 유도하였다. 1 mL 큐벳에서 작은 자석으로 용액을 교반함으로써 검정을 시작하였다. 혈소판 응집을 2-채널 크로노(Chrono)-로그 혈소판 응집계 모델 700 전혈/광학 루미(Lumi)-응집계로 측정하였다.

[0983] 결과:

[0984] 용액에서의 응집 퍼센트를 5분 동안 측정하였다. 결과를 아래의 표 13에 나타낸다.

【표 13】

5분 동안의 혈소판 응집.

항체	크기 (퍼센트 응집)	기울기 (시간에 따른 퍼센트 응집)
MASP-2 항체 (mAbH6) (1 μ g/ml)	46%	59
아이소타입 대조군 항체 (1 μ g/ml)	49%	64
MASP-2 항체 (mAbH6) (0.1 μ g/ml)	52%	63
아이소타입 대조군 항체 (0.1 μ g/ml)	46%	59

[0985]

[0986] 상기 표 13에서 나타난 것과 같이, 대조군 항체 또는 MASP-2 mAbH6 항체로 처리된 ADP-유도 혈소판의 응집 사이에서 유의미한 차이는 관찰되지 않았다. 이들 결과는 인간 MASP-2 항체 (mAbH6)가 혈소판 기능에 영향을 미치지 않는 것을 입증한다. 그러므로, 인간 MASP-2 억제 항체 (mAbH6)로의 MASP-2 억제가 혈전증의 FITC-텍스트란/광 유도 내피 세포 손상 모델에서 정맥 폐색 시간을 증가시켰음을 보여주는 실시예 37에서 기술된 결과는 혈소판

기능에 대한 mAbH6의 영향으로 인한 것이 아니었다. 그러므로, MASP-2 억제제는 혈소판 기능에 직접적으로 영향을 미치지 않으면서 혈전증을 방지하며, 이것은 기존의 항-혈전제와는 구별되는 치료 메커니즘을 나타낸다.

[0987] 실시예 39

[0988] 이 실시예는 TMA의 쥐과 모델에서 혈전 형성 및 혈관 폐색에 미치는 MASP-2 억제제의 영향을 기술한다.

[0989] 배경/근거: 렉틴 경로는 내피 세포 스트레스 또는 손상의 환경에서 보체 시스템을 활성화하는 데 지배적인 역할을 한다. 이 활성화는 aHUS를 나타내는 많은 환자에서 조절에 장애가 있는 대체 경로에 의해 신속하게 증폭된다. 그러므로 MASP-2 및 렉틴 경로의 활성화를 방지하는 것은 막 공격 복합체의 형성, 혈소판 활성화, 및 백혈구 모집으로 이어지는 효소적 반응의 순서를 정지시키는 것으로 예상된다. 이 효과는 조직 손상을 제한한다.

[0990] 더불어, MASP-2는 인자 Xa-유사 활성을 가지며 프로트롬빈을 절단하여 트롬빈을 형성한다. 응고 시스템의 이런 MASP-2-구동 활성화는 항상성의 균형을 깰 수 있고 TMA의 병리를 초래할 수 있다. 그러므로, 보체 및 응고 시스템의 활성화를 차단하는 MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 억제 항체를 사용하는 MASP-2의 억제제는 aHUS 및 다른 TMA-관련 상태의 결과를 개선할 것으로 예상된다.

[0991] 실시예 37에서 기술된 것과 같이, 인간 MASP-2 억제 항체 (mAbH6)로의 MASP-2 억제는 혈전증의 FITC-텍스트란/광 유도 내피 세포 손상 모델에서 정맥 폐색 시간을 증가시킨 것으로 입증되었다. TMA의 이런 모델에서, 마우스를 FITC-텍스트란의 정맥내 주사에 의해 민감화한 후, 마우스 고환거근의 미세혈관구조에서 FITC-텍스트란의 광-활성화를 국지화하였다 (Thorlacius H et al., *Eur J Clin. Invest* 30(9):804-10, 2000; Agero et al., *Toxicon* 50(5):698-706, 2007).

[0992] MASP-2 억제 항체 (mAbH6)가 TMA의 쥐과 모델에서 혈전 형성 및 혈관 폐색에 대해 용량-반응 효과를 가지는지를 측정하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

[0993] 방법: 국지화된 혈전증을 C57 B1/6 마우스의 고환거근의 미세혈관구조에서 플루오레세인 이소티오시아네이트-표지된 텍스트란 (FITC-텍스트란)의 광-활성화에 의해 유도하고 생체내 현미경 검사를 사용하여 실시예 37에서 기술된 방법을 다음의 변형을 포함하여 사용하여 혈전 형성 및 혈관 폐색의 시작을 측정하였다. 마우스 그룹에 mAbH6 (2 mg/kg, 10 mg/kg 또는 20 mg/kg) 또는 아이소타입 대조군 항체 (20 mg/kg)로의 투약을 TMA 유도 전 1 시간 전에 정맥내 (iv) 주사에 의해 투여하였다. 혈전 형성이 시작될 때까지의 시간 및 혈관 폐색에 완료되기까지의 시간을 기록하였다. 30 내지 60분 동안 기록한 생체내 현미경 검사 이미지의 비디오 재생 분석을 사용하여 혈관 크기, 혈류 속도, 광 강도, 혈소판 부착과 동등한 혈전 형성의 개시 속도, 혈전 형성의 개시까지의 시간, 총 혈관 폐색의 속도 및 총 혈관 폐색까지의 시간을 평가하였다. 통계적 분석을 SigmaPlot v12.0을 사용하여 수행하였다.

[0994] 결과:

[0995] 혈전 형성의 개시

[0996] 도 49는 증가하는 용량의 인간 MASP-2 억제 항체 (2 mg/kg, 10mg/kg 또는 20 mg/kg의 mAbH6) 또는 아이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에서 FITC-텍스트란 유도된 혈전성 미세혈관병증에서의 시간의 함수로서 혈전을 보인 마우스의 백분율을 보여주는 카플란-마이어 도표이다. 도 49에서 나타난 것과 같이, 혈전 형성의 개시는 대조군-처리 마우스에 비해 mAbH6-처리 마우스에서 용량-의존성 방식으로 지연되었다.

[0997] 도 50은 mAbH6 용량의 함수로서의 혈전 형성의 개시까지의 중간 시간 (분)을 그래프로 도시한다 (* 대조군에 비교하여 $p<0.01$). 도 50에서 나타난 것과 같이, 혈전 형성의 개시까지의 중간 시간은 mAbH6의 증가하는 용량으로 대조군 그룹에서 6.8분으로부터 20 mg/kg mAbH6 처리된 그룹에서 17.7분으로 증가하였다 ($p<0.01$). 기본적인 실험 데이터 및 통계적 분석을 표 14 및 15에 제공한다.

[0998] 비디오 녹화의 평가를 토대로 기록한 개별 마우스에서의 혈전 형성의 개시까지의 시간을 아래의 표 14에서 상세하게 제시한다.

【표 14】

가벼운 염료-유도 손상 후 혈전 형성의 개시까지의 시간

대조군 처리 개시까지의 시간 (분)	mAbH6 처리			
	대조군	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
	6.07	5.93	12.75	10.00
	1.07	6.95	2.53	10.33
	8.00	8.92	14.00	21.00
	2.40	11.92	3.05	11.50
	8.48	12.75	8.00	19.00
	4.00	12.53	8.17	10.37
	4.00		15.83	22.65
	7.83		11.70	16.37
	6.83		50.67	21.75*
	15.00			32.25*
	15.67			

* 혈관은 표시된 관찰 기간 중에 개시를 보이지 않았음

대조군과 mAbH6 처리된 동물 사이의 폐색의 개시까지의 시간을 비교하는 통계적 분석을 아래의 표 15에 제시한다.

표 15

개시까지의 시간: FITC Dex 용량 반응 연구로부터의 데이터

통계학	대조군	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
사건의 수/동물의 수 (%)	11/11(100%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/10 (80.0%)
중간 시간 (분) (95% CI)	6.8(2.4, 8.5)	10.4 (5.9, 12.8)	11.7 (2.5, 15.8)	17.7 (10.0, 22.7)
윌콕슨 p-값*		0.2364	0.1963	0.0016
사건 = 관찰된 개시까지의 시간 중간 (분) 및 그것의 95% CI는 카플란-마이어 추정값을 토대로 하였음 NE = 추정할 수 없음 *p-값을 Dunnett-Hsu 다중 비교에 의해 조정함				

미세혈관 폐색

도 51은 증가하는 용량의 인간 MASP-2 억제 항체 (2 mg/kg, 10mg/kg 또는 20 mg/kg의 mAbH6) 또는 아이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에서 FITC-텍스트란 유도 혈전성 미세혈관병증에서의 시간의 함수로서 미세혈관 폐색을 보이는 마우스의 백분율을 보여주는 카플란-마이어 도표이다. 도 51에서 나타난 것과 같이, 완전한 미세혈관 폐색은 대조군 마우스에 비교하여 mAbH6 처리된 그룹에서 지연되었다.

도 52는 mAbH6 용량의 함수로서 미세혈관 폐색까지의 중간 시간을 그래프로 도시한다 (* 대조군과 비교하여 $p < 0.05$). 도 52에서 나타난 것과 같이, 완전한 미세혈관 폐색까지의 중간 시간은 대조군 그룹에서 23.3분으로부터 2mg/kg mAbH6 처리 그룹에서 38.6분으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 10 mg/kg 또는 20 mg/kg의 용량은 2 mg/kg mAbH6 처리 그룹과 유사하게 수행하였다 (완전한 미세혈관 폐색까지의 중간 시간은 각각 40.3 및 38분이었음). 기본적인 실험 데이터 및 통계적 분석을 표 16 및 17에 제공한다.

비디오 녹화의 일차 평가를 토대로 기록한 개별 마우스에서의 완전한 혈관 폐색까지의 시간을 아래의 표 16에서 상세하게 제시한다.

표 16

[1007]

가벼운 염료-유도 손상 후 완전한 폐색까지의 시간

대조군 처리		mAbH6 처리		
폐색까지의 시간 (분)	대조군	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
	37.50	42.3	30.92	38.00
	29.07	21.91	17.53	28.00
	27.12	24.4	51.38	40.58
	19.38	31.38	36.88	33.00
	19.55	61.17*	26.83	39.10
	18.00	61.55*	40.28	32.03
	16.50		55.83	38.53
	23.33		71.93*	21.75*
	14.83		98.22*	32.25*
	30*			33.17*
	61.8*			

[1008]

* 혈관은 표시된 관찰 기간 중에 완전히 폐색되지 않았다.

[1009]

대조군과 mAbH6 처리된 동물 사이의 완전한 폐색까지의 시간을 비교하는 통계적 분석을 아래의 표 17에 제시한다.

표 17

[1010]

완전한 미세혈관 폐색까지의 시간: FITC Dex 용량 반응 연구로부터의 데이터

통계학	대조군	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
사건의 수/동물의 수 (%)	9/11(81.8%)	4/6 (66.7%)	7/9 (77.8%)	7/10 (70.0%)
중간 시간 (분) (95% CI)	23.3(16.5, 37.5)	36.8 (21.9, NE)	40.3 (17.5, NE)	38.0 (28.0, 40.6)
윌콕슨 p-값*		0.0456	0.0285	0.0260
사건 = 관찰된 폐색까지의 시간 중간 (분) 및 그것의 95% CI는 카플란-마이어 추정값을 토대로 하였음 NE = 추정할 수 없음 *p-값을 Dunnett-Hsu 다중 비교에 의해 조정함				

[1011]

요약

[1012]

표 18에서 요약하는 것과 같이, 혈전 형성의 개시는 대조군-처리 마우스에 비해 mAbH6 처리 마우스에서 용량-의존성 방식으로 지연되었다 (개시까지의 중간 시간은 10.4 내지 17.7분 대비 6.8분). 완전한 폐색까지의 중간 시간은 대조군-처리 그룹에 비해 모든 mAbH6-처리 그룹에서 상당히 지연되었다 (표 18).

표 18

[1013]

혈전 형성의 개시 및 완전한 폐색까지의 중간 시간

	대조군	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
혈전 형성의 개시까지의 중간# 시간 (분)	6.8	10.4	11.7	17.7*
완전한 미세혈관 폐색까지의 중간# 시간 (분)	23.3	36.8*	40.3*	38.0*

[1014]

중간 값은 카플란-마이어 추정값을 토대로 함

[1015]

* p<0.05, 대조군과 비교함 (다중 비교를 위해 Dunnett-Hsu에 의해 조정된 윌콕슨)

- [1016] 이들 결과는 MASP-2에 결합하여 보체 시스템의 렉틴 경로를 차단하는 인간 단클론성 항체인 mAbH6이 TMA의 실험적 마우스 모델에서 용량-의존성 방식으로 미세혈관 혈전증을 감소시켰음을 입증한다. 그러므로, MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 억제 항체의 투여는 HUS, aHUS, TTP, 또는 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS), 전신성 디코스병, 및 암, 암 화학요법 및 이식에 이차적인 TMA를 포함한 다른 TMA와 같은 다른 미세혈관병증 장애를 앓고 있는 환자에서 효과적인 치료법일 것이고 미세혈관 응고 및 혈전증으로부터 보호를 제공할 것으로 예상된다.
- [1017] **실시예 40**
- [1018] 이 실시예는 파지 디스플레이를 사용하는, MASP-2에 결합하여 면역 체계의 고전적 (C1q-의존성) 경로 및 대체 경로 구성요소를 온전하게 남겨두고 렉틴-매개 보체 활성화를 억제하는 전체 인간 scFv 항체의 확인을 기술한다.
- [1019] **개요:**
- [1020] 전체 인간, 고친화성 MASP-2 항체를 파지 디스플레이 라이브러리를 스크리닝함으로써 확인하였다. 항체의 가변 경쇄 및 중쇄 단편을 scFv 포맷 및 전장 IgG 포맷으로 모두 분리하였다. 인간 MASP-2 항체는 면역 체계의 고전적 (C1q-의존성) 경로 구성요소를 온전하게 남겨두면서 렉틴 경로-매개된 대체 보체 경로 활성화와 관련된 세포 손상을 억제하는 데 유용하다. 일부 구체예에서, 대상 MASP-2 억제 항체는 다음의 특징을 가진다: (a) 인간 MASP-2에 대한 고친화도 (예컨대, 10 nM 이하의 K_D), 및 (b) 90%의 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 로 MASP-2-의존성 보체 활성을 억제함.
- [1021] **방법:**
- [1022] **전장 촉매적 비활성 MASP-2의 발현:**
- [1023] 리더 서열 (SEQ ID NO:5)을 가진 인간 MASP-2 폴리펩타이드를 암호화하는 인간 MASP-2 (SEQ ID NO: 4)의 전장 cDNA 서열을, CMV 인핸서/프로모터 영역의 제어 하에 진행 발현을 구동하는 포유류 발현 벡터 pCI-Neo (Promega)에 하위클로닝하였다 (Kaufman R.J. et al., *Nucleic Acids Research* 19:4485-90, 1991; Kaufman, *Methods in Enzymology*, 185:537-66 (1991)에 기술되어 있음).
- [1024] 촉매적 비활성 인간 MASP-2A 단백질을 생성하기 위하여, 부위 지정 돌연변이생성을 US2007/0172483 (본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 것과 같이 수행하였다. PCR 생성물을 아가로스 겔 전기영동 및 밴드 제조 후에 정제하고 단일 아데노신 오버랩을 표준 테일링 과정을 사용하여 생성하였다. 그런 후 아데노신 꼬리가 달린 MASP-2A를 pGEM-T 용이 벡터에 클로닝하고 대장균으로 형질전환시켰다. 인간 MASP-2A를 포유류 발현 벡터 pED 또는 pCI-Neo 중 하나에 추가로 하위클로닝하였다.
- [1025] 상기 기술된 MASP-2A 발현 구성물을 표준 칼슘 포스페이트 트랜스펙션 과정을 사용하여 DXB1 세포에 트랜스펙션하였다 (Maniatis et al., 1989). MASP-2A는 혈청-유리 배지에서 생성되어 체제가 다른 혈청 단백질로 오염되지 않은 것을 보장하였다. 배지를 함유 세포로부터 2일마다 수득하였다 (총 4회). 제조한 MASP-2A의 수준은 평균 대략 1.5 mg/리터 배양 배지였다. MASP-2A (상기 기술된 Ser-Ala 돌연변이체)를 MBP-A-아가로스 칼럼 상에서 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다.
- [1026] **패닝/scFv 전환 및 필터 스크리닝에 의해 확인된 ScFv 후보 클론에 대한 MASP-2A ELISA**
- [1027] 인간 MASP-2 단백질에 대한 고친화성 scFv 항체를 확인하기 위하여 인간 면역글로불린 경쇄 및 중쇄 가변 영역 서열의 파지 디스플레이 라이브러리에 대해 항원 패닝을 수행한 후 자동 항체 스크리닝 및 선택을 수행하였다. HIS-태그화된 또는 비오틴-태그화된 MASP-2A에 대한 scFv 파지 라이브러리의 패닝을 3회기 수행하였다. 제3 회기의 패닝을 먼저 MBL로 나중에 TEA (알칼리성)로 용출하였다. 표적 MASP-2A에 대한 scFv 단편을 나타내는 파지의 특정 풍부화를 모니터링하기 위하여, 고정된 MASP-2A에 대한 다클론성 파지 ELISA를 수행하였다. 제3 회기 패닝으로부터의 scFv 유전자를 pHOG 발현 벡터에 클로닝하고 소규모 필터 스크리닝을 작동시켜서 MASP-2A에 대한 특정 클론을 찾았다.
- [1028] 제3 회기의 패닝으로부터의 scFv 단편을 암호화하는 플라스미드를 함유한 박테리아 콜로니를 선택하여, 니트로셀룰로스 막 위에 그리딩하고 밤새 비-유도 배지에서 성장시켜서 마스터 플레이트를 생성하였다. 제3 회기 패닝으로부터 총 18,000개 콜로니를 선택하여 분석하였고, 그 중 절반은 경합 용출로부터 선택하였고 절반은 후속 TEA 용출로부터 선택하였다. MASP-2A에 대한 scFv 파지미드 라이브러리의 패닝과 이어서 scFv 전환 및 필터 스크리닝으로 137개의 양성 클론을 얻었다. 137개 클론 중 108개가 MASP-2 결합에 대한 ELISA 검정에서 양성이었

고 (데이터 미세시), 그 중 45개 클론을 정상 인간 혈청에서 MASP-2 활성을 차단하는 능력에 대해 추가로 분석하였다.

[1029] **렉틴 경로 C3 전환효소의 형성의 억제를 측정하기 위한 검정**

[1030] 렉틴 경로 C3 전환효소 형성의 억제를 측정하는 기능성 검정을 사용하여 MASP-2 scFv 후보 클론의 "차단 활성"을 평가하였다. MASP-2 세린 프로테아제 활성은 렉틴 경로 C3 전환효소를 포함하는 2개의 단백질 구성요소 (C4b, C2a)를 생성하기 위해 필요하다. 그러므로, MASP-2 기능적 활성을 억제하는 MASP-2 scFv (즉, 차단 MASP-2 scFv)는 렉틴 경로 C3 전환효소의 드노보 형성을 억제할 것이다. C3은 그것의 구조의 일부로서 비정상적으로 매우 반응성인 티오에스테르 기를 함유한다. 이 검정에서 C3의 C3 전환효소에 의한 절단 시에, C3b 상의 티오에스테르 기는 플라스틱 웰의 바닥에 고정된 거대 분자 상의 하이드록실 또는 아미노 기와 함께 에스테르 또는 아마이드 결합을 통해 공유 결합을 형성할 수 있으므로, ELISA 검정에서 C3b의 검출을 용이하게 한다.

[1031] 효모 만남은 렉틴 경로의 공지된 활성화자이다. C3 전환효소의 형성을 측정하기 위한 다음의 방법에서, 만남으로 코팅된 플라스틱 웰을 희석된 인간 혈청과 인큐베이션하여 렉틴 경로를 활성화하였다. 그런 후 웰을 세척하고 웰 상에 고정된 C3b에 대해 표준 ELISA 방법을 사용하여 검정하였다. 이 검정으로 생성된 C3b의 양은 렉틴 경로 C3 전환효소의 드노보 형성을 직접 반영한다. 선택된 농도의 MASP-2 scFv 클론을 이 검정으로 C3 전환효소 형성 및 후속 C3b 생성을 억제하는 그것의 능력에 대해 테스트하였다.

[1032] **방법:**

[1033] 상기 기술된 것과 같이 확인된 45개의 후보 클론을 발현시키고, 정제하고 동일한 스톱 농도로 희석하고, 다시 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)에 희석하여 모든 클론이 동일한 양의 완충액을 가지도록 보장하였다. scFv 클론을 각각 3중으로 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 테스트하였다. 양성 대조군은 OMS100 Fab2였고 0.4 $\mu\text{g/mL}$ 에서 테스트하였다. C3c 형성을 scFv/IgG 클론의 존재 및 부재 하에 모니터링하였다.

[1034] 만남을 50 mM 탄산염 완충액 (15 mM Na_2CO_3 + 35 mM NaHCO_3 + 1.5 mM NaN_3), pH 9.5에서 20 $\mu\text{g/mL}$ (1 $\mu\text{g/Well}$)의 농도로 희석하고 ELISA 플레이트 상에서 밤새 4°C에서 코팅하였다. 다음날, 만남-코팅 플레이트를 200 μl PBS로 3회 세척하였다. 그런 후 100 μl 의 1% HSA 차단 용액을 웰에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 200 μl PBS로 3회 세척하고, 샘플을 첨가할 때까지 200 μl PBS와 함께 얼음에서 보관하였다.

[1035] 정상 인간 혈청을 CaMgGVB 완충액에서 0.5%로 희석하고, scFv 클론 또는 OMS100 Fab2 양성 대조군을 삼중으로 0.01 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$ (OMS100 대조군만) 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 로 이 완충액에 첨가하고 차단된 ELISA 플레이트에 첨가하기 전에 얼음에서 45분 동안 사전인큐베이션하였다. 반응을 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션함으로써 시작하고 플레이트를 얼음 배스에 옮김으로써 중단시켰다. C3b 침착을 토끼 α -마우스 C3c 항체와 이어서 염소 α -토끼 HRP로 검출하였다. 음성 대조군은 항체가 없는 완충액이었고 (항체 없음 = 최대 C3b 침착), 양성 대조군은 EDTA가 첨가된 완충액이었다 (C3b 침착 없음). 웰이 만남이 없는 것을 제외하고 동일한 검정을 수행함으로써 배경을 측정하였다. 만남이 없는 플레이트에 대한 배경 신호를 만남 함유 웰에서의 신호로부터 뺐다. 컷오프 기준을 무관한 scFv 클론 (VZV) 및 완충액 단독의 활성의 절반으로 설정하였다.

[1036] **결과:** 컷오프 기준을 토대로, 총 13개의 클론이 MASP-2의 활성을 차단하는 것으로 나타났다. > 50% 경로 억제를 유발하는 13개 클론을 전부 선택하고 서열을 분석하여 10개의 독특한 클론을 얻었다. 10개의 클론은 전부 동일한 경쇄 하위부류인 $\lambda 3$ 을 갖지만, 3개의 상이한 중쇄 하위부류: VH2, VH3 및 VH6을 가지는 것으로 나타났다. 기능성 검정에서, 10개 후보 scFv 클론 중 5개가 0.5% 인간 혈청을 사용하는 25 nM 표적 기준보다 적은 IC_{50} nM 값을 제공하였다.

[1037] 개선된 효능을 가진 항체를 확인하기 위하여, 상기 기술된 것과 같이 확인된 3개의 모 scFv 클론에 대해 경쇄 서플링을 수행하였다. 이 과정은 각각의 모 클론의 VH와 6개의 건강한 도너로부터의 나이브, 인간 람다 경쇄 (VL)의 라이브러리로부터 이루어지는 조합 라이브러리의 생성을 포함한다. 그런 후 이 라이브러리를 개선된 결합 친화성 및/또는 기능성을 가진 scFv 클론에 대해 스크리닝하였다.

[1038] 선두 딸 클론 및 그것의 각각의 모 클론 (전부 scFv 포맷임)의 IC₅₀ (nM)의 기능적 효능의 비교

scFv 클론	1% 인간 혈청 C3 검정 (IC ₅₀ nM)	90% 인간 혈청 C3 검정 (IC ₅₀ nM)	90% 인간 혈청 C4 검정 (IC ₅₀ nM)
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

[1039] 아래에 상기 표 19에서 제시된 모 클론 및 딸 클론에 대한 중쇄 가변 영역 (VH) 서열이 제공된다.

[1040] Kabat CDR (31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-107 (H3))은 진하게 표시되고; Chothia CDR (26-32 (H1), 52-56 (H2) 및 95-101 (H3))은 밀줄로 표시된다.

[1041] 17D20_35VH-21N11VL 중쇄 가변 영역 (VH) (SEQ ID NO:67, SEQ ID NO:66에 의해 암호화됨)

[1042] QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYYCARIRR
GGIDYWGQGLTVTVSS

[1043] d17N9 중쇄 가변 영역 (VH) (SEQ ID NO:68)

[1044] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVSSSTSAANWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARD
PFGVPPFDIWGQGMTVTVSS

[1045] 아래에 모 클론 및 딸 클론에 대한 경쇄 가변 영역 (VL) 서열이 제공된다.

[1046] Kabat CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2); 및 89-97 (L3))은 진하게 표시되고; Chothia CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2) 및 89-97 (L3))은 밀줄로 표시된다. 이들 영역은 Kabat 시스템에 의해 넘버링되든지 또는 Chothia 시스템에 의해 넘버링되든지 동일하다.

[1047] 17D20m_d3521N11 경쇄 가변 영역 (VL) (SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:69에 의해 암호화됨)

[1048] QPVLTPPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQKPGQSPVLVMYQDKQRPSPGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFEGGGTK
LTVL

[1049] 17N16m_d17N9 경쇄 가변 영역 (VL) (SEQ ID NO:71)

[1050] SYELIQPPSVSVAPGQTATITCAGDNLGKKRVHWYQQRPGQAPVLVIYDSDRPSGIPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQVWDIATDHFVFGGG
TKLTVLAAAGSEQKLISE.

[1051] 인간 MASP-2에 고친화성으로 결합하고 기능적 보체 활성을 차단하는 능력을 가진 것으로 입증된 MASP-2 항체 OMS100 및 MoAb_d3521N11VL (SEQ ID NO:67로서 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70로서 제시된 경쇄 가변 영역을 포함함, 또한 "OMS646" 및 "mAbH6"으로도 언급됨)을 에피토프 결합과 관련하여 닷트 블롯 분석에 의해 분석하였다. 결과는 OMS646 및 OMS100 항체가 MASP-2에 대해 매우 특이적이며 MASP-1/3에 결합하지 않는 것을 보여준다. 항체는 Map19 또는 MASP-2의 CCP1 도메인을 함유하지 않은 MASP-2 단편에 결합하지 않아서 결합 부위가 CCP1을 포함한다는 결론으로 이어진다.

[1052] MASP-2 항체 OMS646을 C1s, C1r 또는 MASP-1과 비교할 때 >5000배의 선택성으로 재조합 MASP-2 (Kd 60-250 pM)에 강력하게 결합하는 것으로 측정하였다 (아래의 표 20 참고):

표 20

[1053] 고상 ELISA 연구에 의해 평가된 OMS646 MASP-2 항체-MASP-2 상호작용의 친화성 및 특이성

항원	K _D (pM)
MASP-1	>500,000
MASP-2	62 ± 23*
MASP-3	>500,000
정제된 인간 C1r	>500,000

정제된 인간 C1s	~500,000
------------	----------

- [1054] * 평균±SD; n=12
- [1055] OMS646은 말단 보체 구성요소의 렉틴-의존성 활성화를 특이적으로 차단한다
- [1056] **방법:**
- [1057] 막 공격 복합체 (MAC) 침착에 미치는 OMS646의 영향을 렉틴 경로, 고전적 경로 및 대체 경로에 대한 경로-특이적 조건을 사용하여 분석하였다. 이 목적에 대해, Wieslab Comp300 보체 스크리닝 키트 (Wieslab, Lund, Sweden)를 제조사의 설명서를 따라 사용하였다.
- [1058] **결과:**
- [1059] 도 53A는 렉틴 경로-특이적 검정 조건 하에서 항-MASP-2 항체 (OMS646)의 존재 또는 부재 하에 MAC 침착의 수준을 그래프로 도시한다. 도 53B는 고전적 경로-특이적 검정 조건 하에서 항-MASP-2 항체 (OMS646)의 존재 또는 부재 하에 MAC 침착의 수준을 그래프로 도시한다. 도 53C는 대체 경로-특이적 검정 조건 하에서 항-MASP-2 항체 (OMS646)의 존재 또는 부재 하에 MAC 침착의 수준을 그래프로 도시한다.
- [1060] 도 53A에서 나타난 것과 같이, OMS646은 대략 1 nM의 IC₅₀ 값으로 MAC 침착의 렉틴 경로-매개 활성화를 차단한다. 그러나, OMS646은 고전적 경로-매개 활성화 (도 53B) 또는 대체 경로-매개 활성화 (도 53C)로부터 생성된 MAC 침착에는 아무런 영향을 나타내지 않았다.
- [1061] 마우스에의 정맥내 (IV) 또는 피하 (SC) 투여 후 OMS646의 약동학 및 약력학
- [1062] OMS646의 약동학 (PK) 및 약력학 (PD)을 마우스에서 28일 단일 용량 PK/PD 연구로 평가하였다. 연구는 피하로 투여된 (SC) 5 mg/kg 및 15 mg/kg의 OMS646의 용량 수준뿐만 아니라, 정맥내로 투여된 (IV) 5 mg/kg OMS646의 용량 수준을 테스트하였다.
- [1063] OMS646의 PK 프로파일과 관련하여, 도 54는 표시된 용량에서 OMS646의 투여 후 시간의 함수로서 OMS646 농도 (n=3마리 동물/그룹의 평균)를 그래프로 도시한다. 도 54에서 나타난 것과 같이, 5 mg/kg SC에서, OMS646은 투약 후 대략 1-2일 후에 5-6 ug/mL의 최대 혈장 농도에 도달하였다. 5 mg/kg SC에서 OMS646의 생체이용률은 대략 60%였다. 도 54에서 추가로 나타난 것과 같이, 15 mg/kg SC에서, OMS646은 투약 후 대략 1 내지 2일 후에 10-12 ug/mL의 최대 혈장 농도에 도달하였다. 모든 그룹에 대해, OMS646은 전신 순환으로부터 서서히 제거되었고 말단 반감기는 대략 8-10일이었다. OMS646의 프로파일은 마우스에서의 인간 항체에 대해 전형적이다.
- [1064] OMS646의 PD 활성을 도 55A 및 55B에 그래프로 도시한다. 도 55A 및 55B는 5 mg/kg IV (도 55A) 및 5 mg/kg SC (도 55B) 그룹에서 각각의 마우스에 대한 PD 반응 (전신성 렉틴 경로 활성의 감소)을 보여준다. 점선은 검정의 기준선을 나타낸다 (최대 억제; 검정 전 과잉량의 OMS646으로 시험관내에서 스파이크된 나일브 마우스 혈청). 도 55A에서 나타난 것과 같이, 5 mg/kg의 OMS646의 정맥내 투여 후에, 전신성 렉틴 경로 활성은 즉시 거의 검출할 수 없는 수준으로 떨어졌고, 렉틴 경로 활성은 28일 관찰 주기 동안 겨우 적당한 정도의 회복을 보였다. 도 55B에서 나타난 것과 같이, 5 mg/kg의 OMS646을 피하로 투여한 마우스에서, 렉틴 경로 활성의 시간-의존성 억제를 관찰하였다. 렉틴 경로 활성은 약물 투여 후 24시간 이내에 거의 검출할 수 없는 수준으로 떨어졌고 적어도 7일 동안 낮은 수준으로 유지되었다. 렉틴 경로 활성은 시간이 지남에 따라 점진적으로 증가하였지만, 28일 관찰 기간 내에 투여 전 수준으로 돌아가진 못하였다. 15 mg/kg 피하 투여 후 관찰된 렉틴 경로 활성 대비 시간 프로파일은 5 mg/kg 피하 용량과 유사하였고 (데이터 미제시), 그것은 PD 중점의 포화를 나타낸다. 데이터는 추가로 주마다 정맥내 또는 피하로 투여된 5 mg/kg의 OMS646의 용량이 마우스에서 전신성 렉틴 경로 활성의 연속적인 억제를 달성하는 데 충분한 것을 나타냈다.
- [1065] **실시예 41**
- [1066] 이 실시예는 MASP-2 억제 항체 (OMS646)가 질환의 급성 단계 및 차도 단계 중에 얻어진 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS) 환자로부터의 혈청에 노출된 후 활성화된 인간 미세혈관 내피 세포 (HMEC-1)의 표면에서 aHUS 혈청-유도 보체 C5b-9 침착을 억제하는 것을 입증한다.
- [1067] **배경/근거:** MASP-2에 특이적으로 결합하여 렉틴 경로 활성화를 억제하는 MASP-2 항체인 OMS646의 존재 또는 부재 하에 질환의 (1) 급성 단계 중에 및 (2) 차도 단계 중에 얻어진 aHUS 환자 혈청에 노출된 후 활성화된 HMEC-

1 세포의 표면에서 aHUS 혈청-유도 보체 C5b-9 침착을 분석하기 위해 다음의 연구를 수행하였다.

방법:

환자: HUS/TTP의 국제 등록소에 포함되고 마리오 네그리 연구소 (Mario Negri Institute) 이식 및 희귀 질환의 면역학 및 유전학 연구실에 의해 유전자형이 분류된 환자들 중에서, 질환의 급성 단계 및 차도 단계 중에서 모두 연구된 aHUS가 있는 4명의 환자를 이 연구를 위해 선택하였다. 1명의 aHUS 환자가 이형접합성 p.R1210C 보체 인자 H (CFH) 돌연변이를 가졌고 1명은 항-CFH 자가항체를 가진 한편, 다른 2명의 aHUS 환자에서는 CFH에 대한 돌연변이 또는 항체가 발견되지 않았다.

표 21 및 22는 급성 단계 중에 또는 차도 단계 중에 측정된 임상적 및 생화학적 데이터와 함께 이 연구에서 분석된 4명의 aHUS 환자에서의 보체 유전자 돌연변이 및 항-CFH 자가항체에 대한 스크리닝 결과를 요약한다.

표 21

이 연구에서 4명의 aHUS 환자의 임상 파라미터

사례 번호	돌연변이 또는 항-CFH Ab	질환 단계	혈소판 ($150-400 \times 10^3 / \mu\text{l}$)	LDH (266-500 IU/l)	헤모글로빈 (14-18g/dl)	s-크레아티닌 (0.55-1.25 mg/dl)
#1	돌연변이 없음, 항-CFH ab 없음	급성	31,000	1396	12.9	2.37
		차도	267,000	n.a.	11.5	3.76
#2	CFH-R1210C	급성	46,000	1962	7	5.7
		차도	268,000	440	13.4	7.24
#3	항-CFH Ab	급성	40,000	3362	9.5	1.77
		차도	271,000	338	8.8	0.84
#4	돌연변이 없음, 항-CFH ab 없음	급성	83,000	1219	7.8	6.8
		차도	222,000	495	12.2	13

주: n.a. = 이용할 수 없음

표 22

이 연구에서 4명의 aHUS 환자의 보체 파라미터

Case No.	돌연변이 of 항-CFH Ab	질환 단계	혈청 C3 (83-180 mg/dl)	혈장 SC5b-9 (127-400 ng/ml)
#1	돌연변이 없음, 항-CFH ab 없음	급성	51	69
		차도	n.a.	117
#2	CFH-R1210C	급성	79	421
		차도	119	233
#3	항-CFH Ab	급성	58	653
		차도	149	591
#4	돌연변이 없음, 항-CFH ab 없음	급성	108	n.a.
		차도	n.a.	n.a.

실험 방법: 피부 기원의 인간 미세혈관 내피 세포주 (HMEC-1)로부터의 세포를 유리 슬라이드 상에 플레이팅하고 합류가 되었을 때 사용하였다. 합류 HMEC-1 세포를 10 μM ADP (아데노신 다이포스페이트)로 10분 동안 활성화한 후 질환의 급성 단계 중에, 또는 차도시 동일한 aHUS 환자로부터, 또는 4명의 건강한 대조군 대상체로부터 수집된, 표 23 및 24에서 상기 기술된 4명의 aHUS 환자로부터의 혈청과 4시간 동안 인큐베이션하였다. 혈청을 상기 실시예 40에서 기술된 것과 같이 생성된 MASP-2 억제 항체, OMS646 (100 $\mu\text{g/mL}$)의 존재 또는 부재 하에, 또는 보체 억제제의 양성 대조군으로서 가용성 보체 수용체 1 (sCR1) (150 $\mu\text{g/mL}$)의 존재 하에 테스트 배지 (0.5% BSA를 포함한 HBSS)로 희석하였다. 인큐베이션 단계가 끝났을 때, HMEC-1 세포를 토끼 항-인간 보체 C5b-9로 처리하고 이어서 FITC-콘주게이션된 이차 항체로 처리하였다. 각 실험에서, 1명의 건강한 대조군으로부터의 혈청을 aHUS 환자 혈청 (급성 단계 및 차도)과 나란히 테스트하였다. 내피 세포 표면 상의 형광 염색의 획득을 위해 공초점 도립(inverted) 레이저 현미경을 사용하였다. 샘플 당 15개의 필드를 얻었고 형광 염색이 차지한

면적을 소프트웨어 Image J의 빌트인 특정 기능을 사용하여 자동 DPT지 검출에 의해 평가하고 분석된 필드당 픽셀²으로서 표시하였다. 최저 및 최고 값을 보이는 필드는 계산으로부터 배제하였다.

[1075] 통계적 분석 (다중 비교를 위해 일원변량분석과 이어서 Tukey 테스트)을 위해 각 환자 및 대조군에 대한 각각의 실험 조건에서 고려된 13개 필드의 픽셀²의 결과를 사용하였다.

