I834025

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I834025 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：110107578 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 03 月 03 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/395 (2006.01)* *C07K16/40 (2006.01)*
A61P11/00 (2006.01) *A61P31/14 (2006.01)*

(30)優先權：2020/03/06 美國 62/986,566
2020/04/10 美國 63/008,540
2020/04/24 美國 63/015,299
2020/07/21 美國 63/054,298
2020/08/07 美國 63/062,843
2020/10/22 美國 63/104,229
2020/10/26 美國 63/105,637
2021/01/22 美國 63/140,591

(71)申請人：美商奧默羅斯公司 (美國) OMEROS CORPORATION (US)
美國

(72)發明人：丹歐普羅斯 葛雷格里A DEMOPULOS, GREGORY A. (US)；昆頓 坦尼克J QUINTON, TINEKA J. (US)

(74)代理人：陳展俊

(56)參考文獻：

US 20130344073A1

期刊 Sun et al., "Inhibition of complement activation alleviates acute lung injury induced by highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection", Am J Respir Cell Mol Biol, Vol. 49, Issue 2, American Thoracic Society, 2013 Aug, Pages 221-230.

審查人員：張子威

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：53 共 648 頁

(54)名稱

用於治療和/或預防冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群的抑制 MASP-2 的方法

(57)摘要

在一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒例如 SARS-CoV-2 感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群、肺炎或者冠狀病毒感染的一些其它肺部表現或其它表現例如血栓形成的方法。所述方法包括將有效抑制 MASP-2 依賴性補體活化的量的 MASP-2 抑制劑施用於由冠狀病毒感染的受試者的步驟。在一個實施方案中，MASP-2 抑制劑是與 SEQ ID NO:6 的一部分特異性結合的 MASP-2 單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2 抑制劑是小分子 MASP-2 抑制性化合物。在一個實施方案中，受試者是患有 COVID-19 誘導的急性呼吸窘迫症候群 (ARDS)的人受試者，並且在治療之前需要補充氧氣，並且 MASP-2 抑制劑以足以中止對於補充氧氣的需要的量施用。

In one aspect, the invention provides methods for treating, inhibiting, alleviating, or preventing acute respiratory distress syndrome, pneumonia, or some other pulmonary or other manifestation of coronavirus

infection, such as thrombosis, in a mammalian subject infected with coronavirus, such as SARS-CoV-2. The methods comprise the step of administering to a subject infected with coronavirus an amount of a MASP-2 inhibitory agent effective to inhibit MASP-2-dependent complement activation. In one embodiment, the MASP-2 inhibitory agent is a MASP-2 monoclonal antibody, or fragment thereof that specifically binds to a portion of SEQ ID NO:6. In one embodiment, the MASP-2 inhibitory agent is a small molecule MASP-2 inhibitory compound. In one embodiment, the subject is a human subject suffering from COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) and requires supplemental oxygen prior to treatment and the MASP-2 inhibitory agent is administered in an amount sufficient to discontinue the need for supplemental oxygen.

指定代表圖：

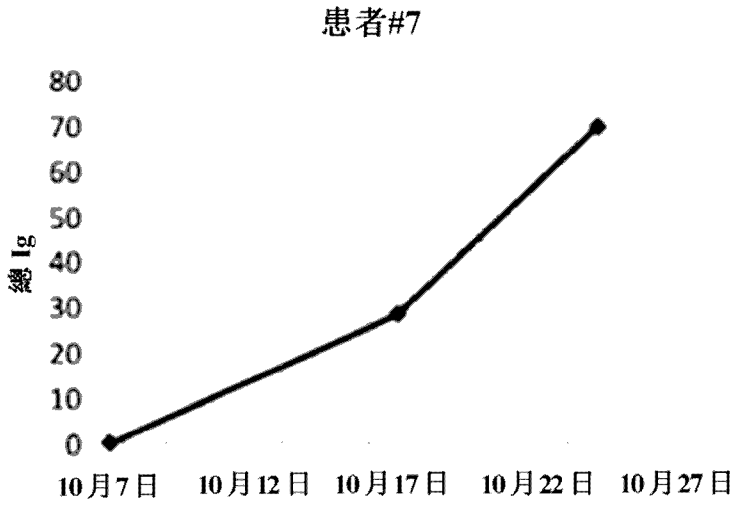


圖 53

專利案號：110107578

公告本

I834025

【發明摘要】

【中文發明名稱】 用於治療和/或預防冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群的抑制MASP-2的方法

【英文發明名稱】 METHODS of Inhibiting MASP-2 for the treatment and/or prevention of coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome

【中文】在一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒例如SARS-CoV-2感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群、肺炎或者冠狀病毒感染的一些其它肺部表現或其它表現例如血栓形成的方法。所述方法包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於由冠狀病毒感染的受試者的步驟。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。在一個實施方案中，受試者是患有COVID-19誘導的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)的人受試者，並且在治療之前需要補充氧氣，並且MASP-2抑制劑以足以中止對於補充氧氣的需要的量施用。

【英文】In one aspect, the invention provides methods for treating, inhibiting, alleviating, or preventing acute respiratory distress syndrome, pneumonia, or some other pulmonary or other manifestation of coronavirus infection, such as thrombosis, in a mammalian subject infected with coronavirus, such as SARS-CoV-2. The methods comprise the step of administering to a subject infected with coronavirus an

amount of a MASP-2 inhibitory agent effective to inhibit MASP-2-dependent complement activation. In one embodiment, the MASP-2 inhibitory agent is a MASP-2 monoclonal antibody, or fragment thereof that specifically binds to a portion of SEQ ID NO:6. In one embodiment, the MASP-2 inhibitory agent is a small molecule MASP-2 inhibitory compound. In one embodiment, the subject is a human subject suffering from COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) and requires supplemental oxygen prior to treatment and the MASP-2 inhibitory agent is administered in an amount sufficient to discontinue the need for supplemental oxygen.

【指定代表圖】　　圖53

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　用於治療和/或預防冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群的抑制MASP-2的方法

【英文發明名稱】　METHODS of Inhibiting MASP-2 for the treatment and/or prevention of coronavirus-induced acute respiratory distress syndrome

【技術領域】

【0001】 相關申請的交叉引用

本申請要求於2020年3月6日提交的美國臨時申請號62/986,566的權益，並且要求於2020年4月10日提交的美國臨時申請號63/008,540的權益，並且要求於2020年4月24日提交的美國臨時申請號63/015,299的權益，並且要求於2020年7月21日提交的美國臨時申請號63/054,298的權益，並且要求於2020年8月7日提交的美國臨時申請號63/062,843的權益，並且要求於2020年10月22日提交的美國臨時申請號63/104,229的權益，並且要求於2020年10月26日提交的美國臨時申請號63/105,637的權益，並且要求於2021年1月22日提交的美國臨時申請號63/140,591的權益，所述美國臨時申請全部在此整體引入作為參考。

【0002】 關於序列表的聲明

與本申請相關的序列表以文本格式代替紙質副本提供，並且在此引入說明書內作為參考。含有序列表的文本文件的名稱為MP_1_0312_US_Sequence_Listing_20210302_ST25.txt。文本文件為136 KB；於2021年3月2日創建；並且與說明書的提交一起經由FS-Web提交。

【0003】 本發明關於一種用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群的方法，尤其有關一種用於治療和/或預防冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群的抑制MASP-2的方法。

【先前技術】

【0004】 補體系統提供了在人和其它脊椎動物中的早期作用機制，以啟動、擴增且協調對微生物感染和其它急性傷害的免疫應答(M.K. Liszewski和J.P. Atkinson，1993，於*Fundamental Immunology*，第三版，由W.E. Paul編輯，Raven Press，Ltd.，New York)。雖然補體活化提供了針對潛在病原體的有價值的一線防禦，但促進保護性免疫應答的補體活性也可能代表對宿主的潛在威脅(K.R. Kalli等人，*Springer Semin. Immunopathol. 15*:417-431，1994；B.P. Morgan，*Eur. J. Clinical Investig. 24*:219-228，1994)。例如，C3和C5蛋白酶解產物募集並活化嗜中性粒細胞。雖然活化的嗜中性粒細胞對於宿主防禦是必不可少的，但在其破壞性酶的釋放方面是不加區別的，並且可能引起器官損害。另外，補體活化可能引起裂解性補體組分沉積在附近的宿主細胞以及微生物靶上，從而導致宿主細胞裂解。

【0005】 當前，廣泛公認補體系統可以通過三種不同的途徑被活化：經典途徑、凝集素途徑和替代途徑。經典途徑通常為由與外來顆粒(即抗原)結合的宿主抗體組成的複合物所觸發，因此需要先前暴露於抗原以生成特異性抗體應答。由於經典途徑的活化取決於宿主的先前適應性免疫應答，因此經典途徑是獲得性免疫系統的部分。相比之下，凝集素途徑和替代途徑兩者均不依賴於適應性免疫，並且是先天免疫系統的部分。

【0006】凝集素途徑被廣泛認為在首次用於實驗的宿主中針對感染的宿主防禦中具有主要作用。MBL涉及宿主防禦的有力證據來自功能性MBL的血清水平減少的患者的分析(Kilpatrick，*Biochim. Biophys. Acta 1572*:401-413,(2002))。此類患者展示對復發性細菌和真菌感染的敏感性。這些症狀通常在生命的早期顯而易見，在由於母體衍生的抗體滴度減弱而明顯的易損性窗口期間，但在抗體應答的完全庫(repertoire)發展之前。這種症候群經常起因於在MBL的膠原部分中的幾個位點處的突變，所述突變干擾MBL寡聚體的正確形成。然而，由於MBL可以不依賴於補體而充當調理素，因此尚不知道感染敏感性的增加在多大程度上是由於受損的補體活化。

【0007】所有三種途徑(即，經典途徑、凝集素途徑和替代途徑)已被認為在C5處彙聚，所述C5被切割以形成具有多重促炎效應的產物。彙聚的途徑已被稱為末端補體途徑。C5a是最有效力的過敏毒素，誘導平滑肌和血管緊張度以及血管滲透性的改變。它也是嗜中性粒細胞和單核細胞兩者的強大的趨化因子和活化劑。C5a介導的細胞活化可以通過誘導多種另外的炎症介質(包括細胞因子、水解酶、花生四烯酸代謝產物和活性氧物類)的釋放，來顯著放大炎症應答。C5切割導致C5b-9的形成，後者也稱為膜攻擊複合物(MAC)。目前有證據強烈表明，除作為裂解孔形成複合物的作用之外，亞裂解性MAC沉積還可能在炎症中起重要作用。

【0008】除了在免疫防禦中的必要作用之外，補體系統還在許多臨床狀況下促成組織損傷。儘管存在廣泛證據暗示經典補體途徑和替代補體途徑兩者涉及非傳染性人疾病的發病機制，但凝集素途徑的作用才剛剛開始進行評估。最近的研究提供了以下證據：凝集素途徑的活化可能負責缺血/再灌注損傷中的

補體活化和有關炎症。Collard等人(2000)報告了經受氧化性應激的培養的內皮細胞結合MBL，並且在暴露於人血清後顯示C3的沉積(Collard等人，*Am. J. Pathol. 156*:1549-1556,(2000))。另外，用阻斷性抗MBL單選殖抗體處理人血清抑制MBL結合和補體活化。這些發現擴展到心肌缺血再灌注的大鼠模型，在所述模型中，與用對照抗體治療的大鼠相比，用針對大鼠MBL的阻斷抗體治療的大鼠顯示了在冠狀動脈閉塞後明顯更少的心肌損傷(Jordan等人，*Circulation 104*:1413-1418,(2001))。在氧化性應激後MBL與血管內皮結合的分子機制尚不清楚；最近的研究提示了，在氧化性應激後凝集素途徑的活化可能通過MBL與血管內皮細胞角蛋白(而非糖綴合物)的結合來介導(Collard等人，*Am. J. Pathol. 159*:1045-1054,(2001))。其它研究已暗示經典途徑和替代途徑涉及缺血/再灌注損傷的發病機制，而凝集素途徑在該疾病中的作用仍存在爭議(Riedermann，N.C.等人，*Am. J. Pathol. 162*:363-367，2003)。

【0009】 纖維化是通常響應損害或損傷而在器官或組織中過度形成結締組織。纖維化的標誌是在局部創傷之後過度產生細胞外基質。對損傷的正常生理應答導致結締組織的沉積，但這種最初有益的修復過程可能持續並變得病理性，改變組織的體系結構和功能。在細胞水平，上皮細胞和成纖維細胞增殖並分化為成肌纖維細胞，導致基質收縮、剛性增加、微血管壓縮和缺氧。包括巨噬細胞和淋巴細胞在內的炎性細胞的流入導致細胞因子釋放，並且擴大膠原、纖連蛋白和纖維化的其它分子標記物的沉積。使用皮質類固醇和免疫抑制藥物，常規治療方法已在很大程度上靶向纖維化的炎症過程。遺憾的是，這些消炎藥具有很少乃至沒有臨床效應。目前不存在用於纖維化的有效治療或治療

劑，但動物研究和傳聞的人報告兩者均提示了，纖維化組織損傷可以被逆轉(Tampe和Zeisberg，*Nat Rev Nephrol*，第10卷:226-237，2014)。

【0010】 腎臟具有從損傷中恢復的有限能力。各種腎病理狀況導致局部炎症，其引起腎組織的瘢痕形成和纖維化。炎性刺激的持續驅動慢性腎臟疾病中的小管間質性炎症和纖維化以及進行性腎功能受損。其進展為終末期腎衰竭與顯著的發病率和死亡率相關。由於小管間質性纖維化是多種腎病理狀況的共同終點，因此它代表了旨在預防腎衰竭的療法的關鍵靶。不依賴於原發性腎疾病的風險因素(例如蛋白尿)通過驅動局部炎症而促成腎纖維化的發展和腎排泄功能的喪失，進而增強了疾病進展。

【0011】 考慮到纖維化在許多疾病和病症中的作用，例如導致慢性腎臟疾病的小管間質性纖維化，迫切需要開發治療上有效的藥劑，用於治療由纖維化引起或加劇的疾病和病況。進一步鑒於靶向腎疾病中的炎症性促纖維化途徑的新的和現有治療的匱乏，需要開發治療上有效的藥劑以治療、抑制、預防和/或逆轉腎纖維化，並且從而預防進行性慢性腎臟疾病。

【0012】 冠狀病毒病2019(COVID-19)是由嚴重急性呼吸症候群冠狀病毒2(SARS冠狀病毒2或SARS-CoV-2)引起的傳染病，所述病毒是與SARS病毒密切相關的病毒(世界衛生組織(World Health Organization)，2/11/2020，Novel Coronavirus Situation Report 22)。受COVID-19影響的那些人可能發生發燒、乾咳、疲勞和呼吸短促。病例可能進展為呼吸功能障礙，包括肺炎、嚴重急性呼吸症候群以及最脆弱的人的死亡(參見例如，Hui D.S.等人，*Int J Infect Dis* 91:264-266，2020年1月14日)。不存在疫苗或特異性抗病毒治療，其管理涉及症狀的治療和支持性護理。

【0013】 流感(也稱為“流行性感冒”)是由RNA流感病毒引起的傳染病。流感病毒感染的症狀可能為輕度至重度的，並且包括高燒、流鼻涕、咽喉痛、肌肉和關節疼痛、頭痛、咳嗽和感到疲倦。這些症狀通常在暴露於病毒後兩天開始，且大多數持續少於一周，然而，咳嗽可能持續多於兩周。(參見“Influenza Seasonal，World Health Organization 6，2018年11月6日)。流感的併發症可能包括病毒性肺炎、急性呼吸窘迫症候群(ARDS)、繼發性細菌性肺炎、鼻竇感染以及先前的健康問題如哮喘或心力衰竭的惡化(參見“Key Facts About Influenza(Flu)” Centers for Disease Control and Prevention(CDC)，2014年9月9日)。流感的效應比普通感冒嚴重得多，並且持續更長時間。大多數人在約一至兩周內完全恢復，但其它人會發展危及生命的併發症，例如肺炎。因此，流感可能是致命的，尤其是對於具有受損的免疫系統或長期患病的體弱者、幼者和老者。參見Hilleman MR，*Vaccine*. 20(25–26): 3068–87(2002)。

【0014】 四種類型的流感病毒中的三種影響人：甲型、乙型和丙型(*參見“Types of Influenza Viruses Seasonal Influenza(Flu)，Centers for Disease Control and Prevention(CDC). 2017年9月27日*)。丁型尚未知感染人，但認為具有這樣的潛力(參見“Novel Influenza D virus: Epidemiology，pathology，evolution and biological characteristics,” *Virulence. 8(8): 1580–91，2017*)。已在人中確認的甲型流感的血清型為：H1N1(引起1918年的“西班牙流感”和2009年的“豬流感”)；H2N2(引起1957年的“亞洲流感”)、H3N2(引起1968年的“香港流感”)、H5N1(引起2004年的“禽流感”)、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9和H6N1。參見世界衛生組織(2006年6月30日)。“Epidemiology of WHO-confirmed human cases of avian influenza A(H5N1)infection，*Wkly Epidemiol*

Rec. 81(26): 249–57.；*Fouchier RA*等人*(2004)PNAS 101(5): 1356-61*；*Wkly Epidemiol Rec*. 83(46): 415–20，Asian Lineage Avian Influenza A(H7N9)Virus，Centers for Disease Control and Prevention(CDC)，2018年12月7日)。

【0015】 流感病毒(也稱為流行性感冒)的常見症狀，例如發燒、頭痛和疲勞，是由受流感感染的細胞產生的大量促炎細胞因子和趨化因子(例如干擾素或腫瘤壞死因子)的結果。參見Eccles R. 等人，Lancet Infect Dis 5(11):718-25(2005)；Schmitz N等人，*Journal of Virology*. 79(10): 6441–8(2005)。這種大規模的免疫應答可能導致危及生命的細胞因子風暴。這種效應已提議為H5N1禽流感和1918年大流行毒株兩者的異常致命性的原因。Cheung CY等人，*Lancet*. 360(9348): 1831–37(2002)；Kash JC等人，*Nature*. 443(7111): 578–81(2006)。流感似乎也觸發了程序性細胞死亡(細胞凋亡)，參見Clinical Respiratory Medicine，Elsevier Health Sciences.第311頁(2012)。

【0016】 因此，迫切需要開發治療上有效的藥劑，以治療、抑制和/或預防冠狀病毒誘導的肺炎和急性呼吸窘迫症候群、以及流感病毒誘導的肺炎和急性呼吸窘迫症候群。

【發明內容】

【0017】 提供該概述以簡化形式介紹所選擇的概念，所述概念在下文詳述中進一步描述。該概述並不預期鑒定請求保護的主題的關鍵特徵，也不旨在用作確定請求保護的主題的範圍的幫助。

【0018】 在一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群的方法，其包括將有效抑

制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一些實施方案中，受試者患有一種或多種呼吸症狀，並且方法包括將有效改善至少一種呼吸症狀(即，改善呼吸功能)的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由SARS-CoV-2感染的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於患有COVID-19的受試者，例如患有與COVID-19相關的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由SARS-CoV感染的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由MERS-CoV感染的受試者。在一個實施方案中，在MASP-2抑制劑施用之前，受試者被鑒定為具有冠狀病毒(即SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS-CoV)。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2抗體或其抗原結合片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑選擇性地抑制凝集素途徑補體活化，而基本上不抑制C1q依賴性補體活化。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是抑制MASP-2依賴性補體活化的小分子，例如合成或半合成的小分子。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清(即正常人血清)中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID

NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列。

【0019】 在另一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防由流感病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群的方法，其包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一些實施方案中，受試者患有一種或多種呼吸症狀，並且方法包括將有效改善至少一種呼吸症狀(即，改善呼吸功能)的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一個實施方案中，受試者由選自甲型流感病毒、乙型流感病毒和丙型流感病毒的流感病毒感染。在一個實施方案中，受試者由甲型流感感染。該受試者由選自以下的甲型流感血清型感染：H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9和H6N1。在一個實施方案中，在MASP-2抑制劑施用之前，受試者被鑒定為具有流感病毒。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2抗體或其抗原結合片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑選擇性地抑制凝集素途徑補體活化，而基本上不抑制C1q依賴性補體活化。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是抑制MASP-2依賴性補體活化的小分子，例如合成或半合成的小分子。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，

MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其中IC50為30 nM或更小。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列。

【0020】 在另一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防哺乳動物受試者的纖維化的方法，所述受試者患有疾病或病症或者處於發展疾病或病症的風險中，所述疾病或病症由纖維化和/或炎症引起或者因纖維化和/或炎症而加劇，例如冠狀病毒感染，該方法包括將有效抑制纖維化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑選擇性地抑制凝集素途徑補體活化，而基本上不抑制C1q依賴性補體活化。

【0021】 在另一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群、肺炎或者冠狀病毒感染的一些其它肺部表現或其它表現例如血栓形成的方法，其包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一個實施方案

中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【0022】 在另一個方面，本發明提供了用於治療患有COVID-19誘導的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)或肺炎的人受試者的方法，其包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一個實施方案中，受試者在治療之前處於機械呼吸機(侵入性機械呼吸機或非侵入性機械呼吸機)上，並且MASP-2抑制劑以足以中止對於機械通氣的需要的劑量和時間段施用。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【0023】 在另一個方面，本發明提供了用於治療、預防由SARS-CoV-2感染的人受試者的凝血或血栓形成或者降低其嚴重性的方法，其包括將有效治療、預防所述受試者的凝血或血栓形成或者降低其嚴重性的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一個實施方案中，受試者具有的D-二聚體水平高於治療前的標準範圍，並且MASP-2抑制劑以足以將所述受試者的D-二聚體水平降低到健康受試者的正常範圍內的量和時間施用。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑提供抗凝和/或抗血栓形成效應，而不影響止血。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【0024】 在另一個方面，本發明提供了用於治療、改善、預防或降低人受試者發展一種或多種COVID-19有關的長期後遺症的風險的方法，所述人受

試者目前由SARS-CoV-2感染或已由SARS-CoV-2感染，所述方法包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一個實施方案中，受試者患有COVID-19誘導的肺炎或ARDS，並且MASP-2抑制劑以有效改善呼吸功能的量施用。在一個實施方案中，受試者已從COVID-19誘導的肺炎或ARDS中恢復，並且MASP-2抑制劑以治療或改善一種或多種長期後遺症的量施用。在一個實施方案中，受試者患有COVID-19誘導的凝血或血栓形成，並且MASP-2抑制劑以有效治療、預防所述受試者的凝血或血栓形成或者降低其嚴重性的量施用於受試者。在一個實施方案中，受試者已從COVID-19誘導的凝血或血栓形成中恢復，並且MASP-2抑制劑以治療或改善一種或多種長期後遺症的量施用。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【0025】 在另一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防由流感病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群、肺炎或者流感病毒感染的一些其它肺部表現或其它表現的方法，其包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一個實施方案中，流感病毒是甲型流感病毒、乙型流感病毒或丙型流感病毒。在一個實施方案中，甲型流感病毒選自H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9和H6N1。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【圖式簡單說明】

【0026】本發明的前述方面和許多伴隨的優點將變得更加容易理解，因為當與附圖結合考慮時，通過參考下述詳述，它們將變得更加容易理解，在所述附圖中：

圖1是示出了人MASP-2的基因組結構的圖；

圖2A是示出了人MASP-2蛋白的結構域結構的示意圖；

圖2B是示出了人MAp19蛋白的結構域結構的示意圖；

圖3是示出了鼠MASP-2敲除策略的圖；

圖4是示出了人MASP-2小基因(minigene)構建體的圖；

圖5A呈現的結果證實了，如實施例2中所述，如通過甘露聚糖上的C4b沉積的缺乏測量的，MASP-2缺陷導致凝集素途徑介導的C4活化的喪失；

圖5B呈現的結果證實了，如實施例2中所述，如通過酵母聚糖上的C4b沉積的缺乏測量的，MASP-2缺陷導致凝集素途徑介導的C4活化的喪失；

圖5C呈現的結果證實了，如實施例2中所述，如通過甘露聚糖和酵母聚糖上的C4b沉積測量的，從MASP-2+/-、MASP-2-/-和野生型毒株獲得的血清樣品的相對C4活化水平；

圖6呈現的結果證實了，如實施例2中所述，如通過甘露聚糖上的C4b沉積測量的，向MASP-2-/-血清樣品中添加鼠重組MASP-2，以蛋白質濃度依賴性的方式恢復凝集素途徑介導的C4活化；

圖7呈現的結果證實了，如實施例8中所述，經典途徑在MASP-2-/-毒株中是有功能的；

圖8A呈現的結果證實了，如實施例10中所述，抗MASP-2 Fab2抗體#11抑制C3轉化酶形成；

圖8B呈現的結果證實了，如實施例10中所述，抗MASP-2 Fab2抗體#11結合天然大鼠MASP-2；

圖8C呈現的結果證實了，如實施例10中所述，抗MASP-2 Fab2抗體#41抑制C4切割；

圖9呈現的結果證實了，如實施例10中所述，所有測試的抑制C3轉化酶形成的抗MASP-2 Fab2抗體也被發現抑制C4切割；

圖10是示出了衍生自大鼠MASP-2的重組多肽的圖，所述重組多肽用於MASP-2阻斷Fab2抗體的表位作圖，如實施例11中所述；

圖11呈現的結果證實了，如實施例11中所述，抗MASP-2 Fab2 #40和#60與大鼠MASP-2多肽的結合；

圖12A以圖形方式示出了，在凝集素途徑特異性測定條件下，在人MASP-2單選殖抗體(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉積水平，證實了OMS646抑制凝集素介導的MAC沉積，其IC_{50}值為大約1 nM，如實施例12中所述；

圖12B以圖形方式示出了，在經典途徑特異性測定條件下，在人MASP-2單選殖抗體(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉積水平，證實了OMS646並不抑制經典途徑介導的MAC沉積，如實施例12中所述；

圖12C以圖形方式示出了，在替代途徑特異性測定條件下，在人MASP-2單選殖抗體(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉積水平，證實了OMS646並不抑制替代途徑介導的MAC沉積，如實施例12中所述；

圖13以圖形方式示出了，人MASP-2單選殖抗體(OMS646)在小鼠中的藥代動力學(PK)概況，顯示了在以指示劑量施用後，根據時間的OMS646濃度(n=3只動物/組的平均值)，如實施例12中所述；

圖14A以圖形方式示出了，在靜脈內施用之後，在小鼠中測量為系統性凝集素途徑活性的下降的人MASP-2單選殖抗體(OMS646)的藥效學(PD)應答，如實施例12中所述；

圖14B以圖形方式示出了，在皮下施用之後，在小鼠中測量為系統性凝集素途徑活性的下降的人MASP-2單選殖抗體(OMS646)的藥效學(PD)應答，如實施例12中所述；

圖15以圖形方式示出了，用天狼星紅染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，其中所述組織切片得自在單側輸尿管梗阻(UUO)7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠，以及假手術的野生型和MASP-2-/-小鼠，如實施例14中所述；

圖16以圖形方式示出了，用F4/80巨噬細胞特異性抗體染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，其中所述組織切片得自在單側輸尿管梗阻(UUO)7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的野生型和MASP-2-/-小鼠，如實施例14中所述。

圖17以圖形方式示出了，在得自單側輸尿管梗阻(UUO)7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的野生型和MASP-2-/-小鼠的腎臟組織切片中，如通過定量PCR(qPCR)測量的，膠原-4的相對mRNA表達水平，如實施例14中所述。

圖18以圖形方式示出了，在得自單側輸尿管梗阻(UUO)7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的野生型和MASP-2-/-小鼠的腎臟組織切片中，如通過qPCR測量的，轉化生長因子β-1(TGFβ-1)的相對mRNA表達水平，如實施例14中所述。

圖19以圖形方式示出了，在得自單側輸尿管梗阻(UUO)7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的野生型和MASP-2-/-小鼠的腎臟組織切片中，如通過qPCR測量的，白細胞介素6(IL-6)的相對mRNA表達水平，如實施例14中所述。

圖20以圖形方式示出了，在得自單側輸尿管梗阻(UUO)7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的野生型和MASP-2-/-小鼠的腎臟組織切片中，如通過qPCR測量的，干擾素-γ的相對mRNA表達水平，如實施例14中所述。

圖21以圖形方式示出了，用天狼星紅染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，其中所述組織切片在單側輸尿管梗阻(UUO)7天之後，得自用MASP-2抑制性抗體以及同種型對照抗體治療的野生型小鼠，如實施例15中所述。

圖22以圖形方式示出了，與來自得自用IgG4同種型對照治療的野生型小鼠的梗阻腎臟的組織中的羥脯胺酸水平相比，來自得自用MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠的單側輸尿管梗阻(UUO)後7天收穫的腎臟的羥脯胺酸含量，如實施例15中所述。

圖23以圖形方式示出了，在僅接受鹽水的野生型對照小鼠(n=2)、接受BSA的野生型小鼠(n=6)和接受BSA的MASP-2-/-小鼠(n=6)中，在蛋白質超負荷研究的第15天時測量的血清蛋白質總量(mg/ml)，如實施例16中所述。

圖24以圖形方式示出了，來自僅接受鹽水的野生型對照小鼠(n=2)、接受BSA的野生型(n=6)和接受BSA的MASP-2-/-小鼠(n=6)，在蛋白質超負荷研究的第15天時，在經過24小時時期收集的尿中的排泄蛋白質總量(mg)，如實施例16中所述。

圖25顯示了在蛋白質超負荷研究的第15天時，來自如下的下述小鼠組的代表性蘇木精和曙紅(H&E)染色的腎組織切片：(小圖A)野生型對照小鼠；(小圖B)MASP-2-/-對照小鼠，(小圖C)用BSA治療的野生型小鼠；以及(小圖D)用牛血清白蛋白(BSA)治療的MASP-2-/-小鼠，如實施例16中所述。

圖26以圖形方式示出了，用巨噬細胞特異性抗體F4/80染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，顯示了巨噬細胞的平均染色面積(%)，其中所述組織切片在蛋白質超負荷研究的第15天得自野生型對照小鼠(n=2)、用BSA治療的野生型小鼠(n=6)、以及用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=5)，如實施例16中所述。

圖27A以圖形方式示出了，通過相對於巨噬細胞浸潤(平均染色面積%)繪製來自24小時樣品的尿中測量的總排泄蛋白，關於用BSA治療的每只野生型小鼠(n=6)中的巨噬細胞-蛋白尿相關性的存在的分析，如實施例16中所述。

圖27B以圖形方式示出了，通過相對於巨噬細胞浸潤(平均染色面積%)繪製在24小時樣品的尿中的總排泄蛋白，關於用BSA治療的每只MASP-2-/-小鼠(n=5)中的巨噬細胞-蛋白尿相關性的存在的分析，如實施例16中所述。

圖28以圖形方式示出了，在用BSA治療的野生型小鼠(n=4)和用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=5)中，用抗TGFβ抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% TGFβ抗體染色面積測量的)，如實施例16中所述。

圖29以圖形方式示出了，在用BSA治療的野生型小鼠(n=4)和用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=5)中，用抗TNFα抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% TNFα抗體染色面積測量的)，如實施例16中所述。

圖30以圖形方式示出了，在野生型對照小鼠、MASP-2-/-對照小鼠、用BSA治療的野生型小鼠(n=7)和用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=7)中，用抗IL-6抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% IL-6抗體染色面積測量的)，如實施例16中所述。

圖31以圖形方式示出了，在野生型對照小鼠(n=1)、MASP-2-/-對照小鼠(n)、用BSA治療的野生型小鼠(n=7)和用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=7)中，從來自腎皮質的組織切片中連續選擇的20個高倍視野(HPF)中計數的TUNEL凋亡細胞的頻率，如實施例16所述。

圖32顯示了在用BSA治療後的第15天，來自下述小鼠組的代表性H&E染色的組織切片：(小圖A)用鹽水治療的野生型對照小鼠，(小圖B)同種型抗體治療的對照小鼠，以及(小圖C)用MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠，如實施例17中所述。

圖33以圖形方式示出了，在用鹽水對照和BSA治療的野生型小鼠(n=8)、用同種型對照抗體和BSA治療的野生型小鼠(n=8)、以及用MASP-2抑制性抗體和BSA治療的野生型小鼠(n=7)中，從來自腎皮質的組織切片中連續選擇的20個高倍視野(HPF)中計數的TUNEL凋亡細胞的頻率，如實施例17中所述。

圖34以圖形方式示出了，在用BSA和鹽水治療的野生型小鼠(n=8)、用BSA和同種型對照抗體治療的野生型小鼠(n=7)、以及用BSA和MASP-2抑制性抗體

治療的野生型小鼠(n=8)中，用抗TGFβ抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% TGFβ抗體染色面積測量的)，如實施例17中所述。

圖35以圖形方式示出了，在用BSA和鹽水治療的野生型小鼠(n=8)、用BSA和同種型對照抗體治療的野生型小鼠(n=7)、以及用BSA和MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠(n=8)中，用抗TNFα抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% TNFα抗體染色面積測量的)，如實施例17中所述。

圖36以圖形方式示出了，在用BSA和鹽水治療的野生型小鼠(n=8)、用BSA和同種型對照抗體治療的野生型小鼠(n=7)、以及用BSA和MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠(n=8)中，用抗IL-6抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% IL-6抗體染色面積測量的)，如實施例17中所述。

圖37顯示了在僅用阿黴素或鹽水(對照)治療後的第14天，來自下述小鼠組的代表性H&E染色的組織切片：(小圖A-1、A-2、A-3)僅用鹽水治療的野生型對照小鼠；(小圖B-1、B-2、B-3)用阿黴素治療的野生型小鼠；以及(小圖C-1、C-2、C-3)用阿黴素治療的MASP-2-/-小鼠，如實施例18中所述；

圖38以圖形方式示出了，用巨噬細胞特異性抗體F4/80染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，顯示了在僅用阿黴素或鹽水(野生型對照)治療後的第14天，來自下述小鼠組的巨噬細胞的平均染色面積(%)：僅用鹽水治療的野生型對照小鼠；用阿黴素治療的野生型小鼠；僅用鹽水治療的MASP-2-/-小鼠，以及用阿黴素治療的MASP-2/-小鼠，其中**p=0.007，如實施例18中所述；

圖39以圖形方式示出了，用天狼星紅染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，顯示了在僅用阿黴素或鹽水(野生型對照)治療後的第14天，來

自下述小鼠組的膠原沉積的染色面積(%)：僅用鹽水治療的野生型對照小鼠；用阿黴素治療的野生型小鼠；僅用鹽水治療的MASP-2-/-小鼠，以及用阿黴素治療的MASP-2/-小鼠，其中**p=0.005，如實施例18中所述；和

圖40以圖形方式示出了，在用MASP-2抑制性抗體(OMS646)的每週治療的十二周研究過程期間，兩個IgA患者中的尿白蛋白/肌酐比(uACR)，如實施例19中所述。

圖41A顯示了來自COVID-19患者肺的中隔血管組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像(H&E，400x)，如實施例21中所述。

圖41B顯示了來自COVID-19患者肺的中隔血管組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像(H&E，400x)，如實施例21中所述。

圖41C顯示了來自COVID-19患者的中等直徑肺中隔血管的組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像，如實施例21中所述。

圖41D顯示了來自COVID-19患者的肝實質組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像(H&E，400x)，如實施例21中所述。

圖42A以圖形方式示出了，與並非這項研究的部分的COVID-19患者(n=33)中的CEC/ml計數相比，在正常健康對照(n-6)的外周血中的循環內皮細胞(CEC)/ml計數，如實施例21中所述。

圖42B以圖形方式示出了，在用納索利單抗(narsoplimab)治療之前(基線)和之後，對於這項研究選擇的6個患者中的CEC/ml計數，方框代表了從第一四分位數到第三四分位數的值，水平線顯示了中值，而須線指示了最小值和最大值，如實施例21中所述。

圖43以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，6個COVID-19患者的C反應蛋白(CRP)的血清水平(中值；四分位數間距(IQR))，如實施例21中所述。

圖44以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，6個COVID-19患者的乳酸脫氫酶(LDH)的血清水平(中值；IQR)，如實施例21中所述。

圖45以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，6個COVID-19患者的白細胞介素6(IL-6)的血清水平(中值；四分位數間距(IQR))，如實施例21中所述。

圖46以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，6個COVID-19患者的白細胞介素8(IL-8)的血清水平(中值；四分位數間距(IQR))，如實施例21中所述。

圖47A顯示了自入選以後(即，在用納索利單抗治療後)的第5天時，患者#4的CT掃描，其中觀察到患者患有嚴重的間質性肺炎，具有涉及周圍和中央區域兩者的彌漫性磨玻璃影，尤其是在左肺的下葉中的實變，以及大塊雙側肺栓塞，伴隨在葉間和節段動脈中的充盈缺損(未顯示)，如實施例21中所述。

圖47B顯示了自入選以後(即，在用納索利單抗治療後)的第16天時，患者#4的CT掃描，其中磨玻璃影顯著降低，並且實質實變的幾乎完全消退，如實施例21中所述。

圖48以圖形方式示出了，在用納索利單抗治療的COVID-19患者中，在基線時以及在納索利單抗治療後的不同時間點(在2個劑量後，在4個劑量後)，IL-

6的血清水平(pg/mL)，其中方框代表了從第一四分位數到第三四分位數的值，水平線顯示了中值，而點顯示了所有患者的值，如實施例21中所述。

圖49以圖形方式示出了，在用納索利單抗治療的COVID-19患者中，在基線時以及在納索利單抗治療後的不同時間點(在2個劑量後，在4個劑量後)，IL-8的血清水平(pg/mL)，其中方框代表了從第一四分位數到第三四分位數的值，水平線顯示了中值，而點顯示了所有患者的值，如實施例21中所述。

圖50以圖形方式示出了，用納索利單抗治療的6個COVID-19患者的臨床結果，如實施例21中所述。

圖51A以圖形方式示出了，在納索利單抗治療之前和之後的天冬胺酸胺基轉移酶(AST)的血清水平(單位/升，U/L)。黑線代表了中值和四分位數間距(IQR)。紅線代表了正常水平，而點顯示了所有患者的值，如實施例21中所述。

圖51B以圖形方式示出了，在用納索利單抗治療起始之前其基線值可用的四個COVID-19患者中，D-二聚體值的血清水平(ng/ml)。黑色圓圈指示了何時啟動類固醇治療。紅線代表了正常水平，如實施例21中所述。

圖52A以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，在用納索利單抗治療的第七個COVID-19患者(患者#7)中，D-二聚體值的血清水平(ng/ml)，其中用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示，並且其中水平線代表了正常水平，如實施例22中所述。

圖52B以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，在具有COVID-19的患者#7中的C反應蛋白(CRP)的血清水平，其中用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示，並且其中水平線代表了正常水平，如實施例22中所述。

圖52C以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在納索利單抗治療後的不同時間點，在具有COVID-19的患者#7中的天冬胺酸胺基轉移酶(AST)的血清水平(單位/升，U/L)，其中用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示，並且其中水平線代表了正常水平，如實施例22中所述。

圖52D以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在納索利單抗治療後的不同時間點，在具有COVID-19的患者#7中的丙胺酸胺基轉移酶(ALT)的血清水平(單位/升，U/L)，其中用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示，並且其中水平線代表了正常水平，如實施例22中所述。

圖52E以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，在具有COVID-19的患者#7中的乳酸脫氫酶(LDH)的血清水平，其中用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示，並且其中水平線代表了正常水平，如實施例22中所述。

圖53以圖形方式示出了，隨著時間過去，患者#7的抗SARS-CoV-2抗體滴度，指示了用納索利單抗的治療並不阻礙適應性免疫應答的效應子功能，如實施例22中所述。

【實施方式】

【0027】 序列表說明

SEQ ID NO:1人MAp19 cDNA

SEQ ID NO:2人MAp19蛋白(具有前導區)

SEQ ID NO:3人MAp19蛋白(成熟的)

SEQ ID NO:4人MASP-2 cDNA

SEQ ID NO:5人MASP-2蛋白(具有前導區)

SEQ ID NO:6人MASP-2蛋白(成熟的)

SEQ ID NO:7人MASP-2 gDNA(外顯子1-6)

抗原：(參考MASP-2成熟蛋白)

SEQ ID NO:8 CUBI序列(aa 1-121)

SEQ ID NO:9 CUBEGF序列(aa 1-166)

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

SEQ ID NO:11 EGF區(aa 122-166)

SEQ ID NO:12絲胺酸蛋白酶結構域(aa 429 – 671)

SEQ ID NO:13失活的絲胺酸蛋白酶結構域(aa 610-625，具有Ser618至Ala突變)

SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL(CUBI肽)

SEQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ(CUBI肽)

SEQ ID NO:16 TFRSDYSN(MBL結合區核心)

SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF(MBL結合區)

SEQ ID NO:18 IDECQVAPG(EGF肽)

SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALV(絲胺酸蛋白酶結合核心)

肽抑制劑：

SEQ ID NO:20 MBL全長cDNA

SEQ ID NO:21 MBL全長蛋白質

SEQ ID NO:22 OGK-X-GP(共有區結合)

SEQ ID NO:23 OGKLG

SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G

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

SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGLRGLQGPOGKLGPOG

SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQGPOGPOGKMGPKGEOGDO(人h-纖維膠凝蛋白(ficolin))

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

SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI(C4切割位點)

表達抑制劑：

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

SEQ ID NO:31

5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3'
包括MASP-2翻譯起始位點的SEQ ID NO:4的核苷酸12-45(有義)

SEQ ID NO:32

5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'
編碼包含MASP-2 MBL結合位點的區域的SEQ ID NO:4的核苷酸361-396(有義)

SEQ ID NO:33

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

選殖引物：

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

SEQ ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA(用於CUB的3’ PCR)

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

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

SEQ ID NOS:38-47是用於人源化抗體的選殖引物

SEQ ID NO:48是9aa肽

表達載體：

SEQ ID NO:49是MASP-2小基因插入片段

SEQ ID NO:50是鼠MASP-2 cDNA

SEQ ID NO:51是鼠MASP-2蛋白(w/前導區)

SEQ ID NO:52是成熟的鼠MASP-2蛋白

SEQ ID NO:53大鼠MASP-2 cDNA

SEQ ID NO:54是大鼠MASP-2蛋白(w/前導區)

SEQ ID NO:55是成熟的大鼠MASP-2蛋白

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

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

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

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

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

SEQ ID NO:68 17N16mc重鏈可變區(VH)多肽

SEQ ID NO:69 17D20_dc35VH21N11VL(OMS646)輕鏈可變區(VL)多肽

SEQ ID NO:70編碼17D20_dc35VH21N11VL(OMS646)輕鏈可變區(VL)的DNA

SEQ ID NO:71 17N16_dc17N9輕鏈可變區(VL)多肽

SEQ ID NO:72：SGMI-2L(全長)

SEQ ID NO:73：SGMI-2M(中等截短的形式)

SEQ ID NO:74：SGMI-2S(短截短的形式)

SEQ ID NO:75：包含VH-M2ab6-SGMI-2-N和具有鉸鏈突變的人IgG4恒定區的成熟多肽

SEQ ID NO:76：包含VH-M2ab6-SGMI-2-C和具有鉸鏈突變的人IgG4恒定區的成熟多肽

SEQ ID NO:77：包含VL-M2ab6-SGMI-2-N和人Igλ恒定區的成熟多肽

SEQ ID NO:78：包含VL-M2ab6-SGMI-2-C和人Igλ恒定區的成熟多肽

SEQ ID NO:79：肽接頭(10aa)

SEQ ID NO:80：肽接頭(6aa)

SEQ ID NO:81：肽接頭(4aa)

SEQ ID NO:82：編碼包含VH-M2ab6-SGMI-2-N和具有鉸鏈突變的人IgG4恒定區的多肽的多核苷酸

SEQ ID NO:83：編碼包含VH-M2ab 6-SGMI-2-C和具有鉸鏈突變的人IgG4恒定區的多肽的多核苷酸

SEQ ID NO:84：編碼包含VL-M2ab6-SGMI-2-N和人Igλ恒定區的多肽的多核苷酸

SEQ ID NO:85：編碼包含VL-M2ab6-SGMI-2-C和人Igλ恒定區的多肽的多核苷酸

【0028】 本發明基於本發明人的下述令人驚訝的發現：對補體系統的凝集素途徑的關鍵調節劑即甘露聚糖結合凝集素相關絲胺酸蛋白酶-2(MASP-2)的抑制，顯著降低了纖維化疾病的各種動物模型中的炎症和纖維化，所述動物模型包括單側輸尿管梗阻(UUO)模型、蛋白質超負荷模型和阿黴素誘導的腎纖維化腎病模型。因此，發明人已證實了，對MASP-2介導的凝集素途徑活化的抑制提供了改善、治療或預防腎纖維化，例如腎小管間質性炎症和纖維化的有效治療方法，而不管潛在原因如何。如本文進一步所述，在患有免疫球蛋白A腎病(IgAN)和膜性腎病(MN)的人受試者中，MASP-2抑制性抗體(OMS646)的使用有效改善腎功能並減少皮質類固醇需求。如本文進一步所述，MASP-2抑制劑的使用還可用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒例如SARS-CoV-2感染的受試者的急性呼吸窘迫症候群，並且還可用於治療、抑制、減輕或預防由流感病毒感染的受試者的急性呼吸窘迫。

【0029】 I. 定義

【0030】 除非本文具體定義，否則本文使用的所有術語具有與本發明領域的普通技術人員理解相同的含義。提供下述定義，以便提供關於術語在說明書和申請專利範圍中用於描述本發明時的明確性。

【0031】 如本文使用的，術語“MASP-2依賴性補體活化”包含凝集素途徑的MASP-2依賴性活化，其在生理條件下(即，在Ca^{++}的存在下)發生，導致凝集素途徑C3轉化酶C4b2a的形成，並且在C3切割產物C3b的積累後，隨後導致C5轉化酶C4b2a(C3b)n的形成，所述C4b2a(C3b)n已被確定為主要引起調理作用。

【0032】 如本文使用的，術語“替代途徑”指例如通過以下觸發的補體活化：來自真菌和酵母細胞壁的酵母聚糖，來自革蘭氏陰性外膜的脂多糖(LPS)和兔紅細胞，以及來自許多純多糖、兔紅細胞、病毒、細菌、動物腫瘤細胞、寄生蟲和損害細胞，並且其在傳統上已被認為起於C3b自補體因子C3的自發蛋白酶解生成。

【0033】 如本文使用的，術語“凝集素途徑”指經由血清和非血清碳水化合物結合蛋白的特異性結合而發生的補體活化，所述非血清碳水化合物結合蛋白包括甘露聚糖結合凝集素(MBL)、CL-11和纖維膠凝蛋白(H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白或L-纖維膠凝蛋白)。

【0034】 如本文使用的，術語“經典途徑”指這樣的補體活化，其通過與外來顆粒結合的抗體觸發，並且需要識別分子C1q的結合。

【0035】 如本文使用的，術語“MASP-2抑制劑”指與MASP-2結合或直接相互作用，並且有效抑制MASP-2依賴性補體活化的任何試劑，包括抗MASP-2抗體及其MASP-2結合片段、天然和合成肽、小分子、可溶性MASP-2受體、表達抑制劑和分離的天然抑制劑，並且還包括與MASP-2競爭結合凝集素途徑中

的另一種識別分子(例如MBL、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白或L-纖維膠凝蛋白)的肽，但不包括與此類其它識別分子結合的抗體。可用於本發明的方法中的MASP-2抑制劑可以使MASP-2依賴性補體活化降低大於20%，例如大於50%，例如大於90%。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑使MASP-2依賴性補體活化降低大於90%(即，導致僅10%或更少的MASP-2補體活化)。

【0036】 如本文使用的，術語“纖維化”指器官或組織中的過量結締組織的形成或存在。纖維化可能作為對刺激(如組織損傷或炎症)的修復或替換應答而發生。纖維化的標誌是過度細胞外基質的產生。對損傷的正常生理應答導致作為癒合過程的部分的結締組織沉積，但這種結締組織沉積可能持續並變得病理性，改變組織的體系結構和功能。在細胞水平下，上皮細胞和成纖維細胞增殖並分化為成肌纖維細胞，導致基質收縮、剛性增加、微血管壓縮和缺氧。

【0037】 如本文使用的，術語“治療患有或處於發展由纖維化和/或炎症引起或者因其加劇的疾病或病症的風險中的哺乳動物受試者的纖維化”，指逆轉、減輕、改善或抑制所述哺乳動物受試者的纖維化。

【0038】 如本文使用的，術語“蛋白尿”指以異常量的尿蛋白的存在，例如在來自人受試者的24小時尿收集中超過0.3g蛋白質的量，或在人受試者中多於1g/升的濃度。

【0039】 如本文使用的，術語“改善蛋白尿”或“降低蛋白尿”指與在用MASP-2抑制劑治療之前受試者的基線24小時尿蛋白排泄相比，使患有蛋白尿的受試者的24小時尿蛋白排泄降低至少20%，例如至少30%，例如至少40%，例如至少50%或更多。在一個實施方案中，根據本發明的方法用MASP-2抑制劑的治療有效降低人受試者的蛋白尿，以便實現24小時尿蛋白排泄的大於20百分

比降低，或例如24小時尿蛋白排泄的大於30百分比降低，或例如24小時尿蛋白排泄的大於40百分比降低，或例如24小時尿蛋白排泄的大於50百分比降低)。

【0040】 如本文使用的，術語“小分子”、“有機小分子”和“無機小分子”分別指這樣的分子(有機、有機金屬或無機)、有機分子和無機分子，其是天然存在的或合成的，並且具有大於約50 Da且小於約2500 Da的分子量。小有機(例如)分子可以小於約2000 Da、在約100 Da至約1000 Da之間、或在約100至約600 Da之間、或在約200至500 Da之間。

【0041】 如本文使用的，術語“抗體”包括這樣的抗體及其抗體片段，其衍生自任何產生抗體的哺乳動物(例如，小鼠、大鼠、兔和靈長類動物包括人)，或者雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達或轉基因動物(或產生抗體或抗體片段的其它方法)，並且特異性結合靶多肽，例如MASP-2、多肽或其一部分。並不預期術語“抗體”在抗體的來源、或它在其中製備的方式(例如，通過雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達、轉基因動物、肽合成等)方面受到限制。示例性抗體包括多選殖抗體、單選殖抗體和重組抗體；泛特異性、多特異性抗體(例如雙特異性抗體、三特異性抗體)；人源化抗體；鼠抗體；嵌合的、小鼠-人、小鼠-靈長類動物、靈長類動物-人單選殖抗體；以及抗獨特型抗體，並且可以是任何完整的抗體或其片段。如本文使用的，術語“抗體”不僅包括完整的多選殖抗體或單選殖抗體，還包括其片段(例如dAb、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv)、單鏈(ScFv)、其合成變體、天然存在的變體、包含具有所需特異性的抗原結合片段的抗體部分的融合蛋白、人源化抗體、嵌合抗體以及免疫球蛋白分子的任何其它修飾構型，所述免疫球蛋白分子包含具有所需特異性的抗原結合位點或片段(表位識別位點)。

【0042】“單選殖抗體”指同質的抗體群體，其中所述單選殖抗體包含涉及表位的選擇性結合的胺基酸(天然存在和非天然存在的)。單選殖抗體對於靶抗原是高度特異性的。術語“單選殖抗體”不僅包含完整的單選殖抗體和全長單選殖抗體，還包括其片段(例如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv)、單鏈(ScFv)、其變體、包含抗原結合部分的融合蛋白、人源化單選殖抗體、嵌合單選殖抗體以及免疫球蛋白分子的任何其它修飾構型，所述免疫球蛋白分子包含具有所需特異性和結合表位的能力的抗原結合片段(表位識別位點)。它並不預期在抗體的來源、或它在其中製備的方式(例如，通過雜交瘤、噬菌體選擇、重組表達、轉基因動物等)方面受到限制。該術語包括完整的免疫球蛋白，以及上文在“抗體”的定義下描述的片段等。

【0043】如本文使用的，術語“抗體片段”指衍生自全長抗體或與全長抗體有關的一部分，所述全長抗體如抗MASP-2抗體，一般包括其抗原結合區域或可變區。抗體片段的說明性實例包括Fab、Fab'、$F(ab)_2$、$F(ab')_2$和Fv片段、scFv片段、雙抗體、線性抗體、單鏈抗體分子以及由抗體片段形成的多特異性抗體。

【0044】如本文使用的，“單鏈Fv”或“scFv”抗體片段包含抗體的V_H和V_L結構域，其中這些結構域存在於單條多肽鏈中。一般地，Fv多肽進一步包含在V_H和V_L結構域之間的多肽接頭，這使得scFv能夠形成對於抗原結合所需的結構。

【0045】如本文使用的，“嵌合抗體”是重組蛋白質，其含有衍生自非人物種(例如齧齒類動物)抗體的可變結構域和互補決定區，而抗體分子的剩餘部分衍生自人抗體。

【0046】 如本文使用的，“人源化抗體”是嵌合抗體，其包含與衍生自非人免疫球蛋白的特異性互補決定區一致的最小序列，所述非互補免疫球蛋白被移植到人抗體構架內。人源化抗體通常是重組蛋白質，其中僅抗體互補決定區具有非人來源。

【0047】 如本文使用的，術語“甘露聚糖結合凝集素”("MBL")等價於甘露聚糖結合蛋白("MBP")。

【0048】 如本文使用的，“膜攻擊複合物”("MAC")指插入膜內，並破壞膜的末端五種補體組分(與C6、C7、C8和C-9組合的C5b)(也稱為C5b-9)的複合物。

【0049】 如本文使用的，“受試者”包括所有哺乳動物，包括但不限於人、非人靈長類動物、犬、貓、馬、綿羊、山羊、牛、兔、豬和齧齒類動物。

【0050】 如本文使用的，胺基酸殘基如下縮寫：丙胺酸(Ala；A)、天冬醯胺(Asn；N)、天冬胺酸(Asp；D)、精胺酸(Arg；R)、半胱胺酸(Cys；C)、麩胺酸(Glu；E)、麩醯胺(Gln；Q)、甘胺酸(Gly；G)、組胺酸(His；H)、異白胺酸(Ile；I)、白胺酸(Leu；L)、離胺酸(Lys；K)、甲硫胺酸(Met；M)、苯丙胺酸(Phe；F)、脯胺酸(Pro；P)、絲胺酸(Ser；S)、蘇胺酸(Thr；T)、色胺酸(Trp；W)、酪胺酸(Tyr；Y)和纈胺酸(Val；V)。

【0051】 在最廣泛的意義上，天然存在的胺基酸可以基於各自胺基酸的側鏈的化學特徵分成各組。“疏水性”胺基酸意指Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val、Ala、Cys或Pro。“親水性”胺基酸意指Gly、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、Arg或His。胺基酸的這種分組可以進一步如下再分類。“非荷

電的親水性”胺基酸意指Ser、Thr、Asn或Gln。“酸性”胺基酸意指Glu或Asp。“鹼性”胺基酸意指Lys、Arg或His。

【0052】 如本文使用的，術語“保守胺基酸取代”通過下述各組內的胺基酸的取代來示出：(1)甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸和異白胺酸，(2)苯丙胺酸、酪胺酸和色胺酸，(3)絲胺酸和蘇胺酸，(4)天冬胺酸和麩胺酸，(5)麩醯胺和天冬醯胺，以及(6)離胺酸、精胺酸和組胺酸。

【0053】 如本文使用的，術語“寡核苷酸”指核糖核酸(RNA)或脫氧核糖核酸(DNA)或其模擬物的寡聚物或聚合物。該術語還涵蓋由天然存在的核苷酸、糖和共價核苷間(主鏈)鍵組成的寡聚核酸鹼基(oligonucleobase)，以及具有非天然存在的修飾的寡核苷酸。

【0054】 如本文使用的，“表位”指蛋白質(例如人MASP-2蛋白)上由抗體結合的位點。“重疊表位”包括至少一個(例如，兩個、三個、四個、五個或六個)共同的胺基酸殘基，包括線性表位和非線性表位。

【0055】 如本文使用的，術語“多肽”、“肽”和“蛋白質”可互換使用，並且意指任何肽連接的胺基酸鏈，不管長度或翻譯後修飾如何。本文所述的MASP-2蛋白可以含有或可以是野生型蛋白，或者可以是具有不多於50個(例如不多於1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40或50個)保守胺基酸取代的變體。保守取代通常包括以下組內的取代：甘胺酸和丙胺酸；纈胺酸、異白胺酸和白胺酸；天冬胺酸和麩胺酸；天冬醯胺、麩醯胺、絲胺酸和蘇胺酸；離胺酸、組胺酸和精胺酸；以及苯丙胺酸和酪胺酸。

【0056】 在一些實施方案中，人MASP-2蛋白可以具有與人MASP-2蛋白等於或大於70(例如，71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、

83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100)%同一性的胺基酸序列，所述人MASP-2蛋白具有SEQ ID NO:5中所示的胺基酸序列。

【0057】 在一些實施方案中，肽片段可以是長度至少6個(例如，至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500或600個或更多個)胺基酸殘基(例如，SEQ ID NO:5的至少6個鄰接胺基酸殘基)。在一些實施方案中，人MASP-2蛋白的抗原性肽片段長度小於500個(例如，小於450、400、350、325、300、275、250、225、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7或6個)胺基酸殘基(例如，SEQ ID NO:5中任一個中小於500個鄰接胺基酸殘基)。

【0058】 胺基酸序列同一性的百分比(%)定義為：在將序列比對並在必要時引入空位，以實現最大序列同一性百分比後，候選序列中與參考序列中的胺基酸相同的胺基酸百分比。用於確定序列同一性百分比目的的比對，可以以在本領域技術內的各種方式來實現，例如，使用可公開獲得的計算機軟件，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)軟件。可以通

過已知方法來確定用於測量比對的適當參數，包括在待比較的序列的全長上實現最大比對所需的任何算法。

【0059】 II. 發明概述

【0060】 如本文所述，發明人已鑒定了凝集素途徑在腎小管腎病理狀況的啟動和疾病進展中的中心作用，從而暗示了凝集素途徑活化在不同範圍的腎疾病的病理生理學中的關鍵作用，所述腎疾病包括IgA腎病、C3腎小球病和其它腎小球腎炎。如本文進一步所述，發明人發現，對補體系統的凝集素途徑的關鍵調節劑即甘露聚糖結合凝集素相關絲胺酸蛋白酶-2(MASP-2)的抑制，顯著降低了纖維化疾病的各種動物模型中的炎症和纖維化，所述動物模型包括單側輸尿管梗阻(UUO)模型、蛋白質超負荷模型和阿黴素誘導的腎纖維化腎病模型。因此，發明人已證實了，對MASP-2介導的凝集素途徑活化的抑制提供了改善、治療或預防腎纖維化，例如小管間質性纖維化的有效治療方法，而不管潛在原因如何。如本文進一步所述，MASP-2抑制劑的使用還可用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒例如SARS-CoV-2感染的受試者的急性呼吸窘迫症候群。

【0061】 凝集素(MBL、M-纖維膠凝蛋白、H-纖維膠凝蛋白、L-纖維膠凝蛋白和CL-11)是觸發先天性補體系統的特異性識別分子，並且該系統包括凝集素啟動途徑和相關的末端途徑擴增環，其擴大了凝集素啟動的末端補體效應分子的活化。C1q是觸發獲得性補體系統的特異性識別分子，並且該系統包括經典啟動途徑和相關的末端途徑擴增環，其擴大了C1q啟動的末端補體效應分子的活化。我們將這兩個主要的補體活化系統分別稱為凝集素依賴性補體系統和C1q依賴性補體系統。

【0062】除其在免疫防禦中的必要作用之外，補體系統還在許多臨床狀況下促成組織損傷。因此，迫切需要開發治療有效的補體抑制劑，以預防這些不良作用。認識到能夠抑制凝集素介導的MASP-2途徑，同時使經典途徑保持原樣，從而意識到高度期望僅特異性抑制引起特定病理狀況的補體活化系統，而不完全關閉補體的免疫防禦能力。例如，在其中補體活化佔優勢地由凝集素依賴性補體系統介導的疾病狀態中，僅特異性抑制該系統將是有利的。這使C1q依賴性補體活化系統保持原樣，以處理免疫複合物加工，並幫助針對感染的宿主防禦。

【0063】在治療劑的開發中靶向以特異性抑制凝集素依賴性補體系統的優選蛋白質組分是MASP-2。在凝集素依賴性補體系統的所有已知蛋白質組分中(MBL、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白、L-纖維膠凝蛋白、MASP-2、C2-C9、因子B、因子D和備解素)，僅MASP-2既是凝集素依賴性補體系統所獨有的，也是該系統發揮功能所必需的。凝集素(MBL、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白、L-纖維膠凝蛋白和CL-11)也是凝集素依賴性補體系統中的獨特組分。然而，由於凝集素冗餘性，任何一種凝集素組分的喪失並不一定抑制系統的活化。有必要抑制所有五種凝集素，以便保證凝集素依賴性補體活化系統的抑制。此外，由於還已知MBL和纖維蛋白具有不依賴於補體的調理活性，因此凝集素功能的抑制將導致針對感染的這種有益的宿主防禦機制的喪失。相比之下，如果MASP-2是抑制靶，則這種補體不依賴性凝集素調理活性將保持完整。MASP-2作為抑制凝集素依賴性補體活化系統的治療靶的附加益處在於，MASP-2的血漿濃度是任何補體蛋白中最低的(≈ 500 ng/ml)；因此，相應地低濃

度的MASP-2的高親和力抑制劑可能足以獲得完全抑制(Moller-Kristensen，M.等人，J. Immunol Methods 282:159-167，2003)。

【0064】 如本文實施例14中所述，在纖維化腎臟疾病(單側輸尿管梗阻UUO)的動物模型中確定，與野生型對照動物相比，不含MASP-2基因(MASP-2-/-)的小鼠顯示出明顯更少的腎臟疾病，如通過炎症細胞浸潤(75%降低)和纖維化的組織學標記物如膠原沉積(三分之一降低)所示。如實施例15中進一步所示，與用同種型對照抗體治療的野生型小鼠相比，用抗MASP-2單選殖抗體系統治療的野生型小鼠被保護免受腎纖維化，所述MASP-2單選殖抗體選擇性地阻斷凝集素途徑，同時使經典途徑保持原樣。這些結果證實了凝集素途徑是腎臟疾病的關鍵貢獻者，並且進一步證實了阻斷凝集素途徑的MASP-2抑制劑(例如MASP-2抗體)作為抗纖維化劑是有效的。如實施例16中進一步所示，在蛋白質超負荷模型中，用牛血清白蛋白(BSA)治療的野生型小鼠發展蛋白尿性腎病，而用相同水平的BSA治療的MASP-2-/-小鼠具有降低的腎損傷。如實施例17中所示，在蛋白質超負荷模型中，用抗MASP-2單選殖抗體系統治療的野生型小鼠被保護免受腎損傷，所述MASP-2單選殖抗體選擇性地阻斷凝集素途徑，同時使經典途徑保持原樣。如實施例18中所述，與野生型小鼠相比，在阿黴素誘導的腎纖維化腎病模型中，MASP-2-/-小鼠顯示出較少的腎炎症和小管間質性損傷。如實施例19中所述，在正在進行的2期開放標簽腎試驗中，用抗MASP-2抗體治療的IgA腎病患者證實了試驗自始至終，臨床上有意義和統計上顯著的尿白蛋白/肌酐比(uACR)減少，以及從基線到治療結束在24小時尿蛋白水平的降低。如實施例19中進一步所述，在相同的2期腎試驗中，用抗MASP-2抗體治療的膜性腎病患者也證實了在治療期間的uACR降低。

【0065】 根據前述內容，本發明涉及MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體作為抗纖維化劑的用途，MASP-2抑制劑用於製造用於治療纖維化狀況的藥劑的用途，以及預防、治療、減輕或逆轉有此需要的人受試者的纖維化狀況的方法，所述方法包括將有效量的MASP-2抑制劑(例如，抗MASP-2抗體)施用於所述患者。如實施例20、21和22中所述，在用納索利單抗治療之後，在患有COVID-19有關的呼吸衰竭的患者中觀察到臨床改善，所述納索利單抗抑制MASP-2和凝集素途徑活化。如實施例21中所述，用納索利單抗治療的所有6個COVID-19患者都證實了臨床改善。在每種情況下，COVID-19肺損傷在納索利單抗治療之前已進展為ARDS，並且所有患者在治療啟動時都接受非侵入性機械通氣。其隨訪(5-6個月)數據可獲得的納索利單抗治療的COVID-19患者，並未顯示觀察到的長期後遺症的臨床或實驗室證據。如實施例22中進一步所述，用納索利單抗治療的另外的COVID-19患者也證實了臨床改善。與第一個隊列相似，在本文所述的用納索利單抗治療的這些另外COVID-19患者的任一者中，並未觀察到長期後遺症。如實施例22中進一步證實的，納索利單抗治療的患者發生適當地高滴度的抗SARS-Cov-2抗體，指示了用納索利單抗的治療並不阻礙適應性免疫應答的效應子功能。

【0066】 相應地，本發明的方法可以用於治療、抑制、減輕、預防或逆轉人受試者的冠狀病毒誘導的肺炎或急性呼吸窘迫症候群，所述人受試者患有冠狀病毒，例如患有由於SARS-CoV-2、SARS或MERS的COVID-19，如本文進一步所述。本發明的方法還可以用於治療、抑制、減輕、預防或逆轉人受試者的流感病毒誘導的肺炎或急性呼吸窘迫症候群，所述人受試者患有流感病毒，例如甲型流感病毒血清型(H1N1(引起1918年的“西班牙流感”和2009年的“豬流

感”)；H2N2(引起1957年的“亞洲流感”)、H3N2(引起1968年的“香港流感”)、H5N1(引起2004年的“禽流感”)、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9和H6N1)；或乙型流感病毒或丙型流感病毒。

【0067】 III. MASP-2在由纖維化引起或加劇的疾病和狀況中的作用

【0068】 纖維化是通常響應損害或損傷，在器官或組織中的過度結締組織形成或存在。纖維化的標誌是在損傷之後過度細胞外基質的產生。在腎臟中，纖維化表徵為在腎實質上的進行性有害的結締組織沉積，其不可避免地導致腎功能下降，而不依賴於引起原始腎臟損傷的原發性腎疾病。所謂的上皮間充質轉化(EMT)，其中腎小管上皮細胞轉化為間充質成纖維細胞的細胞特徵的變化，構成腎纖維化的首要機制。纖維化影響幾乎所有組織和器官系統，並且可能作為對刺激(如組織損傷或炎症)的修復或替換應答而發生。對損傷的正常生理應答導致結締組織的沉積，但如果這個過程變成病理性的，則高度分化的細胞通過瘢痕形成性結締組織的替換改變組織的體系結構和功能。在細胞水平下，上皮細胞和成纖維細胞增殖並分化為成肌纖維細胞，導致基質收縮、剛性增加、微血管壓縮和缺氧。目前不存在用於纖維化的有效治療或治療劑，但動物研究和傳聞性人報告兩者均提示了，纖維化組織損傷可以被逆轉(Tampe和Zeisberg，Nat Rev Nephrol，第10卷:226-237，2014)。

【0069】 許多疾病導致引起進行性器官衰竭的纖維化，包括以下的疾病：腎臟(例如，慢性腎臟疾病、IgA腎病、C3腎小球病和其它腎小球腎炎)、肺(例如，特發性肺纖維化、囊性纖維化、支氣管擴張)、肝(例如，肝硬化、非酒精性脂肪肝病)、心臟(例如，心肌梗塞、心房纖維化、瓣膜纖維化、心內膜纖維化)、大腦(例如，中風)、皮膚(例如，過度傷口癒合、硬皮病、系統性硬化、

瘢痕疙瘩)、血管系統(例如，動脈粥樣硬化性血管疾病)、腸道(例如，克羅恩氏病)、眼(例如，前囊下白內障、後囊混濁)、肌肉骨骼的軟組織結構(例如，粘連性關節囊炎、迪皮特朗氏攣縮(Dupuytren's contracture)、骨髓纖維化)、生殖器官(例如，子宮內膜異位症、佩羅尼氏病)、以及某些傳染病(例如，冠狀病毒、α病毒、丙型肝炎、乙型肝炎等)。

【0070】 儘管纖維化在許多組織和疾病中發生，但存在其病理狀況的共同分子機制和細胞機制。通過成纖維細胞的細胞外基質沉積伴隨著免疫細胞浸潤，佔優勢地為單核細胞(參見Wynn T.，Nat Rev Immunol 4(8):583-594，2004，在此引入本文作為參考)。穩固的炎症應答導致以下的表達：生長因子(TGF-β、VEGF、肝細胞生長因子、結締組織生長因子)、細胞因子和激素(內皮素、IL-4、IL-6、IL-13、趨化因子)、降解酶(彈性蛋白酶、基質金屬蛋白酶、組織蛋白酶)和細胞外基質蛋白(膠原、纖連蛋白、整聯蛋白)。

【0071】 另外，補體系統在眾多纖維化疾病中變得活化。補體組分，包括膜攻擊複合物，已在眾多纖維化組織樣本中得到鑒定。例如，凝集素途徑的組分已在以下的纖維化病變中發現：腎臟疾病(Satomura等人，Nephron. 92(3):702-4(2002)；Sato等人，Lupus 20(13):1378-86(2011)；Liu等人，Clin Exp Immunol，174(1):152-60(2013))；肝疾病(Rensen等人，Hepatology 50(6): 1809-17(2009))；以及肺疾病(Olesen等人，Clin Immunol 121(3):324-31(2006))。

【0072】 超調補體活化已被確定為免疫複合物介導的以及抗體非依賴性腎小球腎炎的關鍵貢獻者。然而，存在強有力的證據鏈，其證實了原位不受控制的補體活化在本質上涉及非腎小球疾病中的TI纖維化的病理生理進展(Quigg R.J，J Immunol 171:3319-3324，2003，Naik A.等人，Semin Nephrol 33:575-

585，2013，Mathern D.R.等人，Clin J Am Soc Nephrol 10:P1636-1650，2015)。由局部補體活化觸發的強促炎信號可以通過以下啟動：過濾到近端小管內並隨後進入間質間隙的補體組分，或者補體組分通過腎小管或其它常駐和浸潤細胞的異常合成，或者腎臟細胞上的補體調節蛋白的異常表達，或者補體調控組分中的功能突變的不存在或喪失或獲得(Mathern D.R.等人，Clin J Am Soc Nephrol 10:P1636-1650，2015，Sheerin N.S.等人，FASEB J 22: 1065-1072，2008)。例如，在小鼠中，補體調節蛋白CR1相關基因/蛋白y(Crry)的缺陷，導致小管間質性(TI)補體活化，伴隨人TI疾病中可見的後續炎症和損傷典型的纖維化(Naik A.等人，Semin Nephrol 33:575-585，2013，Bao L.等人，J Am Soc Nephrol 18:811-822，2007)。腎小管上皮細胞暴露於過敏毒素C3a導致上皮間充質轉化(Tsang Z.等人，J Am Soc Nephrol 20:593-603，2009)。經由單獨的C3a受體阻斷C3a信號傳導最近已顯示減輕蛋白尿和非蛋白尿動物的腎TI纖維化(Tsang Z.等人，J Am Soc Nephrol 20:593-603，2009，Bao L.等人，Kidney Int. 80: 524-534，2011)。

【0073】 如本文所述，發明人已鑒定了凝集素途徑在腎小管腎病理狀況的啟動和疾病進展中的中心作用，從而暗示了凝集素途徑活化在不同範圍的腎疾病的病理生理學中的關鍵作用，所述腎疾病包括IgA腎病、C3腎小球病和其它腎小球腎炎(Endo M.等人，Nephrol Dialysis Transplant 13: 1984-1990，1998；Hisano S.等人，Am J Kidney Dis 45:295-302，2005；Roos A.等人，J Am Soc Nephrol 17: 1724-1734，2006；Liu L.L.等人，Clin Exp. Immunol 174:152-160，2013；Lhotta K.等人，Nephrol Dialysis Transplant 14:881-886，1999；Pickering等人，Kidney International 84:1079-1089，2013)、糖尿病性腎病(Hovind P.等

人，Diabetes 54:1523-1527，2005)、缺血性再灌注損傷(Asgari E.等人，FASEB J 28:3996-4003，2014)和移植排斥(Berger S.P.等人，Am J Transplant 5:1361-1366，2005)。

【0074】 如本文進一步所述，發明人已證實了MASP-2抑制降低了小管間質性疾病的小鼠模型中的炎症和纖維化。因此，預計MASP-2抑制劑可用於治療腎纖維化，包括小管間質性炎症和纖維化、蛋白尿、IgA腎病、C3腎小球病和其它腎小球腎炎和腎缺血再灌注損傷。

【0075】 肺疾病

【0076】 肺纖維化是肺中的過度纖維結締組織的形成或發展，其中正常的肺組織被纖維化組織替換。這種瘢痕形成導致肺僵硬，並且損傷肺部結構和功能。在人中，肺纖維化被認為起因於對肺中的微小氣囊(肺泡)內和之間的組織的反復損傷。在實驗設置下，各種動物模型已複製了人疾病的各個方面。例如，可以將外來試劑如博來黴素、異硫氰酸熒光素、二氧化矽或石棉滴注到動物的氣管內(Gharaee-Kermani等人，Animal Models of Pulmonary Fibrosis. Methods Mol. Med.，2005，117:251-259)。

【0077】 相應地，在某些實施方案中，本公開內容提供了抑制患有肺疾病或病症的受試者的肺纖維化的方法，所述肺疾病或病症由纖維化和/或炎症引起或者因纖維化和/或炎症而加劇，例如冠狀病毒誘導的ARDS，該方法包括將MASP-2抑制劑，例如MASP-2抑制性抗體施用於有此需要的受試者。該方法包括施用包含有效抑制肺纖維化、減少肺纖維化和/或改善肺功能的量的MASP-2抑制劑的組合物。肺功能的症狀的改善包括肺功能和/或容量的改善、疲勞的減少以及氧飽和度的改善。

【0078】 MASP-2抑制性組合物可以局部施用於纖維化的區域，例如在手術或局部注射期間，通過直接或遠程(例如通過導管)局部施加該組合物。可替代地，可以將MASP-2抑制劑全身性地施用於受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、經鼻、皮下或其它腸胃外施用，或潛在地通過關於非肽能試劑的經口施用。施用可以如通過醫生確定的進行重複，直到狀況已消退或得到控制。

【0079】 在某些實施方案中，MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)，與對於潛在的肺疾病或狀況適當的一種或多種試劑或治療模式組合進行施用。

【0080】 傳染病

【0081】 傳染病如冠狀病毒以及慢性傳染病如丙型肝炎和乙型肝炎引起組織炎症和纖維化，並且高凝集素途徑活性可能是有害的。在此類疾病中，MASP-2的抑制劑可能是有益的。例如，發現MBL和MASP-1水平是丙型肝炎病毒(HCV)感染中的肝纖維化嚴重性的重要預測物(Brown等人，Clin Exp Immunol. 147(1):90-8，2007；Saadanay等人，Arab J Gastroenterol. 12(2):68-73，2011；Saeed等人，Clin Exp Immunol. 174(2):265-73，2013)。MASP-1先前已顯示為MASP-2和凝集素途徑的有力活化劑(Megyeri等人，J Biol Chem. 29: 288(13):8922-34，2013)。α病毒如基孔肯雅病毒和羅斯河病毒誘導強宿主炎症應答，導致關節炎和肌炎，並且這種病理狀況由MBL和凝集素途徑介導(Gunn等人，PLoS Pathog. 8(3):e1002586，2012)。

【0082】 相應地，在某些實施方案中，本公開內容提供了預防、治療、逆轉、抑制和/或降低受試者的纖維化和/或炎症的方法，所述受試者患有或先

前已患有引起炎症和/或纖維化的傳染病，例如冠狀病毒或流感病毒，該方法包括將MASP-2抑制劑，例如MASP-2抑制性抗體施用於有此需要的受試者。

【0083】 MASP-2抑制性組合物可以局部施用於纖維化的區域，例如在手術或局部注射期間，通過直接或遠程(例如通過導管)局部施加該組合物。可替代地，可以將MASP-2抑制劑全身性地施用於受試者，例如通過動脈內、靜脈內、肌內、吸入、經鼻、皮下或其它腸胃外施用，或潛在地通過關於非肽能試劑的經口施用。施用可以如通過醫生確定的進行重複，直到狀況已消退或得到控制。

【0084】 在某些實施方案中，MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)，與對於潛在的傳染病適當的一種或多種試劑或治療模式組合進行施用。例如，在一些實施方案中，可以用包括一種或多種MASP-2抑制劑的試劑組合來治療診斷有COVID-19的患者，所述試劑組合例如包含抗病毒劑(例如瑞德西韋)和一種或多種MASP-2抑制劑的組合。試劑可以以任何合適的順序，例如序貫地或同時地施用。

【0085】 在一些實施方案中，引起炎症和/或纖維化的傳染病選自冠狀病毒、α病毒、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、結核病、HIV和流感。

【0086】 在某些實施方案中，MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體或MASP-2抑制性小分子化合物)，與對於潛在的疾病或病症適當的一種或多種試劑或治療模式組合進行施用。

【0087】 在本文描述的各種方法和藥物組合物的任一種的某些實施方案中，MASP-2抑制性抗體或小分子化合物選擇性地阻斷凝集素途徑，同時使經典途徑保持原樣。

【0088】 IV. MASP-2抑制劑

【0089】 在各個方面，本發明提供了抑制纖維化和/或炎症的不良作用的方法，其包括將MASP-2抑制劑施用於有此需要的受試者。MASP-2抑制劑以有效抑制活受試者的MASP-2依賴性補體活化的量進行施用。在本發明的這個方面的實踐中，代表性的MASP-2抑制劑包括：抑制MASP-2的生物活性的分子(例如小分子抑制劑、抗MASP-2抗體(例如，MASP-2抑制性抗體)、或者與MASP-2相互作用或干擾蛋白質-蛋白質相互作用的阻斷肽)、以及減少MASP-2表達的分子(例如MASP-2反義核酸分子、MASP-2特異性RNAi分子和MASP-2核酶)，從而阻止MASP-2活化凝集素補體途徑。MASP-2抑制劑可以單獨用作主要療法，或與其它治療劑組合用作輔助療法，以增強其它醫學治療的治療益處。

【0090】 對MASP-2依賴性補體活化的抑制的特徵在於，補體系統組分的下述變化中的至少一種，所述變化由於根據本發明的方法施用MASP-2抑制劑而發生：MASP-2依賴性補體活化系統產物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9(MAC)的生成或產生的抑制(例如，如實施例2中所述測量的)、C4切割和C4b沉積的降低(例如，如實施例2中所述測量的)、或者C3切割和C3b沉積的降低(例如，如實施例2中所述測量的)。

【0091】 根據本發明，利用了MASP-2抑制劑，其有效抑制由冠狀病毒如SARS-CoV-2感染的受試者的呼吸窘迫(或換言之，改善呼吸功能)。

【0092】 呼吸功能的評價可以定期例如每小時、每天、每週或每月進行。這種評價優選地對於給定受試者在幾個時間點進行，或者對於給定受試者和健康對照在一個或幾個時間點進行。評價可以以規律的時間間隔例如每小

時、每天、每週或每月進行。當一項評價已導致呼吸窘迫減少(即，呼吸功能增加)的發現時，MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體，被說成有效治療患有冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群的受試者。

【0093】 可用於本發明的這個方面的實踐中的MASP-2抑制劑包括例如MASP-2抗體及其片段、MASP-2抑制性肽、小分子、MASP-2可溶性受體和表達抑制劑。MASP-2抑制劑可以通過阻斷MASP-2的生物學功能，來抑制MASP-2依賴性補體活化系統。例如，抑制劑可以有效地阻斷MASP-2蛋白質-蛋白質相互作用，干擾MASP-2二聚化或組裝，阻斷Ca^{2+}結合，干擾MASP-2絲胺酸蛋白酶活性位點，或可能降低MASP-2蛋白表達。

【0094】 在一些實施方案中，MASP-2抑制劑選擇性地抑制MASP-2補體活化，使C1q依賴性補體活化系統在功能上保持原樣。

【0095】 在一個實施方案中，可用於本發明的方法中的MASP-2抑制劑是與包含SEQ ID NO:6的多肽特異性結合的特異性MASP-2抑制劑，其親和力是與補體系統中的其它抗原的至少十倍。在另一個實施方案中，MASP-2抑制劑與包含SEQ ID NO:6的多肽特異性結合，其親和力是與補體系統中的其它抗原的至少100倍。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑與以下中的至少一種特異性結合：(i)CCP1-CCP2結構域(SEQ ID NO:6的aa 300-431)或MASP-2的絲胺酸蛋白酶結構域(SEQ ID NO:6的aa 445-682)，並且抑制MASP-2依賴性補體活化。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是與MASP-2特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。MASP-2抑制劑的結合親和力可以使用合適的結合測定進行確定。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑抑制90%人血清中的C3b沉積，其IC_{50}為30 nM或更小。

【0096】 MASP-2多肽顯示出類似於MASP-1、MASP-3、以及C1r和C1s(C1補體系統的蛋白酶)的分子結構。SEQ ID NO:4中所示的cDNA分子編碼MASP-2的代表性實例(由SEQ ID NO:5中所示的胺基酸序列組成)，並且提供了具有前導序列(aa 1-15)的人MASP-2多肽，所述前導序列在分泌後被切割，導致成熟形式的人MASP-2(SEQ ID NO:6)。如圖2中所示，人MASP 2基因包含十二個外顯子。人MASP-2 cDNA由外顯子B、C、D、F、G、H、I、J、K和L編碼。可變剪接導致20 kDa蛋白，稱為MBL相關蛋白19("MAp19"，也稱為"sMAP")(SEQ ID NO:2)，由(SEQ ID NO:1)編碼，起於外顯子B、C、D和E，如圖2中所示。SEQ ID NO:50中所示的cDNA分子編碼鼠MASP-2(由SEQ ID NO:51中所示的胺基酸序列組成)，並且提供了具有前導序列的鼠MASP-2多肽，所述前導序列在分泌後被切割，導致成熟形式的鼠MASP-2(SEQ ID NO:52)。SEQ ID NO:53中所示的cDNA分子編碼大鼠MASP-2(由SEQ ID NO:54中所示的胺基酸序列組成)，並且提供了具有前導序列的大鼠MASP-2多肽，所述前導序列在分泌後被切割，導致成熟形式的大鼠MASP-2(SEQ ID NO:55)。

【0097】 本領域技術人員將認識到，SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:53中公開的序列分別代表人、鼠和大鼠MASP-2的單個等位基因，並且預計發生等位基因變異和可變剪接。SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:53中所示的核苷酸序列的等位基因變體，包括含有沉默突變的等位基因變體、以及其中突變導致胺基酸序列變化的等位基因變體，在本發明的範圍內。MASP-2序列的等位基因變體可以根據標準程序，通過探測來自不同個體的cDNA或基因組文庫進行選殖。

【0098】 人MASP-2蛋白(SEQ ID NO:6)的結構域顯示於圖1和2A中，並且包括N末端C1r/C1s/海膽Vegf/骨形態發生蛋白(CUBI)結構域(SEQ ID NO:6的aa 1-121)、表皮生長因子樣結構域(aa 122-166)、第二CUBI結構域(aa 167-293)、以及串聯的補體控制蛋白結構域和絲胺酸蛋白酶結構域。MASP 2基因的可變剪接導致圖1中所示的MAp19。MAp19是非酶促蛋白，其含有MASP-2的N末端CUBI-EGF區域，伴隨衍生自外顯子E的四個另外殘基(EQSL)，如圖1中所示。

【0099】 幾種蛋白質已顯示通過蛋白質-蛋白質相互作用與MASP-2結合或相互作用。例如，已知MASP-2與凝集素蛋白MBL、H-纖維膠凝蛋白和L-纖維膠凝蛋白結合，並且與之形成Ca^{2+}依賴性複合物。每種MASP-2/凝集素複合物已顯示了，通過蛋白質C4和C2的MASP-2依賴性切割來活化補體(Ikeda，K.等人，J. Biol. Chem. 262:7451-7454，1987；Matsushita，M.等人，J. Exp. Med. 176:1497-2284，2000；Matsushita，M.等人，J. Immunol. 168:3502-3506，2002)。研究已顯示了，MASP-2的CUBI-EGF結構域對於MASP-2與MBL的結合是必要的(Thielens，N.M.等人，J. Immunol. 166:5068，2001)。還已顯示了CUBIEGFCUBII結構域介導MASP-2的二聚化，其為活性MBL複合物形成所必需的(Wallis，R.等人，J. Biol. Chem. 275:30962-30969，2000)。因此，可以鑒定MASP-2抑制劑，其結合或干擾已知對於MASP-2依賴性補體活化重要的MASP-2靶區域。

【0100】 抗MASP-2抗體

【0101】 在本發明的這個方面的一些實施方案中，MASP-2抑制劑包含抑制MASP-2依賴性補體活化系統的抗MASP-2抗體。可用於本發明的這個方面中

的抗MASP-2抗體包括衍生自任何產生抗體的哺乳動物的多選殖抗體、單選殖抗體或重組抗體，並且可以是多特異性的、嵌合的、人源化的、抗獨特型的和抗體片段。抗體片段包括如本文進一步所述的Fab、Fab'、$F(ab)_2$、$F(ab')_2$、Fv片段、scFv片段和單鏈抗體。

【0102】 使用本文所述的測定，可以就抑制MASP-2依賴性補體活化系統的能力和抗纖維化活性、和/或抑制與蛋白尿或阿黴素誘導的腎病相關的腎損害的能力，來篩選MASP-2抗體。幾種MASP-2抗體已在文獻中進行描述，並且一些已是新近生成的，其中一些在下表1中列出。例如，如本文的實施例10和11中所述，已鑒定了阻斷MASP-2依賴性補體活化的抗MASP-2 Fab2抗體。如實施例12中所述以及在此引入本文作為參考的WO2012/151481中所述，已鑒定了阻斷MASP-2依賴性補體活化的全人MASP-2 scFv抗體(例如，OMS646)。如實施例13中所述以及在此引入本文作為參考的WO2014/144542中所述，通過將SGMI-2肽胺基酸序列(SEQ ID NO:72、73或74)融合到人MASP-2抗體(例如，OMS646-SGMI-2)的重鏈和/或輕鏈的胺基或羧基末端上，來生成具有MASP-2抑制活性的荷有SGMI-2肽的MASP-2抗體及其片段。

【0103】 相應地，在一個實施方案中，用於本發明的方法中的MASP-2抑制劑包含人抗體，例如OMS646。相應地，在一個實施方案中，用於本發明的組合物和方法中的MASP-2抑制劑包含人抗體，其結合由人MASP-2(SEQ ID NO:6)組成的多肽，其中所述抗體包括：(I)(a)重鏈可變區，其包含：i)包含來自SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii)包含來自SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii)包含來自SEQ ID NO:67的95-107的胺基酸序列的重鏈CDR-H3，以及b)輕鏈可變區，其包含：i)包含來自

SEQ ID NO:69的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii)包含來自SEQ ID NO:69的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii)包含來自SEQ ID NO:69的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3，或(II)其變體，其包含與SEQ ID NO:67具有90%的同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的同一性)的重鏈可變區，以及與SEQ ID NO:69具有90%的同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的同一性)的輕鏈可變區。

【0104】 在一些實施方案中，該方法包括向受試者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體包括包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區、以及包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

【0105】 在一些實施方案中，該方法包括向受試者施用包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體特異性識別人MASP-2上由參考抗體OMS646識別的表位的至少一部分，所述參考抗體OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重鏈可變區和如SEQ ID NO:69中所示的輕鏈可變區。在一個實施方案中，用於本發明的方法中的MASP-2抑制劑包含人抗體OMS646。

【0106】 表1：示例性的MASP-2特異性抗體

抗原	抗體類型	參考文獻
重組 MASP-2	大鼠多選殖的	Peterson，S.V.等人，*Mol. Immunol.* 37:803-811，2000
重組人 CCP1/2-SP 片段(MoAb 8B5)	大鼠 MoAb (亞類 IgG1)	Moller-Kristensen，M.等人，*J. of Immunol. Methods* 282:159-167，2003
重組人 MAp19(MoAb 6G12)(與 MASP-2 交叉反應)	大鼠 MoAb (亞類 IgG1)	Moller-Kristensen，M.等人，*J. of Immunol. Methods* 282:159-167，2003
hMASP-2	小鼠 MoAb(S/P) 小鼠 MoAb(N 末端)	Peterson，S.V.等人，*Mol. Immunol.* 35:409，April 1998
hMASP-2(CCP1-CCP2-SP 結構域	大鼠 MoAb: Nimoab101，由雜交瘤細胞系 03050904(ECACC)產生	WO 2004/106384

抗原	抗體類型	參考文獻
hMASP-2(全長-加上 his 標簽的)	鼠 MoAb：NimoAb104，由雜交瘤細胞系 M0545YM035(DSMZ) 產生 NimoAb108，由雜交瘤細胞系 M0545YM029(DSMZ) 產生 NimoAb109，由雜交瘤細胞系 M0545YM046(DSMZ) 產生 NimoAb110，由雜交瘤細胞系 M0545YM048(DSMZ) 產生	WO 2004/106384
大鼠 MASP-2(全長)	MASP-2 Fab2 抗體片段	實施例 10
hMASP-2(全長)	全人 scFv 選殖	實施例 12 和 WO2012/151481
hMASP-2(全長)	荷有 SGMI-2 肽的 MASP-2 抗體	實施例 13 和 WO2014/144542

【0107】 具有降低的效應子功能的抗MASP-2抗體

【0108】 在本發明的這個方面的一些實施方案中，抗MASP-2抗體具有降低的效應子功能，以便降低可能起於經典補體途徑的活化的炎症。IgG分子觸發經典補體途徑的能力已顯示位於分子的Fc部分內(Duncan，A.R.等人，Nature 332:738-740 1988)。已通過酶促切割去除分子的Fc部分的IgG分子缺乏這種效應

子功能(參見Harlow，Antibodies: A Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory，New York，1988)。相應地，通過具有使效應子功能降到最低的遺傳改造的Fc序列、或者具有人IgG_2或IgG_4同種型，由於缺少分子的Fc部分而生成具有降低的效應子功能的抗體。

【0109】 如本文所述以及在Jolliffe等人，Int'l Rev. Immunol. 10:241-250，1993、和Rodrigues等人，J. Immunol. 151:6954-6961，1998中所述，可以通過IgG重鏈的Fc部分的標準分子生物學操作，來產生具有降低的效應子功能的抗體。具有降低的效應子功能的抗體還包括人IgG2和IgG4同種型，其具有降低的活化補體和/或與Fc受體相互作用的能力(Ravetch，J.V.等人，Annu. Rev. Immunol. 9:457-492，1991；Isaacs，J.D.等人，J. Immunol. 148:3062-3071，1992；van de Winkel，J.G.等人，Immunol. Today 14:215-221，1993)。可以通過本領域普通技術人員之一已知的幾種方法之一，來產生由IgG2或IgG4同種型組成的對人MASP-2特異性的人源化抗體或全人抗體，如Vaughan，T.J.等人，Nature Biotechnical 16:535-539，1998中所述。

【0110】 抗MASP-2抗體的產生

【0111】 可以使用MASP-2多肽(例如全長MASP-2)、或使用荷有抗原性MASP-2表位的肽(例如MASP-2多肽的一部分)，來產生抗MASP-2抗體。免疫原性肽可以小至五個胺基酸殘基。例如，包括SEQ ID NO:6的整個胺基酸序列的MASP-2多肽，可以用於誘導可用於本發明的方法中的抗MASP-2抗體。已知涉及蛋白質-蛋白質相互作用的特定MASP-2結構域，例如CUBI和CUBIEGF結構域，以及包含絲胺酸蛋白酶活性位點的區域，可以如實施例3中所述的作為重組多肽進行表達，並且用作抗原。另外，包含MASP-2多肽(SEQ ID NO:6)的至

少6個胺基酸的一部分的肽也可用於誘導MASP-2抗體。下表2中提供了可用於誘導MASP-2抗體的MASP-2衍生抗原的另外實例。用於產生抗體的MASP-2肽和多肽可以作為天然多肽、或者重組肽或合成肽、以及無催化活性的重組多肽如MASP-2A進行分離，如本文進一步所述。在本發明的這個方面的一些實施方案中，使用如本文所述的轉基因小鼠品系來獲得抗MASP-2抗體。

【0112】 可用於產生抗MASP-2抗體的抗原還包括融合多肽，例如MASP-2或其一部分與免疫球蛋白多肽或麥芽糖結合蛋白的融合物。多肽免疫原可以是全長分子或其一部分。如果多肽部分是半抗原樣的，則此類部分可以有利地結合或連接至大分子載體(例如鑰孔血藍蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或破傷風類毒素)用於免疫。

【0113】 表2：MASP-2衍生的抗原

SEQ ID NO:	胺基酸序列
SEQ ID NO:6	人 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:51	鼠 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:8	人 MASP-2 的 CUBI 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	人 MASP-2 的 CUBIEGF 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	人 MASP-2 的 CUBIEGFCUBII 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	人 MASP-2 的 EGF 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 122-166)
SEQ ID NO:12	人 MASP-2 的絲胺酸蛋白酶結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 429-671)
SEQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	絲胺酸蛋白酶失活的突變體形式(具有突變的 Ser 618 的 SEQ ID NO:6 的 aa 610-625)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	人 CUBI 肽

SEQ ID NO:	胺基酸序列
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDL ELSHLCEYDFVKLSSGA KVLATLCGQ	人CUBI肽
SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	人CUBI結構域中的MBL結合區
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNE KPFTGF	人CUBI結構域中的MBL結合區
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	EGF肽
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSC RGDSGGALV	來自絲胺酸蛋白酶活性位點的肽

【0114】 多選殖抗體

【0115】 可以使用本領域普通技術人員眾所周知的方法，通過用MASP-2多肽或其免疫原性部分免疫動物，來製備針對MASP-2的多選殖抗體。參見例如，Green等人，"Production of Polyclonal Antisera," 於Immunochemical Protocols(Manson，編輯)，第105頁。MASP-2多肽的免疫原性可以通過使用佐劑包括礦物凝膠得到增加，所述佐劑如氫氧化鋁或弗氏佐劑(完全或不完全)、表面活性物質如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚陰離子、油乳劑、鑰孔血藍蛋白和二硝基苯酚。多選殖抗體通常在動物中產生，所述動物例如馬、牛、犬、雞、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、山羊或綿羊。可替代地，可用於本發明中的抗MASP-2抗體也可以衍生自類人猴。用於在狒狒中產生診斷和治療上有用的抗體的一般技術可以例如在Goldenberg等人，國際專利公開號WO 91/11465，以

及Losman，M.J.等人，Int. J. Cancer 46:310，1990中找到。然後使用本領域眾所周知的標準程序，從此類免疫動物的血液產生含有免疫活性抗體的血清。

【0116】 單選殖抗體

【0117】 在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是抗MASP-2單選殖抗體。抗MASP-2單選殖抗體是高度特異性的，針對單個MASP-2表位。如本文使用的，修飾語“單選殖”指示抗體的特徵為得自基本上同質的抗體群體，並且不應解釋為要求通過任何特定方法的抗體產生。單選殖抗體可以使用任何技術來獲得，所述技術提供了通過培養中的連續細胞系的抗體分子產生，例如通過Kohler，G.等人，Nature 256:495，1975描述的雜交瘤方法，或者它們可以通過重組DNA方法(參見例如，授予Cabilly的美國專利號4,816,567)進行製備。也可以使用Clackson，T.等人，Nature 352:624-628，1991，以及Marks，J.D.等人，J. Mol. Biol. 222:581-597，1991中描述的技術，從噬菌體抗體文庫中分離單選殖抗體。此類抗體可以具有任何免疫球蛋白類別，包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及其任何亞類。

【0118】 例如，可以通過用包含MASP-2多肽或其一部分的組合物注射合適的哺乳動物(例如BALB/C小鼠)，來獲得單選殖抗體。在預定的時間段後，將脾細胞從小鼠中取出，並且懸浮於細胞培養基中。然後將脾細胞與永生細胞系融合，以形成雜交瘤。所形成的雜交瘤在細胞培養物中生長，並且就其產生針對MASP-2的單選殖抗體的能力進行篩選。本文提供了進一步描述抗MASP-2單選殖抗體的產生的實例(還參見Current Protocols in Immunology，第1卷，John Wiley & Sons，第2.5.1-2.6.7頁，1991。)

【0119】 人單選殖抗體可以通過使用轉基因小鼠來獲得，所述轉基因小鼠已進行改造，以響應抗原攻擊而產生特異性人抗體。在該技術中，將人免疫球蛋白重鏈和輕鏈基因座的元件引入衍生自胚胎幹細胞系的小鼠品系內，所述胚胎幹細胞系含有內源性免疫球蛋白重鏈和輕鏈基因座的靶向破壞。轉基因小鼠可以合成對於人抗原，例如本文所述的MASP-2抗原特異性的人抗體，並且可以通過使用常規的Kohler-Milstein技術，將來自此類動物的B細胞與合適的骨髓瘤細胞系融合，將小鼠用於產生分泌人MASP-2抗體的雜交瘤，如本文進一步所述。具有人免疫球蛋白基因組的轉基因小鼠是商購可得的(例如，來自Abgenix，Inc.，Fremont，CA和Medarex，Inc.，Annandale，N.J.)。用於從轉基因小鼠中獲得人抗體的方法例如由Green，L.L.等人，Nature Genet. 7:13，1994；Lonberg，N.等人，Nature 368:856，1994；以及Taylor，L.D.等人，Int. Immun. 6:579，1994進行描述。

【0120】 可以通過各種充分確立的技術，從雜交瘤培養物中分離且純化單選殖抗體。此類分離技術包括用蛋白A瓊脂糖的親和層析、尺寸排阻層析和離子交換層析(參見例如，Coligan在第2.7.1-2.7.12頁和第2.9.1-2.9.3頁上；Baines等人，"Purification of Immunoglobulin G(IgG)," 於Methods in Molecular Biology，The Humana Press，Inc.，第10卷，第79-104頁，1992)。

【0121】 一旦產生，首先就特異性MASP-2結合測試多選殖抗體、單選殖抗體或噬菌體衍生的抗體。可以利用本領域技術人員已知的各種測定，來檢測與MASP-2特異性結合的抗體。示例性測定包括通過標準方法(例如，如Ausubel等人中所述)的蛋白質印跡或免疫沉澱分析、免疫電泳、酶聯免疫吸附測定、斑點印跡、抑制或競爭測定和夾心測定(如Harlow和Land，Antibodies: A

Laboratory Manual，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1988中所述)。一旦鑒定了與MASP-2特異性結合的抗體，就在幾種測定之一中測試抗MASP-2抗體充當MASP-2抑制劑的能力，所述測定例如凝集素特異性C4切割測定(實施例2中所述)、C3b沉積測定(實施例2中所述)、或C4b沉積測定(實施例2中所述)。

【0122】 抗MASP-2單選殖抗體的親和力可以通過本領域普通技術人員容易地確定(參見例如，Scatchard，A.，NY Acad. Sci. 51:660-672，1949)。在一個實施方案中，可用於本發明的方法中的抗MASP-2單選殖抗體與MASP-2結合，其結合親和力<100 nM，優選<10 nM且最優選<2 nM。

【0123】 嵌合/人源化抗體

【0124】 可用於本發明的方法中的單選殖抗體包括嵌合抗體，其中重鏈和/或輕鏈的一部分與衍生自特定物種或者屬特定抗體類別或亞類的抗體中的相應序列相同或同源，而鏈的剩餘部分與衍生自另一個物種或者屬另一個抗體類別或亞類的抗體、以及此類抗體的片段中的相應序列相同或同源(授予Cabilly的美國專利號4,816,567；以及Morrison，S.L.等人，Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855，1984)。

【0125】 可用於本發明中的嵌合抗體的一種形式是人源化的單選殖抗MASP-2抗體。非人(例如鼠)抗體的人源化形式是嵌合抗體，其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。通過將非人(例如小鼠)互補決定區(CDR)，從小鼠免疫球蛋白的重鏈和輕鏈可變區轉移到人可變結構域內，來產生人源化的單選殖抗體。通常，然後在非人配對物的構架區中取代人抗體的殘基。此外，人源化抗體可以包含在受體抗體或供體抗體中未發現的殘基。製備這些修飾以進一步完善抗體性能。一般而言，人源化抗體將包含至少一個可變結構域，且通常為兩

個可變結構域的基本上全部，其中高變環的全部或基本上全部對應於非人免疫球蛋白的高變環，並且Fv構架區的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的Fv構架區。人源化抗體任選地還包含免疫球蛋白恒定區(Fc)的至少一部分，通常為人免疫球蛋白的恒定區。關於進一步細節，參見Jones，P.T.等人，Nature 321:522-525，1986；Reichmann，L.等人，Nature 332:323-329，1988；以及Presta，Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596，1992。

【0126】 可用於本發明中的人源化抗體包括至少包括MASP-2結合CDRH3區的人單選殖抗體。另外，可以這樣替換Fc部分，以便產生IgA或IgM以及人IgG抗體。此類人源化抗體將具有特定的臨床效用，因為它們將特異性識別人MASP-2，但不在人中引發針對抗體本身的免疫應答。因而，它們更適合於人中的體內施用，尤其是在需要重複施用或長期施用時。

【0127】 在本文實施例6中提供了從鼠抗MASP-2單選殖抗體生成人源化抗MASP-2抗體的實例。用於產生人源化的單選殖抗體的技術也例如通過以下進行描述：Jones，P.T.等人，Nature 321:522，1986；Carter，P.等人，Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:4285，1992；Sandhu，J.S.，Crit. Rev. Biotech. 12:437，1992；Singer，I.I.等人，J. Immun. 150:2844，1993；Sudhir(編輯)，Antibody Engineering Protocols，Humana Press，Inc.，1995；Kelley，"Engineering Therapeutic Antibodies," 於Protein Engineering: Principles and Practice，Cleland等人(編輯)，John Wiley & Sons，Inc.，第399-434頁，1996；以及授予Queen的美國專利號 5,693,762，1997。另外，存在從特異性鼠抗體區域合成人源化抗體的商業實體，例如Protein Design Labs(Mountain View，CA)。

【0128】 重組抗體

【0129】 抗MASP-2抗體也可以使用重組方法進行製備。例如，可以使用人免疫球蛋白表達文庫(例如，可得自Stratagene，Corp.，La Jolla，CA)製備人抗體，以產生人抗體的片段(V_H、V_L、Fv、Fd、Fab或$F(ab')_2$)。然後使用類似於產生嵌合抗體的技術，將這些片段用於構建完整的人抗體。

【0130】 抗獨特型抗體

【0131】 一旦鑒定了具有所需抑制活性的抗MASP-2抗體，就可以使用本領域眾所周知的技術，將這些抗體用於生成類似MASP-2的一部分的抗獨特型抗體。參見例如，Greenspan，N.S.等人，FASEB J. 7:437，1993。例如，與MASP-2結合並競爭性抑制補體活化所需的MASP-2蛋白相互作用的抗體，可以用於生成抗獨特型，其類似MASP-2蛋白上的MBL結合位點，並且因此結合並中和MASP-2的結合配體，例如MBL。

【0132】 免疫球蛋白片段

【0133】 可用於本發明的方法中的MASP-2抑制劑不僅包含完整的免疫球蛋白分子，還包含眾所周知的片段，包括Fab、Fab'、$F(ab)_2$、$F(ab')_2$和Fv片段、scFv片段、雙抗體、線性抗體、單鏈抗體分子以及由抗體片段形成的多特異性抗體。

【0134】 本領域眾所周知的是，抗體分子的僅一小部分，對位(paratope)，涉及抗體與其表位的結合(參見例如，Clark，W.R.，The Experimental Foundations of Modern Immunology，Wiley & Sons，Inc.，NY，1986)。抗體的pFc'和Fc區是經典補體途徑的效應子，但不涉及抗原結合。pFc'區已從其中酶促切割、或已產生不含pFc'區的抗體被指定為$F(ab')_2$片段，並且保留了完整抗體的兩個抗原結合位點。分離的$F(ab')_2$片段由於其兩個抗原結合

位點而被稱為二價單選殖片段。類似地，Fc區已從其中酶促切割、或已產生不含Fc區的抗體被指定為Fab片段，並且保留了完整抗體分子的抗原結合位點之一。

【0135】抗體片段可以通過蛋白酶解水解，例如通過常規方法通過完整抗體的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化來獲得。例如，抗體片段可以通過用胃蛋白酶酶促切割抗體來產生，以提供表示為$F(ab')_2$的5S片段。這種片段可以使用硫醇還原劑進一步切割，以產生3.5S Fab'單價片段。任選地，可以使用起因於二硫鍵合切割的巰基的保護基團，來執行切割反應。作為替代方案，使用胃蛋白酶的酶促切割直接產生兩個單價Fab片段和一個Fc片段。這些方法在例如以下中進行描述：授予Goldenberg的美國專利號4,331,647；Nisonoff，A.等人，Arch. Biochem. Biophys. 89:230，1960；Porter，R.R.，Biochem. J. 73:119，1959；Edelman等人，於Methods in Enzymology 1:422，Academic Press，1967；以及通過Coligan在第2.8.1-2.8.10和2.10.-2.10.4頁。

【0136】在一些實施方案中，優選使用缺少Fc區的抗體片段，以避免經典補體途徑的活化，所述經典補體途徑在Fc與Fcγ受體結合後啟動。存在通過其可以產生避免Fcγ受體相互作用的MoAb的幾種方法。例如，單選殖抗體的Fc區可以使用通過蛋白水解酶的部分消化(例如，無花果酶消化)進行化學去除，從而生成例如抗原結合抗體片段，例如Fab或$F(ab)_2$片段(Mariani，M.等人，Mol. Immunol. 28:69-71，1991)。可替代地，可以在如本文所述的人源化抗體的構建期間，使用不結合Fcγ受體的人γ4 IgG同種型。缺少Fc結構域的抗體、單鏈抗體和抗原結合結構域，也可以使用本文所述的重組技術進行改造。

【0137】單鏈抗體片段

【0138】 可替代地，可以產生對於MASP-2特異性的單一肽鏈結合分子，其中重鏈和輕鏈Fv區是連接的。Fv片段可以通過肽接頭連接，以形成單鏈抗原結合蛋白(scFv)。通過構建包含DNA序列的結構基因來製備這些單鏈抗原結合蛋白，所述DNA序列編碼通過寡核苷酸連接的V_H和V_L結構域。將結構基因插入表達載體內，隨後將所述表達載體引入宿主細胞，例如大腸桿菌(E. coli)內。重組宿主細胞合成具有橋接兩個V結構域的接頭肽的單條多肽鏈。用於產生scFv的方法例如通過以下進行描述：Whitlow等人，"Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97，1991；Bird等人，Science 242:423，1988；授予Ladner的美國專利號4,946,778；Pack，P.等人，Bio/Technology 11:1271，1993。

【0139】 作為說明性實例，可以通過將淋巴細胞在體外暴露於MASP-2多肽，並且在噬菌體或類似載體中選擇抗體展示文庫(例如，通過使用固定的或標記的MASP-2蛋白或肽)，來獲得MASP-2特異性scFv。可以通過篩選在噬菌體或細菌(例如大腸桿菌)上展示的隨機肽文庫，來獲得編碼具有潛在MASP-2多肽結合結構域的多肽的基因。這些隨機肽展示文庫可以用於篩選與MASP-2相互作用的肽。用於產生和篩選此類隨機肽展示文庫的技術是本領域眾所周知的(授予Lardner的美國專利號5,223,409；授予Lardner的美國專利號 4,946,778；授予Lardner的美國專利號5,403,484；授予Lardner的美國專利號 5,571,698；以及Kay等人，Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press，Inc.，1996)，並且用於篩選此類文庫的隨機肽展示文庫和試劑盒是例如從CLONTECH Laboratories，Inc.(Palo Alto，Calif.)、Invitrogen Inc.(San Diego，Calif.)、New

England Biolabs，Inc.(Ipswich，Mass.)和Pharmacia LKB Biotechnology Inc.(Piscataway，N.J.)商購可得的。

【0140】 可用於本發明的這個方面中的抗MASP-2抗體片段的另一種形式是編碼單個互補決定區(CDR)的肽，所述單個互補決定區與MASP-2抗原上的表位結合，並且抑制MASP-2依賴性補體活化。CDR肽(“最小識別單位”)可以通過構建編碼目的抗體的CDR的基因來獲得。例如，通過使用聚合酶鏈反應，由抗體產生細胞的RNA合成可變區，來製備此類基因(參見例如，Larrick等人，Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106，1991；Courtenay-Luck，"Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," 於Monoclonal Antibodies: Production，Engineering and Clinical Application，Ritter等人(編輯)，第166頁，Cambridge University Press，1995；以及Ward等人，"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," 於Monoclonal Antibodies: Principles and Applications，Birch等人(編輯)，第137頁，Wiley-Liss，Inc.，1995)。

【0141】 將本文所述的MASP-2抗體施用於有此需要的受試者，以抑制MASP-2依賴性補體活化。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是具有降低的效應子功能的高親和力人或人源化單選殖抗MASP-2抗體。

【0142】 肽抑制劑

【0143】 在本發明的這個方面的一些實施方案中，MASP-2抑制劑包含分離的MASP-2肽抑制劑，包括分離的天然肽抑制劑和合成肽抑制劑，其抑制MASP-2依賴性補體活化系統。如本文使用的，術語“分離的MASP-2肽抑制劑”指通過以下抑制MASP-2依賴性補體活化的肽：與MASP-2結合，與MASP-2競爭結合凝集素途徑中的另一種識別分子(例如MBL、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維

膠凝蛋白或L-纖維膠凝蛋白)，和/或直接與MASP-2相互作用以抑制MASP-2依賴性補體活化，所述肽是基本上純的，並且基本不含它們可能與之一起在自然界發現的其它物質，至對於其預期用途實際且適當的程度。

【0144】 肽抑制劑已成功地在體內用於干擾蛋白質-蛋白質相互作用和催化位點。例如，針對與LFA 1在結構上有關的粘附分子的肽抑制劑最近已批准用於凝血病中的臨床使用(Ohman，E.M.等人，European Heart J. 16:50-55，1995)。預防或干擾整聯蛋白依賴性粘附的短線性肽(<30個胺基酸)已得到描述(Murayama，O.等人，J. Biochem. 120:445-51，1996)。長度範圍為25至200個胺基酸殘基的更長的肽，也已成功地用於阻斷整聯蛋白依賴性粘附(Zhang，L.等人，J. Biol. Chem. 271(47):29953-57，1996)。一般而言，更長的肽抑制劑具有比短肽更高的親和力和/或更慢的解離速率，並且因此可能是更有力的抑制劑。環肽抑制劑也已顯示為體內整聯蛋白的有效抑制劑，用於治療人炎性疾病(Jackson，D.Y.等人，J. Med. Chem. 40:3359-68，1997)。產生環狀肽的一種方法涉及合成其中肽的末端胺基酸是半胱胺酸的肽，從而允許肽通過末端胺基酸之間的二硫鍵合以環狀形式存在，其已顯示為改善在體內的親和力和半衰期，用於治療造血系統贅生物(例如，授予Larson的美國專利號6,649,592)。

【0145】 合成MASP-2肽抑制劑

【0146】 可用於本發明的這個方面的方法中的MASP-2抑制性肽通過胺基酸序列來例示，所述胺基酸序列模擬對於MASP-2功能重要的靶區域。可用於本發明的方法的實踐中的抑制性肽的大小範圍為約5個胺基酸至約300個胺基酸。表3提供了可以用於本發明的這個方面的實踐中的示例性抑制性肽的列表。可以在幾種測定之一中測試候選MASP-2抑制性肽充當MASP-2抑制劑的能

力，所述測定包括例如凝集素特異性C4切割測定(實施例2中所述)和C3b沉積測定(實施例2中所述)。

【0147】 在一些實施方案中，MASP-2抑制性肽衍生自MASP-2多肽，並且選自全長成熟的MASP-2蛋白(SEQ ID NO:6)、或MASP-2蛋白的特定結構域，例如CUBI結構域(SEQ ID NO:8)、CUBIEGF結構域(SEQ ID NO:9)、EGF結構域(SEQ ID NO:11)和絲胺酸蛋白酶結構域(SEQ ID NO:12)。如先前所述，CUBEGFCUBII區域已顯示為二聚化以及與MBL結合所必需的(Thielens等人，同上)。特別地，MASP-2的CUBI結構域中的肽序列TFRSDYN(SEQ ID NO:16)已在一項研究中顯示為涉及與MBL的結合，所述研究鑒定了在Asp105至Gly105處攜帶純合突變的人，導致MASP-2從MBL複合物中的喪失(Stengaard-Pedersen，K.等人，New England J. Med. 349:554-560，2003)。

【0148】 在一些實施方案中，MASP-2抑制性肽衍生自與MASP-2結合並涉及凝集素補體途徑的凝集素蛋白。已鑒定了涉及該途徑的幾種不同的凝集素，包括甘露聚糖結合凝集素(MBL)、L-纖維膠凝蛋白、M纖維膠凝蛋白和H-纖維膠凝蛋白。(Ikeda，K.等人，J. Biol. Chem. 262:7451-7454，1987；Matsushita，M.等人，J. Exp. Med. 176:1497-2284，2000；Matsushita，M.等人，J. Immunol. 168:3502-3506，2002)。這些凝集素作為同源三聚體亞基的寡聚體存在於血清中，所述同源三聚體亞基各自具有含有碳水化合物識別結構域的N末端膠原樣纖維。這些不同的凝集素已顯示與MASP-2結合，並且凝集素/MASP-2複合物通過蛋白質C4和C2的切割而活化補體。H-纖維膠凝蛋白具有24個胺基酸的胺基末端區域、具有11個Gly-Xaa-Yaa重複的膠原樣結構域、12個胺基酸的頸結構域、以及207個胺基酸的纖維蛋白原樣結構域(Matsushita，M.等

人，J. Immunol. 168:3502-3506，2002)。H-纖維膠凝蛋白與GlcNAc結合，並且使由LPS包被的人紅細胞凝集，所述LPS衍生自鼠傷寒沙門氏菌(S. typhimurium)、明尼蘇達沙門氏菌(S. minnesota)和大腸桿菌。H-纖維膠凝蛋白已顯示與MASP-2和MAp19結合，並且活化凝集素途徑。同上。L-纖維膠凝蛋白/P35也與GlcNAc結合，並且已顯示與人血清中的MASP-2和MAp19結合，並且該複合物已顯示活化凝集素途徑(Matsushita，M.等人，J. Immunol. 164:2281，2000)。相應地，可用於本發明中的MASP-2抑制性肽可以包含選自以下的至少5個胺基酸的區域：MBL蛋白(SEQ ID NO:21)、H-纖維膠凝蛋白(Genbank登錄號NM_173452)、M-纖維膠凝蛋白(Genbank登錄號O00602)和L-纖維膠凝蛋白(Genbank登錄號NM_015838)。

【0149】 更具體而言，科學家已鑒定了在MBL上的MASP-2結合位點在12個 Gly-X-Y三聯體"GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS"(SEQ ID NO:26)內，其位於MBP的膠原樣結構域的C末端部分的鉸鏈和頸部之間(Wallis，R.等人，J. Biol. Chem. 279:14065，2004)。這個MASP-2結合位點區域在人H-纖維膠凝蛋白和人L-纖維膠凝蛋白中也是高度保守的。已描述了共有結合位點，其存在於包含胺基酸序列"OGK-X-GP"(SEQ ID NO:22)的所有三種凝集素蛋白中，其中字母"O"代表羥脯胺酸，且字母"X"是疏水殘基(Wallis等人，2004，同上)。相應地，在一些實施方案中，可用於本發明的這個方面中的MASP-2抑制性肽的長度為至少6個胺基酸，並且包含SEQ ID NO:22。衍生自包括胺基酸序列"GLR GLQ GPO GKL GPO G"(SEQ ID NO:24)的MBL的肽，已顯示在體外結合MASP-2(Wallis等人，2004，同上)。為了增強與MASP-2的結合，可以合成在每個端部處側面為兩個

GPO三聯體的肽("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O" SEQ ID NO:25)，以增強如天然MBL蛋白中發現的三螺旋的形成(如Wallis，R.等人，J. Biol. Chem. 279:14065，2004中進一步描述的)。

【0150】 MASP-2抑制性肽也可以衍生自人H-纖維膠凝蛋白，其包括來自H-纖維膠凝蛋白中的共有MASP-2結合區的序列"GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO"(SEQ ID NO:27)。還包括的是衍生自人L-纖維膠凝蛋白的肽，其包括來自L-纖維膠凝蛋白中的共有MASP-2結合區的序列 "GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO"(SEQ ID NO:28)。

【0151】 MASP-2抑制性肽也可以衍生自C4切割位點，例如 "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI"(SEQ ID NO:29)，其是與抗凝血酶III的C末端部分連接的C4切割位點(Glover，G.I.等人，Mol. Immunol. 25:1261(1988))。

【0152】 表3：示例性的MASP-2抑制性肽

SEQ ID NO	來源
SEQ ID NO:6	人 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:8	MASP-2 的 CUBI 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	MASP-2 的 CUBIEGF 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	MASP-2 的 CUBIEGFCUBII 結構域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	MASP-2 的 EGF 結構域(aa 122-166)
SEQ ID NO:12	MASP-2 的絲胺酸蛋白酶結構域(aa 429-671)
SEQ ID NO:16	MASP-2 中的 MBL 結合區
SEQ ID NO:3	人 MAp19
SEQ ID NO:21	人 MBL 蛋白

SEQ ID NO	來源
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP， 其中"O"=羥脯胺酸，且"X"是疏水胺基酸殘基	來自人 MBL 和人纖維膠凝蛋白的合成肽共有區結合位點
SEQ ID NO:23 OGKLG	人 MBL 核心結合位點
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	證實與 MASP-2 結合的人 MBP 三聯體 6-10
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGP OGGPOGPO	具有添加的 GPO 以增強三螺旋形成的人 MBP 三聯體
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQGL RGLQGPOGKLGPOGNOGPSG SOGPKGQKGDOGKS	人 MBP 三聯體 1-17
SEQ ID NO:27 GAOGSOGEKGAOGPQGPOGP OGKMGPKGEOGDO	人 H-纖維膠凝蛋白(Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNG KRGERGPOGPOGKAGPOGPN GAOGEO	人 L-纖維膠凝蛋白 P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFL VFI	人 C4 切割位點
SEQ ID NO:72 LEVTCEPGTTFKDKCNTCRC GSDGKSAVCTKLWCNQ	SGMI-2L(全長)
SEQ ID NO:73 TCEPGTTFKDKCNTCRCGSD GKSAVCTKLWCNQ	SGMI-2M(中等截短形式)

SEQ ID NO	來源
SEQ ID NO:74 TCRCGSDGKSAVCTKLWCN Q	SGMI-2S(短截短形式)

【0153】 注意：字母"O"代表羥脯胺酸。字母"X"是疏水殘基。

【0154】 衍生自C4切割位點的肽以及抑制MASP-2絲胺酸蛋白酶位點的其它肽可以進行化學修飾，使得它們成為不可逆的蛋白酶抑制劑。例如，適當的修飾可以包括但不一定限於在C末端、Asp或Glu處，或者附加至功能性側鏈的鹵代甲基酮(Br、Cl、I、F)；在胺基或其它功能性側鏈上的鹵代乙醯基(或其它α-鹵代乙醯基)；在胺基或羧基末端或功能性側鏈上的含環氧化物或亞胺的基團；或者在胺基或羧基末端或功能性側鏈上的亞氨酸酯。此類修飾提供通過肽的共價附著來永久地抑制酶的優點。這可以導致較低的有效劑量和/或需要肽抑制劑的較不頻繁施用。

【0155】 除上述抑制性肽之外，可用於本發明的方法中的MASP-2抑制性肽包括這樣的肽，其含有如本文所述獲得的抗MASP-2 MoAb的MASP-2結合的CDRH3區。用於合成肽的CDR區的序列可以通過本領域已知的方法來確定。重鏈可變區是長度範圍一般為100至150個胺基酸的肽。輕鏈可變區是長度範圍一般為80至130個胺基酸的肽。在重鏈和輕鏈可變區內的CDR序列僅包括大約3-25個胺基酸序列，其可以通過本領域普通技術人員容易地進行測序。

【0156】 本領域技術人員將認識到，上述MASP-2抑制性肽的基本上同源的變異也顯示出MASP-2抑制活性。示例性的變異包括但不一定限於在主題肽的羧基末端或胺基末端部分上，具有插入、缺失、替換和/或另外胺基酸的肽及

其混合物。相應地，具有MASP-2抑制活性的那些同源肽被視為可用於本發明的方法中。所述的肽還可以包括重複的基序和具有保守取代的其它修飾。保守變體在本文其它地方進行描述，並且包括胺基酸與類似電荷、大小或疏水性等等的另一種胺基酸的交換。

【0157】 MASP-2抑制性肽可以進行修飾，以增加溶解度和/或使正電荷或負電荷達到最大，以便更緊密地類似完整蛋白質中的區段。衍生物可以具有或可以不具有本文公開的肽的確切一級胺基酸結構，只要衍生物在功能上保留了MASP-2抑制的所需特性。修飾可以包括用通常已知的二十種胺基酸之一或另一種胺基酸的胺基酸取代、用具有輔助期望特徵(例如對酶促降解的抗性)的衍生或取代胺基酸的胺基酸取代、或者用D胺基酸的胺基酸取代、或者用另一種分子或化合物例如碳水化合物的取代，所述另一種分子或化合物模擬一種或多種胺基酸或肽的天然構象和功能；胺基酸缺失；用通常已知的二十種胺基酸之一或另一種胺基酸的胺基酸插入、用具有輔助期望特徵(例如對酶促降解的抗性)的衍生或插入胺基酸的胺基酸插入、或者用D胺基酸的胺基酸插入、或者用另一種分子或化合物例如碳水化合物的取代，所述另一種分子或化合物模擬一種或多種胺基酸或肽的天然構象和功能；或者用另一種分子或化合物例如碳水化合物或核酸單體的取代，所述另一種分子或化合物模擬親本肽的天然構象、電荷分佈和功能。肽也可以通過乙醯化或醯胺化進行修飾。

【0158】 衍生物抑制性肽的合成可以依賴肽生物合成、碳水化合物生物合成等等的已知技術。作為起點，技術人員可以依賴合適的計算機程序，以確定目的肽的構象。一旦已知本文公開的肽的構象，則技術人員就可以以合理的設計方式確定可以在一個或多個位點處進行哪種取代，以製備保留親本肽的基

本構象和電荷分佈，但可能具有親本肽中不存在或增強超過親本肽中發現的特徵的衍生物。一旦鑒定了候選衍生物分子，就可以使用本文所述的測定來測試衍生物，以確定它們是否充當MASP-2抑制劑。

【0159】 篩選MASP-2抑制性肽

【0160】 還可以使用分子建模和合理的分子設計，來生成且篩選模擬MASP-2的關鍵結合區的分子結構，並抑制MASP-2的補體活性的肽。用於建模的分子結構包括抗MASP-2單選殖抗體的CDR區，以及已知對於MASP-2功能重要的靶區域，包括二聚化所需的區域、涉及與MBL結合的區域以及絲胺酸蛋白酶活性位點，如先前所述。用於鑒定結合特定靶的肽的方法是本領域眾所周知的。例如，分子印跡可以用於從頭構建大分子結構，例如與特定分子結合的肽。參見例如，Shea，K.J.，"Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sties," TRIP 2(5)1994。

【0161】 作為說明性實例，製備MASP-2結合肽的模擬物的一種方法如下。將已知MASP-2結合肽的功能單體或顯示出MASP-2抑制的抗MASP-2抗體的結合區域(模板)聚合。然後去除模板，隨後為第二類單體在通過模板留下的空隙中的聚合，以提供顯示出與模板相似的一種或多種所需特性的新分子。除以這種方式製備肽之外，還可以製備其為MASP-2抑制劑的其它MASP-2結合分子，例如多糖、核苷、藥物、核蛋白、脂蛋白、碳水化合物、糖蛋白、類固醇、脂質和其它生物活性材料。這種方法可用於設計比其天然配對物更穩定的廣泛多樣的生物模擬物，因為它們通常通過功能單體的自由基聚合進行製備，導致具有不可生物降解的主鏈的化合物。

【0162】肽合成

【0163】MASP-2抑制性肽可以使用本領域眾所周知的技術進行製備，所述技術例如最初通過Merrifield於J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154，1963中描述的固相合成技術。可以根據由製造商提供的說明書，例如使用Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer(Foster City，Calif.)，來實現自動化合成。可以例如在Bodanszky，M.等人，Peptide Synthesis，第二版，John Wiley & Sons，1976，以及本領域技術人員已知的其它參考文獻中找到其它技術。

【0164】肽也可以使用本領域技術人員已知的標準基因工程技術進行製備。例如，肽可以通過以下酶促產生：將編碼肽的核酸插入表達載體內，表達DNA，並且在所需胺基酸的存在下，將DNA翻譯成肽。然後使用層析或電泳技術或借助於載體蛋白來純化肽，通過將編碼載體蛋白的核酸序列與肽編碼序列同相插入表達載體內，所述載體蛋白可以與肽融合並隨後從肽中切割。融合蛋白-肽可以使用層析、電泳或免疫學技術(例如經由針對載體蛋白的抗體與樹脂結合)進行分離。可以使用化學方法或如通過例如水解酶來酶切切割肽。

【0165】遵循常規技術，還可以在重組宿主細胞中產生可用於本發明的方法中的MASP-2抑制性肽。為了表達MASP-2抑制性肽編碼序列，必須將編碼該肽的核酸分子與調控序列可操作地連接，所述調控序列控制表達載體中的轉錄表達，然後引入宿主細胞內。除轉錄調控序列例如啟動子和增強子之外，表達載體還可以包括翻譯調控序列和標記物基因，其適合於選擇攜帶表達載體的細胞。

【0166】編碼MASP-2抑制性肽的核酸分子可以使用方案如亞磷醯胺法，用“基因機器”進行合成。如果化學合成的雙鏈DNA是應用例如基因或基因片段

的合成所需的，則分開地製備每條互補鏈。短基因(60至80個鹼基對)的產生是技術上簡單的，並且可以通過合成互補鏈然後使其退火來完成。對於更長基因的產生，合成基因(雙鏈)以模塊形式由單鏈片段進行組裝，所述單鏈片段長度為20至100個核苷酸。關於多核苷酸合成的綜述，參見例如，Glick和Pasternak，"Molecular Biotechnology，Principles and Applications of Recombinant DNA"，ASM Press，1994；Itakura，K.等人，Annu. Rev. Biochem. 53:323，1984；以及Climie，S.等人，Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:633，1990。

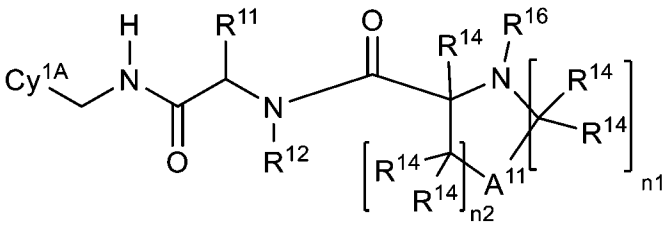
【0167】 小分子MASP-2抑制劑

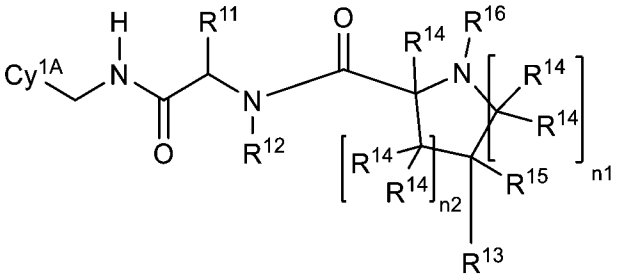
【0168】 在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是小分子抑制劑，包括具有低分子量(例如50至1000 Da)的天然、半合成和合成物質，例如肽、擬肽和非肽抑制劑(例如寡核苷酸和有機化合物)。可以基於抗MASP-2抗體的可變區的分子結構，來生成MASP-2的小分子抑制劑。

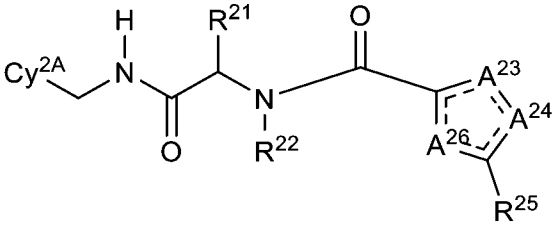
【0169】 還可以使用計算藥物設計，基於MASP-2的晶體結構，來設計且生成小分子抑制劑(Kuntz I.D.等人，Science 257:1078，1992)。大鼠MASP-2的晶體結構已得到描述(Feinberg，H.等人，EMBO J. 22:2348-2359，2003)。使用通過Kuntz等人描述的方法，將MASP-2晶體結構坐標用作計算機程序如DOCK的輸入，所述程序輸出預計與MASP-2結合的小分子結構列表。此類計算機程序的使用是本領域技術人員眾所周知的。例如，通過使用程序DOCK(Kuntz，I.D.等人，J. Mol. Biol. 161:269-288，1982；DesJarlais，R.L.等人，PNAS 87:6644-6648，1990)，評估在Cambridge Crystallographic數據庫中找到的化合物與酶結合位點的擬合，HIV-1蛋白酶抑制劑的晶體結構用於鑒定其為HIV-1蛋白酶抑制劑的獨特的非肽配體。

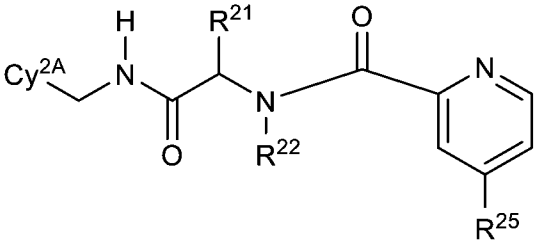
【0170】 示例性的MASP-2抑制劑包括但不限於美國專利申請號62/943,629、62/943,622、62/943,611、62/943,599、16/425,791和PCT申請號PCT/US19/34220中公開的化合物，其各自在此整體引入作為參考。

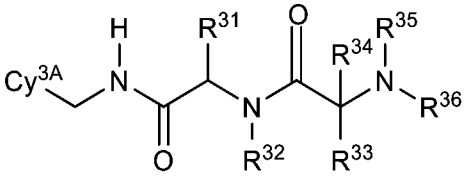
【0171】 在一些實施方案中，小分子是式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)或(IV)的化合物：

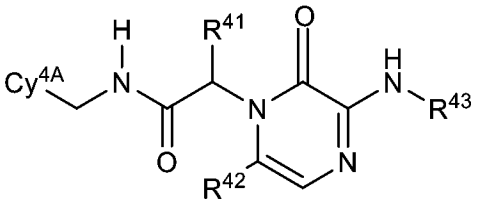
【0172】  (IA)，

【0173】  (IB)，

【0174】  (IIA)，

【0175】  (IIB)，

【0176】  (III)，

【0177】  (IV)

【0178】 或其鹽，其中：

【0179】 Cy^{1A}是未取代或取代的C_{6-10}芳基、或者未取代或取代的5-10元雜芳基；其中形成Cy^{1A}的5-10元雜芳基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成Cy^{1A}的取代的C_{6-10}芳基或取代的5-10元雜芳基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy1A}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a11}、S^{Ra11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NOR^{a11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NOC(O)R^{b11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0180】 每個R^{Cy1A}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy1A}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2、3或4個雜原子組成，其中形成R^{Cy1A}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、

$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代，並且其中形成R^{Cy1A}的每個C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0181】R^{11}為H或C_{1-6}烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷基或5-10元雜芳基-C_{1-6}烷基，其中形成R^{11}的C_{1-6}烷基是未取代的，或者被獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代，並且其中形成$R^{11}$的$C_{6-10}$芳基-$C_{1-6}$烷基或5-10元雜芳基-$C_{1-6}$烷基是未取代的，或者被獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0182】R^{12}為H或C_{1-6}烷基；或

【0183】 R^{11}和R^{12}連同它們與之連接的基團一起形成4-6元雜環烷基環；

【0184】 A^{11}為$CR^{13}R^{15}$或N；

【0185】 每個R^{13}獨立地為Cy^{1B}、$(CR^{13A}R^{13B})_{n3}Cy^{1B}$、($C_{1-6}$亞烷基)$Cy^{1B}$、($C_{2-6}$亞烯基)$Cy^{1B}$、($C_{2-6}$亞炔基)$Cy^{1B}$或$OCy^{1B}$，其中$R^{13}$的$C_{1-6}$亞烷基、$C_{2-6}$亞烯基或$C_{2-6}$亞炔基組分是未取代的，或者被1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自鹵素、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0186】 每個R^{14}獨立地選自H和C_{1-6}烷基；

【0187】 R^{15}選自H、R^{13}、C_{1-6}烷基和OH；

【0188】 與相鄰碳原子連接的一對R^{14}基團、或與相鄰碳原子連接的一對R^{14}和R^{15}基團，可以不依賴於R^{14}的其它出現，一起被替換為連接所述一對R^{14}基團或所述一對R^{14}和R^{15}基團與之連接的相鄰碳原子的鍵，使得相鄰的碳原子通過雙鍵連接；或

【0189】 與同一碳原子連接的一對R^{14}基團、或與同一碳原子連接的一對R^{13}和R^{15}基團，可以不依賴於R^{14}的其它出現，並且連同所述一對R^{14}基團或所述一對R^{13}和R^{15}基團與之連接的碳原子一起，形成螺稠合的C_{3-10}環烷基或4-10元雜環烷基環，其中所形成的4-10元雜環烷基環的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成，其中所形成的螺稠合的C_{3-10}環烷基或4-10元雜環烷基環，任選地進一步由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷

基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、鹵代烷基、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；或

【0190】 與相鄰碳原子連接的一對R^{14}基團、或與相鄰碳原子連接的一對R^{14}和R^{15}基團，可以不依賴於R^{14}的其它出現，連同所述一對R^{14}基團或所述一對R^{14}和R^{15}基團與之連接的相鄰碳原子一起，形成稠合的C_{3-10}環烷基或4-10元雜環烷基環，其中所形成的4-10元雜環烷基環的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成，其中所形成的稠合的C_{3-10}環烷基或4-10元雜環烷基環，任選地進一步由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、鹵代烷基、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；或

【0191】 與兩個相鄰的碳原子連接的一組四個R^{14}基團，或與兩個相鄰的碳原子連接的一組兩個R^{14}、一個R^{13}和一個R^{15}基團，可以不依賴於R^{14}的其它出現，連同所述一組四個R^{14}基團，或所述一組兩個R^{14}、一個R^{13}和一個R^{15}基團與之連接的兩個相鄰的碳原子一起，形成稠合的C_{6-10}芳基或5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基或4-10元雜環烷基環，其中所形成的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基環的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成，並且其中所形

成的稠合的C_{6-10}芳基或5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基或4-10元雜環烷基環，任選地進一步由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、鹵代烷基、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0192】 n1為1或2；

【0193】 n2為0、1或2；

【0194】 條件是n1和n2之和為1、2或3；

【0195】 條件是如果n1為1或n2為0，則A^{11}為$CR^{13}R^{15}$；

【0196】 n3為0、1或2；

【0197】 每個R^{13A}獨立地為H或C_{1-6}烷基；

【0198】 每個R^{13B}獨立地為H或C_{1-6}烷基；或

【0199】 或者與同一碳原子連接的R^{13A}和R^{13B}，不依賴於任何其它R^{13A}和R^{13B}基團，一起可以形成–$(CH_2)_{2-5}$-，從而形成3-6元環烷基環；或

【0200】 Cy^{1B}是未取代或取代的C_{6-10}芳基、未取代或取代的5-10元雜芳基、未取代或取代的C_{3-10}環烷基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基；其中形成Cy^{1B}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；和

【0201】 其中形成Cy^{1B}的取代的C_{6-10}芳基、取代的5-10元雜芳基、取代的C_{3-10}環烷基或取代的4-10元雜環烷基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代

基各自獨立地選自R^{Cy1B}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a11}、S^{Ra11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NOR^{a11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NOC(O)R^{b11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0202】其中每個R^{Cy1B}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy1B}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成R^{Cy1B}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)^{Rb11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；並且其中形成$R^{Cy1B}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)^{Rb11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0203】 R^{16}為H、Cy^{1C}、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基，其中形成R^{16}的C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基是未取代的，或者被選自以下的1、2、3、4或5個取代基取代：Cy^{1C}、鹵素、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代，條件是$R^{16}$的不多於一個取代基為$Cy^{1C}$；

【0204】 Cy^{1C}是未取代或取代的C_{6-10}芳基、未取代或取代的5-10元雜芳基、未取代或取代的C_{3-10}環烷基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基；其中形成Cy^{1C}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；和

【0205】 其中形成Cy^{1C}的取代的C_{6-10}芳基、取代的5-10元雜芳基、取代的C_{3-10}環烷基或取代的4-10元雜環烷基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy1C}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a11}、S^{Ra11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)R^{b11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NOR^{a11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NOC(O)R^{b11})NR^{c11}R^{d11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0206】 其中每個R^{Cy1C}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy1C}的5-10元雜

芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成R^{Cy1C}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)^{Rb11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；並且其中形成$R^{Cy1C}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a11}、SR^{a11}、$C(O)R^{b11}$、$C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$C(O)OR^{a11}$、$OC(O)R^{b11}$、$OC(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)^{Rb11}$、$NR^{c11}C(O)NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(O)OR^{a11}$、$C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$NR^{c11}C(=NR^{e11})NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)R^{b11}$、$S(O)NR^{c11}R^{d11}$、$S(O)_2R^{b11}$、$NR^{c11}S(O)_2R^{b11}$、$S(O)_2NR^{c11}R^{d11}$和氧代；

【0207】 R^{a11}、R^{b11}、R^{c11}和R^{d11}各自獨立地選自H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、C_{3-7}環烷基、5-10元雜芳基、4-10元雜環烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基、5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中形成R^{a11}、R^{b11}、R^{c11}和R^{d11}的所述C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、C_{3-7}環烷基、5-10元雜芳基、4-10元雜環烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基、5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2、3、4或5個取代基取代：C_{1-6}烷基、鹵素、CN、OR^{a12}、SR^{a12}、$C(O)R^{b12}$、$C(O)NR^{c12}R^{d12}$、$C(O)OR^{a12}$、$OC(O)R^{b12}$、

$OC(O)NR^{c12}R^{d12}$、$NR^{c12}R^{d12}$、$NR^{c12}C(O)R^{b12}$、$NR^{c12}C(O)NR^{c12}R^{d12}$、$NR^{c12}C(O)OR^{a12}$、$C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$、$NR^{c12}C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$、$S(O)R^{b12}$、$S(O)NR^{c12}R^{d12}$、$S(O)_2R^{b12}$、$NR^{c12}S(O)_2R^{b12}$、$S(O)_2NR^{c12}R^{d12}$和氧代；

【0208】 或者連接至同一N原子的R^{c11}和R^{d11}，連同它們均與之連接的N原子一起，形成4、5、6或7元雜環烷基或者5元雜芳基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：C_{1-6}烷基、鹵素、CN、OR^{a12}、SR^{a12}、$C(O)R^{b12}$、$C(O)NR^{c12}R^{d12}$、$C(O)OR^{a12}$、$OC(O)R^{b12}$、$OC(O)NR^{c12}R^{d12}$、$NR^{c12}R^{d12}$、$NR^{c12}C(O)R^{b12}$、$NR^{c12}C(O)NR^{c12}R^{d12}$、$NR^{c12}C(O)OR^{a12}$、$C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$、$NR^{c12}C(=NR^{e12})NR^{c12}R^{d12}$、$S(O)R^{b12}$、$S(O)NR^{c12}R^{d12}$、$S(O)_2R^{b12}$、$NR^{c12}S(O)_2R^{b12}$、$S(O)_2NR^{c12}R^{d12}$和氧代；

【0209】 R^{a12}、R^{b12}、R^{c12}和R^{d12}各自獨立地選自H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、苯基、C_{3-7}環烷基、5-6元雜芳基、4-7元雜環烷基、苯基-C_{1-3}烷基、5-6元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-7元雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中形成R^{a12}、R^{b12}、R^{c12}和R^{d12}的所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、苯基、C_{3-7}環烷基、5-6元雜芳基、4-7元雜環烷基、苯基-C_{1-3}烷基、5-6元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-7元雜環烷基-C_{1-3}烷基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：OH、CN、胺基、NH(C_{1-6}烷基)、N(C_{1-6}烷基)$_2$、鹵素、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{1-6}鹵代烷氧基和氧代；

【0210】 或者連接至同一N原子的R^{c12}和R^{d12}，連同它們均與之連接的N原子一起，形成4、5、6或7元雜環烷基或者5元雜芳基，其各自是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：OH、CN、胺基、NH(C_{1-6}烷

基)、$N(C_{1-6}烷基)_2$、鹵素、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{1-6}鹵代烷氧基和氧代；

【0211】 R^{e11}和Re^{12}各自獨立地為H、CN或NO_2；

【0212】 Cy^{2A}是未取代或取代的C_{6-10}芳基、或者未取代或取代的5-10元雜芳基；其中形成Cy^{2A}的5-10元雜芳基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成Cy^{2A}的取代的C_{6-10}芳基或取代的5-10元雜芳基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy2A}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a21}、S^{Ra21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)R^{b21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$C(=NOR^{a21})NR^{c21}R^{d21}$、$C(=NOC(O)R^{b21})NR^{c21}R^{d21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代；

【0213】 每個R^{Cy2A}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy2A}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2、3或4個雜原子組成，其中形成R^{Cy2A}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)R^{b21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代，其中形成$R^{Cy2A}$的每個$C_{6-10}$芳

基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)R^{b21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代；

【0214】 R^{21}為H或C_{1-6}烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷基或5-10元雜芳基-C_{1-6}烷基，其中形成R^{21}的C_{1-6}烷基是未取代的，或者被獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)R^{b21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代，並且其中形成$R^{21}$的$C_{6-10}$芳基-$C_{1-6}$烷基或5-10元雜芳基-$C_{1-6}$烷基是未取代的，或者被獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)R^{b21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代；

【0215】 R^{22}為H或C_{1-6}烷基；或

【0216】 R^{21}和R^{22}連同它們與之連接的基團一起形成4-6元雜環烷基環；

【0217】 A^{23}為N或NR^{23}；

【0218】 A^{24}為CR^{24}、N和NR^{24}；

【0219】 A^{26}為CR^{26}或S；

【0220】 條件是

【0221】 式(IIA)中的A^{23}、A^{24}和A^{26}這樣加以選擇，使得包含A^{23}、A^{24}和A^{26}的環為雜芳基環，並且符號═══表示芳環(標準化的)鍵；

【0222】 R^{23}為H或C_{1-6}烷基；

【0223】 R^{24}為H；C_{1-6}烷基或苯基；

【0224】 R^{25}為Cy^{2B}、$(CR^{25A}R^{25B})_{n25}Cy^{2B}$、($C_{1-6}$亞烷基)$Cy^{2B}$、($C_{2-6}$亞烯基)$Cy^{2B}$或($C_{2-6}$亞炔基)$Cy^{2B}$，其中$R^{25}$的$C_{1-6}$亞烷基、$C_{2-6}$亞烯基或$C_{2-6}$亞炔基組分是未取代的，或者被1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自鹵素、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)R^{b21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代；

【0225】 R^{26}為H或C_{1-6}烷基；

【0226】 每個R^{25A}為H或C_{1-6}烷基；

【0227】 每個R^{25B}為H或C_{1-6}烷基；

【0228】 n25為0、1或2；

【0229】 Cy^{2B}為未取代或取代的C_{6-10}芳基、未取代或取代的5-10元雜芳基、未取代或取代的C_{3-10}環烷基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基；其中

形成Cy^{2B}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；和

【0230】 其中形成Cy^{2B}的取代的C_{6-10}芳基、取代的5-10元雜芳基、取代的C_{3-10}環烷基或取代的4-10元雜環烷基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy2B}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a21}、S^{Ra21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)R^{b21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$C(=NOR^{a21})NR^{c21}R^{d21}$、$C(=NOC(O)R^{b21})NR^{c21}R^{d21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代；

【0231】 其中每個R^{Cy2B}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy2B}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成R^{Cy2B}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)^{Rb21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代；並且其中形成$R^{Cy2B}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a21}、SR^{a21}、$C(O)R^{b21}$、$C(O)NR^{c21}R^{d21}$、

$C(O)OR^{a21}$、$OC(O)R^{b21}$、$OC(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)^{Rb21}$、$NR^{c21}C(O)NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(O)OR^{a21}$、$C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$NR^{c21}C(=NR^{e21})NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)R^{b21}$、$S(O)NR^{c21}R^{d21}$、$S(O)_2R^{b21}$、$NR^{c21}S(O)_2R^{b21}$、$S(O)_2NR^{c21}R^{d21}$和氧代；

【0232】 各自獨立地選自H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、C_{3-7}環烷基、5-10元雜芳基、4-10元雜環烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基、5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中形成R^{a21}、R^{b21}、R^{c21}和R^{d21}的所述C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、C_{3-7}環烷基、5-10元雜芳基、4-10元雜環烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基、5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2、3、4或5個取代基取代：C_{1-6}烷基、鹵素、CN、OR^{a22}、SR^{a22}、$C(O)R^{b22}$、$C(O)NR^{c22}R^{d22}$、$C(O)OR^{a22}$、$OC(O)R^{b22}$、$OC(O)NR^{c22}R^{d22}$、$NR^{c22}R^{d22}$、$NR^{c22}C(O)R^{b22}$、$NR^{c22}C(O)NR^{c22}R^{d22}$、$NR^{c22}C(O)OR^{a22}$、$C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$、$NR^{c22}C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$、$S(O)R^{b22}$、$S(O)NR^{c22}R^{d22}$、$S(O)_2R^{b22}$、$NR^{c22}S(O)_2R^{b22}$、$S(O)_2NR^{c22}R^{d22}$和氧代；

【0233】 或者連接至同一N原子的R^{c21}和R^{d21}，連同它們均與之連接的N原子一起，形成4、5、6或7元雜環烷基或者5元雜芳基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：C_{1-6}烷基、鹵素、CN、OR^{a22}、SR^{a22}、$C(O)R^{b22}$、$C(O)NR^{c22}R^{d22}$、$C(O)OR^{a22}$、$OC(O)R^{b22}$、$OC(O)NR^{c22}R^{d22}$、$NR^{c22}R^{d22}$、$NR^{c22}C(O)R^{b22}$、$NR^{c22}C(O)NR^{c22}R^{d22}$、$NR^{c22}C(O)OR^{a22}$、$C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$、$NR^{c22}C(=NR^{e22})NR^{c22}R^{d22}$、$S(O)R^{b22}$、$S(O)NR^{c22}R^{d22}$、$S(O)_2R^{b22}$、$NR^{c22}S(O)_2R^{b22}$、$S(O)_2NR^{c22}R^{d22}$和氧代；

【0234】 R^{a22}、R^{b22}、R^{c22}和R^{d22}各自獨立地選自H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、苯基、C_{3-7}環烷基、5-6元雜芳基、4-7元雜環烷基、苯基-C_{1-3}烷基、5-6元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-7元雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中形成R^{a22}、R^{b22}、R^{c22}和R^{d22}的所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、苯基、C_{3-7}環烷基、5-6元雜芳基、4-7元雜環烷基、苯基-C_{1-3}烷基、5-6元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-7元雜環烷基-C_{1-3}烷基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：OH、CN、胺基、NH(C_{1-6}烷基)、N(C_{1-6}烷基)$_2$、鹵素、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{1-6}鹵代烷氧基和氧代；

【0235】 或者連接至同一N原子的R^{c22}和R^{d22}，連同它們均與之連接的N原子一起，形成4、5、6或7元雜環烷基或者5元雜芳基，其各自是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：OH、CN、胺基、NH(C_{1-6}烷基)、N(C_{1-6}烷基)$_2$、鹵素、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{1-6}鹵代烷氧基和氧代；

【0236】 R^{e21}和Re^{22}各自獨立地為H、CN或NO_2；

【0237】 Cy^{3A}是未取代或取代的C_{6-10}芳基、或者未取代或取代的5-10元雜芳基；其中形成Cy^{3A}的5-10元雜芳基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成Cy^{3A}的取代的C_{6-10}芳基或取代的5-10元雜芳基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy3A}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a31}、S^{Ra31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$C(=NOR^{a31})NR^{c31}R^{d31}$、

$C(=NOC(O)R^{b31})NR^{c31}R^{d31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；

【0238】每個R^{Cy3A}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy3A}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2、3或4個雜原子組成，其中形成R^{Cy3A}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代，並且其中形成$R^{Cy3A}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；

【0239】R^{31}為H或C_{1-6}烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷基或5-10元雜芳基-C_{1-6}烷基，其中形成R^{31}的C_{1-6}烷基是未取代的，或者被獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、

$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代，並且其中形成$R^{31}$的$C_{6-10}$芳基-$C_{1-6}$烷基或5-10元雜芳基-$C_{1-6}$烷基是未取代的，或者被獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；

【0240】 R^{32}為H或C_{1-6}烷基；或

【0241】 R^{31}和R^{32}連同它們與之連接的基團一起形成4-6元雜環烷基環；

【0242】 R^{33}為Cy^{3B}、$(CR^{33A}R^{33B})_{n33}Cy^{3B}$、($C_{1-6}$亞烷基)$Cy^{3B}$、($C_{2-6}$亞烯基)$Cy^{3B}$或($C_{2-6}$亞炔基)$Cy^{3B}$，其中$R^{35}$的$C_{1-6}$亞烷基、$C_{2-6}$亞烯基或$C_{2-6}$亞炔基組分是未取代的，或者被1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自鹵素、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；

【0243】 每個R^{33A}獨立地為H或C_{1-6}烷基；

【0244】 每個R^{33B}獨立地為H或C_{1-6}烷基；或

【0245】 或者附著至同一碳原子的R^{33A}和R^{33B}，不依賴於任何其它R^{33A}和R^{33B}基團，一起可以形成–$(CH_2)_{2-5}$-，從而形成3-6元環烷基環；或

【0246】 n33為0、1、2或3；

【0247】 Cy^{3B}為未取代或取代的C_{6-10}芳基、未取代或取代的5-10元雜芳基、未取代或取代的C_{3-10}環烷基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基；其中形成Cy^{3B}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；和

【0248】 其中形成Cy^{3B}的取代的C_{6-10}芳基、取代的5-10元雜芳基、取代的C_{3-10}環烷基或取代的4-10元雜環烷基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy3B}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a31}、S^{Ra31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$C(=NOR^{a31})NR^{c31}R^{d31}$、$C(=NOC(O)R^{b31})NR^{c31}R^{d31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；

【0249】 其中每個R^{Cy3B}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy3B}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成R^{Cy3B}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)^{Rb31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、

$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；並且其中形成$R^{Cy3B}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)^{Rb31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；

【0250】 R^{34}選自H和C_{1-6}烷基；

【0251】 R^{35}選自H、取代或取代的C_{1-6}烷基和Cy^{3C}，其中形成R^{35}的取代的C_{1-6}烷基由選自以下的1、2、3、4或5個取代基取代：Cy^{3C}、鹵素、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；條件是$R^{35}$的不多於一個取代基是$Cy^{3C}$；

【0252】 Cy^{3C}為未取代或取代的C_{6-10}芳基、未取代或取代的5-10元雜芳基、未取代或取代的C_{3-10}環烷基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基；其中形成Cy^{3C}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；和

【0253】其中形成Cy^{3C}的取代的C_{6-10}芳基、取代的5-10元雜芳基、取代的C_{3-10}環烷基或取代的4-10元雜環烷基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy3C}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a31}、S^{Ra31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)R^{b31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$C(=NOR^{a31})NR^{c31}R^{d31}$、$C(=NOC(O)R^{b31})NR^{c31}R^{d31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；

【0254】其中每個R^{Cy3C}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy3C}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成R^{Cy3C}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)^{Rb31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；並且其中形成$R^{Cy3C}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a31}、SR^{a31}、$C(O)R^{b31}$、$C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$C(O)OR^{a31}$、$OC(O)R^{b31}$、$OC(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)^{Rb31}$、$NR^{c31}C(O)NR^{c31}R^{d31}$、$NR^{c31}C(O)OR^{a31}$、$C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、

$NR^{c31}C(=NR^{e31})NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)R^{b31}$、$S(O)NR^{c31}R^{d31}$、$S(O)_2R^{b31}$、$NR^{c31}S(O)_2R^{b31}$、$S(O)_2NR^{c31}R^{d31}$和氧代；

【0255】 R^{36}選自H和C_{1-6}烷基；

【0256】 R^{a31}、R^{b31}、R^{c31}和R^{d31}各自獨立地選自H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、C_{3-7}環烷基、5-10元雜芳基、4-10元雜環烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基、5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中形成R^{a31}、R^{b31}、R^{c31}和R^{d31}的所述C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、C_{3-7}環烷基、5-10元雜芳基、4-10元雜環烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基、5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2、3、4或5個取代基取代：C_{1-6}烷基、鹵素、CN、OR^{a32}、SR^{a32}、$C(O)R^{b32}$、$C(O)NR^{c32}R^{d32}$、$C(O)OR^{a32}$、$OC(O)R^{b32}$、$OC(O)NR^{c32}R^{d32}$、$NR^{c32}R^{d32}$、$NR^{c32}C(O)R^{b32}$、$NR^{c32}C(O)NR^{c32}R^{d32}$、$NR^{c32}C(O)OR^{a32}$、$C(=NR^{e32})NR^{c32}R^{d32}$、$NR^{c32}C(=NR^{e32})NR^{c32}R^{d32}$、$S(O)R^{b32}$、$S(O)NR^{c32}R^{d32}$、$S(O)_2R^{b32}$、$NR^{c32}S(O)_2R^{b32}$、$S(O)_2NR^{c32}R^{d32}$和氧代；

【0257】 或者連接至同一N原子的R^{c31}和R^{d31}，連同它們均與之連接的N原子一起，形成4、5、6或7元雜環烷基或者5元雜芳基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：C_{1-6}烷基、鹵素、CN、OR^{a32}、SR^{a32}、$C(O)R^{b32}$、$C(O)NR^{c32}R^{d32}$、$C(O)OR^{a32}$、$OC(O)R^{b32}$、$OC(O)NR^{c32}R^{d32}$、$NR^{c32}R^{d32}$、$NR^{c32}C(O)R^{b32}$、$NR^{c32}C(O)NR^{c32}R^{d32}$、$NR^{c32}C(O)OR^{a32}$、$C(=NR^{e32})NR^{c32}R^{d32}$、$NR^{c32}C(=NR^{e32})NR^{c32}R^{d32}$、$S(O)R^{b32}$、$S(O)NR^{c32}R^{d32}$、$S(O)_2R^{b32}$、$NR^{c32}S(O)_2R^{b32}$、$S(O)_2NR^{c32}R^{d32}$和氧代；

【0258】 R^{a32}、R^{b32}、R^{c32}和R^{d32}各自獨立地選自H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、苯基、C_{3-7}環烷基、5-6元雜芳基、4-7元雜環烷基、苯基-C_{1-3}烷基、5-6元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-7元雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中形成R^{a32}、R^{b32}、R^{c32}和R^{d32}的所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、苯基、C_{3-7}環烷基、5-6元雜芳基、4-7元雜環烷基、苯基-C_{1-3}烷基、5-6元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-7元雜環烷基-C_{1-3}烷基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：OH、CN、胺基、NH(C_{1-6}烷基)、N(C_{1-6}烷基)$_2$、鹵素、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{1-6}鹵代烷氧基和氧代；

【0259】 或者連接至同一N原子的R^{c32}和R^{d32}，連同它們均與之連接的N原子一起，形成4、5、6或7元雜環烷基或者5元雜芳基，其各自是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：OH、CN、胺基、NH(C_{1-6}烷基)、N(C_{1-6}烷基)$_2$、鹵素、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{1-6}鹵代烷氧基和氧代；和

【0260】 R^{e31}和Re^{32}各自獨立地為H、CN或NO_2；

【0261】 Cy^{4A}是未取代或取代的C_{6-10}芳基、或者未取代或取代的5-10元雜芳基；其中形成Cy^{4A}的5-10元雜芳基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；其中形成Cy^{4A}的取代的C_{6-10}芳基或取代的5-10元雜芳基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy4A}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a41}、S^{Ra41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$、

$C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；

【0262】每個R^{Cy4A}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy4A}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2、3或4個雜原子組成，其中形成R^{Cy4A}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代，並且其中形成$R^{Cy4A}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；

【0263】R^{41}為H或C_{1-6}烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-6}烷基或5-10元雜芳基-C_{1-6}烷基，其中形成R^{41}的C_{1-6}烷基是未取代的，或者被獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、

$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代，並且其中形成$R^{41}$的$C_{6-10}$芳基-$C_{1-6}$烷基或5-10元雜芳基-$C_{1-6}$烷基是未取代的，或者被獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；

【0264】 R^{42}為H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基或Cy^{4B}；其中形成R^{42}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基是未取代的，或者被選自以下的1、2、3、4或5個取代基取代：Cy^{4B}、鹵素、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；條件是不多於一個取代基是$Cy^{4B}$；

【0265】 Cy^{4B}是未取代或取代的C_{6-10}芳基、未取代或取代的5-10元雜芳基、未取代或取代的C_{3-10}環烷基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基；其中形成Cy^{4B}的5-10元雜芳基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；並且其中形成Cy^{4B}的取代的C_{6-10}芳基、取代的5-10元雜芳基、取代的C_{3-10}環烷基或4-10元雜環烷基由1、2、

3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy4B}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a41}、S^{Ra41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；

【0266】其中每個R^{Cy4B}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy4B}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成，並且其中形成R^{Cy4B}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；並且形成$R^{Cy4B}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、

$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；

【0267】 或者R^{41}和R^{42}連同它們與之連接的原子、以及連接R^{41}和R^{42}與之連接的原子的氮原子一起形成4-7元雜環烷基環；其任選地進一步被1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy4B}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a41}、S^{Ra41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；

【0268】 R^{43}為H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基或Cy^{4C}；其中形成R^{43}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基是未取代的，或者被1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自：選自以下的0、1、2、3、4或5個取代基：Cy^{4C}、鹵素、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代，條件是形成$R^{43}$的$C_{1-6}$烷基、$C_{2-6}$烯基或$C_{2-6}$炔基的不多於一個取代基是$Cy^{4C}$；

【0269】 Cy^{4C}為未取代或取代的C_{6-10}芳基、未取代或取代的5-10元雜芳基、未取代或取代的C_{3-10}環烷基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基；其中形成Cy^{4B}的5-10元雜芳基、或者未取代或取代的4-10元雜環烷基的環原子由碳

原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成；並且其中形成Cy^{4C}的取代的C_{6-10}芳基、取代的5-10元雜芳基、取代的C_{3-10}環烷基或4-10元雜環烷基由1、2、3、4或5個取代基取代，所述取代基各自獨立地選自R^{Cy4C}、鹵素、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a41}、S^{Ra41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NOR^{a41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NOC(O)R^{b41})NR^{c41}R^{d41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；

【0270】 每個R^{Cy4C}獨立地選自C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、5-10元雜芳基、C_{3-10}環烷基和4-10元雜環烷基，其中形成R^{Cy4C}的5-10元雜芳基或4-10元雜環烷基的環原子由碳原子以及選自O、N和S的1、2或3個雜原子組成，其中形成R^{Cy4C}的每個C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基或C_{2-6}炔基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；並且其中形成每個$R^{Cy4A}$的每個$C_{6-10}$芳基、5-10元雜芳基、$C_{3-10}$環烷基和4-10元雜環烷基獨立地是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：鹵素、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{1-6}鹵代烷基、CN、OR^{a41}、SR^{a41}、$C(O)R^{b41}$、$C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$C(O)OR^{a41}$、$OC(O)R^{b41}$、$OC(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)R^{b41}$、