[1076] 결과:

[1077] 4명의 aHUS 환자로부터의 혈청을 사용한 보체 침착 분석의 결과를 아래의 표 23A에서 요약하고, 4명의 건강한 대조군으로부터의 혈청을 사용한 결과를 아래의 표 23B에서 요약한다.

【표 23A】

ADP-활성화된 HMEC-1 세포 상의 aHUS 혈청-유도 C5b-9 침착에 미치는 보체

억제제의 영향

aHUS 환자 #	aHUS 급성 단계			aHUS 차도 단계		
	미처리	+sCR1	+OMS646	미처리	+sCR1	+OMS646
환자 #1 (돌연변이 없음, 항-CFH ab 없음)	5076 ± 562 °	551 ± 80*	3312 ± 422 **	4507 ± 533 °	598 ± 101 §	1650 ± 223 §
환자 #2(CFH-R1210C)	5103 ± 648 °	497 ± 67*	2435 ± 394 *	3705 ± 570 °	420 ± 65 §	2151 ± 250 § § §
환자 #3(항-CFH ab)	3322 ± 421 °	353 ± 64*	2582 ± 479	6790 ± 901 °	660 ± 83 §	2077 ± 353 §
환자 #4(돌연변이 없음, 항-CFH ab 없음)	4267 ± 488 °	205 ± 34*	2369 ± 265 **	5032 ± 594 °	182 ± 29 §	3290 ± 552 § §

[1078]

【표 23B】

ADP-활성화된 HMEC-1 세포 상의 C5b-9 침착에 대한 4명의 건강한 대조군 대

상체 (aHUS를 앓지 않음)로부터의 혈청에 대한 보체 억제제의 영향

건강한 대조군 대상체 #	미처리	+sCR1	+OMS646
대조군 대상체 #1(aHUS 대상체 #1과 나란히 검정됨)	481 ± 66	375 ± 43	213 ± 57
대조군 대상체 #2(aHUS 대상체 #2와 나란히 검정됨)	651 ± 61	240 ± 33	490 ± 69
대조군 대상체 #3(aHUS 대상체 #3과 나란히 검정됨)	602 ± 83	234 ± 35	717 ± 109
대조군 대상체 #4(aHUS 대상체 #4와 나란히 검정됨)	370 ± 53	144 ± 20	313 ± 36

[1079]

[1080] 표 23A 및 23B에 대해: 데이터는 평균 ± SE이다. ° P<0.001 대비 대조군; *P<0.001, **P<0.01 대비 미처리 aHUS 급성 단계; §P<0.001, § §P<0.01, § § §P<0.05 대비 미처리 aHUS 차도 단계.

[1081] 도 56은 ADP-활성화된 HMEC-1 세포 상에서 aHUS 혈청-유도 C5b-9 침착에 미치는 MASP-2 항체 (OMS646) 및 sCR1의 억제 효과를 그래프로 도시한다. 도 56에서, 데이터는 평균 ± SE이다. ° P<0.0001 대비 대조군; *P<0.0001 대비 미처리 aHUS 급성 단계; ^P<0.0001 대비 aHUS 급성 단계 + sCR1; §P<0.0001 대비 aHUS 차도 단계 및 #P<0.0001 대비 aHUS 차도 단계 + sCR1.

[1082] 표 23A, 23B 및 도 56에서 나타난 것과 같이, aHUS 환자로부터의 혈청 (급성 단계 또는 차도시 수집됨)에 4시간 동안 정적 조건에서 노출된 ADP-자극된 HMEC-1 세포는 공초점 현미경 검사에 의해 검출된 바 세포 표면 상에서 C5b-9의 강렬한 침착을 보였다. C5b-9에 의해 덮인 영역을 측정함으로써, aHUS 혈청이 급성 단계에서 수집되었는지 또는 차도시 수집되었는지 관계 없이 건강한 대조군 대상체로부터의 혈청에 노출된 세포 상에서보다 상당

히 더 많은 양의 C5b-9 침착을 관찰하였다. 급성 단계와 차도 사이에서 혈청-유도 내피 C5b-9 침착의 차이를 관찰하지 못하였다.

[1083] 표 23A, 23B 및 도 56에서 추가로 나타난 것과 같이, MASP-2 항체 OMS646의 aHUS 혈청 (급성 단계 중에 또는 차도시 환자로부터 얻어짐)에의 첨가는 미처리 aHUS 혈청과 비교하여 내피 세포 표면 상의 C5b-9 침착의 상당한 감소로 이어졌다. 그러나, C5b-9 침착에 미치는 OMS646의 억제 효과는 보체 pan-억제제 sCR1에 의해 나타난 효과보다 덜 뚜렷하였다. 실제로, 통계적으로 유의미한 차이가 OMS646 대비 sCR1의 존재 하에서의 aHUS 혈청-유도 C5b-9 침착 사이에서 관찰되었다 (도 56 및 표 23A 및 23B).

[1084] 4명의 aHUS 환자의 평균으로서 계산하였을 때, 보체 억제제의 존재 하에 관찰된 5b-9 침착의 감소 백분율 (동일한 환자로부터의 미처리 혈청에 의해 유도된 C5b-9 침착을 100%로 하여 비교됨)은 다음과 같았다:

[1085] 급성 단계:

[1086] sCR1 (150 μ g/ml): C5b-9 침착의 91% 감소

[1087] OMS646 (100 μ g/ml): C5b-9 침착의 40% 감소

[1088] 차도 단계:

[1089] sCR1 (150 μ g/ml): C5b-9 침착의 91% 감소

[1090] OMS646 (100 μ g/ml): C5b-9 침착의 54% 감소

[1091] 결론: 이 실시예에서 기술된 결과는 보체의 렉틴 경로가 활성화된 미세혈관 내피 세포에 의해 자극되고 이 자극은 aHUS의 특징인 지나친 보체 활성화 반응의 유의미한 구동요인인 것을 입증한다. 또한 이 렉틴 경로의 자극 및 결과적으로 유발된 지나친 보체 활성화 반응은 aHUS의 급성 단계 중에 및 임상 차도시 모두 발생하는 것으로 입증된다. 더욱이, 이런 발견은 aHUS와 관련된 어떠한 특정 보체 결핍에 국한되지 않는 것으로 나타난다. 이 실시예에서 추가로 입증되는 것은, OMS646과 같은 MASP-2 억제 항체로의 렉틴 경로의 선택적 억제는 다양한 병인을 가진 aHUS 환자의 보체 침착을 감소시킨다는 것이다.

[1092] **실시예 42**

[1093] 이 실시예는 MASP-2 억제 항체 (OMS646)가 aHUS의 (1) 급성 단계 및 (2) 차도 단계 중에 얻어진 aHUS 환자 혈청에 대한 노출 후에 활성화된 인간 미세혈관 내피 세포 (HMEC-1)의 표면 상의 aHUS 혈청-유도 혈소판 응집 및 혈전 형성을 억제하는 것을 입증한다.

[1094] 방법:

[1095] 환자: aHUS를 가진 3명의 환자 (표 21, 22, 23A 및 23B 및 실시예 41에서 기술된 바 환자 #1, #2 및 #4) (1명의 환자는 이형접합성 p.R1210C CFH 돌연변이를 가진 한편, 다른 2명의 환자에서는 돌연변이 또는 항-CFH 항체가 발견되지 않음)를 질환의 급성 단계 중에 및 차도시 모두 연구하였다. HUS/TTP의 국제 등록소에 포함되고 마리오 네그리 연구소 이식 및 회귀 질환의 면역학 및 유전학 연구실에 의해 유전자형이 분류된 환자들 중에서 환자를 이 연구를 위해 선택하였다. 5명의 건강한 대장체를 또한 관류 실험을 위한 혈액 도너로서 선택하였다.

[1096] 방법: 합류 HMEC-1 세포를 10 μ M ADP로 10분 동안 활성화한 후 질환의 급성 단계 중에 또는 차도시 동일 환자로부터 수집된 3명의 aHUS 환자 (실시예 41에서 기술된 환자 #1, 2 및 4)로부터의 혈청과, 또는 건강한 대장체로부터의 대조군 혈청과 3시간 동안 인큐베이션하였다. 혈청을 실시예 40에서 기술된 것과 같이 생성된 MASP-2 억제 항체, OMS646 (100 μ g/mL)의 존재 또는 부재 하에 테스트 배지 (0.5% BSA를 포함한 HBSS)로; 또는 보체 억제제의 양성 대조군으로서 sCR1 (150 μ g/mL)로 1:2로 희석하였다. 환자 #1 및 #2에 대해 추가 웰을 100 μ g/mL의 무관한 아이소타입 대조군 항체를 함유한 테스트 배지로 또는 20 μ g/mL의 OMS646으로 1:2로 희석한 혈청 (급성 단계 및 차도시로부터 얻어짐)과 함께 인큐베이션하였다 (후자의 경우, 사례 #1을 차도시에만 테스트하였고 사례 #2는 급성 단계 중에 및 차도시 모두 테스트함).

[1097] 인큐베이션 단계가 끝났을 때, HMEC-1 세포를 건강한 대장체로부터 얻어진 헤파린 처리된 전혈 (10 UI/mL) (혈소판을 표지하는 형광 염료 메파크린을 함유함)로 미세순환에서 만나는 전단 응력 ($60 \text{ 다인}/\text{cm}^2$, 3분)에서 유동 챔버에서 관류시켰다. 3분의 관류 후, 내피 세포 단일층을 아세톤에 고정시켰다. 내피 세포 표면 상의 혈소판 혈전의 샘플당 15개 이미지를 공초점 도립 레이저 현미경에 의해 획득하고, 혈전이 차지한 면적을 소프트웨어 Image J를 사용하여 평가하였다. 최저 및 최고 값을 보이는 필드는 계산으로부터 배제하였다.

[1098] 통계적 분석 (다중 비교를 위해 일원변량분석과 이어서 Tukey 테스트)을 위해, 각 환자 및 대조군에 대한 각각의 실험 조건에서 고려된 13개 필드의 픽셀²의 결과를 사용하였다.

[1099] 결과:

[1100] 3명의 aHUS 환자로부터의 혈청을 사용한 혈전 형성 실험의 결과를 아래의 표 24A에서 요약하고, 5명의 건강한 대조군으로부터의 혈청을 사용한 결과를 아래의 표 24B에서 요약한다.

【표 24A】

ADP-활성화된 HMEC-1 세포 상의 aHUS 혈청-유도 혈전 형성 (픽셀²±SE) 에

미치는 보체 억제제의 영향

실험 조건	질판 단계	aHUS 사례 #1 혈전 형성 (픽셀 ² ±SE) (돌연변이 없음, 항-CFH ab 없음)	aHUS 사례 #2 혈전 형성 (픽셀 ² ±SE) (CFH-R1210C)	aHUS 사례 #3 혈전 형성 (픽셀 ² ±SE) (돌연변이 없음, 항-CFH ab 없음)
미처리	급성	5499 ± 600	22320 ± 1273°	10291 ± 1362°
	차도	6468 ± 1012°	3387 ± 443°	17676 ± 1106°
+sCR1 (150 µg/mL)	급성	4311 ± 676	5539 ± 578*	5336 ± 1214***
	차도	573 ± 316 §	977 ± 102 §	2544 ± 498 §
+OMS646 (20 µg/mL)	급성	측정되지 않음	6974 ± 556*	측정되지 않음
	차도	832 ± 150 §	1224 ± 252 §	측정되지 않음
+OMS646 (100 µg/mL)	급성	3705 ± 777	9913 ± 984*	2836 ± 509*
	차도	3321 ± 945 § § §	733 ± 102 §	1700 ± 321 §
+ 무관한 아이소타입 대조군 항체 (100 µg/mL)	급성	5995 ± 725	18655 ± 1699	측정되지 않음
	차도	10885 ± 1380	2711 ± 371	측정되지 않음

[1101]

【표 24B】

ADP-활성화된 HMEC-1 세포 상의 혈전 형성 (픽셀²±SE) 검정에서 5명의 건강

한 대조군 대상체 (aHUS를 알지 않음)로부터의 혈청에 미치는 보체 억제제의 영향

실험 조건	대조군 #1 혈전 형성 (픽셀 ² ±SE)	대조군 #2 혈전 형성 (픽셀 ² ±SE)	대조군 #3 혈전 형성 (픽셀 ² ±SE)	대조군 #4 혈전 형성 (픽셀 ² ±SE)	대조군 #5 혈전 형성 (픽셀 ² ±SE)
미처리	2380 ± 510	1046 ± 172	1144 ± 193	735 ± 124	2811 ± 609
+sCR1 (150 µg/mL)	5192 ± 637	1527 ± 153	1198 ± 138	2239 ± 243	2384 ± 410
+OMS646 (100 µg/mL)	7637 ± 888	1036 ± 175	731 ± 203	2000 ± 356	7177 ± 1477
+무관한 아이소타입 대조군 항체 (100 µg/mL)	6325 ± 697	1024 ± 235	399 ± 82	45269	측정되지 않음
aHUS 대상체로부터의 혈청과 나란히 검정됨	#1 (급성 단계 혈청)	#1 (차도 단계 혈청)	#2 (급성 단계 혈청)	#2 (차도 단계 혈청)	#5 (급성 and 차도 단계 혈청)

[1102]

[1103] 표 24A 및 24B에 대해: 데이터는 평균 ± SE이다. ° P<0.001 대비 대조군; *P<0.001, **P<0.05 대비 미처리 aHUS 급성 단계; § P<0.001, § § P<0.01, § § § P<0.05 대비 미처리 aHUS 차도 단계.

[1104] 도 57은 ADP-활성화된 HMEC-1 세포 상에서 aHUS 혈청-유도 혈전 형성에 미치는 MASP-2 항체 (OMS646) 및 sCR1의 효과를 그래프로 도시한다. 도 57에서, 제시된 데이터는 평균 ± SE이다. ° P<0.0001, ° ° P<0.01 대비 대조군; *P<0.0001, **P<0.01 대비 미처리 aHUS 급성 단계; § P<0.0001 대비 미처리 aHUS 차도 단계.

- [1105] 표 24A 및 도 57에서 나타난 것과 같이, 건강한 대조군 대상체로부터의 혈청에 노출된 세포와 비교하여, 혈전에 덮인 면적의 현저한 증가가 급성 단계 중에 또는 차도시 수집된 aHUS 혈청으로 처리된 HMEC-1 세포 상에서 관찰되었다 (표 24B 및 도 57). 도 57 및 표 24A에서 나타난 것과 같이, OMS646 (100 μ g/ml 및 20 μ g/ml에서 모두)는 급성 단계 중에 취한 aHUS 혈청에 사전 노출된 세포에 대해 혈전 형성의 부분 억제 효과를 보였다. 항혈전 형성 효과는 OMS646의 두 상이한 용량 사이에서 비슷하였고 sCR1의 효과와 다르지 않았다 (도 57 및 표 24A). 무관한 아이소타입 대조군 항체의 첨가는 aHUS-혈청-유도 혈전 형성에 억제 효과를 나타내지 않았다.
- [1106] 도 57 및 표 24A에서 추가로 나타난 것과 같이, OMS646의 억제 효과는 차도 단계 중에 수집된 aHUS 혈청에 대해 더욱 더 분명하였다. 실제로, 차도시 수집된 aHUS 환자 혈청에 대한 100 μ g/ml 및 20 μ g/ml의 두 용량 모두에서의 OMS646의 첨가는, sCR1의 첨가로 관찰된 것과 유사한 거의 완전한 혈전 형성의 억제를 초래하였다. 무관한 아이소타입 대조군 항체는 유의미한 억제 효과를 보이지 않았다.
- [1107] 3명의 aHUS 환자의 평균으로서 계산했을 때, 보체 억제제로 기록된 혈전 침착에 의해 덮인 HMEC-1 표면의 감소 백분율 (동일한 환자로부터의 미처리 혈청에 의해 유도된 혈전 형성을 100%로 하여 비교됨)은 다음과 같았다:
- [1108] 급성 단계:
- [1109] sCR1 (150 μ g/ml): 60% 감소
- [1110] OMS646 (100 μ g/ml): 57% 감소
- [1111] OMS646 (20 μ g/ml): 45% 감소
- [1112] 차도 단계:
- [1113] sCR1 (150 μ g/ml): 85% 감소
- [1114] OMS646 (100 μ g/ml): 79% 감소
- [1115] OMS646 (20 μ g/ml): 89% 감소
- [1116] 결과의 논의:
- [1117] 이 실시예의 결과는 MASP-2 억제 항체, 예컨대 OMS646 (실시예 40에서 기술된 것과 같이 생성됨)이 HMEC-1 세포 상의 aHUS 혈청-유도 혈전 형성에 대해 강력한 억제 효과를 가지는 것을 입증한다. 놀랍게도, 혈전 형성에 미치는 OMS646의 억제 효과는 HMEC-1 상에서 유도된 C5b-9 침착에 미치는 그것의 효과 (실시예 41에서 기술된 것과 같음)보다 컸다. 또한 놀랍게도 차도시 수집된 aHUS 환자 혈청에 대한 100 μ g/ml 및 20 μ g/ml의 두 용량의 OMS646의 첨가는 모두 거의 완전한 혈전 형성의 억제를 초래한다. 또 다른 놀라운 발견은 급성 단계 및 차도시에 모두 OMS646이 보체 시스템의 광범위하고 거의 완전한 억제제인 양성 대조군 sCR1만큼 효과적이었다는 관찰이다 (Weisman H. et al., *Science* 249:146-151, 1990; Lazar H. et al., *Circulation* 100:1438-1442, 1999).
- [1118] 건강한 대상체로부터의 대조군 혈청은 또한 HMEC-1 세포 상에 중간 정도의 혈전 형성을 유도한 것이 주지된다. 본 발명자들은 OMS646으로 또는 sCR1로 대조군 혈청 유도된 혈전 형성에 대한 일관된 억제를 관찰하지 못하였다. 어떠한 특정 이론에 매이기를 바라지는 않지만, 대조군 혈청과 함께 인큐베이션된 HMEC-1 상에서 관찰된 매우 낮은 C5b-9 침착에 의해 지지되는 바, 대조군-유도 혈전은 보체에 좌우되지 않는 것으로 여겨진다 (실시예 41 참고).
- [1119] 결론:
- [1120] 결론적으로, MASP-2 억제 항체, 예컨대 OMS646의 관찰된 항-혈전 효과 (실시예 41에서 기술되고 도 56에서 도시된 것과 같음)는 이 실험 시스템에서 관찰된 C5b-9 침착에 미치는 OMS646의 억제 효과를 토대로 예상되었던 것보다 실질적으로 더 큰 것으로 나타난다. 예를 들어, Gastoldi et al., *Immunobiology* 217:1129-1222 Abstract 48 (2012)에서 "C5a/C5aR 상호작용은 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)의 내피 세포 상의 보체 활성화 및 혈전증을 매개한다"라는 제목 하에 기술된 것과 같이, C5b-9 침착을 억제하는 (60% 감소) C5 항체의 첨가는 비슷한 정도로 (60% 감소) HMEC-1 상에서의 혈전 형성을 제한시킨 것이 측정되었다. 대조적으로, MASP-2 억제 항체 (100 μ g/mL의 OMS646)는 (급성 단계 = 40% 감소; 차도 단계 = 54% 감소)의 평균 값으로 C5b-9 침착을 억제하였고; 실질적으로 더 높은 퍼센트로 혈전 형성을 억제하였다 (급성 단계 = 57% 감소; 차도 단계 = 79% 감소). 비교하면, OMS646은 양성 대조군 보체 억제제보다 더 낮은 백분율로 보체 침착을 억제하였지만 (150 μ g/mL의 sCR1, C5b-9 침착의 급성 단계 억제 = 91% 감소; 차도 단계 = 91% 감소) 혈전 형성을 억제하는 데에는 sCR1 양

성 대조군과 동등하게 효과적이었다 (150 μ g/mL의 sCR1, 급성 단계 = 60% 감소; 차도 단계 = 85% 감소). 이들 결과는 MASP-2 억제 항체 (예컨대, OMS646)가 놀랍게도 급성 단계 및 차도 단계 둘 다에서 aHUS 대상체로부터 얻어진 혈청에서 혈전 형성을 억제하는 데 효과적인 것을 입증한다.

- [1121] 전술한 설명에 따르면, 한 구체예에서, 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈전성 미세혈관병증 (TMA)을 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에서 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, TMA는 용혈성 요독 증후군 (HUS), 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP) 및 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, TMA는 aHUS이다. 한 구체예에서, 조성물은 질환의 급성 단계 중에 aHUS 환자에게 투여된다. 한 구체예에서, 조성물은 차도 단계 중에 aHUS 환자에게 투여된다 (즉, 급성 단계 aHUS의 에피소드로부터 회복되었거나 부분적으로 회복된 대상체에서, 그러한 차도는, 예를 들어 Loirat C et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:60, 2011 (본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 것과 같이, 예를 들어, 증가된 혈소판 수 및/또는 감소된 혈청 LDH 농도에 의해 증명된다).
- [1122] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함하고, 및/또는 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로 또는 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 및 대체 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).
- [1123] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 aHUS (급성 또는 차도 단계)와 같은 TMA를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 aHUS를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서 혈전 형성을 혈청에서 C5b-9 침착에 미치는 억제 효과보다 적어도 20 퍼센트 이상 (예컨대 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%)의 수준으로 억제한다.
- [1124] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 차도 단계의 aHUS 환자로부터의 혈청에서 혈전 형성을, 미처리 혈청과 비교하여 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제한다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 차도 단계의 aHUS 환자의 혈청에서 혈전 형성을 C5b-9 침착에 미치는 억제 효과보다 적어도 20 퍼센트 이상 (예컨대 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%)의 수준으로 억제한다.
- [1125] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 정맥내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 투여된다.
- [1126] 한 구체예에서, 발명은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, TMA를 앓고 있는 대상체에서 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다.
- [1127] 한 구체예에서, TMA는 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS) (급성 또는 차도 단계), HUS 및 TTP로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 대상체는 aHUS의 급성 단계에 있다. 한 구체예에서, 대상체는 aHUS의 차도

단계에 있다.

- [1128] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1129] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 결합 구성원 사이의 결합은 시험관내에서, 예를 들어 ELISA를 사용하여 및/또는 한 결합 구성원에 특정 리포터 분자를 태그를 부착하여 태그가 부착되지 않은 다른 결합 구성원(들)의 존재 하에 검출될 수 있도록 함으로써 동일한 에피토프 또는 중복되는 에피토프에 결합하는 특정 결합 구성원의 확인을 가능하게 함으로써 쉽게 검정될 수 있다. 그러므로, 현재 인간 MASP-2에 대한 결합에 대해 참조 항체 OMS646과 결합하는, 인간 항체 항원 결합 부위를 포함하는 특정 항체 또는 그것의 항원 결합 단편이 제공된다.
- [1130] **실시예 43**
- [1131] 이 실시예는 인간 MASP-2 억제 항체 (OMS646)가 피부 기원의 일차 인간 미세혈관 내피 세포 (MVEC)에서 세포자멸사의 TMA 환자 혈장-매개 유도를 억제할 수 있음을 입증한다.
- [1132] 배경/근거:
- [1133] TMA의 병태생리학은 다양한 인자에 의해 유도된 내피 세포 손상과 이어지는 혈소판 플러그 및/또는 피브린 혈전에 의한 소혈관 (예컨대, 작은 세동맥 및 모세혈관)의 폐색을 포함하는 것으로 알려져 있다 (Hirt-Minkowsk P. et al., *Nephron Clin Pract* 114:c219-c235, 2010; Goldberg R.J. et al., *Am J Kidney Dis* 56(6):1168-1174, 2010). MVEC는 시험관내에서 TMA-관련 장애가 있는 환자로부터의 혈장에 노출되었을 때 세포자멸성 손상이 진행되는 것으로 나타났다 (Stefanescu et al., *Blood Vol* 112 (2):340-349, 2008; Mitra D. et al., *Blood* 89:1224-1234, 1997 참고). TMA와 연관된 세포자멸성 손상은 그러한 환자의 조직 생검 (피부, 뼈, 골수, 비장, 신장, 회장)으로부터 얻어진 MVEC에서 증명되었다. 또한 MVEC에 대한 세포자멸성 손상은 MVEC에서 막 결합 보체 조절 단백질의 수준을 감소시키는 것으로 나타났다 (예컨대, Mold & Morris, *Immunology* 102:359-364, 2001; Christmas et al., *Immunology* 119:522, 2006 참고).
- [1134] 말단 보체 구성요소를 포함하는 양성 피드백 루프는 비정형 용혈성-요독 증후군 (aHUS), 및 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)과 관련된 TMA, 디고스병, 및 암, 암 화학요법, 자가면역 및 이식에 이차적인 TMA를 포함한 TMA의 병태생리학에 관여하는 것으로 여겨지며, 이들 상태의 각각은 mAb 에컬리주맙을 사용한 항-C5 요법에 반응하는 것으로 알려져 있거나 여겨진다 (Chapin J. et al., *Brit. J. Hematol* 157:772-774, 2012; Tsai et al., *Br J Haematol* 162(4):558-559, 2013); Magro C. M. et al., *Journal of Rare Diseases* 8:185, 2013).
- [1135] 인간 MASP-2 억제 항체 (OMS646)가 aHUS, ADAMTS13 결핍-관련 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP), CAPS 및 진신성 디고스병, 뿐만 아니라 암, 이식, 자가면역 및 화학요법에 이차적인 TMA를 앓고 있는 환자로부터 얻어진 혈장 샘플 중의 일차 인간 피부 MVEC에서 세포자멸사의 TMA 환자 혈장-매개 유도를 차단하는 능력을 분석하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.
- [1136] 방법:
- [1137] MASP-2 억제 항체 (OMS646)가 피부 기원의 일차 인간 MVEC에서 세포자멸사의 TMA 환자 혈장-매개 유도를 차단하는 효능을 분석하기 위하여 Stefanescu R. et al., *Blood Vol* 112 (2):340-349, 2008 (본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 것과 같이 시험관내 검정을 수행하였다. 이 검정에서 사용된 혈장 샘플을 건강한 대조군 대상체의 수집으로부터 및 급성-단계 또는 회복기의 혈전성 미세혈관병증을 가진 개체로부터 얻었다. TMA 환자에서 미세혈관병증의 존재를 말초혈 도말 상에서 분열적혈구를 검출함으로써 평가하였다. 더불어, TTP를 Stefanescu R. et al., *Blood Vol* 112 (2):340-349, 2008에서 기술된 것과 같이 진단하였다.
- [1138] 내피 세포 (EC) 배양
- [1139] Stefanescu 등이 기술한 것과 같이, 피부 기원의 일차 인간 MVEC를 ScienCell Research Labs (San Diego, CA)로부터 구입하였다. MVEC는 5 및 6번째 계대까지 cd34를 발현하였다 (*Blood* 89:1224-1234, 1997). MVEC를 내피

세포 성장 보충물, 페니실린, 스트렙토마이신 및 15% 태아 소 혈청을 함유한 ECM1001 배지 (ScienCell Research Labs)에서 물 중의 0.1% 젤라틴으로 코팅된 폴리스티렌 플라스크에서 유지하였다. 모든 MVEC를 2 내지 6번째 계대에서 사용하였다. 하위배양은 0.25% 트립신-EDTA에 대한 5 내지 10분 노출을 포함하였다.

[1140] 세포자멸사 검정

[1141] TTP/HUS 혈장-유도 세포자멸사에 민감한 것으로 알려져 있는 피부 기원의 대표적인 일차 인간 MVEC를 인산염 완충 식염수 (PBS)로 세척하고 물 중의 0.1% 젤라틴으로 코팅된 12-웰 플레이트의 챔버에 0.15×10^6 생존 세포/mL로 플레이팅하였다. 플레이팅된 MVEC 세포를 완전 배지에서 24시간 동안 굵긴 후 MASP-2 mAb OMS646 (150 μ g/mL)의 존재 또는 부재 하에 달라지는 농도 (2%에서 20% 부피/부피)의 TMA 환자 혈장 샘플 또는 건강한 도너 혈장에 18시간 동안 노출시킨 다음 트립신 처리에 의해 수득하였다. 각각의 TMA 환자 샘플을 이중으로 분석하였다. 혈장-매개 세포자멸사의 정도를 요오드화 프로피듐 (PI) 염색을 사용하여 평가하였다. $>5 \times 10^3$ 세포를 세포형광 사진으로 분석하고 A0 피크를 컴퓨터 소프트웨어 (MCycle Av, Phoenix Flow Systems, San Diego, CA)에 의해 규정하였다. 세포 용해물로부터의 세포질 히스톤-관련 DNA 단편의 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)-기반 정량화를 또한 제조사 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)의 설명서대로 수행하였다.

[1142] 결과:

[1143] MASP-2 mAb (OMS646)의 존재 하에 TMA 환자 혈장-유도 MVEC 세포자멸사 검정의 결과를 아래의 표 25에 제시한다.

표 25

[1144] MASP-2 mAb (OMS646)의 존재 하에 피부 기원의 일차 인간 MVEC 상에서 테스트된 TMA 환자 혈장

대상체 #	연령/성별	임상 진단 (TMA) 및 기타 상태	MASP-2 ng/ml	Cre/LDH를 토대로 한 진단	C5a	sC5-b9	ADAMS 활성	ADAMS 활성을 토대로 한 진단	OMS646으로의 보호
#2	41/f	TTP	174	TTP	34.42	772	30%	aHUS	응답자
#3	52/f	TTP	150	TTP	48.32	1399	70%	aHUS	비응답자
#4	20/m	TTP	224	TTP	36.9	1187	<10%	TTP	응답자
#10	60/f	TTP	175.4	TTP	49.5	4406	64%	aHUS	비응답자
#11	59/f	TTP	144.9	TTP	40.3	1352	<10%	TTP	비응답자
#13	49/f	HUS, 암, TTP	142.8	TTP	48.6	3843	86%	aHUS	비응답자
#42	27/m	TTP	341.5	TTP	100.0	5332	<5%	TTP	비응답자
#46	25/f	TTP, 디코스, SLE	225.11	TTP	53.9	3426	ND	ND	응답자
#48	53/f	TTP, SLE, 신염 s/p 신장 이식	788.5	aHUS	31.2	1066	66%	aHUS	응답자
#49	64/f	TTP, APLA, CVA	494.5		35.4	2100	ND	ND	응답자
#51	25/f	aHUS, APLA	313.1	TTP	26.8	1595	23%	aHUS	응답자
#52	56/f	aHUS, SLE	333.1	TTP	18.9	1103	97%	aHUS	비응답자
#53	56/f	aHUS 차도	189.9	차도 TTP	28.69	344	74%	aHUS	비응답자

[1145] 표 25에서 사용된 약어: "APLA" = 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)과 관련된 항인지질 항체.

[1146] "SLE" = 전신성 홍반성 루푸스

[1147] "CVA" = 뇌혈관 사고 (뇌졸중)

[1148] Stefanescu R. et al., *Blood* Vol 112 (2):340-349, 2008에서 보고된 결과와 일치하게, 유의미한 세포자멸사를 MASP-2 항체의 부재 하에 13개의 TMA 환자 혈장 샘플의 존재 하에 피부 기원의 일차 MVEC에 대해 관찰하였다. 건강한 인간 대상체로부터의 대조군 혈장 샘플을 나란히 작업하였고 MVEC에서 세포자멸사를 유도하지 않았다 (데이터 미제시). 표 25에서 나타낸 것과 같이, MASP-2 억제 mAb (OMS646)는 테스트된 13개의 환자 혈장 샘플 중 6개에서 (46%)일차 MVEC에서 세포자멸사의 TMA 환자 혈장-매개 유도를 억제하였다 (표 25에서 "응답자"). 특

히, MASP-2 억제 mAb (OMS646)는 aHUS, TTP, 디고스병, SLE, 이식, 및 APLA (CAPS)를 앓고 있는 환자로부터 얻어진 혈장에서 세포자멸사를 억제한 것이 주지된다. MASP-2 mAb가 세포자멸사를 차단하지 못한 (표 25에서 "비응답자") 이 검정에서 테스트된 7개의 환자 샘플과 관련하여, 세포자멸사는 여러 경로에 의해 유도될 수 있고, 그런 모든 경로가 보체 의존성이 아닌 것이 주지된다. 예를 들어, Stefanescu R. et al., *Blood* Vol 112 (2):340-349, 2008에서 주지된 것과 같이, EC 검정에서 세포자멸사는 세포자멸사를 유도하는 것이 필요한 손상 수준을 측정하는 데 역할을 할 수 있는 혈장 인자에 의해 영향을 받는 기저 EC 활성화 상태에 의존적이다. Stefanescu R. 등에 의해 추가로 주지된 것과 같이, 세포자멸사를 조절할 수 있는 추가의 인자가 TMA 환자 혈장, 예컨대 사이토카인 및 보체 시스템의 다양한 구성요소에 존재할 수 있다. 그러므로, 이들 복잡한 요인으로 인해, MASP-2 항체가 TMA-혈장 유도된 세포자멸사를 나타낸 혈장 샘플의 전부에서 차단 효과를 보이지 않았던 것은 놀라운 것이 아니다.

[1149] 추가로 이와 관련하여, 유사한 분석을 항-C5 항체 에쿨리주맙으로 TMA-혈장 유도된 세포자멸사 검정을 사용하여 수행하였고 매우 유사한 결과를 관찰한 것이 주지된다 (Chapin et al., *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts): Abstract #3342, 120: 2012 참고). 매우 성공적인 상업적 제품인 에쿨리주맙의 임상 효능은 이 모델에서 입증된 효능보다 더 큰 것으로 나타나고, 그것은 이 시험관내 모델이 보체 억제 약물의 임상적 잠재력을 과소평가할 수 있음을 시사한다.

[1150] 이들 결과는 OMS646과 같은 MASP-2 억제 항체가 aHUS, TTP, 디고스병, SLE, 이식, 및 APLA (CAPS)와 같은 TMA를 앓고 있는 환자로부터 얻어진 혈장에서 TMA-혈장-유도 세포자멸사를 억제하는 데 효과적인 것을 입증한다. 내피 손상 및 세포자멸사는 특발성 TTP 및 산발성 HUS와 같은 TMA의 병리학에서 핵심 역할을 하는 것이 알려져 있다 (Kim et al., *Microvascular Research* vol 62(2):83-93, 2001). Dang 등이 기술한 것과 같이, 세포자멸사는 건강한 대조군 대상체에서가 아닌 TTP 환자의 비장 적색 펄프에서 입증되었다 (Dang et al., *Blood* 93(4):1264-1270, 1999). 세포자멸사의 증거는 또한 HUS 환자의 MVEC 기원의 신장 사구체 세포에서 관찰되었다 (Arends M. J. et al., *Hum Pathol* 20:89, 1989). 그러므로, MASP-2 억제제, 예컨대 MASP-2 억제 항체 (예컨대, OMS646)의 투여는 aHUS, TTP와 같은 TMA 또는 CAPS, 전신성 디고스병, 및 암에 이차적인 TMA; 화학요법에 이차적인 TMA, 또는 이식에 이차적인 TMA를 포함하는 다른 TMA와 같은 다른 미세혈관병증 장애를 앓고 있는 환자에서 효과적인 치료법일 것으로 예상된다.

[1151] 전술한 설명에 따르면, 한 구체예에서, 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 충분한 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 내피 세포 손상 및/또는 내피 세포 세포자멸사, 및/또는 혈전 형성을 억제하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, TMA는 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS), 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP) 및 용혈성 요독 증후군 (HUS)로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, TMA는 aHUS이다. 한 구체예에서, 조성물은 질환의 급성 단계 중에 aHUS 환자에게 투여된다. 한 구체예에서, 조성물은 차도 단계 (즉, 급성 단계 aHUS의 에피소드로부터 회복되었거나 부분적으로 회복된 대상체에서, 예를 들어, 증가된 혈소판 수 및/또는 감소된 혈청 LDH 농도에 의해 증거된 그러한 차도, 예를 들어 Loirat C et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 6:60, 2011 (본원에 참조로 포함됨)에서 기술된 것과 같음) 중에 aHUS 환자에게 투여된다.

[1152] 한 구체예에서, 대상체는 (i) 암에 이차적인 TMA; (ii) 화학요법에 이차적인 TMA; 또는 (iii) 이식에 이차적인 TMA (예컨대, 장기 이식, 예컨대 신장 이식 또는 동종 조혈 줄기 세포 이식)인 TMA를 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 한 구체예에서, 대상체는 업쇼-술만 증후군 (USS)을 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 한 구체예에서, 대상체는 디고스병을 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 한 구체예에서, 대상체는 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)을 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다.

[1153] 본원에 개시된 임의의 구체예에 따르면, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', $F(ab)_2$ 및 $F(ab')_2$ 로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함하고, 및/또는 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 대체 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 보체 경로

는 온전하게 남겨 둔다).