$NR^{c41}C(O)NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(O)OR^{a41}$、$C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$NR^{c41}C(=NR^{e41})NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)R^{b41}$、$S(O)NR^{c41}R^{d41}$、$S(O)_2R^{b41}$、$NR^{c41}S(O)_2R^{b41}$、$S(O)_2NR^{c41}R^{d41}$和氧代；

【0271】 R^{a41}、R^{b41}、R^{c41}和R^{d41}各自獨立地選自H、C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、C_{3-7}環烷基、5-10元雜芳基、4-10元雜環烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基、5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中形成R^{a41}、R^{b41}、R^{c41}和R^{d41}的所述C_{1-6}烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、C_{6-10}芳基、C_{3-7}環烷基、5-10元雜芳基、4-10元雜環烷基、C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基、5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2、3、4或5個取代基取代：C_{1-6}烷基、鹵素、CN、OR^{a42}、SR^{a42}、$C(O)R^{b42}$、$C(O)NR^{c42}R^{d42}$、$C(O)OR^{a42}$、$OC(O)R^{b42}$、$OC(O)NR^{c42}R^{d42}$、$NR^{c42}R^{d42}$、$NR^{c42}C(O)R^{b42}$、$NR^{c42}C(O)NR^{c42}R^{d42}$、$NR^{c42}C(O)OR^{a42}$、$C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$、$NR^{c42}C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$、$S(O)R^{b42}$、$S(O)NR^{c42}R^{d42}$、$S(O)_2R^{b42}$、$NR^{c42}S(O)_2R^{b42}$、$S(O)_2NR^{c42}R^{d42}$和氧代；

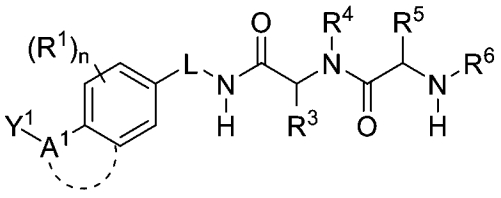
【0272】 或者連接至同一N原子的R^{c41}和R^{d41}，連同它們均與之連接的N原子一起，形成4、5、6或7元雜環烷基或者5元雜芳基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：C_{1-6}烷基、鹵素、CN、OR^{a42}、SR^{a42}、$C(O)R^{b42}$、$C(O)NR^{c42}R^{d42}$、$C(O)OR^{a42}$、$OC(O)R^{b42}$、$OC(O)NR^{c42}R^{d42}$、$NR^{c42}R^{d42}$、$NR^{c42}C(O)R^{b42}$、$NR^{c42}C(O)NR^{c42}R^{d42}$、$NR^{c42}C(O)OR^{a42}$、$C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$、$NR^{c42}C(=NR^{e42})NR^{c42}R^{d42}$、$S(O)R^{b42}$、$S(O)NR^{c42}R^{d42}$、$S(O)_2R^{b42}$、$NR^{c42}S(O)_2R^{b42}$、$S(O)_2NR^{c42}R^{d42}$和氧代；

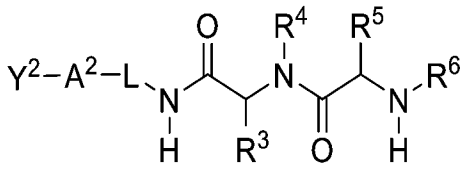
【0273】 R^{a42}、R^{b42}、R^{c42}和R^{d42}各自獨立地選自H、C_{1-6}烷基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、苯基、C_{3-7}環烷基、5-6元雜芳基、4-7元雜環烷基、苯基-C_{1-3}烷基、5-6元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-7元雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中形成R^{a42}、R^{b42}、R^{c42}和R^{d42}的所述C_{1-6}烷基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{2-6}烯基、C_{2-6}炔基、苯基、C_{3-7}環烷基、5-6元雜芳基、4-7元雜環烷基、苯基-C_{1-3}烷基、5-6元雜芳基-C_{1-3}烷基、C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基和4-7元雜環烷基-C_{1-3}烷基，各自任選地由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：OH、CN、胺基、NH(C_{1-6}烷基)、N(C_{1-6}烷基)$_2$、鹵素、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{1-6}鹵代烷氧基和氧代；

【0274】 或者連接至同一N原子的R^{c42}和R^{d42}，連同它們均與之連接的N原子一起，形成4、5、6或7元雜環烷基或者5元雜芳基，其各自是未取代的，或者由獨立地選自以下的1、2或3個取代基取代：OH、CN、胺基、NH(C_{1-6}烷基)、N(C_{1-6}烷基)$_2$、鹵素、C_{1-6}烷基、C_{1-6}烷氧基、C_{1-6}鹵代烷基、C_{1-6}鹵代烷氧基和氧代；和

【0275】 R^{e41}和Re^{42}各自獨立地為H、CN或NO_2。

【0276】 在一些實施方案中，小分子是化合物式(VA)或(VB)：

【0277】 
(VA)或


(VB)

【0278】 其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽；

【0279】 其中：

【0280】 A^1為選自–(C=NH)–、–(C=NOR^a)–、–[C=NO(C=O)R^a]–、–[C=N[O(C=O)ZR^b]}–、稠合的5或6元雜環基和稠合的5或6元雜芳基的成員；

【0281】 當A^1為–(C=NH)–時，Y^1選自–NH_2、–NH(C=O)R^{a}和–NH(C=O)ZR^b；

【0282】 當A^1為–(C=NOR^a)–、–[C=NO(C=O)R^a]–或–{C=N[O(C=O)ZR^b]}–時，Y^1為–NH_2；

【0283】 當A^1為稠合的雜環基或雜芳基時，Y^1為–NH_2或鹵素，並且A^1由m個另外的R^1基團取代；

【0284】 每個R^{a}和R^{b}獨立地選自C_1-C_6烷基、C_3-C_{10}環烷基、C_6-C_{10}芳基和C_7-C_{12}芳基烷基；其中R^{a}具有選自以下的m個取代基：C_1-C_6烷基、羥基、羥基(C_1-C_6烷基)、C_1-C_6烷氧基、C_2-C_9烷氧基烷基、胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素；或者，可替代地，R^{a}和R^{b}連接，以形成具有選自C_1-C_6烷基、羥基、C_1-C_6烷氧基和鹵素的m個取代基的雜環基環；

【0285】 每個Z獨立地選自O和S；

【0286】 A^2為選自C_3-C_6雜芳基、C_6芳基和C_2-C_6烷基的成員；

【0287】 當A^2為C_3-C_6雜芳基時，Y^2選自–NH_2、–CH_2NH_2、氯、–(C=NH)NH_2、–(C=NH)NH(C=O)R^a、–(C=NH)NH(C=O)ZR^b、–(C=NOR^a)NH_2、–[C=NO(C=O)R^a]NH_2和–{C=N[O(C=O)ZR^b]}NH_2；並且A^2由m個另外的R^1基團取代；

【0288】 當A^2為C_6芳基時，Y^2選自胺基甲基、羥基和鹵素，並且A^2由m個另外的R^1基團取代；

【0289】 當A^2為C_2-C_6烷基時，Y^2選自–NH(C=NH)NH_2、–NH(C=NH)NH(C=O)R^a和–NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b；

【0290】 每個R^1為獨立地選自C_1-C_6烷基、羥基、C_1-C_6烷氧基、胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素的成員；

【0291】 每個m和n為獨立地選自0至3的整數；

【0292】 L為$–(O)_p–(C(R^{2a})(R^{2b}))_q–$，

【0293】 每個R^{2a}或R^{2b}為獨立地選自氫和氟的成員；

【0294】 p為0至1的整數；

【0295】 q為1至2的整數；

【0296】 R^3為選自氫、C_1-C_6烷基、C_1-C_6氟烷基和羧基(C_1-C_6烷基)的成員；或者，可替代地，R^3和R^4連接，以形成氮雜環丁烷、吡咯烷或呱啶環；或

【0297】 R^4為選自氫和C_1-C_6烷基的成員；或者，可替代地，R^3和R^4連接，以形成氮雜環丁烷、吡咯烷或呱啶環；

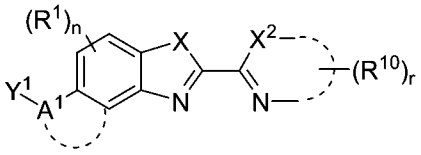
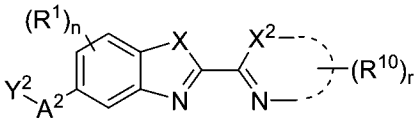
【0298】 R^5為選自C_3-C_7環烷基、C_4-C_8環烷基烷基、雜芳基和具有0至3個R^{13}取代基的C_7-C_{12}芳基烷基或雜芳基烷基的成員；或者，可替代地，R^5和R^6連接，以形成具有0至3個R^{13}取代基的雜環；

【0299】 R^6為選自氫、C_1-C_6烷基、C_3-C_7環烷基、羧基(C_1-C_6烷基)、具有0至3個R^{13}取代基的C_7-C_{12}芳基烷基或雜芳基烷基、胺基(C_1-C_8烷基)；和醯胺基(C_1-C_8烷基)的成員；或者，可替代地，R^5和R^6連接，以形成具有0至3個R^{13}取代基的雜環；和

【0300】 每個R^{13}為獨立地選自C_1-C_6烷基、C_6-C_{10}芳基、(C_6-C_{10}芳基)C_1-C_6烷基、羧基(C_1-C_6 烷氧基)、雜芳基、(C_6-C_{10}雜芳基)C_1-C_6烷基、雜環基、羥

基、羥基(C_1-C_6烷基)、C_1-C_6烷氧基、C_2-C_9烷氧基烷基、胺基、C_1-C_6醯胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素的成員；或者，可替代地，兩個R^{13}基團連接，以形成稠合的C_6-C_{10}芳基、C_6-C_{10}雜芳基或C_5-C_7環烷基環。

【0301】 在一些實施方案中，小分子是式(VIA)或(VIB)的化合物：

【0302】  (VIA)或 

(VIB)

【0303】 其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽；

【0304】 其中：

【0305】 A^1為選自–(C=NH)–、–(C=NOR^a)–、–[C=NO(C=O)R^a]–、–[C=N[O(C=O)ZR^b]]–、稠合的5或6元雜環基和稠合的5或6元雜芳基的成員；

【0306】 當A^1為–(C=NH)–時，Y^1選自–NH_2、–NH(C=O)R^{a}和–NH(C=O)ZR^b；

【0307】 當A^1為–(C=NOR^a)–、–[C=NO(C=O)R^a]–或–{C=N[O(C=O)ZR^b]}–時，Y^1為–NH_2；

【0308】 當A^1為稠合的雜環基或雜芳基時，Y^1為–NH_2或鹵素，並且A^1由m個另外的R^1基團取代；

【0309】 每個R^{a}和R^{b}獨立地選自C_1-C_6烷基、C_3-C_{10}環烷基、C_6-C_{10}芳基和C_7-C_{12}芳基烷基；其中R^{a}具有選自以下的m個取代基：C_1-C_6烷基、羥基、羥基(C_1-C_6烷基)、C_1-C_6烷氧基、C_2-C_9烷氧基烷基、胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素；

或者，可替代地，R^a和R^b連接，以形成具有選自C_1-C_6烷基、羥基、C_1-C_6烷氧基和鹵素的m個取代基的雜環基環；

【0310】 每個Z獨立地選自O和S；

【0311】 A^2為選自C_3-C_6雜芳基和C_2-C_6烷基的成員；

【0312】 當A^2為C_3-C_6雜芳基時，Y^2選自–NH_2、–CH_2NH_2、氯、–$(C=NH)NH_2$、–$(C=NH)NH(C=O)R^a$、–$(C=NH)NH(C=O)ZR^b$、–$(C=NOR^a)NH_2$、–$[C=NO(C=O)R^a]NH_2$和–$\{C=N[O(C=O)ZR^b]\}NH_2$；並且A^2由m個另外的R^1基團取代；

【0313】 當A^2為C_2-C_6烷基時，Y^2選自–$NH(C=NH)NH_2$、–$NH(C=NH)NH(C=O)R^a$和–$NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b$；

【0314】 每個R^1為獨立地選自C_1-C_6烷基、羥基、C_1-C_6烷氧基、胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素的成員；

【0315】 每個m和n為獨立地選自0至3的整數；

【0316】 X和X^2各自為選自NR^8、CH和CR^{10}的成員；

【0317】 每個R^8為獨立地選自氫和C_1-C_6烷基的成員；

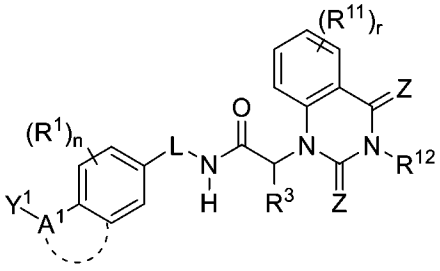
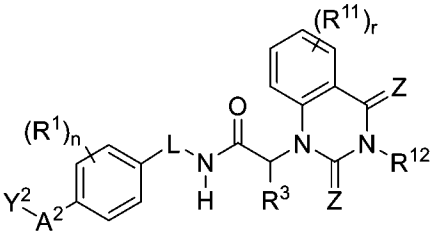
【0318】 每個R^{10}為獨立地選自C_1-C_6烷基、具有0至3個R^{13}取代基的雜芳基或C_6-C_{10}芳基、羥基、羥基(C_1-C_6烷基)、C_1-C_6烷氧基、C_2-C_9烷氧基烷基、胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素的成員；或者，可替代地，兩個R^{10}基團連接，以形成具有0至3個R^{13}取代基的稠合的C_6芳基、雜芳基或C_5-C_7環烷基環；或

【0319】 r是0至4的整數；和

【0320】 每個R^{13}為獨立地選自C_1-C_6烷基、C_6-C_{10}芳基、羧基(C_1-C_6 烷氧基)、雜芳基、雜環基、羥基、羥基(C_1-C_6烷基)、C_1-C_6烷氧基、C_2-C_9烷氧基烷

基、胺基、C_1-C_6醯胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素的成員；或者，可替代地，兩個R^{13}基團連接，以形成稠合的C_6-C_{10}芳基、C_6-C_{10}雜芳基或C_5-C_7環烷基環。

【0321】 在某些具體實施方案中，小分子是式(VIIA)或(VIIB)的化合物：

【0322】  (VIIA)或 

(VIIB)

【0323】 其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽；

【0324】 其中：

【0325】 A^1為選自–(C=NH)–、–(C=NOR^a)–、–[C=NO(C=O)R^a]–、–[C=N[O(C=O)ZR^b]}–、稠合的5或6元雜環基和稠合的5或6元雜芳基的成員；

【0326】 當A^1為–(C=NH)–時，Y^1選自–NH_2、–NH(C=O)R^{a}和–NH(C=O)ZR^b；

【0327】 當A^1為–(C=NOR^a)–、–[C=NO(C=O)R^a]–或–{C=N[O(C=O)ZR^b]}–時，Y^1為–NH_2；

【0328】 當A^1為稠合的雜環基或雜芳基時，Y^1為–NH_2或鹵素，並且A^1由m個另外的R^1基團取代；

【0329】 每個R^{a}和R^{b}獨立地選自C_1-C_6烷基、C_3-C_{10}環烷基、C_6-C_{10}芳基和C_7-C_{12}芳基烷基；其中R^{a}具有選自以下的m個取代基：C_1-C_6烷基、羥基、羥基(C_1-C_6烷基)、C_1-C_6烷氧基、C_2-C_9烷氧基烷基、胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素；

或者，可替代地，R^a和R^b連接，以形成具有選自C_1-C_6烷基、羥基、C_1-C_6烷氧基和鹵素的m個取代基的雜環基環；

【0330】 每個Z獨立地選自O和S；

【0331】 A^2為選自C_3-C_6雜芳基和C_2-C_6烷基的成員；

【0332】 當A^2為C_3-C_6雜芳基時，Y^2選自–NH_2、–CH_2NH_2、氯、–$(C=NH)NH_2$、–$(C=NH)NH(C=O)R^a$、–$(C=NH)NH(C=O)ZR^b$、–$(C=NOR^a)NH_2$、–$[C=NO(C=O)R^a]NH_2$和–$\{C=N[O(C=O)ZR^b]\}NH_2$；並且A^2由m個另外的R^1基團取代；

【0333】 當A^2為C_2-C_6烷基時，Y^2選自–$NH(C=NH)NH_2$、–$NH(C=NH)NH(C=O)R^a$和–$NH(C=NH)NH(C=O)ZR^b$；

【0334】 每個R^1為獨立地選自C_1-C_6烷基、羥基、C_1-C_6烷氧基、胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素的成員；

【0335】 每個m和n為獨立地選自0至3的整數；

【0336】 L為$–(O)_p–(C(R^{2a})(R^{2b}))_q–$，

【0337】 每個R^{2a}或R^{2b}為獨立地選自氫和氟的成員；

【0338】 p為0至1的整數；

【0339】 q為1至2的整數；

【0340】 R^3為選自氫、C_1-C_6烷基和羧基(C_1-C_6烷基)的成員；

【0341】 每個R^{11}為獨立地選自C_1-C_6烷基、羥基、C_1-C_6烷氧基、胺基、C_1-C_6烷基胺基、鹵素基和$(R^{14})(R^{14})N(CO)$-的成員；或者，可替代地，兩個R^{11}基團連接，以形成具有0至3個R^{13}取代基的稠合的C_6芳基、雜芳基或C_5-C_7環烷基環；或

【0342】 r為0至4的整數；和

【0343】 每個Z為獨立地選自O和NR^8的成員；

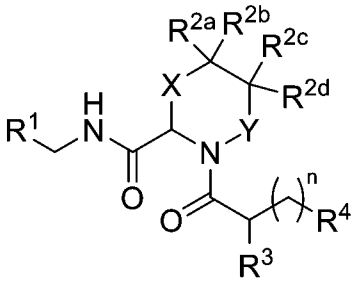
【0344】 每個R^8為獨立地選自氫和C_1-C_6烷基的成員；

【0345】 每個R^{12}為獨立地選自氫、具有0至3個R^{13}取代基的C_1-C_6烷基和C_7-C_{14}芳基烷基的成員；

【0346】 每個R^{13}為獨立地選自C_1-C_6烷基、羥基、羥基(C_1-C_6烷基)、C_1-C_6烷氧基、C_2-C_9烷氧基烷基、胺基、C_1-C_6烷基胺基和鹵素的成員；或者，可替代地，兩個R^{13}基團連接，以形成稠合的C_6芳基、雜芳基或C_5-C_7環烷基環；和

【0347】 每個R^{14}為獨立地選自氫、C_1-C_6烷基、C_3-C_7環烷基、C_4-C_8環烷基烷基、C_7-C_{14}芳基烷基和雜芳基(C_1-C_6烷基)的成員；或者，可替代地，兩個R^{13}基團連接，以形成稠合的雜環基環。

【0348】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0349】 

【0350】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0351】 R^1為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0352】 R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}和R^{2d}獨立地選自氫、鹵素、$C(=O)OR^5$、$OC(=O)R^5$、羥烷基、烷氧基、烷氧基烷基、鹵代烷氧基、氰基、胺基烷基、羧基烷基、NR^5R^6、$C(=O)NR^5R^6$、$N(R^5)C(=O)R^6$、$NR^5C(=O)NR^6$、$S(O)_t$、SR^5、

硝基、$N(R^5)C(O)OR^6$、$C(=NR^5)NR^6R^7$、$N(R^5)C(=NR^6)NR^7R^8$、$S(O)R^5$、$S(O)NR^5R^6$、$S(O)_2R^5$、$N(R^5)S(O)_2R^6$、$S(O)_2NR^5R^6$、芳基、雜芳基、雜環基、環烷基和氧代，條件是R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}或R^{2d}的至少一次出現不是氫；

【0353】 R^3為$NR^{3a}R^{3b}$；

【0354】 R^{3a}和R^{3b}各自獨立地為氫、烷基、羥烷基、鹵代烷基、烷氧基烷基、雜環基、雜芳基、雜環基烷基、雜芳基烷基、環烷基、$(CH_2)_nC(=O)OR^6$或$(CH_2)_nP(=O)(OR^6)_2$；

【0355】 或者R^{3a}和R^{3b}連同它們與之連接的氮一起，形成任選取代的4-7元雜芳基或任選取代的4-7元雜環基；

【0356】 或者R^{3a}和R^4連同它們與之連接的氮和碳一起，分別地形成任選取代的4-7元雜環基；

【0357】 當n為2、3、4、5或6時，R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；或

【0358】 當n為0或1時，R^4為取代或未取代的單環雜芳基、或者取代或未取代的雜環基；

【0359】 在每次出現時，R^5、R^6、R^7和R^8獨立地為氫、烷基、羥烷基、鹵代烷基、烷氧基烷基、羧基烷基、雜環基、雜芳基或環烷基；

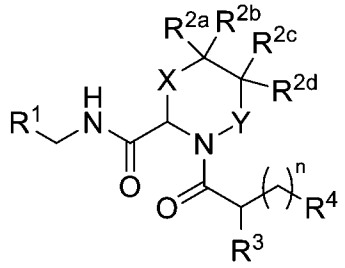
【0360】 X為直接鍵、$-CR^{2e}R^{2f}-$或$-CR^{2e}R^{2f}-CR^{2g}R^{2h}-$；

【0361】 Y為直接鍵或$-CR^{2i}R^{2j}-$；

【0362】 n為0-6的整數；和

【0363】 t為1-3。

【0364】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0365】 

【0366】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0367】 R^1為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0368】 R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}、R^{2d}獨立地選自氫、鹵素、OR^5、$C(=O)OR^5$、$OC(=O)R^5$、羥烷基、烷氧基、烷氧基烷基、鹵代烷氧基、氰基、胺基烷基、羧基烷基、NR^5R^6、$C(=O)NR^5R^6$、$N(R^5)C(=O)R^6$、$NR^5C(=O)NR^6$、$S(O)_t$、SR^5、硝基、$N(R^5)C(O)OR^6$、$C(=NR^5)NR^6R^7$、$N(R^5)C(=NR^6)NR^7R^8$、$S(O)R^5$、$S(O)NR^5R^6$、$S(O)_2R^5$、$N(R^5)S(O)_2R^6$、$S(O)_2NR^5R^6$、芳基、雜芳基、雜環基、環烷基和氧代，條件是R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}、R^{2d}的至少一次出現不是氫；

【0369】 R^3為$NR^{3a}R^{3b}$；

【0370】 R^{3a}和R^{3b}各自獨立地為氫、烷基、羥烷基、鹵代烷基、烷氧基烷基、$-CH_2C(C=O)OH$、$-CH_2C(=O)O$烷基、雜環基、雜芳基、雜環基烷基、雜芳基烷基或環烷基；

【0371】 或者R^{3a}和R^{3b}連同它們與之連接的氮一起，形成任選取代的4-7元雜芳基或任選取代的4-7元雜環基；

【0372】 當n為2、3、4、5或6時，R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；或

【0373】 當n為0或1時，R^4為取代或未取代的單環雜芳基、或者取代或未取代的雜環基；

【0374】 在每次出現時，R^5、R^6、R^7和R^8獨立地為氫、烷基、羥烷基、鹵代烷基、烷氧基烷基、羧基烷基、雜環基、雜芳基或環烷基；

【0375】 X為直接鍵、-[C(R^{2e})R^{2f}]-或-[C(R^{2e})R^{2f}]-[C(R^{2g})R^{2h}]-；

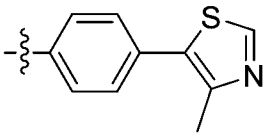
【0376】 Y為直接鍵或-[C(R^{2i})R^{2j}]-；

【0377】 n為0-6的整數；和

【0378】 t為1-3，

【0379】 條件是：

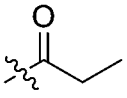
【0380】 a)當R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}、R^{2d}的一次出現為OH時，R^1不具有下述結構：

【0381】 

；

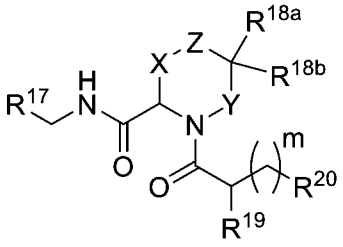
【0382】 b)當R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}、R^{2d}的一次出現為-OH時，n為2-6的整數；和

【0383】 c)當R^{2a}、R^{2b}、R^{2c}、R^{2d}的一次出現為未取代的苯基時，R^{3a}和R^{3b}均不具有下述結構：

【0384】 

。

【0385】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0386】 

【0387】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0388】 R^{17}為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0389】 R^{18a}、R^{18b}獨立地選自氫、鹵素、-OR^{21}、$C(=O)OR^{21}$、$OC(=O)R^{21}$、羥烷基、烷氧基、烷氧基烷基、鹵代烷氧基、氰基、胺基烷基、羧基烷基、$NR^{21}R^{22}$、$C(=O)NR^{21}R^{22}$、$N(R^{21})C(=O)R^{22}$、$NR^{21}C(=O)NR^{22}$、$S(O)_t$、SR^{21}、硝基、$N(R^{21})C(O)OR^{22}$、$C(=NR^{21})NR^{22}R^{23}$、$N(R^{21})C(=NR^{22})NR^{23}R^{24}$、$S(O)R^{21}$、$S(O)NR^{21}R^{22}$、$S(O)_2R^{21}$、$N(R^{21})S(O)_2R^{22}$、$S(O)_2NR^{21}R^{22}$、芳基、雜芳基、雜環基、環烷基和氧代，條件是$R^{18a}$、$R^{18b}$的至少一次出現不是氫；

【0390】 R^{19}為$NR^{19a}R^{19b}$；

【0391】 R^{19a}和R^{19b}各自獨立地為氫、烷基、羥烷基、鹵代烷基、烷氧基烷基、雜環基、雜芳基、雜環基烷基、雜芳基烷基、環烷基、$(CH_2)_nC(=O)OR^5$或$(CH_2)_nP(=O)(OR^5)_2$；

【0392】 或者R^{19a}和R^{19b}連同它們與之連接的氮一起，形成任選取代的4-7元雜芳基或任選取代的4-7元雜環基；

【0393】 R^{20}為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0394】 在每次出現時，R^{21}、R^{22}、R^{23}和R^{24}獨立地為氫、烷基、羥烷基、鹵代烷基、烷氧基烷基、羧基烷基、雜環基、雜芳基或環烷基；

【0395】 X為直接鍵、-$CR^{2e}R^{2f}$-或-$CR^{2e}R^{2f}$-$CR^{2g}R^{2h}$-；

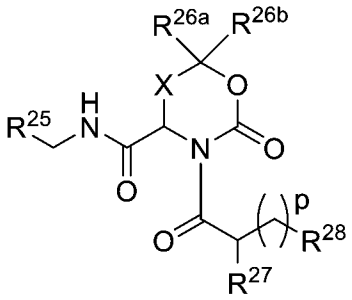
【0396】 Y為直接鍵或-$CR^{2i}R^{2j}$-；

【0397】 Z為O或S；

【0398】 m為0-6的整數；和

【0399】 t為1-3。

【0400】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0401】 

【0402】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0403】 R^{25}為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0404】 R^{26a}、R^{26b}獨立地選自氫、鹵素、$-OR^{29}$、$C(=O)OR^{29}$、$OC(=O)R^{29}$、羥烷基、烷氧基、烷氧基烷基、鹵代烷氧基、氰基、胺基烷基、羧基烷基、$NR^{29}R^{30}$、$C(=O)NR^{29}R^{30}$、$N(R^{29})C(=O)R^{30}$、$NR^{29}C(=O)NR^{30}$、$S(O)_t$、SR^{29}、硝基、$N(R^{29})C(O)OR^{30}$、$C(=NR^{29})NR^{30}R^{31}$、$N(R^{29})C(=NR^{30})NR^{31}R^{32}$、$S(O)R^{29}$、$S(O)NR^{29}R^{30}$、$S(O)_2R^{30}$、$N(R^{29})S(O)_2R^{30}$、$S(O)_2NR^{29}R^{30}$、芳基、雜芳基、雜環基、環烷基和氧代，條件是$R^{26a}$、$R^{26b}$的至少一次出現不是氫；

【0405】 R^{27}為$NR^{27a}R^{27b}$；

【0406】 R^{27a}和R^{27b}各自獨立地為氫、烷基、羥烷基、鹵代烷基、烷氧基烷基、雜環基、雜芳基、雜環基烷基、雜芳基烷基、環烷基、$(CH_2)_nC(=O)OR^{29}$或$(CH_2)_nP(=O)(OR^{29})_2$；

【0407】 或者R^{27a}和R^{27b}連同它們與之連接的氮一起，形成任選取代的4-7元雜芳基或任選取代的4-7元雜環基；

【0408】 R^{28}為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

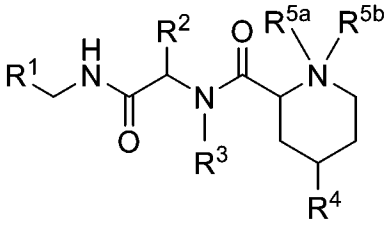
【0409】 在每次出現時，R^{29}、R^{30}、R^{31}和R^{32}獨立地為氫、烷基、羥烷基、鹵代烷基、烷氧基烷基、羧基烷基、雜環基、雜芳基或環烷基；

【0410】 X為直接鍵或$-CR^{26c}R^{26d}-$；

【0411】 p為0-6的整數；和

【0412】 t為1-3。

【0413】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0414】 

【0415】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0416】 R^1為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0417】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【0418】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基；

【0419】 或者R^2和R^3連同它們與之連接的碳和氮一起，分別地形成任選取代的4-7元雜環基；

【0420】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0421】 R^{5a}為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_nC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$或$C(=O)NR^6R^7$；

【0422】 R^{5b}為電子對或烷基；

【0423】 在每次出現時，R^6和R^7獨立地為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基或芳基烷基；

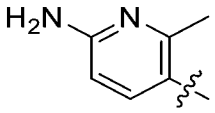
【0424】 R^8為烷基、鹵代烷基、胺基烷基、取代或未取代的芳基烷基；和

【0425】 n為1、2、3、4、5、6、7或8，

【0426】 條件是

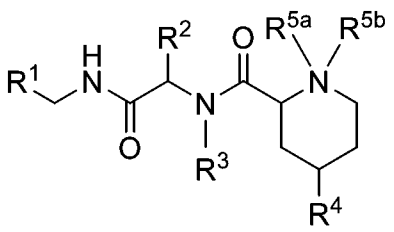
【0427】 A)R^{5a}為烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_nC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$或$C(=O)NR^6R^7$，或R^1由選自取代的雜芳基、$C(=NH)NHC(=O)OR^8$、$C(=NOC(=O)R^8)NH_2$、$C(=NOC(=O)OR^8)NH_2$和$C(=NOH)NH_2$的一個或多個取代基取代；和

【0428】 B)當R^{5a}為烷基或$(CH_2)_nC(=O)OR^6$時，R^1不具有下述結構：

【0429】 

【0430】 除非R^2和R^3連同它們與之連接的碳和氮一起，分別地形成任選取代的4-7元雜環基。

【0431】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0432】 

【0433】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0434】 R^1為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0435】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【0436】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基；

【0437】 或者R^2和R^3連同它們與之連接的碳和氮一起，分別地形成任選取代的4-7元雜環基；

【0438】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0439】 R^{5a}為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_nC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$或$C(=O)NR^6R^7$；

【0440】 R^{5b}為電子對或烷基；

【0441】 在每次出現時，R^6和R^7獨立地為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基或芳基烷基；

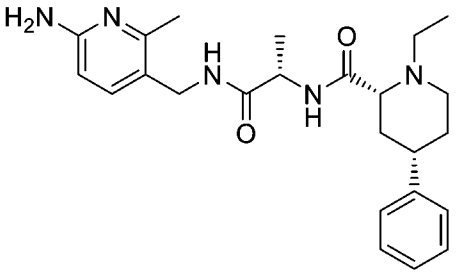
【0442】 R^8為烷基、鹵代烷基、胺基烷基、取代或未取代的芳基烷基；和

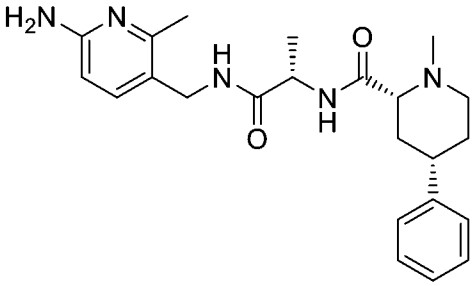
【0443】 n為1、2、3、4、5、6、7或8，

【0444】 條件是

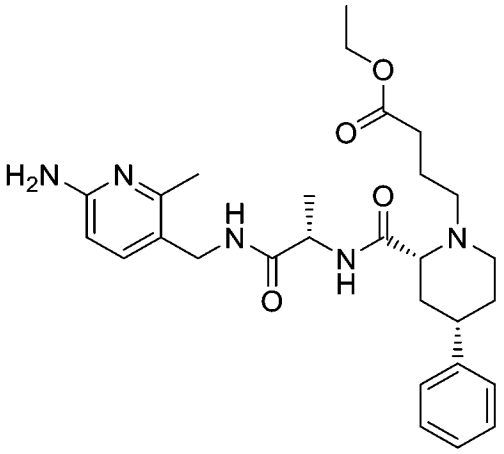
【0445】 A)R^{5a}為烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_nC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$或$C(=O)NR^6R^7$，或R^1由選自取代的雜芳基、$C(=NH)NHC(=O)OR^8$、$C(=NOC(=O)R^8)NH_2$、$C(=NOC(=O)OR^8)NH_2$和$C(=NOH)NH_2$的一個或多個取代基取代；和

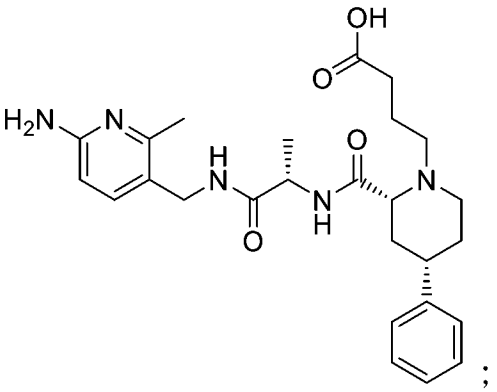
【0446】 B)該化合物不具有下述結構之一：

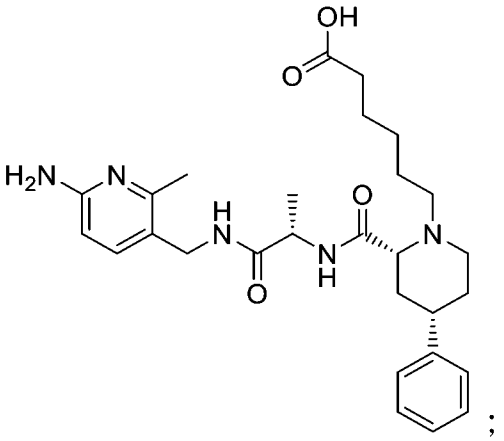

；

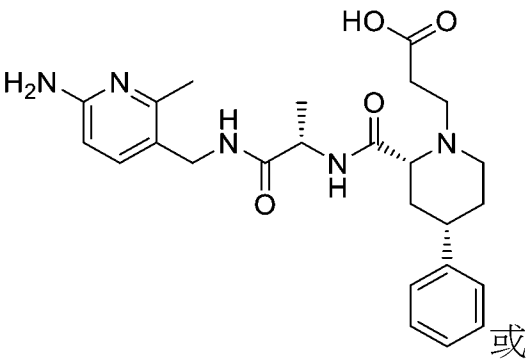

；

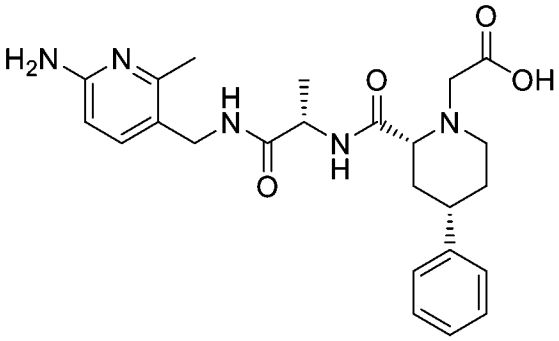
【0447】


；

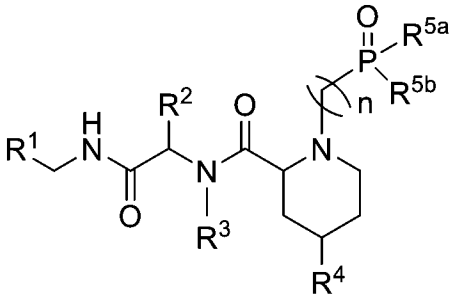

；


；


或


。

【0448】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0449】 

【0450】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0451】 R^1為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

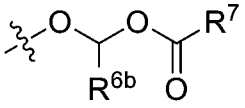
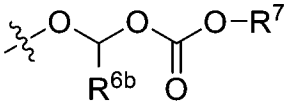
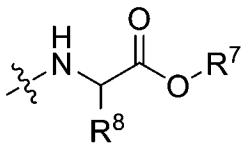
【0452】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【0453】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基；

【0454】 或者R^2和R^3連同它們與之連接的碳和氮一起，分別地形成任選取代的4-7元雜環基；

【0455】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0456】 在每次出現時，R^{5a}和R^{5b}獨立地具有下述結構之一：

【0457】 ；  ；  或  ；

【0458】 或者R^{5a}和R^{5b}連同它們與之連接的磷原子一起，形成任選取代的4-7元雜環基；

【0459】 R^{6a}為烷基、鹵代烷基、芳基、雜芳基、環烷基或雜環基；

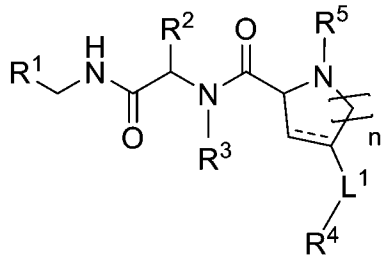
【0460】 在每次出現時，R^{6b}獨立地為氫或烷基；

【0461】 在每次出現時，R^7獨立地為烷基、鹵代烷基、雜芳基、環烷基、雜環基、芳基烷基、雜芳基烷基、環烷基烷基或雜環基烷基；

【0462】 R^8為胺基酸側鏈；和

【0463】 n為1、2、3、4、5、6、7或8。

【0464】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0465】 

【0466】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0467】 ----代表雙鍵或單鍵；

【0468】 R^1為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【0469】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、羥烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【0470】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基，或者R^2和R^3連同它們與之連接的碳和氮一起，分別地形成任選取代的4-7元雜環基；

【0471】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【0472】 R^5為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_mC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$、$(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$或$C(=O)NR^6R^7$；

【0473】 在每次出現時，R^6和R^7獨立地為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基或芳基烷基；

【0474】 L^1為直接鍵、$-CR^{8a}R^{8b}-$、$-S(O)_t-$、NR^{8c}或-O-；

【0475】 R^{8a}和R^{8b}各自獨立地為氫、烷基，或者R^{8a}和R^{8b}連同它們與之連接的碳一起，形成任選取代的3-6元環烷基；

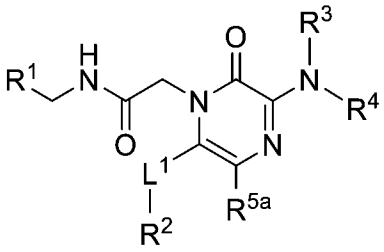
【0476】 R^{8c}為氫、烷基、鹵代烷基、(C=O)烷基、(C=O)O烷基、(C=O)環烷基、(C=O)O環烷基、(C=O)芳基、(C=O)O芳基、(C=O)雜芳基、(C=O)O雜芳基、(C=O)雜環基、(C=O)O雜環基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、取代或未取代的雜環基、取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的雜芳基烷基、取代或未取代的環烷基烷基、或者取代或未取代的雜環基烷基；

【0477】 n為1或2；

【0478】 m為1、2、3、4、5或6；和

【0479】 t為0、1或2。

【0480】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0481】 

【0482】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0483】 R^1為取代或未取代的雜芳基；

【0484】 R^2為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【0485】 R^3為氫或烷基；

【0486】 R^4為烷基、取代或未取代的芳基烷基、由選自取代或未取代的苯基或者取代或未取代的吡啶基的取代基取代的雜環基，或者R^3和R^4連同它們與之連接的氮和碳一起，分別地形成任選取代的4-10元雜環基；

【0487】 R^{5a}為氫或鹵素；

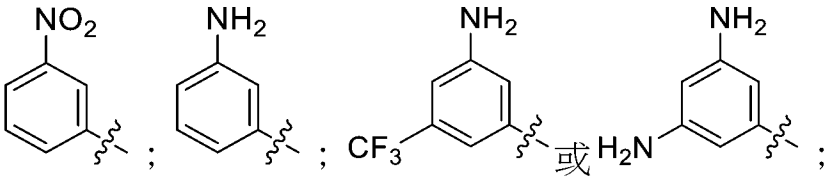
【0488】 R^{5b}為氫、烷基、鹵代烷基、(C=O)烷基、(C=O)O烷基、(C=O)環烷基、(C=O)O環烷基、(C=O)芳基、(C=O)O芳基、(C=O)雜芳基、(C=O)O雜芳基、(C=O)雜環基、(C=O)O雜環基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、取代或未取代的雜環基、取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的雜芳基烷基、取代或未取代的環烷基烷基、或者取代或未取代的雜環基烷基；

【0489】 L^1為直接鍵、$-CH_2-$、$-S(O)_t-$、NR^{5b}、-O-、-C=C-或-C≡C-；和

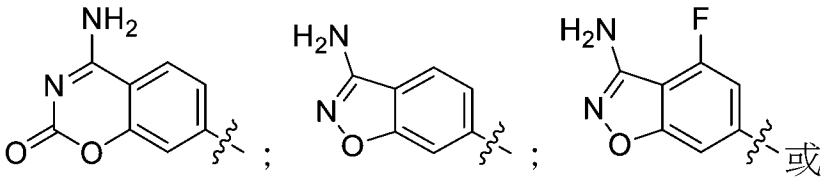
【0490】 t為0、1或2，

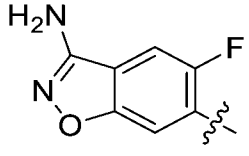
【0491】 條件是：

【0492】 A)R^2不具有下述結構之一：

【0493】 

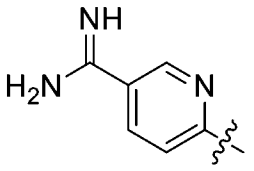
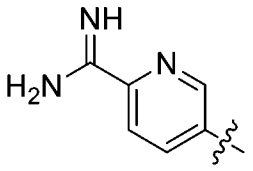
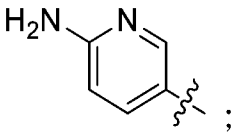
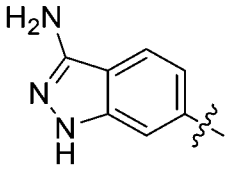
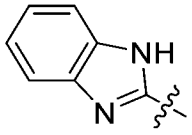
【0494】 B)R^1不具有下述結構之一：

【0495】 

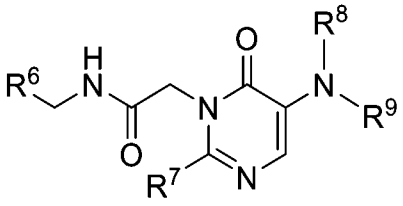


；和

【0496】 C)當R^2為未取代的苯基時，R^1不具有下述結構之一：

【0497】  ；  ；  ；  ；  。

【0498】 在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0499】 

【0500】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0501】 R^6為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【0502】 R^7為烷基、-SR^{10}、取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【0503】 R^8為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基；

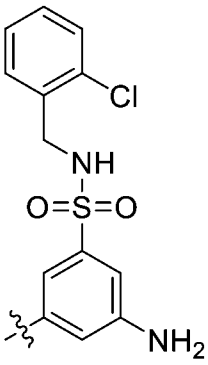
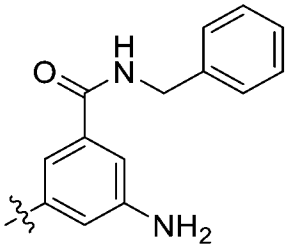
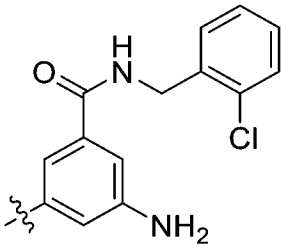
【0504】 R^9為取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的雜芳基烷基，或者R^8和R^9連同它們與之連接的氮一起，形成任選取代的4-10元雜環基；

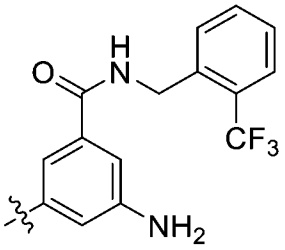
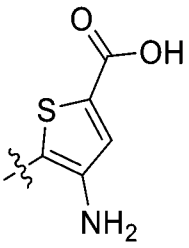
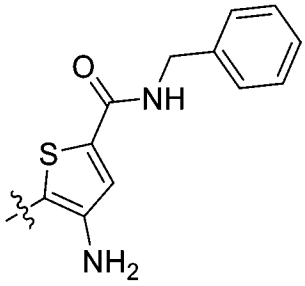
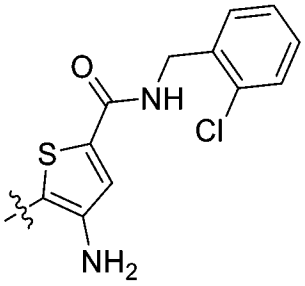
【0505】 R^{10}為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基；

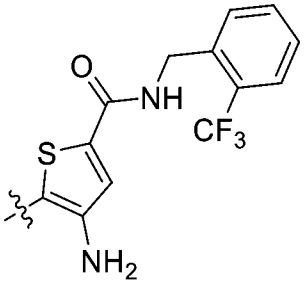
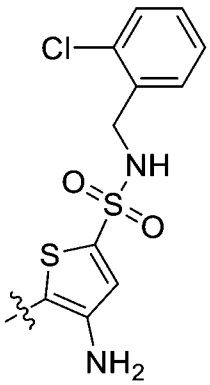
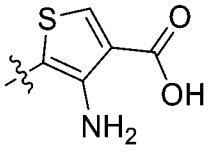
【0506】 條件是：

【0507】 A)當R^7為未取代的苯基、3-((甲基磺醯基)胺基)苯基、2-甲基苯基、3-(二甲基胺基)苯基、3-(甲基胺基)苯基、3-甲基苯基、3-胺基甲基苯基、3-胺基苯基、未取代的吡啶基、3-(甲基胺基)-2-噻吩基、3,4-二胺基-2-噻吩基、

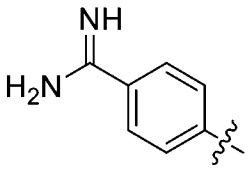
3-((甲基磺醯基)胺基)-2-噻吩基、3-胺基-2-噻吩基、3-胺基-5-5(胺基羰基)苯基，或具有下述結構之一時：

【0508】  ；  ；  ；

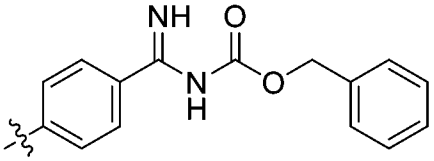
 ；  ；  ；  ；

 ；  或  ，

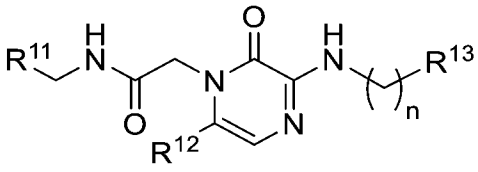
【0509】 R^6不具有下述結構：

【0510】  ；和

【0511】 B)當R^7為未取代的苯基時，R^6不具有下述結構：

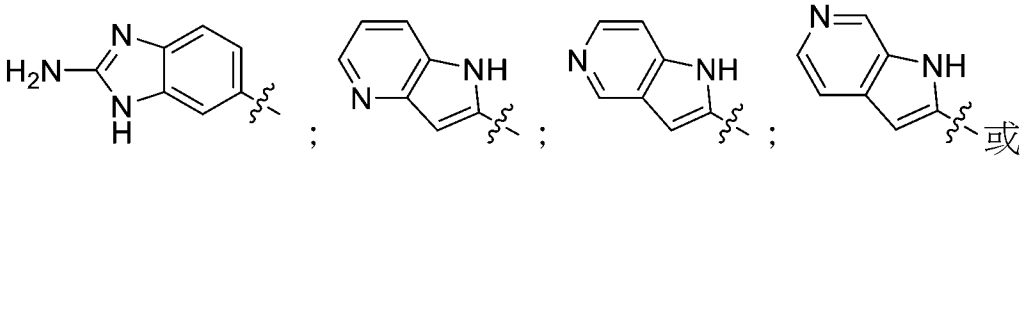
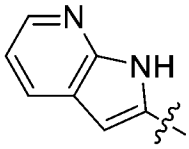
【0512】  。

【0513】在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0514】 

【0515】或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0516】R^{11}具有下述結構之一：

【0517】  ；；；或  ；

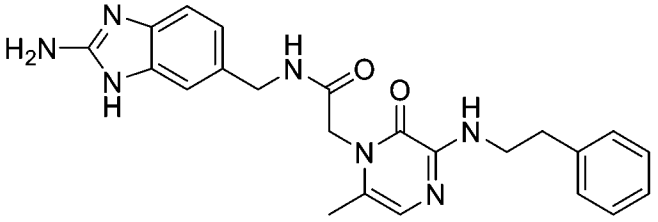
【0518】R^{12}為甲基或鹵素；

【0519】R^{13}為取代或未取代的芳基；和

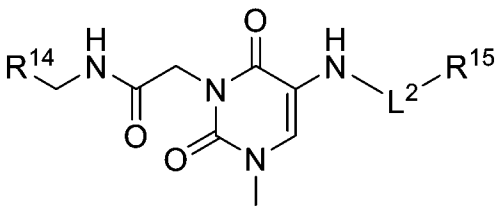
【0520】n為1或2

【0521】條件是：

【0522】該化合物不具有下述結構：

【0523】  。

【0524】在一些實施方案中，小分子是具有下述結構的化合物：

【0525】 

【0526】或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【0527】 R^{14}為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【0528】 R^{15}為取代或未取代的芳基烷基、或者取代或未取代的雜芳基烷基；

【0529】 L^2為直接鍵、-C(=O)或-$S(=O)_t$-；和

【0530】 t為0、1或2。

【0531】 在一些實施方案中，化合物和/或式的某些特徵以組或範圍公開。具體地預期此類公開內容包括此類組和範圍的成員的每個和每一個個別的子組合。例如，術語"C_{1-6}烷基"和"C_1-C_6烷基"具體地預期個別地公開了(但不限於)甲基、乙基、C_3烷基、C_4烷基、C_5烷基和C_6烷基。

【0532】 在本說明書的各個地方，描述了定義二價連接基團的變量。具體地預期每個連接取代基包括連接取代基的正向形式和反向形式兩者。例如，-$NR(CR'R'')_n$-包括-$NR(CR'R'')_n$-和-$(CR'R'')_n$NR-兩者，並且預期個別地公開了每種形式。當結構需要連接基團時，對於該組列出的馬庫什(Markush)變量應理解為連接基團。例如，如果結構需要連接基團，並且關於該變量的馬庫什組定義列出“烷基”或“芳基”，則應理解“烷基”或“芳基”分別代表連接亞烷基或亞芳基。

【0533】 術語“取代的”意指一個原子或一組原子在形式上替換氫作為連接至另一個基團的“取代基”。除非另有說明，否則術語“取代的”指任何取代水平，例如單取代、二取代、三取代、四取代或五取代，當允許此類取代時。取代基是獨立地選擇的，並且取代可以在任何化學可及的位置處。應理解，在給定原子處的取代受效價的限制。短語“任選地取代的”意指取代或未取代的。術語“取代的”意指氫原子在形式上被去除並且被取代基替換。單個二價取代基，例如氧代，可以替換兩個氫原子。

【0534】 其中n和m為整數的術語"C_{n}-$_{m}$"和"C_{n}-C_{m}"指示含有n至m個碳原子的基團。實例包括C_{1-4}、C_{1-6}等等。該術語預期明確地公開了範圍內的每一個成員，即C_{n}、C_{n+1}、C_{n+2} … C_{m-2}、C_{m-1}、C_{m}。例如，C_{1-6}預期公開了C_{1}、C_{2}、C_{3}、C_{4}、C_{5}和C_{6}。"C_{n}-$_{m}$"意欲與"C_{n}-C_{m}"相同。

【0535】 單獨或與其它術語組合採用的術語“烷基”指可以是直鏈或支鏈的飽和烴基。術語"C_{n-m}烷基"和"C_{n}-C_{m}烷基"指具有n至m個碳原子的烷基。例如，C_{1}-C_{12}指示該基團可以在其中具有1至12個(包括在內)碳原子。如果沒有另外說明，則為約1至約20個碳原子的烷基。烷基在形式上對應於具有一個C-H鍵被替換為烷基與化合物的剩餘部分的連接點的烷烴。在一些實施方案中，烷基含有1至6個碳原子、1至4個碳原子、1至3個碳原子或1至2個碳原子。示例性烷基部分包括但不限於化學基團，例如甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、叔丁基、異丁基、仲丁基；較高級的同源物，例如2-甲基-1-丁基、1,1-二甲基丙基、正戊基、3-戊基、正己基、1,2,2-三甲基丙基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十二烷基等等。術語“低級烷基”指在鏈中具有1-6個碳原子的烷基。“取代的烷基”是由一個或多個取代基取代的烷基。

【0536】 單獨或與其它術語組合採用的術語“烯基”，指對應於具有一個或多個雙碳-碳鍵的烷基的直鏈或支鏈烴基。烯基在形式上對應於具有一個C-H鍵被替換為烯基與化合物的剩餘部分的連接點的烯烴。術語"C_{n-m}烯基"和"C_{n}-C_{m}烯基"指具有n至m個碳的烯基。在一些實施方案中，烯基部分含有2至6、2至4、或2至3個碳原子。示例性烯基包括但不限於乙烯基、正丙烯基、異丙烯基、正丁烯基、仲丁烯基等等。

【0537】 單獨或與其它術語組合採用的術語“炔基”，指對應於具有一個或多個三碳-碳鍵的烷基的直鏈或支鏈烴基。炔基在形式上對應於具有一個C-H鍵被替換為烷基與化合物的剩餘部分的連接點的炔烴。術語"C_{n-m}炔基"和"C_n-C_m炔基"指具有n至m個碳的炔基。示例性炔基包括但不限於乙炔基、丙炔-1-基、丙炔-2-基等等。在一些實施方案中，炔基部分含有2至6、2至4、或2至3個碳原子。

【0538】 單獨或與其它術語組合採用的術語“亞烷基”指二價烷基連接基團。亞烷基在形式上對應於具有兩個C-H鍵被替換為亞烷基與化合物的剩餘部分的連接點的烷烴。術語"C_{n-m}亞烷基"指具有n至m個碳原子的亞烷基。亞烷基的實例包括但不限於亞甲基、乙烷-1,2-二基、丙烷-1,3-二基、丙烷-1,2-二基、丁烷-1,4-二基、丁烷-1,3-二基、丁烷-1,2-二基、2-甲基-丙烷-1,3-二基等等。在一些實施方案中，"Cn-m亞烷基"可以指n至m個亞甲基(CH_2)基團的鏈，-(CH_2)$_{n-m}$-，例如-CH_2-、-CH_2CH_2-、-$CH_2CH_2CH_2$-等。

【0539】 單獨或與其它術語組合採用的術語“烷氧基”指式-O-烷基的基團，其中烷基如上文定義。術語"C_{n-m}烷氧基"指其烷基具有n至m個碳的烷氧基。示例性烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基(例如正丙氧基和異丙氧基)、叔丁氧基等等。在一些實施方案中，烷基具有1至6、1至4、或1至3個碳原子。

【0540】 術語“烷氧基烷基”指其中一個或多個氫原子已被烷氧基替換的烷基。術語"C_{n-m}烷氧基-C_{p-q}烷基"指被C_{n-m}烷氧基取代的C_{p-q}烷基。在一些實施方案中，羥烷基具有一個烷氧基。在一些實施方案中，烷氧基烷基具有一個或兩個烷氧基基團，各自在不同的碳原子上。實例可以包括但不限於甲氧基甲基、乙氧基甲基、3-乙氧基乙基和1-甲氧基乙基。

【0541】 術語“胺基”指式–NH_2的基團。

【0542】 術語“胺基甲醯基”指式–C(O)NH_2的基團。

【0543】 單獨或與其它術語組合採用的術語“羰基”指-C(=O)-基團，其也可以寫作C(O)。

【0544】 術語“氰基”或“腈”指式–C≡N的基團，其也可以寫作-CN。

【0545】 單獨或與其它術語組合使用的術語“鹵代”或“鹵素”指氟、氯、溴和碘。在一些實施方案中，“鹵素”指選自F、Cl或Br的鹵素原子10。在一些實施方案中，鹵素為F。

【0546】 術語“鹵代烷基”指其中一個或多個氫原子已被鹵素原子替換的烷基。術語"C_{n-m}鹵代烷基"指具有n至m個碳原子、以及至少一個到至多{2(n至m)+1}個鹵素原子的C_{n-m}烷基，其可以是相同的或不同的。在一些實施方案中，鹵素原子是氟原子。在一些實施方案中，鹵代烷基具有1至6或1至4個碳原子。示例性鹵代烷基包括CF_3、C_2F_5、CHF_2、CCl_3、$CHCl_2$、C_2Cl_5等等。在一些實施方案中，鹵代烷基是氟烷基。

【0547】 單獨或與其它術語組合採用的術語“鹵代烷氧基”指式-O-鹵代烷基的基團，其中鹵代烷基如上文定義。術語"C_{n-m}鹵代烷氧基"指其鹵代烷基具有n至m個碳的鹵代烷氧基。示例性鹵代烷氧基包括三氟甲氧基等等。在一些實施方案中，鹵代烷氧基具有1至6、1至4、或1至3個碳原子。

【0548】 術語“羥烷基”指其中一個或多個氫原子已被羥基替換的烷基。術語"C_{n-m} 羥烷基"指具有n至m個碳原子、以及至少一個羥基的C_{n-m}烷基。在一些實施方案中，羥烷基具有一個醇基。在某些方面，羥烷基具有一個或兩個醇

基，各自在不同的碳原子上。在某些方面，羥烷基具有1、2、3、4、5或6個醇基。實例可以包括但不限於羥甲基、2-羥乙基和1-羥乙基。

【0549】 術語“氧代”指作為二價取代基的氧原子，當附著至碳時形成羰基，或者當附著至雜原子時，形成亞碸或碸基或N-氧化物基團。

【0550】 術語“硫代基(sulfido)”指作為二價取代基的硫原子，當附著至碳時形成硫羰基(C=S)。

【0551】 其中n為整數的術語“ n元”，通常描述其中成環原子數為n的部分中的成環原子數。其中n和m為整數的術語“ n-m元”描述了其中成環原子數為n至m的範圍。例如，呱啶基是6元雜環烷基環的實例，吡唑基是5元雜芳基環的實例，吡啶基是6元雜芳基環的實例，而1,2,3,4-四氫萘是10元環烷基的實例。

【0552】 術語“芳族的”指具有一個或多個多不飽和環的碳環或雜環，所述多不飽和環具有芳族特性(即，具有(4n + 2)個離域π(pi)電子，其中n為整數)。

【0553】 單獨或與其它術語組合採用的術語“芳基”，指可以是單環或多環(例如具有2、3或4個稠合環)的芳族烴基。術語"C_{n-m}芳基"指具有n至m個環碳原子的芳基。芳基包括例如苯基、萘基、蒽基、菲基、茚滿基、茚基、並四苯基(tetracenyl)等等。在一些實施方案中，芳基具有6至約20個碳原子、6至約18個碳原子、6至約15個碳原子、或6至約10個碳原子。在一些實施方案中，芳基是苯基。

【0554】 單獨或與其它術語組合採用的術語“芳基烷基”或“芳烷基”或“烷基芳基”指式-亞烷基-芳基的基團，並且指其中至少一個氫已被如本文定義的芳基取代的如本文定義的烷基。在一些實施方案中，芳基烷基是C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基。在一些實施方案中，芳基烷基是C_{6-10}芳基-C_{1-4}烷基。在一些實施方案中，

芳基烷基是C_{6-10}芳基-C_{1-3}烷基。在一些實施方案中，芳基烷基是苯基-C_{1-3}烷基。實例包括但不限於苄基、1-苯乙基、4-甲基苄基和1,1,-二甲基-1-苯甲基。在一些實施方案中，芳基烷基是苄基。

【0555】 單獨或與其它術語組合採用的術語“雜芳基”或“雜芳族”，指具有選自硫、氧和氮的至少一個雜原子環成員的單環或多環芳族雜環。其中n為整數的“n元雜芳基”或“n元雜芳族”指具有n個成環原子的雜芳基。其中n和m為整數的“n-m元雜芳基”或“n-m元雜芳族”指具有n至m個成環原子的雜芳基。環中的碳原子數比成環原子數少了雜原子數。因此，在一些實施方案中，n元雜芳基可以具有n-1、n-2、n-3或n-4個環碳原子，而n-m元雜芳基可以具有n-1、n-2、n-3個或n-4個環碳原子至m-1、m-2、m-3或m-4個環碳原子。在一些實施方案中，n-m元雜芳基可以具有1至m-1個環碳原子。在一些實施方案中，雜芳基環具有獨立地選自氮、硫和氧的1、2、3或4個雜原子環成員。在一些實施方案中，雜芳基部分中的任何成環N可以是N-氧化物。在一些實施方案中，雜芳基具有5-10個環原子，包括碳原子以及獨立地選自氮、硫和氧的1、2、3或4個雜原子環成員。在一些實施方案中，雜芳基具有5-6個環原子以及獨立地選自氮、硫和氧的1或2個雜原子環成員。在一些實施方案中，雜芳基是五元或六元雜芳基環。在其它實施方案中，雜芳基是八元、九元或十元稠合雙環雜芳基環。示例性雜芳基包括但不限於吡啶、嘧啶、吡嗪、噠嗪、吡咯、吡唑、唑基、噁唑、異噁唑、噻唑、異噻唑、咪唑、呋喃、噻吩、喹啉、異喹啉、萘啶(包括1,2-、1,3-、1,4-、1,5-、1,6-、1,7-、1,8-、2,3-和2,6-萘啶)、吲哚、氮雜吲哚、苯並噻吩、苯並呋喃、苯並異噁唑、苯並咪唑、咪唑並[1,2-b]噻唑、嘌呤、呋

咱、三唑、四唑、1,2,4-噻二唑、喹唑啉、酞嗪、咪唑並[1,2-a]吡啶、咪唑並[2,1] -b]噻唑基等等。

【0556】 五元雜芳基環是具有五個環原子的雜芳基，其中一個或多個(例如1、2或3)環原子獨立地選自N、O和S。示例性的五元環雜芳基包括噻吩基、呋喃基、吡咯基、咪唑基、噻唑基、噁唑基、吡唑基、異噻唑基、異噁唑基、1,2,3-三唑基、四唑基、1,2,3-噻二唑基、1,2,3-噁二唑基、1,2,4-三唑基、1,2,4-噻二唑基、1,2,4-噁二唑基、1,3,4-三唑基、1,3,4-噻二唑基和1,3,4-噁二唑基。

【0557】 六元雜芳基環是具有六個環原子的雜芳基，其中一個或多個(例如1、2或3)環原子獨立地選自N、O和S。示例性的六元環雜芳基是吡啶基、吡嗪基、嘧啶基、三嗪基和噠嗪基。

【0558】 單獨或與其它術語組合採用的術語“雜芳基烷基”指式–亞烷基-雜芳基的基團。其中n為整數的術語“ n元雜芳基烷基”指其中雜芳基為n元的雜芳基烷基。其中n、m、p和q為整數的術語"n-m元C_{p-q}-烷基"指這樣的雜芳基烷基，其中雜芳基為n至m元的，並且烷基具有p至q個碳原子。在一些實施方案中，雜芳基烷基是5-10元雜芳基-C_{1-3}烷基或C_{1-9}雜芳基-C_{1-3}烷基，其中雜芳基部分是單環或雙環的，並且具有獨立地選自氮、硫和氧的1、2、3、4或5個雜原子環成員。在一些實施方案中，雜芳基烷基是C_{1-9}雜芳基-C_{1-4}烷基，其中雜芳基部分是單環或雙環的，並且具有獨立地選自氮、硫和氧的1、2、3或4個雜原子環成員。實例包括吡啶基甲基，例如2-吡啶基甲基、3-吡啶基甲基或4-吡啶基甲基。

【0559】 單獨或與其它術語組合採用的術語“環烷基”指非芳族、飽和、單環、雙環或多環烴環系統。該術語包括環化的烷基和烯基。術語"C_{n-m}環烷基"

指具有n至m個環成員碳原子的環烷基。環烷基可以包括單環或多環(例如具有2、3或4個稠環)基團和螺環。環烷基可以具有3、4、5、6或7個成環碳(C_{3-7})。在一些實施方案中，環烷基具有3至6個環成員、3至5個環成員、或3至4個環成員。在一些實施方案中，環烷基為單環的。在一些實施方案中，環烷基為單環或雙環的。在一些實施方案中，環烷基為C_{3-6}單環環烷基。環烷基的成環碳原子可以任選地被氧化，以形成氧代或硫代基團。環烷基還包括環亞烷基。在一些實施方案中，環烷基為環丙基、環丁基、環戊基或環己基。環烷基的定義中還包括的是具有與環烷基環稠合(即，與之具有共有鍵)的一個或多個芳環的部分，例如環戊烷、環己烷等等的苯並或噻吩基衍生物。含有稠合芳環的環烷基可以通過任何成環原子，包括稠合芳環的成環原子進行附著。環烷基的實例包括環丙基、環丁基、環戊基、環己基、4,4-二甲基環己基、環庚基、環戊烯基、環己烯基、環己二烯基、環庚三烯基、降冰片基、降蒎基(norpinyl)、降蔵基(norcarnyl)、雙環[1.1.1]戊基、雙環[2.1.1]己基等等。在一些實施方案中，環烷基為環丙基、環丁基、環戊基或環己基。

【0560】 單獨或與其它術語組合採用的術語“環烷基烷基”指式-亞烷基-環烷基的基團。其中n、m、p和q為整數的術語C_{n-m}環烷基-C_{p-q}烷基，指具有n至m個碳原子的環烷基，其附著至具有p至q個碳原子的烷基。在一些實施方案中，環烷基烷基是C_{3-7}環烷基-C_{1-3}烷基，其中環烷基部分是單環或雙環的。實例包括環丙基甲基、環丁基甲基、環戊烷甲基和環己基甲基。

【0561】 單獨或與其它術語組合採用的術語“雜環烷基”指非芳族環或環系統，其可以任選地含有一個或多個亞烯基作為環結構的部分，所述環結構具有獨立地選自氮、硫和氧的至少一個雜原子環成員。其中n為整數的“ n元雜環烷

基”指具有n個成環原子的雜芳基。其中n和m為整數的“ n-m元雜環烷基”指具有n至m個成環原子的雜環烷基。環中的碳原子數比成環原子數少了雜原子數。因此，在一些實施方案中，n元雜環烷基可以具有n-1、n-2、n-3或n-4個環碳原子，而n-m元雜環烷基可以具有n-1、n-2、n-3個或n-4個環碳原子至m-1、m-2、m-3或m-4個環碳原子。在一些實施方案中，n-m元雜環烷基可以具有1至m-1個環碳原子。在一些實施方案中，雜環烷基具有4-12個環成員、4-10個環成員、4-7個環成員或4-6個環成員。雜環烷基中包括的是單環的4、5、6和7元雜環烷基。雜環烷基可以包括單環或雙環(例如，具有兩個稠環或橋環)環系統。在一些實施方案中，雜環烷基是具有獨立地選自氮、硫和氧的1、2或3個雜原子的單環基團。雜環烷基的成環碳原子和雜原子可以任選地被氧化，以形成氧代或硫代基團或者其它氧化鍵合(例如C(O)、S(O)、C(S)或$S(O)_2$、N-氧化物等)，或者氮原子可以被季銨化。雜環烷基可以通過成環碳原子或成環雜原子進行附著。在一些實施方案中，雜環烷基含有0至3個雙鍵。在一些實施方案中，雜環烷基含有0至2個雙鍵。雜環烷基的定義中還包括的是具有與雜環烷基環稠合(即，與之具有共有鍵)的一個或多個芳環的部分，例如呱啶、嗎啉、氮雜環庚三烯等的苯並或噻吩基衍生物。含有稠合芳環的雜環烷基可以通過任何成環原子，包括稠合芳環的成環原子進行附著。雜環烷基的實例包括氮雜環丁烷、氮雜環庚烷、二氫苯並呋喃、二氫呋喃、二氫吡喃、嗎啉、3-氧雜-9-氮雜螺[5.5]十一烷、1-氧雜-8-氮雜螺[4.5]癸烷、呱啶、呱嗪、吡喃、吡咯烷、喹核鹼、四氫呋喃、四氫吡喃、1,2,3,4-四氫喹啉、莨菪烷和硫代嗎啉。

【0562】 如本文使用的，單獨或與其它術語組合採用的術語“雜環烷基烷基”指式-亞烷基-雜環烷基的基團。其中n為整數的術語"n元雜環烷基烷基"指其

中雜環烷基為n元的雜芳基烷基烷基。其中n、m、p和q為整數的術語“n元C_{p-q}-烷基”指這樣的雜環烷基烷基，其中雜環烷基為n至m元的，並且烷基具有p至q個碳原子。在一些實施方案中，雜環烷基烷基是4-10元雜環烷基-C_{1-3}烷基或C_{1-9}雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中雜環烷基部分是單環或雙環的，並且具有獨立地選自氮、硫和氧的1、2、3、4或5個雜原子環成員。在一些實施方案中，雜環烷基烷基是C_{2-9}雜環烷基-C_{1-4}烷基或C_{2-9}雜環烷基-C_{1-3}烷基，其中雜環烷基部分是單環或雙環的，並且具有獨立地選自氮、硫和氧的1、2、3或4個雜原子環成員。

【0563】 在某些地方，定義或實施方案可以指特定環(例如氮雜環丁烷環、吡啶環等)。除非另有說明，否則這些環可以連接至任何環成員，條件是不超過原子的效價。例如，氮雜環丁烷環可以在環的任何位置處連接，而氮雜環丁烷-3-基環在3位置處連接。

【0564】 當相同取代基的任何兩個基團或兩個實例“獨立地選自”替代方案列表時，這些基團可以是相同的或不同的。例如，如果R^a和R^b獨立地選自烷基、氟、胺基和羥烷基，則具有兩個R^a基團和兩個R^b基團的分子可以具有都是烷基的所有基團(例如，四個不同的烷基)。可替代地，第一R^a可以是烷基，第二R^a可以是氟，第一R^b可以是羥烷基，而第二R^b可以是胺基(或選自該組的任何其它取代基)。可替代地，R^a和第一R^b均可以是氟，而第二R^b可以是烷基(即，一些取代基對可以是相同的，而其它對可以是不同的)。除非另有說明，否則如果存在具有相同定義的兩個或更多個基團，但該定義提供了替代方案，則應理解，相同基團的每次出現獨立地選自可能的替代方案。例如，如果化合物中存在兩個或更多個R^a基團，並且R^a的定義提供了R^a可以為A、B或C，則應當理解

化合物中存在的每個R^a基團獨立地選自A、B和C，使得存在於化合物中的R^a基團可以是相同的或不同的。

【0565】 本文所述的化合物可以是不對稱的(例如，具有一個或多個立體中心)。除非另有說明，否則預期所有立體異構體，例如對映異構體和非對映異構體。本文所述的含有不對稱取代的碳原子的化合物可以以光學活性或外消旋形式分離。關於如何從光學惰性的原材料製備光學活性形式的方法是本領域已知的，例如通過外消旋混合物的拆分或通過立體選擇性合成。烯烴、C=N雙鍵等等的許多幾何異構體也可以存在於本文所述的化合物中，並且在本發明中考慮了所有此類穩定的異構體。描述了本發明的化合物的順式和反式幾何異構體，並且可以作為異構體的混合物或作為分開的異構體形式進行分離。

【0566】 化合物的外消旋混合物的拆分可以通過本領域已知的眾多方法中的任一種來進行。一種方法包括使用手性拆分酸的分級重結晶，所述手性拆分酸是光學活性的、成鹽有機酸。用於分級重結晶方法的合適拆分劑是例如光學活性的酸，例如D和L形式的酒石酸、二乙醯酒石酸、二苯甲醯基酒石酸、扁桃酸、蘋果酸、乳酸或各種光學活性的樟腦磺酸例如β-樟腦磺酸。適合於分級結晶方法的其它拆分劑包括α-甲基苄胺的立體異構純形式(例如S和R形式，或非對映異構純形式)、2-苯基甘醇、去甲麻黃鹼、麻黃鹼、N-甲基麻黃鹼、環己基乙胺、1,2-二胺基環己烷等等。

【0567】 外消旋混合物的拆分也可以通過在裝有光學活性拆分劑(例如二硝基苯甲醯基苯基甘胺酸)的柱上洗脫來進行。合適的洗脫溶劑組成可以由本領域技術人員確定。

【0568】在一些實施方案中，本發明的化合物具有(R)-構型。在其它實施方案中，化合物具有(S)-構型。在具有多於一個手性中心的化合物中，除非另有說明，否則該化合物中的每個手性中心可以獨立地為(R)或(S)。

【0569】本文所述的化合物還可以包括互變異構形式。互變異構形式起因於單鍵與相鄰雙鍵的交換連同質子的伴隨遷移。互變異構形式包括質子移變互變異構體，其是具有相同經驗式和總電荷的異構質子化狀態。示例性質子移變互變異構體包括酮-烯醇對、醯胺-亞胺酸對、內醯胺-內醯胺對、烯胺-亞胺對、以及其中質子可以佔據雜環系統的兩個或更多個位置的環形形式，例如1H-和3H-咪唑，1H-、2H-和4H- 1,2,4-三唑，1H-和2H-異吲哚和1H-和2H-吡唑。互變異構形式可以處於平衡，或通過適當的取代在空間上鎖定成一種形式。本公開內容預期涵蓋所述化合物的所有此類互變異構體。

【0570】本文所述的化合物還可以包括在中間產物或最終化合物中存在的原子的所有同位素。同位素包括具有相同原子數但不同質量數的那些原子。例如，氫的同位素包括氚和氘。

【0571】如本文使用的，術語“化合物”意指包括所述結構的所有立體異構體、幾何異構體、互變異構體和同位素。

【0572】本文所述的化合物可以包括酸性和/或鹼性基團並且能夠形成鹽。應當理解，本公開內容預期包括能夠形成鹽的化合物的所有鹽，無論是否明確描述了鹽的可能存在，包括化合物的酸式鹽和鹼式鹽兩者。此外，當描述了其為鹽的化合物時，應理解該化合物的公開內容預期包括該化合物的所有形式，包括游離鹼或游離酸、以及其替代的鹽形式。術語“鹽”指所公開化合物的衍生物，其中母體化合物通過將現有的酸或鹼部分轉換為其鹽形式進行修飾。

鹽的實例包括但不限於鹼性殘基如胺的無機酸鹽或有機酸鹽；酸性殘基如羧酸的鹼金屬鹽或有機鹽；等等。術語“其鹽(a salt thereof)”、“其鹽(salt thereof)”或“其鹽(salts thereof)”可以應用於相關的馬庫什組的任何先前成員。例如，由A、B、C及其鹽組成的組在其範圍內包括其為A的鹽的實施方案、其為B的鹽的實施方案、以及其為C的鹽的實施方案。

【0573】 本文公開的化合物的鹽包括藥學上可接受的鹽。術語“藥學上可接受的鹽”指例如由無毒的無機酸或有機酸形成的母體化合物的無毒鹽。本發明的藥學上可接受的鹽可以通過常規化學方法，由含有鹼性或酸性部分的母體化合物合成。一般地，可以通過使這些化合物的游離酸或鹼形式與化學計算量的適當鹼或酸反應，來製備此類鹽，所述鹼或酸在水或有機溶劑或兩者的混合物中；一般地，非水介質如醚、乙酸乙酯、醇(例如甲醇、乙醇、異丙醇或丁醇)或乙腈(MeCN)是優選的。合適鹽的列表在以下中找到：Remington's Pharmaceutical Sciences，第17版，(Mack Publishing Company，Easton，1985)，第1418頁，Berge等人，J. Pharm. Sci.，1977，66(1)，1-19，以及Stahl等人，Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties，Selection，and Use,(Wiley，2002)。在一些實施方案中，本文所述的化合物包括N-氧化物形式。關於合適的藥學上可接受的鹽的另外信息可以在Remington's，Pharmaceutical Sciences(當前版本)，Mack Publishing Co.，Easton，PA中找到，所述參考文獻引入本文作為參考。

【0574】 化合物和其鹽，包括藥學上可接受的鹽，可以連同其它物質例如水和溶劑(例如水合物和溶劑化物)一起發現，或可以是分離的。當處於固態時，本文所述的化合物及其鹽可以以各種形式存在，並且可以例如採取溶劑化

物包括水合物的形式。化合物可以是任何固態形式，例如多晶型物或溶劑化物，因此，除非另有明確說明，否則提及化合物及其鹽應當理解為包含化合物的任何固態形式。

【0575】 在一些實施方案中，本文所述的化合物或其鹽是基本上分離的。“基本上分離的”意指該化合物與它在其中形成或檢測到的環境至少部分或基本上分開。部分分開可以包括例如富含本發明的化合物的組合物。基本上分開可以包括含有按本發明的化合物或其鹽的重量計至少約50%、至少約60%、至少約70%、至少約80%、至少約90%、至少約95%、至少約97%、或至少約99%的組合物。

【0576】 本文所述的化合物，包括其鹽、水合物和/或溶劑化物，可以通過任何合適的已知有機合成技術進行製備，並且可以根據眾多可能的合成途徑中的任一種進行合成，所述合成途徑例如美國專利申請號62/943,629、62/943,622、62/943,611、62/943,599、16/425,791和PCT申請PCT/US19/34220中所述的，所述專利各自在此整體引入作為參考。

【0577】 用於製備本文所述的化合物的反應可以在合適的溶劑中進行，所述溶劑可以通過有機合成領域的技術人員容易地加以選擇。合適的溶劑可以在其下進行反應的溫度，例如範圍可以從溶劑的凍結溫度到溶劑的沸騰溫度的溫度下，與原材料(反應物)、中間產物或產物基本上不反應。給定的反應可以在一種溶劑或多於一種溶劑的混合物中進行。取決於特定的反應步驟，用於特定反應步驟的合適溶劑可以由本領域技術人員加以選擇。

【0578】 本公開內容的化合物的製備可以涉及各種化學基團的保護和脫保護。關於保護和脫保護的需要以及適當保護基團的選擇，可以由本領域技術

人員容易地確定。保護基團的化學例如在以下中描述：Kocienski，Protecting Groups,(Thieme，2007)；Robertson，Protecting Group Chemistry,(Oxford University Press，2000)；Smith等人，March's Advanced Organic Chemistry: Reactions，Mechanisms，and Structure，第6版(Wiley，2007)；Peturssion等人，"Protecting Groups in Carbohydrate Chemistry," J. Chem. Educ.，1997，74(11)，1297；以及Wuts等人，Protective Groups in Organic Synthesis，第4版(Wiley，2006)。

【0579】 反應可以根據本領域已知的任何合適的方法進行監測。例如，產物形成可以通過以下進行監測：光譜手段如核磁共振光譜法(例如^{1}H或^{13}C)、紅外光譜法、分光光度法(例如UV-可見光)、質譜法、或者層析方法如高效液相層析(HPLC)或薄層層析(TLC)。

【0580】 本領域技術人員將理解，製劑可以使用有機化學的一般知識進行修飾或優化，以製備在本公開內容的範圍內的各種化合物。

【0581】 其合成未在本文中描述的原材料、試劑和中間產物或是商購可得的、文獻中已知的，或可以通過本領域技術人員已知的方法進行製備。

【0582】 本領域技術人員應瞭解，所述方法並非本公開內容的化合物可以通過其合成的唯一手段，並且廣泛的合成有機反應儲庫是可獲得的，以潛在地用於合成本公開內容的化合物中。本領域技術人員知道如何選擇且實施適當的合成路線。原材料、中間產物和產物的合適合成方法可以通過參考文獻進行鑒定，所述文獻包括參考源，例如：Advances in Heterocyclic Chemistry，第1-107卷(Elsevier，1963-2012)；Journal of Heterocyclic Chemistry，第1-49卷(Journal of Heterocyclic Chemistry，1964-2012)；Carreira等人(編輯)Science of

Synthesis，第1-48卷(2001-2010)和Knowledge Updates KU2010/1-4；2011/1-4；2012/1-2(Thieme，2001-2012)；Katritzky等人(編輯)Comprehensive Organic Functional Group Transformations,(Pergamon Press，1996)；Katritzky等人(編輯)；Comprehensive Organic Functional Group Transformations II(Elsevier，第2版，2004)；Katritzky等人(編輯)，Comprehensive Heterocyclic Chemistry(Pergamon Press，1984)；Katritzky等人，Comprehensive Heterocyclic Chemistry II(Pergamon Press，1996)；Smith等人，March's Advanced Organic Chemistry: Reactions，Mechanisms，and Structure，第6版(Wiley，2007)；Trost等人(編輯)，Comprehensive Organic Synthesis(Pergamon Press，1991).

【0583】 在一些實施方案中，本公開內容的化合物選擇性地抑制MASP-2超過凝血酶。在一些實施方案中，MASP-2:凝血酶抑制的選擇性比為至少1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1或30:1。在一些實施方案中，除抑制MASP-2之外，本發明的化合物還可以抑制一種或多種凝血蛋白酶，例如凝血酶。

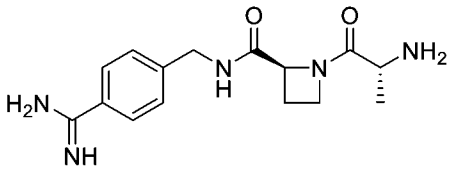
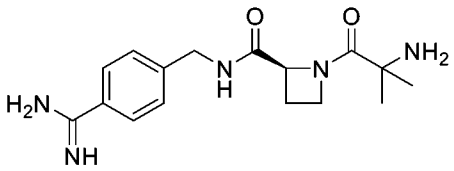
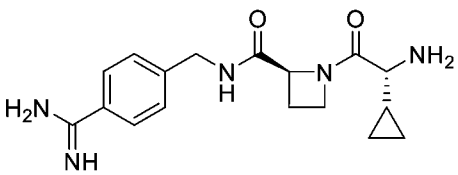
【0584】 本公開內容的小分子化合物的MASP-2抑制活性可以通過本領域已知的方法來確定，例如，利用如PCT申請號PCT/US19/34220中公開的熒光底物的酶促MASP-2測定，所述申請在此整體引入作為參考。同樣地，本公開內容的化合物的凝血酶抑制活性可以使用本領域已知的方法來確定。代表性的小分子化合物的示例性測定方法和MASP-2抑制活性，在本文的實施例23至25中進行描述。

【0585】 在一些實施方案中，本文公開的化合物抑制凝集素途徑的活化。本發明的化合物的凝集素途徑抑制活性可以通過本領域已知的方法來確定，例如，使用PCT申請號PCT/US19/34220中所述的人血清中的凝集素途徑活化(LPA)測定，所述申請在此整體引入作為參考。

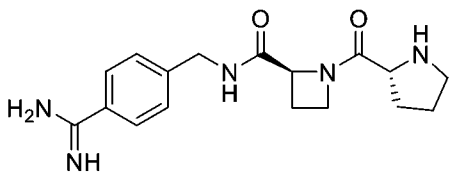
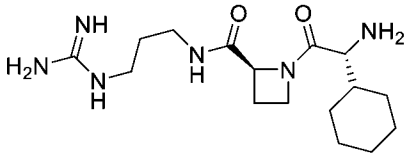
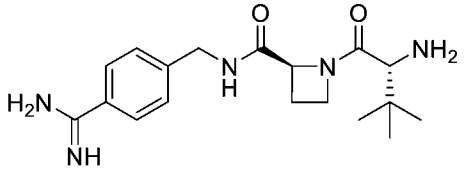
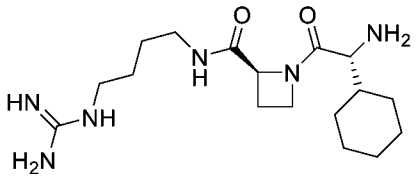
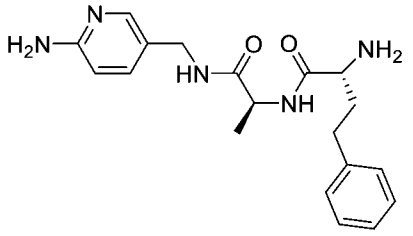
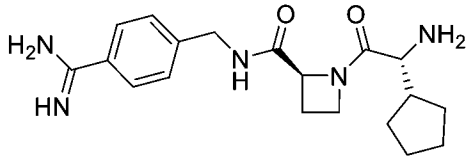
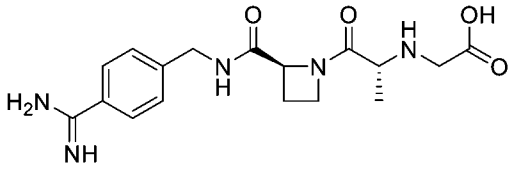
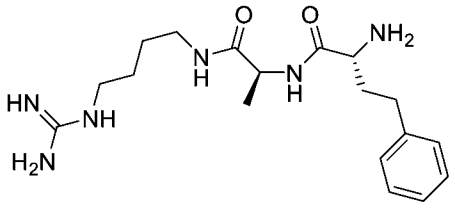
【0586】 在一些實施方案中，如例如通過上述酶促MASP-2測定確定的，化合物具有小於約25 μM、小於約10 μM、小於約2.5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.1 μM的MASP-2抑制Ki值。在一些實施方案中，如例如通過上述凝集素途徑活化(LPA)測定確定的，化合物具有小於約50 μM、小於約5 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.05 μM的凝集素途徑抑制IC_{50}。在一些實施方案中，相對於凝血酶，化合物對於MASP-2抑制具有約大於5.0倍、大於約25倍、大於約50倍、或大於約100倍的選擇性(如例如通過分別的Ki的比率確定的)。

【0587】 在一些實施方案中，該化合物是下表4A-4E的化合物。

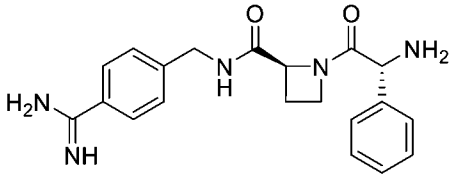
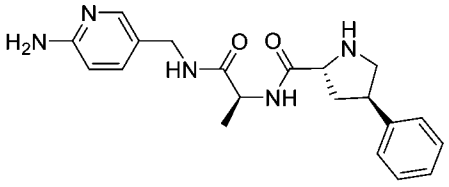
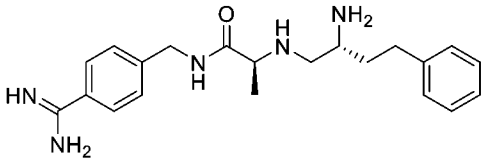
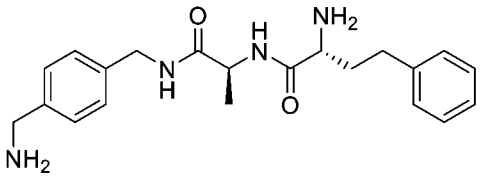
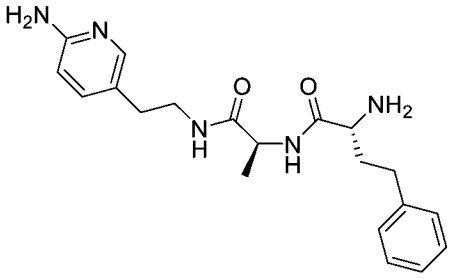
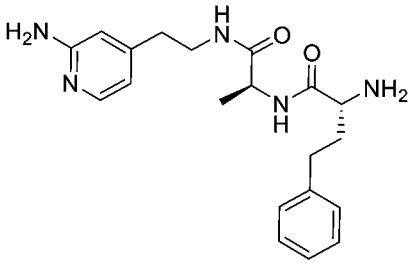
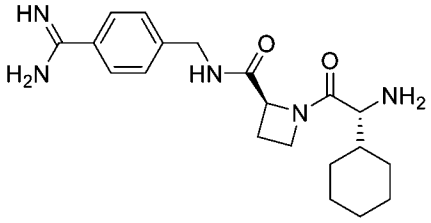
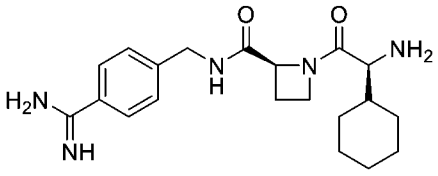
【0588】 表4A. 示例性化合物

化合物編號	結構	鹽
1000		NA
1001		NA
1002		NA

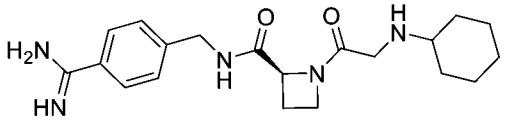
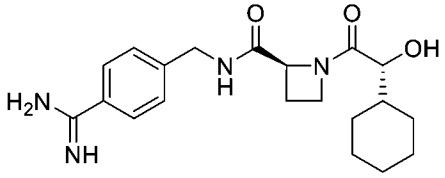
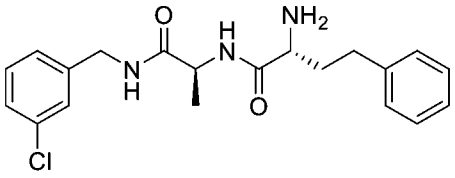
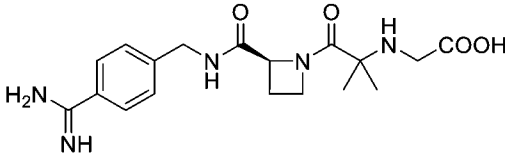
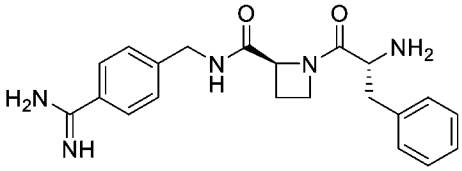
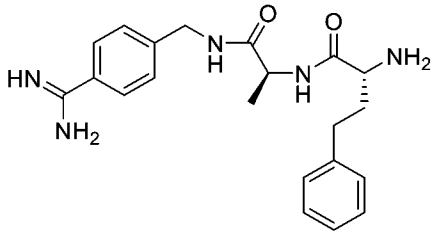
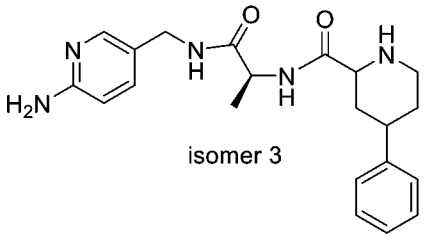
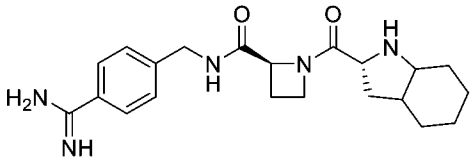
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1003		NA
1004		2HCl
1005		NA
1006		2HCl
1007		2HCl
1008		NA
1009		NA
1010		2HCl

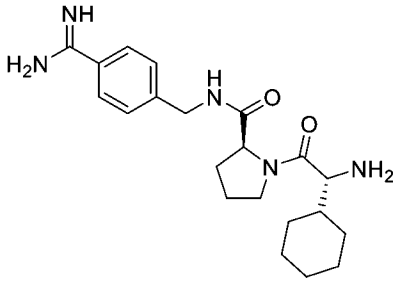
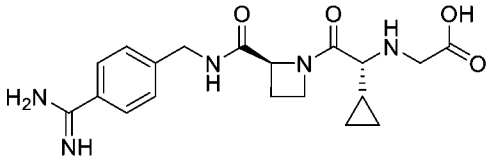
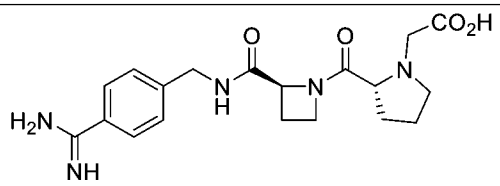
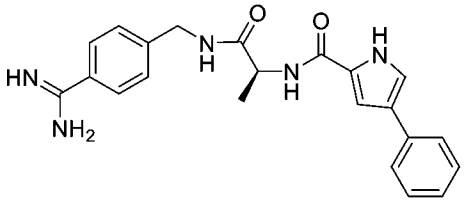
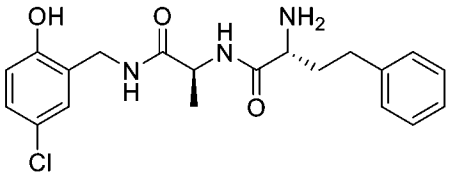
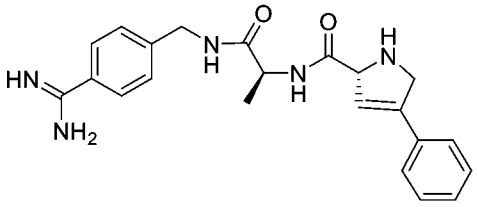
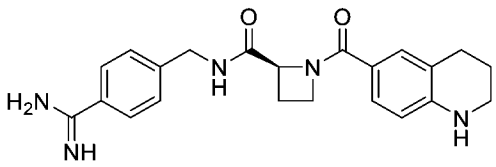
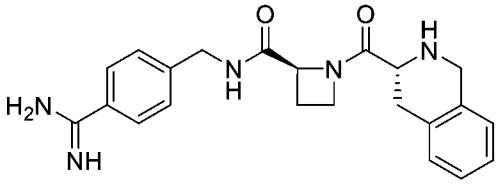
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1011		NA
1012		2HCl
1013		2HCl
1014		2HCl
1015		2HCl
1016		2HCl
1017		NA
1018		NA

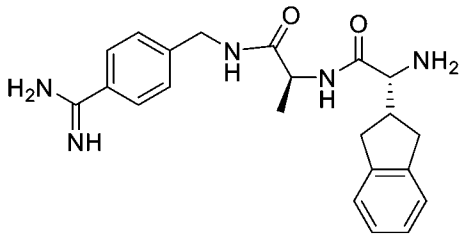
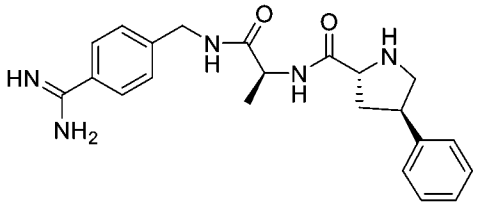
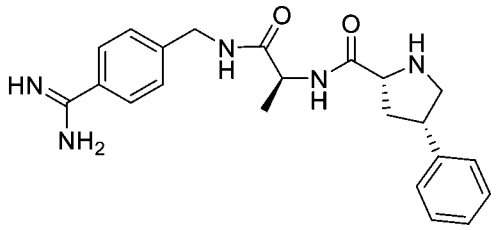
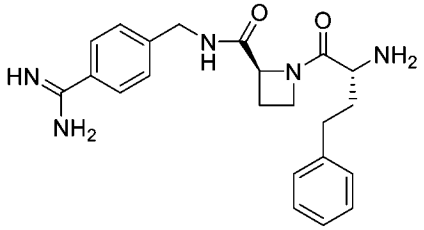
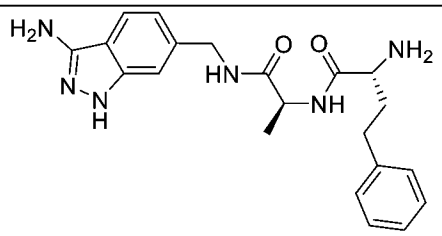
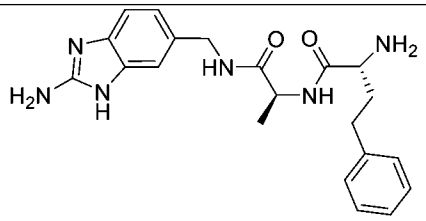
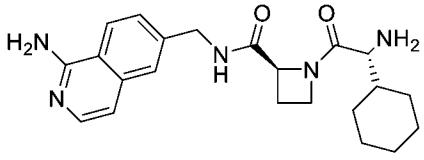
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1019		NA
1020		NA
1021		HCl
1022		NA
1023		NA
1024		2HCl
1025		2HCl
1026		NA

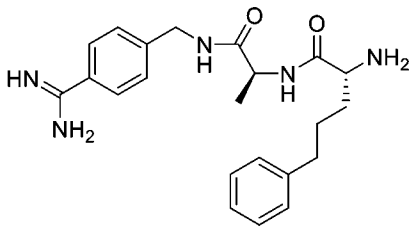
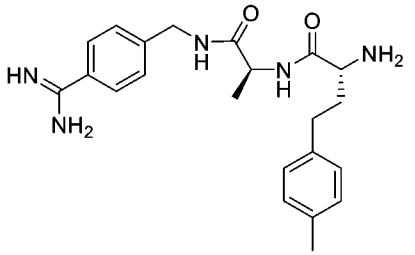
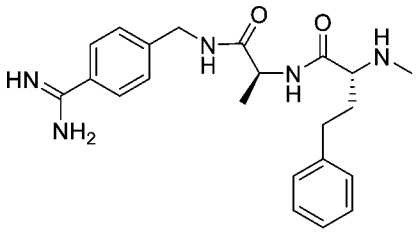
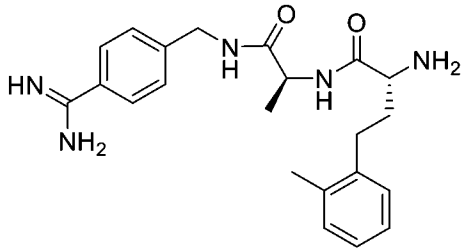
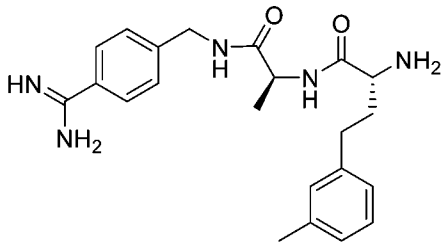
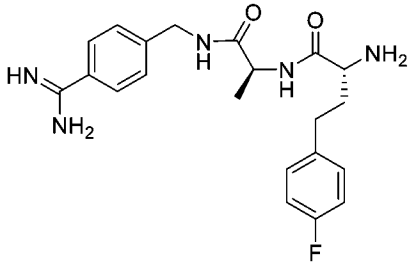
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1027		2HCl
1028		NA
1029		NA
1030		NA
1031		HCl
1032		2HCl
1033		NA
1034		NA

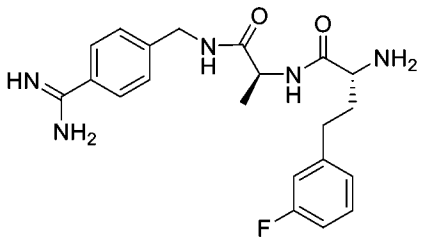
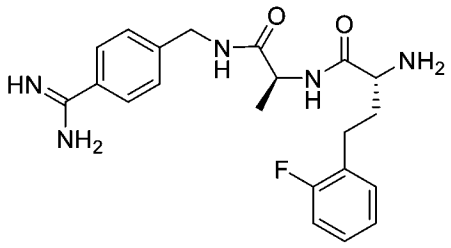
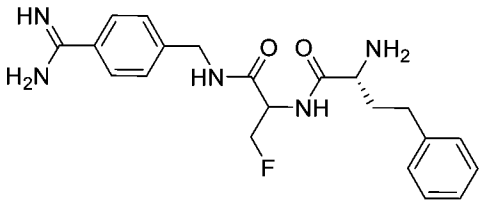
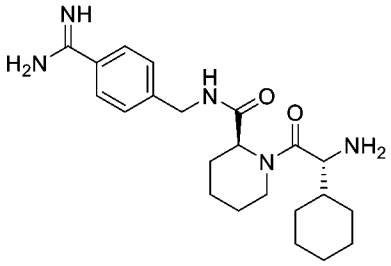
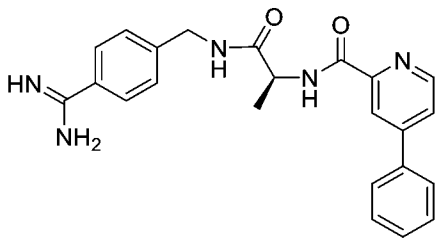
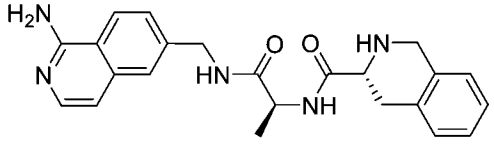
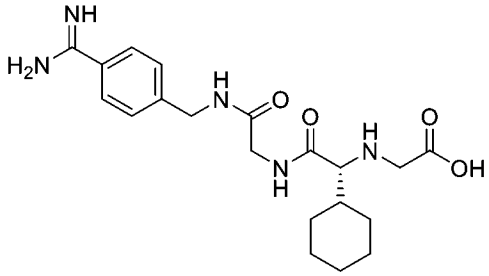
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1035		2HCl
1036		2HCl
1037		2HCl
1038		2HCl
1039		2HCl
1040		2HCl
1041		2HCl

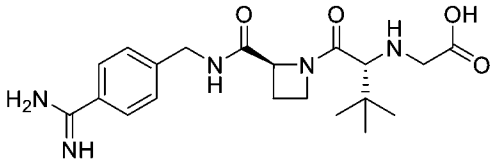
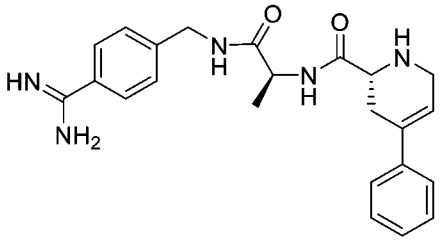
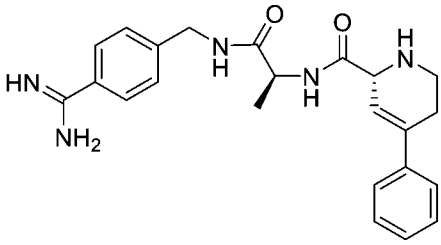
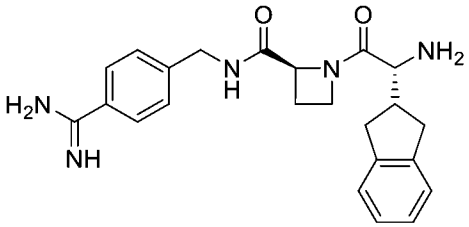
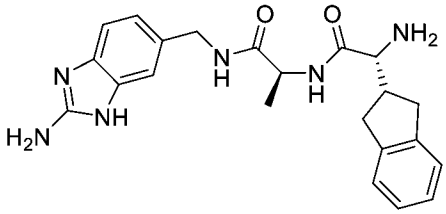
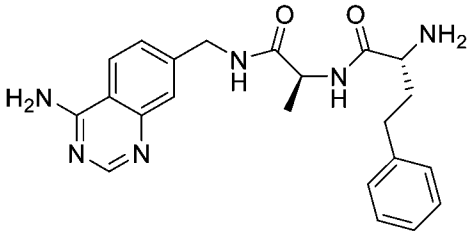
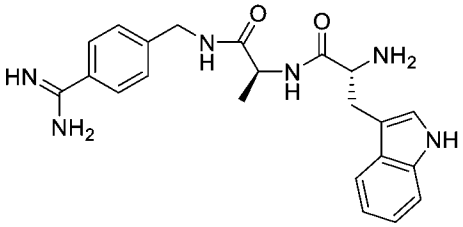
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1042		2HCl
1043		2HCl
1044		2HCl
1045		2HCl
1046		2HCl
1047		2HCl

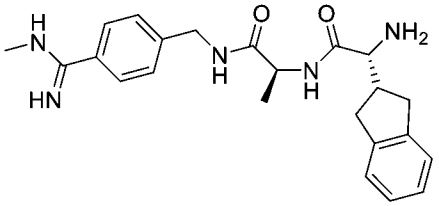
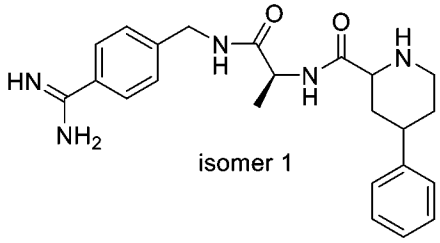
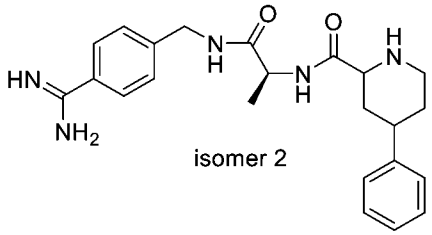
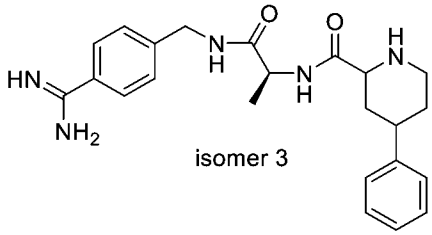
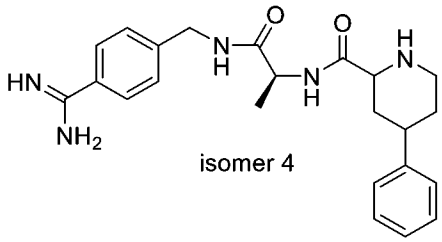
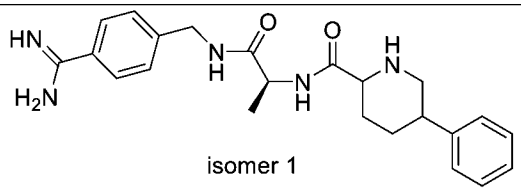
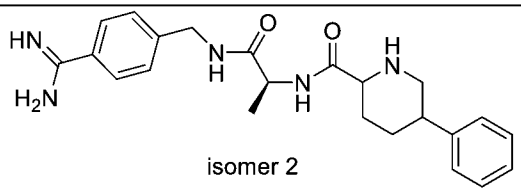
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1048		2HCl
1049		2HCl
1050		2HCl
1051		2HCl
1052		2HCl
1053		2 TFA
1054		2HCl

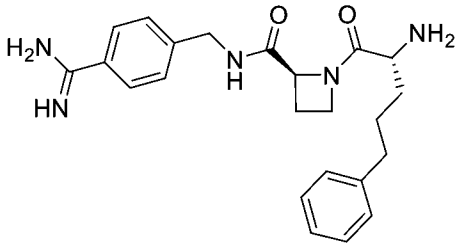
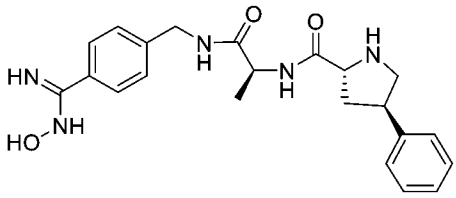
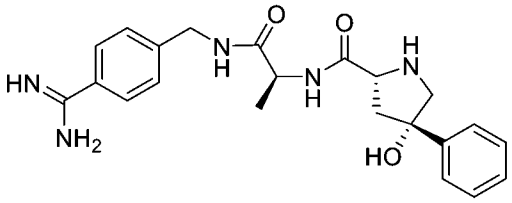
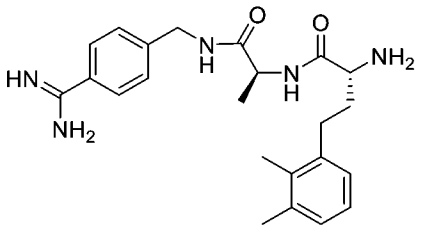
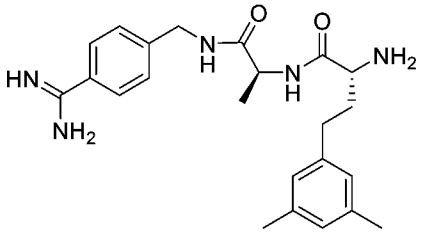
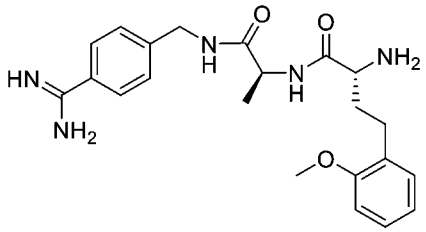
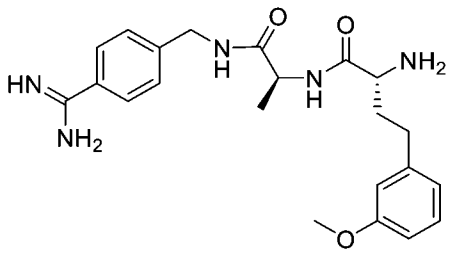
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1055		NA
1056		2HCl
1057		2HCl
1058		NA
1059		2HCl
1060		2HCl
1061		2HCl

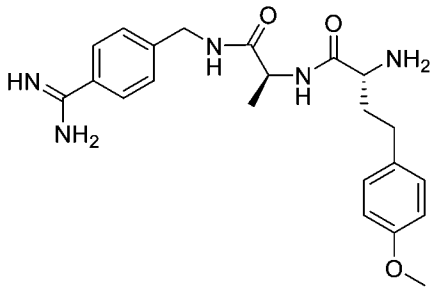
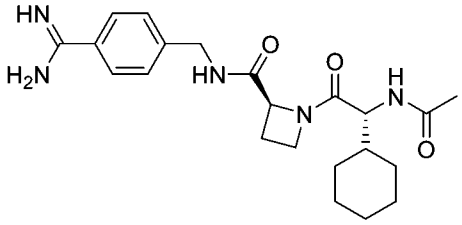
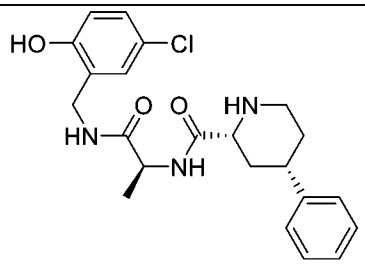
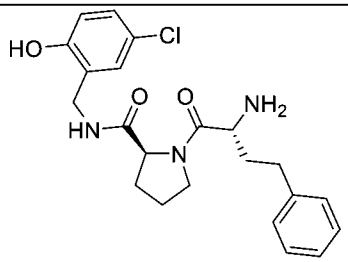
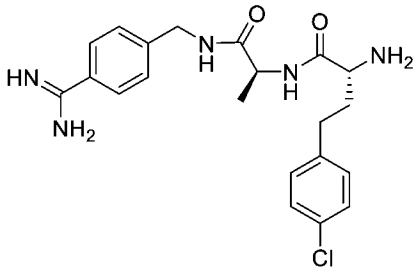
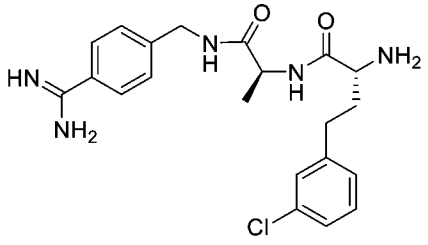
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1062		2HCl
1063		2HCl
1064		2HCl
1065		2HCl
1066		2HCl
1067		2HCl
1068		2HCl

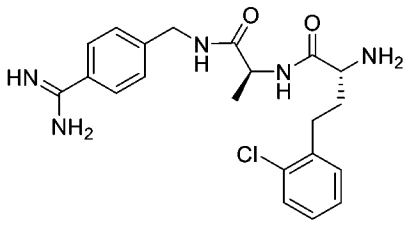
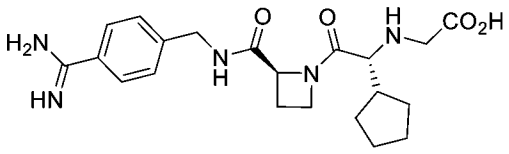
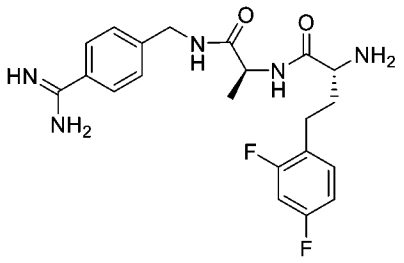
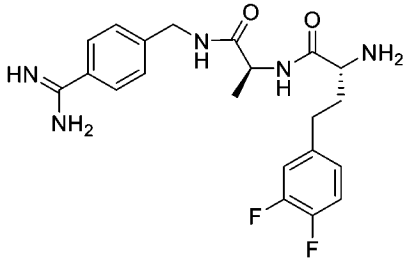
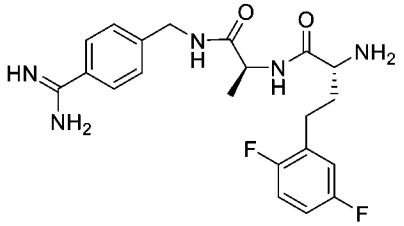
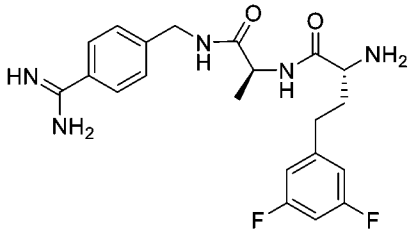
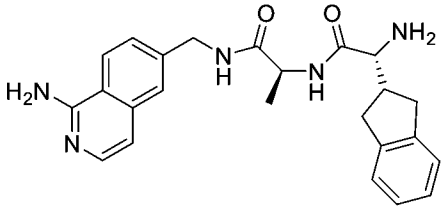
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1069		NA
1070		2HCl
1071		2HCl
1072		2HCl
1073		2HCl
1074		2HCl
1075		2HCl

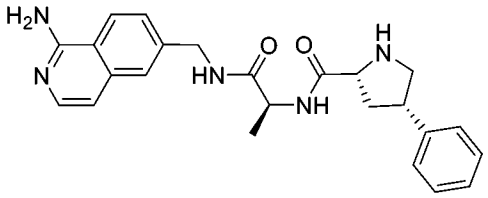
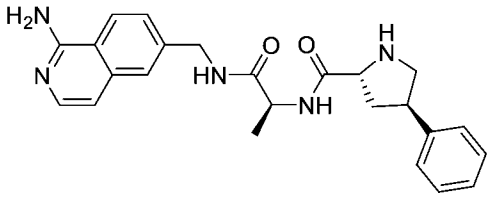
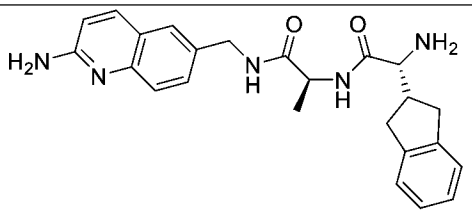
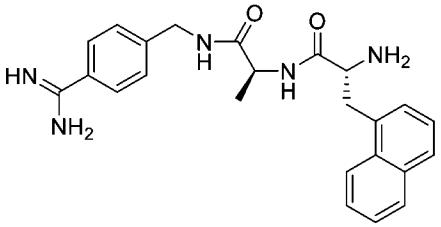
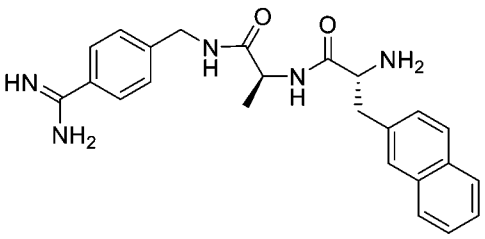
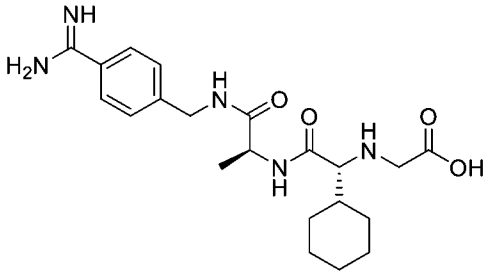
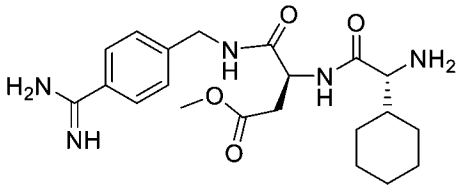
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1076		2HCl
1077		NA
1078		HCl
1079		HCl
1080		2HCl
1081		2HCl

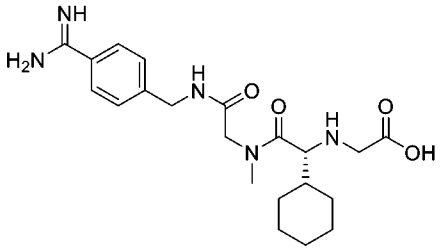
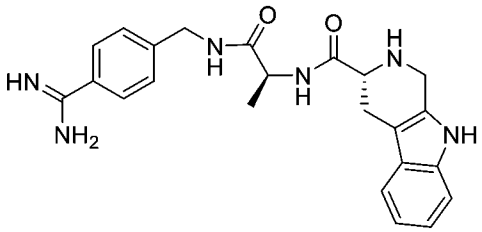
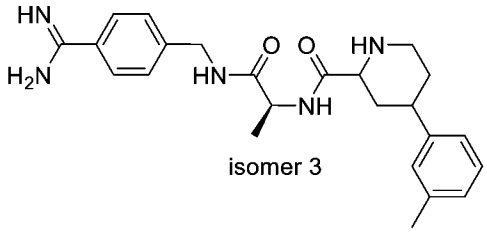
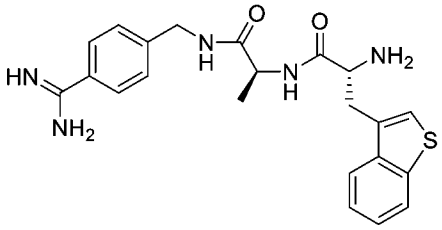
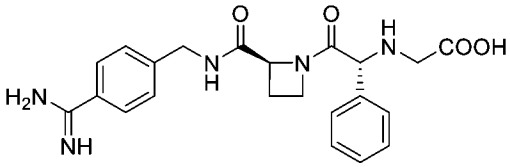
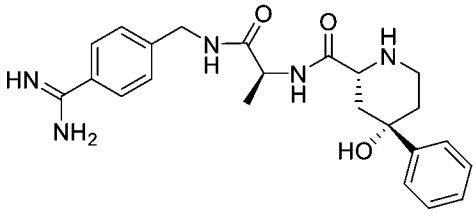
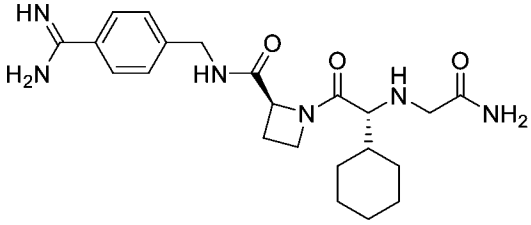
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1082		2HCl
1083		NA
1084		2HCl
1085		2HCl
1086		2HCl
1087		2HCl
1088		2HCl

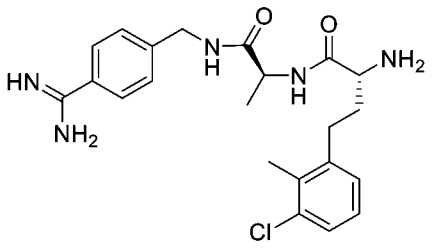
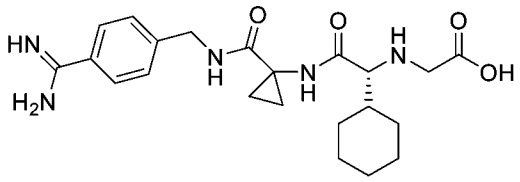
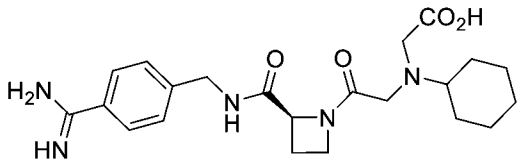
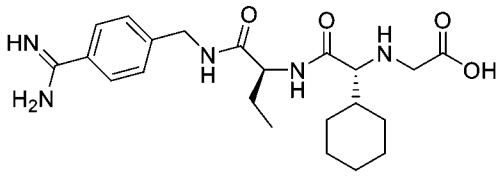
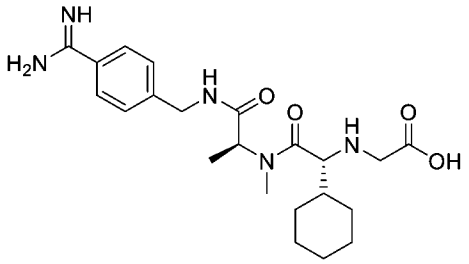
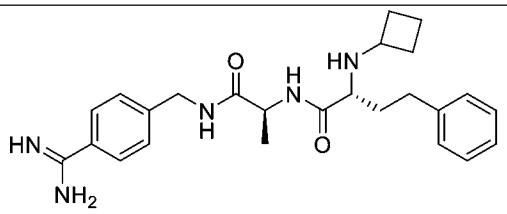
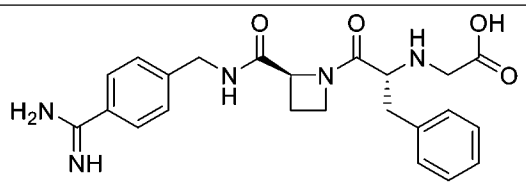
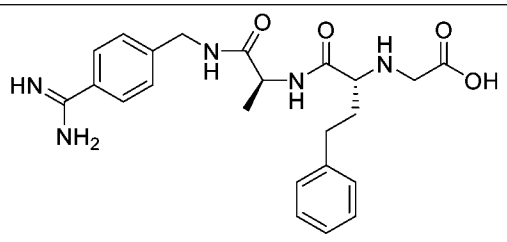
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1089		2HCl
1090		2HCl
1091		2HCl
1092		2HCl
1093		2HCl
1094		2HCl
1095		2HCl

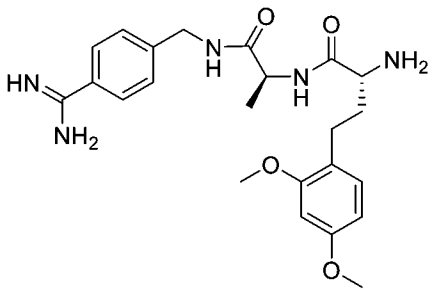
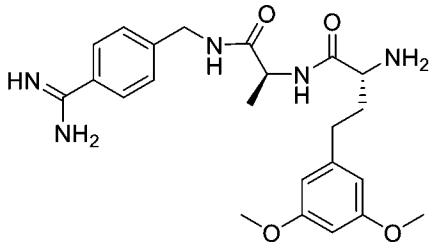
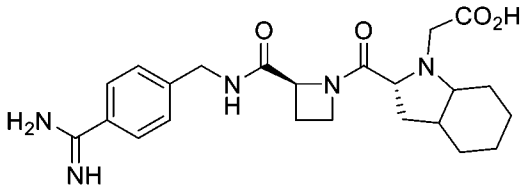
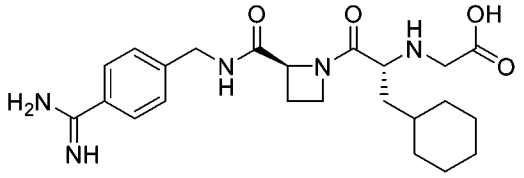
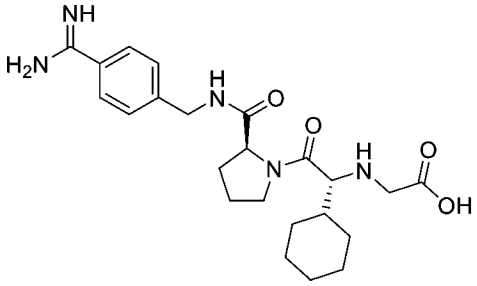
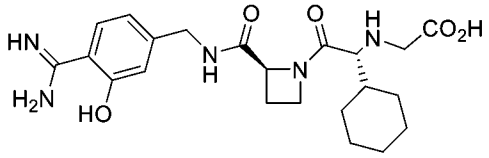
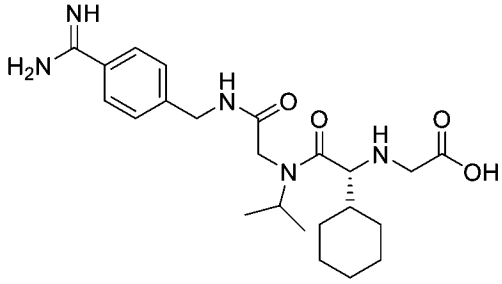
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1096		NA
1097		2HCl
1098		2HCl
1099		2HCl
1100		NA
1101		2HCl
1102		NA

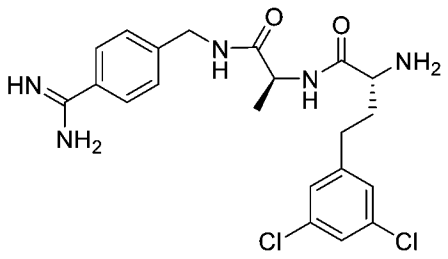
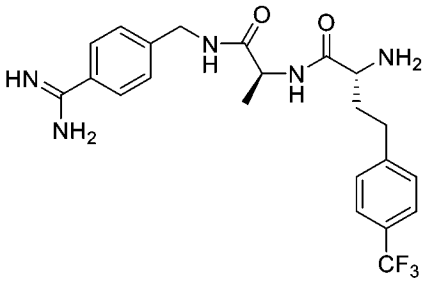
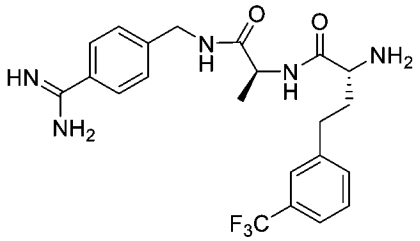
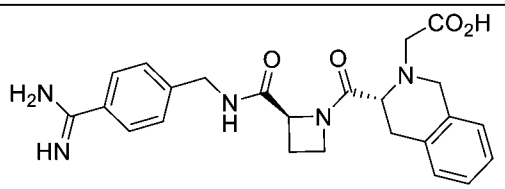
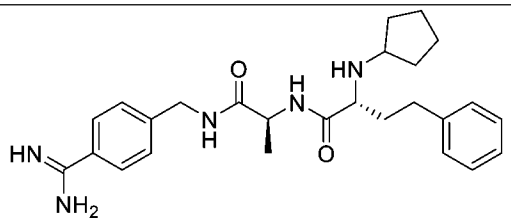
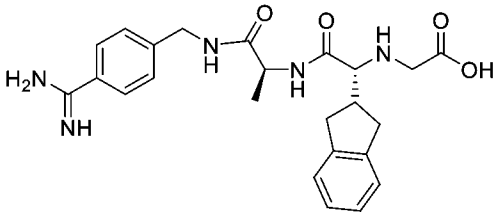
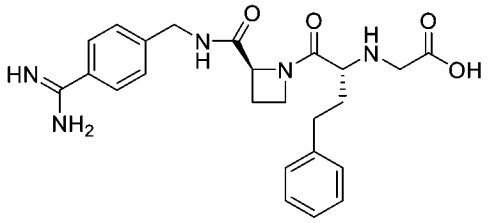
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1103		2HCl
1104		2HCl
1105		NA
1106		2HCl
1107		NA
1108		2HCl
1109		NA
1110		2HCl

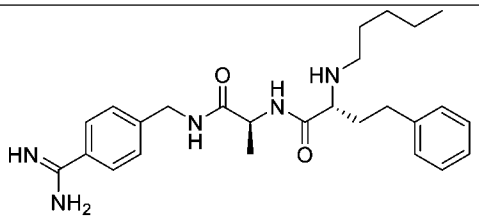
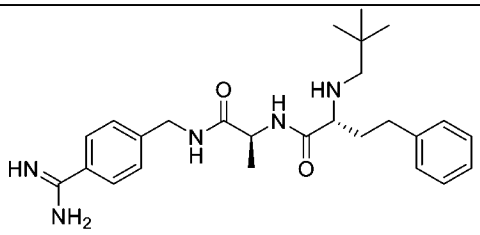
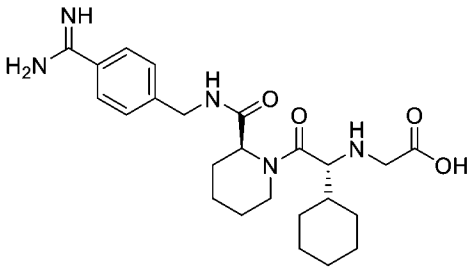
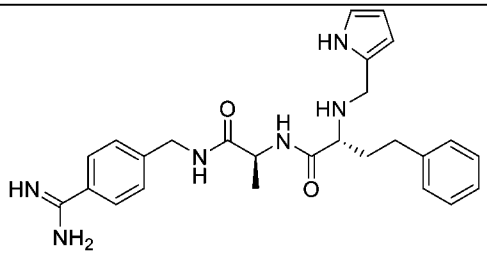
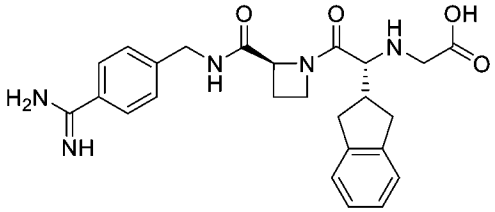
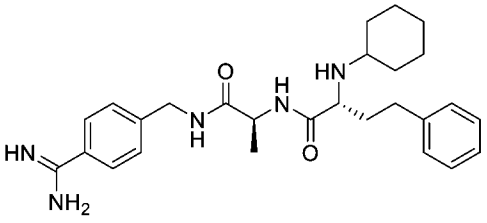
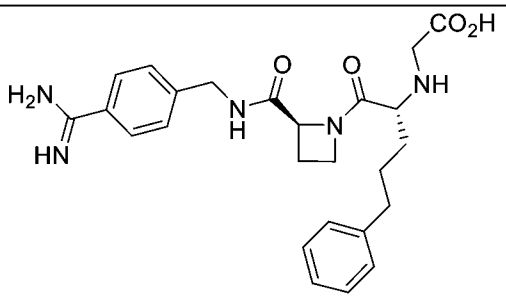
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1111		2HCl
1112		2HCl
1113		NA
1114		NA
1115		NA
1116		NA
1117		NA

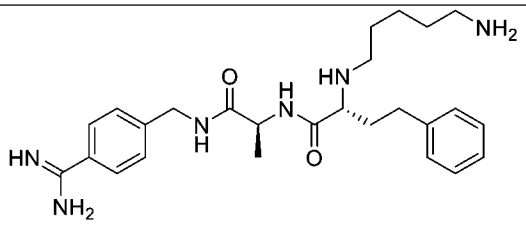
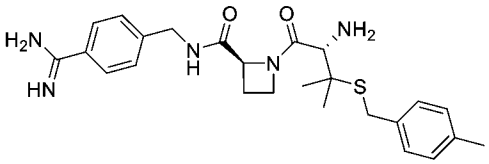
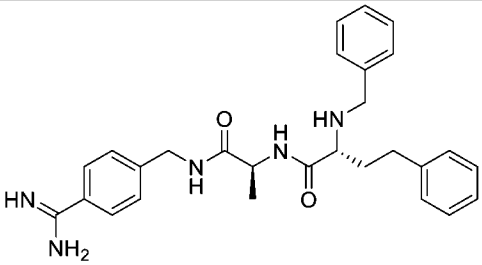
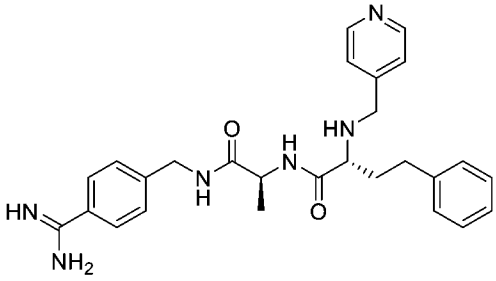
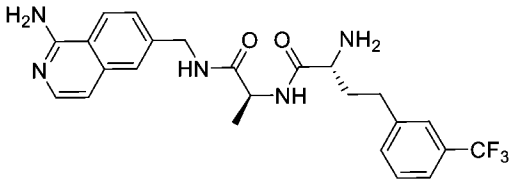
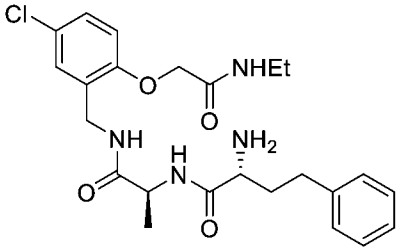
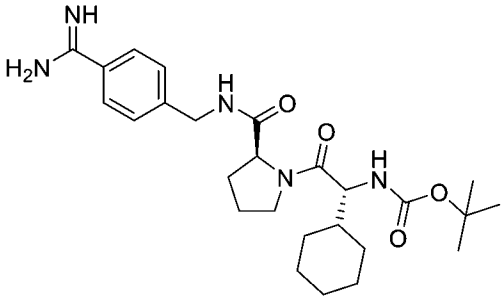
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1118		2HCl
1119		2HCl
1120		2HCl
1121		NA
1122		2HCl
1123		2HCl
1124		2HCl

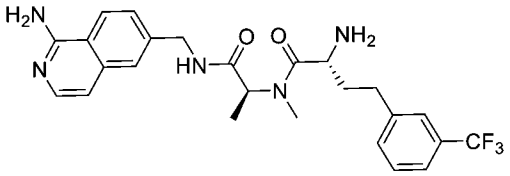
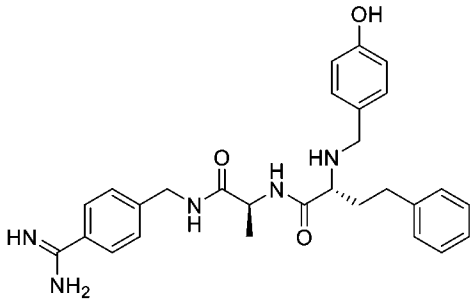
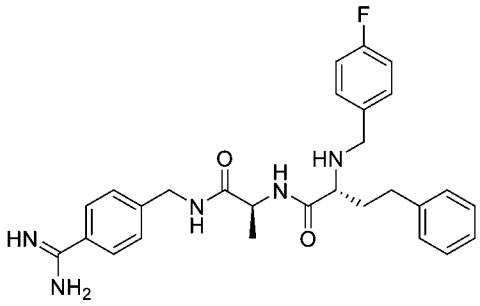
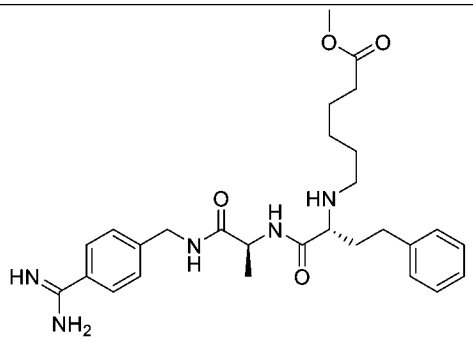
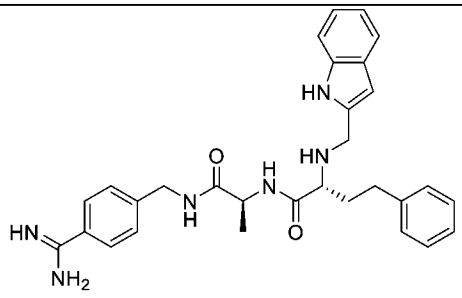
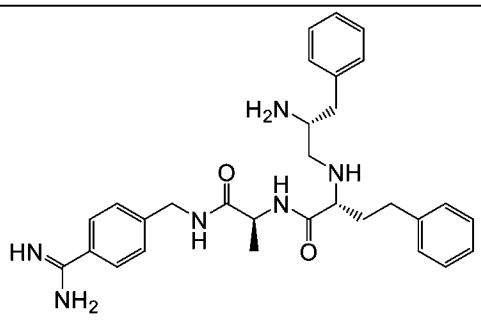
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1125		2HCl
1126		2HCl
1127		NA
1128		2HCl
1129		NA
1130		2 HCl
1131		NA

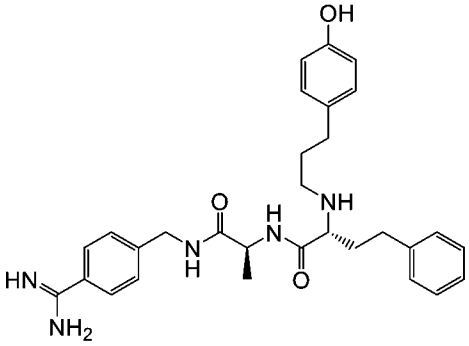
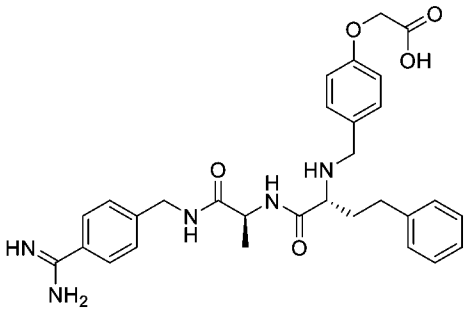
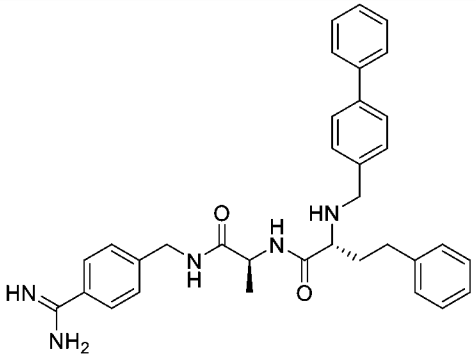
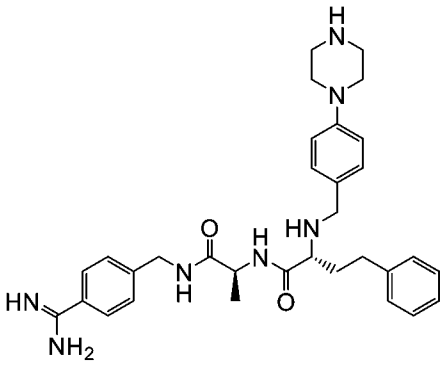
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1132		3HCl
1133		NA
1134		2HCl
1135		3HCl
1136		2HCl
1137		TFA
1138		NA

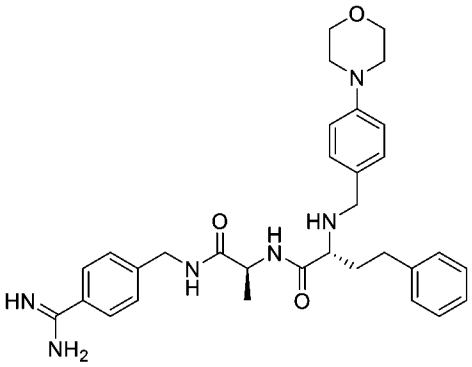
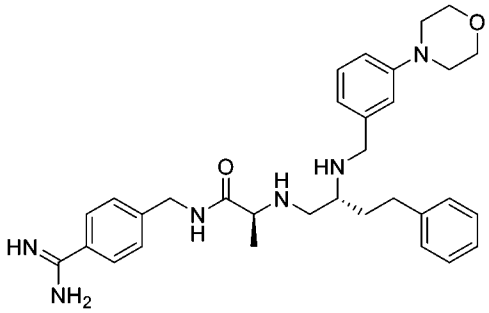
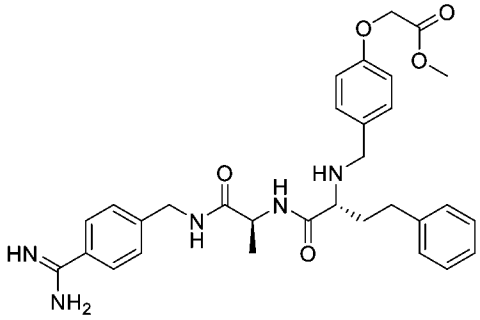
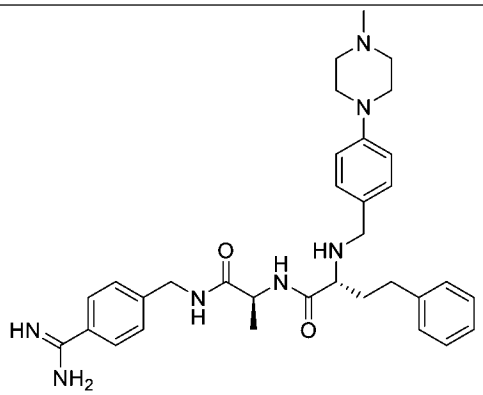
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1139		2HCl
1140		2HCl
1141		2HCl
1142		2HCl
1143		2HCl
1144		3TFA

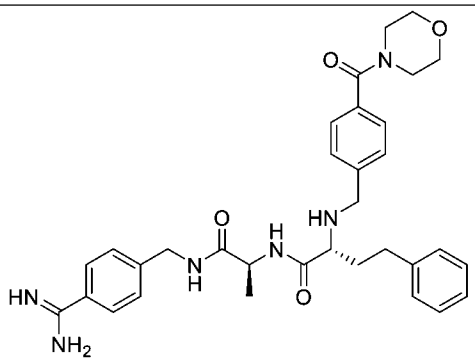
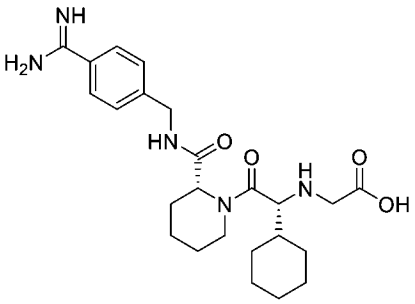
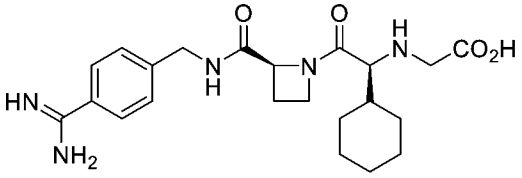
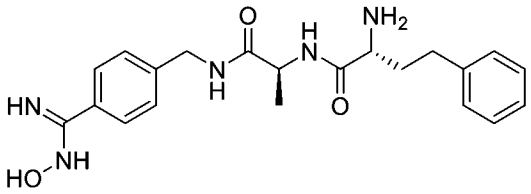
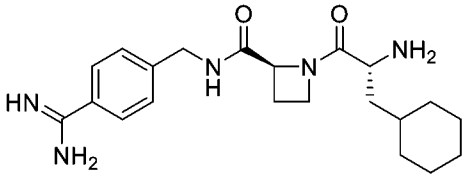
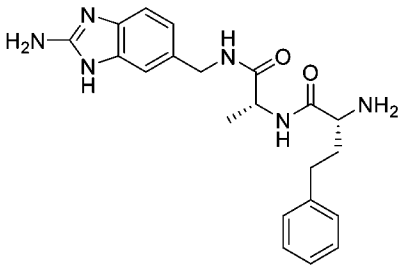
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1145		2HCl
1146		NA
1147		2HCl
1148		3TFA

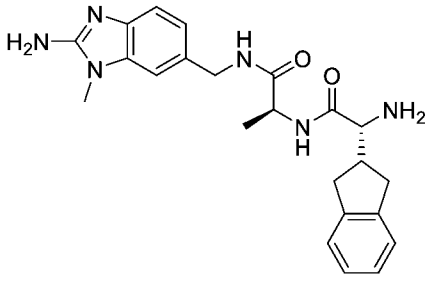
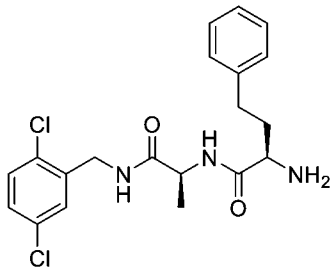
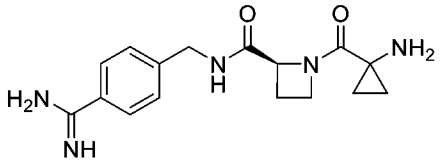
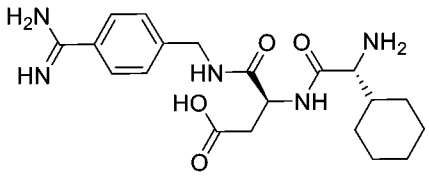
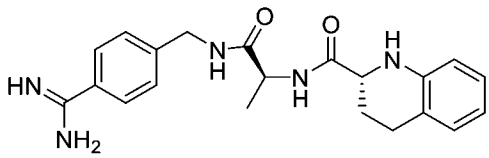
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1149		2HCl
1150		2HCl
1151		2HCl
1152		2HCl

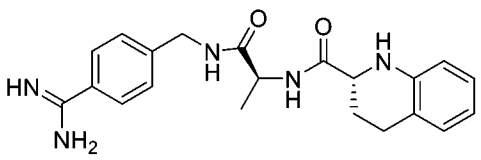
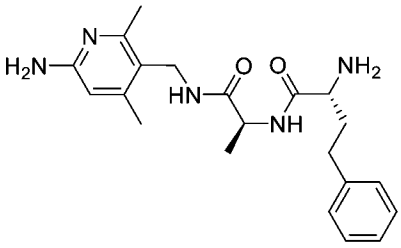
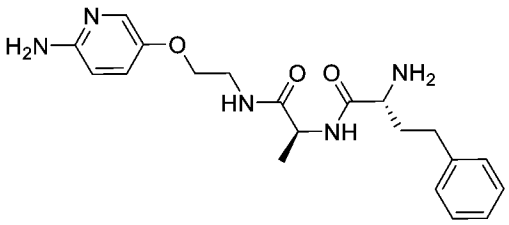
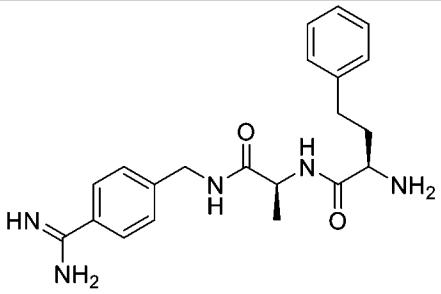
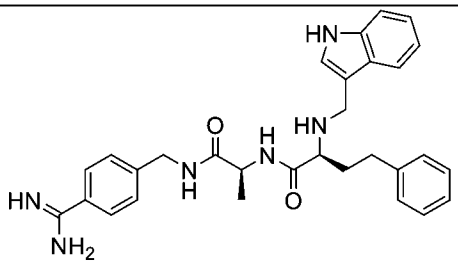
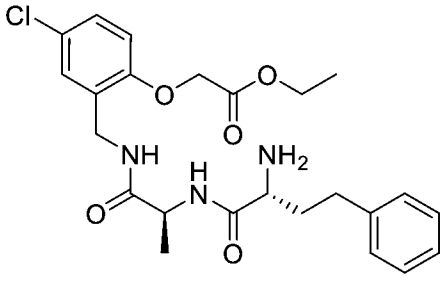
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1153		2HCl
1154		NA
1156		NA
1157		2HCl
1158		2HCl
1170		

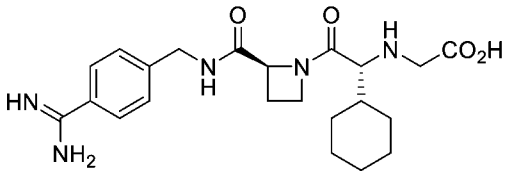
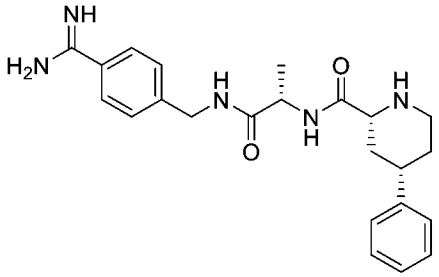
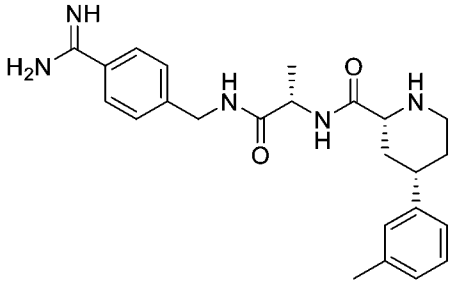
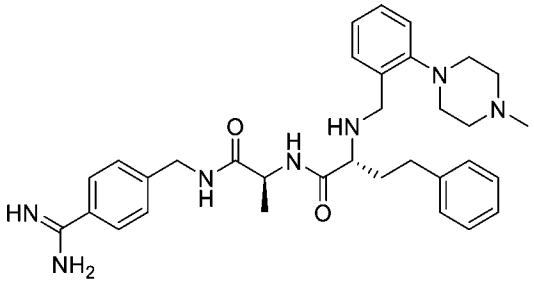
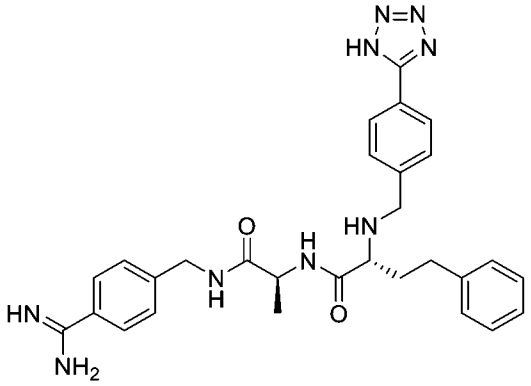
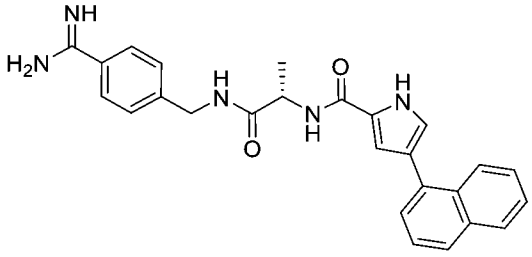
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1171		2HCl
1192		1HCl
1194		NA
1195		2HCl
1207		2HCl

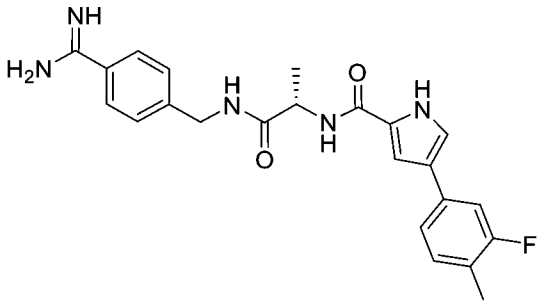
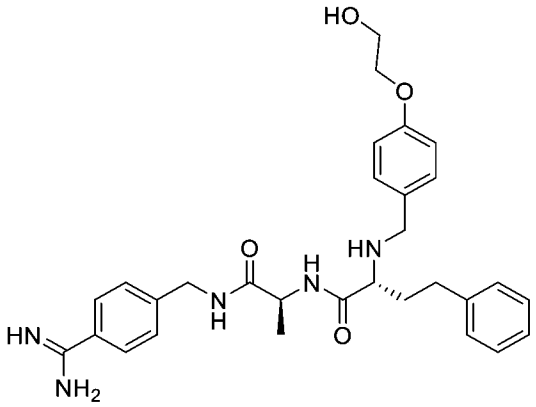
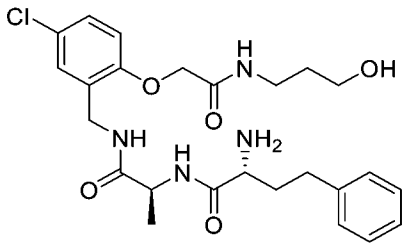
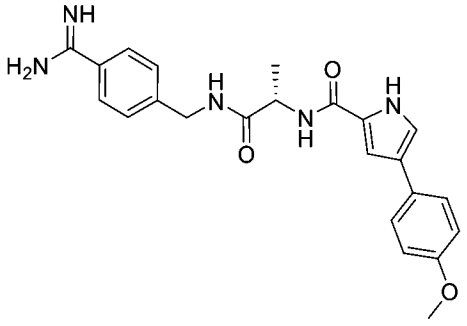
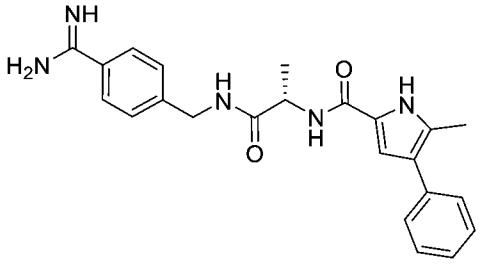
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1211		2HCl
1213		2HCl
1215		2HCl
1218		2HCl
1223		2HCl
1229		1HCl

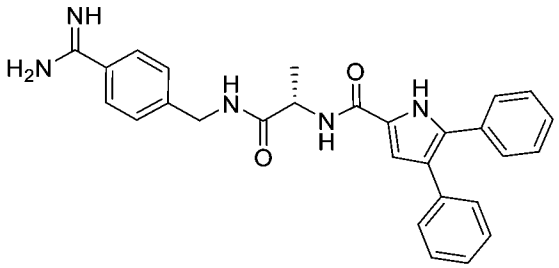
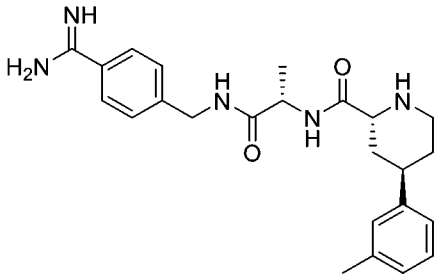
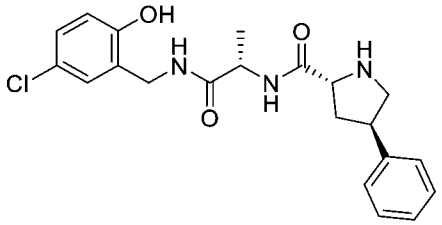
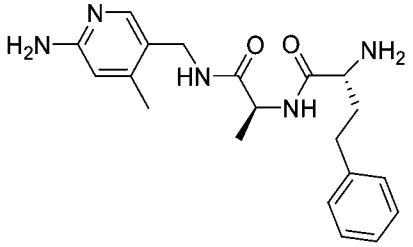
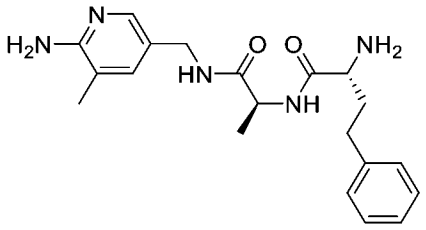
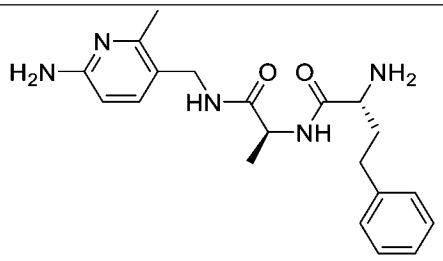
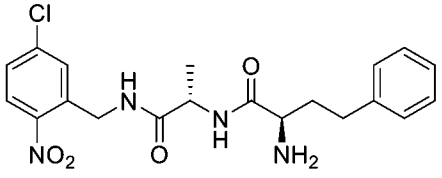
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
999		
1230		2 HCl
1231		2 HCl
1232		2TFA
1233		2TFA
1234		NA

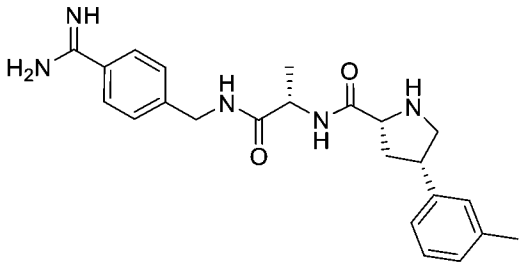
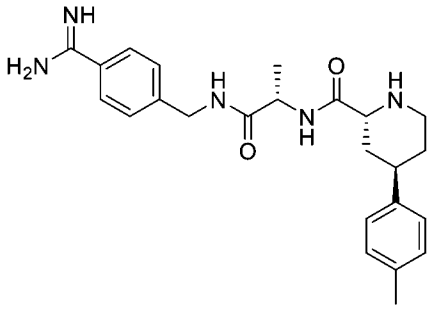
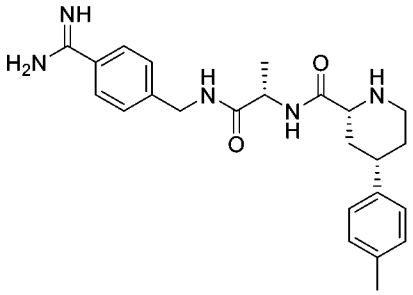
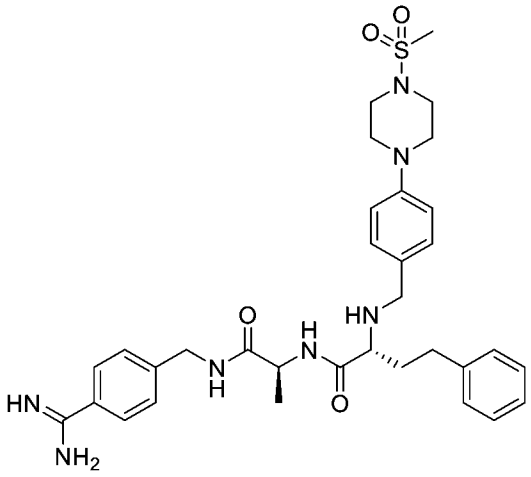
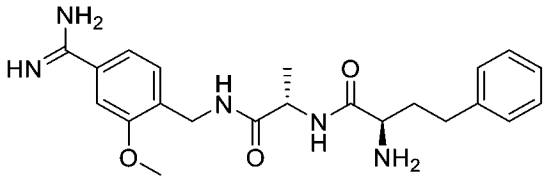
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1235		NA
1236		2TFA
1237		HCl
1238		TFA
1239		TFA

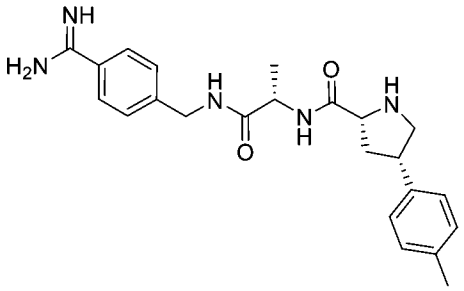
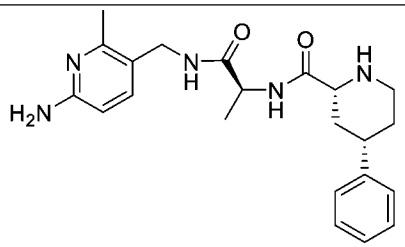
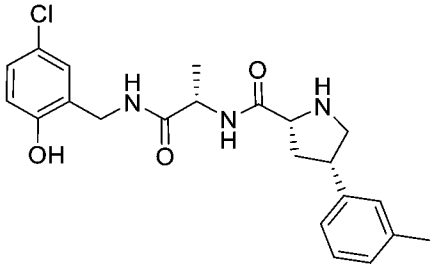
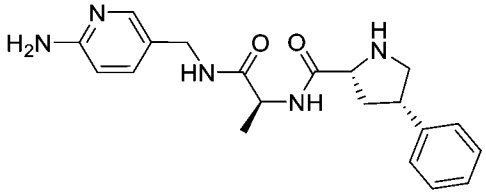
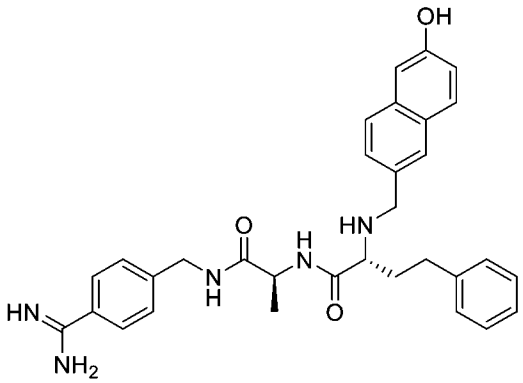
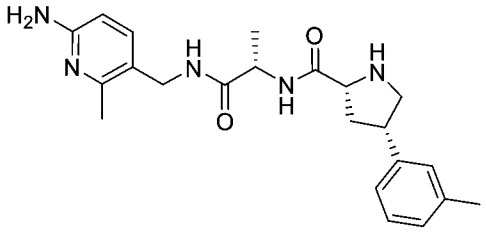
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1240		NA
1241		HCl
1242		N/A
1243		2HCl
1244		2HCl
1245		2HCl
1246		HCl