- [1154] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 aHUS (급성 또는 차도 단계), 용혈성 요독 증후군 (HUS), 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP), 암에 이차적인 TMA; 화학요법에 이차적인 TMA; 이식 (예컨대, 장기 이식, 예컨대 신장 이식 또는 동종 조혈 줄기 세포 이식)에 이차적인 TMA와 같은 TMA를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서, 또는 업쇼-술만 증후군 (USS)을 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서, 또는 디고스병을 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서, 또는 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)을 앓고 있는 대상체에서 혈장 유도된 MVEC 세포자멸사를 억제하며, 여기서 혈장 유도된 MVEC 세포자멸사는 미처리 혈청과 비교하여 적어도 5%, 예컨대 적어도 10%, 예컨대 적어도 20%, 예컨대 적어도 30%, 예컨대 적어도 40%, 예컨대 적어도 50%, 예컨대 적어도 60%, 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 85%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 최대 99% 억제된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 TMA (예컨대, 예컨대 aHUS (급성 또는 차도 단계), 용혈성 요독 증후군 (HUS), 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP), 암에 이차적인 TMA; 화학요법에 이차적인 TMA; 이식 (예컨대, 장기 이식, 예컨대 신장 이식 또는 동종 조혈 줄기 세포 이식)에 이차적인 TMA를 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서, 또는 업쇼-술만 증후군 (USS)을 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서, 또는 디고스병을 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서, 또는 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)을 앓고 있는 대상체에서 혈전 형성을 혈청의 C5b-9 침착에 미치는 억제 효과보다 더 많이 적어도 20 퍼센트 이상 (예컨대 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%)의 수준으로 억제한다.
- [1155] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 정맥내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 투여된다.
- [1156] 한 구체예에서, 발명은 TMA (예컨대 aHUS (급성 또는 차도 단계), 용혈성 요독 증후군 (HUS), 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP), 암에 이차적인 TMA; 화학요법에 이차적인 TMA; 이식 (예컨대, 장기 이식, 예컨대 신장 이식 또는 동종 조혈 줄기 세포 이식)에 이차적인 TMA)를 앓고 있는 대상체에서, 또는 업쇼-술만 증후군 (USS)을 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서, 또는 디고스병을 앓고 있는 대상체로부터의 혈청에서, 또는 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)을 앓고 있는 대상체에서 혈정 형성을 억제하는 방법을 제공하며, 방법은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-102의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1157] 한 구체예에서, 대상체는 암에 이차적인 TMA; 화학요법에 이차적인 TMA; 이식 (예컨대, 장기 이식, 예컨대 신장 이식 또는 동종 조혈 줄기 세포 이식)에 이차적인 TMA, 업쇼-술만 증후군 (USS), 디고스병, 및 치명적인 항인지질 증후군 (CAPS)으로 이루어지는 군으로부터 선택된 TMA를 앓고 있다.
- [1158] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1159] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1160] **실시예 44**
- [1161] 이 실시예는 혈전성 미세혈관병증(TMA)을 가진 성인에서 전체 인간 단클론성 MASP-2 억제 항체의 안전성 및 임상 효능을 평가하기 위한 진행 중인 2상 임상 시험의 초기 결과를 기술한다.
- [1162] 배경: TMA는 신체 장기, 가장 일반적으로 신장 및 뇌의 미세순환에서 과도한 혈전 (응고) -혈소판의 응집-을 특

징으로 하는 드물고, 쇠약하게 하며 생명을 위협하는 장애 군이다.

방법:

공개 임상 2상 시험의 제1 단계를 일차 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS), 혈장 요법-내성 aHUS 및 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP)을 가진 대상체에서 수행하였다. 이 2상 임상 시험은 질환의 생명을 위협하는 본성을 고려하여 위약 팔(arm)이 없다.

대상체는 선별시 18세 이상이었고 다음 TMA 중 하나로 진단되었다면 이 연구에만 포함되었다:

1) 임상적으로 진단되고 혈장의 > 10%에서 ADAMTS13 활성을 가지는 일차 aHUS. 환자는 서류로 입증된 보체 돌연변이 또는 항-CFH 항체가 있거나 없을 수 있다. 환자를 혈장 요법 (혈장 교환 또는 혈장 주입)에 대한 그들의 반응에 따라 분류한다:

o 이 연구의 목적을 위한 혈장 요법-내성 aHUS 환자, 다음의 전부를 충족한다:

(a) 선별 전 적어도 4회의 혈장 요법 치료에도 불구하고 선별시 혈소판 수 < 150,000/ μ L;

(b) 미세혈관병증성 용혈의 증거 (분열적혈구의 존재, 혈청 락테이트 탈수소효소 (LDH) > 정상의 상한 (ULN), 합토클로빈 < LLN); 및

(c) 혈청 크레아티닌 > ULN.

o 만성 혈장 요법-반응성 aHUS 환자 (혈장 요법-민감성)는 4주 동안 적어도 주 1회 혈장 요법을 필요로 한 후 혈청 크레아티닌 > ULN과 함께 제1 용량의 OMS646을 투여한다.

2) TTP를 다음 전부를 가지는 것으로 정의한다:

o 혈소판 수 < 150,000/ μ L;

o 미세혈관병증성 용혈의 증거 (분열적혈구의 존재, 혈청 LDH > ULN, 또는 합토클로빈 < LLN); 및

o TTP의 현재 에피소드 중에 또는 이력적으로 ADAMTS13 활성 $\leq$ 10%.

주: 대상체가 선별 전 3개월 전 이내에 에컬리주맙 요법을 받았으면 그들은 연구로부터 배제하였다. 환자가 혈장 요법에 내성인 것으로 자격을 주는 기준은 이 연구에서 적격성을 결정하는 목적을 위한 것이었다. 발명의 추가의 측면으로, MASP-2 억제제로 치료된 혈장 요법 내성 환자는 이전에 혈장 요법으로 적어도 1회 치료되었고 그러한 혈장 요법 치료 후 여전히 그러한 혈장 요법 치료에 의해 적절하게 감소되거나 제거되지 않은 aHUS의 하나 이상의 임상 마커를 가지고 있었다.

이 연구에서 사용된 단클론성 항체인 OMS646은 인간 MASP-2에 대해 지시된 전체 인간 IgG4 mAb이다. 실시예 40에서 입증된 것과 같이, OMS646은 제조함 MASP-2에 강력하게 결합하고 (100 pM 범위의 외관상 평형 해리 상수) 상동성 단백질 C1s, C1r, 및 MASP-1보다 5000배 이상 큰 선택성을 나타낸다. 기능성 검정에서, OMS646은 인간 렉틴 경로를 나노몰 효능 (약 3 nM의 50% 억제 [IC₅₀]로 이어지는 농도)으로 억제하지만 고전적 경로에 대해서는 유의미한 영향을 갖지 않는다. 마우스, 비-인간 영장류, 및 인간에 대한 정맥내 (IV) 또는 피하 (SC) 주사에 의해 투여된 OMS646은 생체의 검정에서 렉틴 경로 활성화의 억제와 관련된 높은 혈장 농도를 초래하였다.

실시예 42에서 추가로 기술된 것과 같이, OMS646 치료는 TMA의 시험관내 모델에서 C5b-9 침착 및 혈전 형성 및 TMA의 마우스 모델에서 혈전 형성을 감소시켰고, 그래서 OMS646이 치료 이용성을 가지는 것을 입증한다.

이 연구에서, OMS646 약물 물질은 100 mg/mL의 농도로 제공되었고, 정맥내 투여를 위해 추가로 희석하였다. 적절한 계산된 부피의 OMS646 100 mg/mL 주사 용액을 용량 제조용 주사기를 사용하여 바이알로부터 빼냈다. 주입 주머니를 제조 후 4시간 이내에 투여하였다.

연구의 단계 1에서, OMS646을 집단 당 3명의 대상체의 증량 용량 집단에 투여하였다. 단계 1의 각 대상체는 아래의 표 26에서 제시된 것과 같이 OMS646의 4주 용량을 받았다.

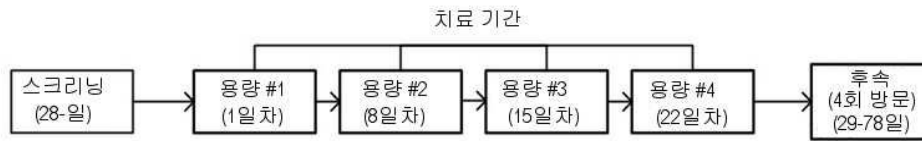
표 26

단계 1을 위한 투약 스케줄

단계, 집단	대상체의 수	OMS646 용량 (mg/kg)
1, 집단 1	3	0.675, 매주 x 4

1, 집단 2	3	2.0, 매주 x 4
1, 집단 3	3	4.0, 매주 x 4

단계 1 연구 설계 계획



희석된 연구 약물을 정맥내로 30분에 걸쳐 주입하였다.

일차 종점

공동 일차 종점은 다음과 같았다:

- AE, 바이탈 신호, ECG, 및 임상 실험실 테스트에 의해 평가된 안전성
- 혈소판 수의 변화에 의해 평가된 임상 활성

이차 종점

이차 종점은 다음과 같았다:

- TMA 임상 활성
 - o 혈청 LDH
 - o 혈청 합토클로빈
 - o 헤모글로빈
 - o 혈청 크레아티닌
 - o TMA-관련 증상
 - o 혈장 요법 (혈장 교환 또는 혈장 주입)에 대한 필요성
 - o 투석에 대한 필요성

허용된 병용 요법

- 혈장 요법-내성 aHUS - OMS646 치료 중에 조사자가 혈장 요법을 의학적으로 지시된 것으로 간주하는 경우에 혈장 요법을 허용하였다.
- 만성 혈장 요법-반응성 aHUS - 조사자는 혈장 요법이 TMA의 개선의 신호, 예컨대, 혈소판 수의 증가, LDH의 감소, 합토클로빈의 증가, 헤모글로빈의 증가, 크레아티닌의 감소가 있을 때까지 지속되어야 한다는 조언을 받았고, 이때 조사자는 혈장 요법이 지속될 수 있을지의 여부를 평가하기 위하여 혈장 요법을 철회하고 TMA 파라미터를 모니터링할 것을 고려하도록 조언을 받았다.
- TTP - 조사자가 혈장 요법을 의학적으로 지시된 것으로 간주하는 경우에 허용하였다.
- 조사자는 신장 투석 요법이 표준 돌봄에 따라 관리되어야 한다는 조언을 받았다.
- 에쿨리주맙을 연구 중에 투여하지 않았다.

결과:

3명의 aHUS 환자로 이루어지는 대상체의 제1 집단을 최저 용량의 OMS646으로 치료하였다. 이 연구 집단의 모든 환자에서 TMA 질환 마커 전체에서 개선이 관찰되었다. 혈소판 수, 혈청 락테이트 탈수소효소 (LDH) 및 혈청 합토클로빈을 질환 활성의 마커로서 측정하였다. 기준선 수준과 비교했을 때, 혈소판 수는 모든 환자에서 개선되었다. 혈청 LDH 수준은 한 명의 환자에서 정상을 유지하였고, 다른 한 명에서는 정상 범위에 가깝게 실질적으로 감소하였으며 세 번째 환자에서는 상승된 채로 유지되었다. 합토클로빈은 2명의 환자에서 개선되었고, 한 명에

서는 정상화되었다. 독립적인 신장 기능을 가진 한 명의 환자에서 크레아티닌 수준은 또한 개선되었다.

- [1206] 설계한 바와 같이, 3명의 환자를 이 임상 시험의 제2, 중간 용량 집단으로 치료하였다. 2명의 환자는 혈장 요법-내성 aHUS를 가졌고 한 명의 환자는 혈전성 혈소판 감소성 자반증 (TTP)을 가졌다. aHUS를 가진 2명의 환자는 모두 연구 등록 전 및 등록 당시 신장 투석 중이었다. 제2 또는 중간 용량 집단에서, 혈장 요법-내성 aHUS를 가진 2명의 환자는 다음을 입증하였다:
- [1207] · 평균 혈소판 수의 47% 증가로, 두 환자 모두 정상 범위의 수를 가지는 결과를 초래함
- [1208] · 평균 분열적혈구 수의 86% 감소, 한 명의 환자에서는 분열적혈구 사라짐
- [1209] · 평균 합토클로빈의 71% 증가로 치료 중에 두 환자 모두 정상 범위에 도달함, 한 명은 마지막 용량 후 1주 후에 약간 정상 아래로 떨어짐
- [1210] · LDH의 평균 수준의 5% 감소, 두 환자 모두에서 수준은 정상 범위보다 약간 상승된 수준을 유지함.
- [1211] 중간 용량 집단 TTP 환자는 연구에 유입되기 전에 반복된 혈장 주입 요법을 필요로 하였다. 실험실 파라미터는 일관된 개선을 보이지 않았지만, 환자는 OMS646으로 치료 중에, 또는, 치료가 완료된 후 지금까지 혈장 요법을 필요로 하지 않았다.
- [1212] 약물은 치료 기간 내내 모든 환자가 잘 받아들여졌다. 제2 또는 중간 용량 집단으로부터의 긍정적인 데이터를 토대로, 제3 또는 고용량 집단을 시작하였고 aHUS 환자는 이미 연구 치료 기간을 완료하였다. 모든 환자에 대해 참조한 데이터는 마지막 용량 후 1주 후의 측정을 포함한다.
- [1213] 제3 (고용량) 집단의 첫 번째 환자 - C형 간염, 한랭글로불린혈증 및 림프종을 포함한 추가의 복잡해진 장애를 가진 혈장 요법-내성 aHUS 환자 -가 또한 OMS646으로의 치료를 완료하였다. OMS646 치료 전에, 환자는 반복된 투석을 필요로 하였다. 치료 기간 내내 및 OMS646 과정이 완료된 후, 지금까지 환자는 투석 없이 유지되었다. 혈액학적 및 신장 파라미터는 다음과 같았다:
- [1214] · 혈소판 수의 63% 개선으로, 정상 수준으로 복귀됨
- [1215] · 분열적혈구의 100% 감소
- [1216] · 검출할 수 없는 수준으로부터 증가되고 표준화된 합토클로빈
- [1217] · LDH의 43% 감소로, 정상보다 약간 높은 수준을 초래함
- [1218] · 크레아티닌 수준의 24% 감소
- [1219] 제1 및 제2 집단에서처럼, 약물은 잘 받아들여졌다.
- [1220] 이 개방 임상 2상 시험에서 일차 종점은 혈소판 수의 변화이다. 중간- 및 고-용량 집단의 3명의 환자는 모두 (2명은 중간 용량 집단이고 한 명은 고용량 집단임)의 혈소판 수는 정상으로 복귀되었고, 기준선으로부터의 통계적으로 유의미한 평균 증가는 대략 68,000 혈소판/mL이었다 ($p=0.0055$).
- [1221] 요약하면, 이 임상 2상 시험으로부터 지금까지 얻어진 데이터는 일차 aHUS, 혈장 요법-내성 aHUS를 가진 환자 및 TTP 환자에서 OMS646의 효능을 보여준다.
- [1222] 전술한 설명에 따르면, 한 구체예에서, 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈장 요법-내성 aHUS를 앓고 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 혈장 요법-내성 aHUS를 앓고 있는 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [1223] 본원에 개시된 구체예들 중 임의의 구체예에 따르면, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로를 실질적으로 억

제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).

- [1224] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 혈소판 수의 증가, LDH의 감소, 합토클로빈의 증가, 헤모글로빈의 증가, 및/또는 크레아티닌의 감소와 같은 aHUS와 관련된 적어도 하나 이상의 임상 파라미터를 개선하기에 효과적인 양으로 투여된다.
- [1225] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 혈장 요법-내성 aHUS를 앓고 있는 대상체에게 카테터를 통해 (예컨대, 정맥내로) 제1 기간 (예컨대, 적어도 1일 내지 1주 또는 2주) 동안 투여한 후 MASP-2 억제 항체를 대상체에게 피하로 제2 기간 (예컨대, 적어도 2주 이상의 만성 단계) 동안 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 기간의 투여는 혈장 요법의 부재 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 기간의 투여는 혈장 요법의 존재 하에 일어난다.
- [1226] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 혈장 요법-내성 aHUS를 앓고 있는 대상체에게 정맥내로, 근육내로, 또는 바람직하게, 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 만성적일 수 있고 매일 내지 매월 투여될 수 있지만, 바람직하게는 2주마다 투여될 수 있다. MASP-2 억제 항체는 단독으로, 또는 에컬리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.
- [1227] 한 구체예에서, 방법은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 혈장 요법-내성 aHUS를 앓고 있는 대상체를 치료하는 단계를 포함한다.
- [1228] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1229] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1230] **실시예 45**
- [1231] 이 실시예는 실시예 44에서 기술된 혈전성 미세혈관병증(TMA)을 가진 성인에서 전체 인간 단클론성 MASP-2 억제 항체의 안전성 및 임상 효능을 평가하기 위한 진행 중인 2상 임상 시험에서 얻어진 추가 결과를 기술한다.
- [1232] **배경:** 실시예 44에서 기술된 것과 같이, TMA는 신체 장기, 가장 일반적으로 신장 및 뇌의 미세순환에서 과도한 혈전 (응고) -혈소판의 응집-을 특징으로 하는 드물고, 쇠약하게 하며 생명을 위협하는 장애 군이다. 본원에서 기술되는 것과 같이, 이식-관련 TMA (TA-TMA)는 이식 환자, 예컨대 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 수령체에서 일어날 수 있는 파괴적인 증후군이다. 이 실시예는 조혈 줄기 세포 이식-관련 TMA를 앓고 있는 환자에서 전체 인간 단클론성 MASP-2 억제 항체의 안전성 및 임상 효능을 평가하기 위한 임상 2상 시험의 초기 결과를 기술한다.
- [1233] **방법:**
- [1234] 실시예 44에서 기술된 것과 같이, 2상 TMA 시험은 MASP-2 억제 항체 OMS646의 3가지 수준의 용량 범위 단계와, 이어서 고정 용량 단계로 이루어진다. 실시예 44에서 추가로 기술된 것과 같이, 양성 결과는 aHUS 환자 및 한 명의 TTP 환자로부터 얻어졌고, 효능 측정에서 일관되고 강력한 개선이 있었다. 저용량 집단에서처럼, OMS646은 치료 기간 내내 중간- 및 고-용량 집단에서 모든 환자에 의해 잘 받아들여졌다. 전임상 독성 연구를 완료하였고 안전성 문제가 없는 것이 입증되어 임상 시험에서 만성 투약이 허용되었다.
- [1235] 실시예 44에서 기술된 것과 같이, OMS646 2상 TMA 임상 시험으로부터의 데이터는 aHUS 및 TTP 환자로부터 얻어졌다. 투약은 이제 실시예 44에서 기술된 방법을 사용하여 고용량 집단에서 추가의 조혈 줄기 세포 이식-관련

TMA 환자에 대해 완료되었다. 이것은 조혈 줄기 세포 이식을 받은 림프종 이력이 있는 환자이다. 그의 이식 후 과정은 혈소판 수혈을 필요로 하는 TMA를 포함하여, 생명을 위협하는 많은 장애로 인해 복잡해졌다. 수혈에도 불구하고, 환자의 조혈 세포 이식-관련 TMA는 지속되었고 OMS646 2상 시험에 등록하였다.

[1236] 결과:

[1237] 실시예 44에서 기술된 것과 같이 4주 투약 기간 (고용량 집단) 후에, 조혈 줄기 세포 이식-관련 TMA 환자는 다음을 입증하였다:

- [1238] · 혈소판 수는 4배 증가하여, 100,000개 이상의 혈소판 수가 되었다;
- [1239] · 합토글로빈 수준은 2배 이상이었고 표준화되었다;
- [1240] · 혈관 내의 손상 척도인 혈장 락테이트 탈수소효소 수준은 35% 감소하였지만, 여전히 정상보다 위였다;
- [1241] · 분열적혈구 수는 단지 1개로 유지되었다.

[1242] OMS646으로 투약하는 내내 및 OMS646 치료를 완료한 이후에, 환자는 어떠한 혈소판 수혈 또는 혈장분리교환술을 필요로 하지 않았다.

[1243] 요약하면, 지금까지 이 임상 2상 시험 (실시예 44 및 이 실시예에서 기술된 바)으로부터 얻어진 데이터는 일차 aHUS, 혈장 요법-내성 aHUS, TTP 환자에서 및 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 가진 환자에서 OMS646의 효능을 보여준다.

[1244] 전술한 설명에 따르면, 한 구체예에서, 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 대상체는 혈소판 수혈 및/또는 혈장분리교환술을 사용한 치료에 대해 내성인 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있다. 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 혈소판 수혈 및/또는 혈장분리교환술로의 치료에 대해 내성인 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[1245] 본원에 개시된 임의의 구체예에 따르면, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).

[1246] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA와 관련된 적어도 하나 이상의 임상 파라미터, 예컨대 혈소판 수의 증가 (예컨대, 치료 전 혈소판 수의 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배), 합토글로빈의 증가, 및/또는 락테이트 탈수소효소의 감소를 개선하기에 효과적인 양으로 투여된다.

[1247] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있는 대상체에게 카테터를 통해 (예컨대, 정맥내로) 제1 기간 (예컨대, 적어도 1일 내지 1주 또는 2주) 동안 투여한 후 MASP-2 억제 항체를 대상체에게 피하로 제2 기간 (예컨대, 적어도 2주 이상의 만성 단계) 동안 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 기간의 투여는 혈장 요법의 부재 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 기간의 투여는 혈장 요법의 존재 하에 일어난다.

[1248] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있는 대상체에게 정맥내로, 근육내로, 또는 바람직하게, 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 만성적일 수 있고 매일 내지 매일 투여될 수 있지만, 바람직하게는 2주마다 투여될 수 있다. MASP-2 억제 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.

[1249] 한 구체예에서, 방법은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-107의 아미노산

서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있는 대상체를 치료하는 단계를 포함한다.

[1250] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[1251] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO: 67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[1252] 실시예 46

[1253] 이 실시예는 실시예 44 및 45에서 기술된 혈전성 미세혈관병증(TMA)을 가진 성인에서 전체 인간 단클론성 MASP-2 억제 항체의 안전성 및 임상 효능을 평가하기 위한 진행 중인 2상 임상 시험에서 얻어진 추가 결과를 기술한다.

[1254] 배경: 실시예 45에서 기술된 것과 같이, 이식-관련 TMA (TA-TMA)는 이식 환자, 예컨대 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 수령체에서 일어날 수 있는 파괴적인 증후군이다. 조혈 줄기 세포 이식-관련 TMA (HSCT-TMA)는 내피 손상에 의해 촉발되는 생명을 위협하는 합병증이다. 신장이 가장 일반적으로 영향을 받는 장기지만, HSCT-TMA는 또한 폐, 장, 심장 및 뇌를 포함하는 다중 시스템 질환이다. 심지어 경미한 TMA의 발생도 장기간 신장 손상과 연관된다. 동종 HSCT 후-관련 TMA의 개발은 달라지는 진단 기준 및 조건화 및 이식편대수주병 예방 요법을 토대로 한 빈도에 차이가 있으며, 칼시뉴린 억제제가 가장 빈번한 약물로 포함된다 (Ho VT et al., *Biol Blood Marrow Transplant*, 11(8):571-5, 2005). 면역억제 칼시뉴린 억제제 요법의 변형은 칼시뉴린 억제제 투여를 감소시키거나 중단하고 수 주 내에 일부 환자에서 TMA의 개선을 초래할 수 있다.

[1255] TMA는 HSCT의 잠재적으로 생명을 위협하는 합병증이며 현재 주로 면역억제제 (예컨대, 칼시뉴린 억제제)의 회피 및 진행 중인 감염의 치료를 포함한 자극 요인의 개선뿐만 아니라 혈액투석과 같은 지지 조치에 의해 관리된다. 비록 많은 HSCT-TMA 환자가 면역억제제의 감소 또는 중단에 잘 반응하지만, 보존적인 치료 조치에도 불구하고 지속적인 HSCT-TMA를 가지는 환자의 하위집단이 있다 (즉, TMA는 면역억제제의 감소 또는 중단에 반응하지 않았음). 이들 보존적 치료 조치에 반응하지 않은 환자는 불량한 예후를 가진다. 혈장 교환은 효능을 보이지 않았고 다른 치료법은 승인된 것이 없다.

[1256] 실시예 45는 지속적인 조혈 줄기 세포 이식-관련 TMA (HSCT-TMA)로 고생하는 환자에서 전체 인간 단클론성 MASP-2 억제 항체 (OMS646)의 안전성 및 임상 효능을 평가하기 위한 2상 임상 시험의 초기 양성 결과를 기술한다. 본 실시예는 보존적 치료 조치에 대해 내성인 지속적인 HSCT-TMA로 고생하는 3명의 추가 대상체에서 OMS646의 안전성 및 임상 효능을 평가하기 위해 진행 중인 2상 임상 시험의 추가 결과를 기술한다.

[1257] 방법:

[1258] 실시예 44에서 기술된 것과 같이, 2상 TMA 시험은 MASP-2 억제 항체 OMS646의 3가지 수준 용량 범위 단계와, 이어서 고정된 용량 단계로 이루어진다. OMS646은 치료 기간 내내 낮은, 중간 및 고-용량 집단의 모든 환자에 의해 잘 받아들여졌다. 전임상 독성 연구를 완료하였고 안전성 문제가 없는 것으로 입증되어, 임상 시험에서 만성 투약이 허용되었다.

[1259] 2상 TMA 시험은 보존적 치료 조치에 대해 내성인 지속적인 HSCT-관련 TMA를 앓고 있는 대상체를 포함하는데, 지속적인 HSCT-관련 TMA는 본 연구의 목적에 대해 면역억제제 (예컨대, 칼시뉴린 억제제 치료)의 감소 또는 중단 후 적어도 2주 또는 이식 후 적어도 30일 후에 다음 전부를 가지는 것으로서 규정한다:

[1260] - 혈소판 감소증 (혈소판 수 < 150,000/ μ L); 및

- [1261] - 미세혈관병증성 용혈성 빈혈의 증거 (분열적혈구의 존재, 혈청 락테이트 탈수소효소 (LDH) > 정상의 상한선 (ULN), 또는 합토클로빈 < 정상의 하한선 (LLN)).
- [1262] HSCT-관련 TMA에 대한 허용된 병용 요법
- [1263] · OMS646 치료 중에 조사자가 혈장 요법을 의학적으로 지시된 것으로 간주하는 경우에 혈장 요법을 허용하였다. 혈장 요법을 받은 환자는 추가로 절반 용량의 OMS646을 받을 수 있었다.
- [1264] · 조사자는 신장 투석 요법이 표준 돌봄에 따라 관리되어야 한다는 조언을 받았다.
- [1265] · 에컬리주맙은 연구 중에 투여하지 않았다.
- [1266] 진행 중인 TMA 연구는 표준 치료 조치에 대해 내성인 지속적인 HSCT-TMA (즉, 칼시뉴린 억제제 치료의 감소 또는 중단 후 적어도 2주 후 지속적인 TMA)를 앓고 있는 대상체를 포함한다.
- [1267] 실시예 45에서 기술된 것과 같이, 실시예 44에서 기술된 방법을 사용하여 고용량 집단 (4주 동안 주 1회 정맥내로 투여된 4 mg/kg OMS646)에서 지속적인 HSCT-TMA를 앓고 있는 환자 (환자 #1)에 대해 투약을 완료하였다.
- [1268] 투약을 이제 아래에서 기술하는 것과 같이, 지속적인 HSCT-TMA를 앓고 있는 추가의 4명의 환자에 대해 완료하였다.
- [1269] 환자 #1 (실시예 44에서 기술됨)을 4주 동안 OMS646으로 치료하였다 (4 mg/kg 정맥내, 매주 1회);
- [1270] 환자 #2 및 #3을 8주 동안 OMS646으로 치료하였다 (4 mg/kg 정맥내, 매주 1회);
- [1271] 환자 #4 및 #5를 각각 2주 및 3주 동안 OMS646으로 치료하였다 (4 mg/kg 정맥내, 매주 1회). 환자 #4 및 #5는 각각 2주 및 3주 후에 연구로부터 철회시켰는데, 치료에 반응하지 않았고 악화되었다. 이들 환자 중 1명은 연구에 들어올 당시 현저하게 상승된 크레아티닌을 가졌음이 주지된다.
- [1272] 결과:
- [1273] 지속적인 HSCT-TMA를 가진 5명의 환자를 본 연구에 등록시켰다. 모든 대상체는 성인이었고 혈액암에 대해 HSCT를 받았다. 도 58, 59 및 60은 MASP-2 억제 항체 OMS646으로의 치료 후 TMA 변수에서 기준선으로부터의 변화를 제공한다. 이들 도면은 5명의 환자 전부에 대한 데이터를 제공하는데, 그들 중 2명은 2-3주 후에 연구를 중단하였고, 그 중 한 명은 후속적 재발하였고 다른 한 명은 완화 치료를 받았다. 도 58, 59 및 60에서 주지된 것과 같이, 제공된 마지막 가능한 치료는 7주 전에 발생하였다.
- [1274] 도 58은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 후 지속적인 조혈 줄기 세포 이식-관련 혈전성 미세혈관병증 (HSCT-TMA)을 앓고 있는 대상체에서 시간 (주)에 따른 기준선으로부터의 혈소판 수의 평균 변화를 그래프로 도시한다.
- [1275] 도 59는 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 후 지속적인 (HSCT-TMA)를 앓고 있는 대상체에서 시간 (주)에 따른 기준선으로부터의 LDH의 평균 변화를 그래프로 도시한다.
- [1276] 도 60은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 후 지속적인 (HSCT-TMA)를 앓고 있는 대상체에서 시간 (주)에 따른 기준선으로부터의 합토클로빈의 평균 변화를 그래프로 도시한다.
- [1277] 도 59 및 60에서 나타난 것과 같이, LDH 및 합토클로빈의 통계적으로 유의미한 개선이 치료 중에 관찰되었다. 도 58에서 나타난 것과 같이, 혈소판 수는 개선되었지만 이 작은 수의 환자에서 통계적 유의성에는 도달하지 못하였다. 3명의 환자 중에서 2명이 치료를 완료하였고, 1명은 크레아티닌의 개선을 보이지 않았지만 병용된 신독성 작용제를 받았다. 크레아티닌은 다른 2명의 환자에서는 개선되었거나 정상으로 유지되었다. 연장된 추적 조사에서, 1명의 환자는 이식 실패를 경험하였고, 두 번째 이식을 대기 중이다. 다른 2명의 환자는 안정을 유지하였다.
- [1278] 대상체 중 2명에서 골수 억제 및 신독성과 관련된 약물의 잠재적으로 혼란스러운 효과에도 불구하고, OMS646의 유익한 치료 효과가 지속적인 HSCT-TMA로 고생하는 대상체 중 3명에게서 관찰되었고 (그 중 한 명은 실시예 45에서 기술됨) 추가로 아래에서 기술한다. 특히, 3명의 응답자 각각에서 치료 효과를 OMS646으로 치료한 후 대략 3주 후에 초기에 볼 수 있었다.
- [1279] 환자 #1 (실시예 45에서 기술된 것과 같이 4주 동안 치료됨). 간단히 요약하면, 혈소판 수는 4배가 되어 100,000/ μ L 이상의 혈소판 수를 초래하였고; 합토클로빈 수준은 2배 이상이고 정상이었으며; 혈장 락테이트 탈

수소효소 수준은 35% 감소하였지만 여전히 정상보다 위었고; 분열적혈구 수는 단지 1에서 유지되었다.

[1280] 환자 #2 (8주 동안 치료됨): 혈소판 수는 치료에 반응하지 않았지만, 환자는 또한 발간시클로비(valganciclovir)로의 병용 치료 및 나중의 이식 실패에 이차적인 골수 억제로 고생하며; 혈장 락테이트 탈수소효소 수준은 712 U/L로부터 256 U/L로 낮게 감소하였고; 합토클로빈 수준은 검출할 수 없는 수준으로부터 250 mg/dL로 높게 증가하였다.

[1281] 환자 #3 (8주 동안 치료됨): 혈소판 수는 13,500/ μ L로부터 133,000/ μ L로 증가하였고; 혈장 락테이트 탈수소효소 수준은 537로부터 225 U/L로 감소하였으며, 합토클로빈 수준은 검출할 수 없는 수준으로부터 181 mg/dL로 높게 증가하였다.

[1282] 결과의 요약:

[1283] OMS646로의 투약을 완료한 지속적인 HSCT-관련 TMA를 앓고 있는 3명의 환자에 대해, 데이터는 강력하고 일관된 효능 신호를 입증한다. LDH 및 합토클로빈의 통계적으로 유의미한 개선이 치료 중에 관찰되었다. 혈소판 수는 개선되었지만 이 작은 수의 환자에서 통계적 유의성에는 도달하지 못하였다. 치료를 완료한 3명의 환자 중에서, 한 명은 크레아티닌의 개선을 보이지 않았지만 병용된 신독성 작용제를 받았다. 다른 두 명의 환자에서 크레아티닌은 개선되거나 정상으로 유지되었다.

[1284] 결론:

[1285] OMS646은 보존적 치료 조치에 반응하지 않은 지속적인 HSCT-TMA를 앓고 있는 환자에서 TMA 마커를 개선하였다. OMS646으로 치료된 HSCT-TMA 환자는 치료하기 가장 어려운 일부를 나타내며, 그로써 보존적 치료 조치에도 불구하고 고위험의 지속적인 HSCT-TMA를 가진 환자에서 OMS646의 치료 효과의 임상적 증거를 입증한다.

[1286] 전술한 설명에 따르면, 한 구체예에서, 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 대상체는 보존적 치료 조치에 대해 내성인 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 지속적인 TMA를 앓고 있다. 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 보존적 치료 조치에 대해 내성인 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 지속적인 TMA를 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[1287] 본원에 개시된 임의의 구체예에 따르면, MASP-2 억제 항체는 다음 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).

[1288] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA와 관련된 적어도 하나 이상의 임상 파라미터, 예컨대 혈소판 수의 증가 (예컨대, 치료 전 혈소판 수의 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배), 합토클로빈의 증가, 및/또는 락테이트 탈수소효소의 감소를 개선하기에 효과적인 양으로 투여된다.

[1289] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있는 대상체에게 카테터를 통해 (예컨대, 정맥내로) 제1 기간 (예컨대, 적어도 1일 내지 1주 또는 2주 또는 3주 또는 4주 또는 그 이상) 동안 투여한 후 MASP-2 억제 항체를 대상체에게 피하로 제2 기간 (예컨대, 적어도 2주 이상의 만성 단계) 동안 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 기간의 투여는 혈장 요법의 부재 하에 일어난다. 일부 구체예에서, 제1 및/또는 제2 기간의 투여는 혈장 요법의 존재 하에 일어난다.

[1290] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA를 앓고 있는 대상체에게 정맥내로, 근육내로, 또는 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 만성적일 수 있고 매일 내지 매일 투여될 수 있지만, 바람직하게는 적어도 2주마다, 또는 적어도 주 1회, 예컨대 주 2회 또는 주 3회 투여될 수 있다. MASP-2 억제 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.

- [1291] 한 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 지속적인 TMA를 앓고 있는 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체를 포함한다.
- [1292] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1293] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1294] 일부 구체예에서, 방법은 보존적 치료 조치에 대해 내성인 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 지속적인 TMA를 앓고 있는 대상체를 포함한, HSCT와 관련된 TMA를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게, SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 3주의 기간 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다.
- [1295] **실시예 47**
- [1296] 이 실시예는 MASP-2 억제 항체, OMS646으로 미세혈관병증과 관련된 이식편대숙주병 (GVHD)의 효과적인 치료를 입증하는 사례 연구를 기술한다.
- [1297] **배경:** 이식편대숙주병은 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT)의 일반적인 합병증이다. 급성 및 만성 형태가 둘 다 존재하며 수령체 환자를 외래 조직으로서 인식하는 도너 면역 세포로부터 유발된다. 이것은 수령체 환자에 대한 면역 반응을 촉발시킨다. 급성 GvHD는 동종 이식을 받은 환자의 최대 50% 이상에서 일어난다. 급성 GvHD는 가장 일반적으로 피부, 위장관, 및 간을 표적으로 하지만, 또한 신장, 눈, 폐 및 혈액 세포에도 영향을 줄 수 있다. 만성 GvHD는 동종 이식을 받은 환자의 대략 40%에서 발생하며, 가장 일반적으로 피부, 간, 눈, 위장관 및 폐에 영향을 미친다. 급성 및 만성 gvHD 모두 유의미한 이환율 및 사망률과 관련이 있다.
- [1298] **방법 및 결과**
- [1299] 제2 완전 차도 (CR)기에 T 세포 급성 림프모세포성 백혈병 (T-ALL)의 영향을 받은 46세의 남성이 사이클로포스파미드 및 전신 방사선 조사 처방 (TBI-Cy) 및 혈연이 아닌 35세 여성 기증자 9/10 HLA 호환 (유전자좌 A에서 항원성 미스매치)으로부터의 말초혈 줄기 세포 (PBSC) 동종 HSCT 이식으로 전체 골수억제 전처치(full myeloablative conditioning)를 받았다. 이식편대숙주병 (GVHD) 예방은 전처치 중에 항흉선 세포 글로불린 (ATG, 5 mg/kg), 사이클로스포린 A (CSA) 및 단기 과정의 메토평렉세이트 (즉, +1, +3, +6일에 메토평렉세이트 (낮은 CD34로 인해 용량 감소))를 토대로 하였다. 그는 강력한 혈액학적 재구성을 달성하였다 (생착: WBC >1000/mm³, +15일에 호중구 >500/mm³; +18일에 혈소판 >20000/mm³, +21일에 50000/mm³). +30, +60, +90, +180, +354일에 전체 기증자에서 키메라즘을 관찰하였다 (골수 및 말초혈, CD3+ 및 CD3- 분획). 완전한 차도 (면역표현형, 분자 MRD)를 +30, +60, +90, +180일에 확인하였다.