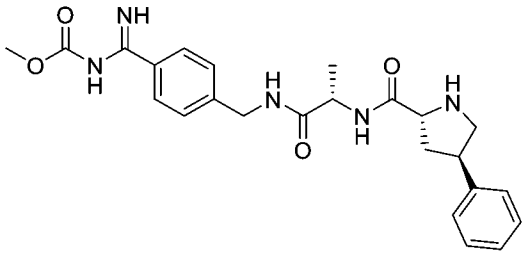
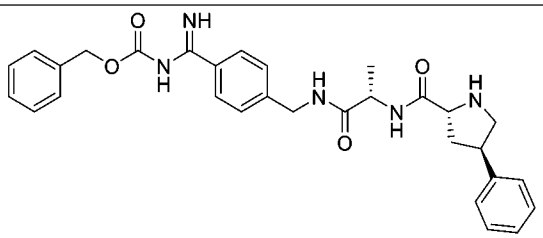
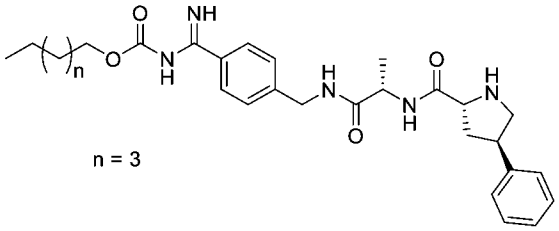
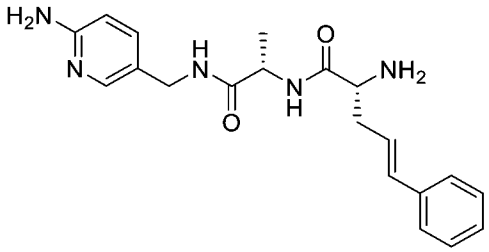
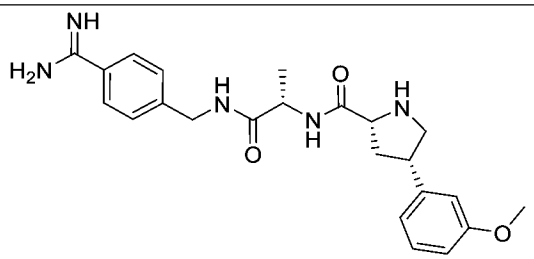
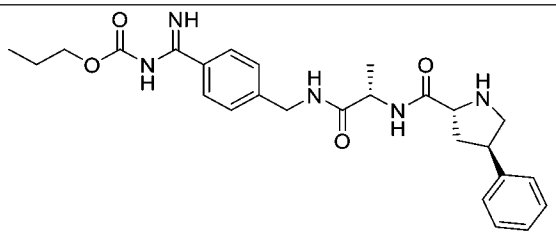
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1247		2HCl
1248		2 HCl
1249		2 HCl
1250		2TFA
1251		TFA

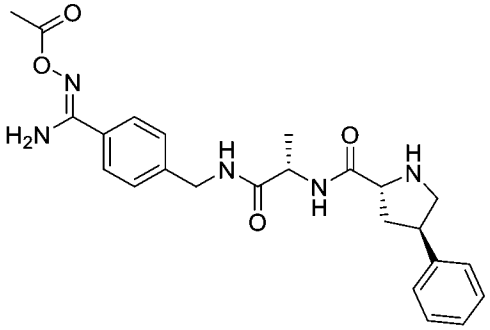
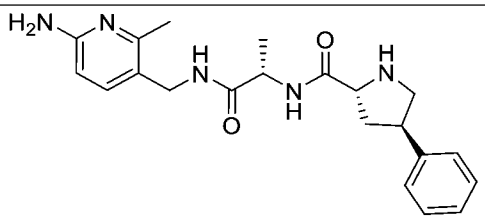
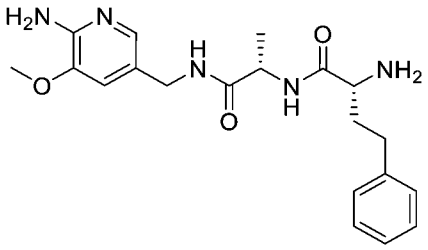
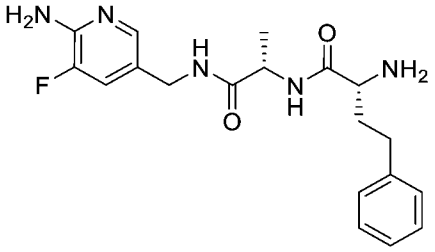
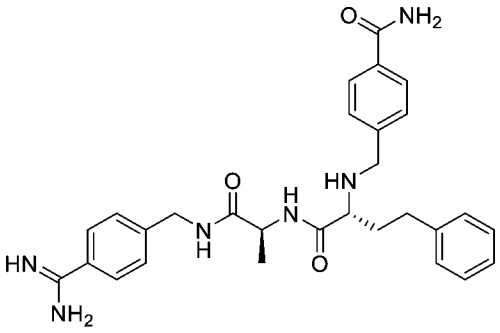
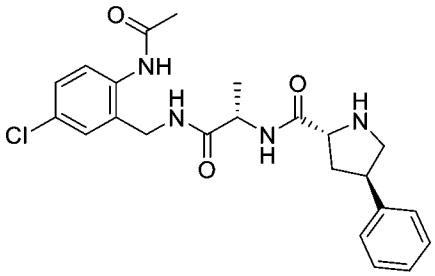
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1252		2HCl
1253		HCl
1254		HCl
1255		2HCl
1256		2TFA
1257		2HCl

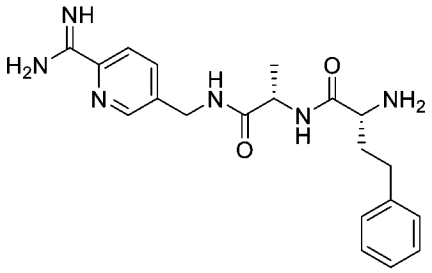
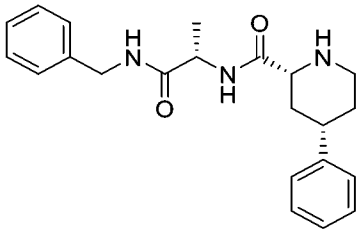
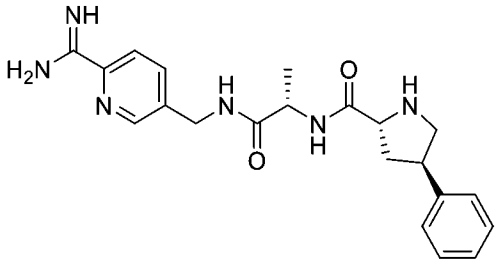
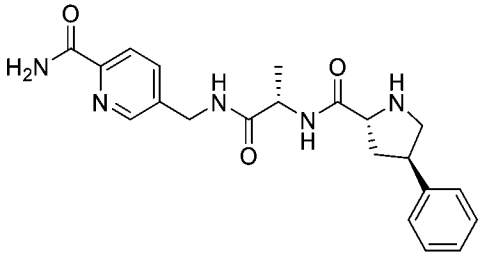
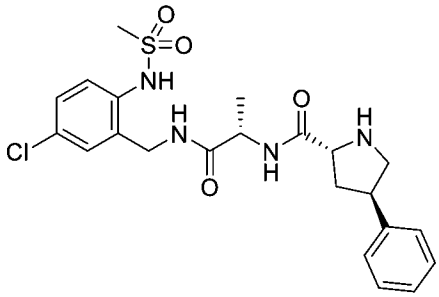
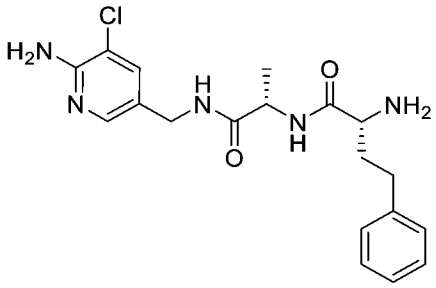
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1258		NA
1259		NA
1260		NA
1261		2HCl
1262		2HCl
1263		NA

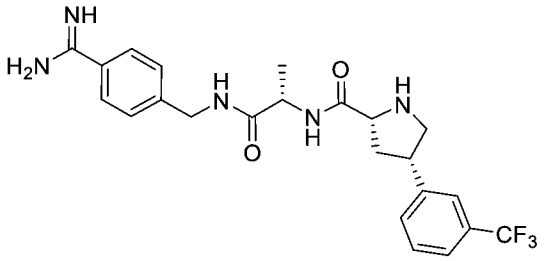
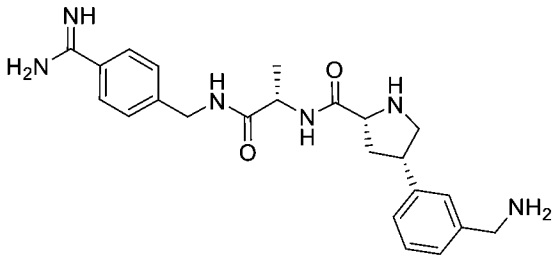
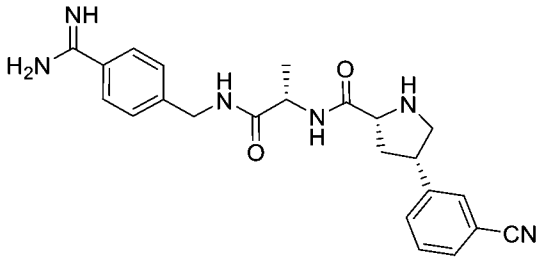
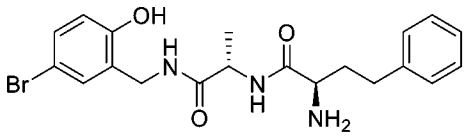
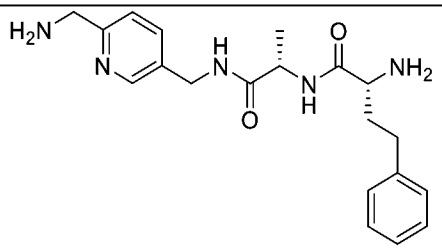
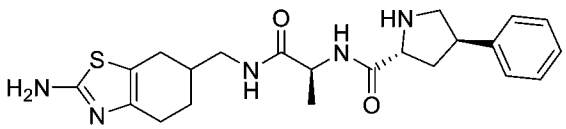
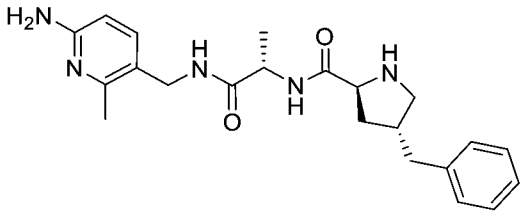
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1264		NA
1265		N/A
1266		2HCl
1267		2HCl
1268		2TFA
1269		HCl

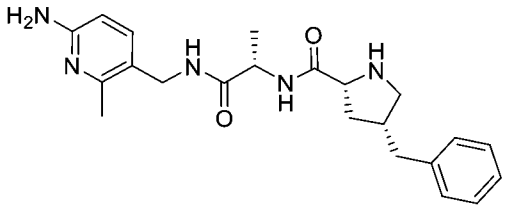
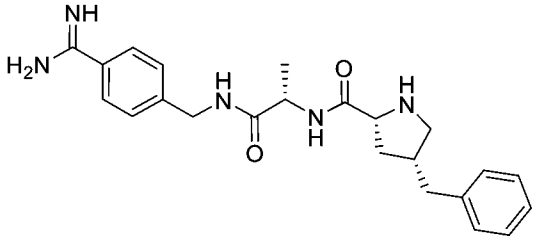
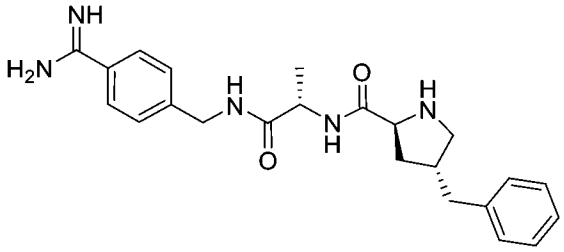
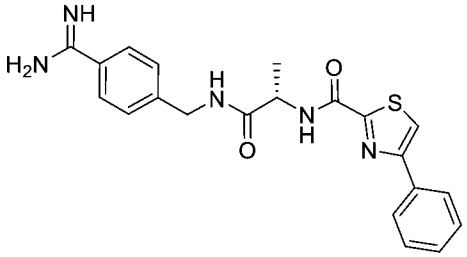
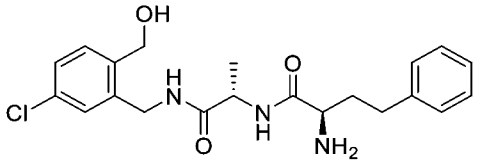
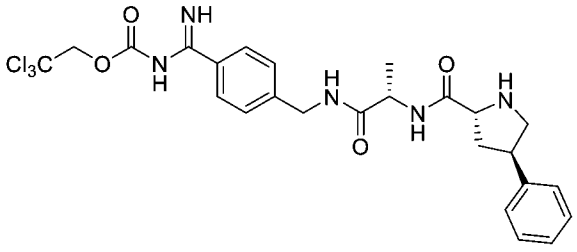
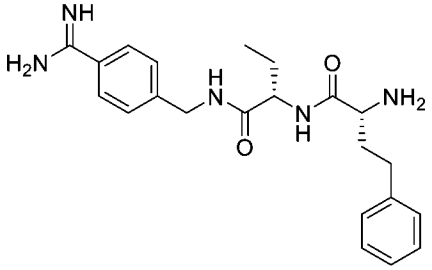
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1270		2 HCl
1271		HCl
1272		2 HCl
1273		HCl
1274		HCl
1275		2HCl

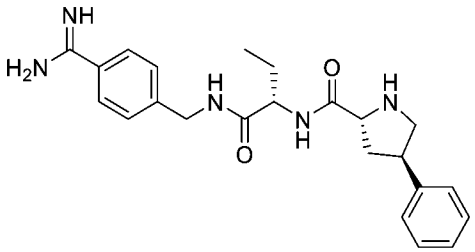
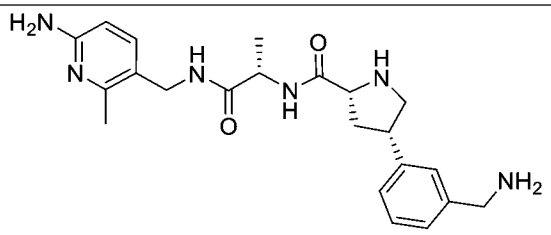
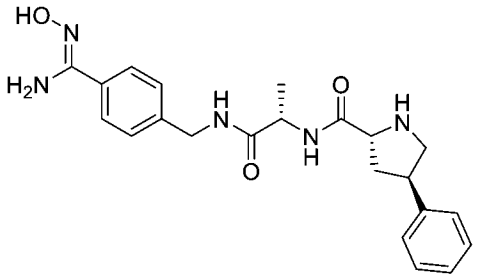
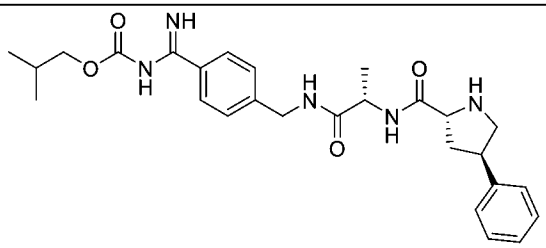
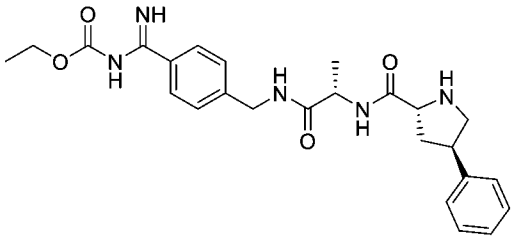
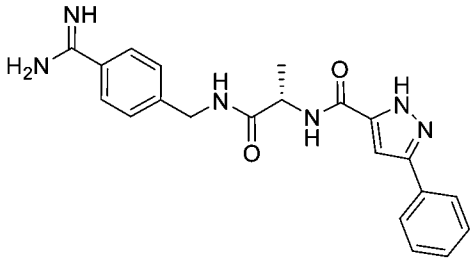
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1276		2HCl
1277		3HCl
1278		2HCl
1279		HCl
1280		2HCl
1281		2TFA
1282		2HCl

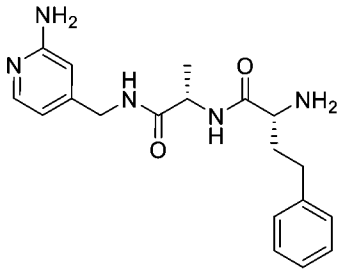
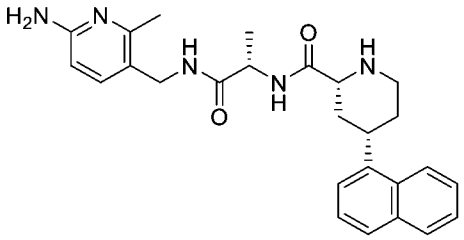
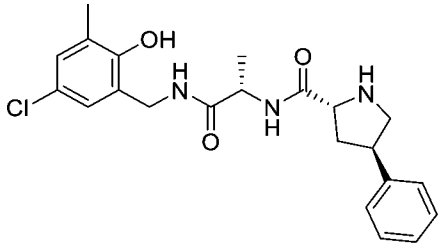
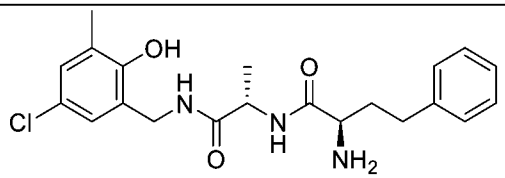
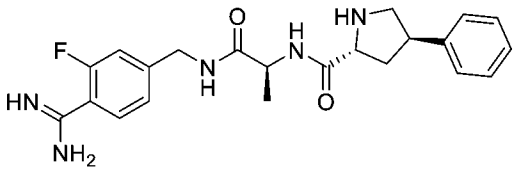
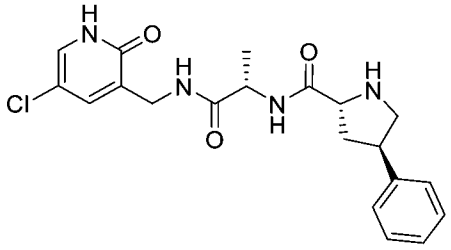
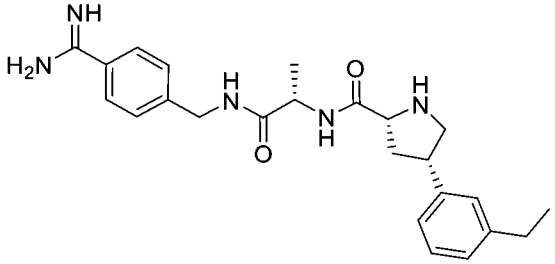
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1283		2HCl
1284		2TFA
1285		2HCl
1286		HCl
1287		HCl
1288		NA
1289		HCl

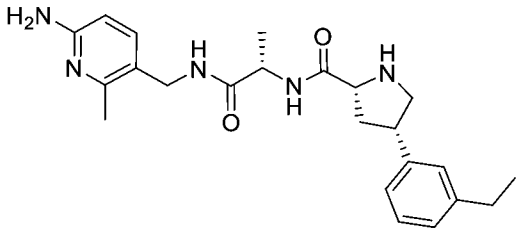
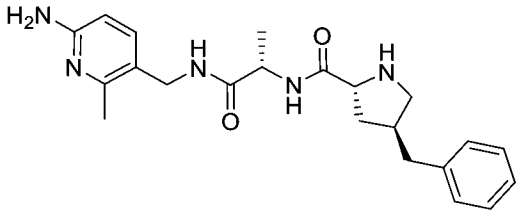
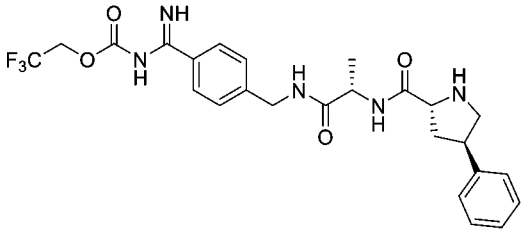
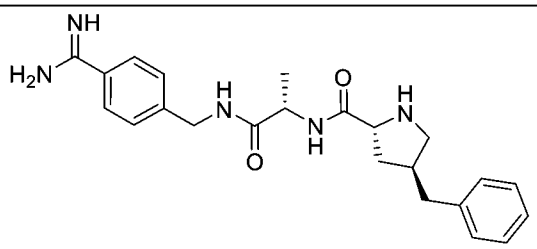
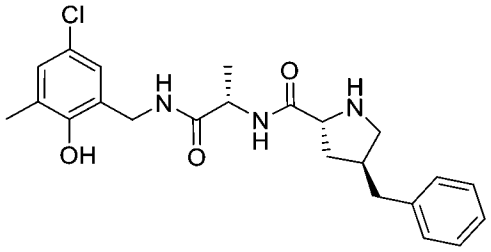
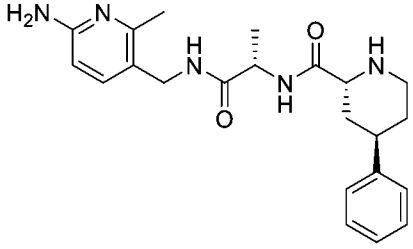
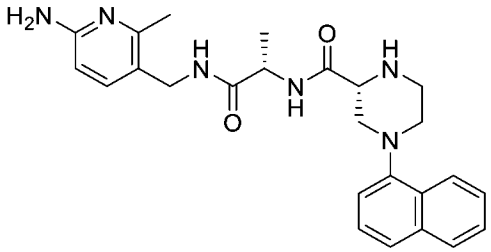
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1290		HCl
1291		2HCl
1292		NA
1293		NA
1294		NA
1295		NA

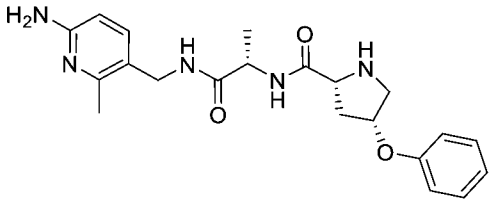
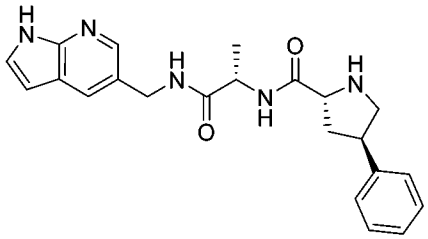
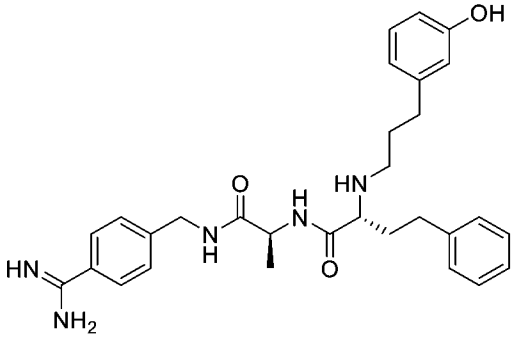
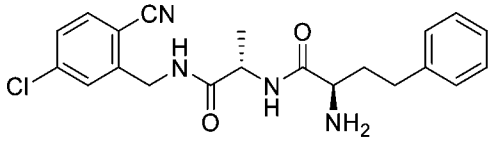
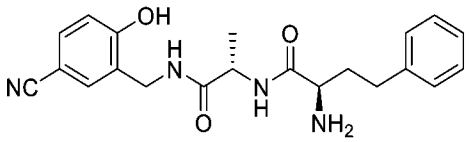
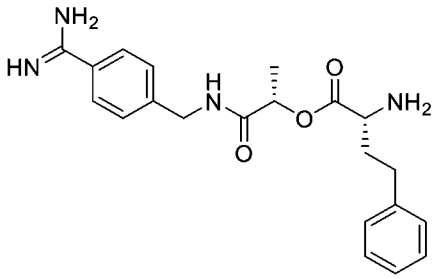
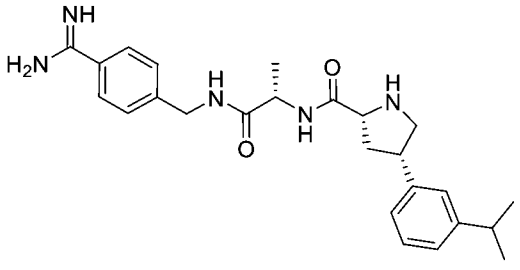
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1296		2HCl
1297		2 HCl
1298		HCl
1299		HCl
1300		2TFA
1301		N/A
1302		2HCl

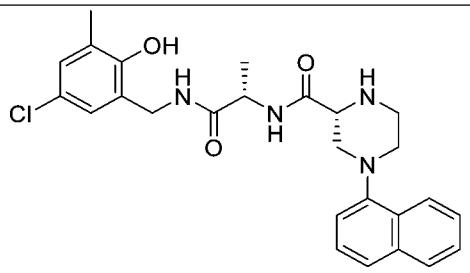
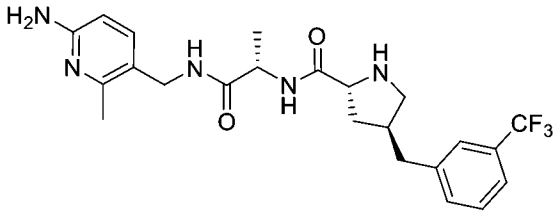
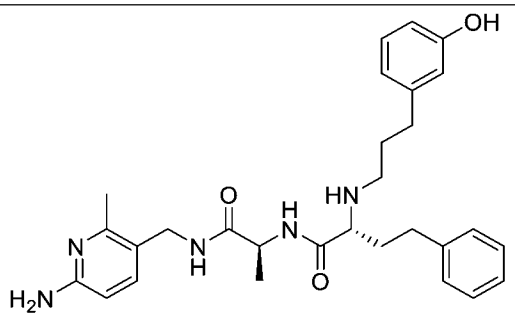
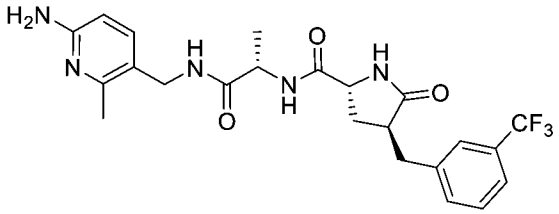
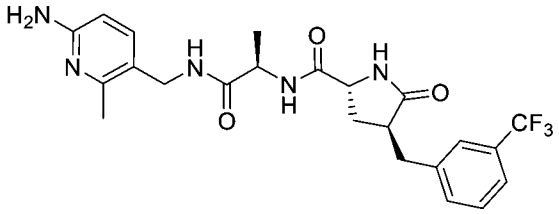
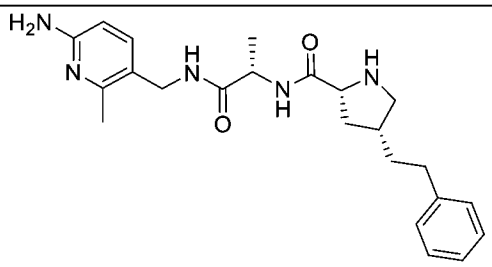
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1303		2HCl
1304		2HCl
1305		NA
1306		2HCl
1307		HCl
1308		2 HCl
1309		2 HCl

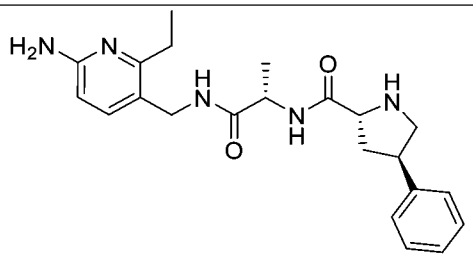
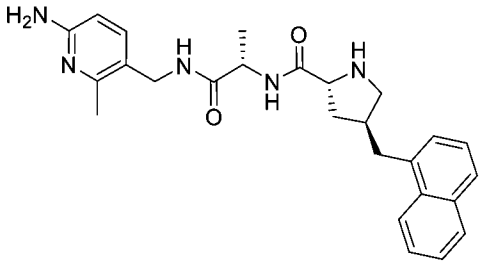
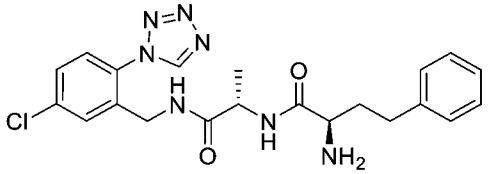
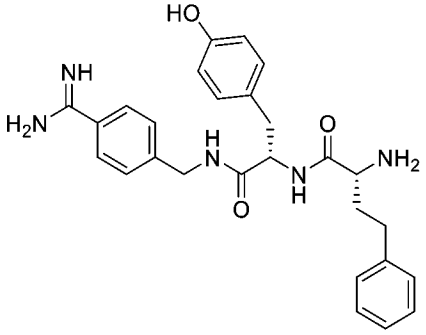
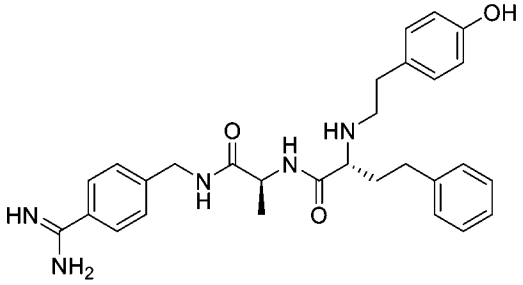
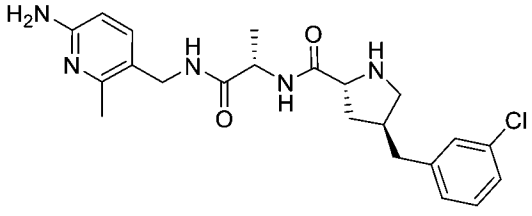
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1310		2HCl
1311		2HCl
1312		2TFA
1313		TFA
1314		TFA
1315		HCl
1316		2HCl

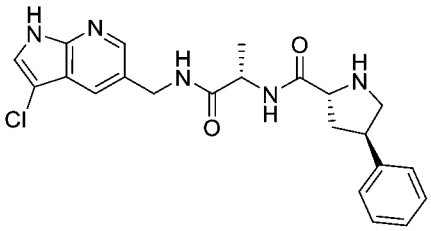
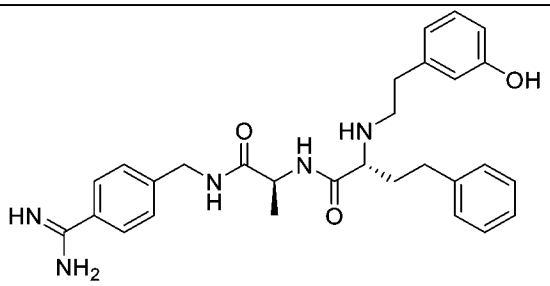
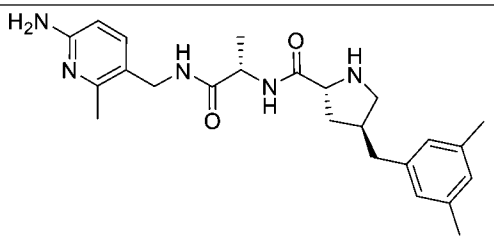
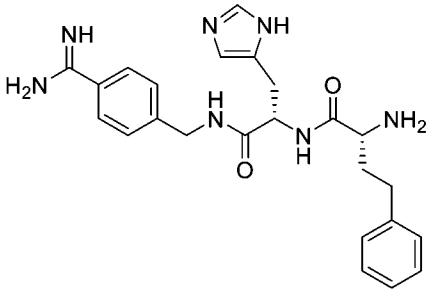
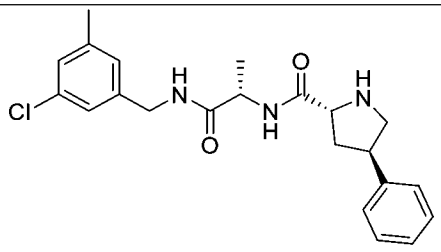
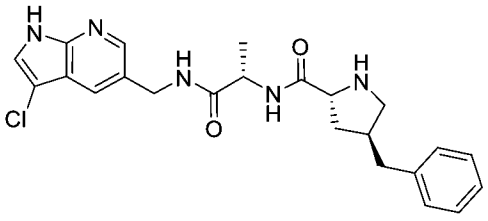
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1317		HCl
1318		2HCl
1319		2HCl
1320		2TFA
1321		2TFA
1322		2HCl

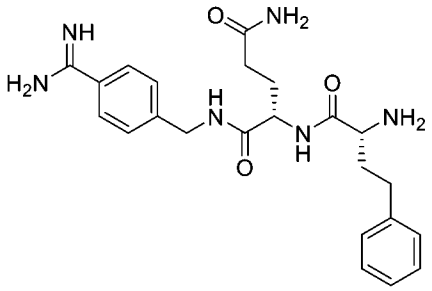
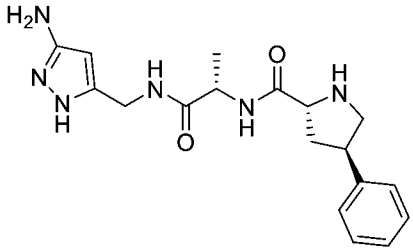
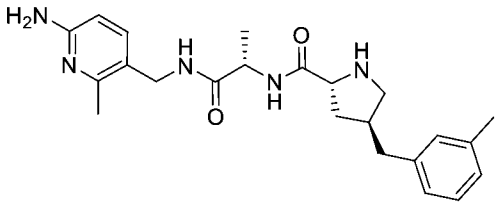
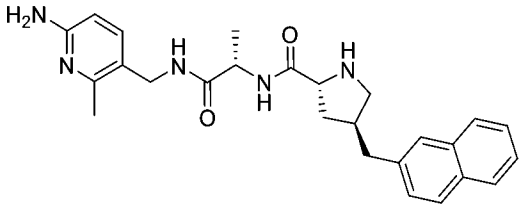
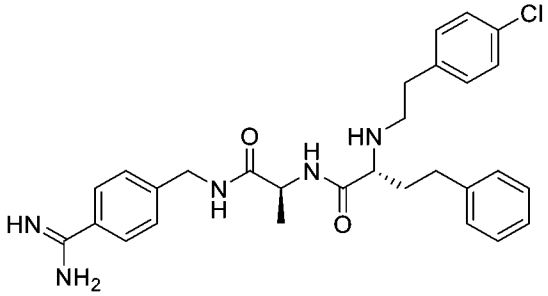
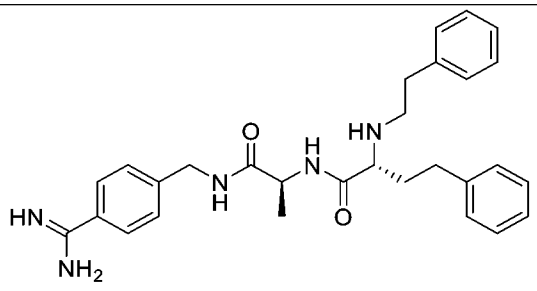
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1323		2HCl
1324		2TFA
1325		TFA
1326		2TFA
1327		2HCl
1328		2HCl

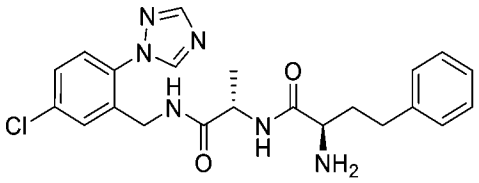
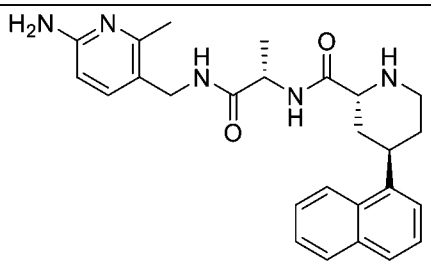
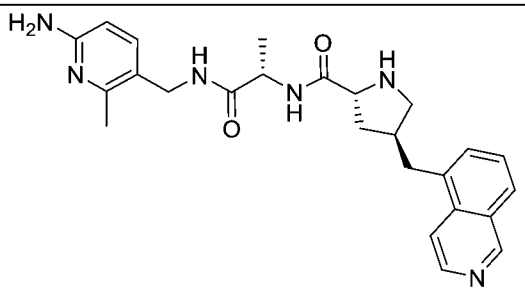
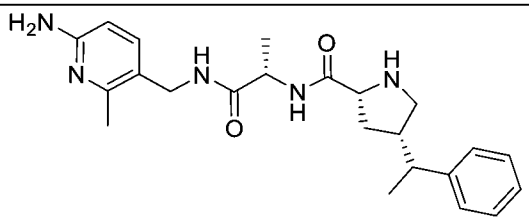
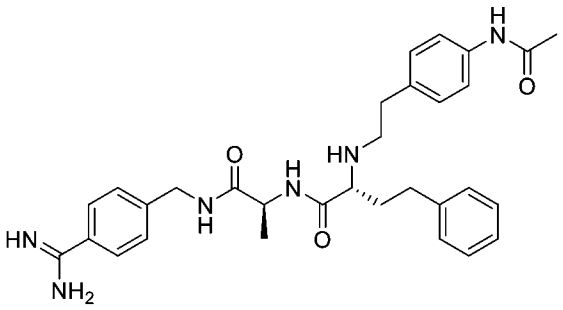
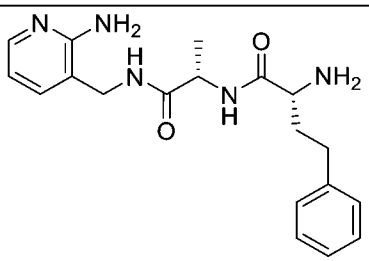
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1329		2HCl
1330		2TFA
1331		2HCl
1332		2TFA
1333		HCl
1334		2HCl

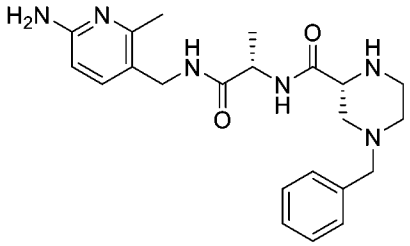
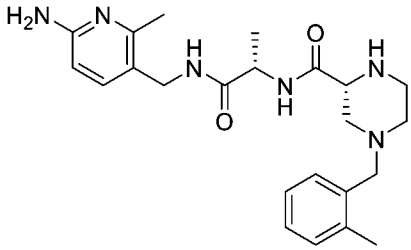
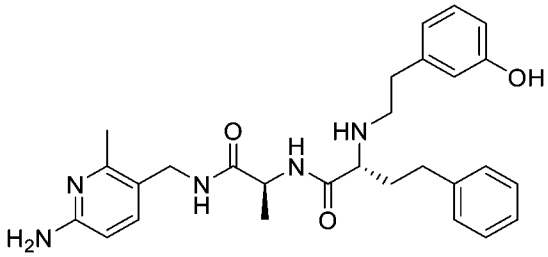
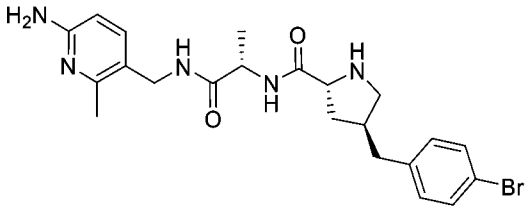
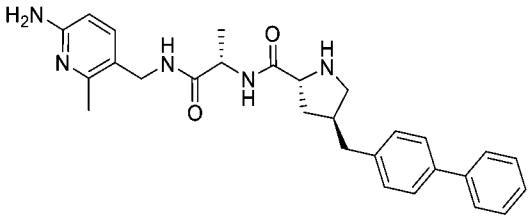
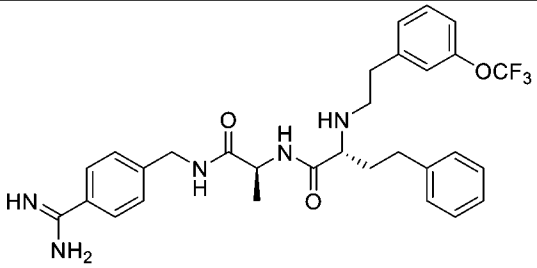
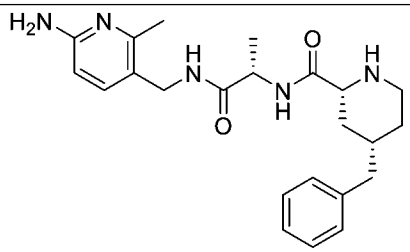
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1335		2TFA
1336		2HCl
1337		2HCl
1338		2HCl
1339		2TFA
1340		2HCl

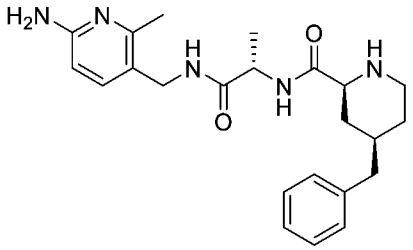
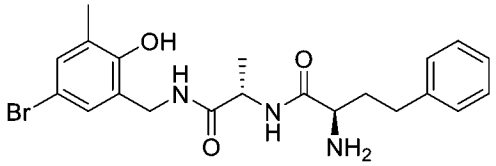
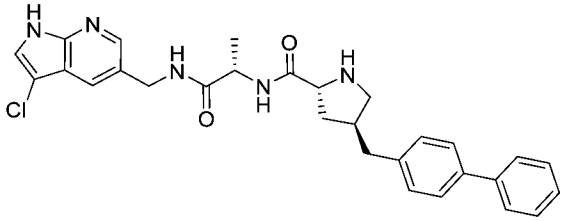
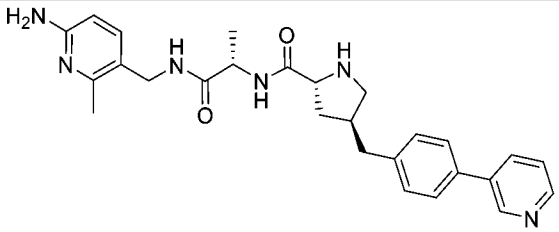
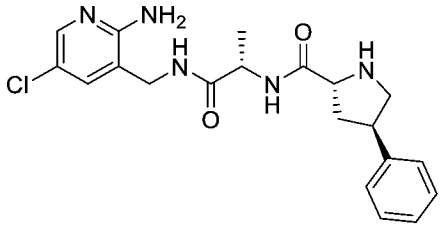
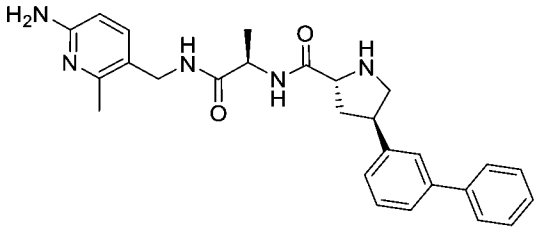
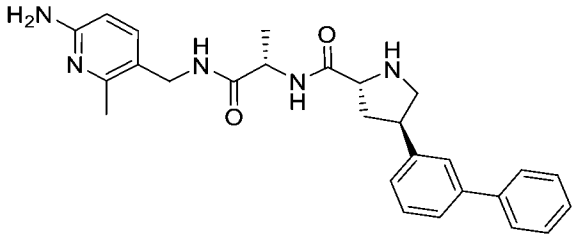
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1341		TFA
1342		2 HCl
1343		2TFA
1344		2HCl
1345		2HCl
1346		2HCl

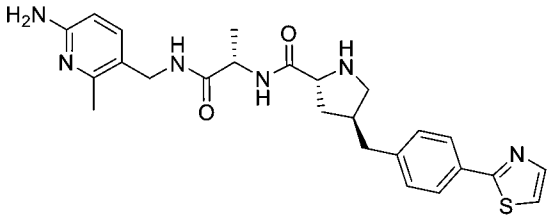
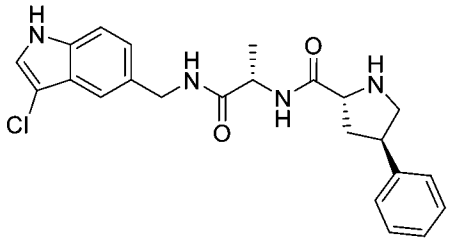
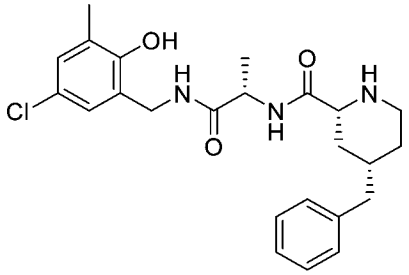
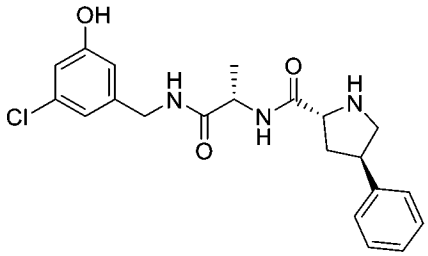
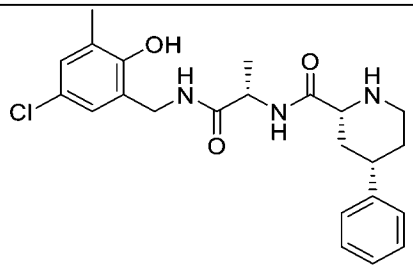
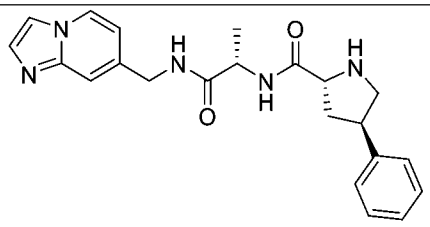
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1347		2 HCl
1348		2 HCl
1349		2HCl
1350		2HCl
1351		2HCl
1352		2TFA
1353		2 HCl

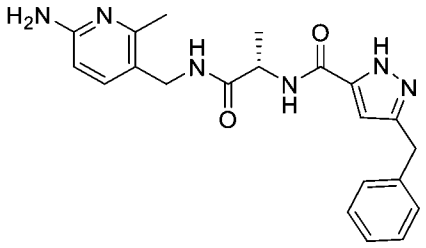
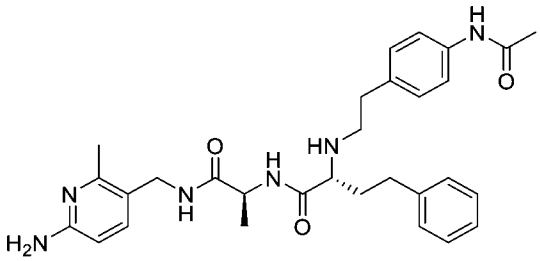
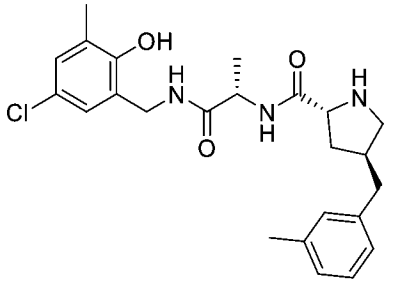
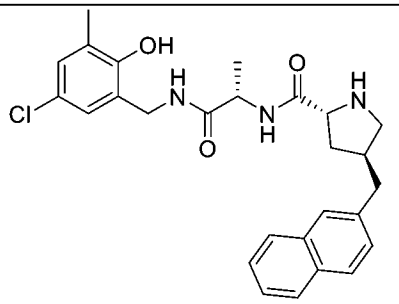
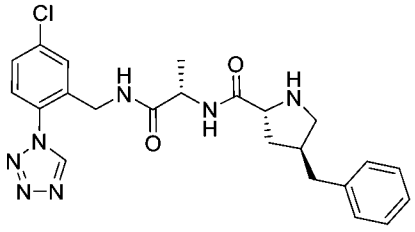
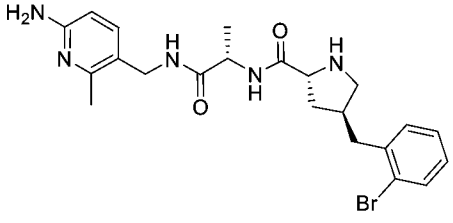
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1354		2 HCl
1355		TFA
1356		TFA
1357		2TFA
1358		2TFA
1359		2TFA
1360		2TFA

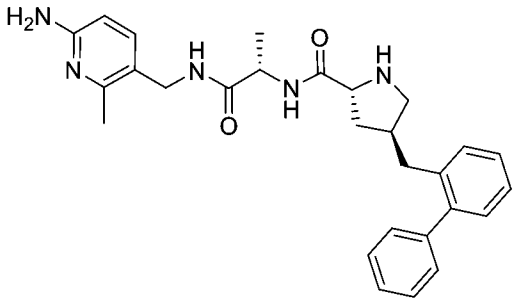
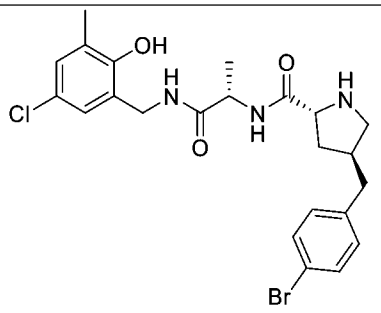
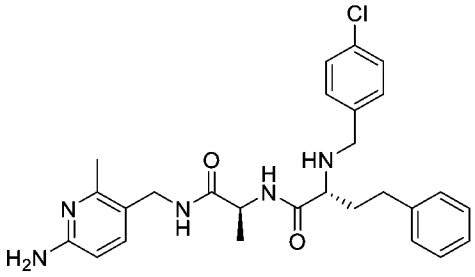
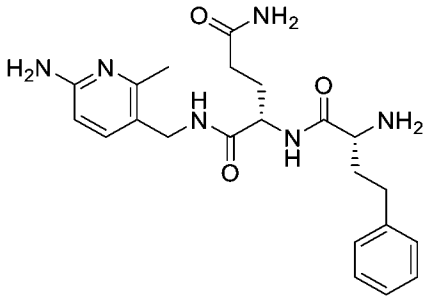
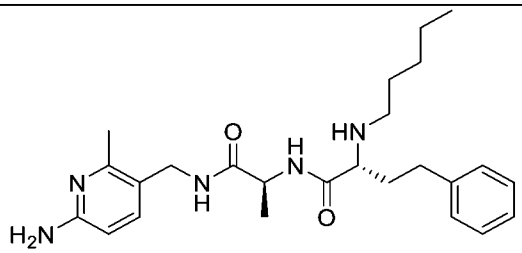
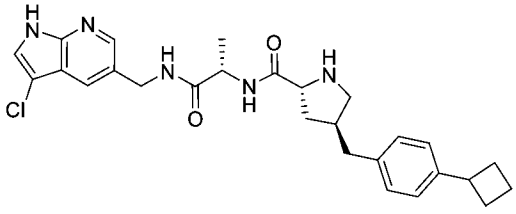
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1361		2TFA
1362		N/A
1363		HCl
1364		HCl
1365		HCl
1366		2HCl

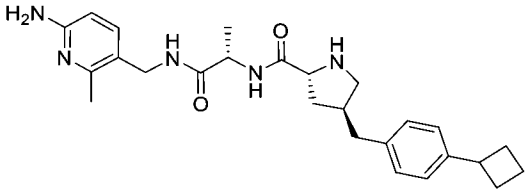
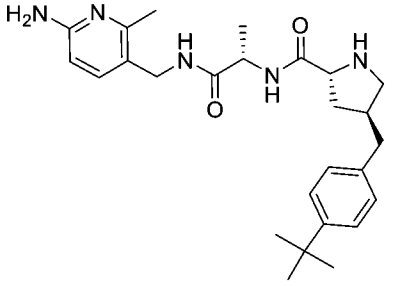
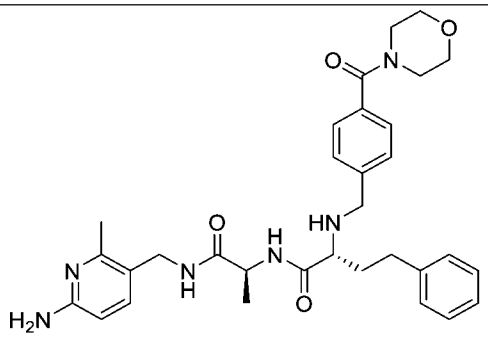
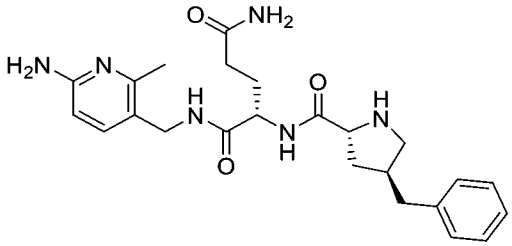
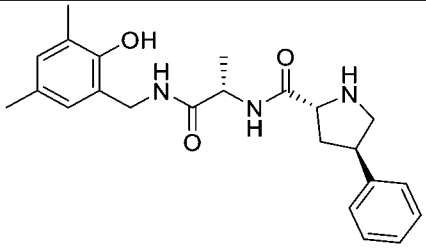
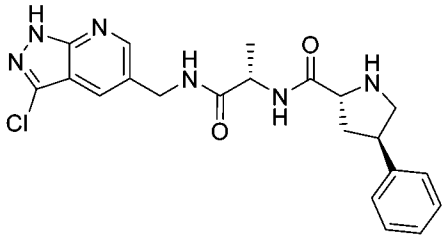
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1367		NA
1368		2HCl
1369		HCl
1370		TFA
1371		HCl
1372		2TFA

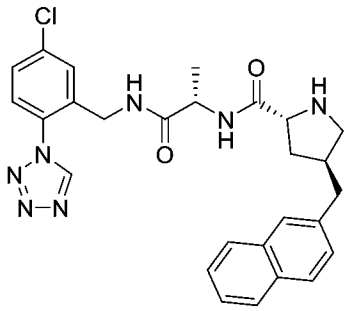
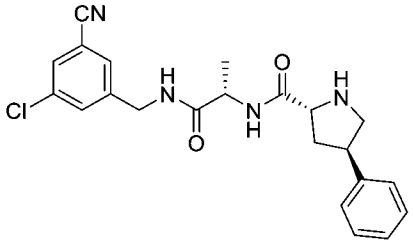
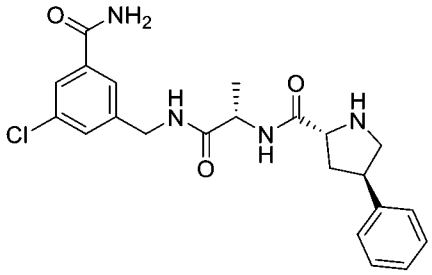
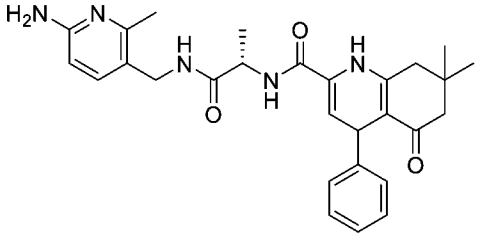
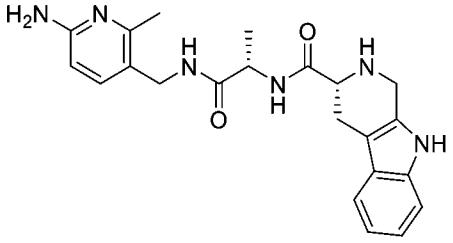
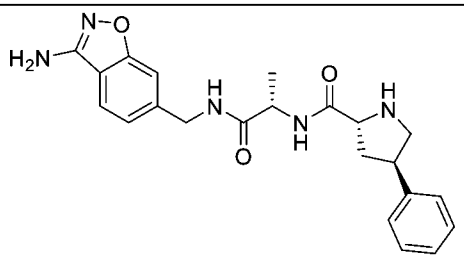
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1373		2TFA
1374		HCl
1375		NA
1376		2TFA
1377		2TFA
1378		2TFA

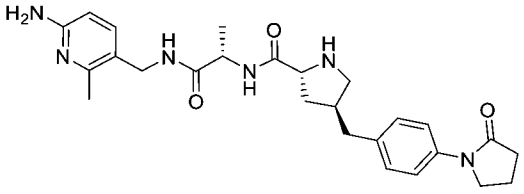
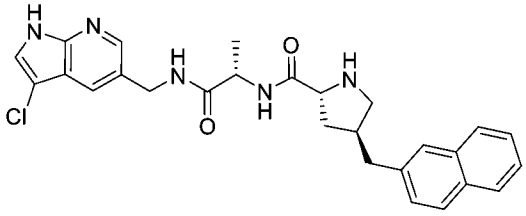
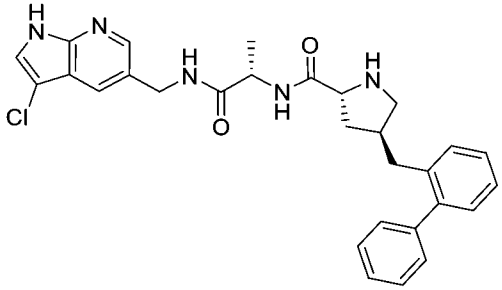
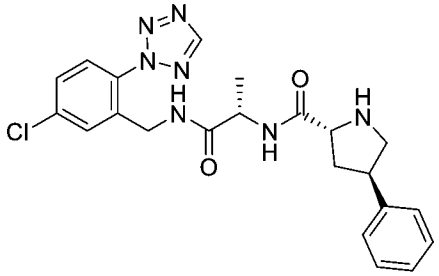
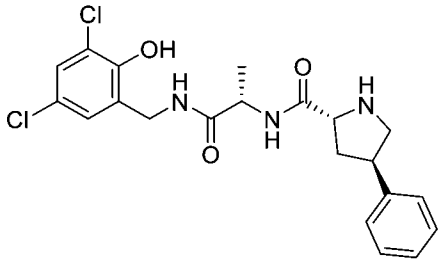
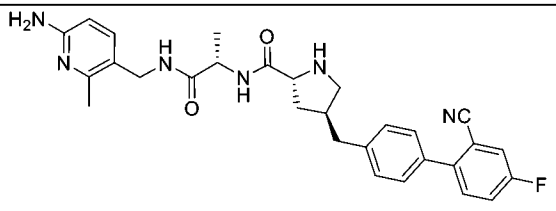
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1379		2TFA
1380		2 HCl
1381		2TFA
1382		2TFA
1383		TFA
1384		2HCl

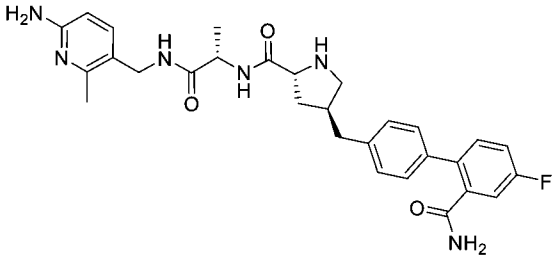
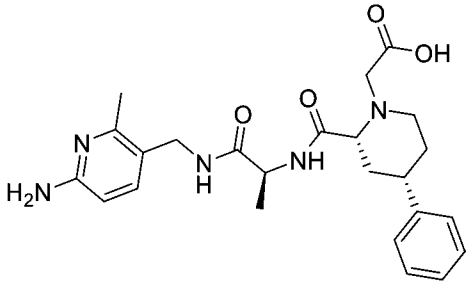
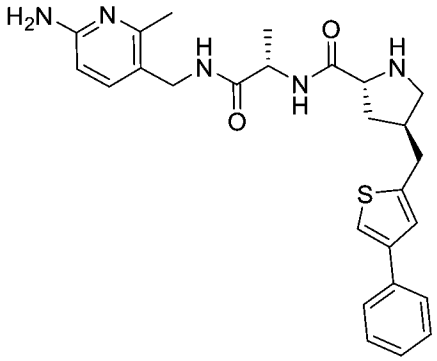
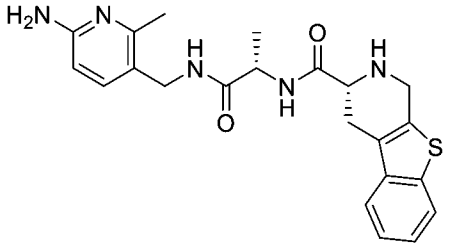
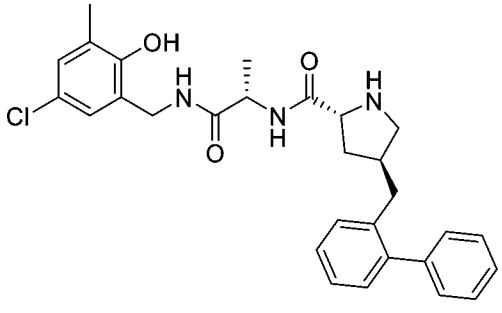
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1385		TFA
1386		TFA
1387		TFA
1388		NA
1389		2 HCl
1390		2TFA

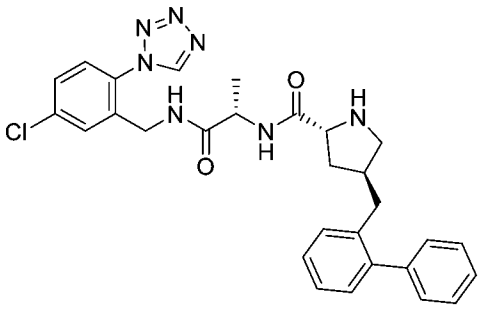
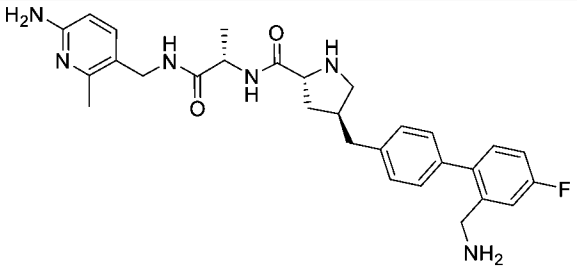
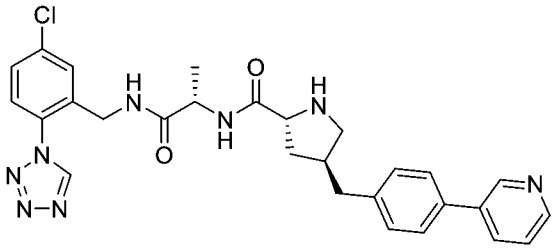
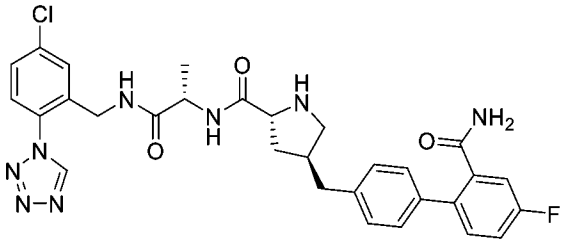
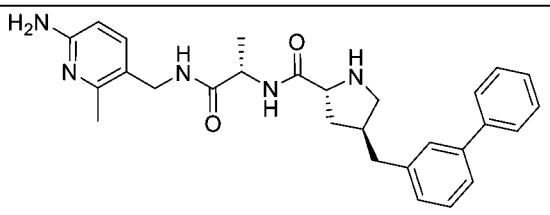
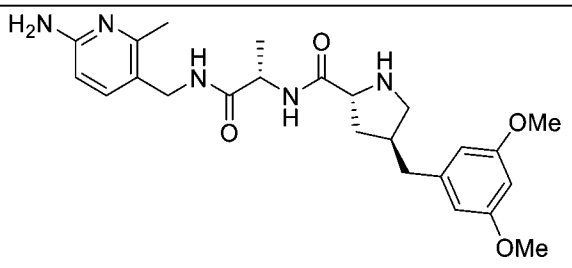
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1391		2TFA
1392		2TFA
1393		2TFA
1394		TFA
1395		TFA
1396		NA

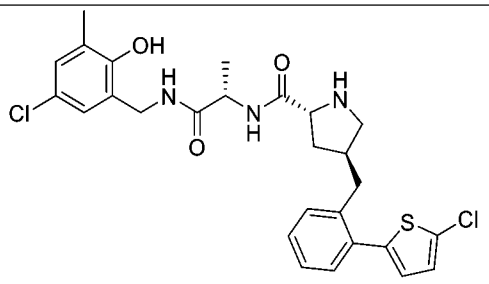
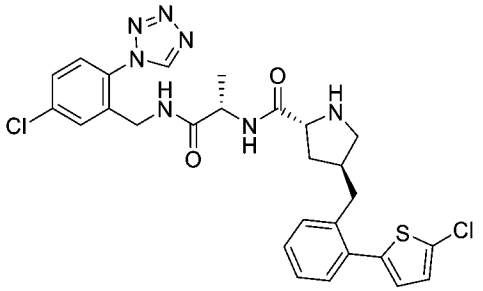
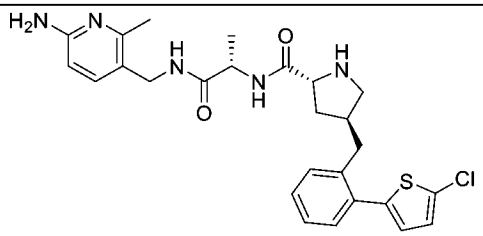
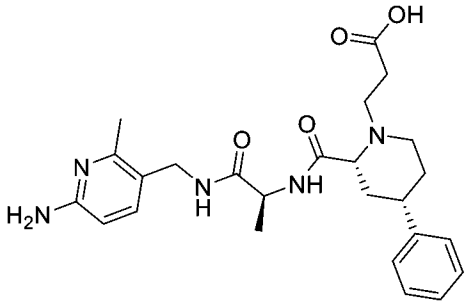
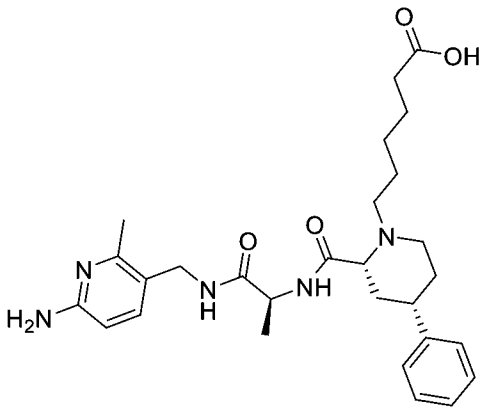
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1397		2TFA
1398		TFA
1399		2 HCl
1400		2 HCl
1401		HCl

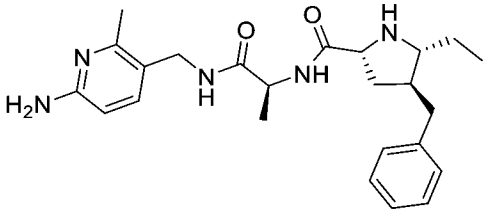
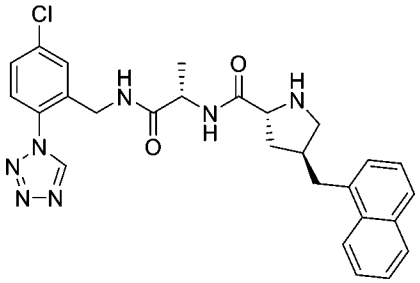
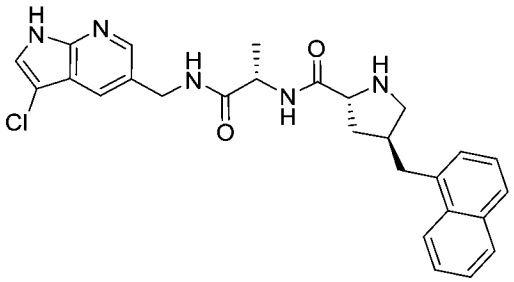
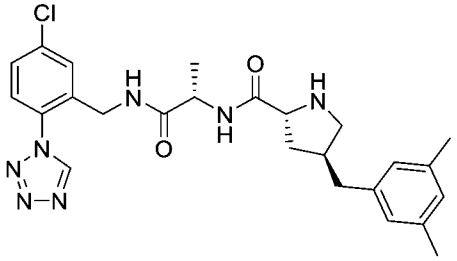
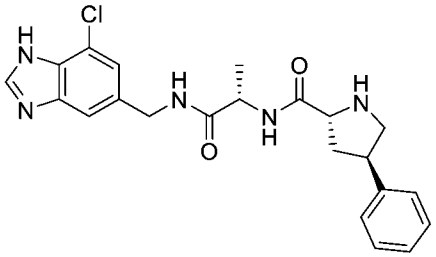
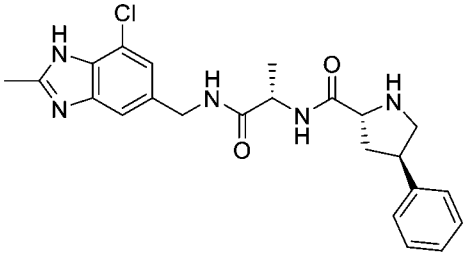
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1402		TFA
1403		NA
1404		HCl
1405		HCl
1406		2HCl
1407		2TFA

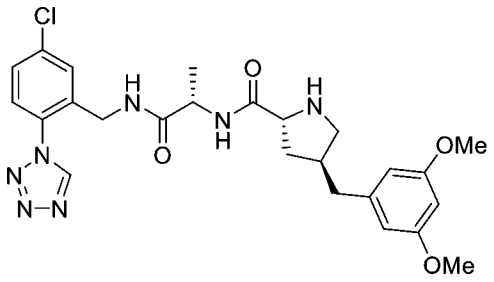
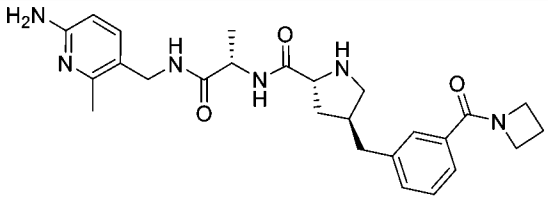
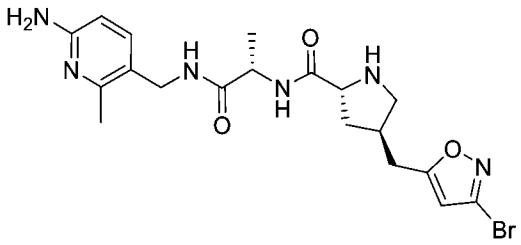
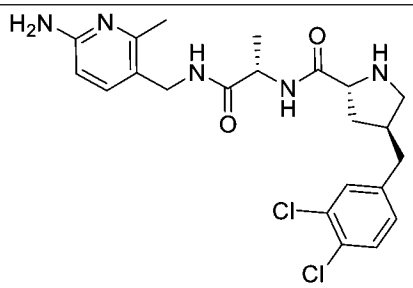
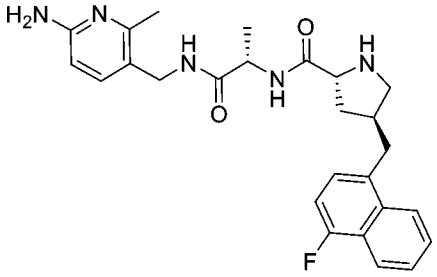
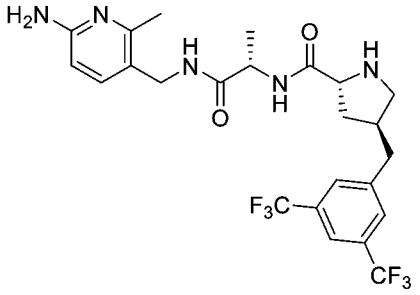
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1408		HCl
1409		TFA
1410		TFA
1411		TFA
1412		TFA

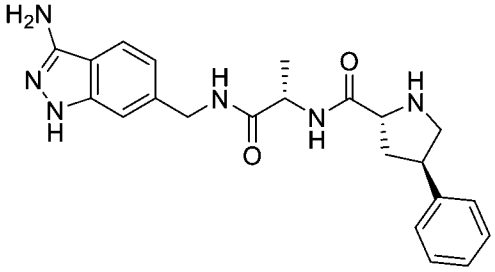
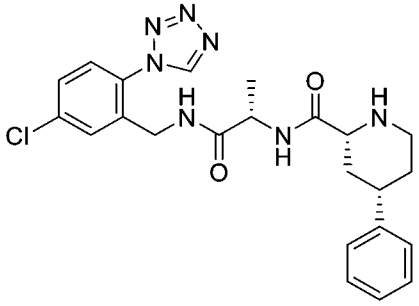
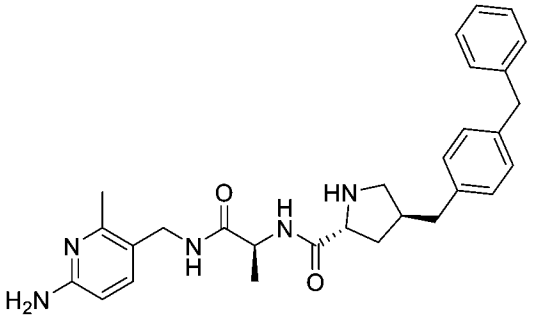
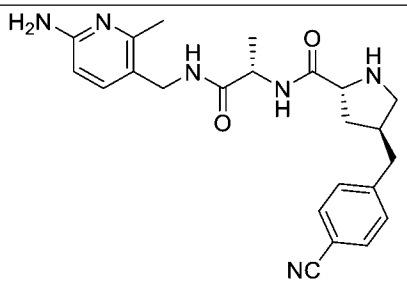
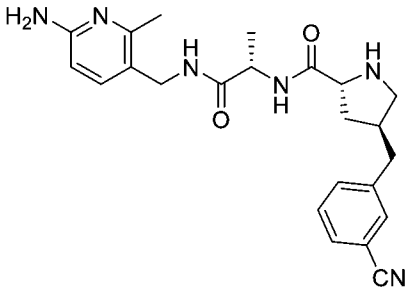
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1413		2TFA
1414		HCl
1415		HCl
1416		HCl
1417		TFA
1418		TFA

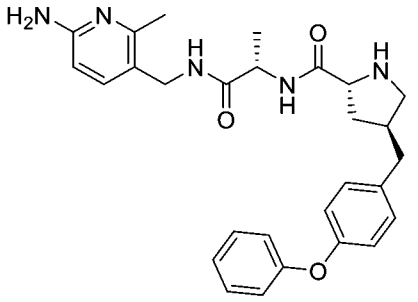
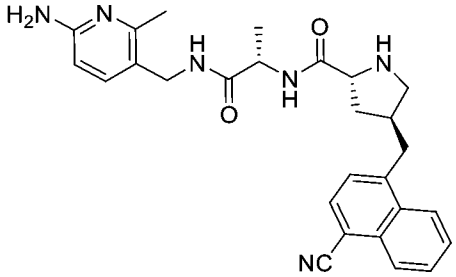
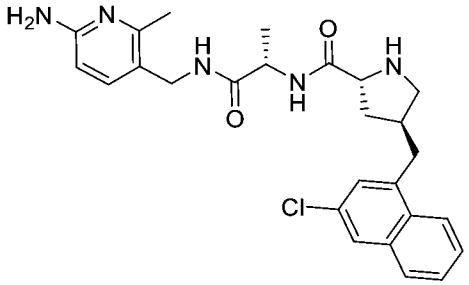
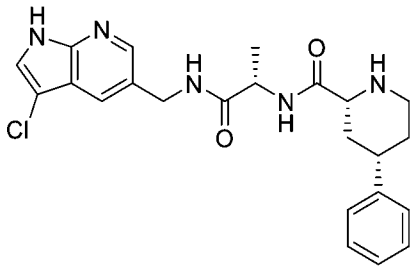
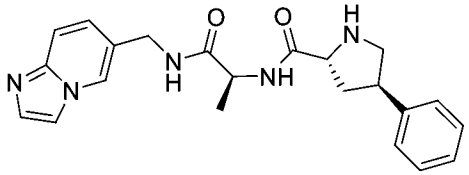
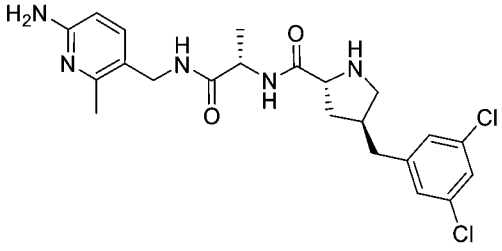
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1419		TFA
1420		2TFA
1421		2TFA
1422		HCl
1423		HCl
1424		2TFA

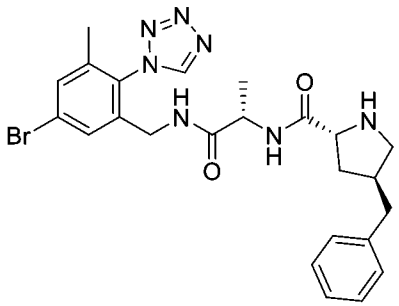
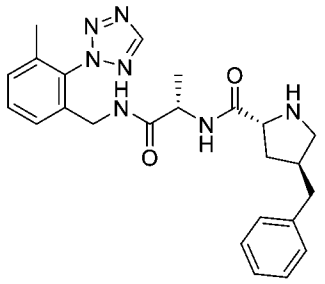
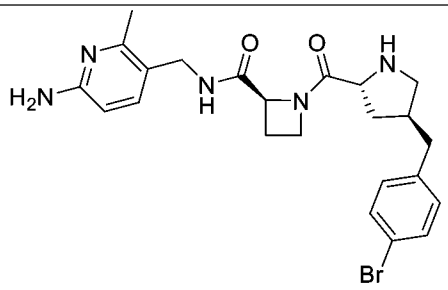
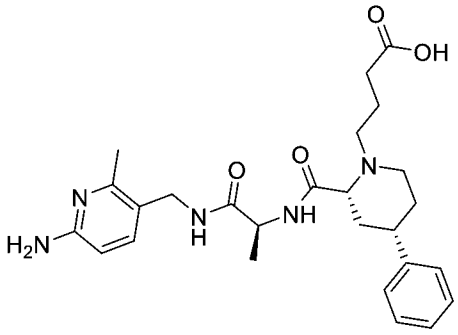
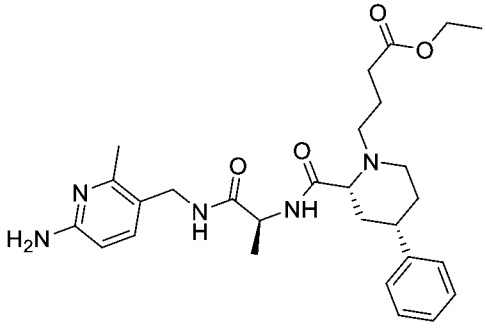
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1425		TFA
1426		TFA
1427		2TFA
1428		2TFA
1429		2TFA