- [1300] 이식 후 +35일 쯤에, 그는 위장 (GI) GVHD를 나타냈고 (구토, 거식증, 설사, 복부 통증; 대장내시경: 확산성 미란; 조직학: 미만성 점막 궤양, 고유층의 림프과립구 염증, 샘 및 크립트 왜곡, 세포사멸체로 나타남), 급성 GvHD, 4기 (장), 사이토메갈로바이러스 (CMV) 대장염과 함께 전체 4등급으로 진단받았다 (장 생검에 대해 양성 면역조직화학 및 실시간 PCR; 전신성 CMV 반응성화 (말초혈에 대해 2614 UI/mL)에 의해 측정됨). 2가지 상태를 동시에 메틸프레드니솔론 (1 mg/Kg), 포스카르넷(foscarnet) 및 간시클로비르(ganciclovir)로 치료하였고 양호한 반응을 보였으며 스테로이드를 점차적으로 중단하였다.
- [1301] 이식 후 +121일 쯤에, 그는 스테로이드 불응성 GI GVHD (구토, 거식증, 설사, 복부 통증; 조직학 결과 (위 및 복부)로 나타남)가 재발하였고, 후기 발병 급성 GI GvHD 4기 (장), 전제 등급 4로 진단받았으며, 그것을 CSA를 계속하고 등록된 임상 연구 (ClinicalTrials.Gov Identifier NCT02032446)에 따라 펜토스타틴 및 중간엽 줄기 세포의 순차적 투여로 치료하였고 양호한 반응을 보였다.
- [1302] 이식 후 +210일 쯤에 환자는 체중 감소, 현저한 무력증, 전신 근육 위축, 사지 마비, 감소된 심부 건 반사, 양측 종아리 감각이상, 신경인성 방광(neurogenic bladder) 및 점막 (즉, 배뇨) 자극의 부재시 요실금을 나타냈다. 임상 검사 및 뇌척수액, 신경방사선 및 전기생리학적 소견은 축삭, 감각운동 및 자율신경성 다발신경병증의 그림(ficture)을 기술하였다. 신경방사선은 정상 MRI (뇌 및 척추)를 나타냈고 뇌척수액은 정상이었다. T-ALL의 재발, 감염, 혈관 손상, 영양 결핍, 탈수초 장애 및 후방 가역성 뇌병증 증후군(posterior reversible encephalopathy syndrome, PRES)은 배제시켰다. 고용량 면역글로불린을 투여하였지만 유익은 없었다. 신장 손상, 망상적혈구 증가증 ($335 \times 10^9/L$), 증가된 LDH (1635 U/L) 및 검출할 수 없는 합토클로빈이 없이 대혈관병증 용혈성 빈혈 (6.7 g/dL)의 특징을 가진 부수적인 혈소판 감소증 ($6 \times 10^9/L$)이 또한 문서화되었다. 직접적인 항글로불린 테스트는 음성이었다. 분열적혈구를 말초혈 도말 (2-3/필드 50x)에서 관찰하였을뿐만 아니라, 항-B abs (주요 부적합 환자/기증자)의 부재, 정상적인 ADAMTS13 활성 활성, 항-ADAMTS13 Ab의 부재, 정상적인 응고 테스트 및 정상적인 크레아티닌 값을 가진 단백뇨를 관찰하였다. 그는 또한 내시경 검사에서 대장 궤양으로 흑색변(melena)을 나타냈고; 조직병리학적 연구는 점막 부종, 섬유증, 관내 피브린 침착이 있는 확장성 소혈관, 선 위축증(glandular atrophy) 및 미생물 소견이 없는 세포사멸사체를 보였다. 그러므로, 비록 지속적인 GI GVHD의 증거가 있을지라도, 임상 및 조직병리학적 그림은 또한 대장 이식-관련 혈전성 미세혈관병증의 진단과 일치하였다. 재발성 GI GVHD로 인해, CSA를 점차로 감소시켰지만 임상적 또는 혈액학적 변화를 얻지 않으면 철회하지 않았다 (최저 수준 100-150 ng/mL).
- [1303] 이식 후 +263일 쯤에, 환자를 보체의 렉틴 경로 활성화를 억제하는 MASP-2 억제 항체인 OMS646으로의 치료를 포함하는, 상기 실시예 45 및 46에서 기술한 임상 시험에 등록시켰다. 도 61에서 나타낸 것과 같이, 약물의 처음 주 2회 용량 후에 흑색변 및 용혈의 해소 및 혈소판 수의 상승이 있는 임상적 및 실험실 반응을 관찰하였다. 4회 용량 후에, 흥미롭게도, 감각운동 결핍의 임상적 및 전기생리학적 개선 둘 다를 포함한 현저한 신경학적 개선이 또한 기록되었다. OMS646의 8회 용량 후, CSA를 점차 감소시켰음에도 불구하고 GvHD 반응은 유지되었지만, 독성은 관찰되지 않았다. 이식 후 +354일 쯤에, 환자는 신경학적 개선 및 점막 (즉, 배뇨) 결핍의 초기 회복을 추가로 기록하였다. 이 환자에 의해 달성된 신속한 임상적 유익은 OMS646의 투여로부터 유발된 보체-매개 내피 손상의 효과적인 억제가 GVHD 관련된 TMA의 치료에 매우 효과적일 수 있음을 시사한다.
- [1304] 요약하면, 이 실시예는 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 후 둘 다 해소된 공존하는 HSCT-TMA 및 GvHD를 가진 이식 후 HSCT 환자의 사례 보고를 기술한다. OMS646로의 치료 전에 환자는 스테로이드-불응성 GvHD, 사이토메갈로바이러스 감염 및 HSCT-TMA의 다중 에피소드에 의해 복잡해진 어려운 이식 후 과정을 가졌다. GvHD의 2회의 이전 에피소드 후에, 환자는 혈변을 나타냈다. 장 생검은 HSCT-TMA 및 GvHD를 둘 다 입증하였다. 감염은 확인되지 않았다. 특히, 환자는 또한 감각이상, 사지 마비 및 신경인성 방광의 새롭게 시작된 신경학적 증상을 가졌고, 이것은 GvHD 및 TMA의 신경학적 증상으로서 보고된 것이다. 환자는 감각이상으로 인해 일할 수 없었고 적어도 1일 1회의 혈액 수혈을 필요로 하였다. 혈액학적 마커는 혈소판 감소증, 상승된 락테이트 탈수소효소(LDH) 및 분열적혈구를 포함한 HSCT-TMA를 입증하였다. 환자는 임상 시험에 돌입하였고 OMS646을 받기 시작하였다. 그의 면역억제 (사이클로스포린)는 2주 더 일찍 감소하였고 그는 그의 스테로이드-불응성 GvHD의 이력의 관점에서 저용량의 코르티코스테로이드만을 받았다. 그는 다른 GvHD 치료는 받지 않았다. 2회의 OMS646 투여 후 그의 혈변은 해결되었고 혈액학적 마커가 개선되었다. 4회의 OMS646 투여 후 그는 일할 수 있었다. 그는 8주의 OMS646 치료를 완료하였고 집에서 잘 지내고 있다. HSCT-TMA 및 GvHD의 모든 신호 및 증상은 해소되었다. 그의 신경학적 증상은 계속해서 개선되었다. OMS646 치료 전에 이 환자는 악화되고 있었고 조기 사망의 위험이 높았다. OMS646으로의 치료 후, GvHD, HSCT-TMA 및 신경학적 증상의 개선이 관찰되었고 환자는 집에서 잘 지내고 있

다.

- [1305] 전술한 설명에 따르면, 한 구체예에서, 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하거나, 또는 GVHD의 발병 위험을 감소시키거나, 또는 GVHD와 관련된 하나 이상의 증상의 중증도를 감소시키기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 이식편대숙주병 (GVHD)을 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, GVHD는 활성, 급성 GVHD이다. 한 구체예에서, GVHD는 만성 GVHD이다. 한 구체예에서, GVHD는 스테로이드-불응성이다 (즉, 스테로이드 치료에도 불구하고 지속적임). 한 구체예에서, GVHD는 위장 (GI) GVHD이다. 한 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체로의 치료 전에 대상체에서 GVHD의 존재를 측정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [1306] 한 구체예에서, 대상체는 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 GVHD를 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 한 구체예에서, 대상체는 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 TMA와 관련된 GVHD를 앓고 있거나, 또는 발병의 위험이 있다. 한 구체예에서, 대상체는 백혈병, 예컨대 T-세포 급성 림프모세포성 백혈병을 앓고 있다.
- [1307] 한 구체예에서, 대상체는 GvHD 및/또는 TMA와 관련된 하나 이상의 신경학적 증상, 예컨대, 예를 들어, 무력증, 감각이상, 사지 마비, 감각운동 결핍, 자율신경성 다발성 신경병증(dysautonomic polyneuropathy), 및/또는 신경인성 방광을 앓고 있으며 MASP-2 억제 항체는 하나 이상의 신경학적 증상을 개선하기에 충분한 시간 동안 충분한 양으로 투여된다.
- [1308] 본원에 개시된 임의의 구체예에 따르면, MASP-2 억제 항체는 다음의 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).
- [1309] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 GVHD와 관련된 적어도 하나 이상의 임상 파라미터를 개선하기에 효과적인 양으로 투여된다.
- [1310] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 GVHD를 앓고 있는 대상체에게 정맥 내로, 근육내로, 또는 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 만성적일 수 있고 매일 내지 매일 투여될 수 있지만, 바람직하게는 적어도 2주마다, 또는 적어도 주 1회, 예컨대 주 2회 또는 주 3회 투여될 수 있다. MASP-2 억제 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.
- [1311] 한 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 GVHD를 앓고 있는 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체를 포함한다.
- [1312] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [1313] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [1314] 일부 구체예에서, 방법은 TMA와 관련된 GVHD를 앓고 있는 대상체를 포함한, GVHD를 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체, 예컨대 HSCT가 진행될 예정이거나, 진행 중이거나, 또는 진행되었던 대상체에게, SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 3주의 기간 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다.
- [1315] **실시예 48**
- [1316] 이 실시예는 MASP-2 억제 항체인 OMS646을 사용한 조혈 줄기 세포 이식 후 TMA 및 미만성 폐포 출혈 (DAH)의 효과적인 치료를 입증하는 사례 연구를 기술한다.
- [1317] 배경: 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT)은 혈전성 미세혈관병증 (TMA), 이식편대숙주병 (GVHD), 미만성 폐포 출혈 (DAH) 및 정맥 폐색성 질환 (veno-occlusive disease, VOD)과 같은 심각한 HSCT-후 합병증에 기여하는 실질적인 내피 손상을 유도한다. (E. Carreras and M. Diaz-Ricart, *Bone Marrow Transplant* vol 46:1495-1502, 2011; Akil et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 21:1739-1745, 2015; 및 Vion et al., *Semin Thromb Hemost* 41(06):629-643, 2015 (이들 문헌은 각각 참조로 본원에 포함됨) 참고).
- [1318] 미만성 폐포 출혈 (DAH)은 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 수령체에서 발생할 수 있는 증후군이다. HSCT 수령체에서 DAH의 진단 기준으로는 폐 침윤, 호흡 곤란 및 저산소증을 들 수 있다 (E. Carreras and M. Diaz-Ricart, *Bone Marrow Transplant* vol 46:1495-1502, 2011 (본원에 참조로 포함됨) 참고). DAH의 의심되는 병인은 HSCT 조건화 플러스 생착된 호중구 및 사일런트 감염에 의한 폐 모세혈관 내피 손상으로, 이것은 적혈구의 폐의 폐포로의 누출을 허용한다 (E. Carreras and M. Diaz-Ricart, *Bone Marrow Transplant* vol 46:1495-1502, 2011). 굴혈관 폐색 증후군(sinusoidal obstructive syndrome, SOS)으로도 알려져 있는 정맥 폐색성 질환 (VOD)은 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 환자에서 발생할 수 있는 또 다른 증후군이다. VOD의 임상 증상으로는 유체 체류로 인한 현저한 체중 증가, 증가된 간 크기 및 혈중 빌리루빈의 상승된 수준을 들 수 있다 (E. Carreras and M. Diaz-Ricart, *Bone Marrow Transplant* vol 46:1495-1502, 2011 (본원에 참조로 포함됨) 참고).
- [1319] 방법 및 결과:
- [1320] 인구 통계학 및 과거 병력
- [1321] 환자는 치료를 시작할 당시 14세의 백인 여성이었고, 이 실시예에서 "동정적 사용 환자 #1"로서 언급한다. 환자는 다이아몬드 블랙판 빈혈(Diamond-Blackfan anemia) 및 빈 셀라 증후군(empty sella syndrome)의 병력이 있었다.
- [1322] 환자 결과
- [1323] 환자는 877일에 살아 있다.
- [1324] 이식을 필요로 하는 질환
- [1325] 환자는 다이아몬드 블랙판 빈혈의 병력이 있다. 그녀는 유아기 이후에 3주마다 RBC 주입을 필요로 하였고 이전에 철 과부하가 발생하였다.
- [1326] 이식
- [1327] 환자는 2015년 9월에 그녀의 줄기 세포 이식을 받았다. 그녀는 9/10 매칭된 혈연이 아닌 기증자로부터 RBSC 이식을 받았다. 호중구 생착은 대략 35일 쯤에 발생하였다. 혈소판 생착은 184일 쯤에도 달성되지 않았다. 그녀는 1년 이상 혈소판 및 RBC 주입을 필요로 하였다.
- [1328] 이식 후 합병증
- [1329] 환자는 복잡한 이식후 과정을 가졌다. 퇴원 직후 그녀는 호흡곤란으로 67일 에 재입원하였고 폐렴으로 추정되었

다. 그녀는 162일에 퇴원하였다. 그녀는 167일에 아시클로비르로 치료된 수두 대상포진 바이러스 재활성화 및 코르티코스테로이드로 치료된 다발성 장막염(polyserositis)으로 재입원하였다. 그녀는 지속적인 혈소판 감소증 및 빈혈, 상승된 LDH, 감소된 합토글로빈, 분열적혈구 및 음성 직접 항체 테스트를 가졌다. TMA 진단이 이루어졌다. 면역억제는 MMF 및 프레드니손으로 변경되었다. 그녀는 또한 HHV6 및 EBV 재활성화를 경험하였다. 그녀는 197일에 퇴원하였다.

[1330] 229일에 그녀는 지속적인 TMA 및 중증의 호흡 곤란으로 재입원하였다. 그녀는 CPAP 및 코르티코스테로이드로 치료된 미만성 폐포 출혈로 진단받았다. 231일에 그녀는 산화가 악화되는 흉막 및 심낭 삼출을 보였다. 그녀의 혈압은 증가되었다. 그녀는 ACE 억제제, 칼슘 채널 차단제, 베타 차단제, 및 BP 제어를 위한 니트로글리세린을 필요로 하였다. 그녀는 발작을 경험하였고 클로니딘이 첨가되었다. 뇌 MRI는 그녀의 RBC 이식 병력으로부터의 이차적인 혈색소증(hemochromatosis)과 일치하게 뇌에서의 철을 보였다. 혈액 투석을 231일에 시작하였다. 259일에 그녀는 계속되는 신장 부전 및 악화되는 폐 상태로 인해 에쿨리주맙 치료를 시작하였다. 그녀의 TMA는 개선되었지만, 그녀는 급성 폐 부종이 발생하였고 에쿨리주맙은 중단되었다. 그녀의 TMA는 악화되었고 그녀는 269, 276, 및 278일에 혈장 교환을 받았지만 개선되지 않았다. 그녀는 테피브로타이드로 치료되었으나 응고병증 및 TMA 개선이 없음으로 인해 중단되었다. 그녀는 다시 대략 320일에 저용량의 에쿨리주맙을 받기 시작하였다. 에쿨리주맙을 다시 폐 부종으로 인해 중단하였다. TMA는 지속되었다. 그녀는 또한 클로스트리디움 디피실(C. difficile) 감염을 발생하였다. 그녀는 프레드니손, MMF, 보리코나졸, 코트리마졸, 암로디핀, 에피트로포이에틴, 우르소디올 및 오메프라졸을 받으면서 379일에 퇴원하였다.

[1331] 그녀는 열, 오한, 및 호흡장애로 380일에 재입원하였다. 그녀는 폐렴막대균(K. pneumoniae) 폐렴 및 엔테로코커스 패시움(E. faecium) 패혈증을 가졌다. 그녀의 MMF는 중단되었다. 그녀는 타조신, 메로페넴, 및 반코마이신으로 치료되었다. 지속적인 박테리아혈증으로, 그녀의 중심선이 변경되었고 그녀의 항생제는 리네졸리드, 닙토마이신, 및 클린다마이신으로 변경되었다. 그녀의 TMA는 계속해서 주 3회 혈액투석 및 매일 혈소판 수혈을 필요로 하였다. 폐 부종은 미만성 폐포 출혈로 진단되었다 (코르티코스테로이드로 치료하였으나 반응 없었음). 404일에 동정적 사용 프로토콜 하에 OMS646 치료를 시작하였다. 본원에서 기술된 것과 같이, OMS646은 보체의 렉틴 경로 활성화를 억제하는 MASP-2 억제 항체이다.

[1332] 그녀를 주 3회 4 mg/kg 용량의 OMS646으로 치료하였다. 그녀의 산소는 중단되었고 그녀의 코르티코스테로이드 용량은 감소되었다. 그녀의 실험실 TMA 마커는 개선되었다. 그녀는 414일에 퇴원하였다.

[1333] 그녀는 주 3회 외환환자 OMS646 치료를 계속하였고 416일에 그녀의 혈액 투석은 매주 1회로 감소하였다. 그녀의 항고혈압 약물도 또한 암로디핀, 클로니딘 및 퓨로세미드로만 감소되었다. 423일에 그녀는 혈액 투석을 중단할 수 있었고 428일에 그녀의 OMS646은 매주 2회로 감소되었으며 그녀의 코르티코스테로이드 및 퓨로세미드 용량도 감소되었다. 그녀의 혈소판 수혈은 이 기간 중에 실질적으로 감소되었다.

[1334] 그녀는 RSV 감염이 발생한 486일 까지 계속해서 잘 지내고 있었다. 그녀의 크레아티닌 및 LDH는 증가하였고, 그녀의 혈소판 수 및 합토글로빈은 떨어졌다. 그녀는 재발 TMA로 진단받았고 OMS646 치료를 주 3회로 증가시켰다. 그녀의 TMA는 증가된 OMS646 치료로 해소되었다.

[1335] 그녀는 혈액 투석 없이 유지되었고 그녀의 마지막 혈소판 수혈은 약 630일에 발생하였다. 그녀는 현재 잘 지내고 있으며 OMS646, 테스퓨록사민, 레보티록신, 세벨라머, 오그멘틴, 레베티라세탐, 알로퓨리놀, 암로디핀, 네비볼롤, 클로니딘 및 에리트로포이에틴으로 치료받고 있다. 그녀는 혈색소증에 대해 사혈(phlebotomies)을 받고 있다.

[1336] TMA 에피소드

[1337] 이 환자는 지속적인 및/또는 재발되는 TMA로 어려운 과정을 가졌다. 그녀의 과정은 다중 장기 TMA와 일치하고 그녀는 또 다른 내피 손상 증후군인 미만성 폐포 출혈 (DAH)을 가졌다. 그녀는 초기에 에쿨리주맙에 반응하였지만, 치료를 견디지 못하였다. OMS646 치료를 시작하기 전에 그녀는 혈액 투석 중이었고 매일 수혈을 필요로 하였다. OMS646 치료 후 곧 그녀의 TMA는 해소되었고, 그녀의 DAH가 해소되었고, 그녀는 투석을 중단할 수 있었다. 그녀는 나중에 혈소판 및 RBC 수혈을 실질적으로 감소할 수 있었고 나중에는 중단할 수 있었지만 안정적이거나 증가하는 혈소판 수 및 헤모글로빈 값을 유지하였다. 이들 결과는 도 62A-62E에서 다음과 같이 입증된다:

[1338] 도 62A는 동정적 사용 환자 #1에서 시간에 따른 크레아티닌의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다.

- [1339] 도 62B는 동정적 사용 환자 #1에서 시간에 따른 합토클로빈의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다.
- [1340] 도 62C는 동정적 사용 환자 #1에서 시간에 따른 헤모글로빈의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다.
- [1341] 도 62D는 동정적 사용 환자 #1에서 시간에 따른 LDH의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다.
- [1342] 도 62E는 동정적 사용 환자 #1에서 시간에 따른 혈소판의 수준을 그래프로 도시하며, 여기서 수직선은 MASP-2 억제 항체 (OMS646)로의 치료 시작을 나타낸다.
- [1343] 전체적으로, 이 환자의 과정은 환자가 산소 요법, 혈액 투석, 및 수혈을 중단할 수 있게 하는 TMA 및 DAH의 성공적인 OMS646 치료를 입증한다.
- [1344] 요약
- [1345] 요약하면, 이 실시예는 에쿨리주맵 치료를 건디지 못하였지만, OMS646 치료의 동정적 사용에 잘 반응한 10대 소녀 (동정적 사용 환자 #1)의 HCST-TMA 사례 보고를 기술한다. OMS646 치료 후 곧 그녀의 TMA는 해소되었고, 그녀의 DAH가 해소되었고, 그녀는 투석을 중단할 수 있었다. 실시예 47에서 기술된 것과 같이, 스테로이드-내성 GvHD 및 사이토메갈로바이러스 감염을 포함한, 어려운 이식 후 과정을 가진 환자를 기술하는 또 다른 HSCT-TMA 사례 보고가 제공되었다. 그는 보존적 조치에 반응하지 않은 TMA가 발생하였고 다발성 신경학적 합병증과 공존하는 GvHD를 가졌으며 일할 수 없었다. 실시예 47에서 기술된 것과 같이, OMS646 치료 후에, 그의 TMA 및 GvHD는 해소되었고 그의 신경학적 합병증은 개선되었다. 그는 직장으로 복귀할 수 있었고 그의 신경학적 상태는 계속해서 개선되었다.
- [1346] HSCT 수령체에서 전체적인 생존율 및 TMA 마커의 개선은 이들 증증으로 아픈 환자에서 GvHD의 해소 및 미만성 폐포 출혈의 해소와 조합되어 이들 증후군에서 역할을 하는 렉틴 경로의 역할 및 줄기 세포 이식 후 TMA, 이식 편대숙주병 및 미만성 폐포 출혈을 치료 및/또는 예방하는 데 MASP-2 억제 항체 OMS646의 사용을 위한 효능을 나타낸다.
- [1347] 전술한 설명에 따르면, 한 구체예에서, 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 (즉, HSCT 수령체에서) 미만성 폐포 출혈을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 HSCT와 관련된 미만성 폐포 출혈을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [1348] 본원에 개시된 임의의 구체예에 따르면, MASP-2 억제 항체는 다음의 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).
- [1349] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 HSCT 수령체에서 미만성 폐포 출혈과 관련된 적어도 하나 이상의 임상 파라미터를 개선하기에 효과적인 양으로 투여된다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 미만성 폐포 출혈을 앓고 있는 대상체에게 정맥내로, 근육내로, 또는 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 만성적일 수 있고 매일 내지 매일 투여될 수 있지만, 바람직하게는 적어도 2주마다, 또는 적어도 주 1회, 예컨대 주 2회 또는 주 3회 투여될 수 있다. MASP-2 억제 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맵과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.
- [1350] 한 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역

역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 미만성 폐포 출혈을 앓고 있는 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체를 포함한다.

[1351] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[1352] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[1353] 일부 구체예에서, 방법은 HSCT와 관련된 미만성 폐포 출혈을 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게, SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 3주의 기간 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다.

[1354] 전술한 설명에 따르면, 또 다른 구체예에서, 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 (즉, HSCT 수령체에서) 정맥 폐색성 질환 (VOD)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체를 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 HSCT와 관련된 정맥 폐색성 질환을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[1355] 본원에 개시된 임의의 구체예에 따르면, MASP-2 억제 항체는 다음의 특징 중 적어도 하나 이상을 나타낸다: 상기 항체는 10 nM 이하의 K_D 로 인간 MASP-2에 결합하며, 상기 항체는 MASP-2의 CCP1 도메인의 에피토프에 결합하고, 상기 항체는 시험관내 검정에서 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 1% 인간 혈청에서 C3b 침착을 억제하며, 상기 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제하고, 여기서 항체는 Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ 및 F(ab')₂로 이루어지는 군으로부터 선택된 항체 단편이며, 항체는 단일 사슬 분자이고, 상기 항체는 IgG2 분자이며, 상기 항체는 IgG1 분자이고, 상기 항체는 IgG4 분자이며, IgG4 분자는 S228P 돌연변이를 포함한다. 한 구체예에서, 항체는 MASP-2에 결합하고 렉틴 경로를 선택적으로 억제하며 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다 (즉, 렉틴 경로를 억제하지만 고전적 보체 경로는 온전하게 남겨 둔다).

[1356] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 HSCT 수령체에서 정맥 폐색성 질환과 관련된 적어도 하나 이상의 임상 파라미터를 개선하기에 효과적인 양으로 투여된다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제 항체를 정맥 폐색성 질환을 앓고 있는 대상체에게 정맥내로, 근육내로, 또는 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 만성적일 수 있고 매일 내지 매일 투여될 수 있지만, 바람직하게는 적어도 2주마다, 또는 적어도 주 1회, 예컨대 주 2회 또는 주 3회 투여될 수 있다. MASP-2 억제 항체는 단독으로, 또는 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제와 함께 투여될 수 있다.

[1357] 한 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영

역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식과 관련된 정맥 폐색성 질환을 앓고 있는 대상체를 치료하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 조성물은 (I) (a) i) SEQ ID NO: 67의 31-35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H1; 및 ii) SEQ ID NO: 67의 50-65의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H2; 및 iii) SEQ ID NO: 67의 95-107의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 (b) i) SEQ ID NO: 70의 24-34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L1; 및 ii) SEQ ID NO: 70의 50-56의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L2; 및 iii) SEQ ID NO: 70의 89-97의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역, 또는 (II) SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, SEQ ID NO: 67에 대해 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 대해 적어도 90% 동일성 (예컨대, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일성)을 가지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 그것의 변이체를 포함하는 MASP-2 억제 항체를 포함한다.

[1358] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편의 일정량을 포함하는 조성물을 HSCT와 관련된 정맥 폐색성 질환을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[1359] 일부 구체예에서, 방법은 SEQ ID NO:67에 제시된 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70에 제시된 경쇄 가변 영역을 포함하는 참조 항체 OMS646에 의해 인식된 인간 MASP-2 상의 에피토프의 적어도 일부를 특이적으로 인식하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[1360] 일부 구체예에서, 방법은 HSCT와 관련된 정맥 폐색성 질환을 앓고 있거나, 또는 발병 위험이 있는 대상체에게, SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 3주의 기간 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다.

[1361] **실시예 49**

[1362] 이 실시예는 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 후 특발성 폐렴 증후군 (IPS)을 앓고 있는 대상체의 치료에 MASP-2 억제 단클론성 항체, OMS646을 사용하는 연구를 기술한다.

[1363] 배경/근거:

[1364] 비감염성 특발성 폐렴으로도 언급되는 특발성 폐렴 증후군 (IPS)은 심장 또는 신장 기능장애의 부재 하에 발생하는 광범위한 폐포 손상, 의원-유도(iatrogenic-induced) 순환 과부하 또는 감염으로서 정의된다. IPS는 전형적으로 이식 후 처음 100일 안에 호흡장애, 저산소혈증, 열 및 폐렴의 임상적 특징을 나타내며 조혈 줄기 세포 (HSCT) 수령체의 최대 10%에서 나타난다 (Wieruszewski et al., *World J. Crit. Car Med* 7(5):62-72, 2018 참고). 이런 폐 손상은 자가 또는 동종 HSCT 후에 발생할 수 있다. IPS는 동종 HSCT에서 더 일반적이며 전형적으로 이식 후 초기 기간 (즉, 이식 후 4일 내지 120일) 동안에 발생한다.

[1365] 동종 HSCT 후 IPS는 코르티코스테로이드에 대한 빈약한 반응 및 점진적인 호흡 부전과 관련된다 (Pagliuca S. et al., *Blood Advances* vol 3 (15):2424-2435, 2019). Fukuda T. et al., *Blood* 102:2777-2785, 2003에서 기술된 것과 같이, 종래의 및 비골수억제성 조건화로의 동종 HSCT 후에 IPS가 발생한 81A명의 환자의 임상 과정 및 결과를 분석하였고 IPS가 개시될 때까지의 중간 시간은 종래의 또는 비골수억제 요법으로 HSCT 후 각각 22일 (범위, 4-106일) 및 16일 (범위, 7-34일)인 것으로 측정되었다. IPS로부터의 사망률은 80% 정도로 높고 인공 호흡기로 호흡을 지원하는 것을 필요로 하는 환자에게는 더 크다. 사망에 이르는 중간 시간은 IPS의 개시로부터 14일이었다 (Fukuda et al., 2003). IPS에 대한 현재의 표준 치료법은 정맥내 코르티코스테로이드를 포함하지만, IPS로 진단된 환자에서 코르티코스테로이드 요법에 대한 반응은 혼합되지만 제한된 효능을 보였고 (Fukuda T. et al., *Blood* 102:2777-2785, 2003) 예후는 여전히 매우 불량하게 유지된다 (75%-85% 사망률), Clark J.G. et al., *Am Rev Respir Dis.* vol 147 (6) pages:1601-1606, 1993; Afessa et al., *Bone Marrow Transplantation* 28: 425-434, 2001 참고.

- [1366] IPS 환자의 한 작은 하위집단에서, 일반적으로 골수 회복의 시작과 관련된 HSCT 직후 기간 (즉, 이식 후 12-19일)에 발생하는, 미만성 폐포 출혈 (DAH)로도 알려져 있는 급성 폐 출혈 또는 출혈성 폐포염(hemorrhagic alveolitis)이 발생한다, Panoskaltis-Mortari et al., *Am J Respir Crit Care Med* vol 183:1262-1279, 2011 참고. DAH의 진단은 미만성, 양측 폐 침윤, BAL 유체의 점진적으로 더 붉어지는 복귀(bloodier return) 및 BAL 유체 중의 헤모시데린-탐재 대식세포의 20%를 넘는 존재를 특징으로 한다 (Robbins et al., *Am J Med* 87:511-518, 1989). IPS의 DAH 형태로 진단받은 환자의 작은 하위집단의 경우, 고용량의 스테로이드는 개선된 사망률과 함께 효능을 증가시킬 수 있다 (67% 대비 91%). Metcalf J.P. et al., *Am J Med* 96:327-334, 1994.
- [1367] HSCT 후 IPS (HSCT-IPS)에 대한 유전자 온톨로지(Gene ontology) 풍부화 분석은 급성 단계 반응 신호전달 단백질, 보체 시스템 (즉, CD55, C3, CFI, CFH, C5) 및 응고 시스템 (즉, KNG1, PLG, PROS1, F2)이, 아마도 사용된 예비 조건화 요법의 강도에 부차적으로 참여하는 것을 입증하였다 (Bhargava M. et al., *Biol Marrow Transplant* 22: 1383-1390, 2016). 쥐과 모델에서 내피 세포 활성화 및 손상이 IPS의 발생의 요인인 것으로 나타났다 (Cooke et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 14:23-32, 2008). HSCT를 받은 313명의 소아 환자의 후향적 연구에서, 그 중 9명이 IPS를 발병하였고, 그 중 8명에서 폐 생검을 수행하였으며, 8명의 환자 전부 내피 세포 활성화 손상과 관련되었을 것으로 해석되는 기저 질환 과정을 보인 것으로 측정되었다 (Altmann T. et al., *Bone Marrow Transplantation* 53:515-518, 2018).
- [1368] 렉틴 경로는 조직 스트레스 및 손상의 선천성 면역 센서로서 작용하며 내피 세포 스트레스 또는 손상의 환경에서 보체를 활성화하는 데 역할을 하는 것으로 여겨진다. 더불어, 렉틴 보체 캐스케이드는 응고 캐스케이드와 상호작용한다. 특히, MASP-2는 인자 Xa와 유사한 방식으로 프로트롬빈을 활성화하여 활성 트롬빈을 생성할 수 있다. 그러므로, MASP-2의 억제제는 HSCT-IPS의 유익한 효과의 일부로서 렉틴-매개 응고 시스템 활성화를 제한할 수 있다. 본원에서 기술된 것과 같이, 연구는 MASP-2 억제 항체 OMS646이 비정형 용혈성 요독 증후군 (aHUS)을 가진 환자로부터의 인간 혈청으로 활성화된 내피 세포 상의 C5b-9 침착 또는 혈전 형성을 억제하는 것을 입증하였다. 렉틴 경로는 HSCT-IPS에서 보체 활성화를 개시하고 지속시키는 데 핵심 역할을 할 수 있고 OMS646과 같은 MASP-2 억제 항체를 통한 렉틴 경로의 억제는 HSCT-IPS와 관련된 보체 및 응고 시스템 매개 폐 손상을 모두 해결할 수 있다.
- [1369] 방법:
- [1370] 조혈 줄기 세포 이식 후 특발성 폐렴 증후군 (IPS) (HSCT-IPS)을 앓고 있는 대상체의 치료에서 OMS646의 용도를 분석하기 위하여 다음의 연구를 수행한다.
- [1371] 방법은 HSCT 후 (즉, HSCT 후 4일 내지 120일 후) 발생하는 비-감염성 호흡기 임상 증후군으로서 정의되고 다음 기준 중 하나 이상 (Clark J.G. et al., *Am Rev Respir Dis.* 1993 Jun: vol 147 No. 6 Pt 1):1601-1606에서 기술된 것과 같음)을 충족하는 HSCT-IPS를 앓고 있는 대상체를 확인하는 단계를 포함한다:
- [1372] (1) 다음 중 하나 이상을 포함하는 광범위한 손상의 증거:
- [1373] (a) 흉부 방사선 사진 또는 컴퓨터 단층촬영 (CT) 스캔에서 다중엽 침윤;
- [1374] (b) 폐렴의 증상 및 징후 (예컨대, 기침, 호흡장애, 수포); 및/또는
- [1375] (c) 증가된 폐포-동맥 산소 구배 또는 산소 보충에 대한 필요성에 의해 표시되는 비정상적인 폐 생리학의 증거; 및
- [1376] (2) 대상체의 활성 하부 기도 감염의 부재.
- [1377] 활성 하부 기도 감염의 존재에 대한 평가 방법으로는, 예를 들어:
- [1378] (a) 유의미한 박테리아 병원체에 대해 음성인 기관지폐포 세척 및/또는 광범위한 항생물질로의 개선의 결여;
- [1379] (b) 병원성 비박테리아 미생물에 대해 음성인 기관지폐포 세척 (예컨대, 일상적인 박테리아 바이러스 및 진균 배양, 셀-바이알 CMV 배양, CMB 개입에 대한 세포학, 진균 및 폐포자충(Pneumocystis carinii), 호흡기 융합 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 및 다른 유기체에 대한 검출 방법);
- [1380] (c) 환자 상태가 허용된다면 경기관지 생검;
- [1381] (d) 선택적으로, 초기 음성 기관지폐포 세척 후 2 내지 14일 후에 일반적으로 수행된, 감염에 대해 실시되는 제 2 확인성 음성 테스트를 들 수 있다.

- [1382] 치료 투여
- [1383] HSCT-IPS를 앓고 있는 대상체에게 체중이 50 kg을 넘는 성인에게 370 mg의 OMS646을 정맥내 주입을 통해 투여한다. 소아 환자 또는 50 kg 이하의 환자는 체중에 따른 용량 조정이 필요하며 4 mg/kg으로 투여된다. 치료는 치료에 대한 반응에 따라 8주 내지 12주 동안 매주 2회 투여된다. 만약 환자가 4주 동안 유지되는 반응을 달성한다면, 투약 빈도는 매주 2회 치료되고 있는 환자에서 매주 1회로 감소될 수 있다.
- [1384] 치료에 대한 양성 반응은 HSCT-IPS의 하나 이상의 증상에서 개선이 관찰될 때 결정된다.
- [1385] 전술한 설명에 따르면, 한 측면으로, 본 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하고 그로써 HSCT-IPS의 적어도 하나의 증상을 개선하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식 후 특발성 폐렴 증후군 (IPS)(HSCT-IPS)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [1386] 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 특발성 폐렴 증후군 (IPS)을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 한 구체예에서, 특발성 폐렴 증후군 (IPS)을 앓고 있는 대상체는 DAH를 갖지 않는 것으로 측정된다.
- [1387] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메릭 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC₅₀으로 C3b 침착을 억제한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [1388] 일부 구체예에서, 방법은 HSCT-IPS를 앓고 있는 대상체에게, SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 2주의 기간 동안, 또는 적어도 3주 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안, 또는 적어도 9주 동안, 또는 적어도 10주 동안, 또는 적어도 11주 동안, 또는 적어도 12주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다.
- [1389] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 4 mg/kg (즉, 3.6 mg/kg 내지 4.4 mg/kg)이다.
- [1390] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 300 mg 내지 약 450 mg (즉, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 350 mg 내지 약 400 mg), 예컨대 약 300 mg, 약 305 mg, 약 310 mg, 약 315 mg, 약 320 mg, 약 325 mg, 약 330 mg, 약 335 mg, 약 340 mg, 약 345 mg, 약 350 mg, 약 355 mg, 약 360 mg, 약 365 mg, 약 370 mg, 약 375 mg, 약 380 mg, 약 385 mg, 약 390 mg, 약 395 mg, 약 400 mg, 약 405 mg, 약 410 mg, 약 415 mg, 약 420 mg, 약 425 mg, 약 430 mg, 약 435 mg, 약 440 mg, 약 445 mg 또는 약 450 mg의 고정 용량이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량이다.
- [1391] 한 구체예에서, 방법은 HSCT-IPS를 앓고 있는 대상체에게 적어도 8주의 치료 기간 동안 매주 2회 정맥내로 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량의 MASP-2 억제 항체를 투여하는 단계를 포함한다.
- [1392] **실시예 50**
- [1393] 이 실시예는 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 후 모세혈관 누출 증후군 (CLS)을 앓고 있는 대상체의 치료에서 MASP-

2 억제 단클론성 항체인 OMS646을 사용하는 연구를 기술한다.

[1394] 배경/근거:

[1395] 모세혈관 누출 증후군 (CLS)은 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT)의 심각한 합병증이며 HSCT 후 처음 15일 이내에, 체중 증가 (24시간 내에 > 3%) 및 전형적으로 퓨로세마이드와 같은 이노제로의 치료에 반응하지 않는 전신 부종 증후군 (복수, 흉막 삼출, 또는 심낭염)의 발생이 임상적인 특징이다. Pagliuca S. et al., *Blood Advances* vol 3 (15): 2424-2435, 2019. 주요 CLS 병인은 혈관내 유체의 간질 공간으로의 손실을 초래하는 모세혈관 내피의 손상이다. 그것의 가장 심각한 형태에서, CLS는 심각한 혈액학적 붕괴 및 다중장기 시스템 부전으로 이어질 수 있다 (Lucchini G. et al., *Pediatr Transplant* 20(8):1132-1136, 2016). CLS를 가진 대상체는 또한 신부전, 빈맥(tachycardia), 저혈압 및/또는 저알부민혈증을 나타낼 수 있다. Pagliuca S. et al., *Blood Advances* vol 3 (15): 2424-2435, 2019 참고. 비록 체중의 증가가 정맥 폐색성 질환 (VOD)의 정의에 포함되는 증상이지만, CLS는 간 세정맥의 피브린-풍부한 혈전 및/또는 증가된 빌리루빈 혈장 수준을 포함한 VOD의 병리학적 소견을 토대로 VOD와는 구별될 수 있다 (Shulman H. et al., *Am J Pathol* 127: 549-558, 1987). CLS는 동종 및 자가 골수 이식 수령체에서 발생한다 (예컨대, Cahill R.A. et al., *Bone Marrow Transplant* 18(1):177-84, 1996; Cornell R. F et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 21:2061-2068, 2015 참고).