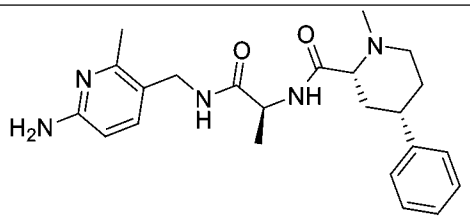
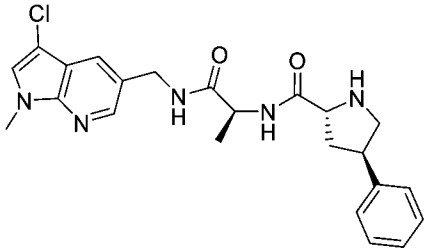
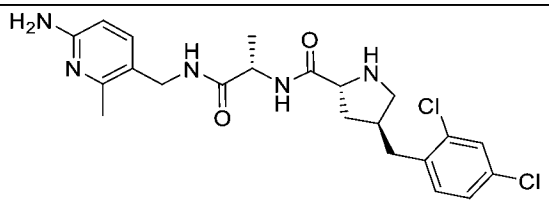
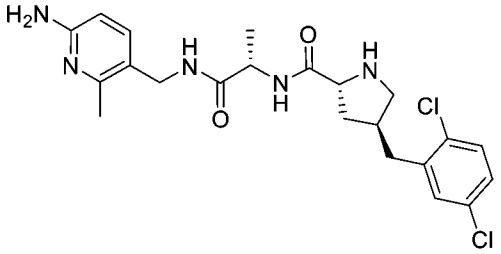
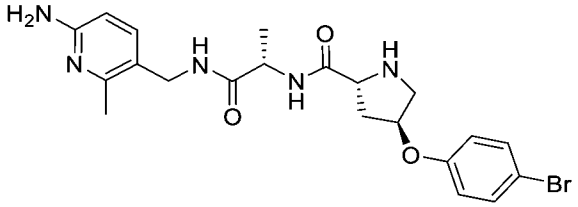
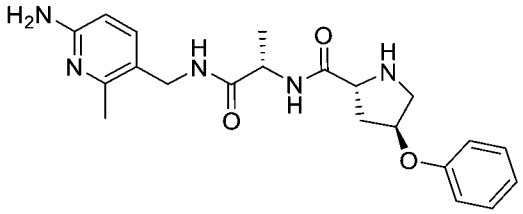
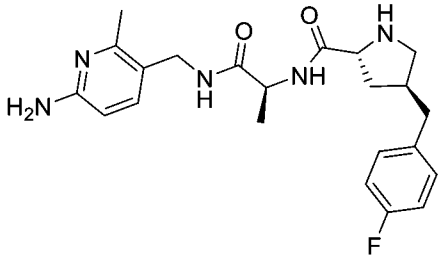
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1430		2TFA
1431		HCl
1432		HCl
1433		TFA
1434		2HCl
1435		2HCl

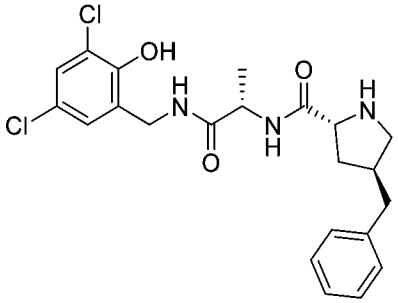
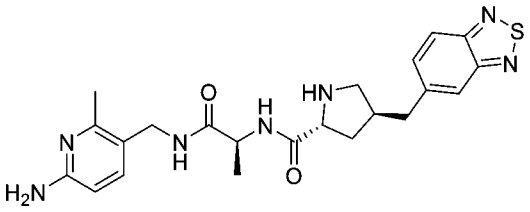
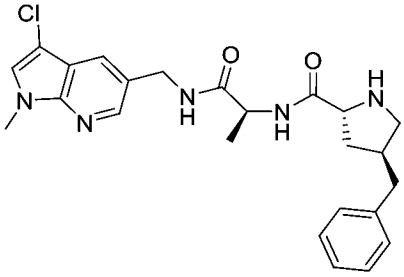
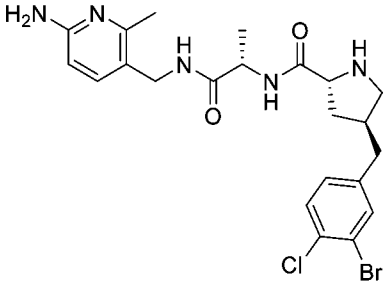
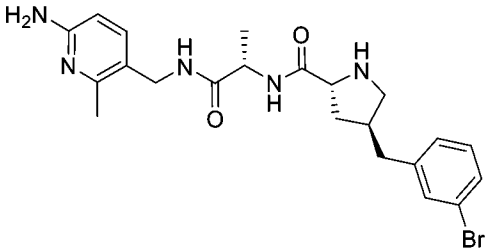
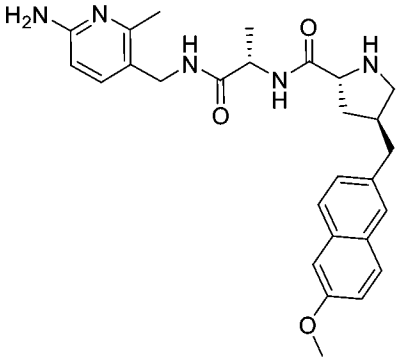
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1436		TFA
1437		TFA
1438		2TFA
1439		TFA
1440		NA

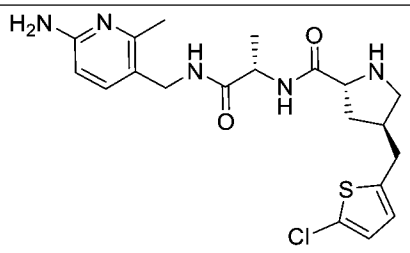
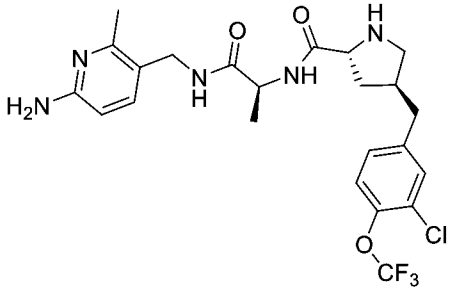
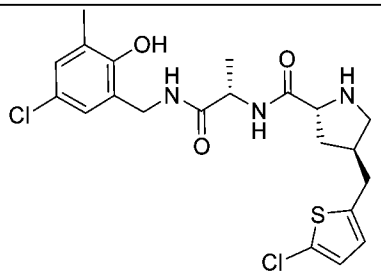
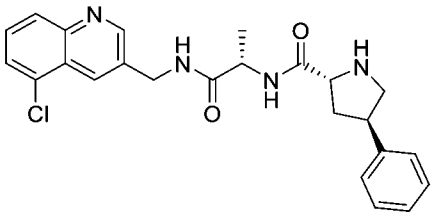
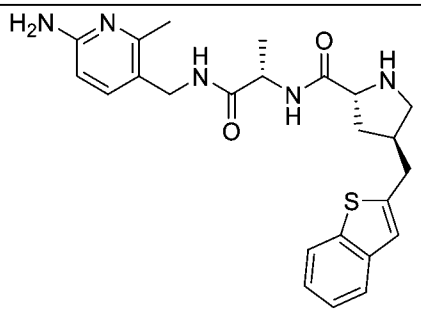
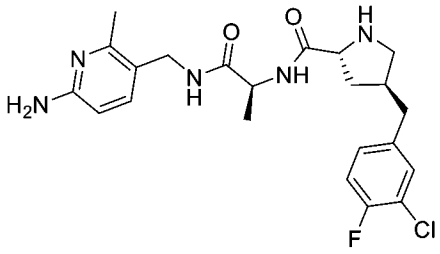
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1441		NA
1442		2HCl
1443		2HCl
1444		2HCl
1445		2HCl
1446		2HCl
1447		2TFA

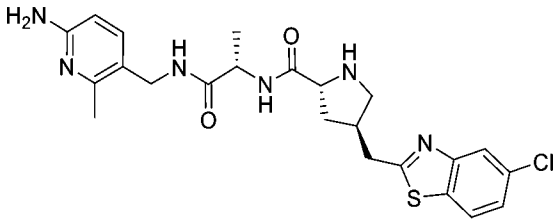
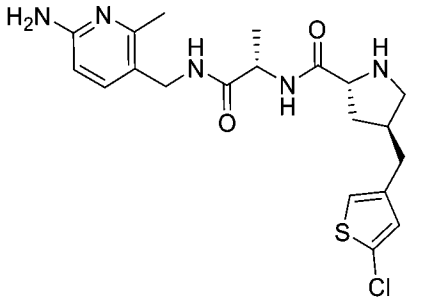
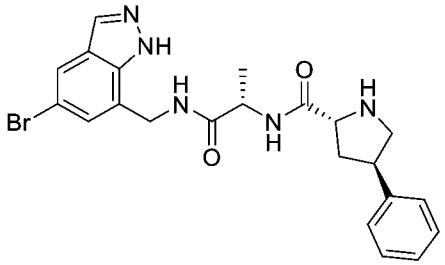
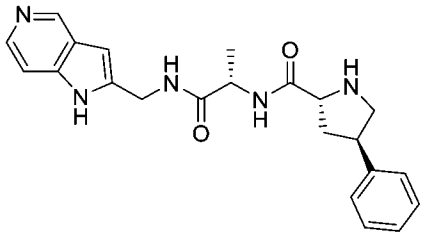
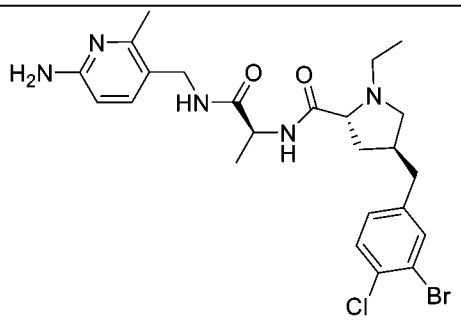
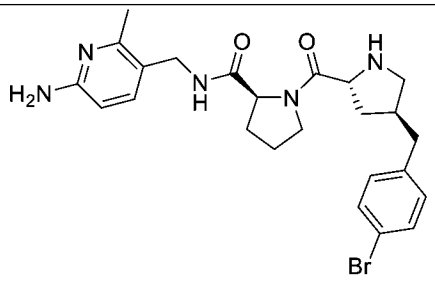
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1448		HCl
1449		2TFA
1450		2HCl
1451		2TFA
1452		2HCl
1453		HCl

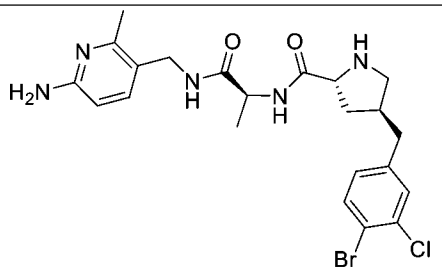
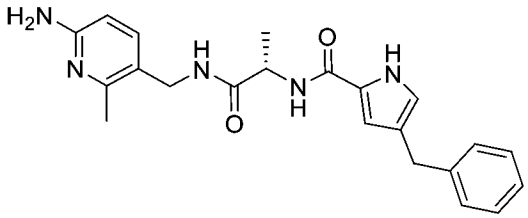
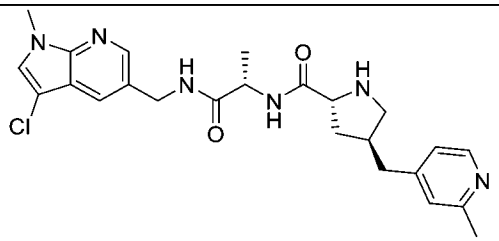
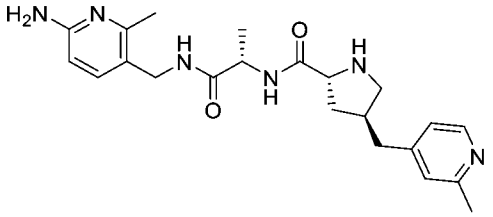
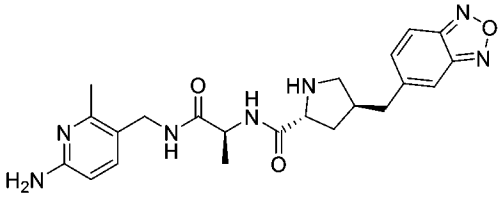
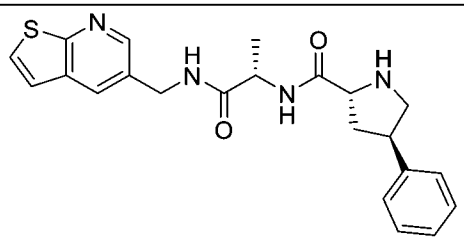
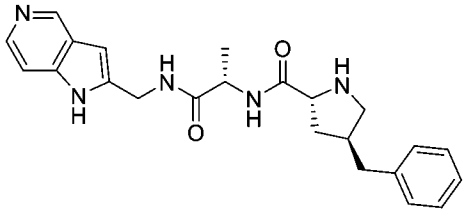
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1454		HCl
1455		2TFA
1456		HCl
1457		HCl
1458		2TFA
1459		2TFA

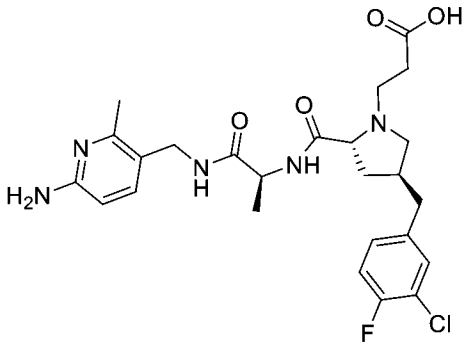
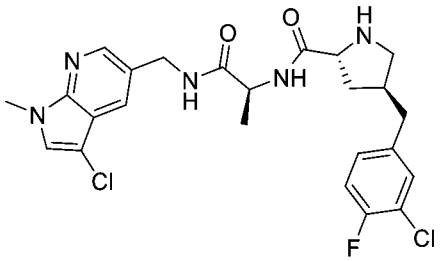
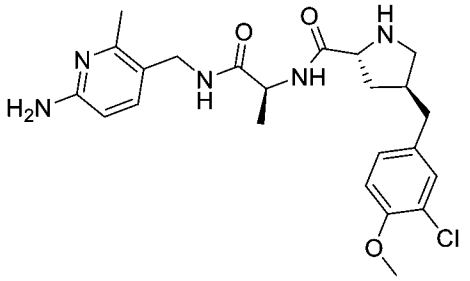
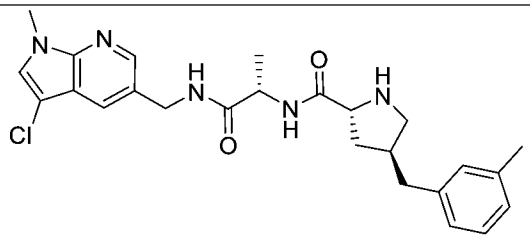
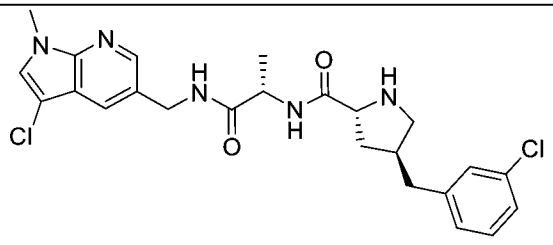
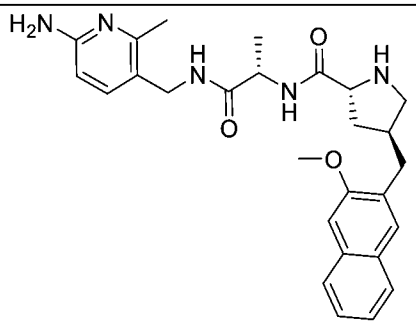
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1460		2TFA
1461		HCl
1462		TFA
1463		2TFA
1464		NA
1465		2TFA

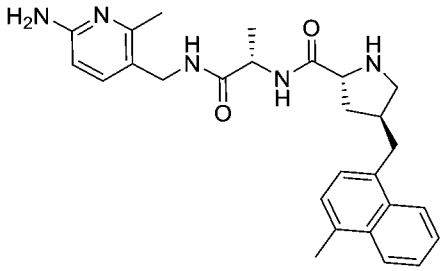
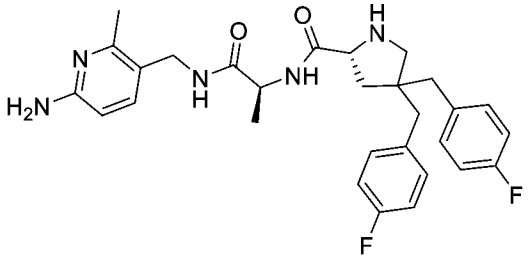
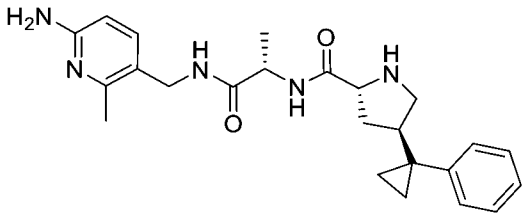
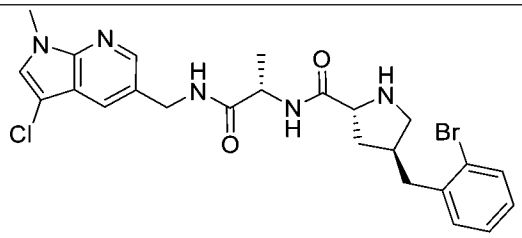
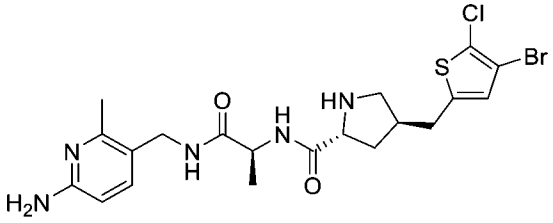
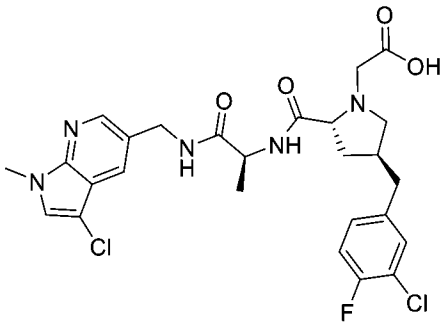
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1466		2TFA
1467		TFA
1468		TFA
1469		HCl
1470		2TFA
1471		1TFA
1472		2TFA

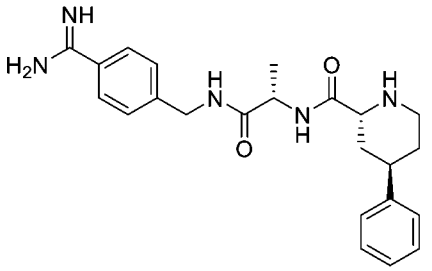
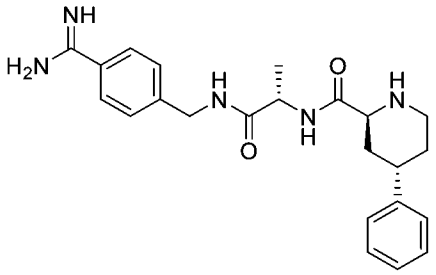
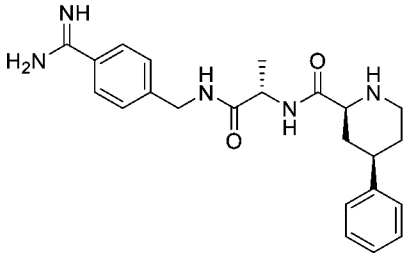
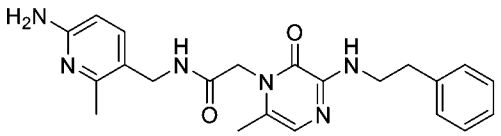
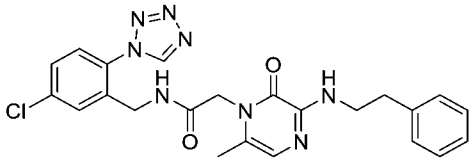
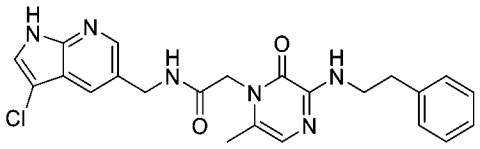
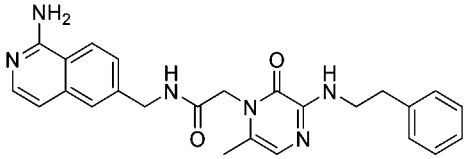
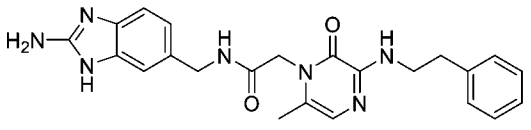
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1473		1TFA
1474		TFA
1475		2TFA
1476		HCl
1477		TFA
1478		HCl

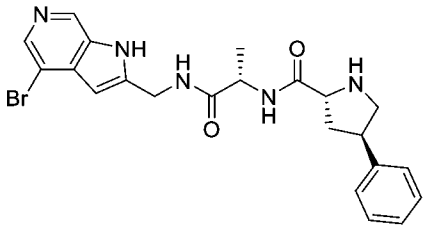
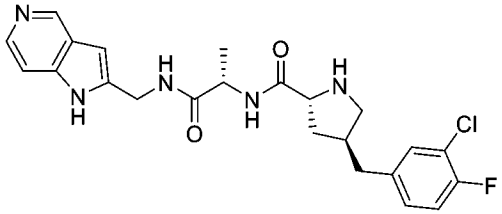
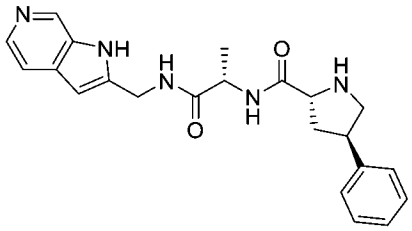
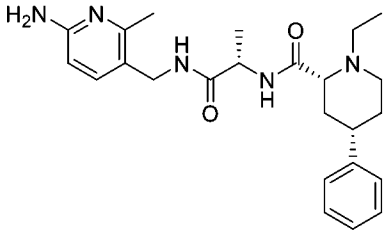
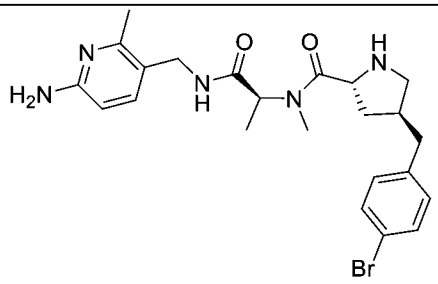
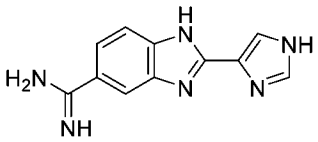
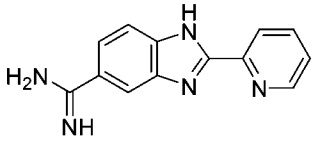
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1479		HCl
1480		2TFA
1481		2TFA
1482		HCl
1483		2TFA
1484		1TFA

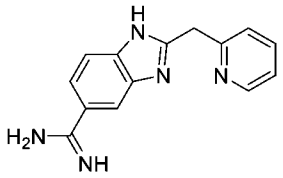
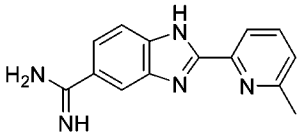
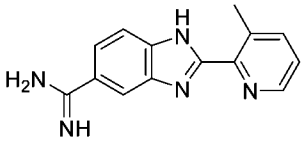
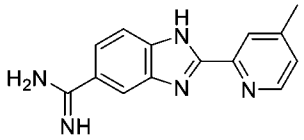
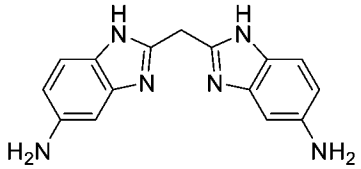
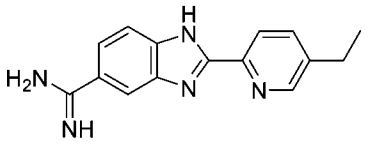
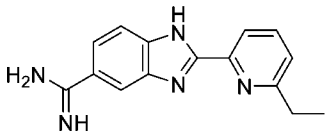
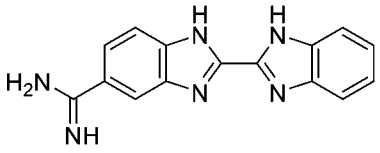
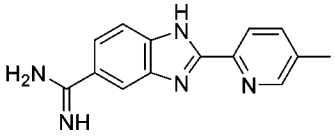
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1485		2 HCl
1486		2 HCl
1487		2HCl
1488		NA
1489		NA
1490		AcO H
1491		TFA
1492		TFA

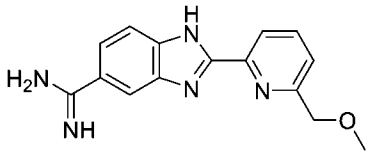
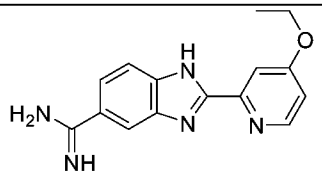
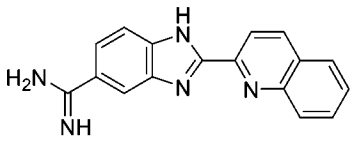
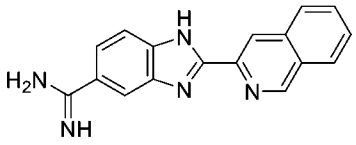
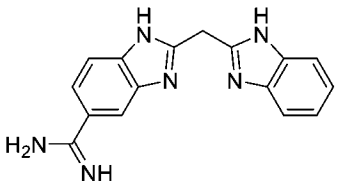
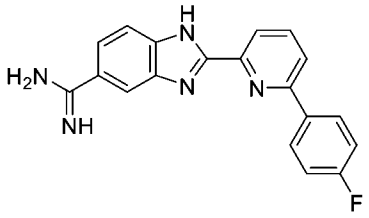
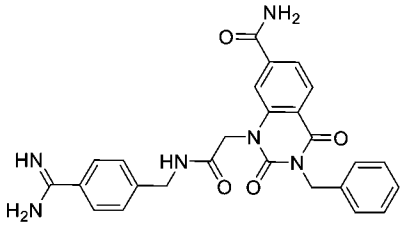
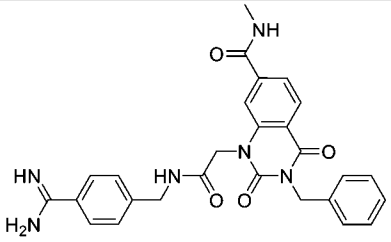
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
1493		2TFA
1494		2TFA
1495		2TFA
1496		NA
1497		2TFA
2000		2 HCl
2001		2 HCl

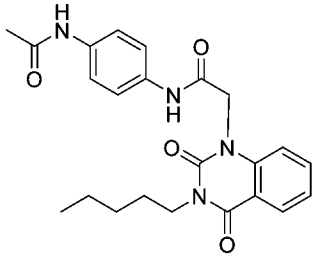
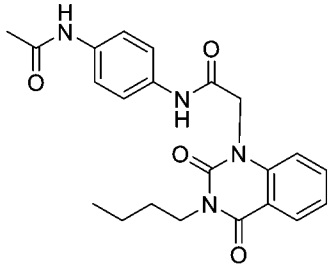
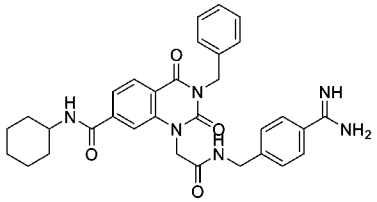
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
2002		2 HCl
2003		2 HCl
2004		2 HCl
2005		2 HCl
2006		
2007		2 HCl
2008		2 HCl
2009		2 HCl
2010		2 HCl

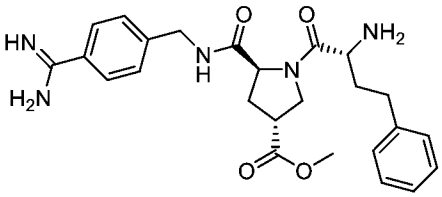
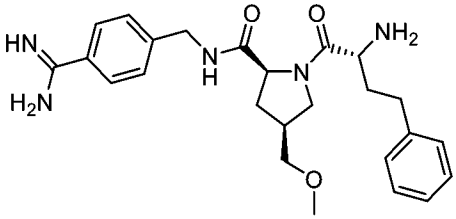
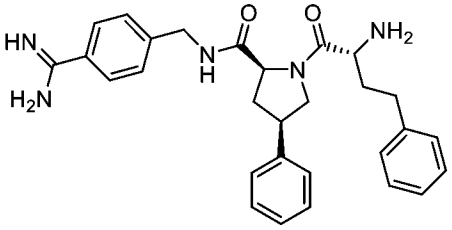
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
2011		2 HCl
2012		2 HCl
2013		2 HCl
2014		2 HCl
2015		2 HCl
2016		2 HCl
2017		HOAc
2018		HOAc

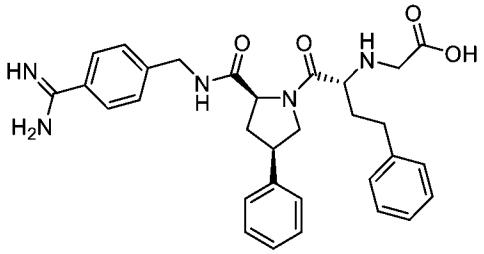
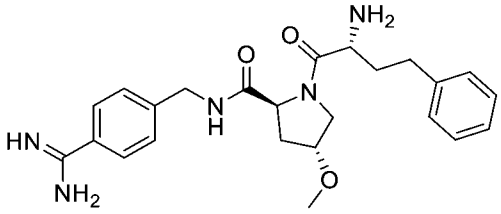
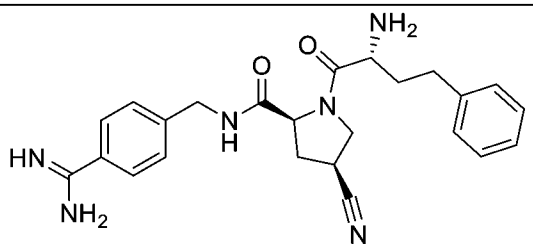
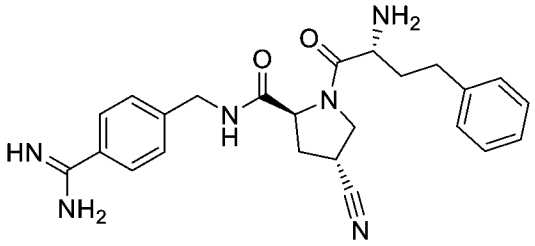
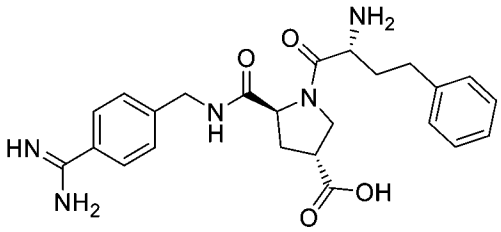
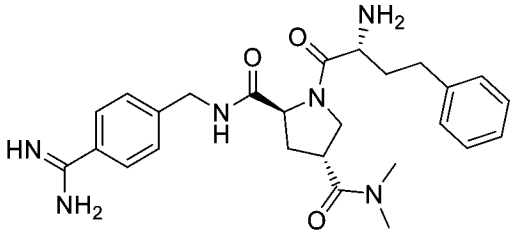
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
2019		N/A
2020		N/A
2021		N/A

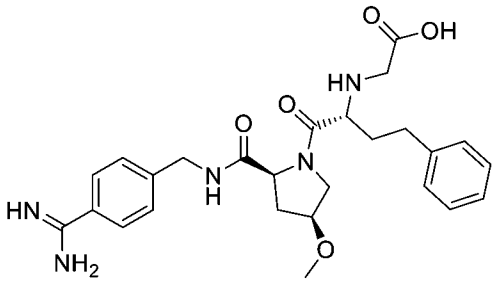
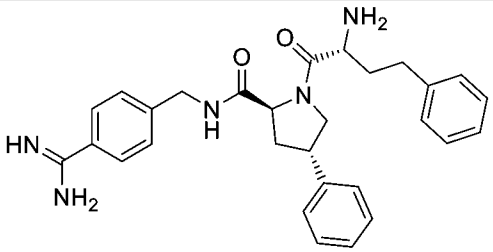
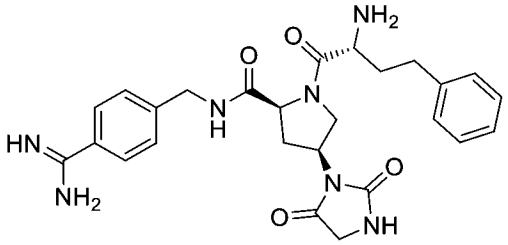
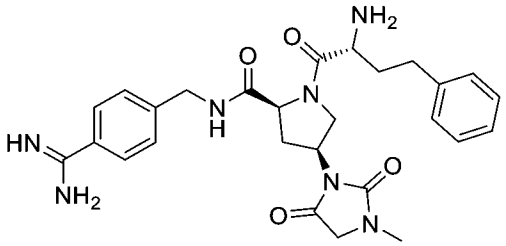
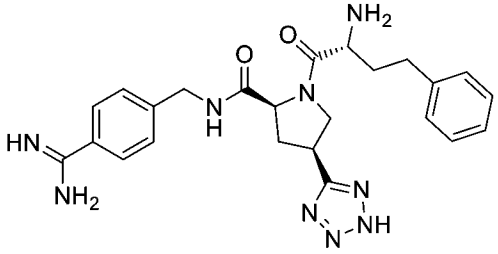
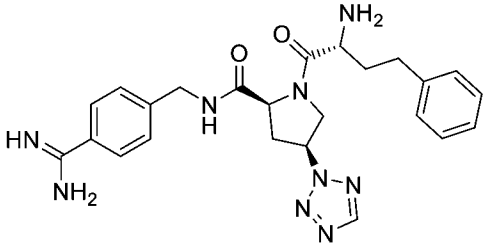
【0589】 表 4B 示例性 MASP-2 抑制性化合物

化合物編號	結構	鹽
I-1		2TFA
I-2		2HCl
I-3		2HCl

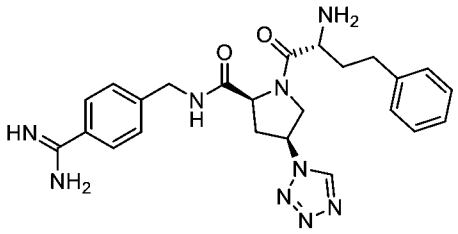
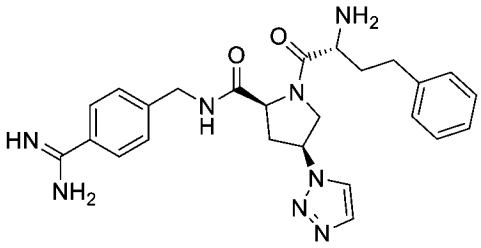
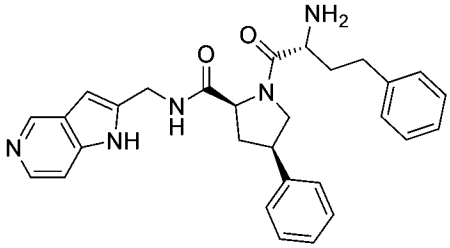
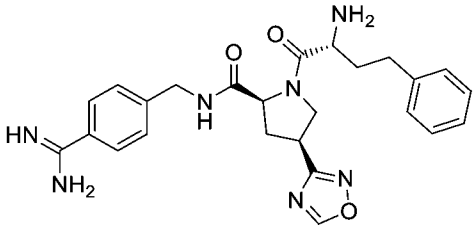
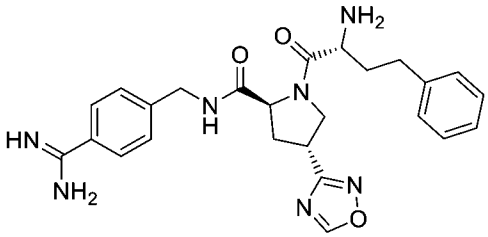
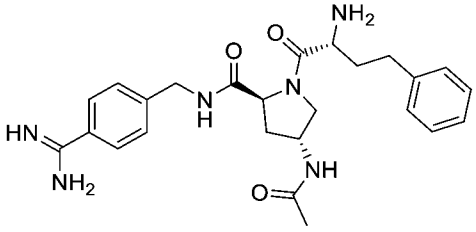
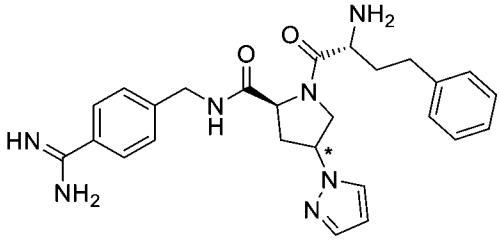
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
I-4		-
I-5		-
I-6		2TFA
I-7		-
I-8		-
I-9		-

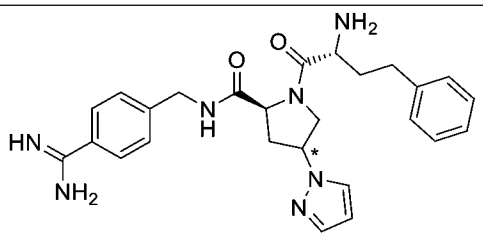
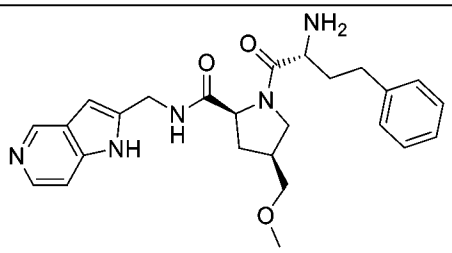
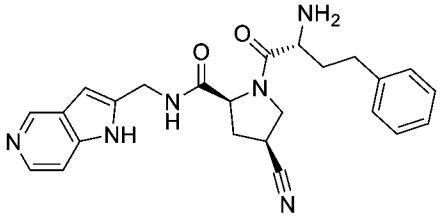
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
I-10		-
I-11		2HCl
I-12		-
I-13		-
I-14		-
I-15		-

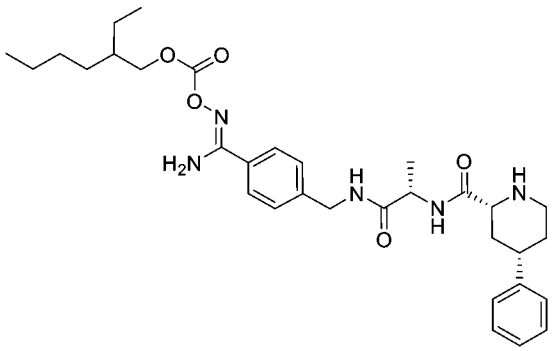
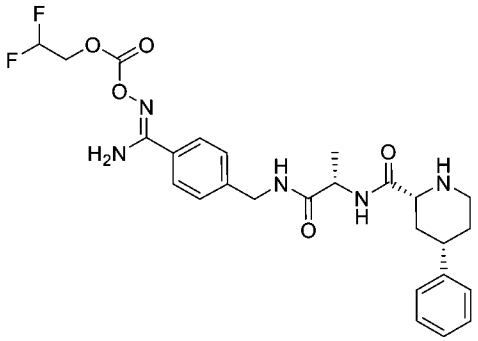
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
I-16		-
I-17		-
I-18		-
I-19		-
I-20		-
I-21		-
I-22		2HCl

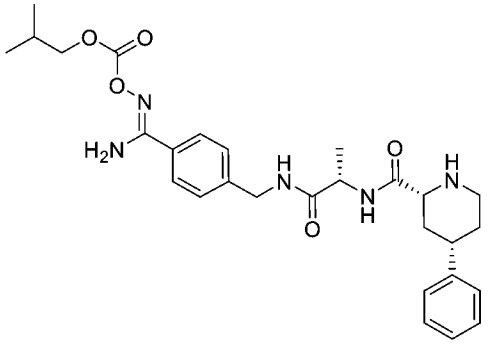
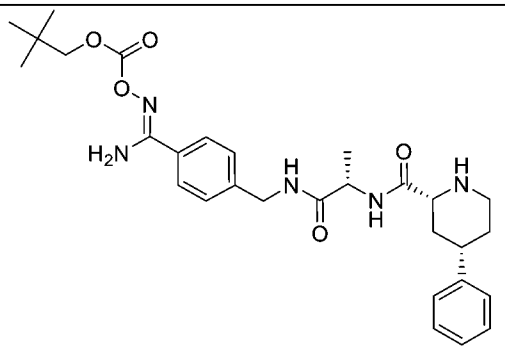
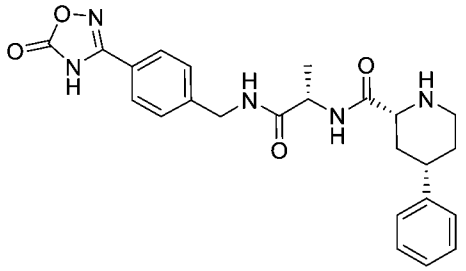
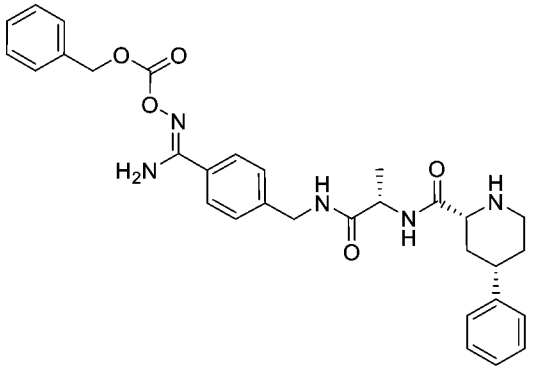
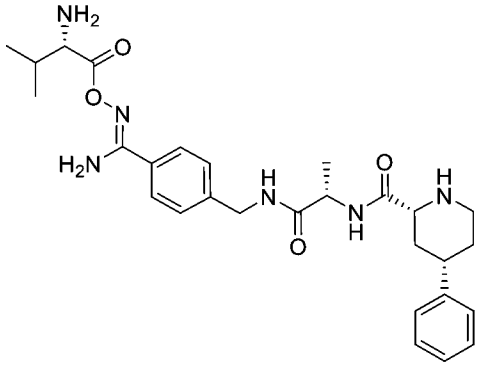
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
I-23		2HCl
I-24		2TFA
I-25		2TFA

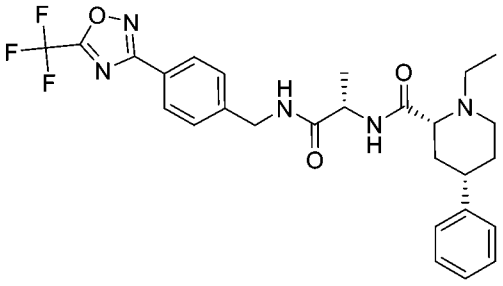
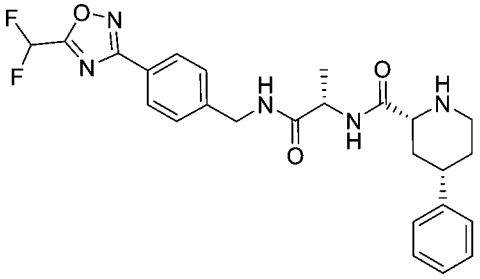
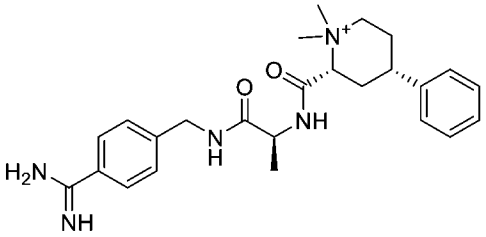
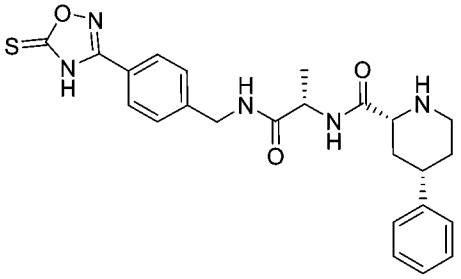
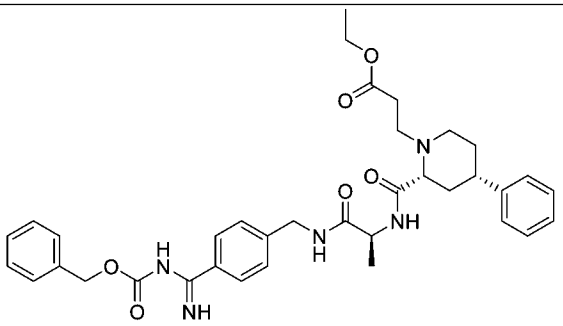
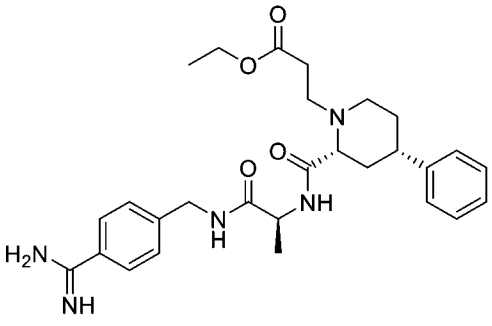
【0590】 表 4C 示例性 MASP-2 抑制性化合物

化合物編號	結構	鹽
II-1		2TFA
II-2		2TFA

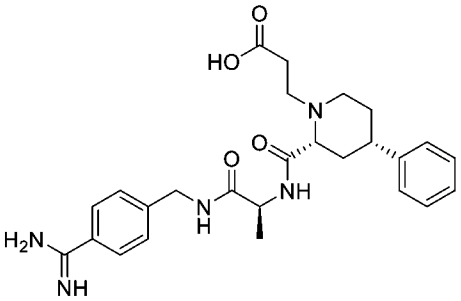
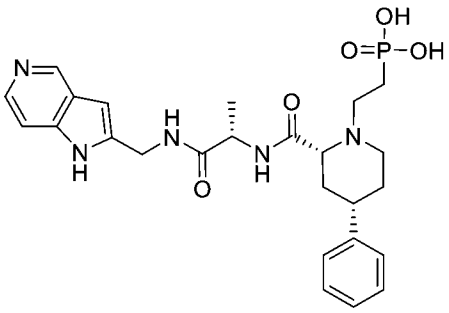
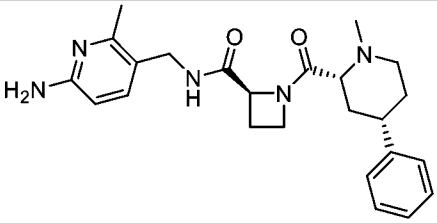
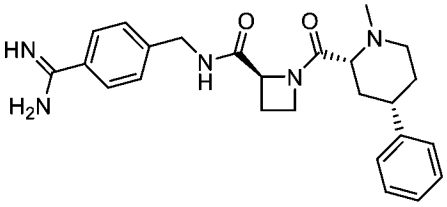
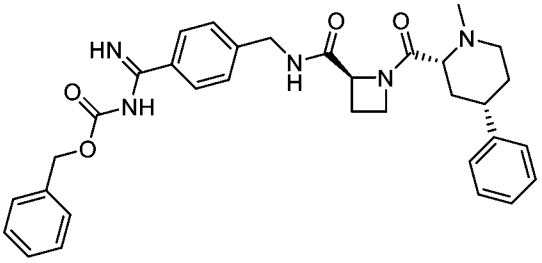
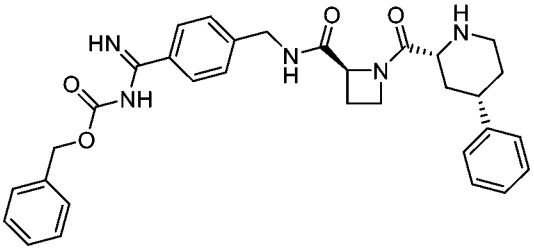
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
II-3		2TFA
II-4		2TFA
II-5		1TFA
II-6		2TFA
II-7		2HCl

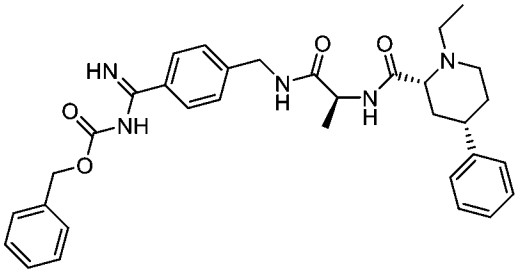
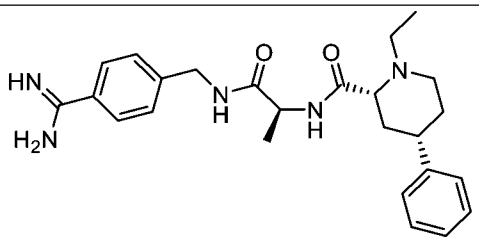
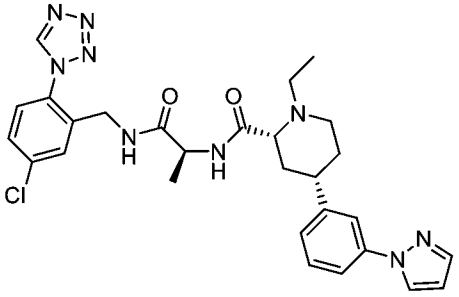
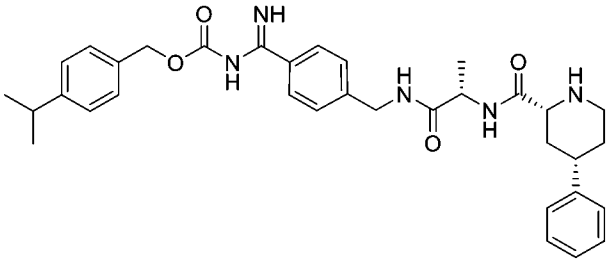
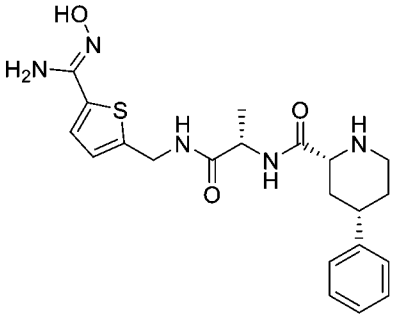
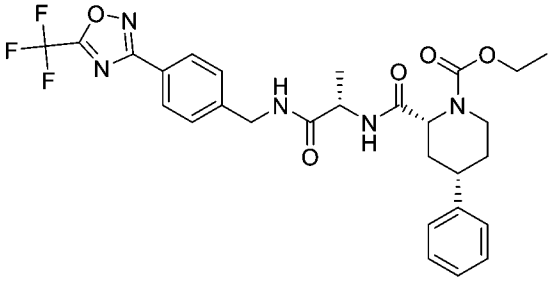
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
II-8		1TFA
II-9		1TFA
II-10		2TFA
II-11		1TFA
II-12		-
II-13		-

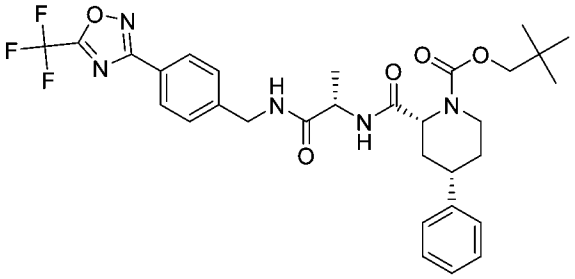
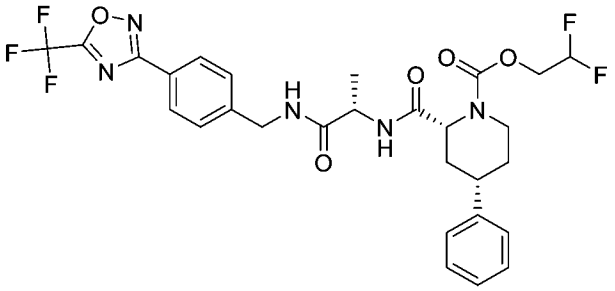
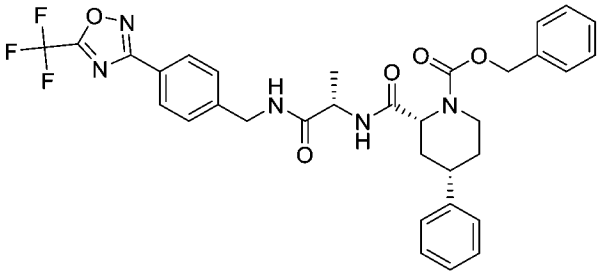
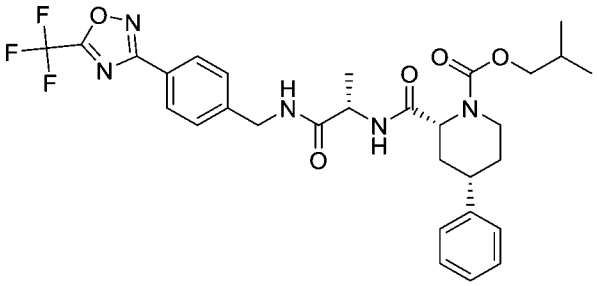
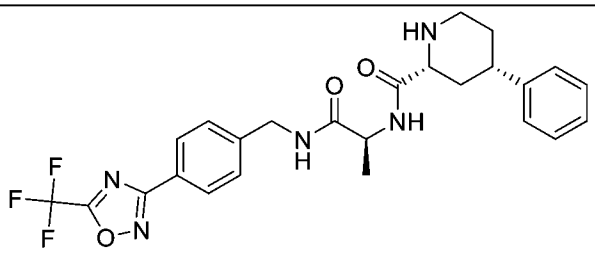
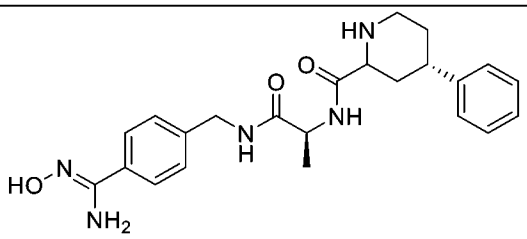
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
II-14		2TFA
II-15		2TFA
II-16		2TFA
II-17		2TFA
II-18		2TFA
II-19		2TFA

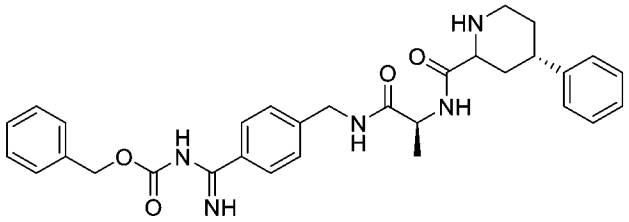
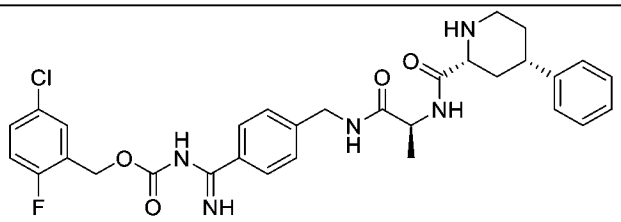
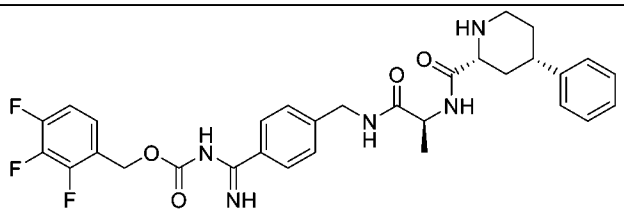
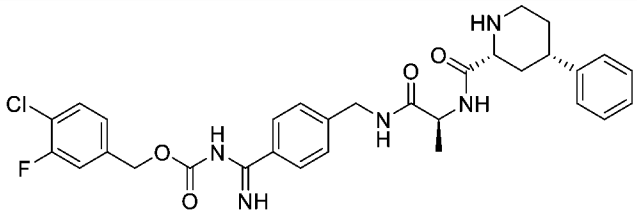
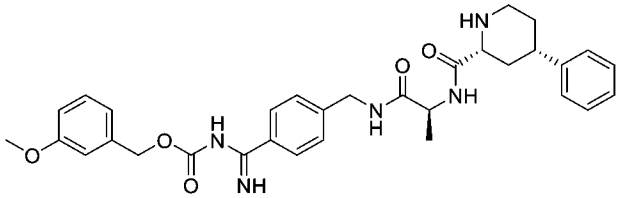
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
II-20		-
II-21		-
II-22		-
II-23		1HCl
II-24		1HCl
II-25		-

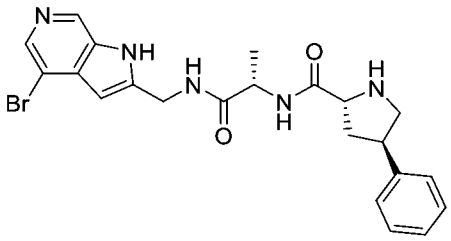
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
II-26		-
II-27		-
II-28		-
II-29		-
II-30		1TFA
II-31		2TFA

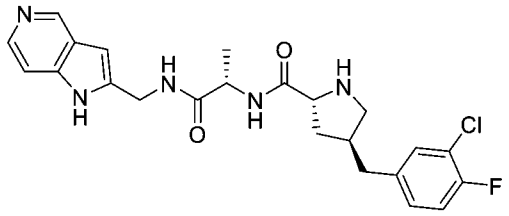
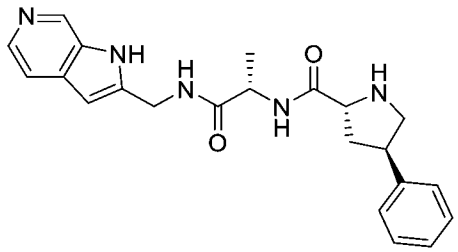
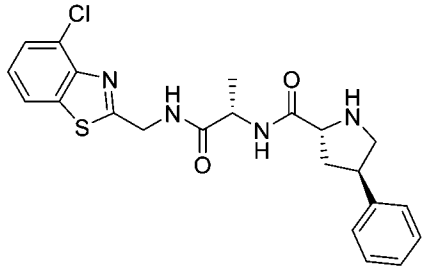
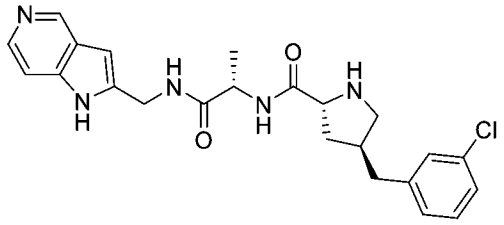
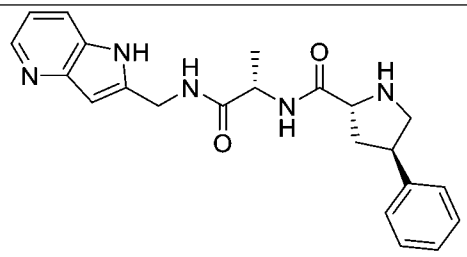
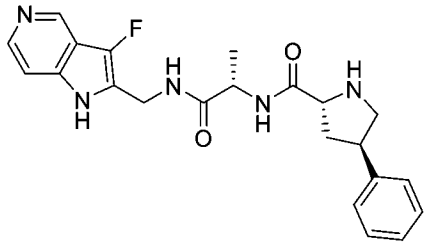
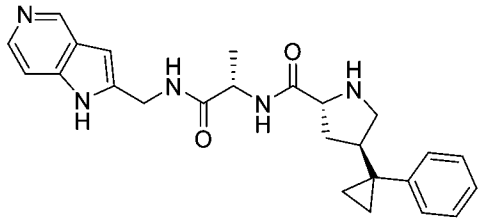
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
II-32		2TFA
II-33		2TFA
II-34		2TFA
II-35		2TFA
II-36		2TFA

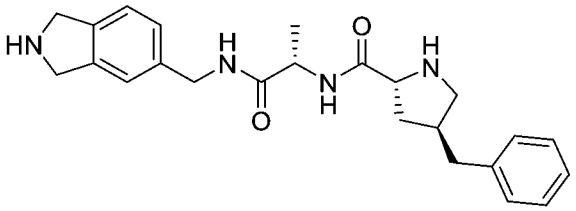
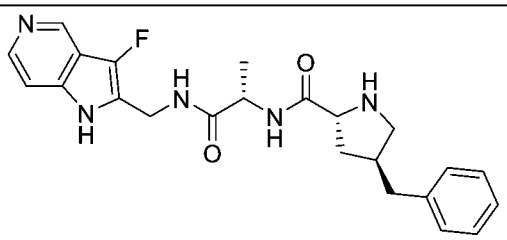
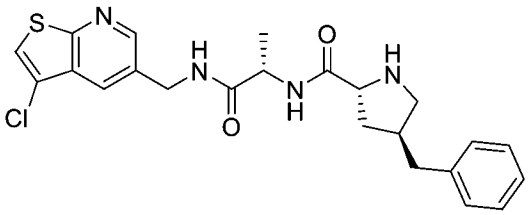
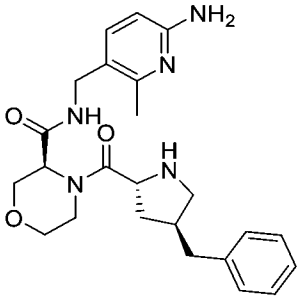
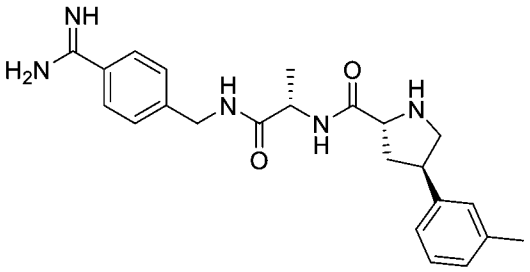
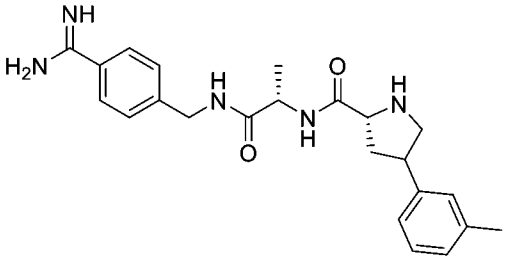
【0591】 表 4D 示例性 MASP-2 抑制性化合物

化合物編號	結構	鹽
III-1		2TFA

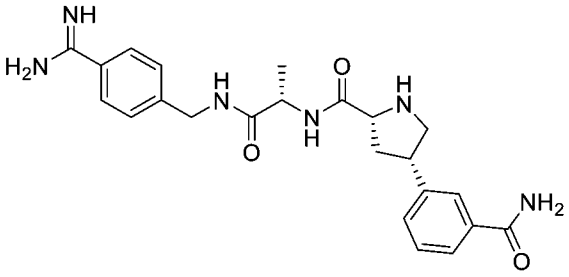
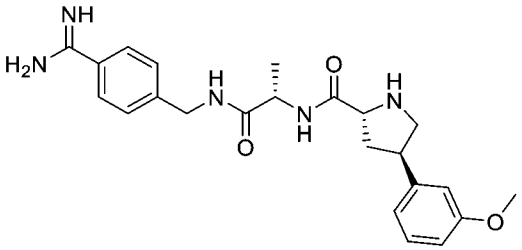
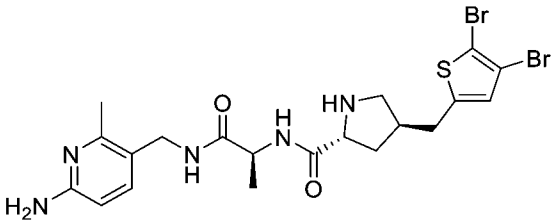
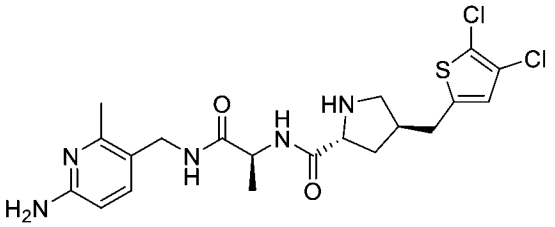
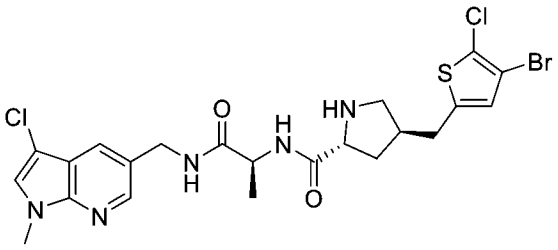
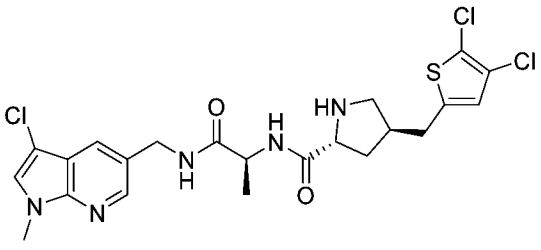
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-2		2TFA
III-3		2TFA
III-4		TFA
III-5		2TFA
III-6		2TFA
III-7		2TFA
III-8		2TFA

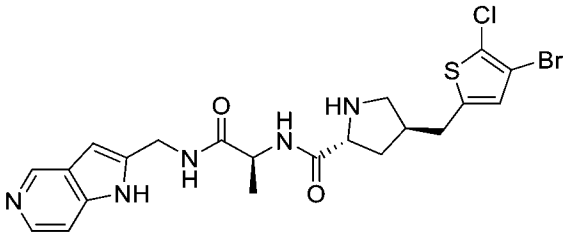
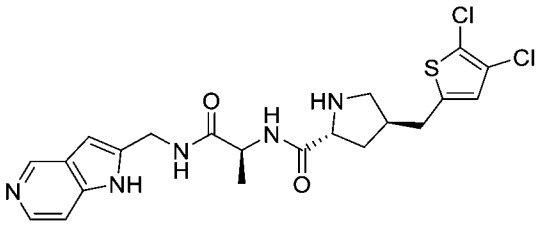
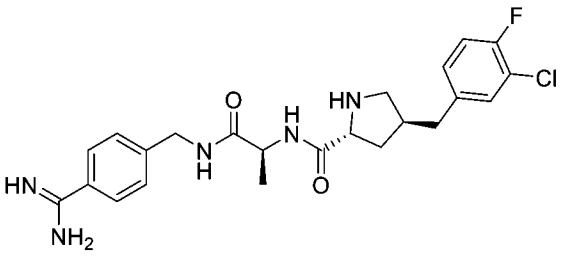
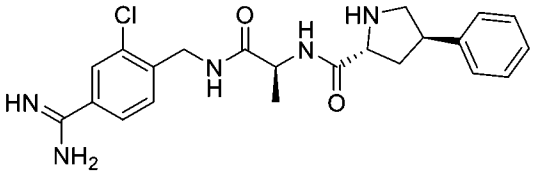
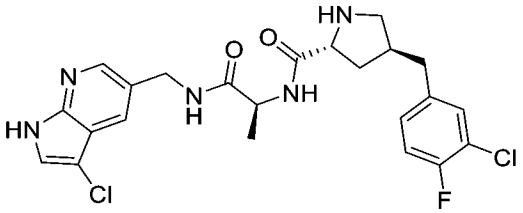
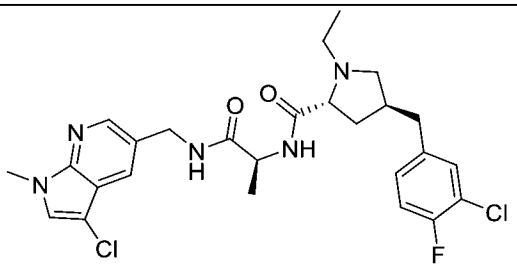
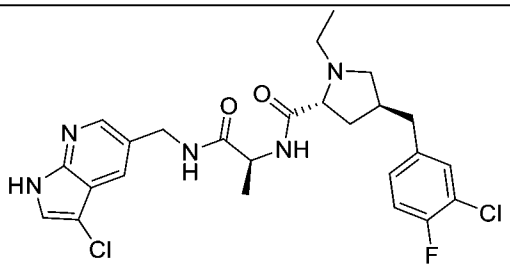
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-9		2TFA
III-10		2TFA
III-11		TFA
III-12		2TFA
III-13		-
III-14		-

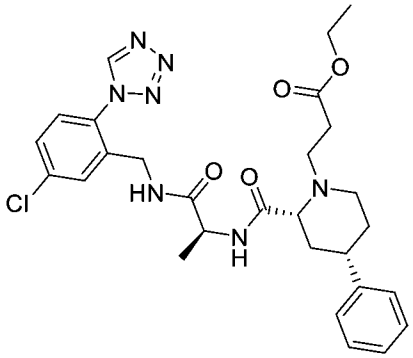
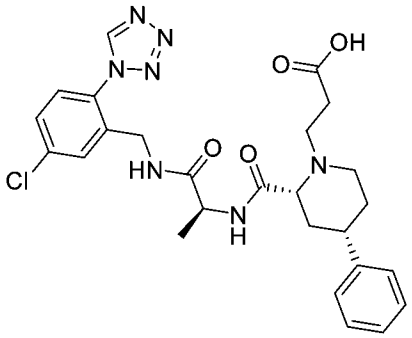
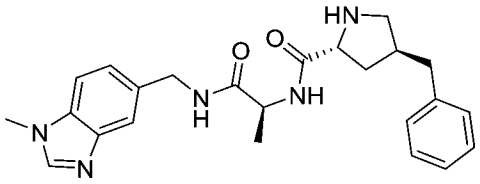
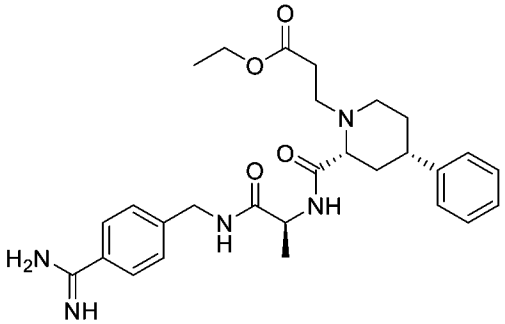
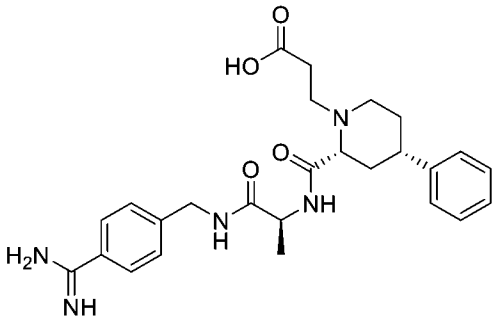
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-15		2TFA
III-16		2HCl
III-17		2TFA
III-18		2TFA
III-19		TFA
III-20		TFA

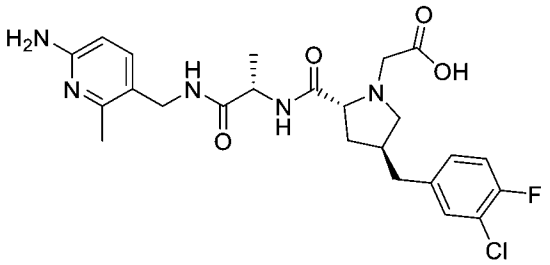
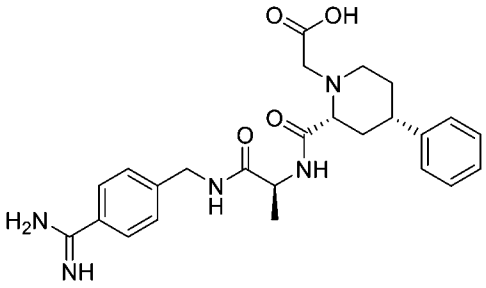
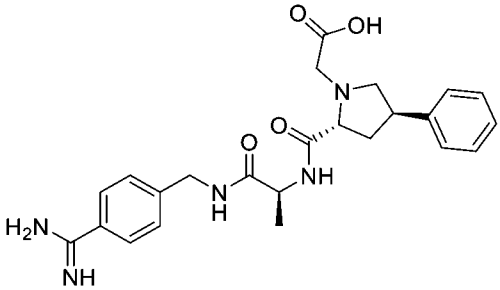
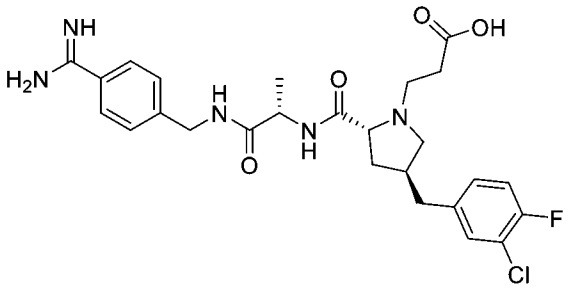
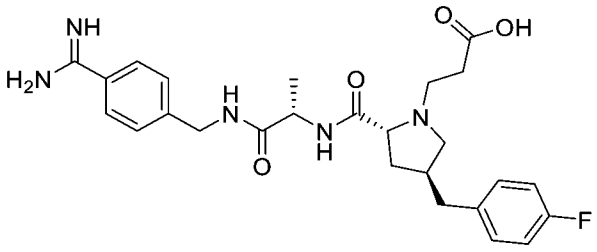
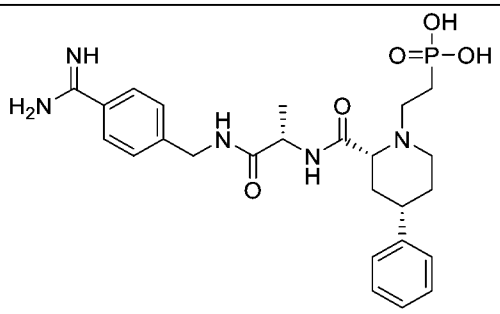
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-21		2TFA
III-22		2TFA
III-23		2TFA
III-24		2TFA
III-25		2TFA
III-26		-
III-27		-

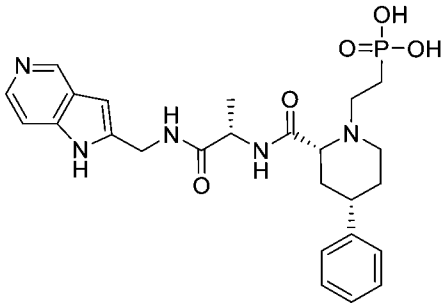
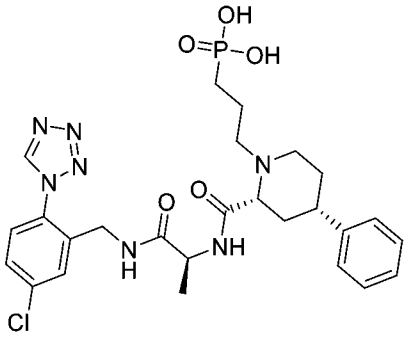
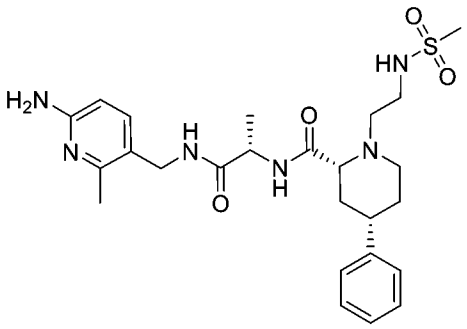
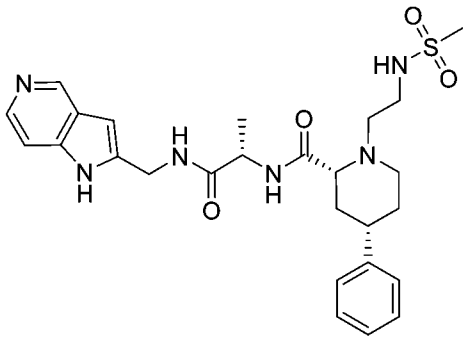
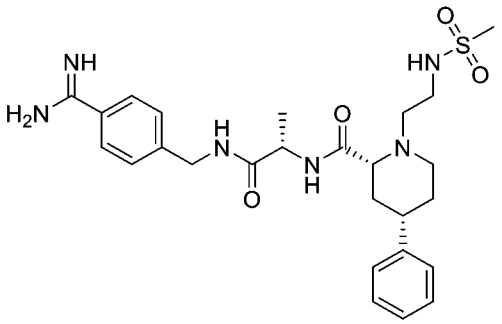
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-28		-
III-29		TFA
III-30		TFA
III-31		-
III-32		2TFA

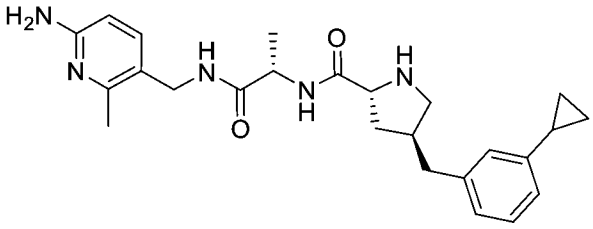
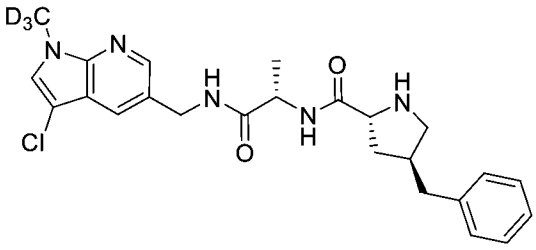
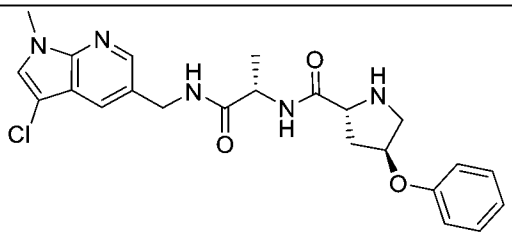
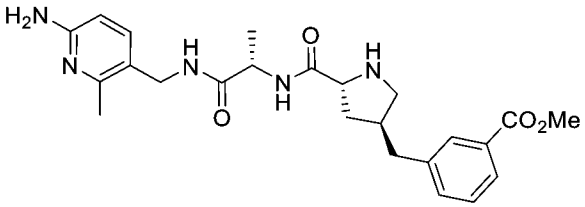
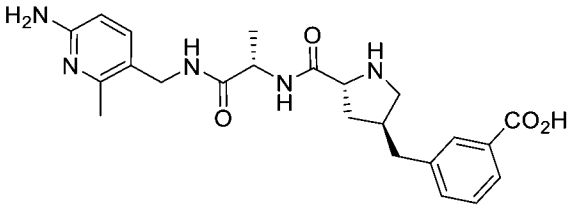
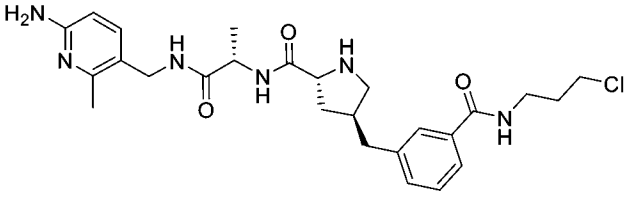
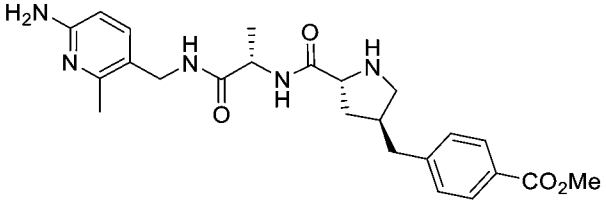
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-33		2TFA
III-34		2TFA
III-35		2TFA
III-36		2TFA
III-37		2TFA
III-38		2TFA