[1396] 보체 C4 (C4d), C3a 및 말단 보체 복합체의 활성화 생성물의 증가된 혈장 수준은 골수 이식 후에 CLS에 존재하는 것으로 관찰되었다 (Salat C. et al., *Ann Hematol* 71:271-274, 1995). 소아과 연구에서, 단순 골수 이식을 받은 아동에서 C1-INH의 혈장 활성화는 골수 이식 후 11일 째에 최대 1.3배 내지 1.5배 증가를 보였다. 대조적으로, CLS를 가진 아동은 골수 이식 후 2주 째에 $15 \pm 7\%$ 의 감소를 가져서 골수 이식 후 CLS는 부분적으로 고전적 보체 활성화 및 C1-INH 기능의 상대적인 결핍으로 인한 것이라는 가설로 이어졌다 (Nurnberger W. et al., *Ann Hematol* 67:17-21, 1996). 나중의 연구에서, (Nurnberger W. et al., *Ann Hematol* 75:95-101, 1997) 정제된 C1-INH 농축물을 골수 이식 후 CLS가 있는 15명의 환자에게 투여하였고 과거 대조군으로서 평가되었던 골수 이식 후 CLS를 가진 7명의 환자와 비교하였다. 인간, 정제된 C1-INH 농축물로의 치료를 CLS의 진단 후 4시간 이내에 시작하였다. 보체 활성화 파라미터 C4d 및 C5a는 골수 이식 전에는 정상 범위에 있었고 CLS의 진단 시에 상당한 증가를 보였다. C1-INH의 제1 주입 후에, C4d 및 C5a는 모두 골수 이식 전의 출발 범위로 감소하였고 안정적으로 유지되었다. 대조군 환자의 보체 수준은 C4d의 증가 및 C1-INH 활성화의 감소를 보였다. C1-INH를 받은 환자는 치료 시작 후 약 1일 후에 체중 감소를 경험하였고 체중의 정상화는 심지어 한 명이 아닌 모든 환자에서 C1-INH로 치료를 중단한 후에도 계속하였다. CLS 후 1년 후에, C1-INH 농축물-치료 그룹의 누적 사망률은 과거 대조군 그룹의 7명 중 6명과 비교하여 15명 중 6명이었다 ($p < 0.001$). Nurnberger W. et al., *Ann Hematol* 75:95-101, 1997 참고.

[1397] 방법:

[1398] 다음의 연구를 조혈 줄기 세포 이식 후 모세혈관 누출 증후군 (CLS) (HSCT-CLS)을 앓고 있는 대상체의 치료에서 OMS646의 용도를 분석하기 위해 수행한다.

[1399] 방법은 HSCT 후 (즉, HSCT 후 처음 15일 이내) 발생하는 임상 증후군으로서 정의되고 Pagliuca S. et al., *Blood Advances* vol 3 (15): 2424-2435, 2019에서 기술된 것과 같이 다음 기준을 충족하는 HSCT-CLS를 앓고 있는 대상체를 확인하는 단계를 포함한다:

[1400] i) 체중 증가 (24시간 내에 >3%) 및 전형적으로 이노제 치료 (예컨대, 퓨로세마이드)에 반응하지 않는 전신 부종 증후군 (복수, 흉막 삼출 또는 심낭염); 및 선택적으로;

[1401] ii) CLS를 가진 대상체는 또한 다음: 신부전, 빈맥, 저혈압 및/또는 저알부민혈증 중 하나 이상을 나타낼 수 있다.

[1402] 일부 구체예에서, 방법은 VOD를 갖지 않는 것으로 측정된 HSCT-CLS를 앓고 있는 대상체를 확인하는 단계를 포함한다. 상기에서 기술된 것과 같이, CLS는 간 세정맥의 피브린-풍부 혈전 및/또는 증가된 빌리루빈 혈장 수준을 포함한 VOD에서의 병리적 소견을 토대로 VOD와 구별될 수 있다 (Shulman H. et al., *Am J Pathol* 127: 549-558, 1987).

[1403] 치료 투여

[1404] HSCT-CLS를 앓고 있는 대상체에게 체중이 50 kg을 넘는 성인에서 정맥내 주입을 통해 370 mg의 OMS646을 투여한다. 소아 환자 또는 50 kg 이하의 환자는 체중에 따른 용량 조정이 필요하며 4 mg/kg으로 투여된다. 치료는 치

료에 대한 반응에 따라 8주 내지 12주 동안 매주 2회 투여된다. 만약 환자가 4주 동안 유지되는 반응을 달성한다면, 투약 빈도는 매주 2회 치료되고 있는 환자에서 매주 1회로 감소될 수 있다.

[1405] 치료에 대한 양성 반응은 HSCT-CLS의 하나 이상의 증상에서 개선이 관찰될 때 결정된다.

[1406] 전술한 설명에 따르면, 한 측면으로, 본 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하고 그로써 HSCT-CLS의 적어도 하나의 증상을 개선하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식 후 모세혈관 누출 증후군 (CLS) (HSCT-IPS)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[1407] 한 구체예에서, 방법은 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[1408] 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 모세혈관 누출 증후군 (CLS)을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 한 구체예에서, CLS를 앓고 있는 대상체는 VOD를 갖지 않는 것으로 측정된다.

[1409] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메릭 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC₅₀으로 C3b 침착을 억제한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[1410] 일부 구체예에서, 방법은 HSCT-CLS를 앓고 있는 대상체에게, SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 2주의 기간 동안, 또는 적어도 3주 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안, 또는 적어도 9주 동안, 또는 적어도 10주 동안, 또는 적어도 11주 동안, 또는 적어도 12주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다.

[1411] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 4 mg/kg (즉, 3.6 mg/kg 내지 4.4 mg/kg)이다.

[1412] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 300 mg 내지 약 450 mg (즉, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 350 mg 내지 약 400 mg), 예컨대 약 300 mg, 약 305 mg, 약 310 mg, 약 315 mg, 약 320 mg, 약 325 mg, 약 330 mg, 약 335 mg, 약 340 mg, 약 345 mg, 약 350 mg, 약 355 mg, 약 360 mg, 약 365 mg, 약 370 mg, 약 375 mg, 약 380 mg, 약 385 mg, 약 390 mg, 약 395 mg, 약 400 mg, 약 405 mg, 약 410 mg, 약 415 mg, 약 420 mg, 약 425 mg, 약 430 mg, 약 435 mg, 약 440 mg, 약 445 mg 또는 약 450 mg의 고정 용량이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량이다.

[1413] 한 구체예에서, 방법은 HSCT-CLS를 앓고 있는 대상체에게 적어도 8주의 치료 기간 동안 매주 2회 정맥내로 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량의 MASP-2 억제 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[1414] **실시예 51**

[1415] 이 실시예는 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT) 후 체액 과부하 (FO)를 앓고 있는 대상체의 치료에 MASP-2 억제 항체, OMS646를 사용하는 연구를 기술한다.

[1416] 배경/근거:

- [1417] 체액 과부하 (FO)는 조혈 줄기 세포 이식 후 초기에 (즉, HSCT 후 처음 30일 이내에) 발생하는 증후군이며 다양한 정도의 체중 증가 및 장기 독성이 있거나 없이 체액 제거가 필요한 부종을 특징으로 한다. 일부 경우에, FO는 환자가 정맥내 수화 및 조건화 화학요법을 받을 때 병원에 입원한 후 처음 7일 이내에 발생한다.
- [1418] 4 등급의 FO가 Rondon G. et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 23:2166-2171, 2017)에서 기술된 것처럼 다음과 같이 인식된다:
- [1419] 등급 1: 기준선으로부터 10% 미만의 체중 증가, 무증상 또는 경미한 부종, 이뇨제 요법 또는 정맥내 체액 대체의 감소가 필요할 가능성이 있음;
- [1420] 등급 2: 기준선으로부터 $\geq 10\%$ 내지 $<20\%$ 의 체중 증가가 있거나 없는 증상이 있는 체액 보류, 진행 중인 이뇨제 요법을 필요로 함;
- [1421] 등급 3: 기준선으로부터 $\geq 20\%$ 의 체중 증가, 이뇨제 요법에 반응하지 않으며, 추가 치료를 필요로 하는 신장, 폐, 또는 심장 부전의 가능성이 있음;
- [1422] 등급 4: 하나 이상의 장기 시스템의 점진적인 기능장애 또는 집중 관리를 필요로 함.
- [1423] 각 환자에 대한 상기 등급은 입원한 날과 또 다른 명백한 원인 또는 증후군의 부재 하에 HSCT 후 30일 사이에 관찰된 최대 등급을 토대로 한다.
- [1424] Rondon et al., 2017에서 기술된 것과 같이, 동종 HSCT 수령체에서 FO 독성의 유병률, 중증도 및 예후 값을 평가하기 위해 후향적 연구를 수행하였다. 이 연구의 일차 종점은 FO의 유병률 및 중증도와 비-재발 사망률에 미치는 그것의 영향이었다. FO의 모든 경우를 이식 후 30일 제 또는 그 전에 진단하였고 입원시로부터 FO 진단을 받기까지의 중간 시간은 2 내지 6일이었다. 등급 2 이상의 FO는 더 큰 비-재발 사망률 및 더 빈약한 생존율과 강하게 관련이 있는 것으로 측정되었다. 이 결론과 일치하게, Bouchard et al., *Kidney Int* 76(4):422-7, 2009에서는 10%를 초과하는 체중 증가로서 규정된 FO 환자가 상당히 더 많은 호흡 부전, 인공 호흡기의 필요성 및 더 많은 패혈증을 가진 것이 보고되었다.
- [1425] 방법:
- [1426] 다음의 연구를 조혈 줄기 세포 이식 후 체액 과부하 (FO) (HSCT-FO)를 앓고 있는 대상체의 치료에서 OMS646의 사용을 분석하기 위해 수행한다.
- [1427] 방법은 HSCT 후 (즉, HSCT 후 처음 30일 이내에) 발생하는 임상 증후군으로서 정의되며 하나 이상의 다음 기준 (Rondon G. et al., *Biol Blood Marrow Transplant* 23:2166-2171, 2017)을 충족하는, HSCT-FO를 앓고 있는 대상체를 확인하는 단계를 포함한다:
- [1428] 등급 1: 기준선으로부터 10% 미만의 체중 증가, 무증상 또는 경미한 부종, 이뇨제 요법 또는 정맥내 체액 대체의 감소가 필요할 가능성이 있음;
- [1429] 등급 2: 기준선으로부터 $\geq 10\%$ 내지 $<20\%$ 의 체중 증가가 있거나 없이 증상이 있는 체액 보류, 진행 중인 이뇨제 요법을 필요로 함;
- [1430] 등급 3: 기준선으로부터 $\geq 20\%$ 의 체중 증가, 이뇨제 요법에 반응하지 않으며, 추가 치료를 필요로 하는 신장, 폐, 또는 심장 부전의 가능성이 있음;
- [1431] Grade 4: 하나 이상의 장기 시스템의 점진적인 기능장애가 있는 기준선으로부터 $\geq 20\%$ 의 체중 증가 또는 집중 관리를 필요로 함.
- [1432] 치료 투여
- [1433] HSCT-FO를 앓고 있는 대상체에게 체중이 50 kg을 넘는 성인에서 정맥내 주입을 통해 370 mg의 OMS646을 투여한다. 소아 환자 또는 50 kg 이하의 환자는 체중에 따른 용량 조정이 필요하며 4 mg/kg으로 투여된다. 치료는 치료에 대한 반응에 따라 8주 내지 12주 동안 매주 2회 투여된다. 만약 환자가 4주 동안 유지되는 반응을 달성한다면, 투약 빈도는 매주 2회 치료되고 있는 환자에서 매주 1회로 감소될 수 있다.
- [1434] 치료에 대한 양성 반응은 HSCT-FO의 하나 이상의 증상에서 개선이 관찰될 때 결정된다.
- [1435] 전술한 측면에 따르면, 한 측면으로, 본 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하고 그로써 HSCT-FO의 적어도 하나의 증상을 개선하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물

을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식 후 체액 과부하 (FO) (HSCT-FO)를 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[1436] 한 구체예에서, 방법은 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[1437] 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 체액 과부하 (FO)를 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.

[1438] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메릭 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC₅₀으로 C3b 침착을 억제한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[1439] 일부 구체예에서, 방법은 HSCT-FO를 앓고 있는 대상체에게, SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 2주의 기간 동안, 또는 적어도 3주 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안, 또는 적어도 9주 동안, 또는 적어도 10주 동안, 또는 적어도 11주 동안, 또는 적어도 12주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다.

[1440] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 4 mg/kg (즉, 3.6 mg/kg 내지 4.4 mg/kg)이다.

[1441] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 300 mg 내지 약 450 mg (즉, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 350 mg 내지 약 400 mg), 예컨대 약 300 mg, 약 305 mg, 약 310 mg, 약 315 mg, 약 320 mg, 약 325 mg, 약 330 mg, 약 335 mg, 약 340 mg, 약 345 mg, 약 350 mg, 약 355 mg, 약 360 mg, 약 365 mg, 약 370 mg, 약 375 mg, 약 380 mg, 약 385 mg, 약 390 mg, 약 395 mg, 약 400 mg, 약 405 mg, 약 410 mg, 약 415 mg, 약 420 mg, 약 425 mg, 약 430 mg, 약 435 mg, 약 440 mg, 약 445 mg 또는 약 450 mg의 고정 용량이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량이다.

[1442] 한 구체예에서, 방법은 HSCT-FO를 앓고 있는 대상체에게 적어도 8주의 치료 기간 동안 매주 2회 정맥내로 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량의 MASP-2 억제 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[1443] 실시예 52

[1444] 이 실시예는 조혈 줄기 세포 이식 후 생착 증후군 (ES) (HSCT-ES)을 앓고 있는 대상체의 치료에서 MASP-2 억제 단클론성 항체, OMS646을 사용하는 연구를 기술한다.

[1445] 배경/근거:

[1446] 생착 증후군 (ES)은 보통 호중구 생착시 (즉, 생착 후 7일 이내) 자가 HSCT 후에 발생한다. 이런 환경에서, 자가 HSCT 후 ES 발생률은 5% 내지 25% 범위이다. ES는 또한 때때로 동종 HSCT 후에 진단된다. ES는 코르티코스테로이드가 증상이 시작된 후 초기에 투여될 때 그것에 반응하지만, 치료가 지연될 때 ES는 비가역적 다중 장기 기능 장애 증후군으로 발전할 수 있다 (Carreras E. et al., *BMT* 45:1417-1422, 2010).

[1447] HSCT-ES는 과립구 회복과 일치하며 혈관 유출, 장기 기능장애 및 열을 유발하는 내피 손상, 활성화된 백혈구 및 염증성 사이토카인에 의해 매개될 가능성이 있다 (Spitzer T.R., *BMT* 50:469-475, 2015; Pagliuca S. et al.,

Blood Advances vol 3(15):2424-2435, 2019).

- [1448] 방법:
- [1449] 다음의 연구를 조혈 줄기 세포 이식 후 생착 증후군 (HSCT-ES)을 앓고 있는 대상체의 치료에서 OMS646의 사용을 분석하기 위해 수행한다.
- [1450] 방법은 호중구 생착시 (즉, 생착 후 7일 이내) 발생하며 Spitzer, T.R., *Bone Marrow Transplant* vol 27:893-898, 2001에서 기술된 HSCT-ES의 진단 기준을 충족하는 임상 증후군으로서 정의된 HSCT-ES를 앓고 있는 대상체를 확인하는 단계를 포함한다. HSCT-ES의 진단에 필수적인 것은 다음과 같이 3개의 주요 기준 또는 2개의 주요 기준 플러스 1개의 사소한 기준이다:
- [1451] 주요 기준:
- [1452] (a) 비-감염성 열 (즉, $>38.3^{\circ}\text{C}$ 의 체온, 식별 가능한 감염 병원 없음);
- [1453] (b) 피부 발진 (즉, 체표면적의 25% 이상을 침범하며 약물에 기인하는 것인 아닌 홍반성 발진); 및/또는
- [1454] (c) 이런 진단과 일치하는 미만성 폐 침윤 및 저산소증으로 나타나는 비심인성 폐 부종.
- [1455] 사소한 기준:
- [1456] (a) 2 mg/dL 이상의 총 빌리루빈 또는 정상보다 2배 이상 수준의 트랜스아미나제 수준을 가지는 간 기능장애;
- [1457] (b) 신부전 (기준선의 2배 이상의 혈청 크레아티닌);
- [1458] (c) 기준선 체중의 2.5%보다 큰 체중 증가; 및/또는
- [1459] (d) 다른 원인으로는 설명할 수 없는 일과성 뇌병증.
- [1460] 치료 투여
- [1461] HSCT-ES를 앓고 있는 대상체에게 체중이 50 kg을 넘는 성인에서 정맥내 주입을 통해 370 mg의 OMS646을 투여한다. 소아 환자 또는 50 kg 이하의 환자는 체중에 따른 용량 조정이 필요하며 4 mg/kg으로 투여된다. 치료는 치료에 대한 반응에 따라 8주 내지 12주 동안 매주 2회 투여된다. 만약 환자가 4주 동안 유지되는 반응을 달성한다면, 투약 빈도는 매주 2회 치료되고 있는 환자에서 매주 1회로 감소될 수 있다.
- [1462] 치료에 대한 양성 반응은 HSCT-ES의 하나 이상의 증상에서 개선이 관찰될 때 결정된다.
- [1463] 전술한 설명에 따르면, 한 측면으로, 본 발명은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하고 그로써 HSCT-ES의 적어도 하나의 증상을 개선하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 조혈 줄기 세포 이식 후 생착 증후군 (ES) (HSCT-ES)을 앓고 있는 인간 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [1464] 한 구체예에서, 방법은 이전에 동종 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 한 구체예에서, 방법은 이전에 자가 조혈 줄기 세포 이식을 받은 대상체에게 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [1465] 한 구체예에서, 방법은 MASP-2-의존성 보체 활성화를 억제하기에 효과적인 양의 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 대상체에게 투여하는 단계 전에 이식 후 생착 증후군 (HSCT-ES)을 앓고 있는 인간 대상체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [1466] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 인간 MASP-2에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체, 또는 그것의 단편이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 단편은 재조합 항체, 이펙터 기능이 감소된 항체, 키메릭 항체, 인간화된 항체, 및 인간 항체로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 고전적 경로를 실질적으로 억제하지 않는다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 90% 인간 혈청에서 30 nM 이하의 IC_{50} 으로 C3b 침착을 억제한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체는 대상체에게 전신적으로 전달된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체 또는 그것의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산

서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[1467] 일부 구체예에서, 방법은 HSCT-ES를 앓고 있는 대상체에게, SEQ ID NO:67로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO:70으로서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 MASP-2 억제 항체, 또는 그것의 항원 결합 단편을 포함하는 조성물을 1 mg/kg 내지 10 mg/kg (즉, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg 또는 10 mg/kg)의 투여량으로 적어도 2주의 기간 동안, 또는 적어도 3주 동안, 또는 적어도 4주 동안, 또는 적어도 5주 동안, 또는 적어도 6주 동안, 또는 적어도 7주 동안, 또는 적어도 8주 동안, 또는 적어도 9주 동안, 또는 적어도 10주 동안, 또는 적어도 11주 동안, 또는 적어도 12주 동안 적어도 매주 1회 (예컨대 적어도 매주 2회 또는 적어도 매주 3회) 투여하는 단계를 포함한다.

[1468] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 4 mg/kg (즉, 3.6 mg/kg 내지 4.4 mg/kg)이다.

[1469] 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 300 mg 내지 약 450 mg (즉, 약 300 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 350 mg 내지 약 400 mg), 예컨대 약 300 mg, 약 305 mg, 약 310 mg, 약 315 mg, 약 320 mg, 약 325 mg, 약 330 mg, 약 335 mg, 약 340 mg, 약 345 mg, 약 350 mg, 약 355 mg, 약 360 mg, 약 365 mg, 약 370 mg, 약 375 mg, 약 380 mg, 약 385 mg, 약 390 mg, 약 395 mg, 약 400 mg, 약 405 mg, 약 410 mg, 약 415 mg, 약 420 mg, 약 425 mg, 약 430 mg, 약 435 mg, 약 440 mg, 약 445 mg 또는 약 450 mg의 고정 용량이다. 한 구체예에서, MASP-2 억제 항체의 투여량은 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량이다.

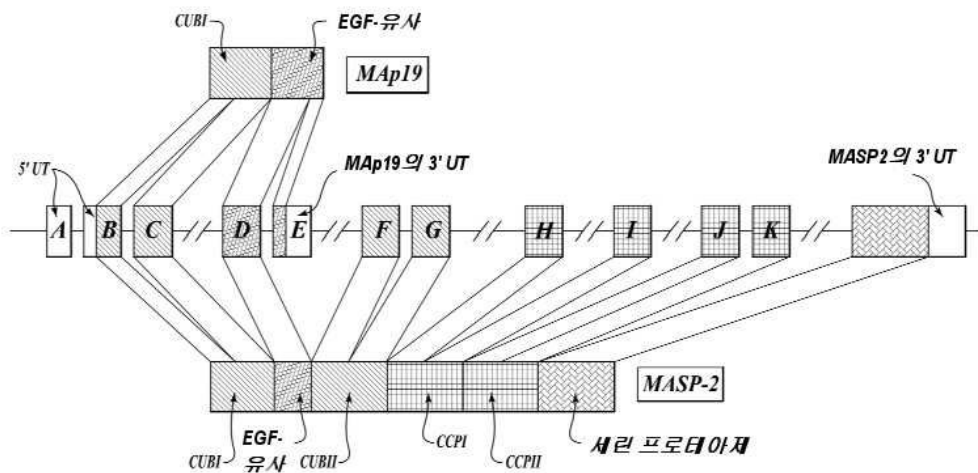
[1470] 한 구체예에서, 방법은 HSCT-ES를 앓고 있는 대상체에게 적어도 8주의 치료 기간 동안 매주 2회 정맥내로 약 370 mg ($\pm 10\%$)의 고정 용량의 MASP-2 억제 항체를 투여하는 단계를 포함한다.

[1471] 예시적인 구체예가 예시되고 기술되었지만, 발명의 사상 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변화가 그 안에서 이루어질 수 있다.

[1472] 배타적 재산 또는 특권이 주장되는 발명의 구체예는 다음과 같이 정의된다.