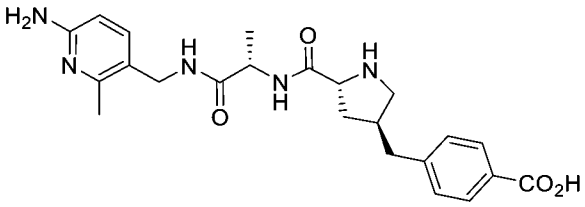
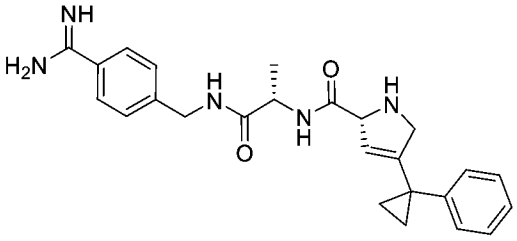
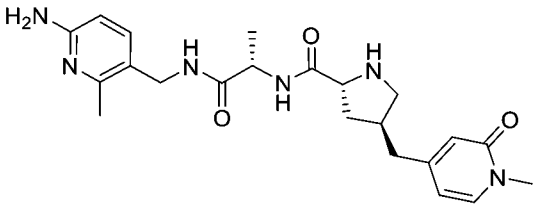
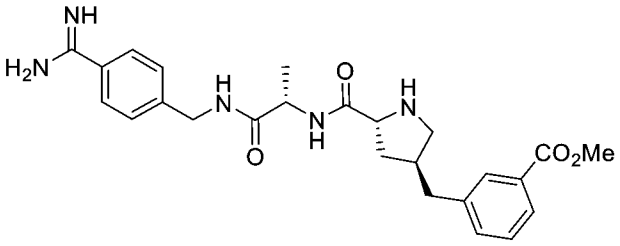
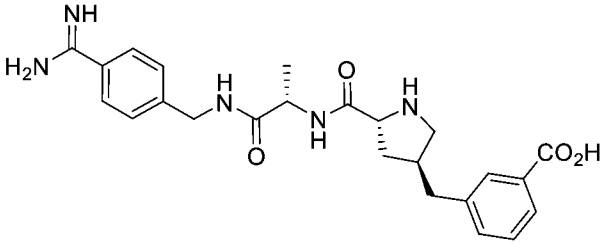
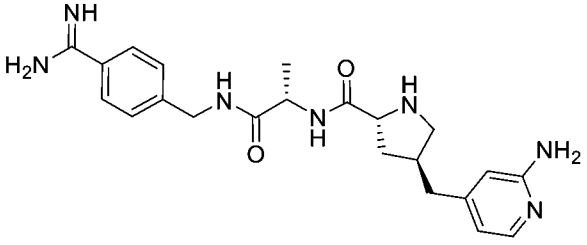
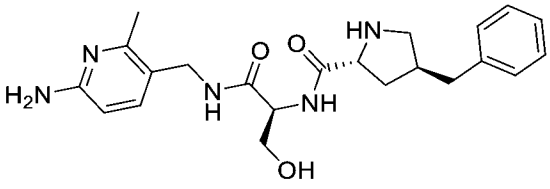
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-39		2TFA
III-40		2TFA
III-41		2TFA
III-42		2TFA
III-43		2TFA

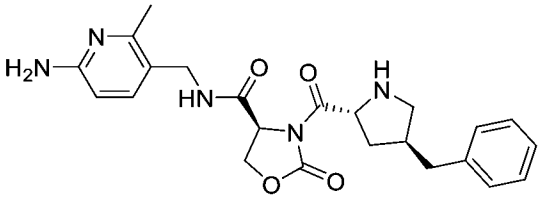
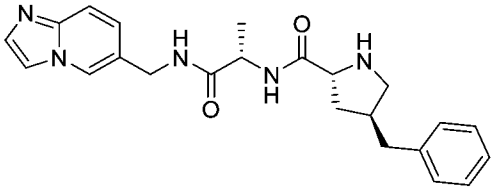
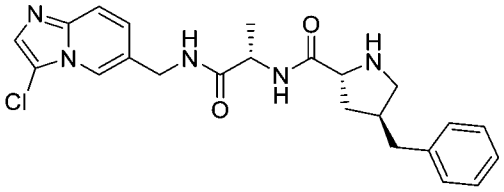
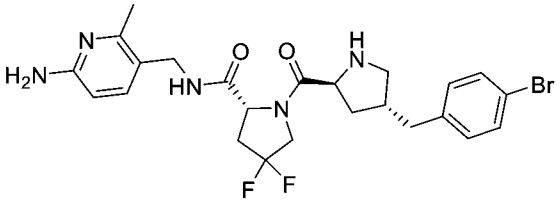
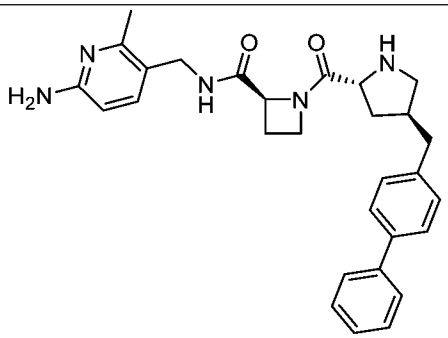
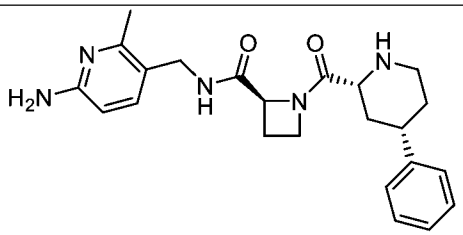
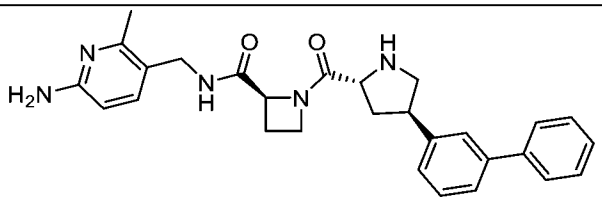
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-44		2TFA
III-45		HCl
III-46		TFA
III-47		2HCl
III-48		2TFA
III-49		2TFA
III-50		2HCl

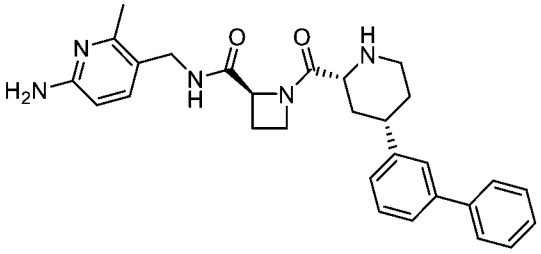
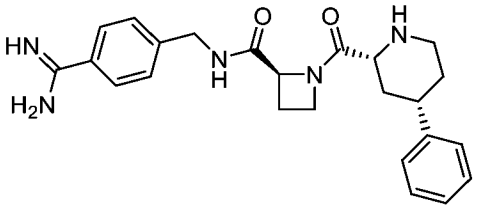
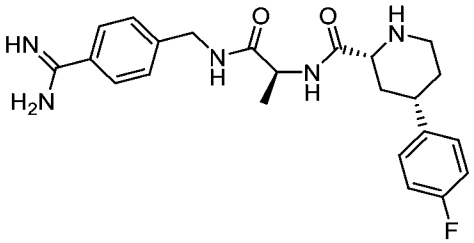
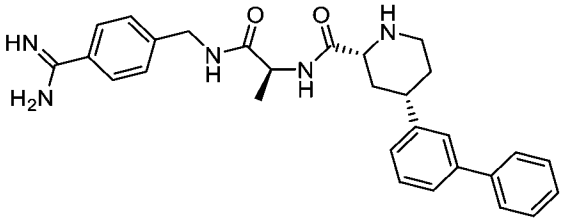
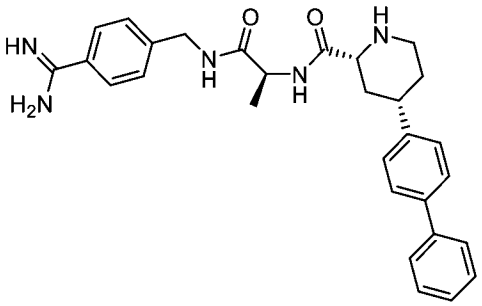
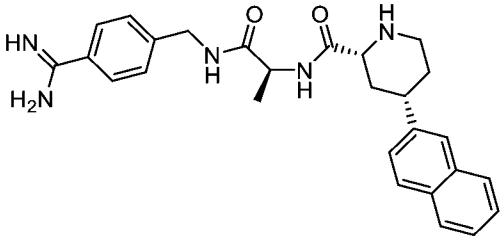
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-51		2TFA
III-52		2HCl
III-53		2TFA
III-54		2TFA
III-55		2TFA
III-56		2TFA
III-57		2HCl

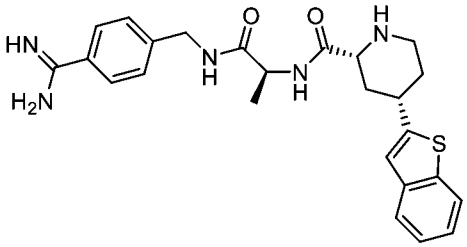
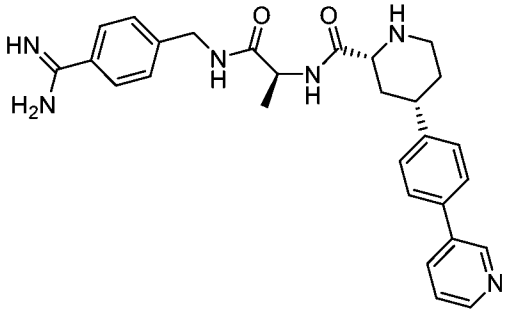
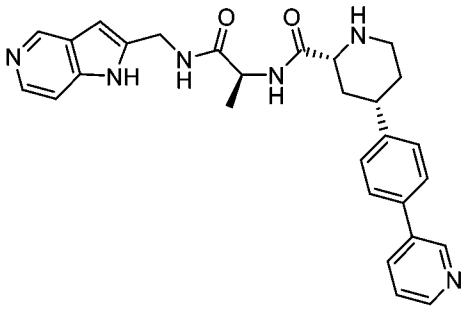
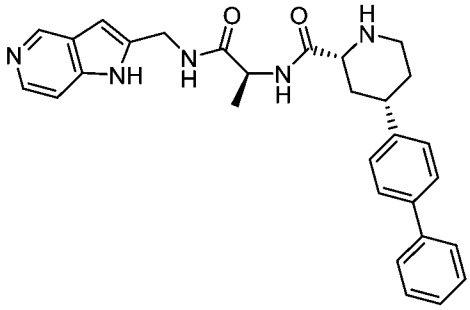
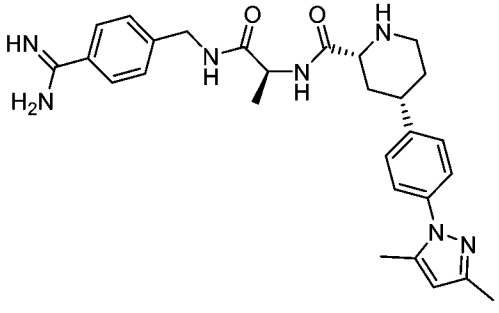
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-58		2TFA
III-59		TFA
III-60		HCl
III-61		2HCl
III-62		2TFA
III-63		2TFA
III-64		2TFA

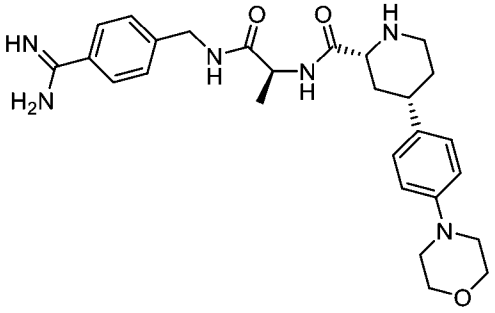
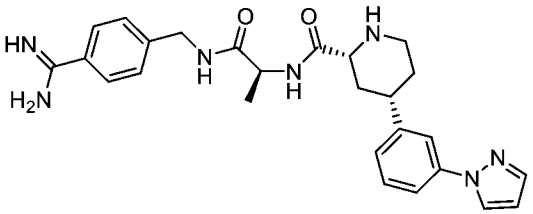
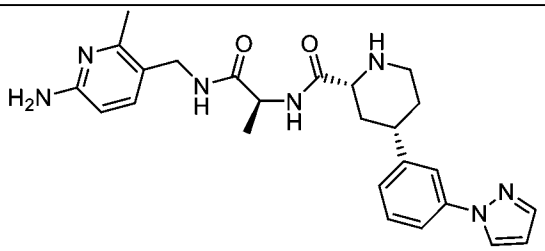
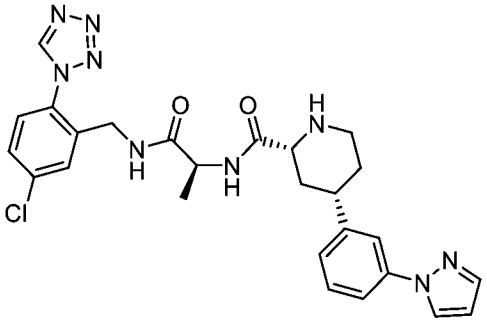
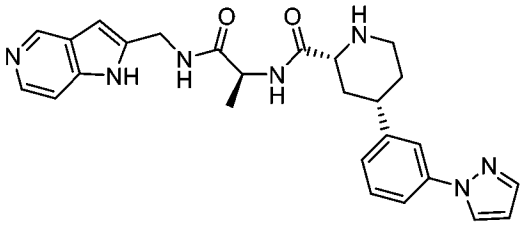
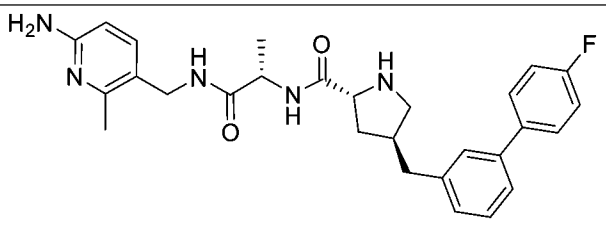
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-65		2TFA
III-66		2TFA
III-67		2TFA
III-68		2TFA
III-69		2TFA
III-70		2TFA

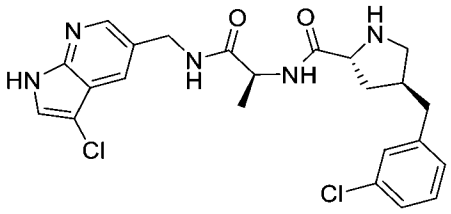
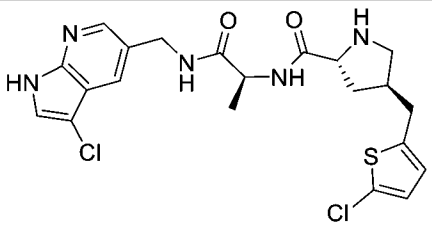
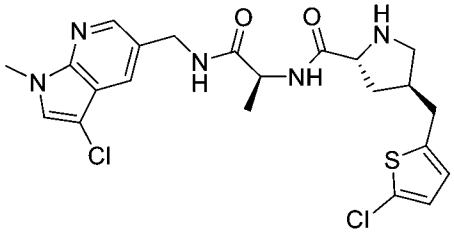
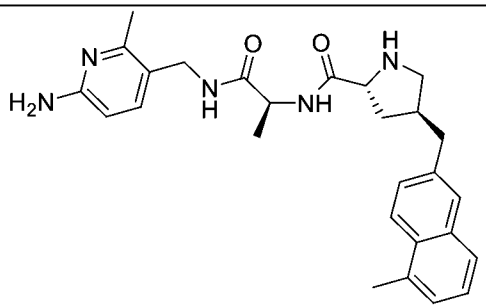
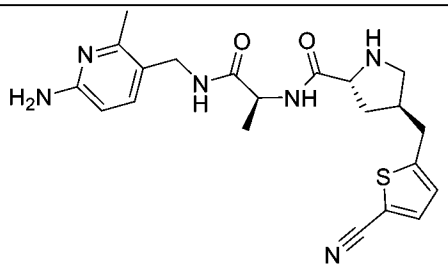
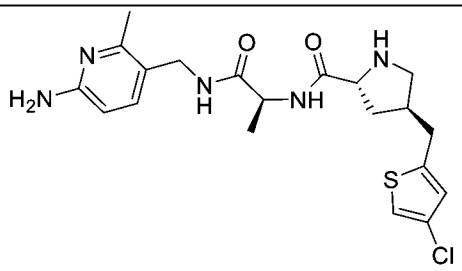
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-71		2TFA
III-72		2TFA
III-73		2TFA
III-74		2TFA
III-75		2HCl

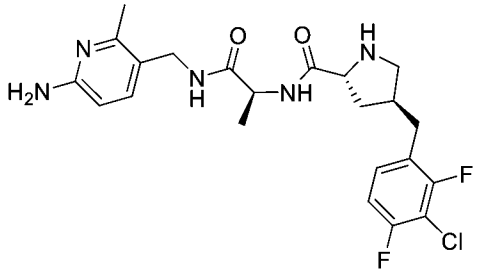
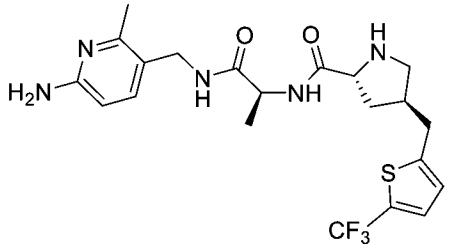
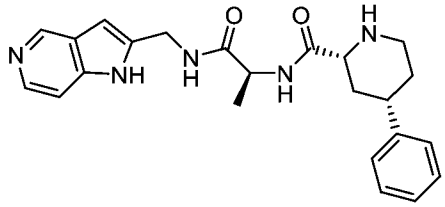
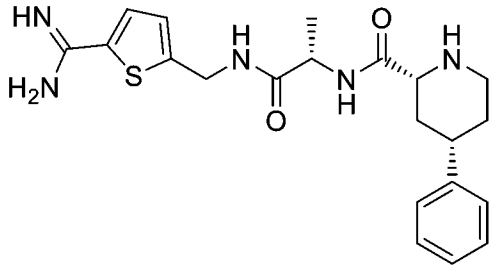
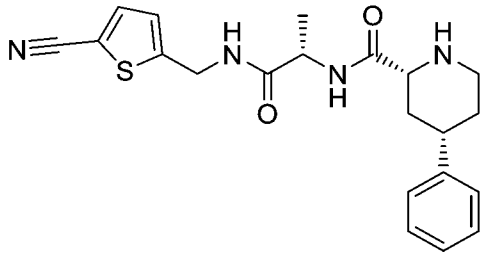
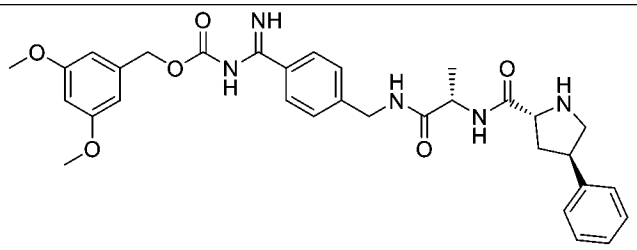
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-76		2HCl
III-77		2HCl
III-78		2HCl
III-79		HCl
III-80		2HCl
III-81		2TFA

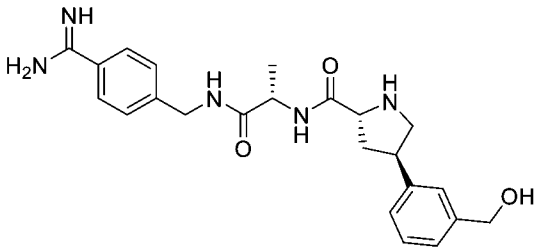
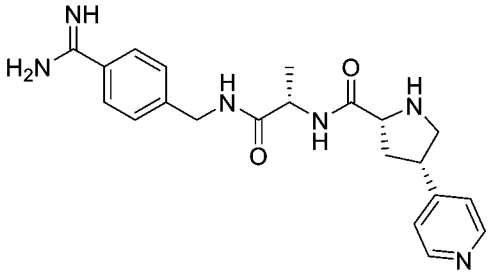
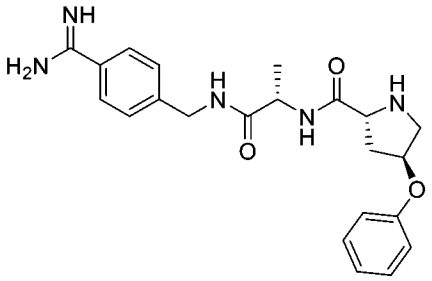
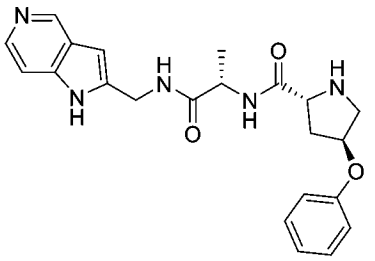
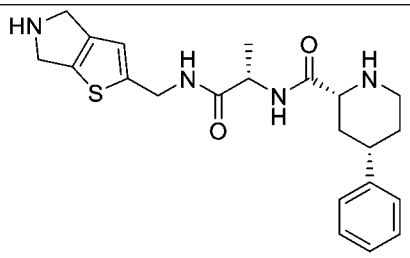
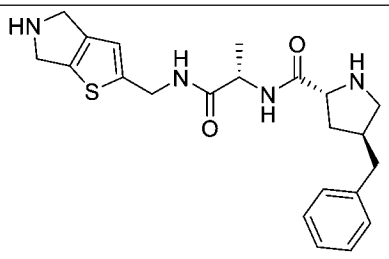
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-82		2HCl
III-83		2HCl
III-84		2HCl
III-85		2HCl
III-86		2HCl
III-87		2HCl

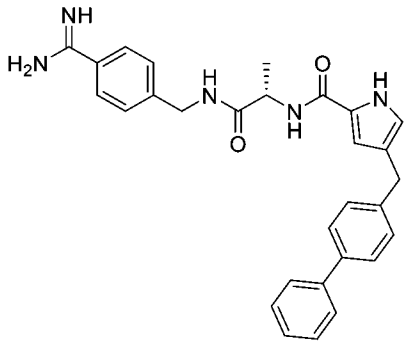
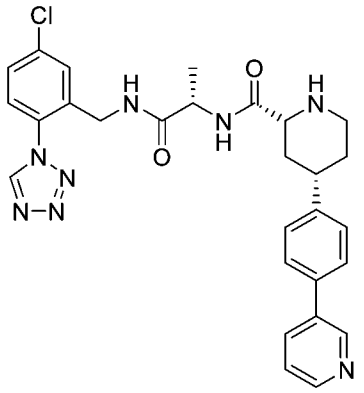
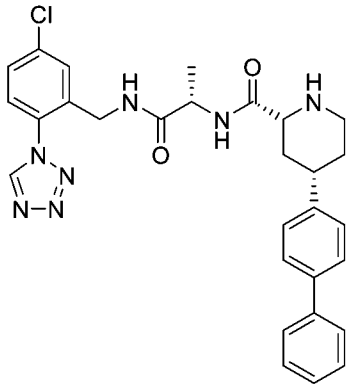
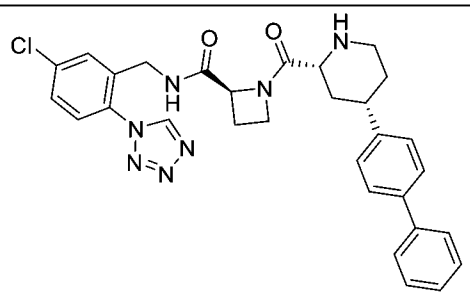
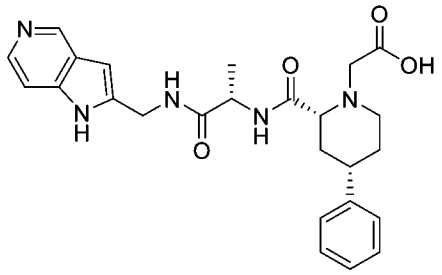
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-88		2HCl
III-89		2HCl
III-90		2TFA
III-91		2TFA
III-92		HCl
III-93		-

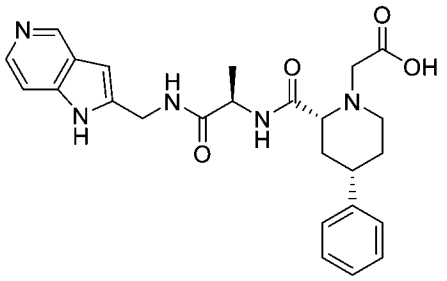
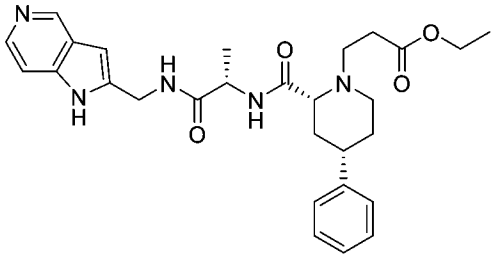
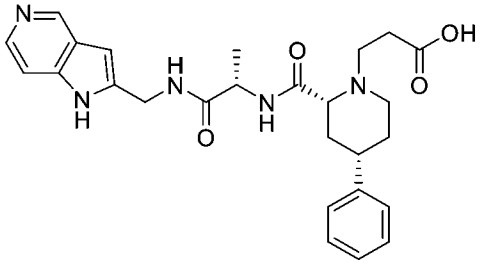
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-94		2TFA
III-95		2TFA
III-96		2TFA
III-97		2TFA
III-98		2TFA
III-99		2TFA

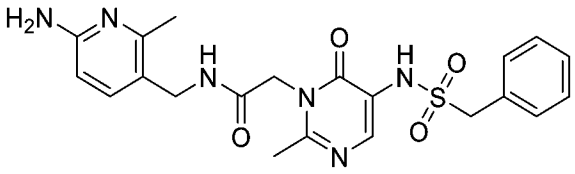
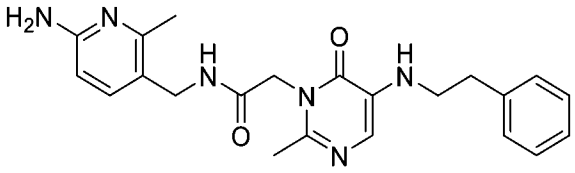
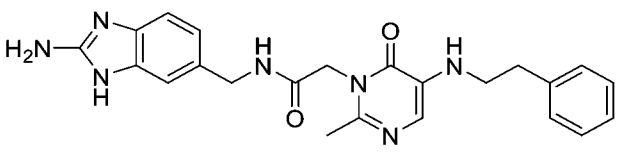
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-100		TFA
III-101		TFA
III-102		TFA
III-103		TFA
III-104		2TFA

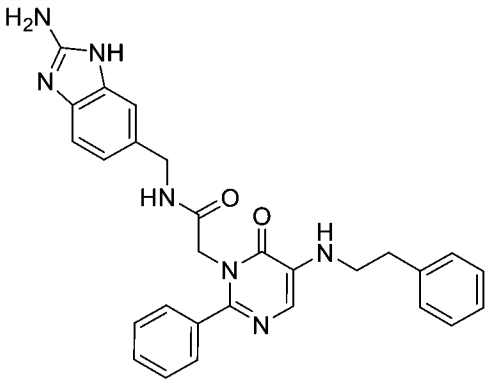
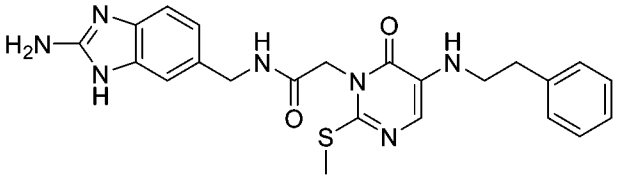
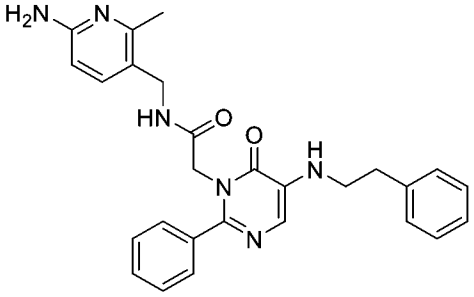
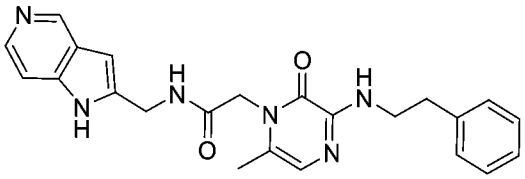
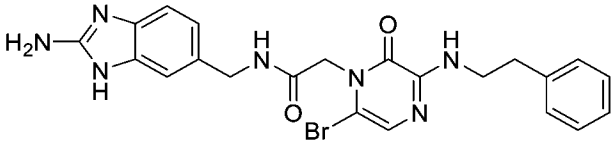
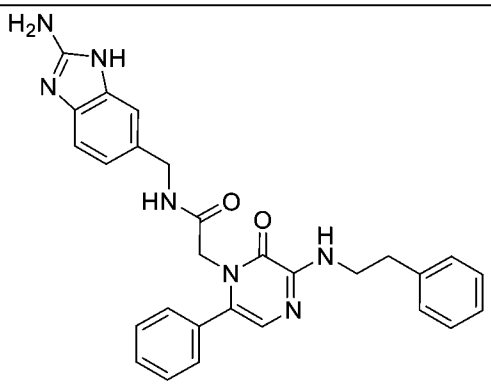
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
III-105		2TFA
III-106		-
III-107		2TFA

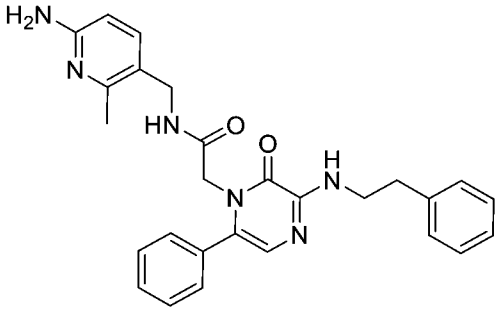
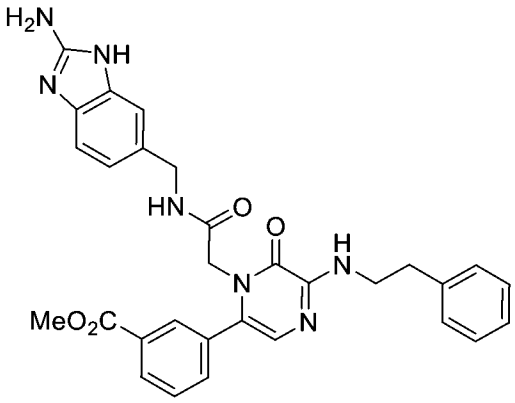
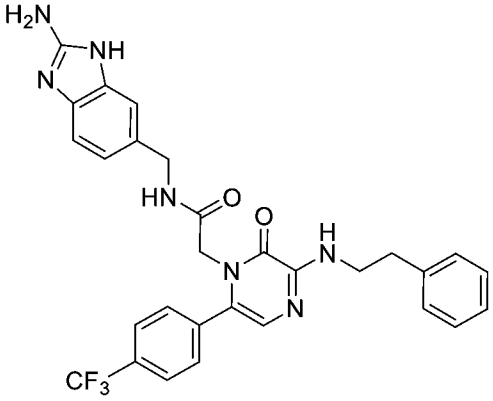
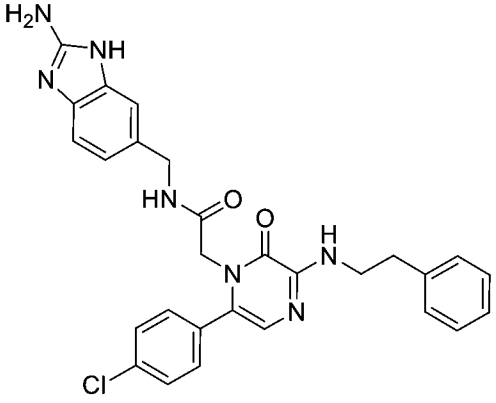
【0592】 表 4E 示例性 MASP-2 抑制性化合物

化合物編號	結構	鹽
IV-1		TFA
IV-2		TFA
IV-3		TFA

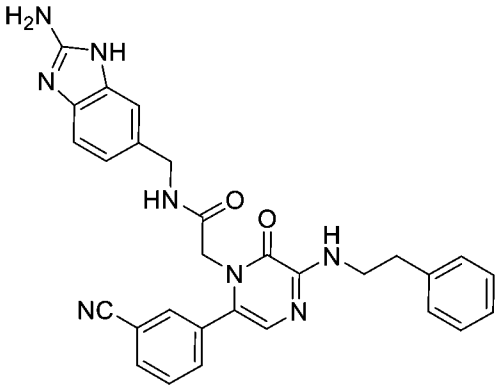
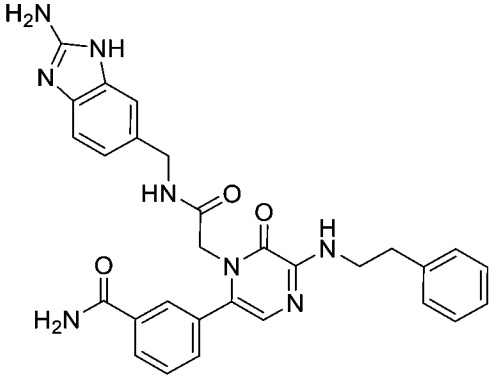
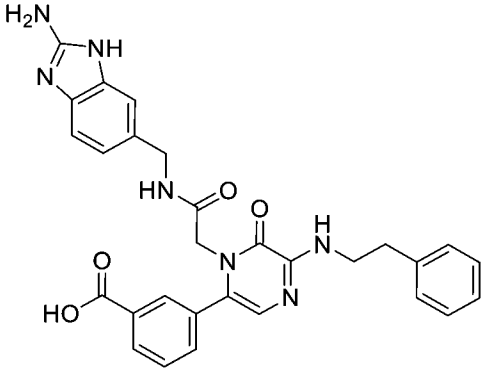
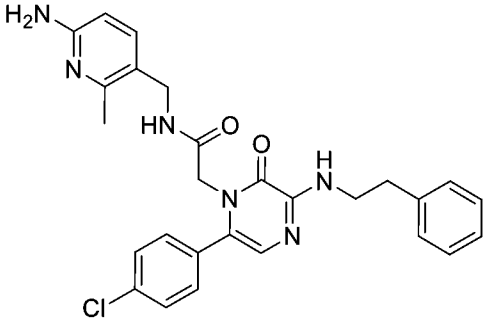
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-4		TFA
IV-5		-
IV-6		-
IV-7		-
IV-8		-
IV-9		-

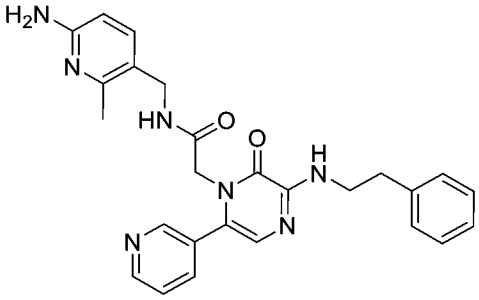
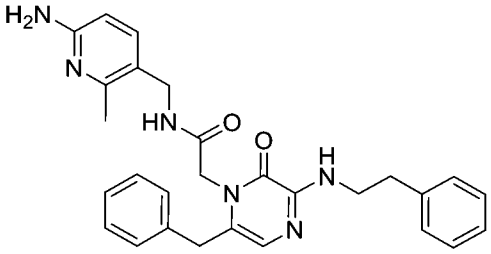
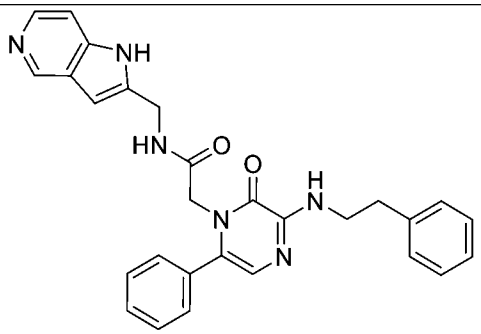
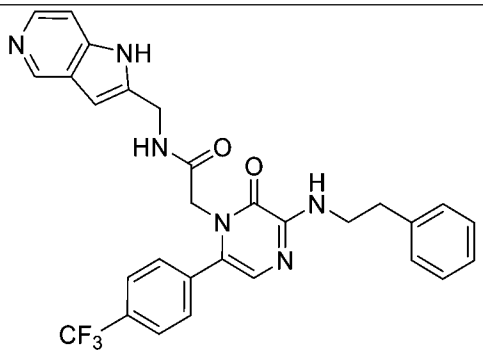
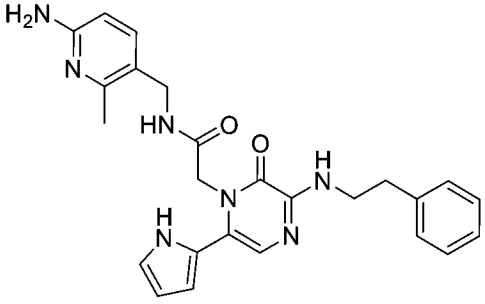
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-10		-
IV-11		-
IV-12		TFA
IV-13		TFA

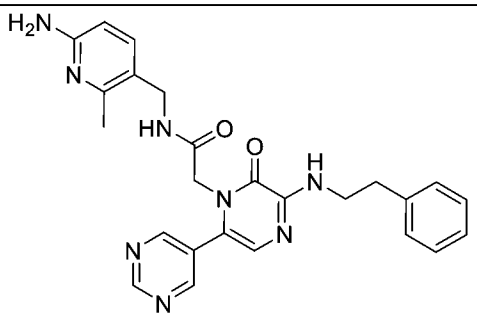
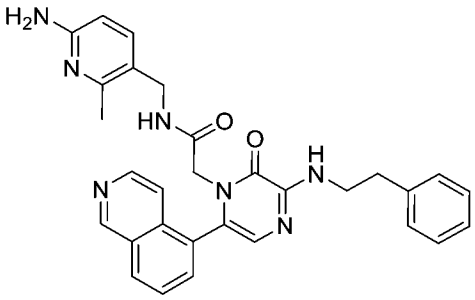
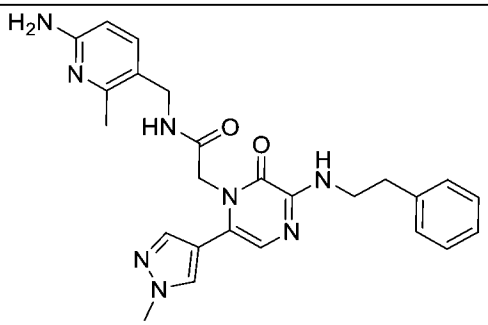
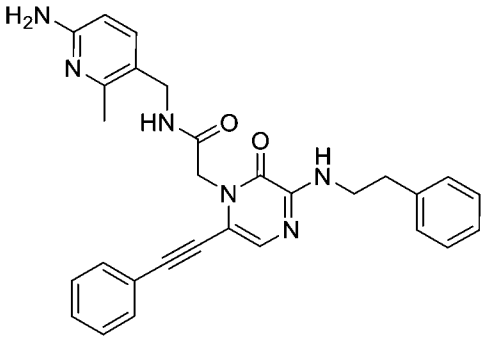
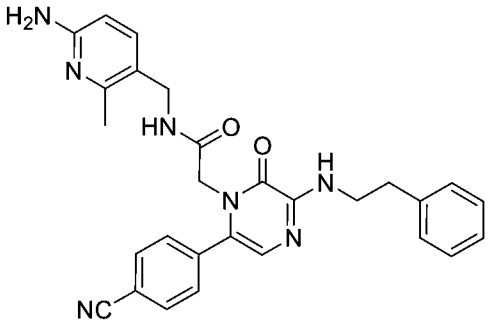
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-14		-
IV-15		TFA
IV-16		TFA
IV-17		TFA

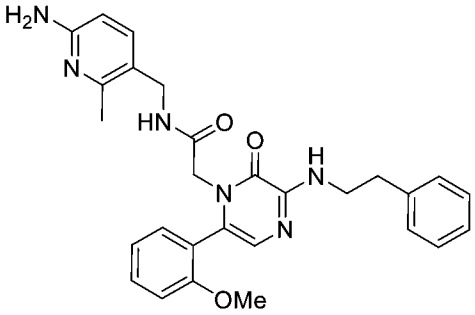
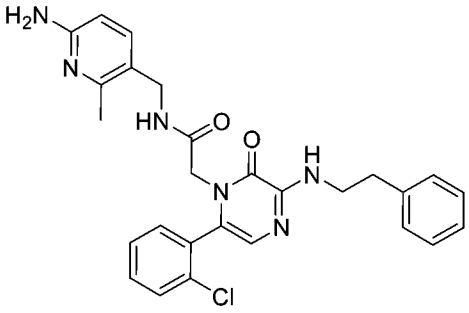
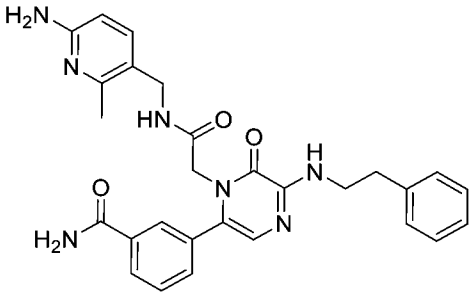
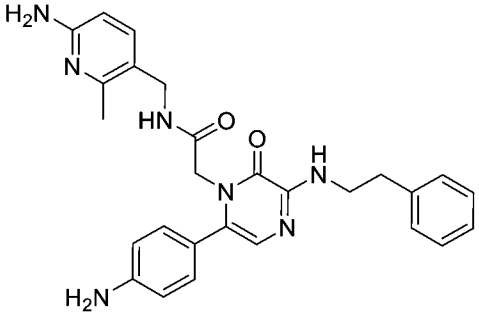
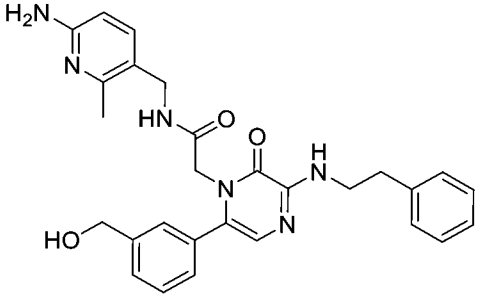
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-18		2TFA
IV-19		TFA
IV-20		TFA
IV-21		TFA
IV-22		-

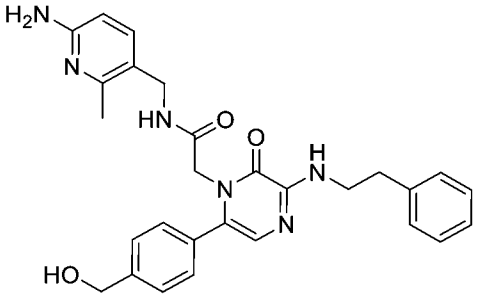
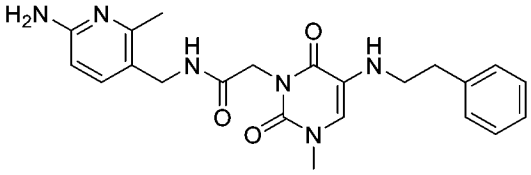
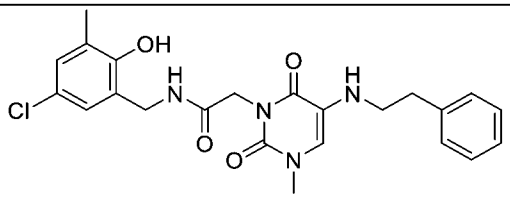
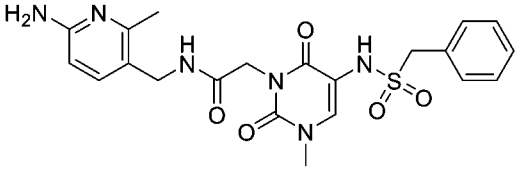
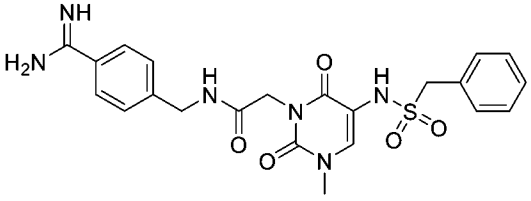
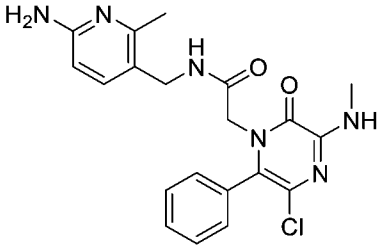
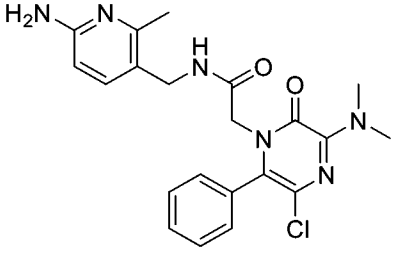
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-23		-
IV-24		-
IV-25		-
IV-26		-
IV-27		-

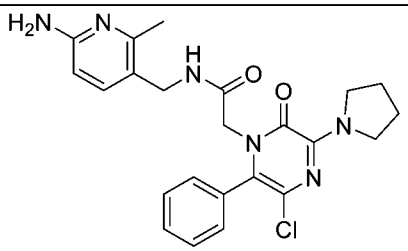
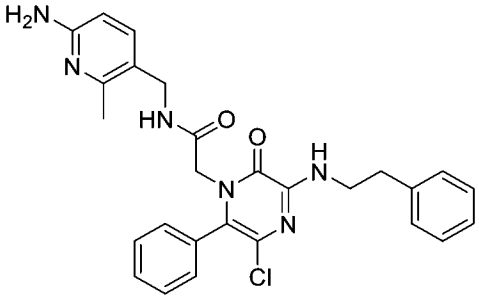
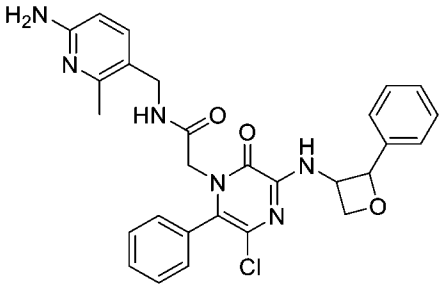
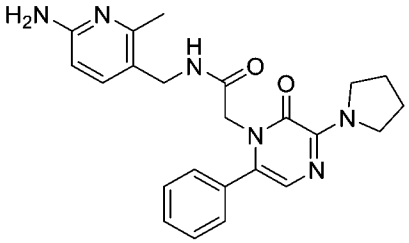
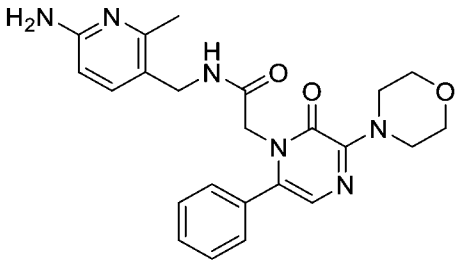
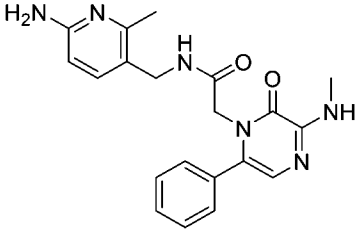
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-28		HCl
IV-29		-
IV-30		HCl
IV-31		-
IV-32		-

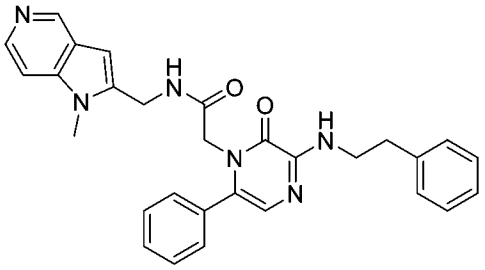
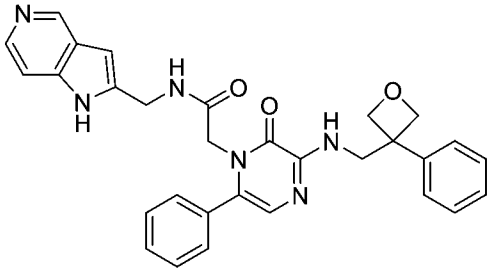
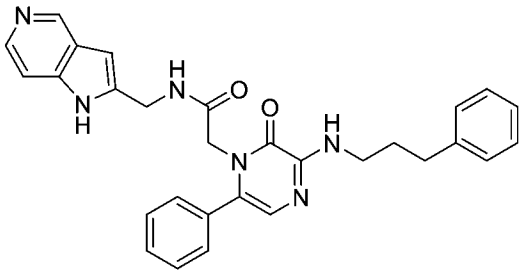
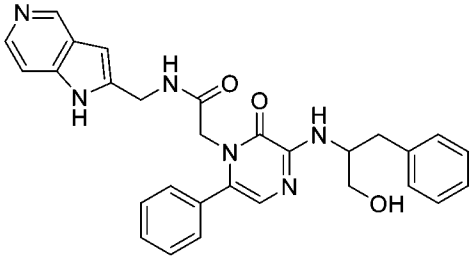
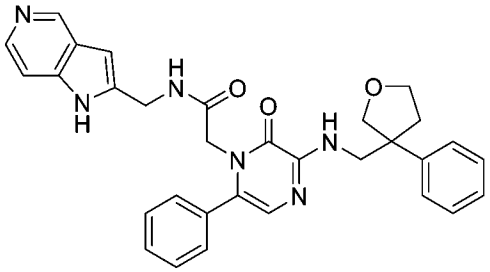
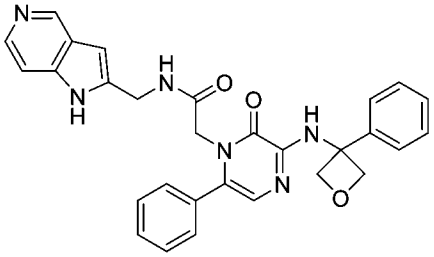
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-33		-
IV-34		-
IV-35		TFA
IV-36		TFA
IV-37		TFA
IV-38		-
IV-39		-

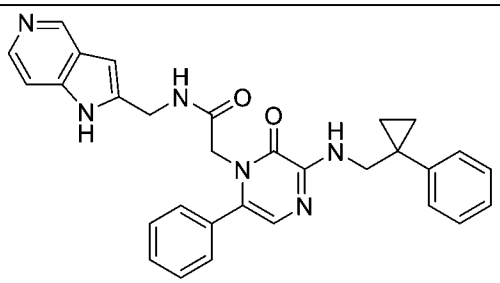
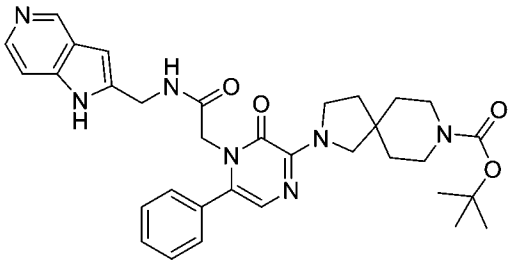
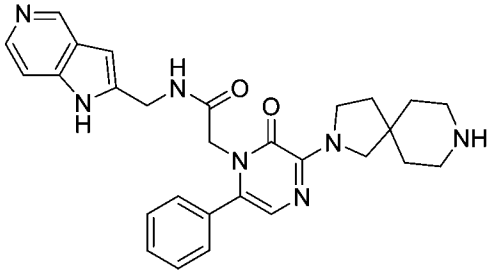
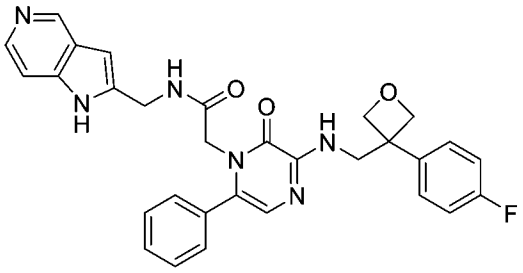
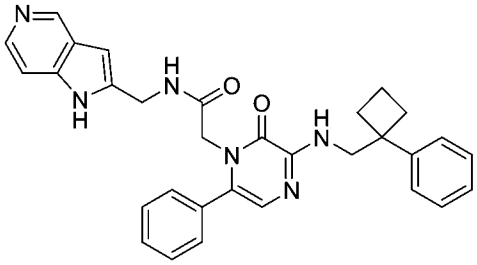
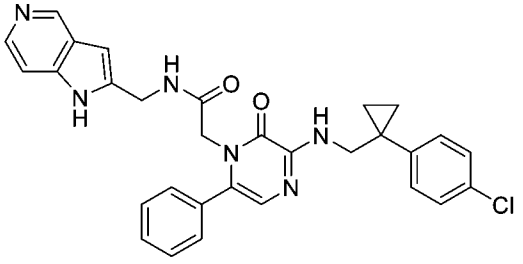
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-40		-
IV-41		-
IV-42		-
43		-
IV-44		-
IV-45		-

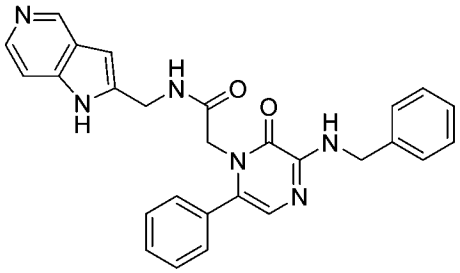
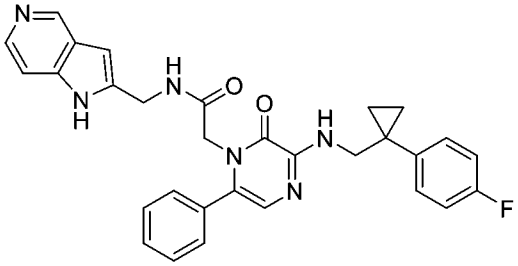
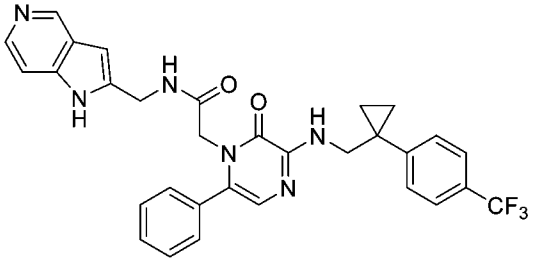
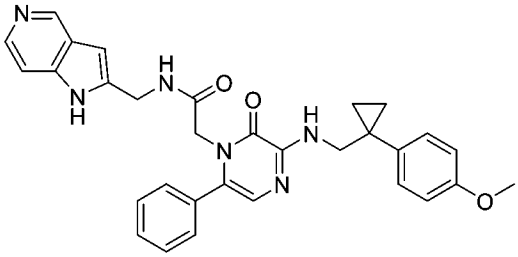
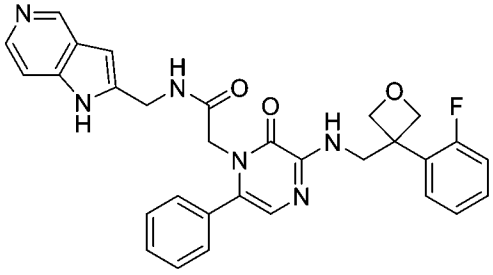
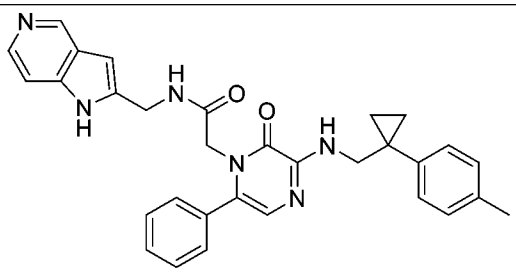
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-46		TFA
IV-47		TFA
IV-48		TFA
IV-49		TFA
IV-50		TFA
IV-51		TFA

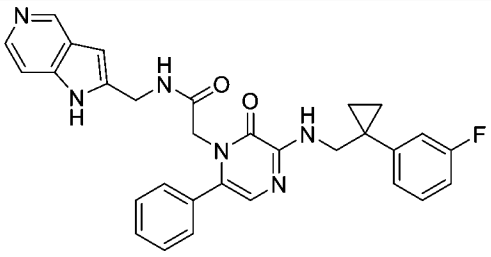
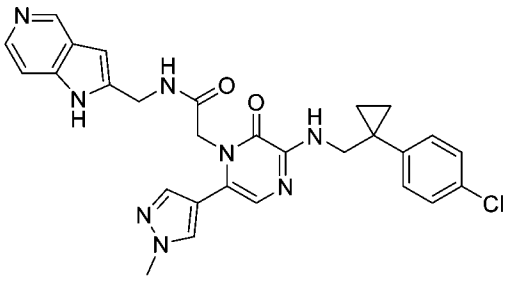
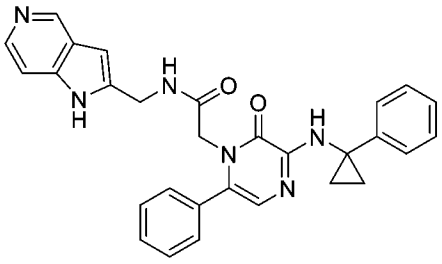
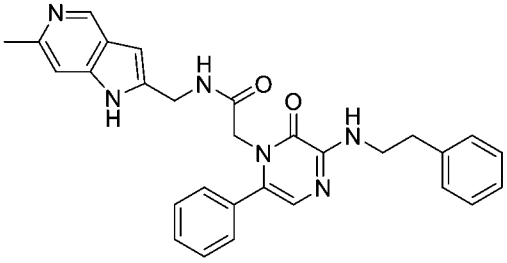
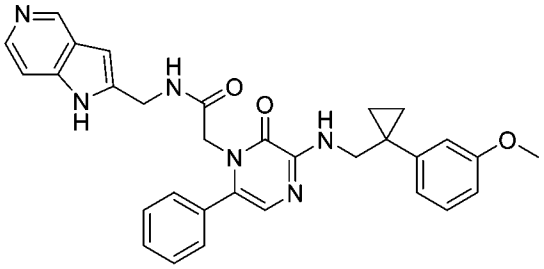
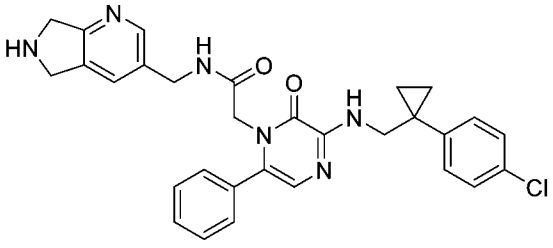
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-52		TFA
IV-53		-
IV-54		2TFA
IV-55		TFA
IV-56		TFA
IV-57		TFA

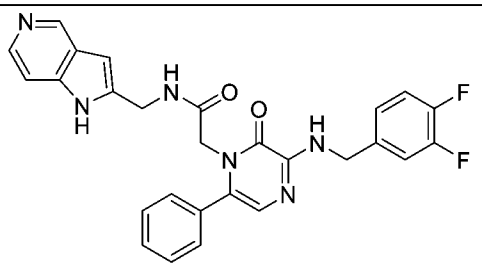
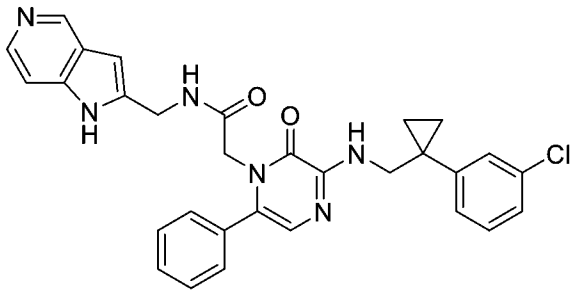
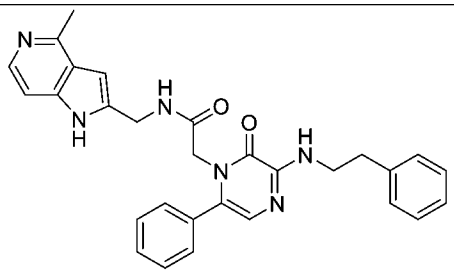
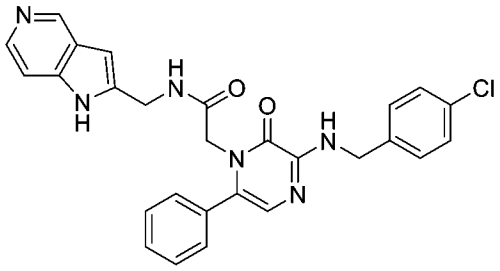
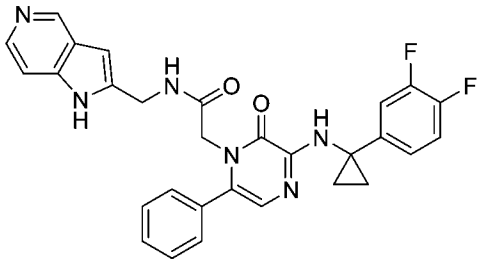
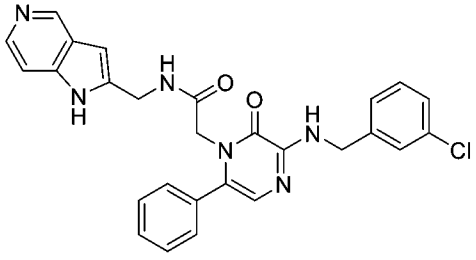
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-58		TFA
IV-59		TFA
IV-60		TFA
IV-61		TFA
IV-62		TFA
IV-63		TFA

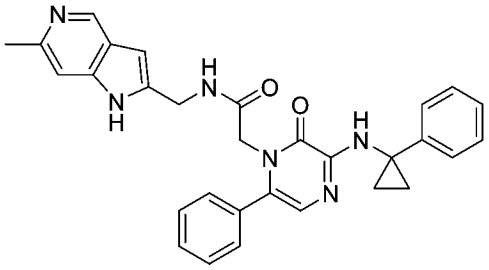
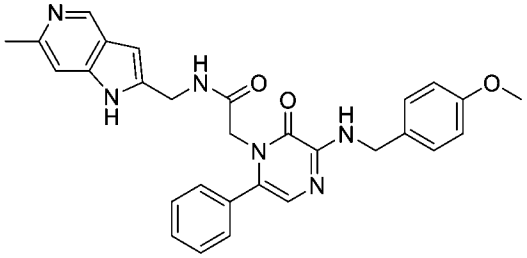
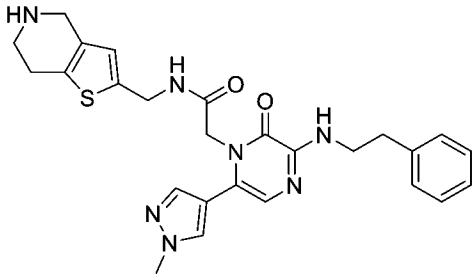
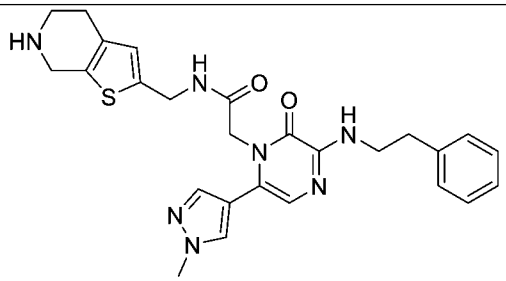
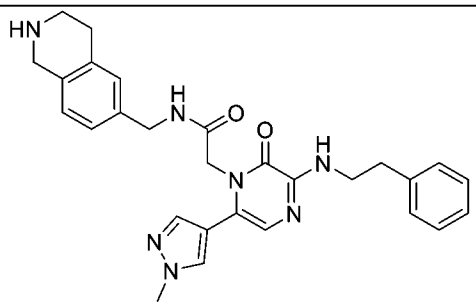
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-64		-
IV-65		TFA
IV-66		TFA
IV-67		TFA
IV-68		TFA
IV-69		TFA

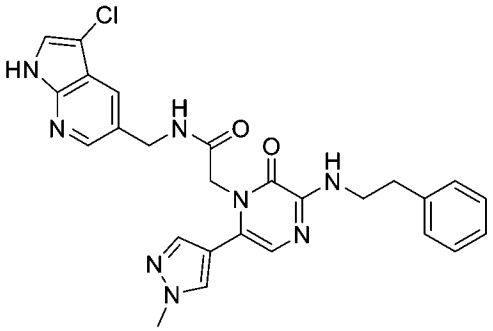
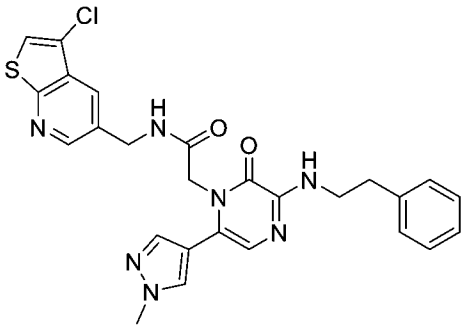
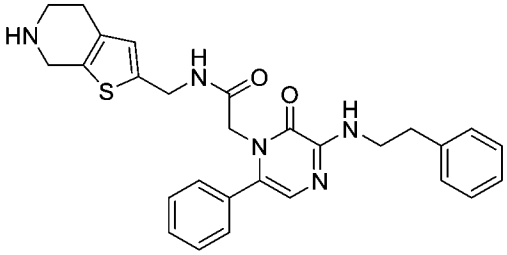
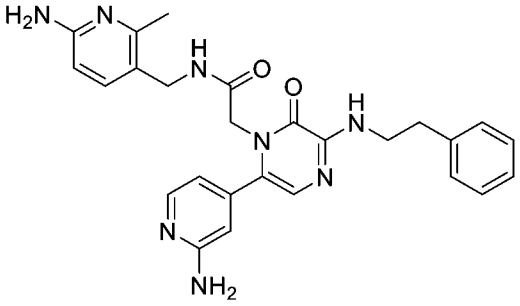
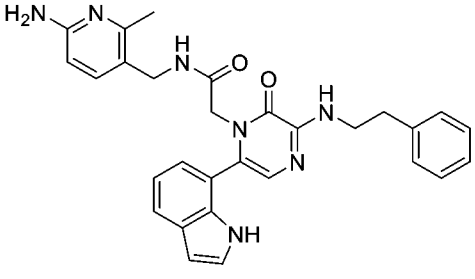
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-70		TFA
IV-71		TFA
IV-72		TFA
IV-73		TFA
IV-74		TFA
IV-75		TFA

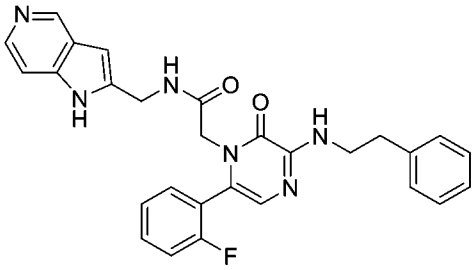
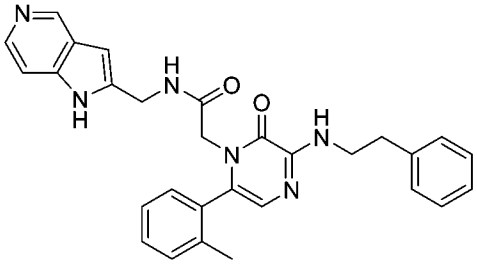
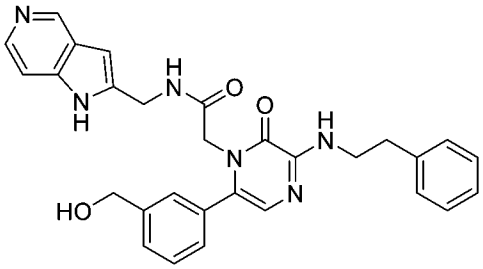
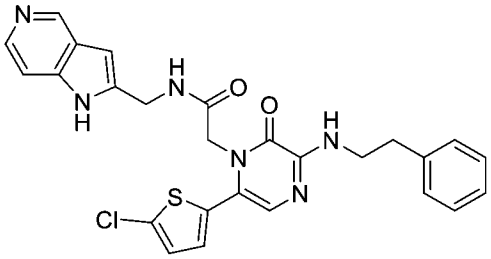
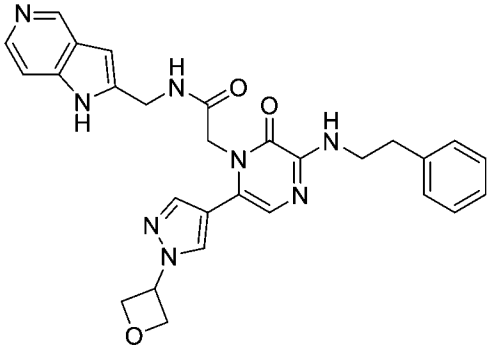
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-76		TFA
IV-77		TFA
IV-78		-
IV-79		-
IV-80		-

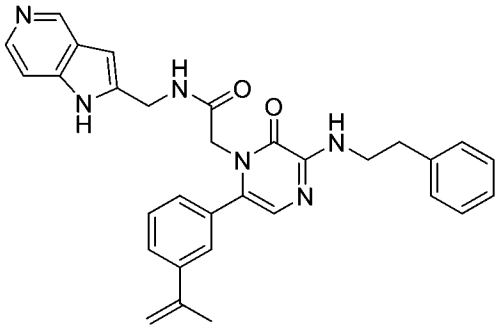
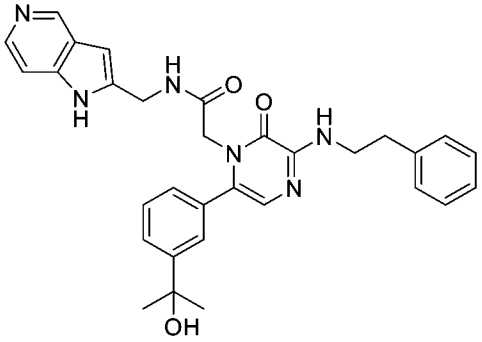
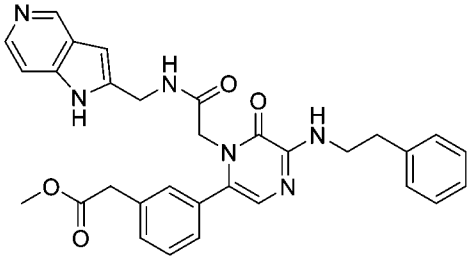
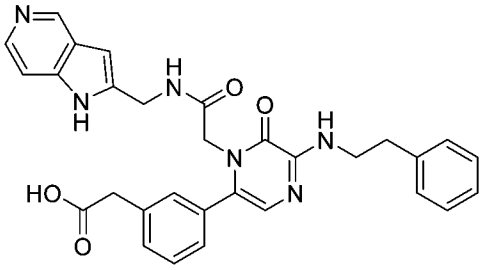
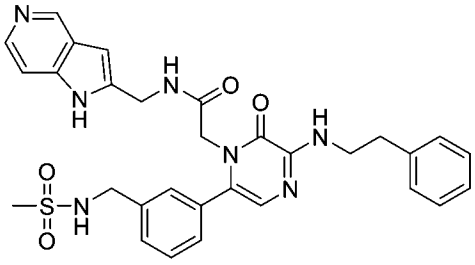
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-81		-
IV-82		-
IV-83		-
IV-84		-
IV-85		TFA

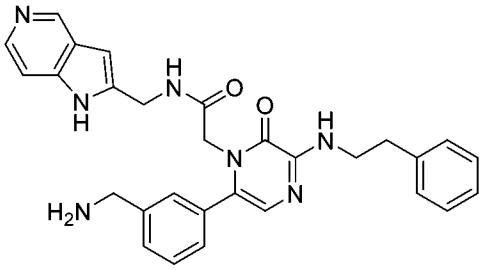
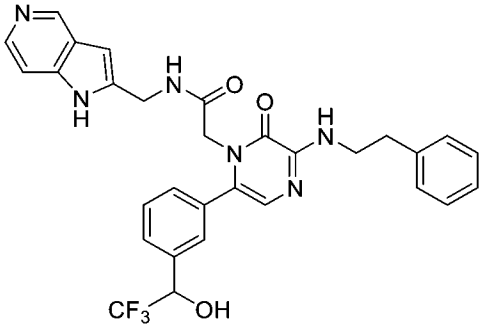
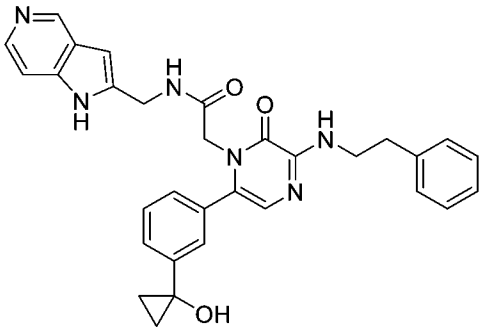
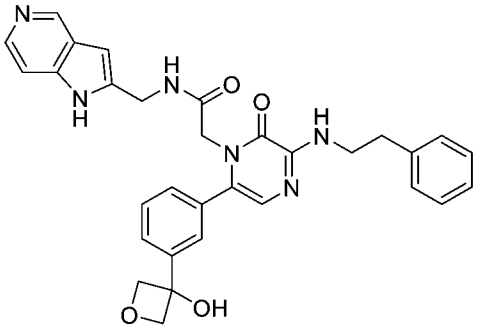
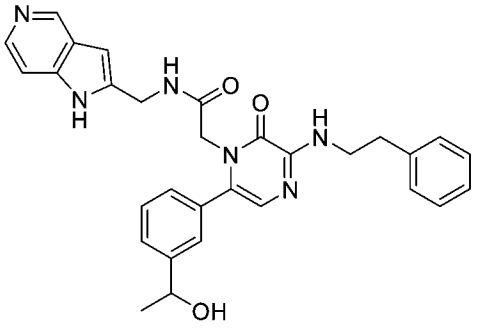
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-86		TFA
IV-87		TFA
IV-88		TFA
IV-89		-
IV-90		TFA

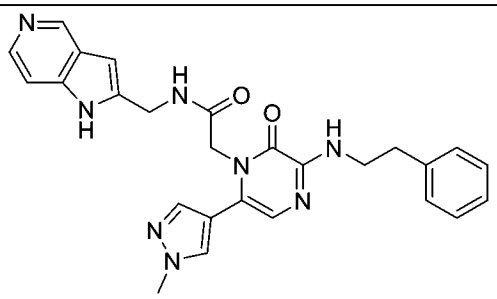
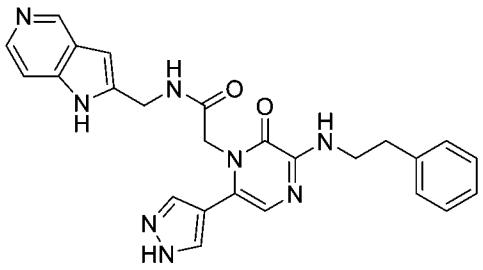
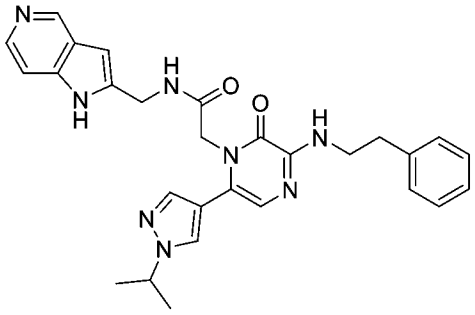
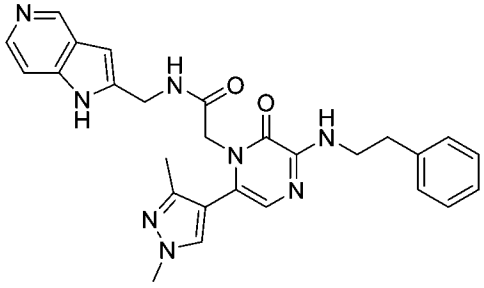
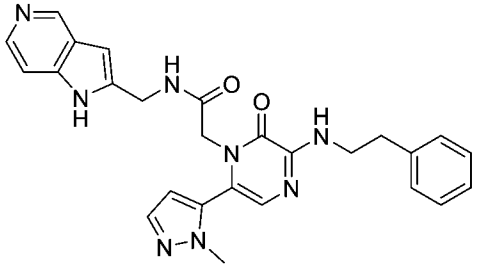
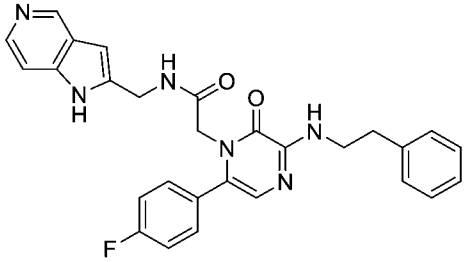
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-91		-
IV-92		-
IV-93		TFA
IV-94		TFA
IV-95		-

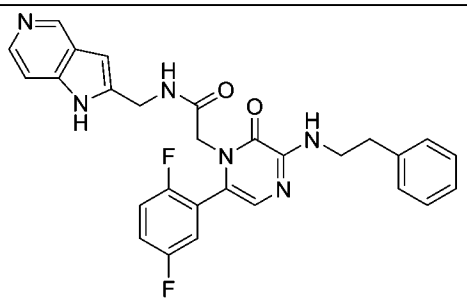
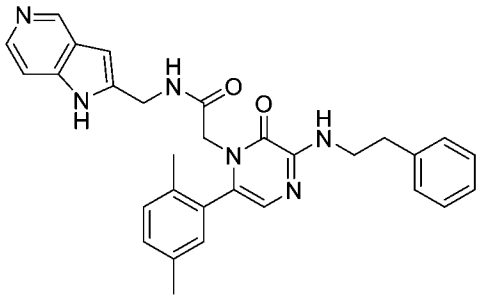
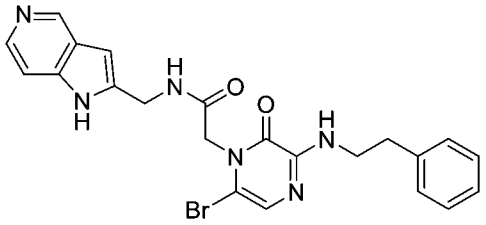
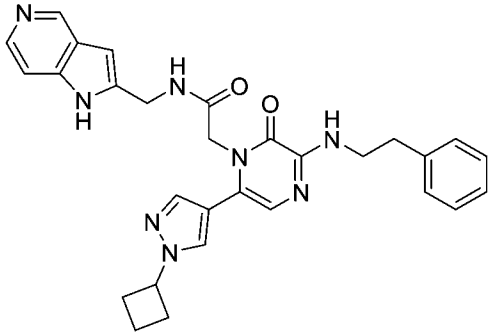
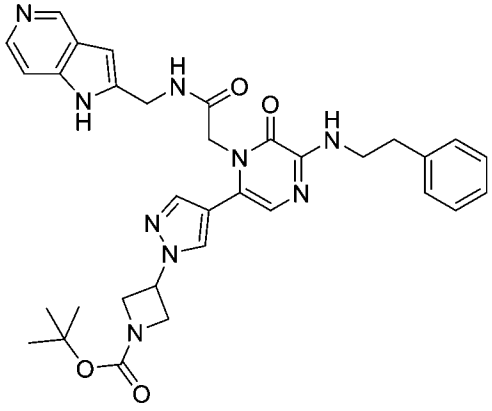
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-96		-
IV-97		-
IV-98		-
IV-99		-
IV-100		-

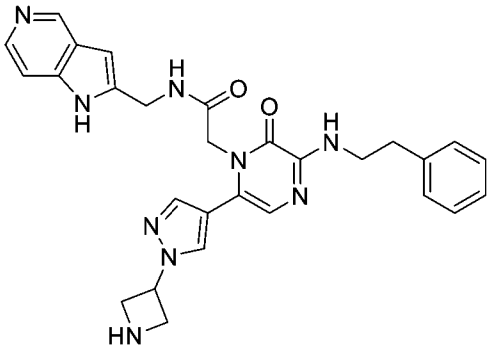
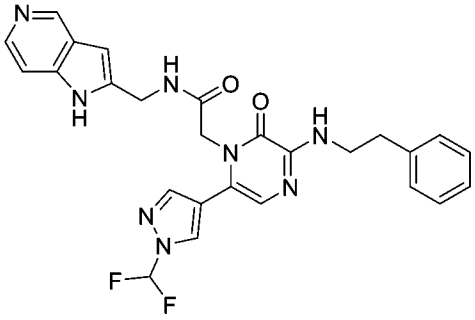
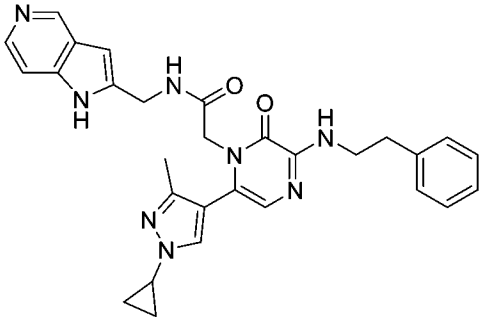
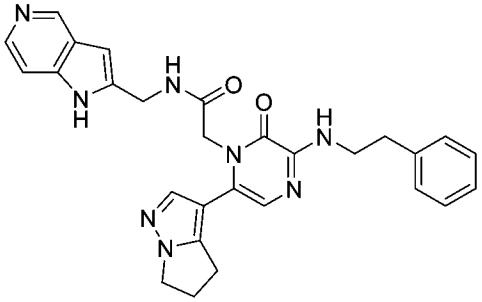
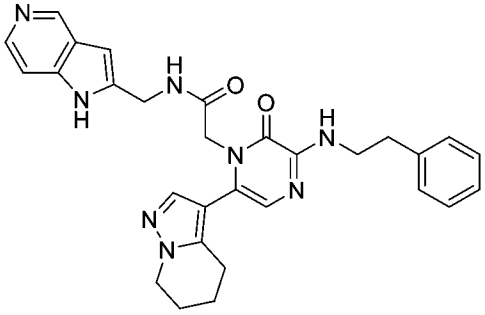
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-101		-
IV-102		-
IV-103		-
IV-104		-
IV-105		-
IV-106		-