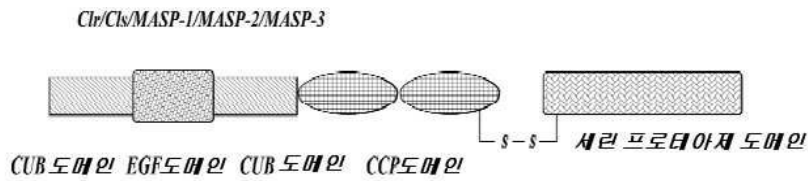
도면

도면1

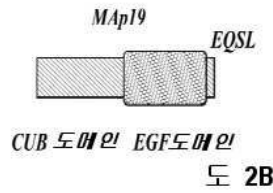


도 1

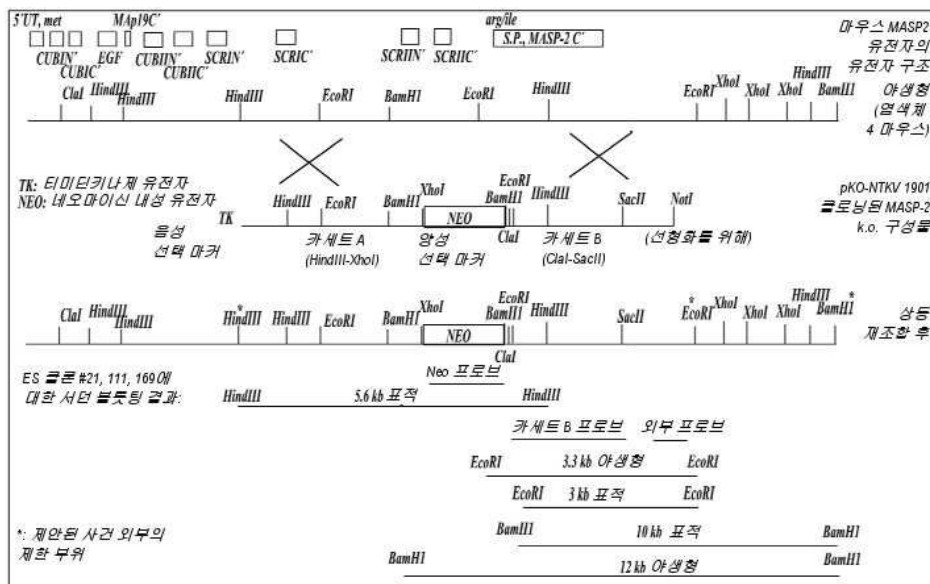
도면2ab



도 2A

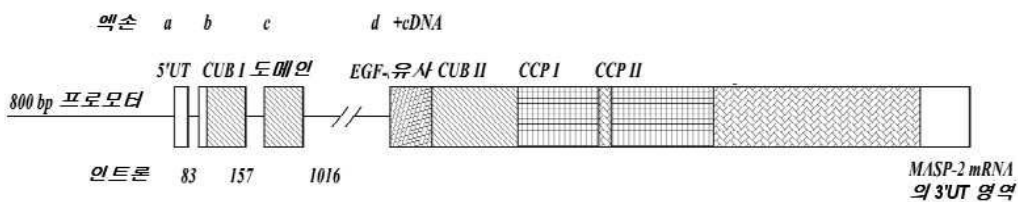


도면3



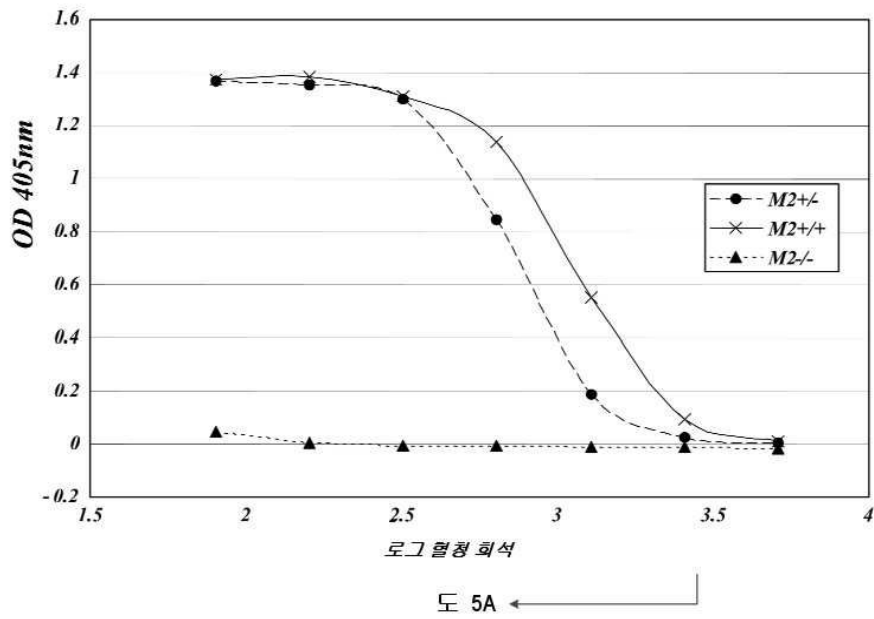
도 3

도면4

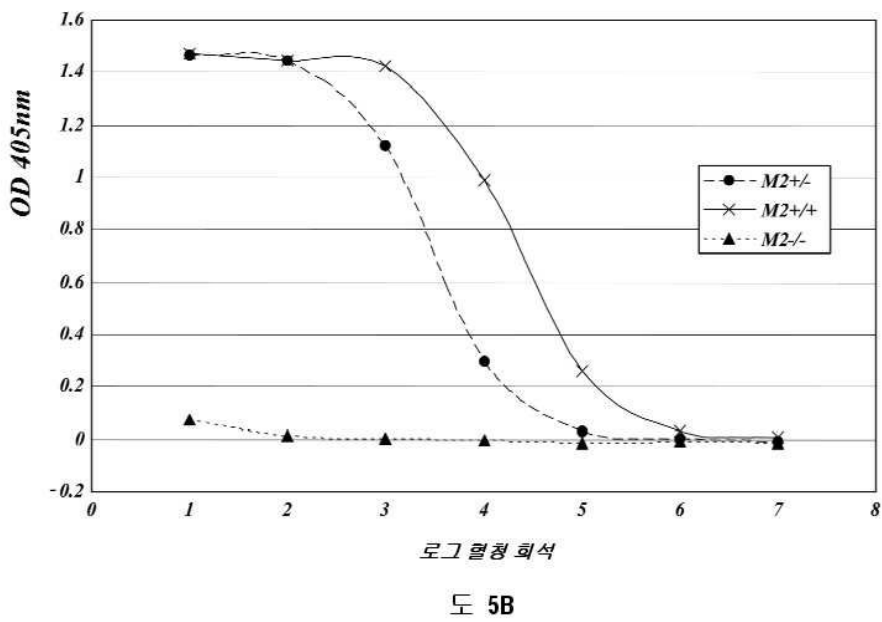


도 4

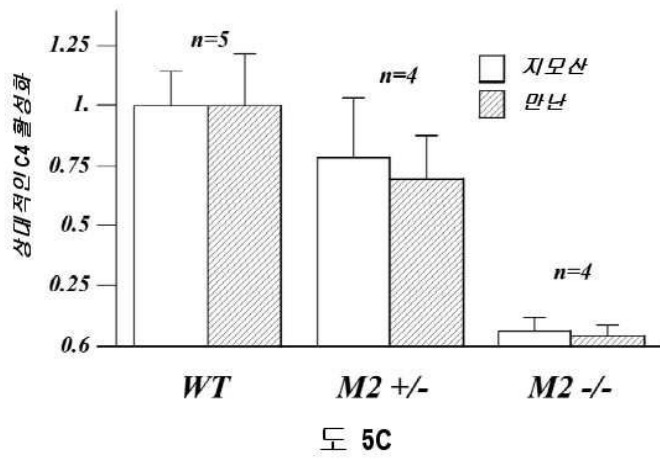
도면5a



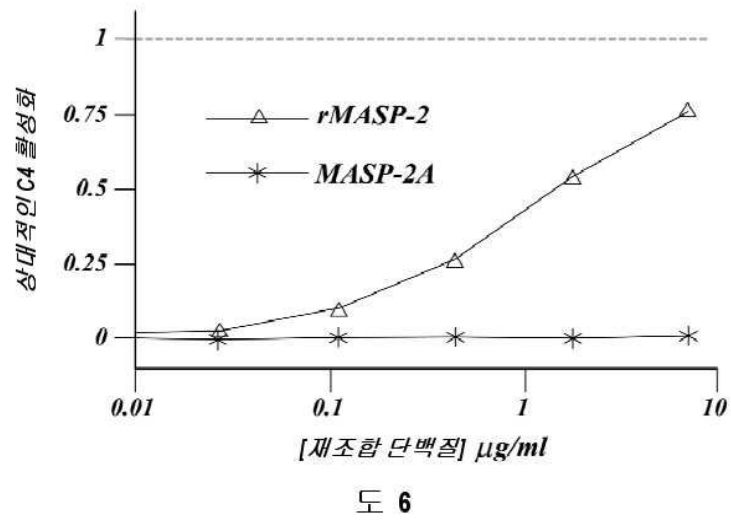
도면5b



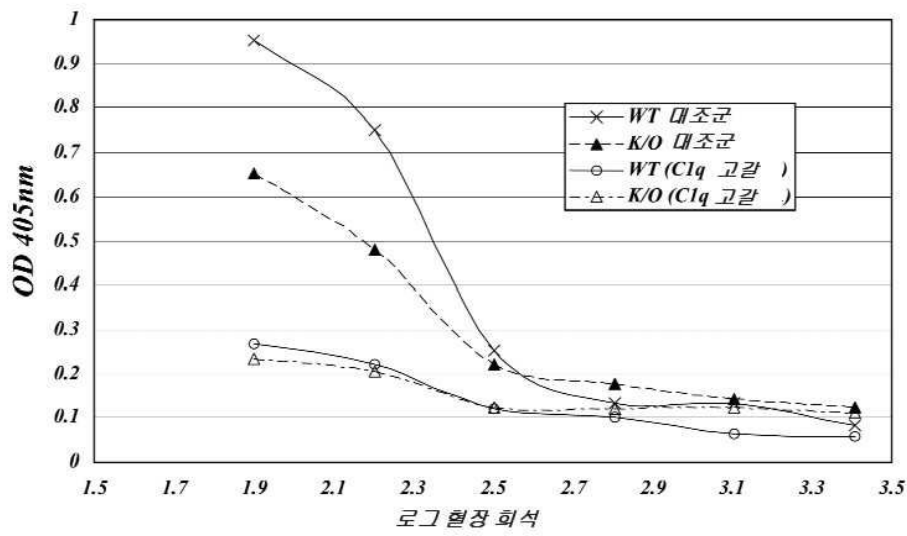
도면5c



도면6

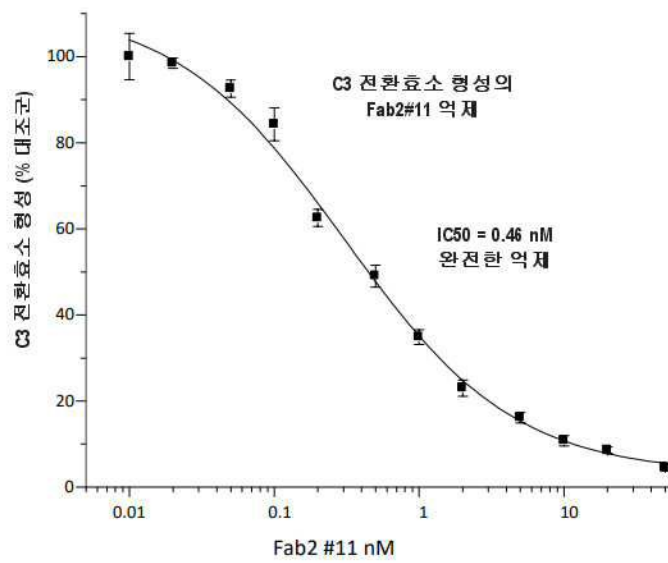


도면7



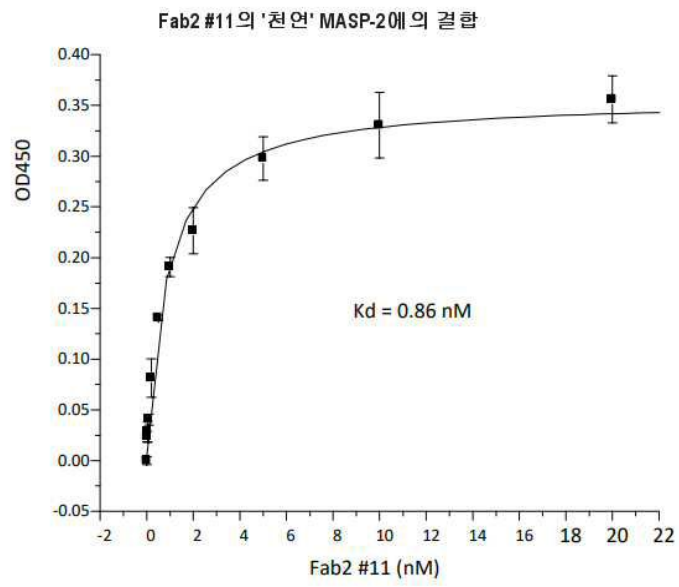
도 7

도면8a



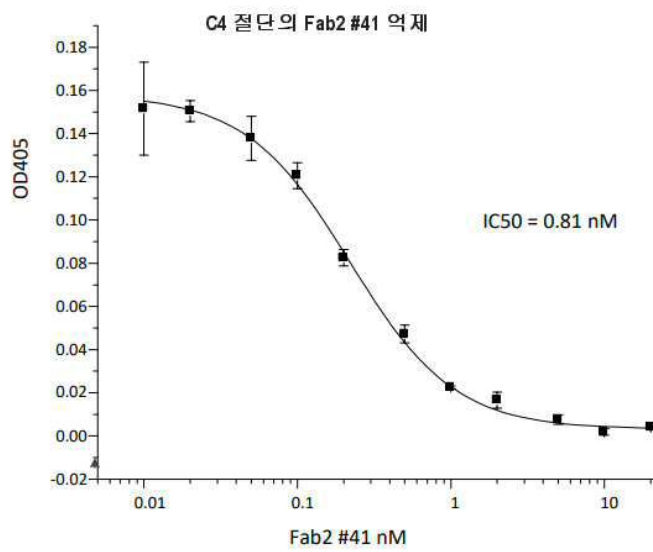
도 8A

도면8b



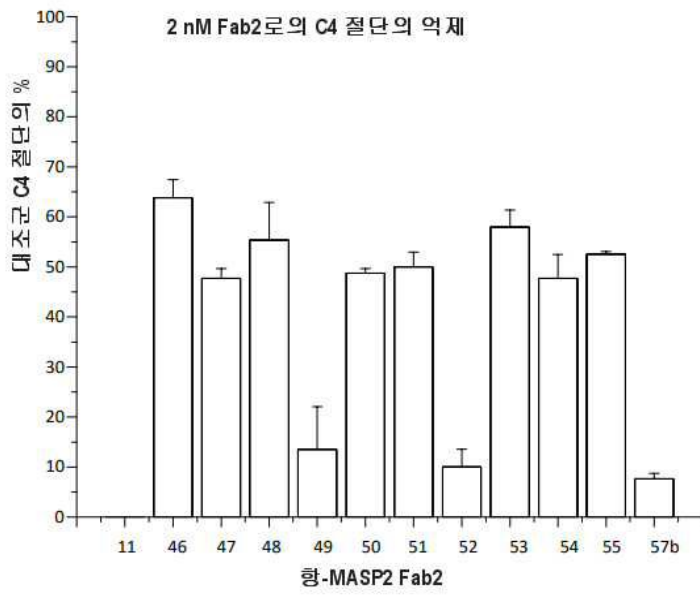
도 8B

도면8c

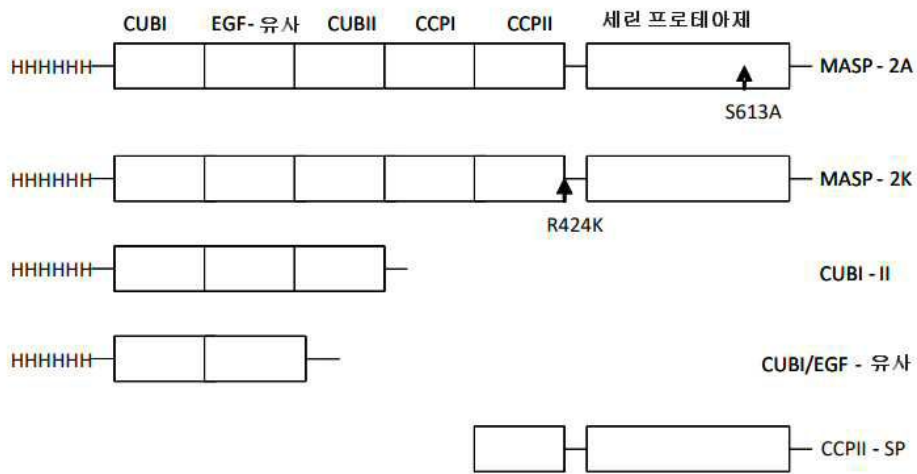


도 8C

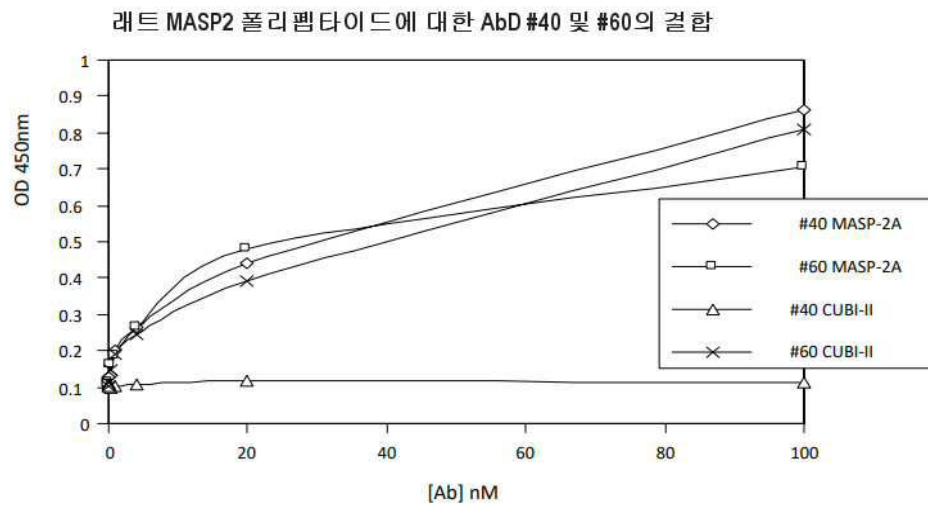
도면9



도면10

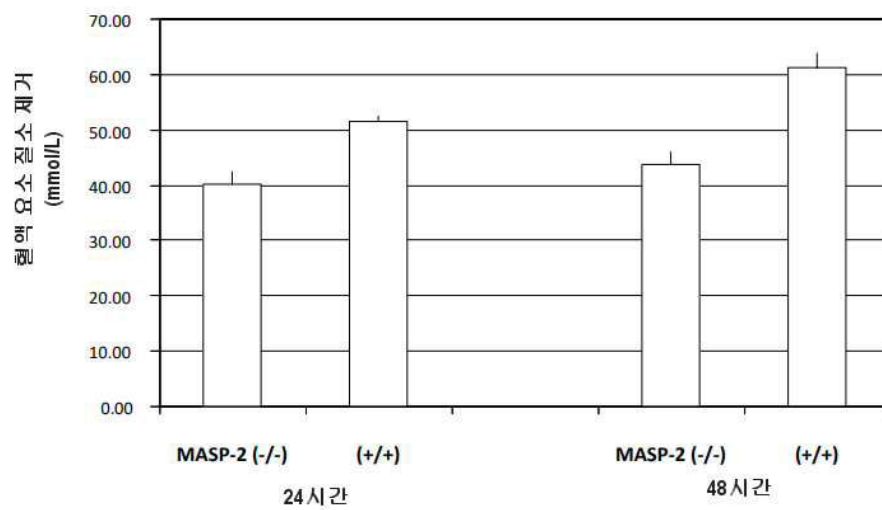


도면11



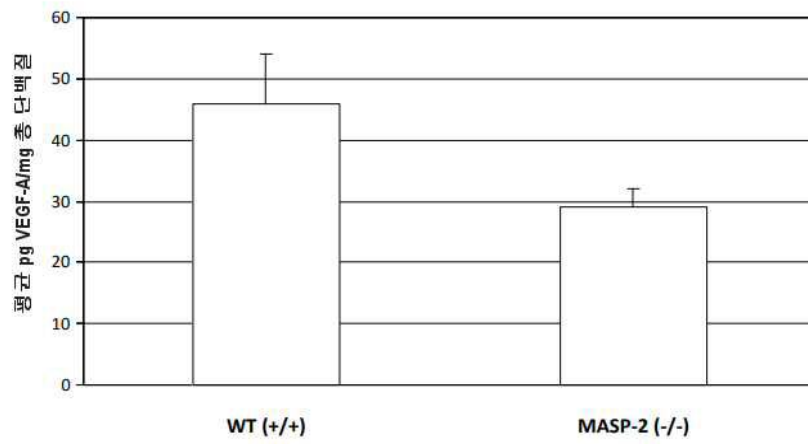
도 11

도면12



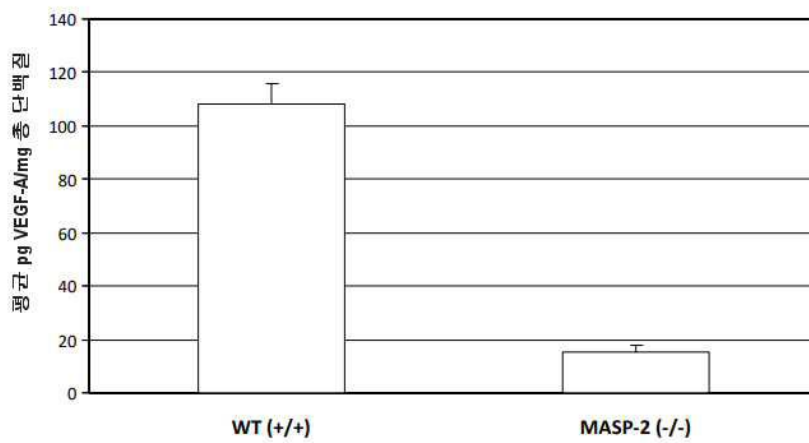
도 12

도면13a



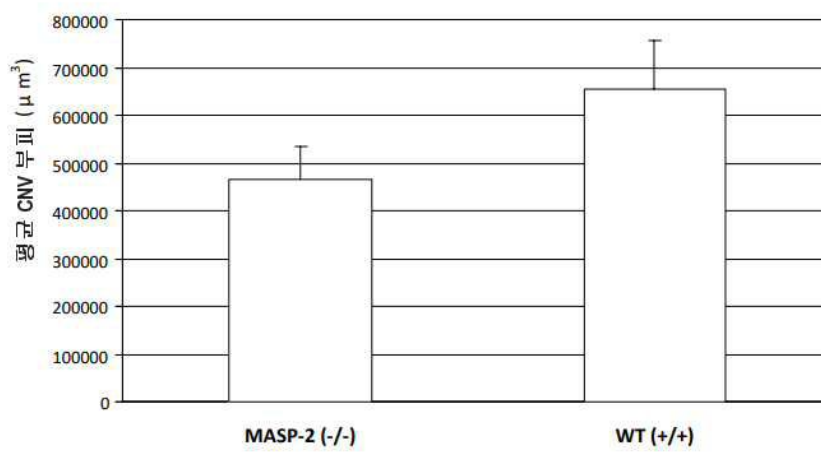
도 13A

도면13b



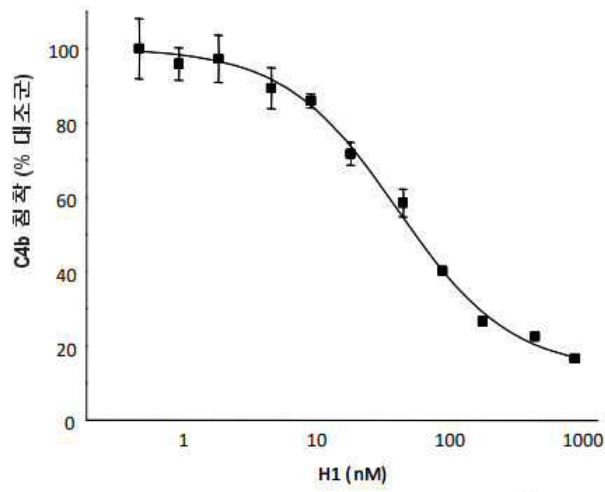
도 13B

도면14

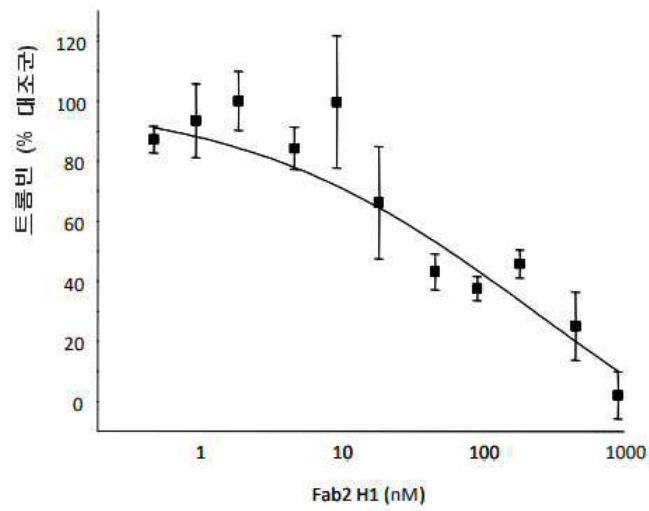


도 14

도면 15ab

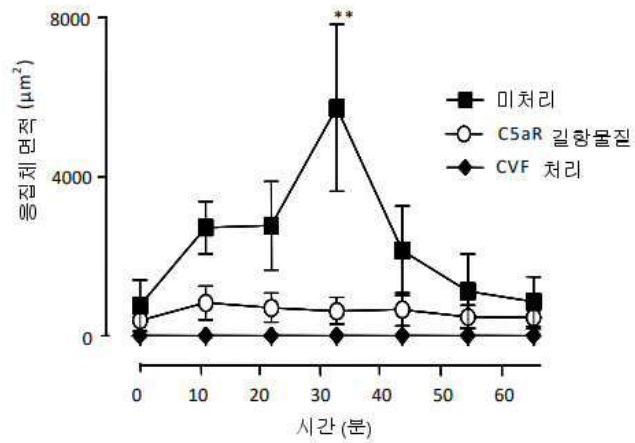


도 15A

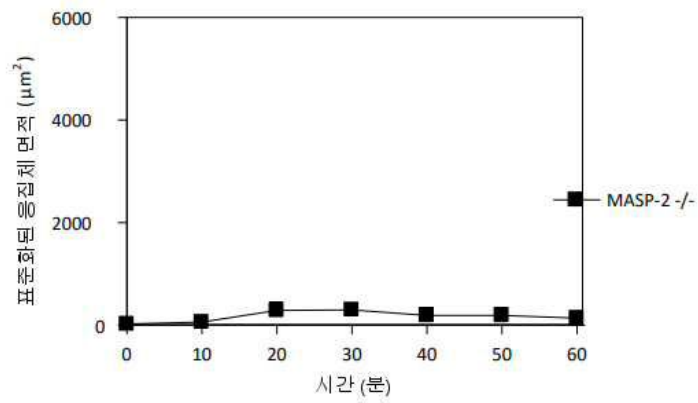


도 15B

도면16ab

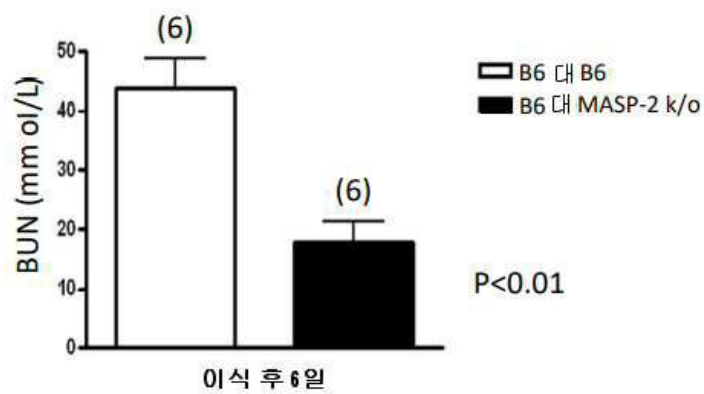


도 16A



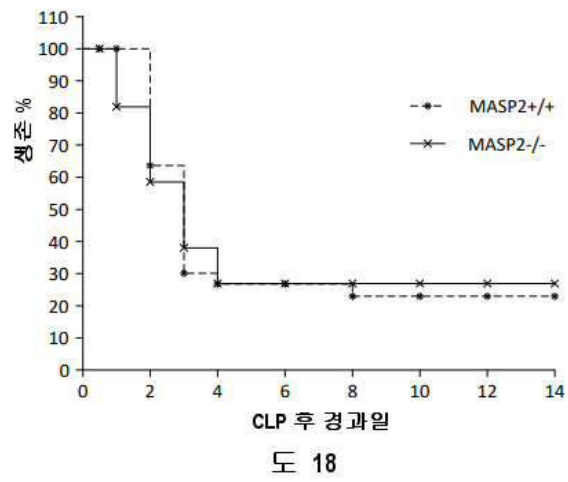
도 16B

도면17

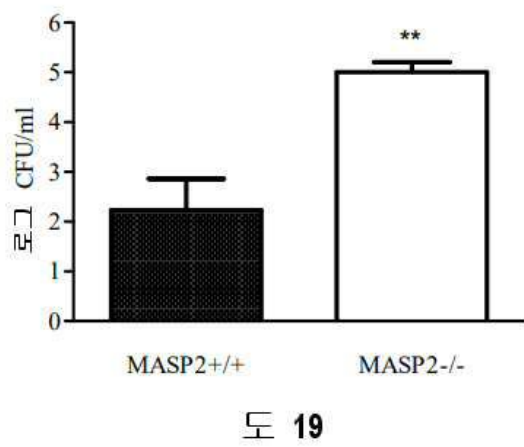


도 17

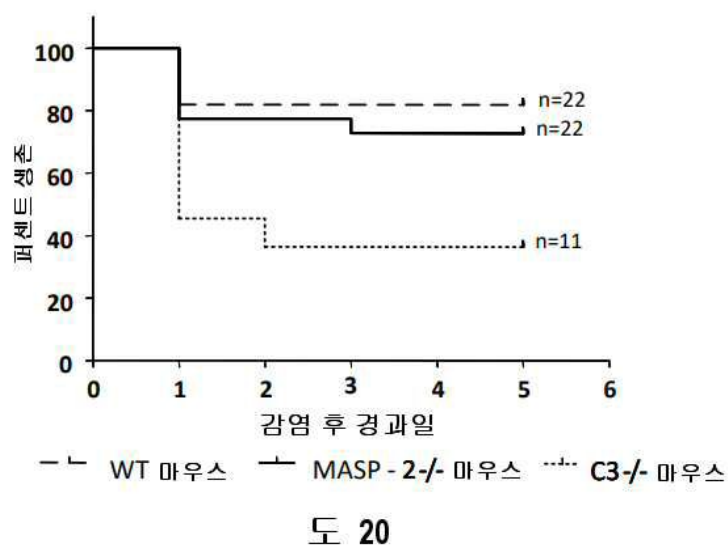
도면18



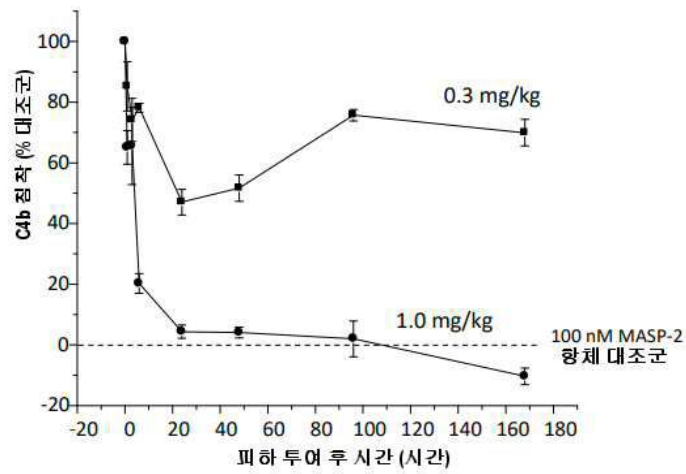
도면19



도면20

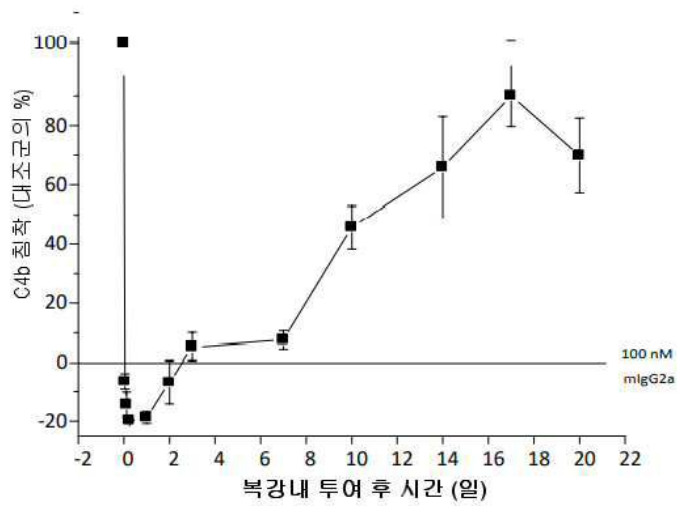


도면21



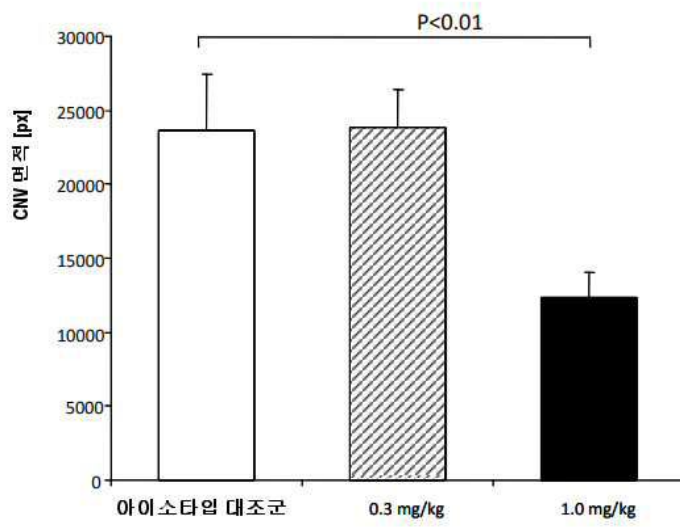
도 21

도면22



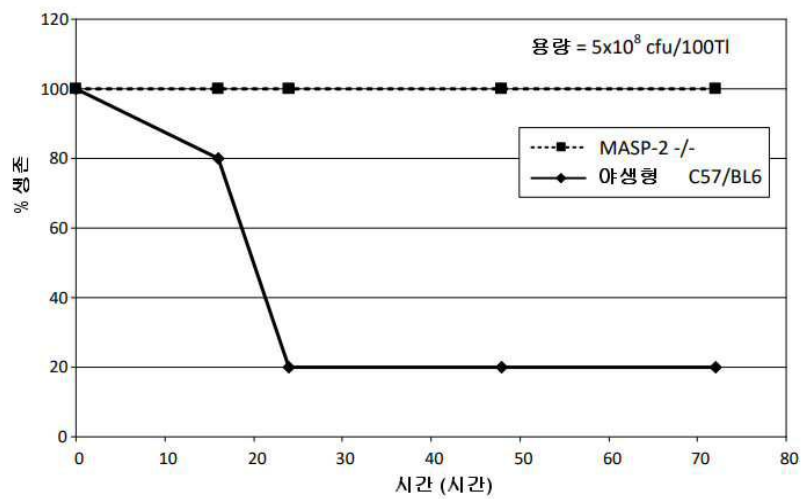
도 22

도면23



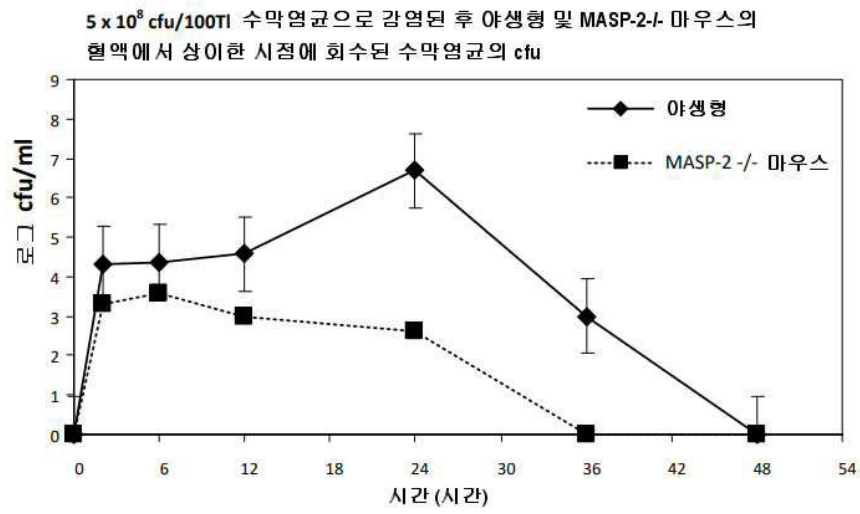
도 23

도면24a



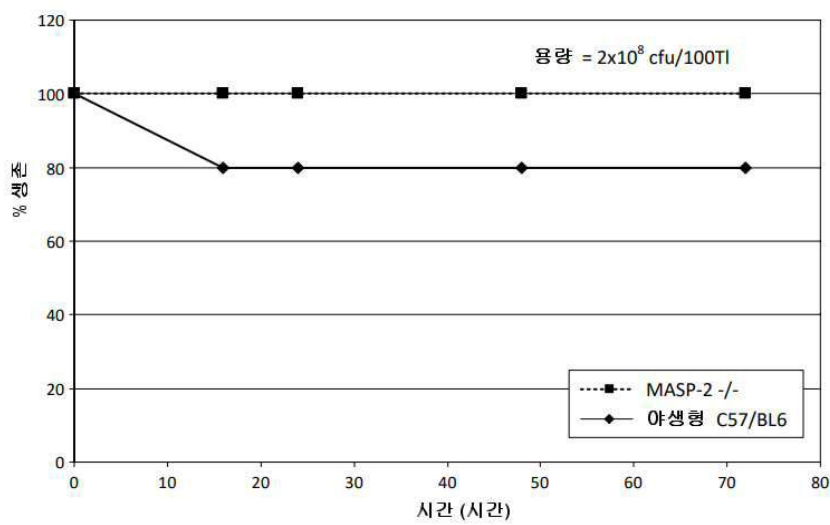
도 24A

도면24b



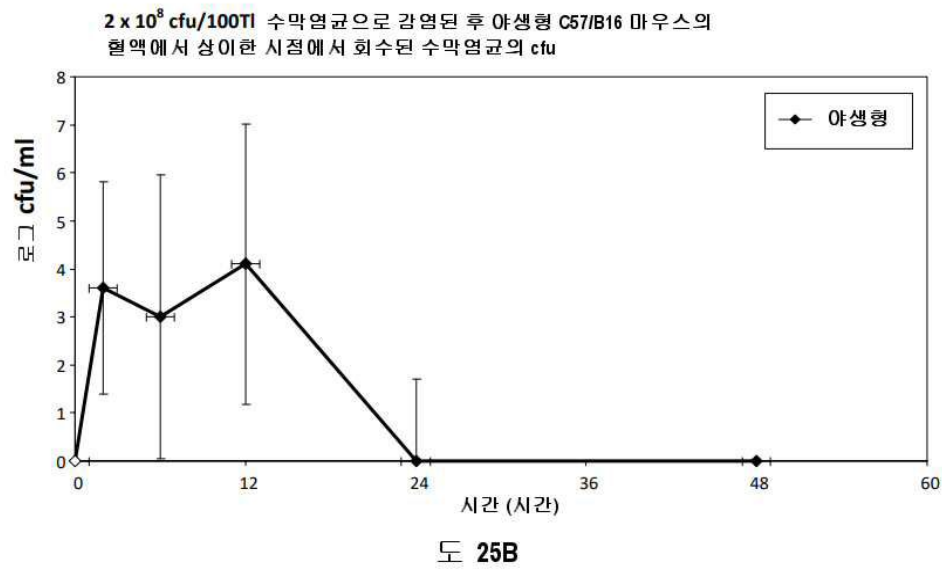
도 24b

도면25a

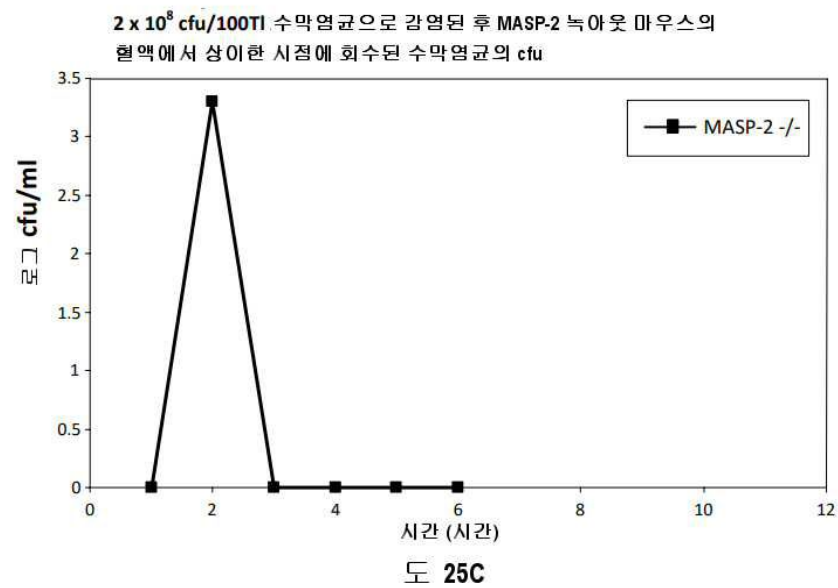


도 25A

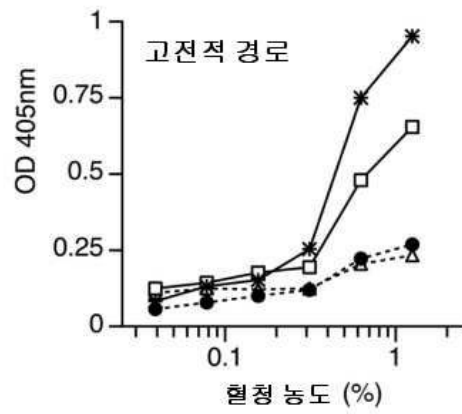
도면25b



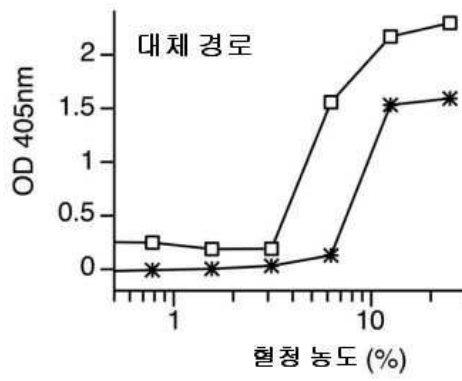
도면25c



도면26ab

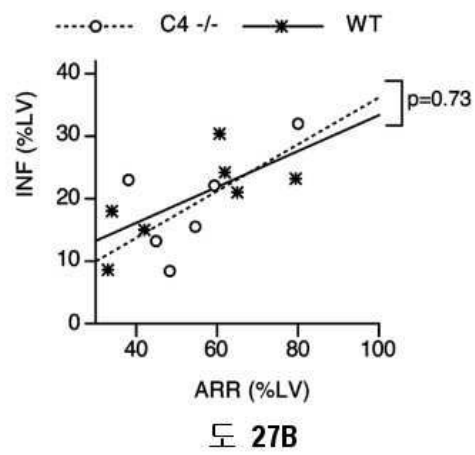
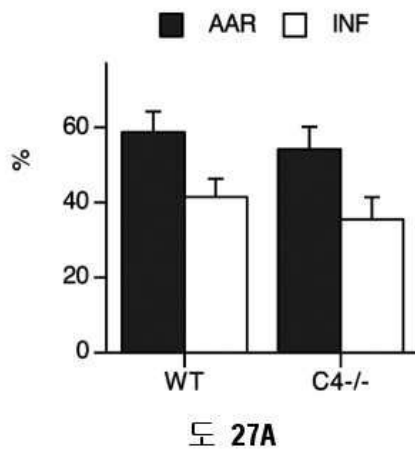


도 26A

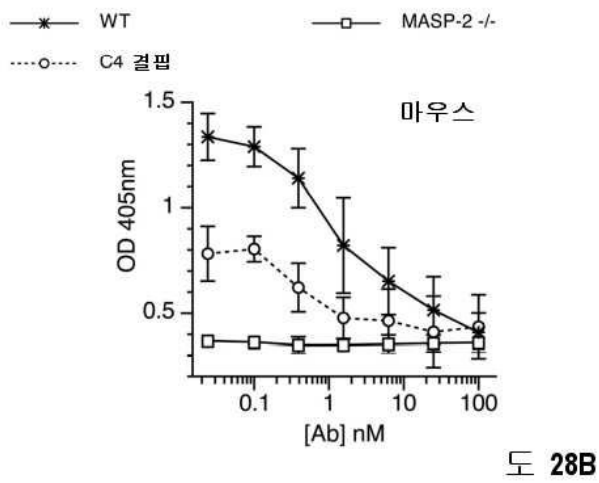
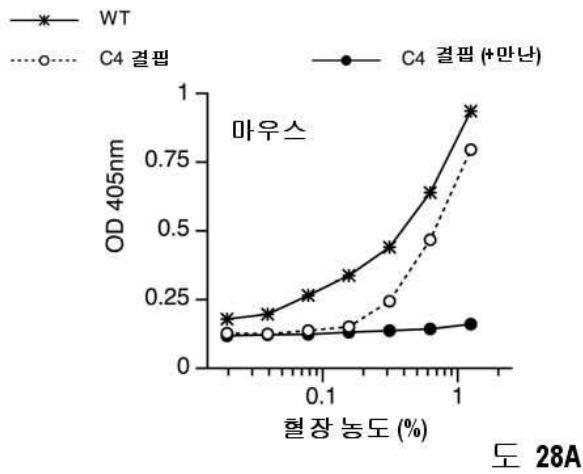


도 26B

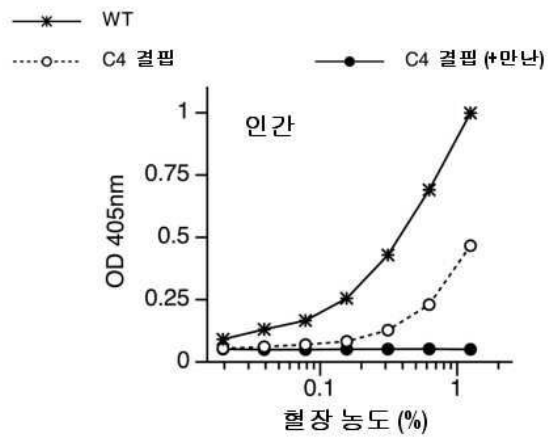
도면27ab



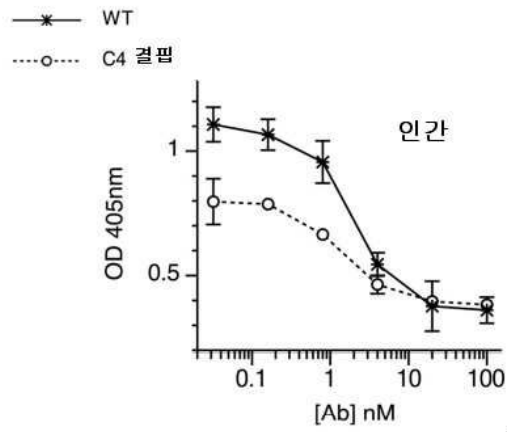
도면28ab



도면28cd

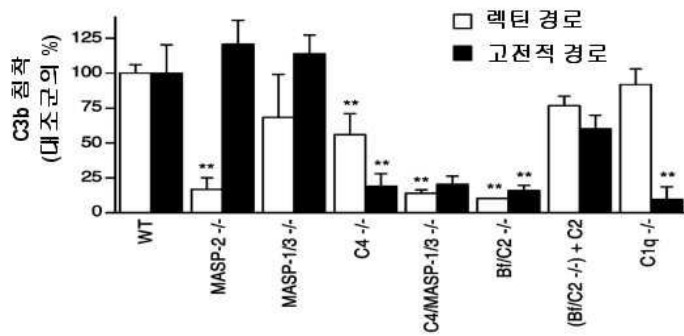


도 28C

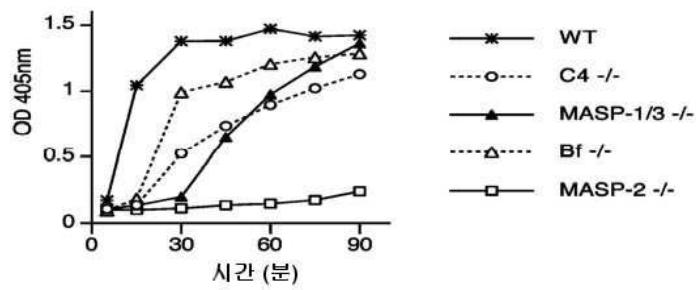


도 28D

도면29ab



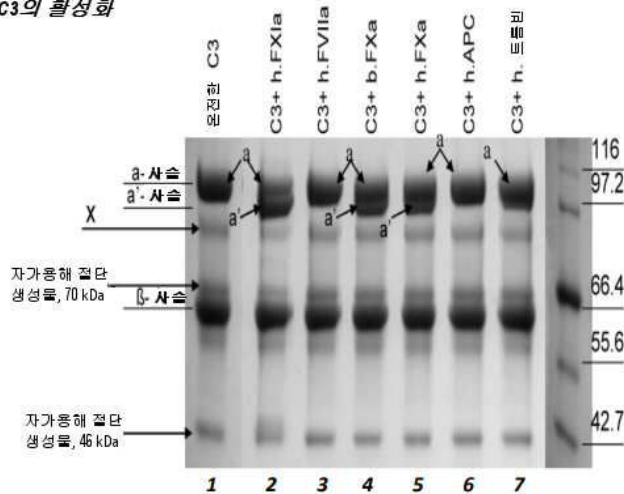
도 29A



도 29B

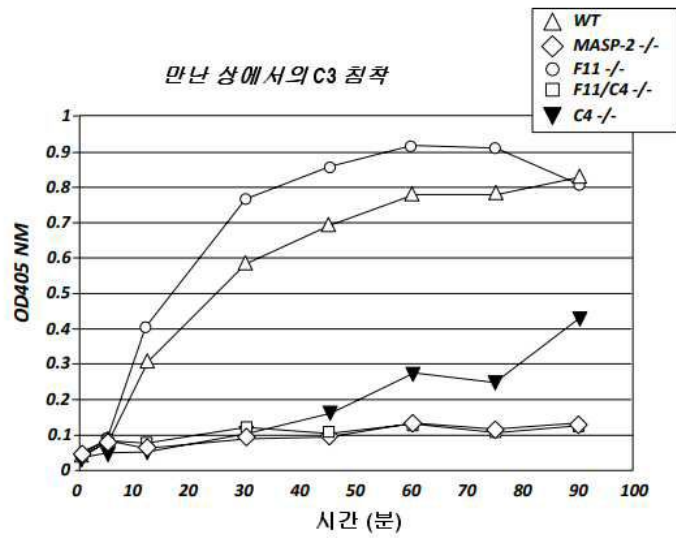
도면30

트롬빈 기질에 의한
C3의 활성화

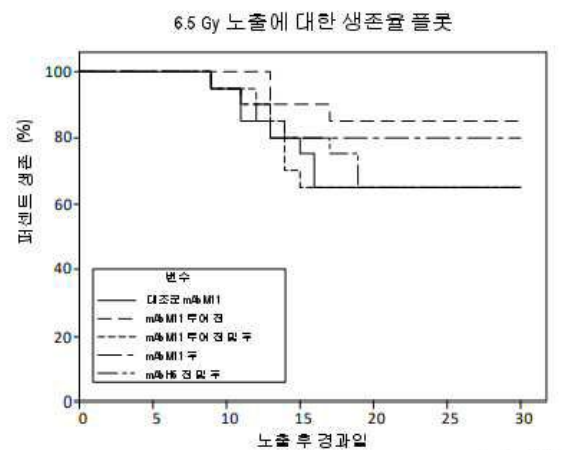
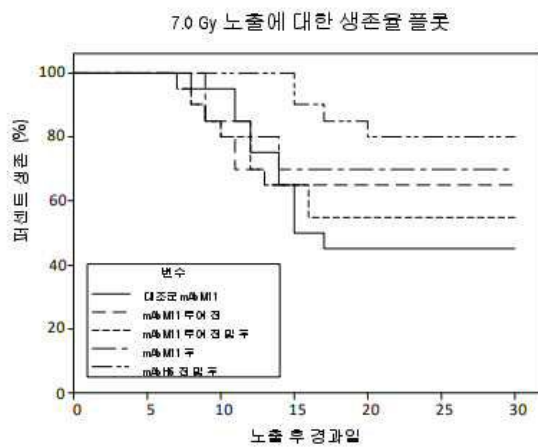


도 30

도면31

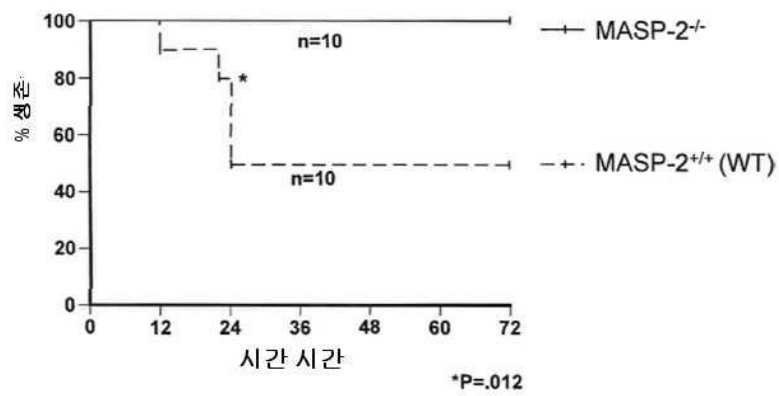


도면32ab



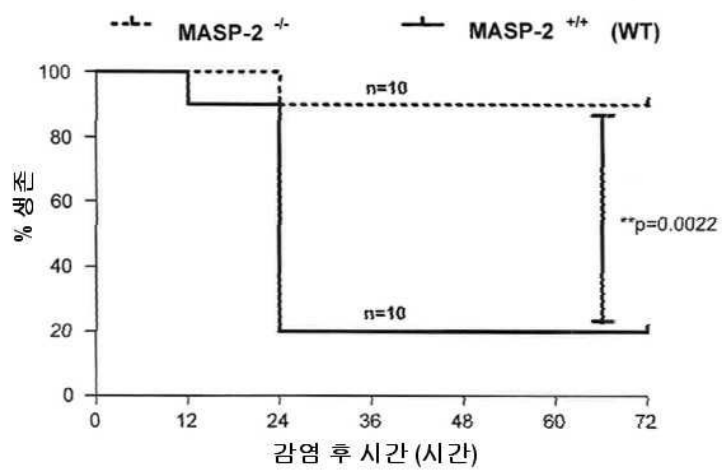
도면33

수막염균 혈청균 A Z2491 감염 후 생존율



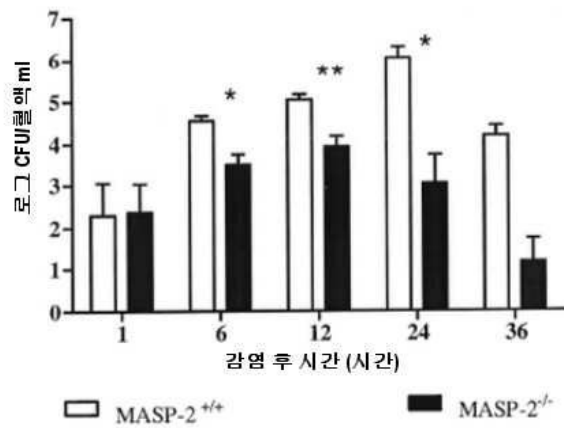
도 33

도면34



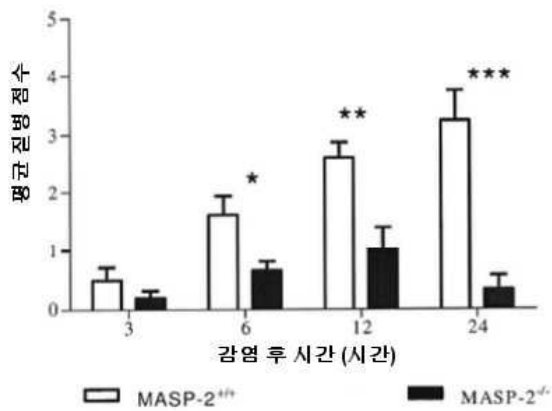
도 34

도면35



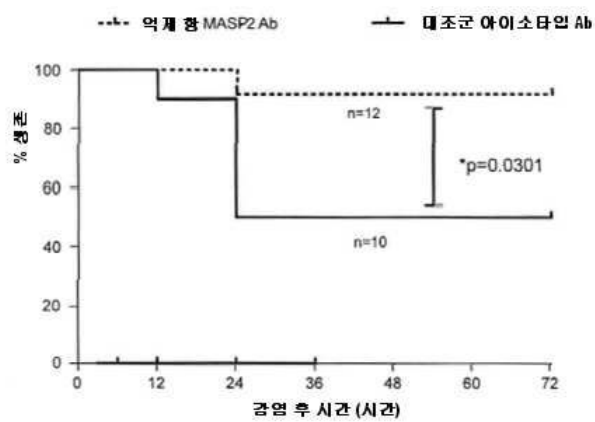
도 35

도면36



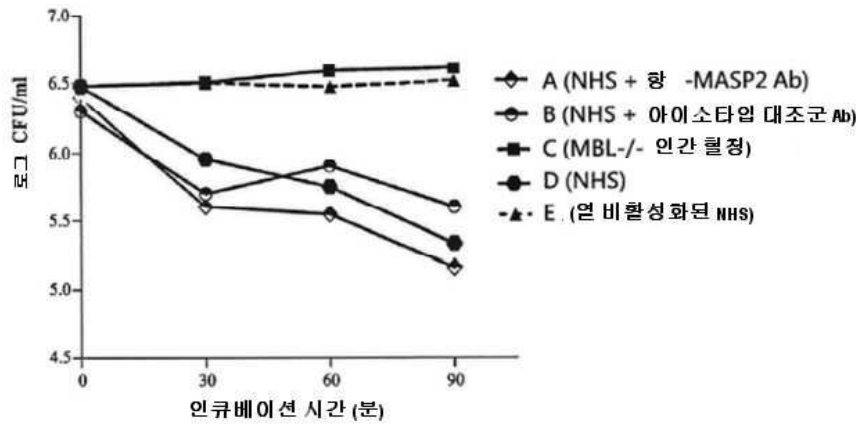
도 36

도면37



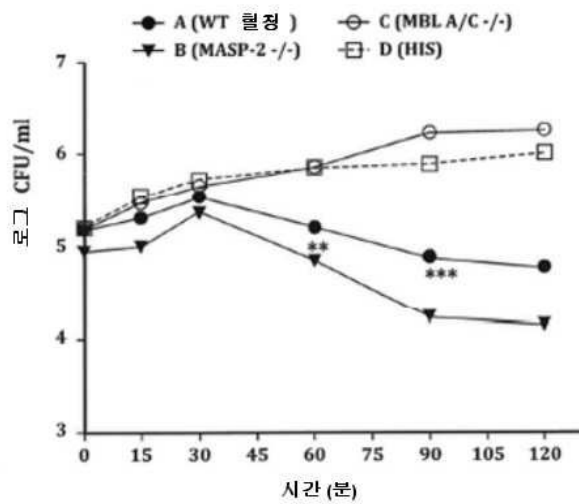
도 37

도면38



도 38

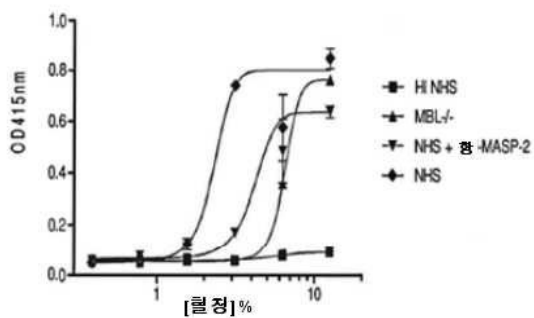
도면39



도 39

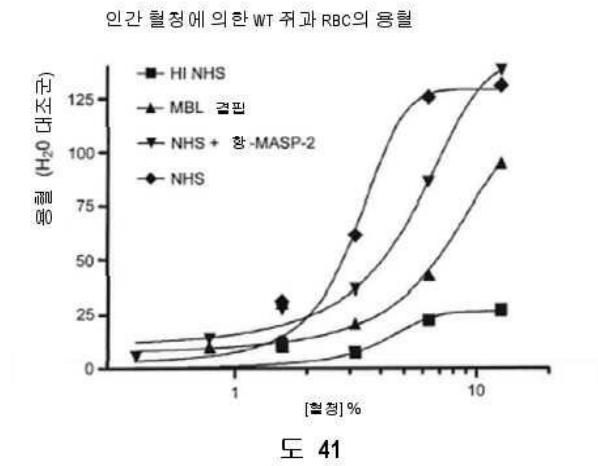
도면40

인간 혈청에 의한 만난-코팅된 쥐과 RBC의 용혈

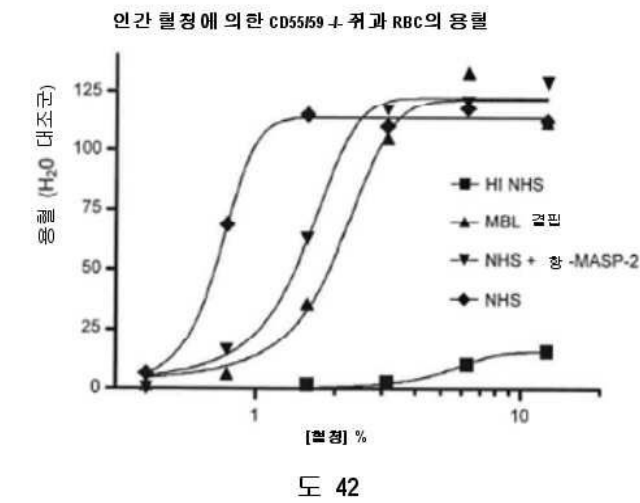


도 40

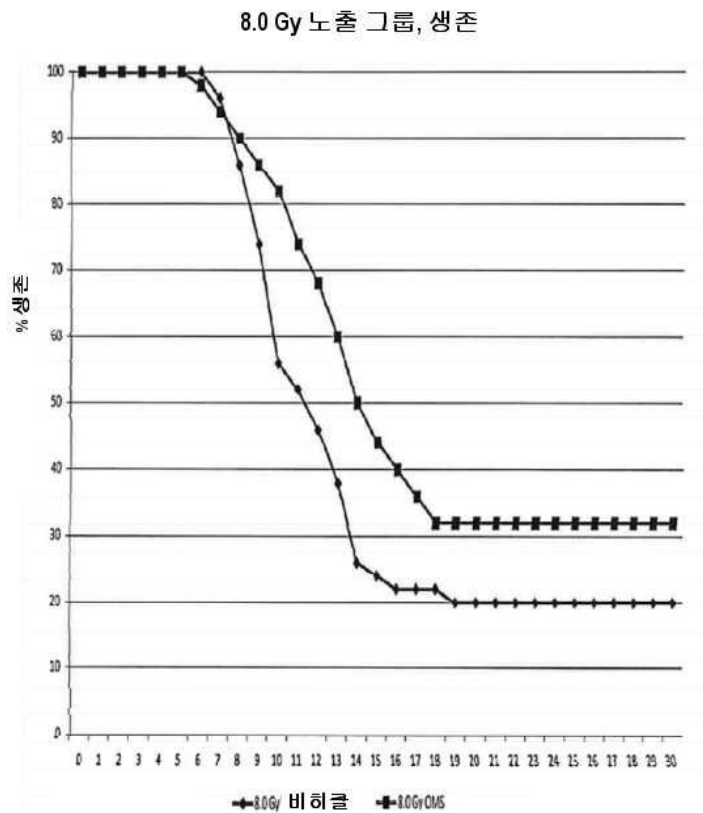
도면41



도면42

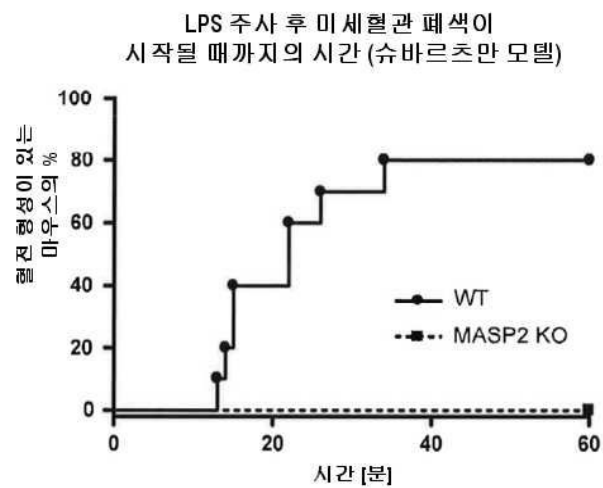


도면43



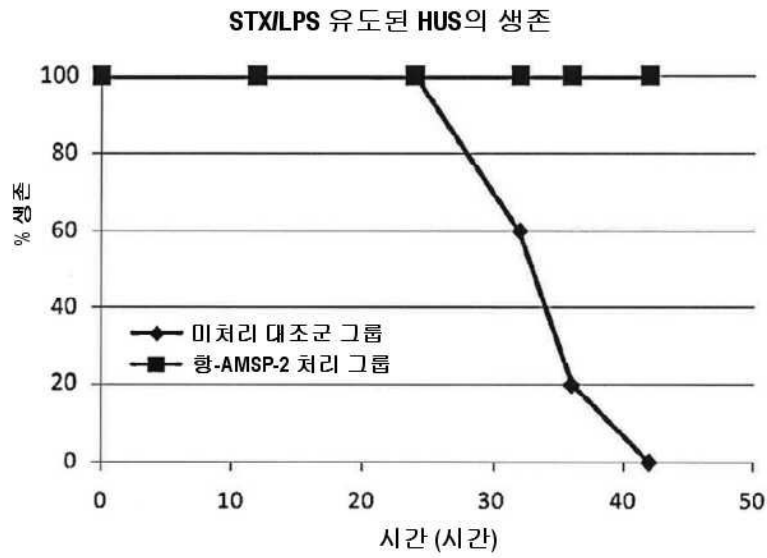
도 43

도면44



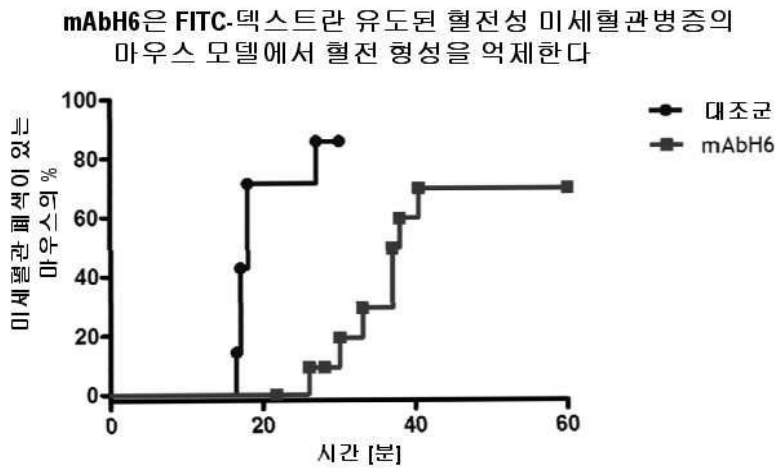
도 44

도면45



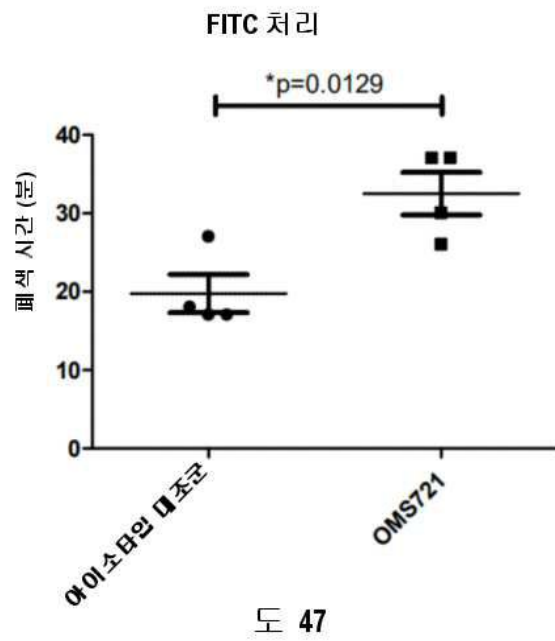
도 45

도면46

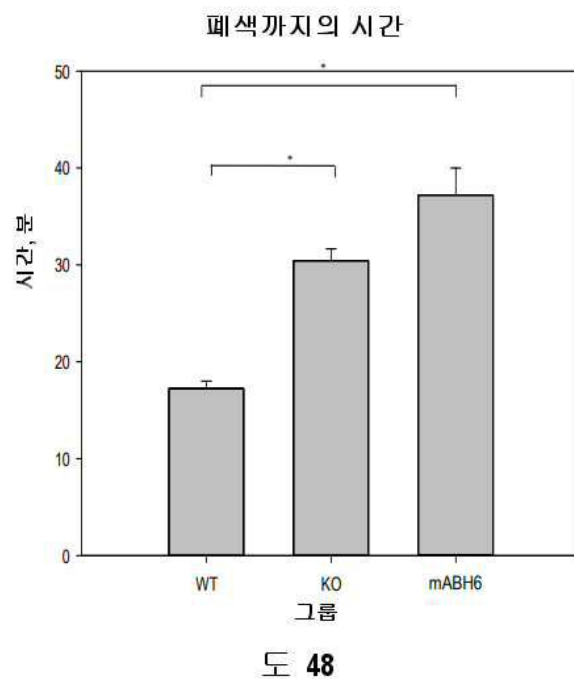


도 46

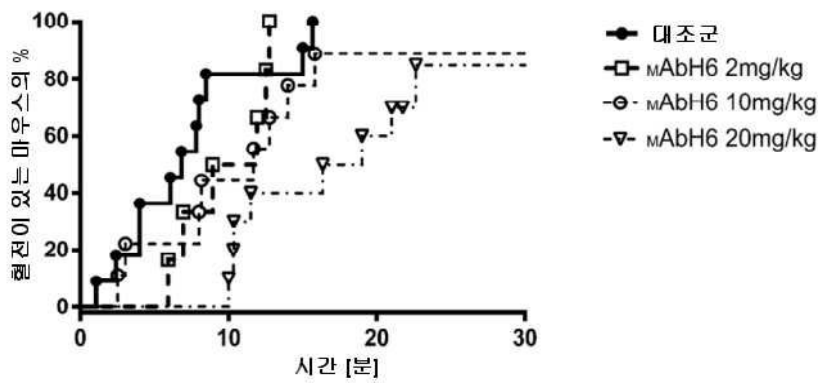
도면47



도면48

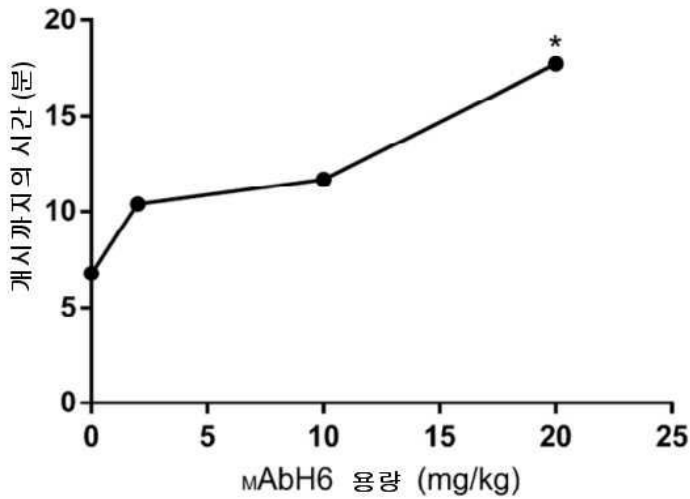


도면49



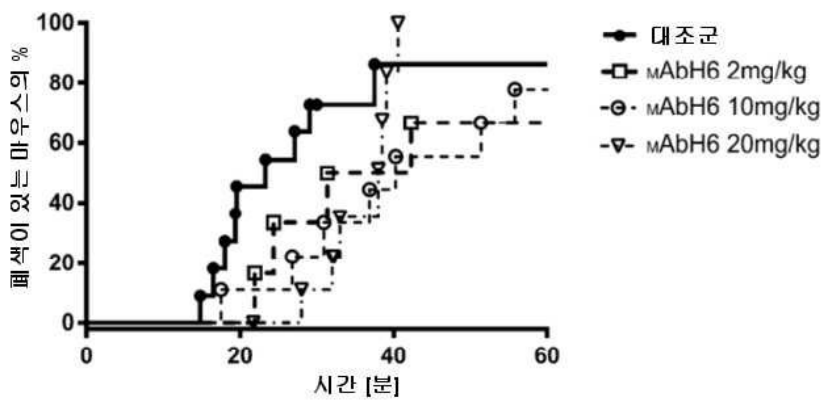
도 49

도면50



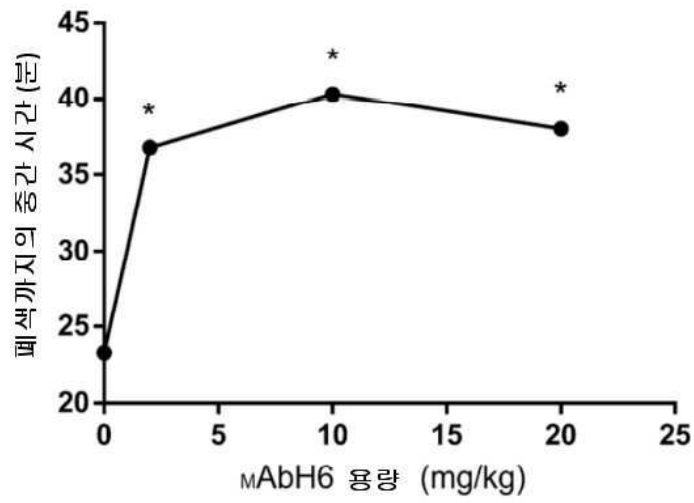
도 50

도면51



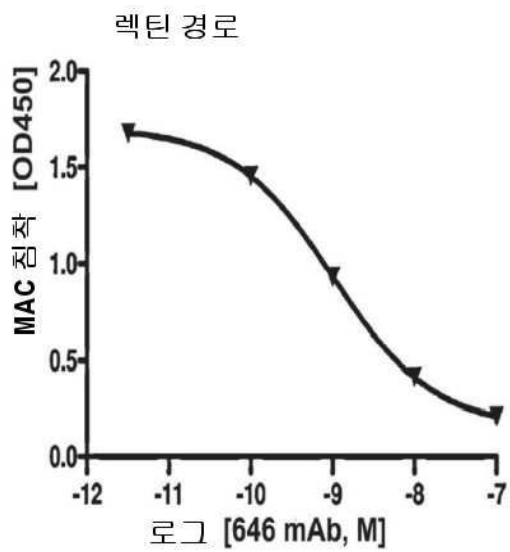
도 51

도면52



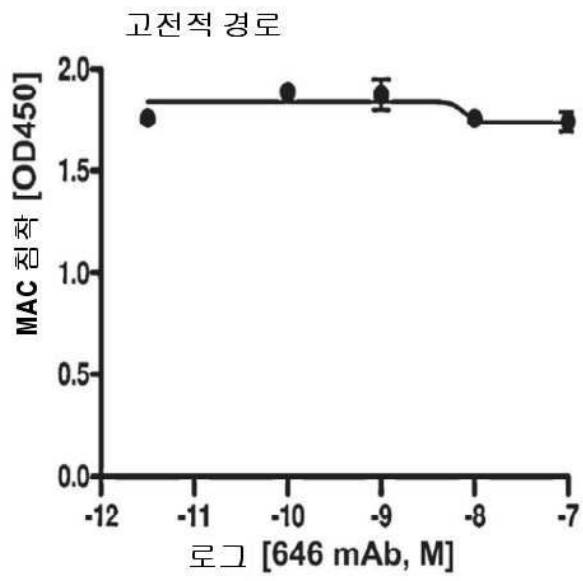
도 52

도면53a



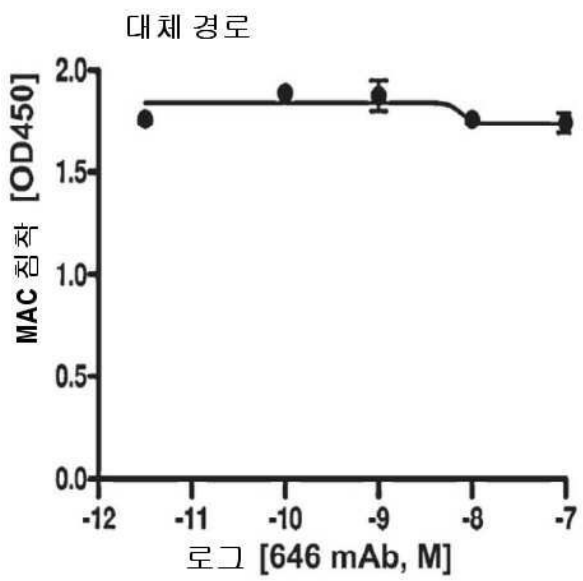
도 53A

도면53b



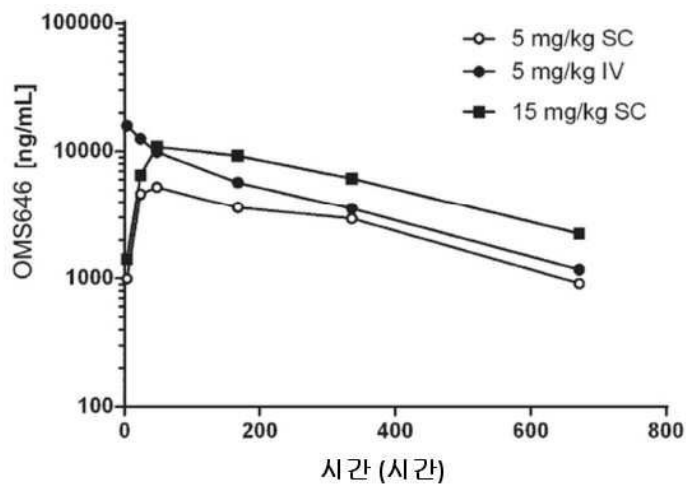
도 53B

도면53c



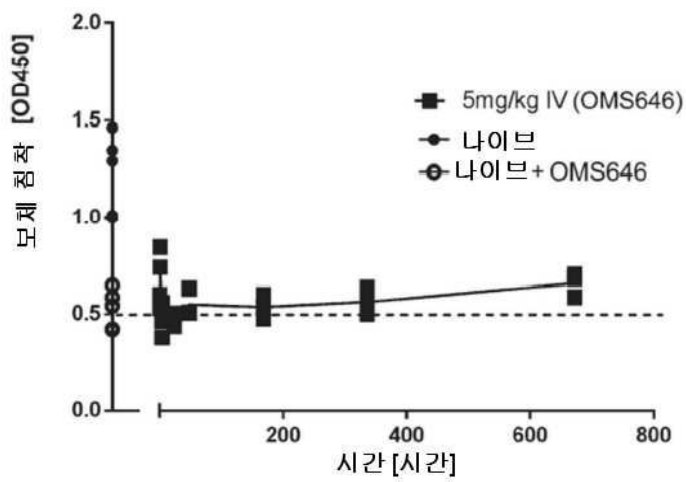
도 53C

도면54



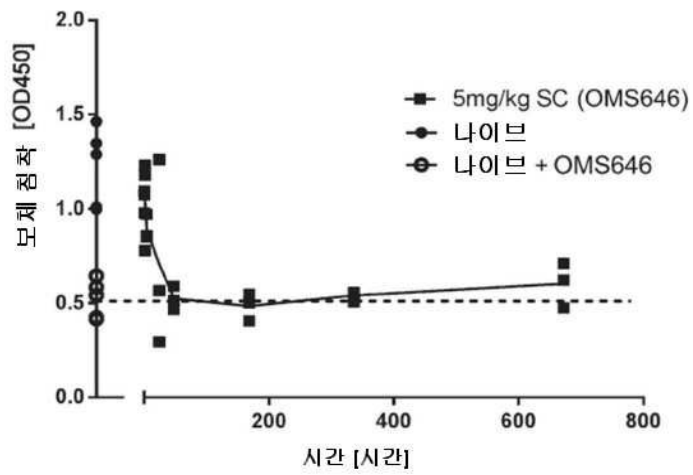
도 54

도면55a



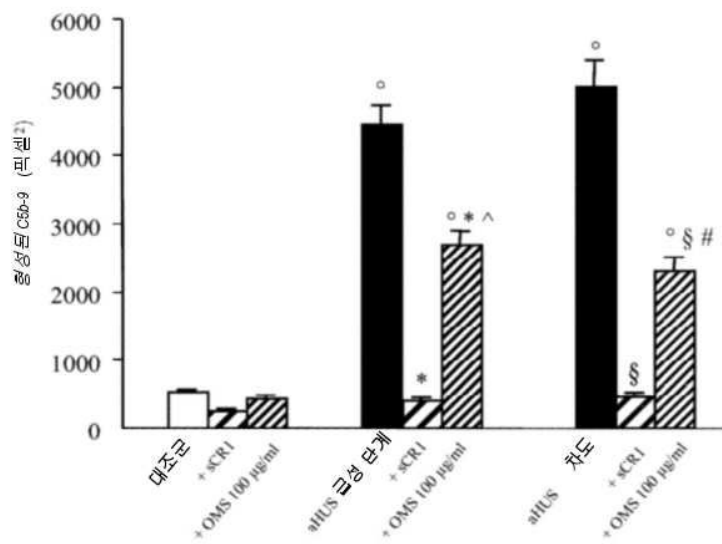
도 55A

도면55b



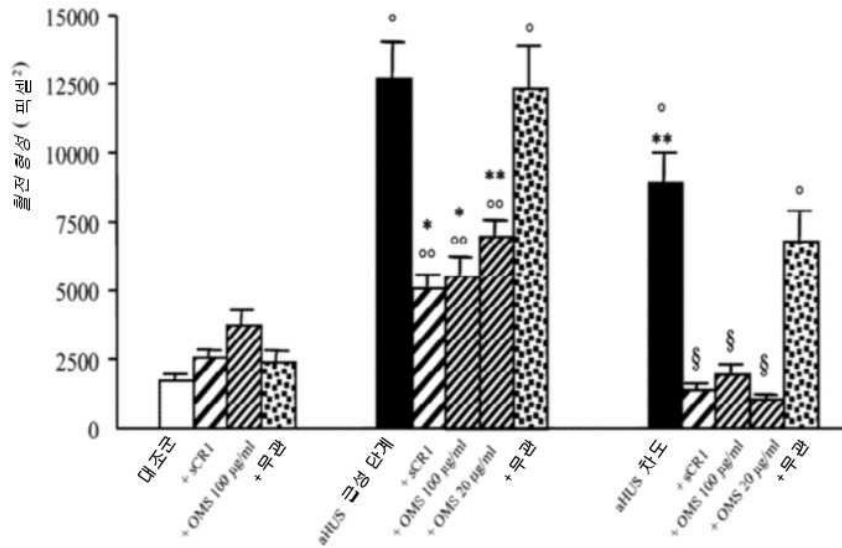
도 55B

도면56



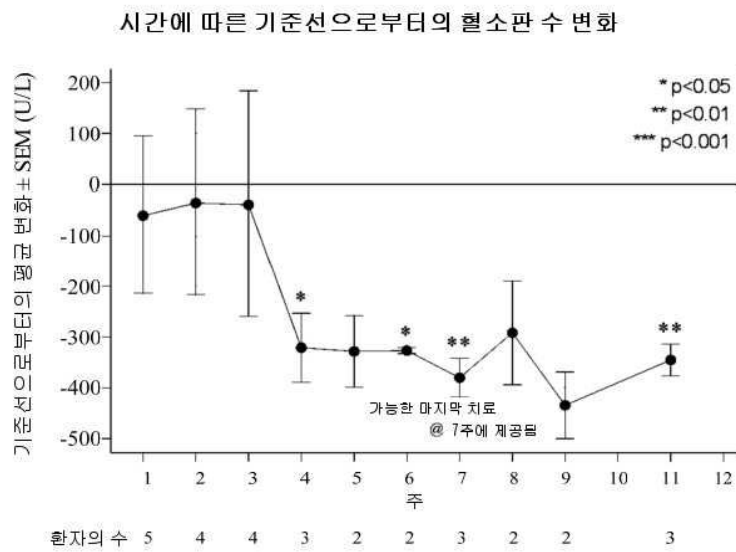
도 56

도면57



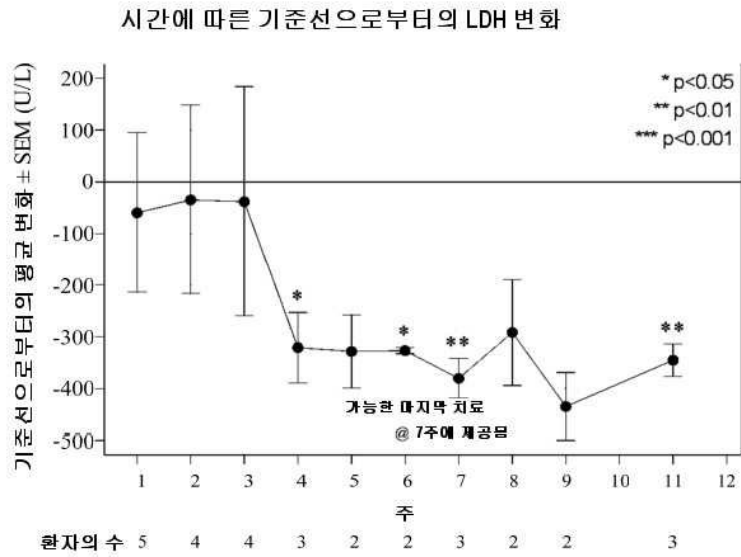
도 57

도면58



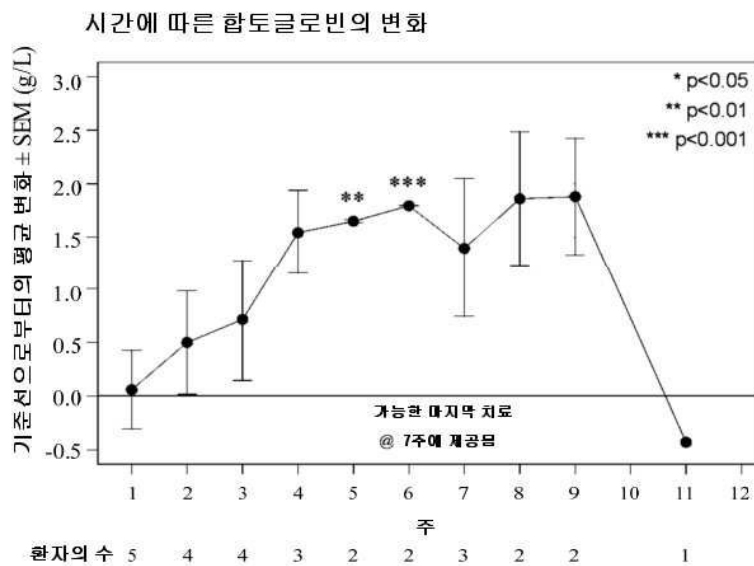
도 58

도면59



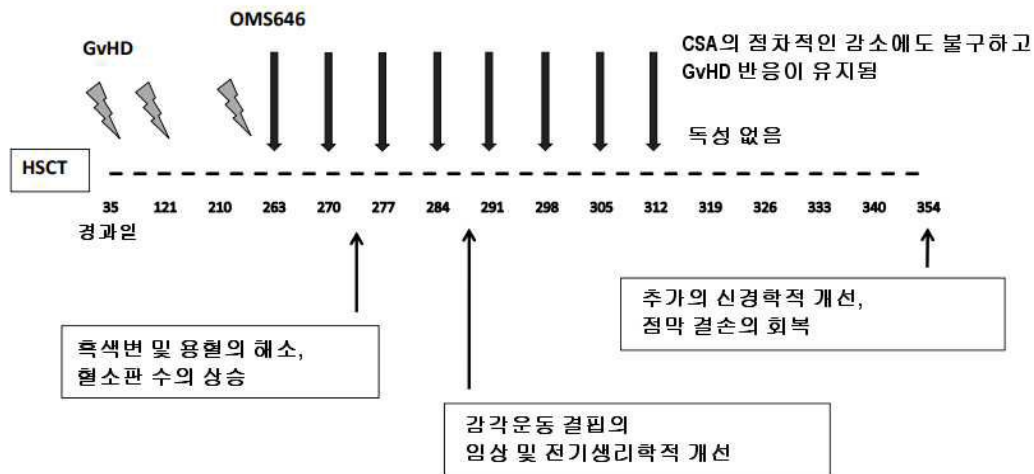
도 59

도면60



도 60

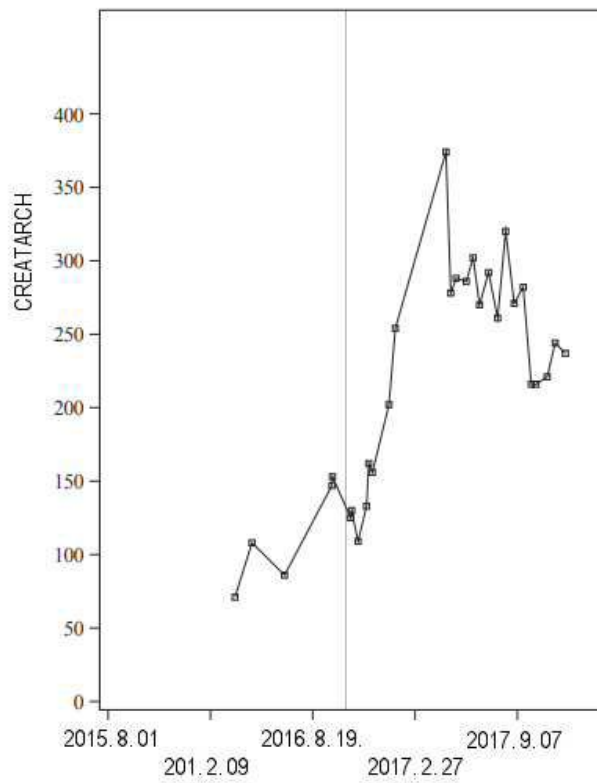
도면61



도 61

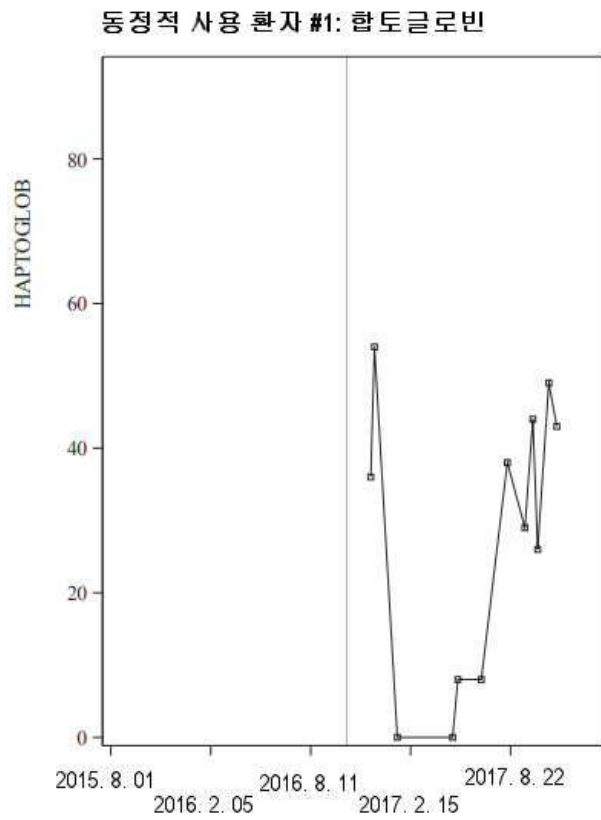
도면62a

동정적 사용 환자 #1: 크레아티닌



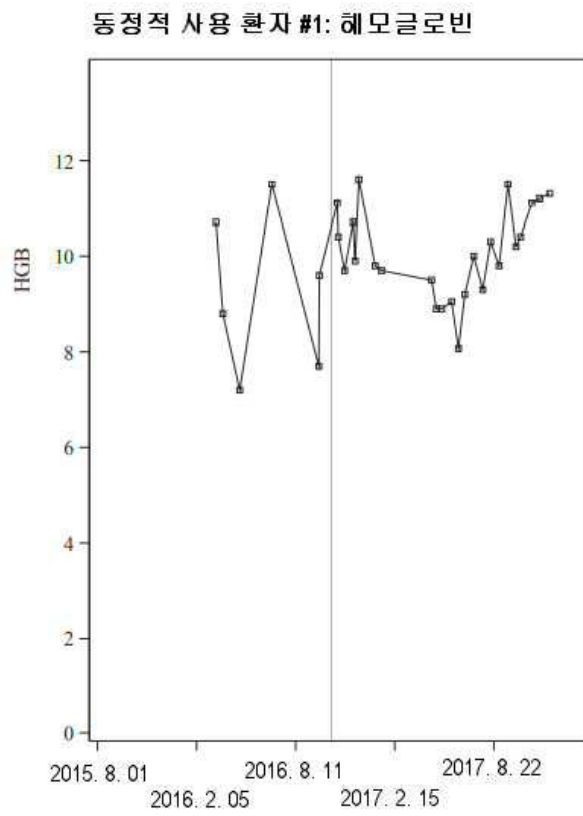
도 62A

도면62b



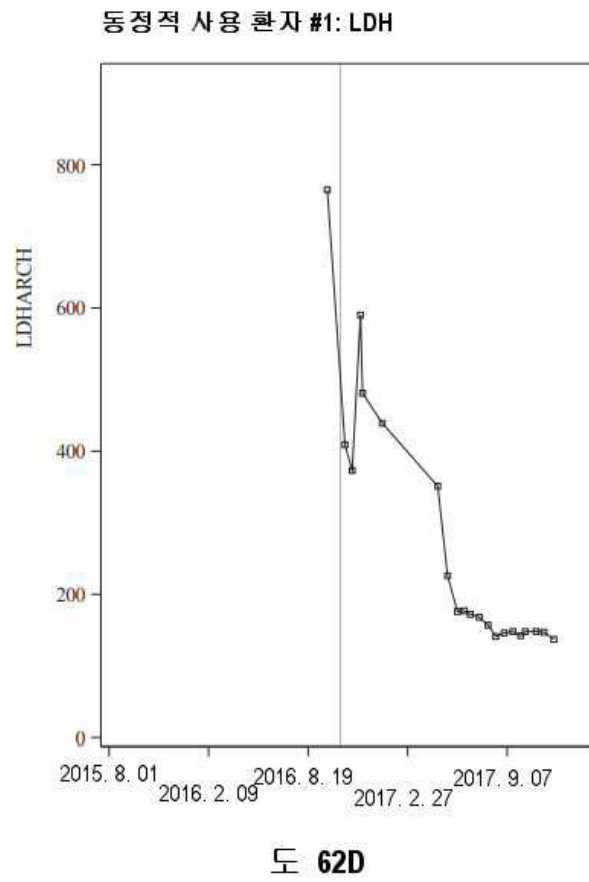
도 62B

도면62c

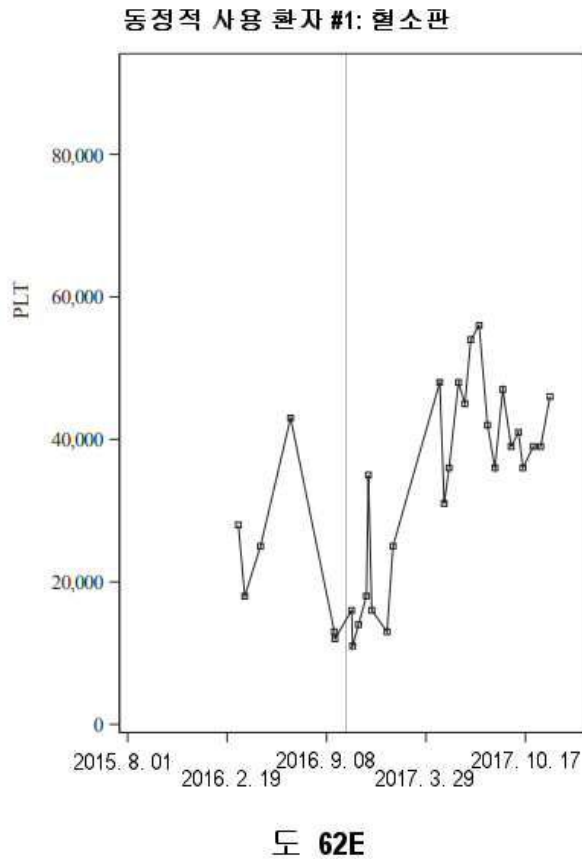


도 62C

도면62d



도면62e



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Omeros Corporation

Demopoulos, Gregory A.

Dudler, Thomas A.

<120> METHODS FOR TREATING AND/OR PREVENTING IDIOPATHIC PNEUMONIA SYNDROME (IPS) AND/OR CAPILLARY LEAK SYNDROME (CLS) AND/OR ENGRAFTMENT SYNDROME (ES) AND/OR FLUID OVERLOAD (FO) ASSOCIATED WITH HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANT

<130> MP.1.0307.PCT

<150> US 62/940,720

<151> 2019-11-26

<150> US 62/940,735

<151> 2019-11-26

<160> 71

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 725

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (27)..(584)

<400> 1

ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt 53

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu

1 5

ctg tgt ggc tgc gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct 101

Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro

10 15 20 25

gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat 149

Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn

30 35 40

gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg 197

Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu

45 50 55

cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag 245

Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu

60 65 70

tac gac ttc gtc aag ctg agc tgc ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg 293

Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu

75 80 85

tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act 341

Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr

90 95 100 105

ttc tac tgc ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac 389

Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr

110 115 120

tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag 437

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu
125 130 135

gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac 485
Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp
140 145 150

cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca 533
His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala
155 160 165

ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc etc 581

Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
170 175 180 185

tag cctccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc 634
tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggtgtgcc ccaactccca ttcaccacc 694
atggacccaa taataaacct ggccccaccc c 725

<210> 2
<211> 185
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr

1 5 10 15
Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30
Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45
Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60
Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser

65 70 75 80
Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

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

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

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val

130 135 140

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
180 185

<210> 3

<211> 170

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

1 5 10 15

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

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

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

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

65 70 75 80

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

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

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln

115	120	125	
Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His			
130	135	140	
Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg			
145	150	155	160
Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu			
165	170		
<210> 4			
<211> 2460			
<212> DNA			
<213> Homo sapiens			
<220><221> CDS			
<222> (22)..(2082)			
<400> 4			
ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg			51
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu			
1	5	10	
tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg			99
Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val			
15	20	25	
ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat gac			147
Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp			
30	35	40	
cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg cgc			195
Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg			
45	50	55	
ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag tac			243
Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr			
60	65	70	
gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc			291
Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys			

75	80	85	90	
ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc				339
Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe				
	95	100	105	
tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc				387
Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser				
	110	115	120	
aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac				435
Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp				
	125	130	135	
att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac				483
Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His				
	140	145	150	
cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc				531
His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly				
	155	160	165	170
tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc				579
Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly				
	175	180	185	
cag gtc ttc acc cag agg tct ggg gag ctc agc agc cct gaa tac cca				627
Gln Val Phe Thr Gln Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro				
	190	195	200	
cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag				675
Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu				
	205	210	215	
gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag				723
Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu				
	220	225	230	
aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca				771
Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr				
	235	240	245	250

gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg	819
Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg	
255 260 265	
att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa	867
Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu	
270 275 280	
tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag	915
Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln	
285 290 295	
cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg	963
Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val	
300 305 310	
caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act	1011
Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr	
315 320 325 330	
ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca	1059
Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala	
335 340 345	
gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc	1107
Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser	
350 355 360	
att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag	1155
Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu	
365 370 375	
tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac	1203
Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr	
380 385 390	
agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat	1251
Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr	
395 400 405 410	

gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca	1299
Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser	
415 420 425	
ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga	1347
Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly	
430 435 440	
ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg	1395
Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp	
445 450 455	
caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat	1443
Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr	
460 465 470	
gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat	1491
Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His	
475 480 485 490	
gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca	
Asp Ala Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser	1539
495 500 505	
cct cat tat aca caa gcc tgg tct gaa gct gtt ttt ata cat gaa ggt	1587
Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly	
510 515 520	
tat act cat gat gct ggc ttt gac aat gac ata gca ctg att aaa ttg	1635
Tyr Thr His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu	
525 530 535	
aat aac aaa gtt gta atc aat agc aac atc acg cct att tgt ctg cca	1683
Asn Asn Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro	
540 545 550	
aga aaa gaa gct gaa tcc ttt atg agg aca gat gac att gga act gca	1731
Arg Lys Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala	

555	560	565	570	
tct gga tgg gga tta acc caa agg ggt ttt ctt gct aga aat cta atg				1779
Ser Gly Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met				
	575	580	585	
tat gtc gac ata ccg att gtt gac cat caa aaa tgt act gct gca tat				1827
Tyr Val Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr				
	590	595	600	
gaa aag cca ccc tat cca agg gga agt gta act gct aac atg ctt tgt				1875
Glu Lys Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys				
	605	610	615	
gct ggc tta gaa agt ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga				1923
Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly				
	620	625	630	
ggg gca ctg gtg ttt cta gat agt gaa aca gag agg tgg ttt gtg gga				1971
Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly				
	635	640	645	650
gga ata gtg tcc tgg ggt tcc atg aat tgt ggg gaa gca ggt cag tat				2019
Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr				
	655	660	665	
gga gtc tac aca aaa gtt att aac tat att ccc tgg atc gag aac ata				2067
Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile				
	670	675	680	
att agt gat ttt taa ctgcgtgtc tgcagtcaag gattcttcat ttttagaaat				2122
Ile Ser Asp Phe				
	685			
gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg				2182
gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact				2242
tgccagttaa attccagcct taccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca				2302
gtcatctttg cccaccagc gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa				2362
gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg				2422
tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaa aaaaaaaaa				2460

<210> 5

<211> 686

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val

130 135 140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu

145 150 155 160

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 sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln

115 120 125

Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His

130 135 140

Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys

180 185 190

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

195 200 205

Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr

210 215 220

Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His

225 230 235 240
 Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser
 245 250 255
 Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr
 260 265 270
 Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro
 275 280 285
 Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile

 290 295 300
 Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu
 305 310 315 320
 Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp
 325 330 335
 Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly
 340 345 350
 Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro

 355 360 365
 Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr
 370 375 380
 Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp
 385 390 395 400
 Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu
 405 410 415
 Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly

 420 425 430
 Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu
 435 440 445
 Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu
 450 455 460
 Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu
 465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val

515 520 525

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu

530 535 540

Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe

610 615 620

Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp

625 630 635 640

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

645 650 655

Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe

660 665 670

<210> 7

<211> 4900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc 60

ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga 120

ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacacatg aggtaggtgg 180
 gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggt gggagcacag gcctgggcct caccgcccct 240
 gccctgcccc taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccaccccct 300
 taggccccaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atcccccggc ttccagggg 360
 agtatgccaa tgaccaggag cggcgtgga cctgactgc accccccggc taccgctgc 420

gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct ctgcgagtac gacttcgtca 480
 aggtgccgtc agacgggagg gctgggggtt ctgagggtcg gggggtcccc aaggagtagc 540
 cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggaggag atcaggcctg 600
 ggtcttgctt tcactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaggtgc 660
 tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt 720
 tctactcgtt gggtccagc ctggacatta cttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780
 cgttcacggg gticgaggcc ttctatgcag ccgagggtga gccaagaggg gtcctgcaac 840

atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900
 tcagtttccc caccittccc agggcagggg agaggcctct ggctgacat catccacaat 960
 gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtccaac tctgagccag 1020
 ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtac gcagggactg gccgggcgcg gcagctcacg 1080
 cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt 1140
 caaggccagc cagggaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200
 gggcgtggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactagga ggctgaggca ggagaattgc 1260

ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtga cagagattgc accactacac tccacctggg 1320
 cgacagacta gactccgtct caaaaaacaa aaaacaaaaa ccacgcaggc cggaggcccc 1380
 atttacaagc tgacaaagtg ggccctgcca gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440
 gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500
 tccttagaag ctgctgaag ggttcagcgc ttagccccg cccctgggt ttgattgact 1560
 cccctcatta gctgggtgac ctggccgga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620
 gatgtttgca tctttctccc agcgtgctg ggagcttgca gcgacctag gcctgtaagg 1680

tgattggccc ggcaccagtc cgcacccta gacaggacct aggcctctc tgaggctccac 1740
 tctgaggta tggtatctct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga 1800
 cggcctgcct ggccctgcct ctccccaga cattgacgag tgccaggtgg ccccgggaga 1860
 ggccccacc tgcgaccacc actgccacaa ccacctgggc ggtttctact gctcctgccg 1920
 cgcaggctac gtctgcacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgaggag gctgcctggg 1980

ccccaacgca ccctctcctg ggatacccg ggctcctcag ggccattgct gctctgcccc	2040
ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc	2100
cccttctcag cctgcttcc cctctcagca gccaggetca tcagtgccac cctgccctag	2160
cactgagact aattctaaca tccactgtg tacctgggtc cacctgggct ctgggaaccc	2220
ctcatgtagc cacgggagag tcggggatc tacctcgtt ccttggactg ggttctctgtt	2280
ccctgcactg ggggacgggc cagtgtctctg gggcgtgggc agccccacc tgtggcgtg	2340
accctgctcc ccgactcgg ttctctctct cggggtctct ccttgccctc ctgatctctc	2400
ttccagagca gagcctctag cctccctgg agctccggct gccagcagg tcagaagcca	2460
gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactccatt	2520
caccaccat ggaccaata ataaacctgg cccacccca cctgctgccg cgtgtctctg	2580
gggtgggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctct gcctaccctc ctcacagcct	2640
catgaacccc aggtctgtgg gagcctctc catggggcca cagggtcctt ggccctaccc	2700
cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgtc gagtccaggt	2760
ccccagagc tgagccaga gtaatcttga accacccca ttcagggtct ggccctggagg	2820
agcctgaccc acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtcccc	2880
gcaaattccag ggtgatcc cactgcccc taggcacagc cacttggaag aaggcaggca	2940
atgttggggc tctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgccccca ctgcagctgg	3000
gggtggggtg gtggtatggg atggggacca agccttcctt gaaggataga gccagccca	3060
acacccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc	3120
agtcatgac acigtgtcct tgaacttcca agaacagccc cagggcaagg gtcaaacag	3180
gggaaagggg gtgatgagag atcttcttc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg	3240
ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg	3300
tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggcctcagg agatgtcct	3360
ctcttttccc gaattcccag ggaccagga gagtgtccct tcttctctt cctgtgtgtc	3420
catccacccc cgccccgc cctggcagag ctggtggaac tcagtgtct agcccctacc	3480
ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgtccc tgggggtgtg agtgagggcc	3540
tgtgcgtcc atcccagtg ctgctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc	3600
ctctctaagc ggccctcag ccatcgggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggccctcagg	3660
gctggccacc tgcagggcc agcccaacc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg	3720

tcccagtttc ctgctcccca aggcatccac cctgctgttg gtgcgagggc tgatagaggg 3780

cacgccaagt cactcccttg ccttccctc cttccagccc tgtgtccgg ccaggtcttc 3840

accagaggt ctggggagct cagcagccct gaataccac ggccgtatcc caaactctcc 3900

agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960

tccttcgatg tggagacaca cctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg 4020

ctctggggcc cctcatcttg tcccagatcc tccccctca gccagctgc acccctact 4080

tcctgcagca tggccccac caggttcccg tcacctcgg tgacccacc tcttcaggtg 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 aaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga 4440

ccacacaggc tggaagatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg 4500

tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgtg gggctcttct 4560

gggcaggact aggaaggac accaggttta gtggtgtctga ggtctgaggc agcagcttct 4620

aagggaagc acccgtgcc tctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680

ccaccattc acccatcact catcttttac ccaccaccc ttgccaactc atccttctgt 4740

ccctcactc tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaacat 4800

ccaccattc ttctacctac ccatcctatc catccactc tctatcagca tctttctacc 4860

accatcctt cgttcggtca tccatcatca tccatccatc 4900

<210> 8

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60
Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80
Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95
Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110
Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
130 135

<210> 9

<211> 181

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15
Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30
Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45
Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60
Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80
Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95
Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110

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

115

120

125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val

130

135

140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu

145

150

155

160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn

165

170

175

Lys Arg Thr Cys Ser

180

<210

> 10

<211> 293

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130 135 140
Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
145 150 155 160
Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
165 170 175
Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg
180 185 190
Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu
195 200 205
Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile
210 215 220
Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu
225 230 235 240
Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly
245 250 255
Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn
260 265 270
Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly
275 280 285
Trp Lys Ile His Tyr
290
<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11
Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys
1 5 10 15
Asp His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg
20 25 30
Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys

35 40

<210> 12

<211> 242

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala

35 40 45

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

50 55 60

Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr

65 70 75 80

His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn

85 90 95

Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys

100 105 110

Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala

180 185 190

Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile

195 200 205

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

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

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<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

<400> 14

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

<210> 15

<211> 43

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

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

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

Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln

35

40

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn

1

5

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<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 Sequence

<220><223> Synthetic

<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

<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 sapiens

<220><221> CDS

<222> (51)..(797)

<400> 20

attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56

Met Ser

1

ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct 104

Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser

5 10 15

tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca 152

Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala

20 25 30

gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat 200

Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp

35 40 45 50

ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc 248

Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu

55 60 65

aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca 296

Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro

70 75 80

ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga 344

Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly

85	90	95	
aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct			392
Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala			
100	105	110	
ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctc acc ttc tct ctg			440
Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu			
115	120	125	130
ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg			488
Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met			
135	140	145	
acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg			536
Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val			
150	155	160	
gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc			584
Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile			
165	170	175	
aag gag gaa gcc ttc ctg ggc atc act gat gag aag aca gaa ggg cag			632
Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln			
180	185	190	
ttt gtg gat ctg aca gga aat aga ctg acc tac aca aac tgg aac gag			680
Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu			
195	200	205	210
ggt gaa ccc aac aat gct ggt tct gat gaa gat tgt gta ttg cta ctg			728
Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu			
215	220	225	
aaa aat ggc cag tgg aat gac gtc ccc tgc tcc acc tcc cat ctg gcc			776
Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His Leu Ala			
230	235	240	
gtc tgt gag ttc cct atc tga agggatcatat cactcaggcc ctccctgtct			827
Val Cys Glu Phe Pro Ile			
245			

ttttactgca acccacaggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc 887
 atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca 947
 aagcaataat agt 960

<210> 21

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala

1 5 10 15

Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys

20 25 30

Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly

35 40 45

Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln

50 55 60

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly

65 70 75 80

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

<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

<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

<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

<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

<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

<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

<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

<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 sapiens
 <400> 30
 atgaggtgc tgacctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc ctgggccc 60
 aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120
 aatgaccagg agcggcgctg gacctgact gcacccccg gctaccgcct gcgcctctac 180
 ttcacccact tcgacctgga gctctccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240
 tcggggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc 300

 cctggcaagg acactttcta ctgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgtccgac 360
 tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420
 gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg 480
 ggcggtttct actgtcctg ccgcgcaggc tacgtctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540
 tcagccctgt gctccggcc 559
 <210> 31
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 31
 cgggcacacc atgaggtgc tgacctcct gggc 34

 <210> 32
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 32
 gacattacct tccgtccga ctccaacgag aag 33
 <210> 33
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

agcagccctg aatacccacg gccgtatccc aaa 33

<210> 34

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

cgggatccat gaggctgctg accctc 26

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

ggaattccta ggctgcata 19

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

ggaattccta caggcgct 19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

ggaattccta gtagtggat 19

<210> 38

<211> 25

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 38
 tgcggccgct gtaggtgctg tcttt 25
 <210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 39
 ggaattcact cgttattctc gga 23
 <210> 40
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 40
 tccgagaata acgagtg 17

 <210> 41
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 41
 cattgaaagc ttggggtag aagttgttc 29
 <210> 42
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 42
 cgcgccgca gctgctcaga gtgtaga 27
 <210> 43

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 43
 cggtaaagctt cactggctca gggaaata 28

<210> 44
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 44
 aagaagcttg ccgccacat ggattggctg tggaact 37

<210> 45
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 45
 cgggatactc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 46
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 46
 aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

<210> 47
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 47

cgggacccctt ctccctctaa cactct	26
<210> 48	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 48	
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His	
1 5	
<210> 49	
<211> 4960	
<212> DNA	
<213> Homo Sapiens	
<400> 49	
ccggacgtgg tggcgcacgc ctgtaatccc agctactcgg gaggtgagg caggagaatt	60
gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag	120
gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacaggga	180
gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac	240
aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga	300
agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt	360
tttttttttt tttaggttgg agtctcactc tgcgtccag gctggagtgc agtgggtcga	420
tctcgatca ctgcaacctc cgcctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc	480
gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttga tttttagtag	540
agatgggatt tcacatgtt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccacc	600
accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg	660
acttctaagc ctgcaaggga atcgggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta	720
agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggtcacac ctgtaatccc agcactttgg	780
gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttaa gaccagcctg accaacaatgg	840
agaaacccca tcctaccaa aaataaaaaa ttaggcaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa	900
tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc	960
agtgagctat gattgcagca ctgcaatgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa	1020
agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gtttcaggc tgttgttacc taggtccgac	1080

tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcatg	1140
gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tctactggaca	1200
aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc	1260
acaccatgag gtaggtgggc gccacagcc tccttcaggg gtgtgggggtg ggagcacagg	1320
cctgggccct caccgccct gccctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg	1380
tggtcgggtg gccacccct tgggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc	1440
atccccggc tttccagggg agtatgcaa tgaccaggag cggcgttgga ccctgactgc	1500
acccccggc taccgctgc gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct	1560
ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctgggggtt tctcagggtc	1620
gggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg	1680
ccaggaggga gatcaggcct gggtcttggc ttcactccct gtgacacctg accccacagc	1740
tgagctcggg ggccaagggtg ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc	1800
ggggcccttg caaggacact ttctactgc tgggtccag cctggacatt accttccgt	1860
ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcaggc cttctatgca gccgagggtg	1920
agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc	1980
ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccaccttcc cagggcaggg gagaggcctc	2040
tggcctgaca tcatccaca tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc	2100
tgagtccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact	2160
ggccgggggc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga	2220
tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact	2280
aaaactacaa aaattagctg ggcgtgggtg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag	2340
gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca	2400
ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa	2460
acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaaag tggggccctg ccagcgggag	2520
cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccttcag agaccaactg tgtgacctct	2580
ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc	2640
cccgccccct gggtttgatt gactccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg	2700
aaactccac tggtttaaca gaggtagtgt ttgcatcttt ctcccagcgc tgctgggagc	2760
ttgcagcgac cctaggcctg taagtgatt ggcccggcac cagtcccga ccctagacag	2820
gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcatggatc tcctgggagg agtccaggct	2880
ggatcccgcc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctccc cagacattga	2940

cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct	3000
gggcgggtttc tactgtctct gccgcgcagg ctacgtcttg caccgtaaca agcgcacctg	3060
ctcagccctg tgcctcggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga	3120
ataccacagg ccgtatccca aactctccag ttgcacttac agcatcagcc tggaggaggg	3180
gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc ctctgatgtg gagacacacc ctgaaacctt	3240
gtgtccctac gacttttca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg	3300
gaagacattg cccacagga ttgaacaaa aagcaacacg gtgacatca cttttgtcac	3360
agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgttg	3420
cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatct	3480
gaaagacagc ttctccatct ttctgcgagc tggtatgag cttctgcaag gtcacttgcc	3540
cctgaaatcc ttactcagc ttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgccgc	3600
gtgcagcatt gtgactgtg gccctcctga tgatctacc agtggccgag tggagtacat	3660
cacaggtcct ggagtgaaca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt	3720
ctacacaatg aaagtgaatg atggtaataa tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag	3780
ctccaaagga gaaaaatcac tccagctctg tgagcctgtt tgtggactat cagcccgac	3840
aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaacct ggtgattttc cttggcaagt	3900
cctgatatta ggiggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac	3960
agctgtctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc gccctggaca ttcgaatggg	4020
cacctgaaa agactatcac ctattatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca	4080
tgaagttat acicatgatg ctggctttga caatgacata gcactgatta aattgaataa	4140
caaagtgtga atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc	4200
ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaaccc aaaggggttt	4260
tcttctaga aatctaagt atgtcgacat accgattgtt gaccatcaa aatgtactgc	4320
tgcatatgaa aagccacct atccaagggg aagtgtact gctaacatgc tttgtgctgg	4380
cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tgggttttct	4440
agatagttaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctggggtt ccatgaattg	4500
tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagtatt aactatatc cctggatcga	4560
gaacataatt agtgattttt aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc attttagaa	4620
atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca	4680

tggcagttgt tgctccaccc aaaaaaacag actccagggtg aggctgctgt catttctcca 4740

 ctgcccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga 4800
 cagtcatctt tgcccaccca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttacctaaa 4860
 aagccagtct cttttcatat tggctgttgg catttctgta aactgcctgt ccatgctctt 4920
 tgtttttaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 4960
 <210> 50
 <211> 2090
 <212> DNA
 <213> Murine
 <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 catttat tgc cac aac tac ttg ggc ggc tac tat tgc tcc tgc	533
Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys	
155 160 165	
aga gcg ggc tac att ctc cac cag aac aag cac acg tgc tca gcc ctt	581
Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu	
170 175 180	
tgt tca ggc cag gtg ttc aca gga aga tct ggg tat ctc agt agc cct	629
Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro	
185 190 195	
gag tac ccg cag cca tac ccc aag ctc tcc agc tgc acc tac agc atc	677
Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile	
200 205 210 215	
cgc ctg gag gac ggc ttc agt gtc atc ctg gac ttc gtg gag tcc ttc	725
Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe	
220 225 230	
gat gtg gag acg cac cct gaa gcc cag tgc ccc tat gac tcc ctc aag	773
Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys	
235 240 245	
att caa aca gac aag ggg gaa cac ggc cca ttt tgt ggg aag acg ctg	821
Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu	

250	255	260	
cct ccc agg att gaa act gac agc cac aag gtg acc atc acc ttt gcc			869
Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala			
265	270	275	
act gac gag tcg ggg aac cac aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc			917
Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser			
280	285	290	295
aca gca cgg ccc tgc cct gat cca acg gcg cca cct aat ggc agc att			965
Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile			
300	305	310	
tca cct gtg caa gcc acg tat gtc ctg aag gac agg ttt tct gtc ttc			1013
Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe			
315	320	325	
tgc aag aca ggc ttc gag ctt ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aaa tca			1061
Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser			
330	335	340	
ttc act gct gtc tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg ccg atg cca			1109
Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro			
345	350	355	
gag tgc agc att att gat tgt ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc			1157
Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly			
360	365	370	375
cat gtg gac tat atc aca ggc cct caa gtg act acc tac aaa gct gtg			1205
His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val			
380	385	390	
att cag tac agc tgt gaa gag act ttc tac aca atg agc agc aat ggt			1253
Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly			
395	400	405	
aaa tat gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa			1301

Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu
410 415 420
aaa ctc ccc ccg gtt tgt gag cct gtt tgt ggg ctg tcc aca cac act 1349
Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr
425 430 435
ata gga gga cgc ata gtt gga ggg cag cct gca aag cct ggt gac ttt 1397
Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe
440 445 450 455
cct tgg caa gtc ttg ttg ctg ggt caa act aca gca gca gca ggt gca 1445
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala
460 465 470
ctt ata cat gac aat tgg gtc cta aca gcc gct cat gct gta tat gag 1493
Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu
475 480 485
aaa aga atg gca gcg tcc tcc ctg aac atc cga atg ggc atc ctc aaa 1541
Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys
490 495 500
agg ctc tca cct cat tac act caa gcc tgg ccc gag gaa atc ttt ata 1589
Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile
505 510 515
cat gaa ggc tac act cac ggt gct ggt ttt gac aat gat ata gca ttg 1637
His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu
520 525 530 535
att aaa ctc aag aac aaa gtc aca atc aac gga agc atc atg cct gtt 1685
Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val
540 545 550
tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act 1733
Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr
555 560 565
gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga 1781
Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg

570 575 580
aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc 1829
Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr
585 590 595
acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg 1877
Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met
600 605 610 615
ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac 1925
Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp
620 625 630
agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt 1973

Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe
635 640 645
gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc 2021
Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly
650 655 660
cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag 2069
Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu

665 670 675
aac ata ata agt aat ttc taa 2090
Asn Ile Ile Ser Asn Phe
680 685
<210> 51
<211> 685
<212> PRT
<213> Murine
<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

<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

<220><221> CDS

<222> (10)..(2067)

<400> 53

tggcacaca atg agg cta ctg atc gtc ctg ggt ctg ctt tgg agt ttg gtg 51

Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val

1 5 10

gcc aca ctt ttg ggc tcc aag tgg cct gag cct gta ttc ggg cgc ctg 99

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

15 20 25 30

gtg tcc ctg gcc ttc cca gag aag tat ggc aac cat cag gat cga tcc 147

Val Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser

35	40	45	
tgg acg ctg act gca ccc cct ggc ttc cgc ctg cgc ctc tac ttc acc			195
Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr			
50	55	60	
cac ttc aac ctg gaa ctc tct tac cgc tgc gag tat gac ttt gtc aag			243
His Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys			
65	70	75	
ttg acc tca ggg acc aag gtg cta gcc acg ctg tgt ggg cag gag agt			291
Leu Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser			
80	85	90	
aca gat act gag cgg gca cct ggc aat gac acc ttc tac tca ctg ggt			339
Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly			
95	100	105	110
ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc gac tac tcc aat gag aag cca			387
Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro			
115	120	125	
ttc aca gga ttt gag gcc ttc tat gca gcg gag gat gtg gat gaa tgc			435
Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys			
130	135	140	
aga aca tcc ctg gga gac tca gtc cct tgt gac cat tat tgc cac aac			483
Arg Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn			
145	150	155	
tac ctg ggc ggc tac tac tgc tcc tgc cga gtg ggc tac att ctg cac			531
Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His			
160	165	170	
cag aac aag cat acc tgc tca gcc ctt tgt tca ggc cag gtg ttc act			579
Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr			
175	180	185	190
ggg agg tct ggc ttt ctc agt agc cct gag tac cca cag cca tac ccc			627
Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro			
195	200	205	

aaa ctc tcc agc tgc gcc tac aac atc cgc ctg gag gaa ggc ttc agt	675
Lys Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser	
210 215 220	
atc acc ctg gac ttc gtg gag tcc ttt gat gtg gag atg cac cct gaa	723
Ile Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu	
225 230 235	
gcc cag tgc ccc tac gac tcc ctc aag att caa aca gac aag agg gaa	771
Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu	
240 245 250	
tac ggc ccg ttt tgt ggg aag acg ctg ccc ccc agg att gaa act gac	819
Tyr Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp	
255 260 265 270	
agc aac aag gtg acc att acc ttt acc acc gac gag tca ggg aac cac	867
Ser Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His	
275 280 285	
aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc aca gca cag ccc tgc cct gat	915
Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp	
290 295 300	
cca acg gcg cca cct aat ggt cac att tca cct gtg caa gcc acg tat	963
Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr	
305 310 315	
gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt	1011
Val Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu	
320 325 330	
ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aag tca ttc act gct gtc tgt cag aaa	1059
Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys	
335 340 345 350	
gat gga tct tgg gac cgg ccg ata cca gag tgc agc att att gac tgt	1107
Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys	
355 360 365	

ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc cac gtg gac tat atc aca ggc 1155

Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly
370 375 380

cct gaa gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac agc tgt gaa gag 1203

Pro Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu
385 390 395

act ttc tac aca atg agc agc aat ggt aaa tat gtg tgt gag gct gat 1251

Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp

400 405 410

gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tcc ctc ccg gtt tgc aag 1299

Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys
415 420 425 430

cct gtc tgt gga ctg tcc aca cac act tca gga ggc cgt ata att gga 1347

Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly
435 440 445

gga cag cct gca aag cct ggt gac ttt cct tgg caa gtc ttg tta ctg 1395

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

ggt gaa act aca gca gca ggt gct ctt ata cat gac gac tgg gtc cta 1443

Gly Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu
465 470 475

aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg 1491

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu
480 485 490

gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa 1539

Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln
495 500 505 510

gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct 1587

Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala

515	520	525	
ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca			1635
Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr			
530	535	540	
atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca			1683
Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala			
545	550	555	
tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta			1731
Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu			
560	565	570	
acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca			1779
Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro			
575	580	585	590
att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac			1827
Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr			
595	600	605	
cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc			1875
Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg			
610	615	620	
ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt			1923
Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe			
625	630	635	
cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg			1971
Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp			
640	645	650	
ggt tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa			2019
Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys			
655	660	665	670
gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa			2067
Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe			
675	680	685	

tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

2091

<210> 54

<211> 685

<212> PRT

<213> Rat

<400> 54

Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr

35 40 45

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

50 55 60

Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser

100 105 110

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr

115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr

130 135 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu

145 150 155 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn

165 170 175

Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg

180 185 190

Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu

195 200 205

Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr

210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln

225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly

245 250 255

Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser Asn

260 265 270

Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly

275 280 285

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr

290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly

340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro

355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu

370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe

385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe

405 410 415

Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys Pro Val

420 425 430

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln

435 440 445

Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Glu

450 455 460
Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala

465 470 475 480
Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile

485 490 495
Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala Trp

500 505 510
Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe

515 520 525
Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn

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

545 550 555 560
Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln

565 570 575
Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Val

580 585 590
Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro Gly

595 600 605
Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly

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

625 630 635 640
Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser

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

660 665 670
Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe

675 680 685
<210> 55

<211> 670

<212> PRT

<213> Rat

<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 Sapiens

<400> 56

atgaggctgc tgacctcct gggccttc 28

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo Sapiens

<400> 57

gtgccctcc tgcgtcacct ctg 23

<210> 58

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo Sapiens

<400> 58

cagaggtgac gcaggagggg cac 23

<210> 59

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo Sapiens

<400> 59

ttaaaatcac taattatgtt ctcgatc 27

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine

<400> 60

atgaggctac tcattcttct gg 22

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine

<400> 61
ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23
<210> 62
<211
> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Murine
<400> 62
ccccccctgc gtcacctctg cag 23
<210> 63
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Murine
<400> 63
ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29
<210> 64
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rat
<400> 64
gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt 29
<210
> 65
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rat
<400> 65
ctagaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca 37
<210> 66
<211> 354
<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 66

caggtcacct tgaaggagtc tggctcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg 60
acctgcaccg tctctgggtt ctcactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt 120
cagcccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgagtga cgaaaaatcc 180
tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240

gtccttaciaa tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300
cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaacctgg tcaactgtctc ctca 354

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 67

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly

20 25 30

Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 68

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Thr

20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala

50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn

65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val

85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 69

<211> 318

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (246)..(246)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 69

cagccagtgc tgactcagcc cccctcactg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60

acctgctctg gagagaaatt gggggataaa tatgcttact ggtatcagca gaagccaggc 120

cagtccctg tgttggtcat gtatcaagat aaacagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
 ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
 gatgangctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg 300
 accaagctga ccgtccta 318

<210> 70

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 70

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
 20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 71

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic

<400> 71

Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Arg Val

20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr

35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Gly Glu Ala Gly

65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ile Ala Thr Asp His

85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly

100 105 110

Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu

115 120