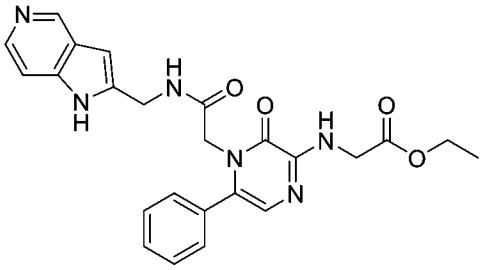
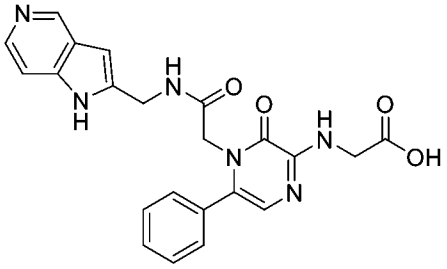
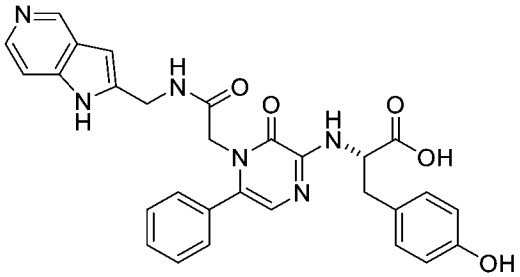
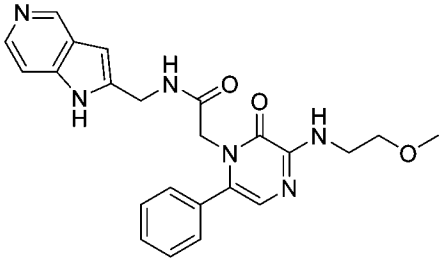
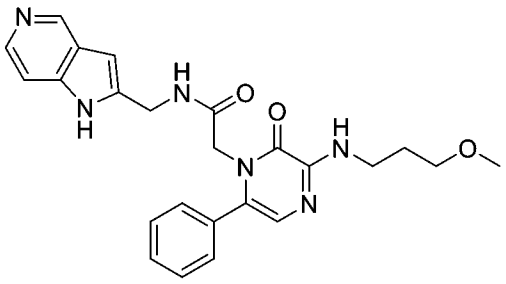
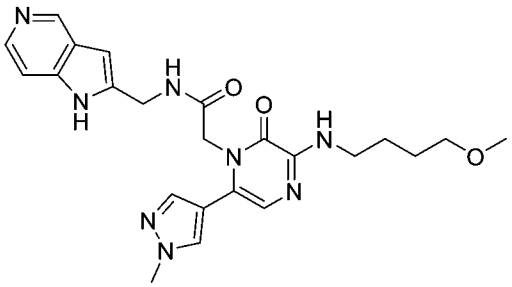
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-107		-
IV-108		-
IV-109		-
IV-110		-
IV-111		-

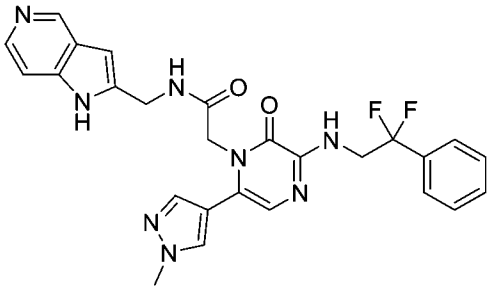
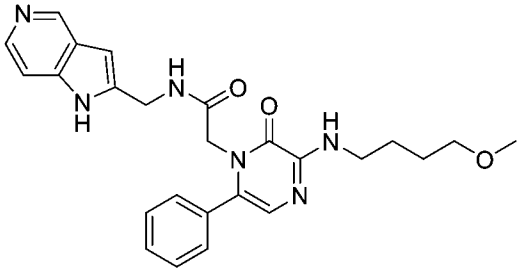
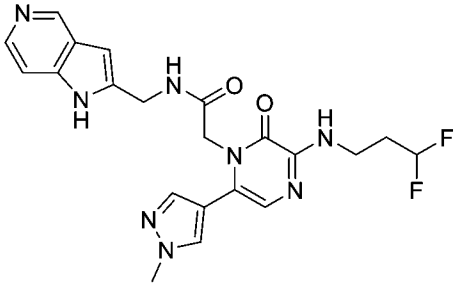
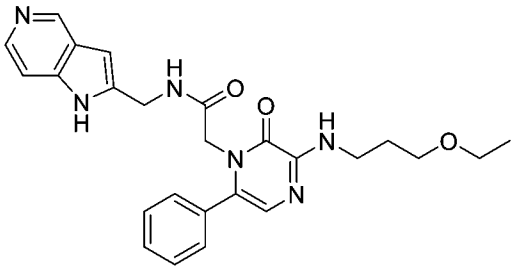
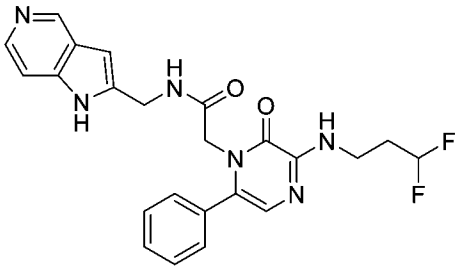
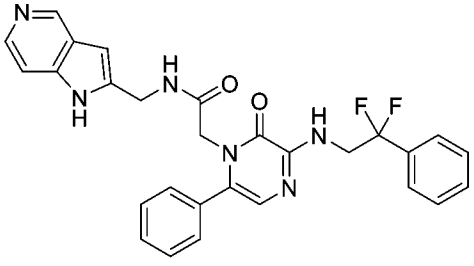
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-112		HCl
IV-113		-
IV-114		-
IV-115		-
IV-116		-

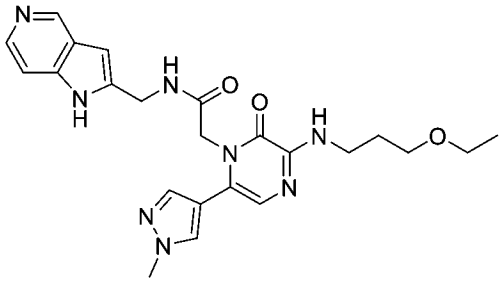
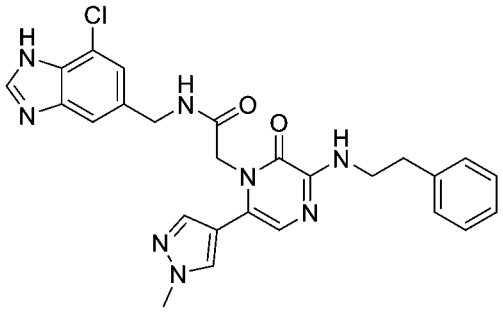
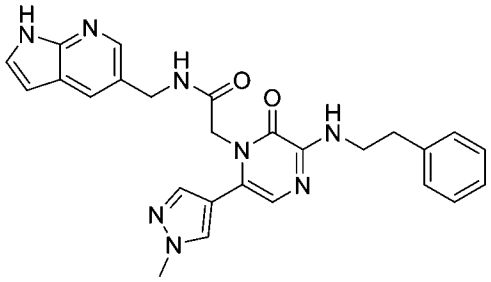
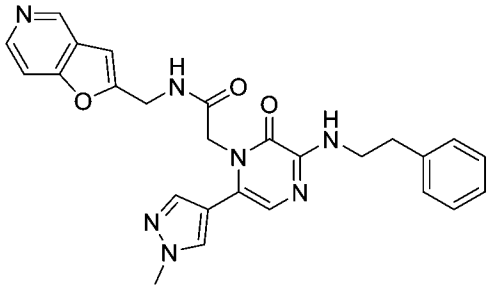
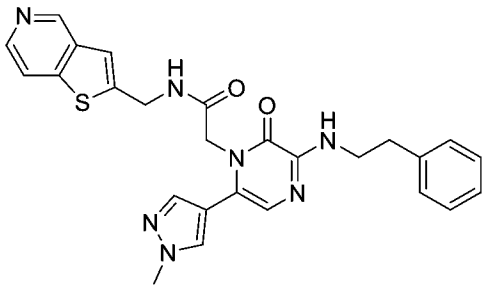
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-117		-
IV-118		TFA
IV-119		TFA
IV-120		TFA
IV-121		TFA
IV-122		TFA

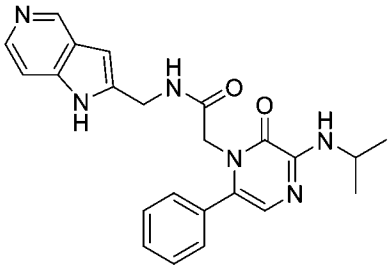
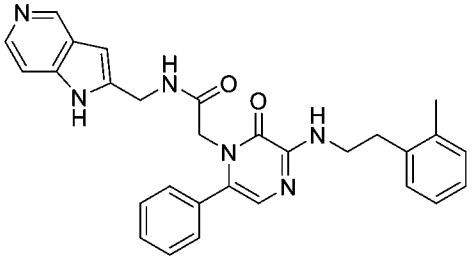
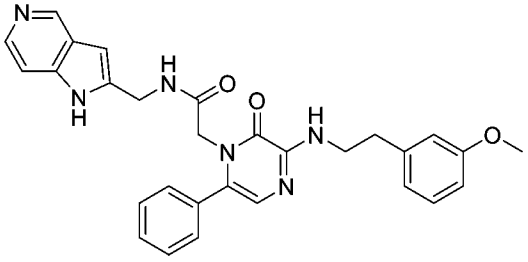
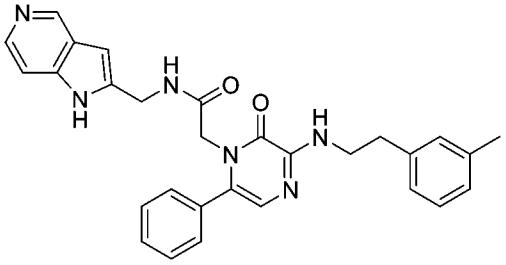
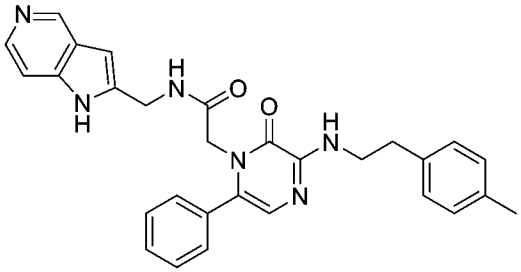
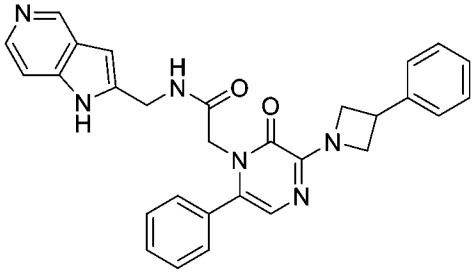
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-123		TFA
IV-124		TFA
IV-125		TFA
IV-126		TFA
IV-127		TFA
IV-128		TFA

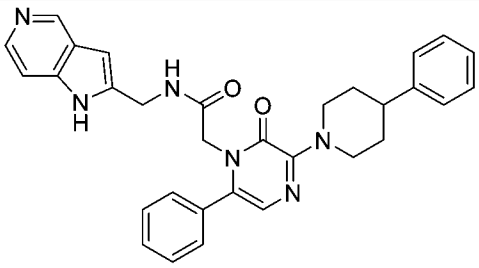
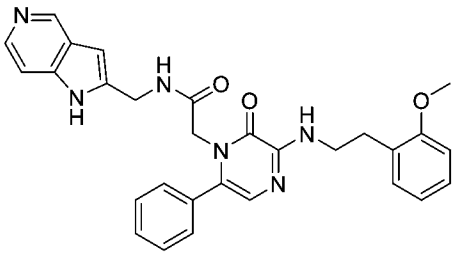
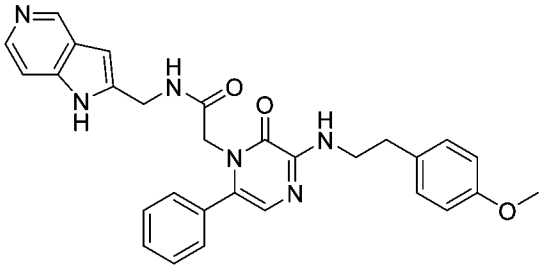
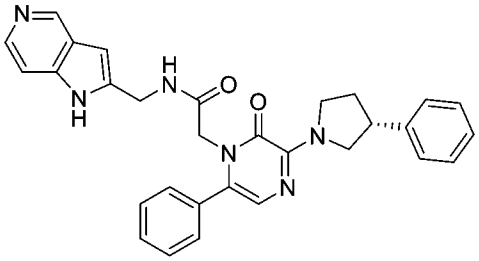
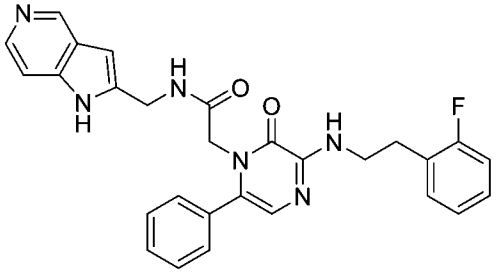
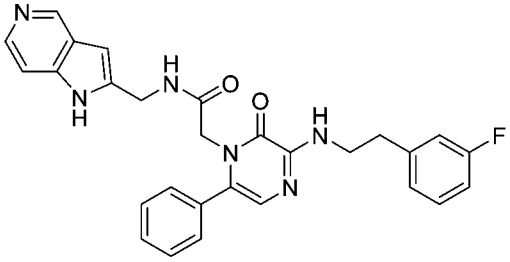
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-129		TFA
IV-130		-
IV-131		-
IV-132		-
IV-133		-

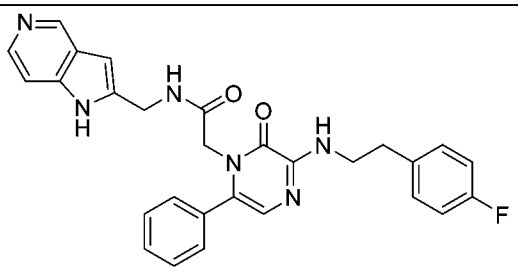
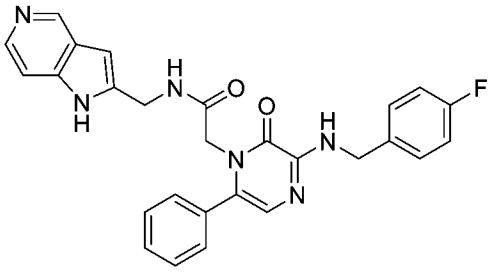
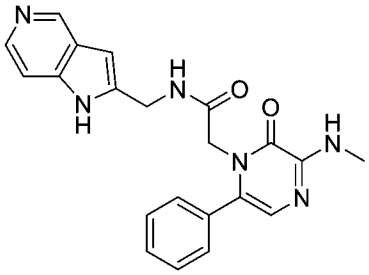
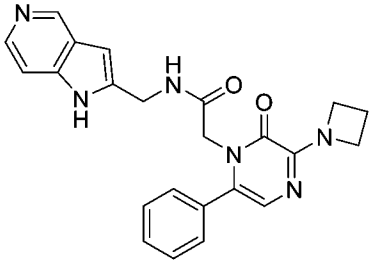
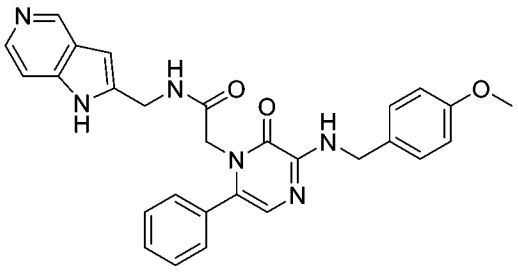
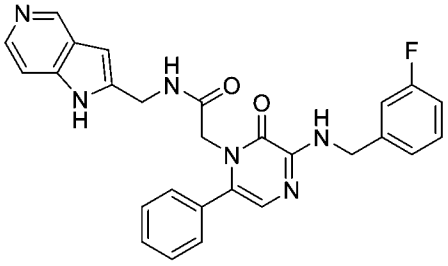
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-134		-
IV-135		-
IV-136		-
IV-137		-
IV-138		-
IV-139		-

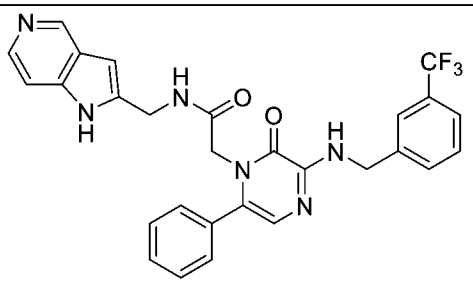
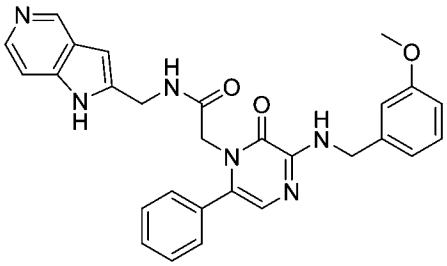
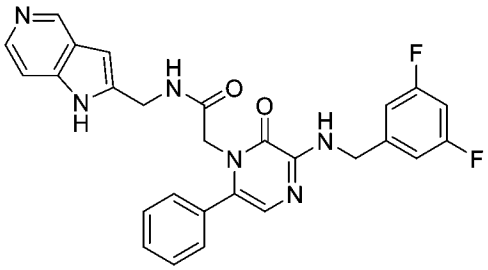
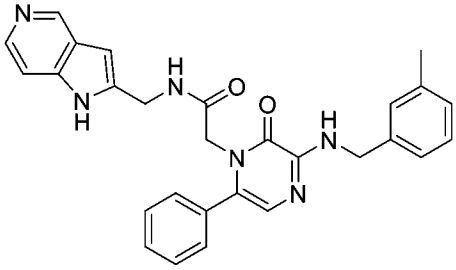
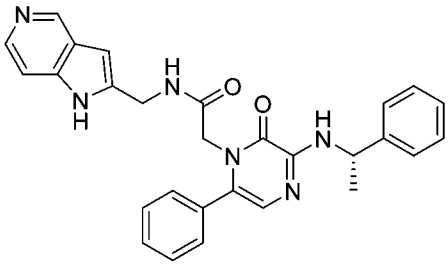
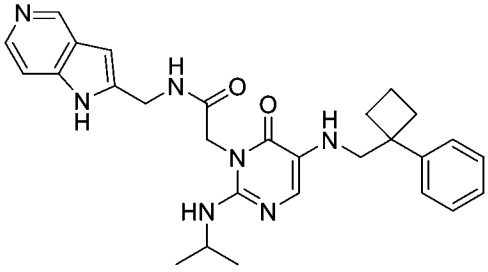
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-140		-
IV-141		-
IV-142		-
IV-143		-
IV-144		-
IV-145		-

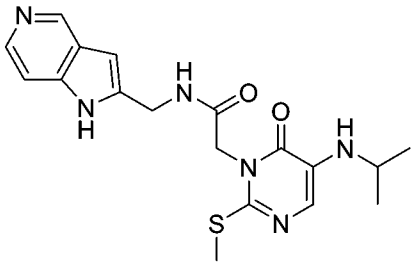
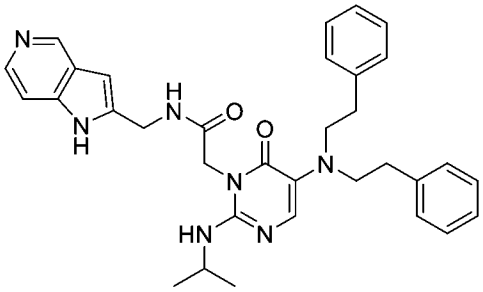
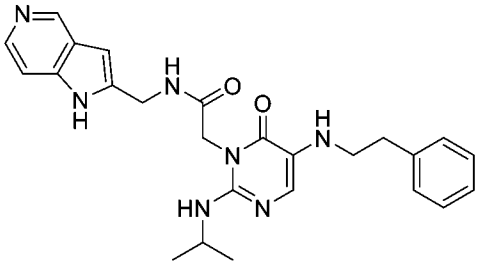
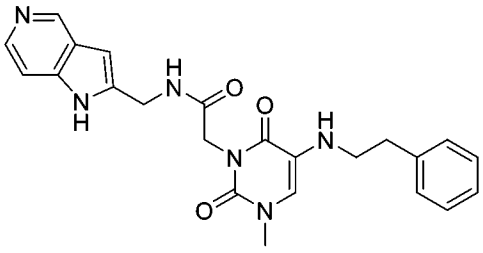
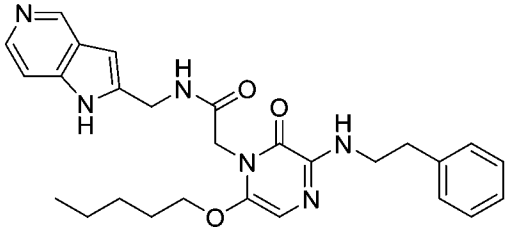
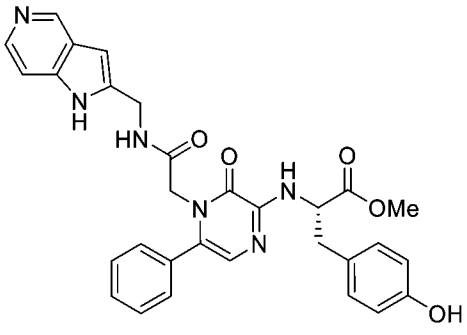
(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-146		-
IV-147		-
IV-148		-
IV-149		-
IV-150		-
IV-151		-

(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-152		-
IV-153		-
IV-154		-
IV-155		-
IV-156		-
IV-157		2TFA

(2022 年 11 月修正)

化合物編號	結構	鹽
IV-158		-
IV-159		-
IV-160		-
IV-161		-
IV-162		-
IV-163		TFA

【0593】 在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是表4A、4B、4C、4D和4E中任一個的化合物。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是化合物1230、1231、III-91或I-89。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是分子量為200 Da至2,000 Da的小分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是分子量為250 Da至2,000 Da的小分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是分子量為350 Da至2,000 Da的小分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是分子量為350 Da至1,500 Da的小分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是分子量為350 Da至1,200 Da的小分子。

【0594】 在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是僅具有選自胍基和苄脒基的一個鹼性基團的小分子。在一些實施方案中，MASP-2抑制劑是不包括選自胍基和苄脒基的鹼性基團的小分子。

【0595】 MASP-2的表達抑制劑

【0596】 在本發明的這個方面的另一個實施方案中，MASP-2抑制劑是能夠抑制MASP-2依賴性補體活化的MASP-2表達抑制劑。在本發明這個方面的實踐中，代表性的MASP-2表達抑制劑包括MASP-2反義核酸分子(例如反義mRNA、反義DNA或反義寡核苷酸)、MASP-2核酶和MASP-2 RNAi分子。

【0597】 通過與MASP-2 mRNA雜交並阻止MASP-2蛋白的翻譯，反義RNA和DNA分子作用於阻斷MASP-2 mRNA的翻譯。反義核酸分子可以以多種不同的方式進行構建，條件是它能夠干擾MASP-2的表達。例如，可以通過相對於其正常轉錄方向，反轉MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)的編碼區(或其一部分)，以允許其互補體的轉錄，來構建反義核酸分子。

【0598】 反義核酸分子通常與一種或多種靶基因的至少一部分基本上相同。然而，核酸無需完全相同以抑制表達。一般地，較高的同源性可以用於補償較短的反義核酸分子的使用。最低限度的同一性百分比通常大於約65%，但較高的同一性百分比可以對內源序列的表達施加更有效的阻遏。通常優選多於約80%的基本上更高的同一性百分比，儘管通常最優選約95%至絕對同一性。

【0599】 反義核酸分子無需具有與靶基因相同的內含子或外顯子模式，並且靶基因的非編碼區段在實現靶基因表達的反義壓制方面可以與編碼片段同樣有效。至少約8個左右的核苷酸的DNA序列可以用作反義核酸分子，儘管更長的序列是優選的。在本發明中，有用的MASP-2抑制劑的代表性實例是反義MASP-2核酸分子，其與MASP-2 cDNA的互補體至少百分之九十相同，所述MASP-2 cDNA由SEQ ID NO:4所示的核酸序列組成。SEQ ID NO:4中所示的核酸序列編碼由SEQ ID NO:5中所示的胺基酸序列組成的MASP-2蛋白。

【0600】 反義寡核苷酸靶向結合MASP-2 mRNA是可以用於降低MASP-2蛋白合成水平的另一種機制。例如，通過針對其各自的mRNA序列的反義寡核苷酸，來抑制聚半乳糖醛酸酶和毒葶鹼2型乙醯膽鹼受體的合成(授予Cheng的美國專利號5,739,119和授予Shewmaker的美國專利號5,759,829)。此外，反義抑制的實例已用以下加以證實：核蛋白細胞週期蛋白、多藥抗性基因(MDG1)、ICAM-1、E-選擇素、STK-1、紋狀體$GABA_A$受體和人EGF(參見例如，授予Baracchini的美國專利號5,801,154；授予Baker的美國專利號5,789,573；授予Considine的美國專利號5,718,709；以及授予Reubenstein的美國專利號5,610,288)。

【0601】 允許普通技術人員確定哪些寡核苷酸可用於本發明中的系統已得到描述，所述系統涉及使用RNA酶H切割作為轉錄物內的序列可及性的指標，來探測靶mRNA中的合適位點。Scherr，M.等人，Nucleic Acids Res. 26:5079-5085，1998；Lloyd等人，Nucleic Acids Res. 29:3665-3673，2001。將與MASP-2轉錄物的某些區域互補的反義寡核苷酸的混合物，加入表達MASP-2的細胞提取物例如肝細胞中，並且進行雜交以便產生易受RNA酶H影響的位點。這種方法可以與計算機輔助的序列選擇組合，基於其形成二聚體、髮夾或其它二級結構(其降低或阻止與宿主細胞中的靶mRNA的特異性結合)的相對能力，所述計算機輔助的序列選擇可以預測關於反義組合物的最佳序列選擇。可以使用OLIGO引物分析軟件(Rychlik，I.，1997)、以及BLASTN 2.0.5算法軟件(Altschul，S.F.等人，Nucl. Acids Res. 25:3389-3402，1997)，來執行這些二級結構分析和靶位點選擇考慮。針對靶序列的反義化合物優選包含約8至約50個核苷酸的長度。包含約9至約35個左右核苷酸的反義寡核苷酸是特別優選的。發明人考慮了在9至35個核苷酸範圍內的所有寡核苷酸組合物(即，長度9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35個左右的鹼基的組合物)，對於本發明的基於反義寡核苷酸的方法的實踐是高度優選的。MASP-2 mRNA的高度優選的靶區域是在AUG翻譯起始密碼子處或附近的那些區域，以及與mRNA的5'區域，例如MASP-2基因核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的–10至+10區域基本上互補的序列。示例性的MASP-2表達抑制劑在下文提供：

【0602】 SEQ ID NO:30(SEQ ID NO:4的核苷酸22-680)：編碼CUBIEGF的MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)的核酸序列。

【0603】 SEQ ID NO:31(5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC3)：包括MASP-2翻譯起始位點(有義)的SEQ ID NO:4的核苷酸12-45。

【0604】 SEQ ID NO:32(5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3')：編碼包含MASP-2 MBL結合位點的區域(有義)的SEQ ID NO:4的核苷酸361-396。

【0605】 SEQ ID NO:33(5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAAA3')：編碼包含CUBII結構域的區域的SEQ ID NO:4的核苷酸610-642

【0606】 如上文指出的，如本文使用的，術語“寡核苷酸”指核糖核酸(RNA)或脫氧核糖核酸(DNA)或其模擬物的寡聚物或聚合物。該術語還涵蓋由天然存在的核苷酸、糖和共價核苷間(主鏈)鍵組成的寡聚核酸鹼基，以及具有非天然存在的修飾的寡核苷酸。這些修飾允許引入通過天然存在的寡核苷酸並未提供的某些期望特性，例如降低的毒性特性、針對核酸酶降解的穩定性增加和增強的細胞攝取。在說明性的實施方案中，本發明的反義化合物與天然DNA的不同之處在於磷酸二酯主鏈的修飾，以延長反義寡核苷酸的壽命，其中磷酸酯取代基被硫代磷酸酯替換。同樣地，寡核苷酸的一個或兩個端部可以被一種或多種吖啶衍生物取代，所述吖啶衍生物嵌入核酸鏈內的相鄰鹼基對之間。

【0607】 反義的另一種替代方法是使用“RNA干擾”(RNAi)。雙鏈RNA(dsRNA)可以在哺乳動物體內誘發基因沉默。RNAi和共壓制的天然功能似乎是保護基因組免於通過可移動遺傳元件的侵入，所述可移動遺傳元件例如逆轉錄轉座子和病毒，當它們變得活躍時，在宿主細胞中產生異常的RNA或

dsRNA(參見例如，Jensen，J.等人，Nat. Genet. 21:209-12，1999)。可以通過合成能夠形成雙鏈RNA分子的兩條RNA鏈，來製備雙鏈RNA分子，每條RNA鏈具有約19至25(例如19個23個核苷酸)的長度。例如，可用於本發明的方法中的dsRNA分子，可以包含對應於本文列出的序列及其互補體(例如，SEQ ID NO:30至SEQ ID NO:33)的RNA。優選地，RNA的至少一條鏈具有1-5個核苷酸的3'突出端。合成的RNA鏈在形成雙鏈分子的條件下組合。RNA序列可以包含SEQ ID NO:4的至少8核苷酸部分，其總長度為25個核苷酸或更短。關於給定靶的siRNA序列設計在本領域技術人員的普通技能內。設計siRNA序列並確保至少70%的表達敲減的商業服務是可獲得的(Qiagen，Valencia，Calf)。

【0608】 dsRNA可以作為藥物組合物施用並通過已知方法進行，其中將核酸引入所需的靶細胞內。常用的基因轉移方法包括磷酸鈣、DEAE-右旋糖酐、電穿孔、顯微注射和病毒方法。此類方法在Ausubel等人，Current Protocols in Molecular Biology，John Wiley & Sons，Inc.，1993中得到教導。

【0609】 核酶也可以用於減少MASP-2的量和/或生物活性，例如靶向MASP-2 mRNA的核酶。核酶是催化性RNA分子，其可以切割具有與核酶的序列完全或部分同源的序列的核酸分子。能夠設計編碼RNA核酶的核酶轉基因，所述RNA核酶與靶RNA特異性配對，並且在特異性位置處切割磷酸二酯主鏈，從而使靶RNA在功能上失活。在進行這種切割時，核酶本身並不改變，並且因此能夠再循環且切割其它分子。在反義RNA內包括核酶序列對其賦予RNA切割活性，從而增加了反義構建體的活性。

【0610】 可用於本發明的實踐中的核酶通常包含至少約九個核苷酸的雜交區域和催化區域，所述雜交區域在核苷酸序列中與靶MASP-2 mRNA的至少

一部分互補，所述催化區域適於切割靶MASP-2 mRNA(一般參見EPA編號0 321 201；WO88/04300；Haseloff，J.等人，Nature 334:585-591，1988；Fedor，M.J.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1668-1672，1990；Cech，T.R.等人，Ann. Rev. Biochem. 55:599-629，1986)。

【0611】 核酶可以以摻入核酶序列的RNA寡核苷酸的形式直接靶向細胞，或作為編碼所需核酶RNA的表達載體引入細胞內。核酶可以以與對於反義多核苷酸描述的大致相同的方式進行使用且施加。

【0612】 可用於本發明的方法中的反義RNA和DNA、核酶和RNAi分子，可以通過本領域已知用於合成DNA和RNA分子的任何方法來製備。這些包括本領域眾所周知的、用於化學合成寡脫氧核糖核苷酸和寡核糖核苷酸的技術，例如固相亞磷醯胺化學合成。可替代地，可以通過編碼反義RNA分子的DNA序列的體外和體內轉錄，來生成RNA分子。此類DNA序列可以摻入廣泛多樣的載體內，所述載體摻入合適的RNA聚合酶啟動子，例如T7或SP6聚合酶啟動子。可替代地，取決於使用的啟動子，可以將組成型或誘導型地合成反義RNA的反義cDNA構建體穩定地引入細胞系內。

【0613】 DNA分子的各種眾所周知的修飾可以作為增加穩定性和半衰期的手段而引入。有用的修飾包括但不限於在分子的5'和/或3'端處添加核糖核苷酸或脫氧核糖核苷酸的側翼序列，或者在寡脫氧核糖核苷酸主鏈內使用硫代磷酸酯或2' O-甲基而不是磷酸二酯酶鍵。

【0614】 V. 藥物組合物和遞送方法

【0615】 給藥

【0616】 在另一個方面，本發明提供了用於抑制受試者中的MASP-2依賴性補體活化的不良作用的組合物，所述受試者患有如本文公開的疾病或狀況，所述方法包括將組合物施用於受試者，所述組合物包含治療有效量的MASP-2抑制劑和藥學上可接受的載體。MASP-2抑制劑可以以治療有效劑量施用於有此需要的受試者，以治療或改善與MASP-2依賴性補體活化相關的狀況。治療有效劑量指足以導致與疾病或狀況相關的症狀改善的MASP-2抑制劑的量。

【0617】 MASP-2抑制劑的毒性和治療功效可以通過採用實驗動物模型的標準藥學程序來確定，所述實驗動物模型例如實驗例1中所述的，表達人MASP-2轉基因的鼠MASP-2 -/-小鼠模型。使用此類動物模型，NOAEL(未觀察到不良作用水平)和MED(最低有效劑量)可以使用標準方法進行確定。NOAEL和MED效應之間的劑量比是治療比，其表示為比率NOAEL/MED。顯示出大治療比或指數的MASP-2抑制劑是最優選的。從細胞培養測定和動物研究獲得的數據，可以用於制定用於在人中使用的劑量範圍。MASP-2抑制劑的劑量優選位於循環濃度的範圍內，所述循環濃度包括具有很少毒性或無毒性的MED。劑量可以在該範圍內變化，取決於所採用的劑型和所利用的施用途徑。

【0618】 在一些實施方案中，MASP-2抑制劑用於治療、抑制、減輕或預防哺乳動物受試者(其患有或處於發展由纖維化和/或炎症引起或者因其加劇的疾病或病症的風險中)的纖維化的治療功效，通過下述中的一種或多種進行確定：腎組織中的炎症和瘢痕形成的一種或多種標記物(例如TGFβ-1、CTFF、IL-6、細胞凋亡、纖連蛋白、層粘連蛋白、膠原、EMT、浸潤性巨噬細胞)的降低；釋放到尿和血漿內的炎症和纖維化腎疾病的可溶性標記物的降低(例如，通過腎排泄功能的測量)。

【0619】 對於任何化合物製劑，可以使用動物模型來估計治療有效劑量。例如，可以在動物模型中制定劑量，以達到包括MED的循環血漿濃度範圍。血漿中的MASP-2抑制劑的定量水平也可以例如通過高效液相層析進行測量。

【0620】 除毒性研究之外，還可以基於活受試者中存在的MASP-2蛋白的量和MASP-2抑制劑的結合親和力，來估計有效劑量。已顯示正常人受試者的MASP-2水平以在500 ng/ml範圍內的低水平存在於血清中，並且特定受試者的MASP-2水平可以使用用於MASP-2的定量測定來確定，所述定量測定在Moller-Kristensen M.等人，J. Immunol. Methods 282:159-167，2003中進行描述。

【0621】 一般地，包含MASP-2抑制劑的所施用組合物的劑量根據此類因素而變，如受試者的年齡、重量、身高、性別、一般醫學狀況和先前醫療史。作為說明，MASP-2抑制劑，例如抗MASP-2抗體，可以以約0.010至10.0 mg/kg，優選0.010至1.0 mg/kg，更優選0.010至0.1 mg/kg的受試者體重的劑量範圍施用。在一些實施方案中，組合物包含抗MASP-2抗體和MASP-2抑制性肽的組合。

【0622】 可以根據本領域技術人員眾所周知的補體測定，來確定本發明的MASP-2抑制性組合物和方法在給定受試者中的治療功效和適當的劑量。補體生成眾多特異性產物。在過去的十年中，已開發了靈敏和特異性的測定，並且在商業上可用於這些活化產物中的大多數，包括小活化片段C3a、C4a和C5a，以及大活化片段iC3b、C4d、Bb和sC5b-9。這些測定中的大多數利用單選殖抗體，其與暴露於片段上的新抗原(新生抗原)反應，但不與它們由其形成的天然蛋白質上的抗原反應，使得這些測定非常簡單和特異性。儘管放射免疫測

定有時仍用於C3a和C5a，但大多數依賴ELISA技術。後面的這些測定既測量未加工的片段，又測量其'desArg'片段，其是循環中發現的主要形式。未加工的片段和$C5a_{desArg}$通過與細胞表面受體結合得到快速清除，並且因此以非常低的濃度存在，而$C3a_{desArg}$不與細胞結合並在血漿中積累。C3a的測量提供了補體活化的敏感、途徑不依賴性指標。替代途徑活化可以通過測量Bb片段進行評價。膜攻擊途徑活化的液相產物sC5b-9的檢測，提供了補體被活化至完成的證據。由於凝集素途徑和經典途徑兩者均生成相同的活化產物C4a和C4d，因此這兩種片段的測量並不提供關於這兩個途徑中的哪一個已生成活化產物的任何信息。

【0623】 對MASP-2依賴性補體活化的抑制的特徵在於，補體系統的組分的下述變化中的至少一種，所述變化由於根據本發明的方法施用MASP-2抑制劑而發生：MASP-2依賴性補體活化系統產物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9(MAC)的生成或產生的抑制(例如，如實施例2中所述測量的)、C4切割和C4b沉積的降低(例如，如實施例10中所述測量的)、或者C3切割和C3b沉積的降低(例如，如實施例10中所述測量的)。

【0624】 另外的試劑

【0625】 在某些實施方案中，預防、治療、逆轉和/或抑制纖維化和/或炎症的方法，包括將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)作為治療方案的部分，連同適合於抑制纖維化和/或炎症的一種或多種其它藥物、生物製品或治療干預一起施用。在某些實施方案中，另外的藥物、生物製品或治療干預適合於特定症狀，所述症狀與由纖維化和/或炎症引起或者因其加劇的疾病或病症相關。例如，MASP-2抑制性抗體可以作為治療方案的部分，連同一種或多種免疫抑制劑(例如氨甲蝶呤、環磷醯胺、硫唑嘌呤和黴酚酸酯)一起施用。作為進

一步的實例，MASP-2抑制性抗體可以作為治療方案的部分，連同設計為增加血流量的一種或多種試劑(例如硝苯地平、氨氯地平、地爾硫卓、非洛地平或尼卡地平)一起施用。作為進一步的實例，MASP-2抑制性抗體可以作為治療方案的部分，連同預期減少纖維化的一種或多種試劑(例如d-青黴胺、秋水仙鹼、PUVA、鬆弛素、環孢菌素、TGFβ阻滯劑或p38 MAPK阻滯劑)一起施用。作為進一步的實例，MASP-2抑制性抗體可以作為治療方案的部分，連同類固醇或支氣管擴張劑一起施用。

【0626】 包含MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)的組合物和方法，可以任選地包含一種或多種另外的治療劑，其可以加強MASP-2抑制劑的活性、或者以累加或協同方式提供有關的治療功能。例如，在治療患有由纖維化和/或炎症引起或者因其加劇的疾病或病症的受試者的背景下，一種或多種MASP-2抑制劑可以與一種或多種另外的抗纖維化劑、和/或一種或多種抗病毒劑和/或消炎藥和/或免疫抑制劑組合進行施用(包括共施用)。

【0627】 MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)可以與其它治療劑組合使用，所述其它治療劑例如一般的抗病毒藥、或免疫抑制藥物例如皮質類固醇、免疫抑制劑或細胞毒素劑和/或抗纖維化劑。

【0628】 在本文描述的方法的一些實施方案中，MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體或MASP-2的小分子抑制劑)用作單一療法，用於治療患有冠狀病毒例如患有COVID-19或流感病毒的受試者。在本文所述方法的一些實施方案中，MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體或MASP-2的小分子抑制劑)與其它治療劑組合使用，所述其它治療劑例如抗病毒劑、治療性抗體、皮質類固醇和/或顯示對於治療患有冠狀病毒或流感病毒的受試者有效的其它試劑。

在一些實施方案中，藥物組合物包含MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體或MASP-2的小分子抑制劑)和至少一種另外的治療劑，例如抗病毒劑(例如，瑞德西韋)、針對除MASP-2外的靶的治療性抗體、皮質類固醇、抗凝劑例如低分子量肝素(例如，依諾肝素)和抗生素(例如，阿奇黴素)。

【0629】 在此類組合療法中，MASP-2抑制劑可以與以下同時、在以下之前或在以下之後進行配製或施用：一種或多種其它所需的COVID-19治療劑例如抗病毒劑(例如，瑞德西韋)、針對除MASP-2外的靶的治療性抗體、皮質類固醇或抗凝劑。可以以本領域已知的各種方式來配製組合療法的每種組分。例如，組合療法的MASP-2抑制劑和第二試劑可以一起或分開配製。MASP-2抑制劑和另外的試劑可以一次或經過一系列治療，適當地施用於COVID-19患者。

【0630】 示例性的抗病毒劑包括例如達蘆那韋(其可以與利托那韋或考比司他一起使用，以增加達蘆那韋水平)、法維拉韋、洛匹那韋、利托那韋、瑞德西韋、加利西韋、依巴斯汀、達諾瑞韋、ASC09、恩曲他濱、替諾福韋、umifnovir、巴洛沙韋、阿茲夫定/或ISR-50。示例性的治療性抗體包括例如血管生長因子抑制劑(例如貝伐珠單抗)、PD-1阻斷抗體(例如胸腺素、卡瑞利珠單抗)、CCR5拮抗劑(例如萊隆利單抗)、IL-6受體拮抗劑(例如沙利魯單抗、托珠單抗)、IL-6靶向抑制劑(例如司妥昔單抗)、抗GMCSF抗體(例如gimsilumab、TJM2)、GMCSF受體α阻斷抗體(例如莫夫單抗)、抗C5抗體(例如依庫珠單抗、雷武珠單抗)和/或抗C5a抗體(IFX-1)。

【0631】 在本文描述的方法的一些實施方案中，MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體例如OMS646、或MASP-2的小分子抑制劑)與抗病毒劑例如瑞德西韋組合使用，用於治療患有COVID-19的受試者。

【0632】 對於治療冠狀病毒和/或流感病毒可能有效的其它試劑包括例如氯喹/羥基氯喹、甲磺酸卡莫司他、魯索利尼、聚乙二醇干擾素α-2b、樂複能、艾芬地爾、重組ACE2、APN01、brlacidin、BXT-25、BIO-11006、芬戈莫德、WP1122、干擾素β-1a、萘莫司他、氯沙坦和/或阿替普酶。

【0633】 藥物載體和遞送媒介物

【0634】 一般而言，與任何其它選擇的治療劑組合的本發明的MASP-2抑制劑組合物，適當地包含在藥學上可接受的載體中。載體是無毒的、生物相容的，並且這樣加以選擇，以便不會有害地影響MASP-2抑制劑(以及與其組合的任何其它治療劑)的生物活性。用於肽的示例性藥學上可接受的載體在授予Yamada的美國專利號5,211,657中進行描述。可用於本發明中的抗MASP-2抗體和抑制性肽可以配製成以固體、半固體、凝膠、液體或氣體形式的製劑，例如片劑、膠囊、粉末、顆粒、軟膏、溶液、貯存劑、吸入劑和注射劑，其允許經口、腸胃外或手術施用。本發明還考慮了通過包被醫療器械等等的組合物的局部施用。

【0635】 用於經由注射、輸注或沖洗的腸胃外遞送以及局部遞送的合適載體包括蒸餾水、生理磷酸鹽緩衝鹽水、正常或乳酸林格氏溶液、右旋糖溶液、漢克氏溶液或丙二醇。另外，無菌的不揮發性油可以用作溶劑或懸浮介質。為此，可以採用任何生物相容性油，包括合成的甘油單酯或甘油二酯。另外，脂肪酸如油酸可用於注射劑的製備中。載體和試劑可以配混為液體、懸浮液、可聚合或不可聚合的凝膠、糊劑或藥膏。

【0636】 載體還可以包含遞送媒介物，以維持(即，延長、延遲或調控)一種或多種試劑的遞送，或者增強治療劑的遞送、攝取、穩定性或藥代動力學。

作為非限制性實例，此類遞送媒介物可以包括由蛋白質、脂質體、碳水化合物、合成有機化合物、無機化合物、聚合或共聚水凝膠和聚合膠束組成的微粒、微球、納米球或納米顆粒。合適的水凝膠和膠束遞送系統包括在WO 2004/009664 A2中公開的PEO:PHB:PEO共聚物和共聚物/環糊精複合物，以及在美國專利申請公開號2002/0019369 A1中公開的PEO和PEO/環糊精複合物。此類水凝膠可以在預期作用部位處局部注射，或者皮下或肌內注射，以形成緩釋貯庫。

【0637】 對於關節內遞送，MASP-2抑制劑可以在上述可注射的液體或凝膠載體、上述可注射的緩釋遞送媒介物、或者透明質酸或透明質酸衍生物中攜帶。

【0638】 對於非肽能試劑的經口施用，MASP-2抑制劑可以在惰性填料或稀釋劑如蔗糖、玉米澱粉或纖維素中攜帶。

【0639】 對於局部施用，MASP-2抑制劑可以在軟膏、洗劑、乳膏、凝膠、滴劑、栓劑、噴霧、液體或粉末中攜帶，或者經由透皮貼劑在凝膠或微膠囊遞送系統中攜帶。

【0640】 各種鼻和肺遞送系統，包括氣溶膠、定量吸入器、乾粉吸入器和噴霧器正在開發中，並且可以適當地適於分別在氣溶膠、吸入劑或霧化的遞送媒介物中遞送本發明。

【0641】 對於鞘內(IT)或腦室內(ICV)遞送，適當的無菌遞送系統(例如，液體；凝膠、懸浮液等)可以用於施用本發明。

【0642】 本發明的組合物還可以包括生物相容性賦形劑，例如分散劑或濕潤劑、助懸劑、稀釋劑、緩衝劑、滲透促進劑、乳化劑、粘合劑、增稠劑、調味劑(用於經口施用)。

【0643】 用於抗體和肽的藥物載體

【0644】 更具體地，關於抗MASP-2抗體和抑制性肽，示例性製劑可以作為化合物在具有藥物載體的生理上可接受的稀釋劑中的溶液或懸浮液的可注射劑量進行施用，所述藥物載體可以是無菌液體，例如水、油、鹽水、甘油或乙醇。另外，輔助物質例如濕潤劑或乳化劑、表面活性劑、pH緩衝物質等等，可以存在於包含抗MASP-2抗體和抑制性肽的組合物中。藥物組合物的另外組分包括礦脂(例如動物、植物或合成起源的礦脂)，例如大豆油和礦物油。一般而言，二醇如丙二醇或聚乙二醇是用於可注射溶液的優選液體載體。

【0645】 抗MASP-2抗體和抑制性肽也可以以貯庫注射劑或植入物製劑的形式施用，其可以以允許活性劑的緩釋或脈衝式釋放的方式進行配製。

【0646】 用於表達抑制劑的藥學上可接受的載體

【0647】 更具體地，關於可用於本發明的方法中的表達抑制劑，提供了包含如上所述的表達抑制劑和藥學上可接受的載體或稀釋劑的組合物。該組合物可以進一步包含膠體分散系統。

【0648】 包括表達抑制劑的藥物組合物可以包括但不限於溶液、乳劑和含脂質體的製劑。這些組合物可以由各種組分生成，所述組分包括但不限於預形成的液體、自乳化固體和自乳化半固體。此類組合物的製備通常涉及將表達抑制劑與下述中的一種或多種組合：緩衝劑、抗氧化劑、低分子量多肽、蛋白質、胺基酸、碳水化合物(包括葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合劑(例如EDTA、谷

胱甘肽和其它穩定劑)和賦形劑。中性緩衝鹽水或與非特異性血清白蛋白混合的鹽水是合適稀釋劑的實例。

【0649】 在一些實施方案中，組合物可以作為乳劑製備且配製，所述乳劑通常是一種液體以液滴形式分散在另一種液體中的非均質系統(參見Idson，於Pharmaceutical Dosage Forms，第1卷，Rieger和Banker(編輯)，Marcek Dekker，Inc.，N.Y.，1988)。乳劑製劑中使用的天然存在的乳化劑的實例包括阿拉伯膠、蜂蠟、羊毛脂、卵磷脂和磷脂。

【0650】 在一個實施方案中，包括核酸的組合物可以配製為微乳劑。如本文使用的，微乳劑指水、油和兩親化合物的系統，其是單一的光學各向同性和熱力學穩定的液體溶液(參見Rosoff，於Pharmaceutical Dosage Forms，第1卷)。本發明的方法還可以使用脂質體，用於將反義寡核苷酸轉移和遞送至所需位點。

【0651】 用於局部施用的表達抑制劑的藥物組合物和製劑可以包括透皮貼劑、軟膏、洗劑、乳膏、凝膠、滴劑、栓劑、噴霧、液體和粉末。可以使用常規的藥物載體，以及水性、粉末或油性基質和增稠劑等等。

【0652】 施用模式

【0653】 包含MASP-2抑制劑的藥物組合物可以眾多方式進行施用，取決於局部還是全身施用模式最適合於待治療的狀況。進一步地，可以通過將組合物包被或摻入可植入醫療裝置之上或之內，來遞送本發明的組合物。

【0654】 全身遞送

【0655】 如本文使用的，術語“全身遞送”和“全身施用”預期包括但不限於經口和腸胃外途徑，包括肌內(IM)、皮下、靜脈內(IV)、動脈內、吸入、舌

下、頰、局部、透皮、鼻、直腸、陰道和其它施用途徑，其有效地導致遞送的試劑分散到預期治療作用的單一或多重部位。用於本組合物的全身遞送的優選途徑包括靜脈內、肌內、皮下和吸入。應瞭解，將確定本發明的特定組合物中利用的所選試劑的確切全身施用途徑，以部分考慮試劑對與給定施用途徑相關的代謝轉化途徑的敏感性。例如，肽能試劑可以最合適地通過除經口外的途徑施用。

【0656】 MASP-2抑制性抗體和多肽可以通過任何合適的手段，遞送到有此需要的受試者中。MASP-2抗體和多肽的遞送方法包括通過經口、肺、腸胃外(例如肌內、腹膜內、靜脈內(IV)或皮下注射)、吸入(例如經由細粉製劑)、透皮、鼻、陰道、直腸或舌下施用途徑的施用，並且可以以對於每種施用途徑適當的劑型進行配製。

【0657】 作為代表性實例，MASP-2抑制性抗體和肽可以通過施加於能夠吸收多肽的機體膜，例如鼻、胃腸道和直腸膜，而引入活體內。通常將多肽與滲透促進劑結合施加於吸收膜。(參見例如，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.，編輯，Peptide and Protein Drug Delivery，Marcel Dekker，New York(1991)；DeBoer，A.G.等人，J. Controlled Release 13:241，1990.)例如，STDHF是夫西地酸的合成衍生物，所述夫西地酸是在結構中類似於膽汁鹽的甾體表面活性劑，並且已用作用於鼻遞送的滲透促進劑。(Lee，W.A.，Biopharm. 22，Nov./Dec. 1990.)

【0658】 MASP-2抑制性抗體和多肽可以與另一種分子(例如脂質)結合引入，以保護多肽免受酶促降解。例如，聚合物尤其是聚乙二醇(PEG)的共價附

著，已用於保護某些蛋白質免受體內的酶促水解，並且因此延長半衰期(Fuertges，F.等人，J. Controlled Release 11:139，1990)。用於蛋白質遞送的許多聚合物系統已得到報告(Bae，Y.H.等人，J. Controlled Release 9:271，1989；Hori，R.等人，Pharm. Res. 6:813，1989；Yamakawa，I.等人，J. Pharm. Sci. 79:505，1990；Yoshihiro，I.等人，J. Controlled Release 10:195，1989；Asano，M.等人，J. Controlled Release 9:111，1989；Rosenblatt，J.等人，J. Controlled Release 9:195，1989；Makino，K.，J. Controlled Release 12:235，1990；Takakura，Y.等人，J. Pharm. Sci. 78:117，1989；Takakura，Y.等人，J. Pharm. Sci. 78:219，1989)。

【0659】 最近，已開發了具有改善的血清穩定性和循環半衰期的脂質體(參見例如，授予Webb的美國專利號5,741,516)。此外，脂質體和脂質體樣製劑作為潛在藥物載體的各種方法已得到綜述(參見例如，授予Szoka的美國專利號5,567,434；授予Yagi的美國專利號5,552,157；授予Nakamori的美國專利號5,565,213；授予Shinkarenko的美國專利號5,738,868；以及授予Gao的美國專利號5,795,587)。

【0660】 對於透皮應用，可以將MASP-2抑制性抗體和多肽與其它合適的成分(例如載體和/或佐劑)組合。不存在關於此類其它成分的性質的限制，除了它們對於其預期施用必須是藥學上可接受的，並且不會降解組合物的活性成分的活性之外。合適媒介物的實例包括具有或不具有純化膠原的軟膏、乳膏、凝膠或懸浮液。MASP-2抑制性抗體和多肽也可以浸入透皮貼劑、石膏和繃帶內，優選以液體或半液體形式。

【0661】 本發明的組合物可以以確定為維持所需療效水平的間隔，定期進行全身施用。例如，可以每兩周至四周或以更不頻繁的間隔，例如通過皮下注射來施用組合物。通過醫生考慮可能影響試劑組合作用的各種因素來確定劑量方案。這些因素將包括待治療狀況的進展程度，患者的年齡、性別和重量，以及其它臨床因素。每種個別試劑的劑量將根據以下而變：組合物中包括的MASP-2抑制劑、以及任何藥物遞送媒介物(例如緩釋遞送媒介物)的存在和性質。另外，可以調整劑量數量，以考慮施用頻率和所遞送試劑的藥代動力學行為的變化。

【0662】 局部遞送

【0663】 如本文使用的，術語“局部的”包含在預期局限性作用的部位中或周圍的藥物施加，並且可以包括例如局部遞送至皮膚或其它受累組織、眼遞送、鞘內(IT)、腦室內(ICV)、關節內、腔內、顱內或囊內施用、放置或沖洗。局部施用可能是優選的，以使得能夠施用較低的劑量，以避免全身性副作用，並且用於更準確控制遞送的時機和在局部遞送的部位處的活性劑濃度。不管代謝、血流量等方面的患者間變化性如何，局部施用提供了在靶部位處的已知濃度。還通過直接遞送模式提供了改善的劑量控制。

【0664】 MASP-2抑制劑的局部遞送可以在用於治療由纖維化和/或炎症引起或者因其加劇的疾病或病症的外科方法的背景下，例如在操作如手術的過程中實現。

【0665】 治療方案

【0666】 在預防應用中，將包含MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體或MASP-2抑制性小分子化合物)的藥物組合物施用於易受以下影響或在其它

方面處於發展以下的風險中的受試者：冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群或流感病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群，所述藥物組合物的量足以抑制MASP-2依賴性補體活化，且從而降低、消除或降低發展呼吸症候群的症狀的風險。在預防方案和治療方案兩者中，包含MASP-2抑制劑的組合物可以以幾種劑量進行施用，直到在受試者中已實現足夠的治療結果。本發明的MASP-2抑制性組合物的應用可以通過組合物的單次施用或限定的施用順序來進行，用於治療與纖維化和/或炎症相關的急性狀況。可替代地，組合物可以經過延長的時間段以週期性間隔進行施用，用於治療與纖維化和/或炎症相關的慢性狀況。

【0667】 在預防方案和治療方案兩者中，包含MASP-2抑制劑的組合物可以以幾種劑量進行施用，直到在受試者中已實現足夠的治療結果。在本發明的一個實施方案中，MASP-2抑制劑包含MASP-2抗體，其可以以下述劑量合適地施用於成人患者(例如，70 kg的平均成人重量)：0.1 mg至10,000 mg，更合適地1.0 mg至5,000 mg，更合適地10.0 mg至2,000 mg，更合適地10.0 mg至1,000 mg，且再更合適地50.0 mg至500 mg。對於兒科患者，劑量可以與患者的重量成比例地進行調整。本發明的MASP-2抑制性組合物的應用可以通過組合物的單次施用或限定的施用順序來進行，用於治療患有或處於發展由纖維化和/或炎症引起或者因其加劇的疾病或病症的風險中的受試者。可替代地，組合物可以在延長的時間段內以週期性間隔(例如每天、每兩周、每週、每隔一周、每月或每兩個月)進行施用，用於治療患有或處於發展由纖維化和/或炎症引起或者因其加劇的疾病或病症的風險中的受試者。

【0668】 在預防方案和治療方案兩者中，包含MASP-2抑制劑的組合物可以以幾種劑量進行施用，直到在受試者中已實現足夠的治療結果。

【0669】 VI. 實施例

【0670】 下述實施例僅僅示出了目前考慮用於實踐本發明的最佳模式，但不應該解釋為限制本發明。本文所有文獻引用都明確引入作為參考。

【0671】 實施例1

【0672】 本實施例描述了MASP-2(MASP-2-/-)缺陷，但MAp19(MAp19+/+)充分的小鼠品系的生成。

【0673】 材料和方法：靶向載體pKO-NTKV 1901被設計為破壞編碼鼠MASP-2的C末端的三個外顯子，包括編碼絲胺酸蛋白酶結構域的外顯子，如圖3中所示。PKO-NTKV 1901用於轉染鼠ES細胞系E14.1a(SV129 Ola)。選擇了新黴素抗性和胸苷激酶敏感性選殖。篩選了600個ES選殖，並且在這些中，鑒定了四個不同的選殖，並且通過DNA印跡驗證為含有預計的選擇性靶向和重組事件，如圖3中所示。通過胚胎移植由這四個陽性選殖生成了嵌合體。然後將嵌合體在遺傳背景C57/BL6中回交，以產生轉基因雄性。使轉基因雄性與雌性雜交以生成F1，其中50%的後代顯示了關於破壞的MASP-2基因的雜合性。使雜合小鼠交配，以生成純合的MASP-2缺陷後代，分別導致1:2:1比率的雜合小鼠和野生型小鼠。

【0674】 結果和表型：發現所得到的純合的MASP-2-/-缺陷純合小鼠是活的和可育的，並且通過DNA印跡驗證為MASP-2缺陷的，以確認正確的靶向事件，通過RNA印跡來確認MASP-2 mRNA的不存在，並且通過蛋白質印跡來確認MASP-2蛋白質的不存在(數據未顯示)。在LightCycler機器上，使用時間分辨RT-PCR，進一步確認了MAp19 mRNA的存在和MASP-2 mRNA的不存在。MASP-2-/-小鼠確實繼續如預計的表達MAp19、MASP-1和MASP-3 mRNA和蛋

白質(數據未顯示)。通過LightCycler分析，來評價MASP-2-/-小鼠中關於備解素、因子B、因子D、C4、C2和C3 mRNA的存在和豐度，並且發現與野生型同窩對照等同(數據未顯示)。如實施例2中進一步描述的，來自純合MASP-2-/-小鼠的血漿完全缺乏凝集素途徑介導的補體活化。

【0675】 在純C57BL6背景上生成MASP-2-/-品系：在MASP-2-/-品系用作實驗動物模型之前，使MASP-2-/-小鼠與純C57BL6系回交雜交9代。

【0676】 還如下生成其為鼠MASP-2-/-、MAp19+/+，並且表達人MASP-2轉基因(鼠MASP-2敲除和人MASP-2敲入)的轉基因小鼠品系：

【0677】 材料和方法：構建如圖4中所示的編碼人MASP-2的小基因，稱為“微型hMASP-2”(SEQ ID NO:49)，其包括人MASP 2基因的啟動子區，包括前3個外顯子(外顯子1至外顯子3)，隨後為代表後續8個外顯子的編碼序列的cDNA序列，從而編碼由其內源啟動子驅動的全長MASP-2蛋白。將微型hMASP-2構建體注射到MASP-2-/-的受精卵內，以便通過轉基因表達的人MASP-2替換缺陷的鼠MASP 2基因。

【0678】 實施例2

【0679】 本實施例證實了MASP-2是經由凝集素途徑的活化補體所需的。

【0680】 方法和材料：

【0681】 凝集素途徑特異性C4切割測定：C4切割測定已通過Petersen等人，J. Immunol. Methods 257:107(2001)進行描述，其測量了起因於來自金黃色葡萄球菌(S. aureus)的脂磷壁酸(LTA)的凝集素途徑活化，所述脂磷壁酸結合L-纖維膠凝蛋白。如下所述，在添加來自MASP-2 -/-小鼠的血清之前，通過用LPS和甘露聚糖或酵母聚糖包被板，由Petersen等人，(2001)描述的測定適於測

量經由MBL的凝集素途徑活化。測定還進行修改，以消除由於經典途徑的C4切割的可能性。這通過使用含有1 M NaCl的樣品稀釋緩衝液來實現，所述緩衝液允許凝集素途徑識別組分與其配體的高親和力結合，但阻止了內源性C4的活化，從而通過使C1複合物解離而排除了經典途徑的參與。簡言之，在修改的測定中，將血清樣品(在高鹽(1 M NaCl)緩衝液中稀釋)加入配體包被的板中，隨後為在具有生理濃度的鹽的緩衝液中添加恒定量的純化C4。含有MASP-2的結合識別複合物切割C4，導致C4b沉積。

【0682】 測定方法：

【0683】 1)Nunc Maxisorb微量滴定板(MaxiSorb®，Nunc，目錄號442404，Fisher Scientific)用在包被緩衝液(15 mM Na_2CO_3、35 mM $NaHCO_3$，pH 9.6)中稀釋的1 μg/ml甘露聚糖(M7504 Sigma)或任何其它配體(例如，下文列出的配體)進行包被。

【0684】 下述試劑用於測定中：

【0685】 a. 甘露聚糖(在100 μl包被緩衝液中的1 μg/孔的甘露聚糖(M7504 Sigma))：

【0686】 b. 酵母聚糖(在100 μl包被緩衝液中的1 μg/孔酵母聚糖(Sigma))；

【0687】 c. LTA(在100 μl包被緩衝液中的1μg/孔或在20 μl甲醇中的2 μg/孔)

【0688】 d. 在包被緩衝液中的1 μg H-纖維膠凝蛋白特異性Mab 4H5

【0689】 e. 來自綠色氣球菌(Aerococcus viridans)的PSA(在100 μl包被緩衝液中的2 μg/孔)

【0690】 f. 在包被緩衝液中的100 μl/孔的福爾馬林固定的金黃色葡萄球菌DSM20233(OD_{550}=0.5)。

【0691】 2)使板在4°C下溫育過夜。

【0692】 3)在過夜溫育後，通過使板與0.1% HAS-TBS封閉緩衝液(在10 mM Tris-CL、140 mM NaCl、1.5 mM NaN_3，pH 7.4中的0.1%(w/v)HSA)一起溫育1-3小時，然後用TBS/tween/Ca^{2+}(具有0.05% Tween 20和5 mM $CaCl_2$、1 mM $MgCl_2$的TBS，pH 7.4)將板洗滌3X，使殘留的蛋白結合位點飽和。

【0693】 4)待測試的血清樣品在MBL結合緩衝液(1 M NaCl)中進行稀釋，並且將稀釋的樣品加入板中，並在4°C下溫育過夜。僅接收緩衝液的孔用作陰性對照。

【0694】 5)在4°C下溫育過夜之後，將板用TBS/tween/Ca^{2+}洗滌3X。然後將人C4(100 μl/孔的在BBS(4 mM巴比妥、145 mM NaCl、2 mM $CaCl_2$、1 mM $MgCl_2$，pH 7.4)中稀釋的1 μg/ml)加入板中，並且在37°C下溫育90分鐘。將板再次用TBS/tween/Ca^{2+}洗滌3X。

【0695】 6)C4b沉積用鹼性磷酸酶綴合的雞抗人C4c(在TBS/tween/Ca^{2+}中1:1000稀釋的)進行檢測，將所述雞抗人C4c加入板中並在室溫下溫育90分鐘。然後將板再次用TBS/tween/Ca^{2+}洗滌3X。

【0696】 7)通過加入100 μl對硝基苯磷酸鹽底物溶液，在室溫下溫育20分鐘，並且在微量滴定板閱讀器中讀取OD_{405}，來檢測鹼性磷酸酶。

【0697】 結果：圖5A-B顯示了在來自MASP-2 +/+(十字)、MASP-2+/-(實心圓圈)和MASP-2-/-(實心三角形)的血清稀釋物中，在甘露聚糖(圖5A)和酵母聚糖(圖5B)上的C4b沉積量。圖5C顯示了基於測量對野生型血清標準化的C4b沉積

量，相對於野生型小鼠(n=5)，來自MASP-2/+小鼠(n=5)和MASP-2-/-小鼠(n=4)，在包被有酵母聚糖(白色條)或甘露聚糖(陰影條)的板上的相對C4轉化酶活性。誤差條代表標準差。如圖5A-C中所示，在甘露聚糖和酵母聚糖包被的板上，來自MASP-2-/-小鼠的血漿完全缺乏凝集素途徑介導的補體活化。這些結果明確地證實了，MASP-2是凝集素途徑的效應子組分。

【0698】 重組MASP-2重構來自MASP-2-/-小鼠的血清中的凝集素途徑依賴性C4活化

【0699】 為了確定MASP-2的不存在是MASP-2-/-小鼠中的凝集素途徑依賴性C4活化喪失的直接原因，在上述C4切割測定中檢查了將重組MASP-2蛋白加入血清樣品中的效應。如下文實施例3中所述，功能活性的鼠MASP-2以及無催化活性的鼠MASP-2A(其中絲胺酸蛋白酶結構域中的活性位點絲胺酸殘基取代了丙胺酸殘基)重組蛋白質，如下文實施例3中所述產生並純化。使來自4只MASP-2 -/-小鼠的合併血清與蛋白質濃度增加的重組鼠MASP-2或無活性的重組鼠MASP-2A一起預溫育，並且如上所述測定C4轉化酶活性。

【0700】 結果：如圖6中所示，功能活性的鼠重組MASP-2蛋白(顯示為空心三角形)對得自MASP-2 -/-小鼠的血清的添加，以蛋白質濃度依賴性方式恢復了凝集素途徑依賴性C4活化，而無催化活性的鼠MASP-2A蛋白(顯示為星形)並未恢復C4活化。圖6中所示的結果針對用合併的野生型小鼠血清(顯示為虛線)觀察到的C4活化進行標準化。

【0701】 實施例3

【0702】 本實施例描述了重組全長人、大鼠和鼠MASP-2、MASP-2衍生的多肽、以及MASP-2的無催化活性突變體形式的重組表達和蛋白質產生。

【0703】 全長人、鼠和大鼠MASP-2的表達：

【0704】 還將人MASP-2的全長cDNA序列(SEQ ID NO:4)亞選殖到哺乳動物表達載體pCI-Neo(Promega)內，所述表達載體在CMV增強子/啟動子區的控制下，驅動真核生物表達(在Kaufman R.J.等人，Nucleic Acids Research 19:4485-90，1991；Kaufman，Methods in Enzymology，185:537-66(1991)中進行描述)。將全長小鼠cDNA(SEQ ID NO:50)和大鼠MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:53)各自亞選殖到pED表達載體內。然後使用Maniatis等人，1989中描述的標準磷酸鈣轉染程序，將MASP-2表達載體轉染到貼壁的中國倉鼠卵巢細胞系DXB1內。用這些構建體轉染的細胞生長非常緩慢，暗示所編碼的蛋白酶是細胞毒性的。

【0705】 在另一種方法中，將含有通過其內源啟動子驅動的MASP-2的人cDNA的小基因構建體(SEQ ID NO:49)瞬時轉染到中國倉鼠卵巢細胞(CHO)內。人MASP-2蛋白被分泌到培養基內，並且如下所述進行分離。

【0706】 全長無催化活性的MASP-2的表達：

【0707】 原理：在識別亞組分MBL或纖維膠凝蛋白(L-纖維膠凝蛋白、H-纖維膠凝蛋白或M-纖維膠凝蛋白)與其各自的碳水化合物模式結合後，MASP-2通過自催化切割被活化。導致MASP-2活化的自催化切割經常在來自血清的MASP-2的分離程序過程中，或在重組表達之後的純化過程中發生。為了獲得用作抗原的更穩定的蛋白質製劑，通過將存在於蛋白酶結構域的催化三聯體中的絲胺酸殘基替換為大鼠(SEQ ID NO:55 Ser617至Ala617)；小鼠(SEQ ID NO:52 Ser617至Ala617)；或人(SEQ ID NO:6 Ser618至Ala618)中的丙胺酸殘基，來產生設計為MASP-2A的無催化活性形式的MASP-2。

【0708】 為了生成無催化活性的人和鼠MASP-2A蛋白，使用表5中所示的寡核苷酸進行定點誘變。

【0709】 表5中的寡核苷酸被設計為對編碼酶促活性的絲胺酸的人和鼠cDNA區域退火，並且寡核苷酸含有錯配，以便將絲胺酸密碼子改變為丙胺酸密碼子。例如，PCR寡核苷酸SEQ ID NO:56-59與人MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)組合使用，以擴增從起始密碼子到酶促活性的絲胺酸以及從絲胺酸到終止密碼子的區域，以生成含有Ser618至Ala618突變的突變MASP-2A的完整開放讀碼框。PCR產物在瓊脂糖凝膠電泳和條帶製備後進行純化，並且使用標準加尾程序生成單個腺苷重疊。然後將腺苷加尾的MASP-2A選殖到pGEM-T easy載體內，轉化到大腸桿菌內。

【0710】 通過將這兩種寡核苷酸以等摩爾的量組合，在100°C下加熱2分鐘並緩慢冷卻至室溫，通過對SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65進行激酶化(kinasing)和退火，來生成無催化活性的大鼠MASP-2A蛋白。所得到的退火片段具有Pst1和Xba1相容性端部，並且被插入代替野生型大鼠MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:53)的Pst1-Xba1片段，以生成大鼠MASP-2A。

【0711】 5 'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3'(SEQ ID NO:64)

【0712】 5' CTAGAAACACTAATGCCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3'(SEQ ID NO:65)

【0713】 將人、鼠和大鼠的MASP-2A各自進一步亞選殖到哺乳動物表達載體pED或pCI-Neo內，並且如下所述轉染到中國倉鼠卵巢細胞系DXB1內。

【0714】 在另一種方法中，使用Chen等人，J. Biol. Chem.，276(28):25894-25902，2001中所述的方法，構建無催化活性形式的MASP-2。簡言之，用Xho1和EcoR1消化含有全長人MASP-2 cDNA的質粒(在Thiel等人，Nature 386:506，1997中進行描述)，並且將MASP-2 cDNA(本文描述為SEQ ID NO:4)選殖到pFastBac1杆狀病毒轉移載體(Life Technologies，NY)的相應限制位點內。然後，通過用天然區胺基酸610至625取代編碼肽區胺基酸610-625(SEQ ID NO:13)的雙鏈寡核苷酸，將在Ser618處的MASP-2絲胺酸蛋白酶活性位點改變為Ala618，以產生具有無活性蛋白酶結構域的MASP-2全長多肽。

【0715】 含有衍生自人MASP-2的多肽區域的表達質粒的構建

【0716】 使用MASP-2信號肽(SEQ ID NO:5的殘基1-15)來產生下述構建體，以分泌MASP-2的各種結構域。通過PCR擴增編碼MASP-2(SEQ ID NO:6)的殘基1–121的區域(對應於N末端CUBI結構域)，來製備表達人MASP-2 CUBI結構域(SEQ ID NO:8)的構建體。通過PCR擴增編碼MASP-2(SEQ ID NO:6)的殘基1–166的區域(對應於N末端CUBIEGF結構域)，來製備表達人MASP-2 CUBIEGF結構域(SEQ ID NO:9)的構建體。通過PCR擴增編碼MASP-2(SEQ ID NO:6)的殘基1-293的區域(對應於N末端CUBIEGFCUBII結構域)，來製備表達人MASP-2 CUBIEGFCUBII結構域(SEQ ID NO:10)的構建體。根據確定的PCR方法，使用Vent$_R$聚合酶和pBS-MASP-2作為模板，通過PCR擴增上文提到的結構域。有義引物的5'引物序列(5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO:34)在PCR產物的5'端處引入BamHI限制位點(加下劃線的)。下表5中顯示的關於每個MASP-2結構域的反義引物，設計為在每個PCR產物的端部處引入終止密碼子(粗體字)，隨後為EcoRI位點(加下劃線的)。一旦擴增，DNA片段就用

BamHI和EcoRI進行消化，並且選殖到pFastBac1載體的相應位點內。所得到的構建體通過限制性圖譜進行表徵，並且通過dsDNA測序加以確認。

【0717】 表5：MASP-2 PCR引物

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

【0718】 MASP-2的重組真核表達以及無酶促活性的小鼠、大鼠和人MASP-2A的蛋白質產生

【0719】 使用標準磷酸鈣轉染程序(Maniatis等人，1989)，將上述MASP-2和MASP-2A表達構建體轉染到DXB1細胞內。MASP-2A在無血清培養基中產生，以確保製劑不被其它血清蛋白質污染。每隔一天從融合細胞中收穫培養基(總共四次)。對於這三個物種的每一種，重組MASP-2A的水平平均起來大約1.5 mg/L培養基。

【0720】 MASP-2A蛋白純化：MASP-2A(上述Ser-Ala突變體)通過在MBP-A瓊脂糖柱上的親和層析進行純化。這種策略使得無需使用外來標簽的快速純化成為可能。將MASP-2A(100-200 ml用等體積的上樣緩衝液(50 mM Tris Cl，pH 7.5，含有150 mM NaCl和25 mM $CaCl_2$)稀釋的培養基)，裝載到用10 ml上樣緩衝液預平衡的MBP瓊脂糖親和柱(4 ml)上。在用進一步的10 ml上樣緩衝液洗滌之後，用含有1.25 M NaCl和10 mM EDTA的50 mM Tris Cl，pH 7.5，在1 ml級分中洗脫蛋白質。通過SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳來鑒定含有MASP-2A的級分。必要時，通過在MonoQ柱(HR 5/5)上的離子交換層析，進一步純化MASP-2A。蛋白質用含有50 mM NaCl的50 mM Tris-Cl pH 7.5進行透析，然後裝載到在相同緩衝液中平衡的柱上。在洗滌之後，結合的MASP-2A用超過10 ml的0.05–1 M NaCl梯度進行洗脫。

【0721】 結果：從200 ml培養基中獲得0.25–0.5 mg MASP-2A蛋白的產率。由於糖基化，通過MALDI-MS測定的77.5 kDa分子量大於未修飾的多肽的計算值(73.5 kDa)。在N-糖基化位點各自處的聚糖附著解釋了觀察到的質量。

MASP-2A作為單一條帶在SDS-聚丙烯醯胺凝膠上遷移，證實了它在生物合成過程中並未進行蛋白酶解加工。通過平衡超速離心測定的重均分子量與糖基化多肽的同二聚體的計算值一致。

【0722】 重組人MASP-2多肽的產生

【0723】 用於產生重組MASP-2和MASP-2A衍生多肽的另一種方法在Thielens，N.M.等人，J. Immunol. 166:5068-5077，2001中進行描述。簡言之，草地貪夜蛾(Spodoptera frugiperda)昆蟲細胞(從Novagen，Madison，WI獲得的Ready-Plaque Sf9細胞)在Sf900II無血清培養基(Life Technologies)中生長且維持，所述培養基補充有50 IU/ml青黴素和50 mg/ml鏈黴素(Life Technologies)。粉紋夜蛾(Trichoplusia ni)(High Five)昆蟲細胞(由Jadwiga Chroboczek，Institut de Biologie Structurale，Grenoble，法國提供)在TC100培養基(Life Technologies)中維持，所述培養基含有10% FCS(Dominique Dutscher，Brumath，法國)，補充有50 IU/ml青黴素和50 mg/ml鏈黴素。重組杆狀病毒使用Bac-to-Bac system®(Life Technologies)生成。杆粒DNA使用Qiagen midiprep純化系統(Qiagen)進行純化，並且如製造商的方案中所述，使用在Sf900 II SFM培養基(Life Technologies)中的cellfectin，用於轉染Sf9昆蟲細胞。4天后收集重組病毒顆粒，通過病毒噬斑測定滴定，並且如通過King和Possee，於The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide，Chapman and Hall Ltd.，London，第111-114頁，1992所述進行擴增。

【0724】 在28°C下，在Sf900 II SFM培養基中，用感染複數為2的含有MASP-2多肽的重組病毒，將High Five細胞(1.75 x 10^7個細胞/175-cm^2組織培養

瓶)感染96小時。通過離心收集上清液，並且添加氟磷酸二異丙酯至1 mM的最終濃度。

【0725】 MASP-2多肽被分泌到培養基中。培養上清液針對50 mM NaCl、1 mM $CaCl_2$、50 mM三乙醇胺鹽酸鹽，pH 8.1進行透析，並且以1.5 ml/分鐘裝載到在相同緩衝液中平衡的Q-Sepharose Fast Flow柱(Amersham Pharmacia Biotech)(2.8 x 12 cm)上。通過施加在相同緩衝液中至350 mM NaCl的1.2升線性梯度進行洗脫。含有重組MASP-2多肽的級分通過蛋白質印跡分析進行鑒定，通過添加$(NH_4)_2SO_4$至60%(w/v)進行沉澱，並且在4°C下靜置過夜。將團塊重懸浮於145 mM NaCl、1 mM $CaCl_2$、50 mM三乙醇胺鹽酸鹽，pH 7.4中，並且施加到在相同緩衝液中平衡的TSK G3000 SWG柱(7.5 x 600 mm)(Tosohaas，Montgomeryville，PA)上。然後通過在Microsep微型濃縮器(m.w.截斷=10,000)(Filtron，Karlstein，德國)上的超濾，將純化的多肽濃縮至0.3 mg/ml。

【0726】 實施例4

【0727】 本實施例描述了產生針對MASP-2多肽的多選殖抗體的方法。

【0728】 材料和方法：

【0729】 MASP-2抗原：多選殖抗人MASP-2抗血清通過用下述分離的MASP-2多肽免疫兔而產生：從血清中分離的人MASP-2(SEQ ID NO:6)；如實施例3中所述的重組人MASP-2(SEQ ID NO:6)，含有無活性蛋白酶結構域(SEQ ID NO:13)的MASP-2A；以及如上文實施例3所述表達的重組CUBI(SEQ ID NO:8)、CUBEGFI(SEQ ID NO:9)和CUBEGFCUBII(SEQ ID NO:10)。

【0730】 多選殖抗體：用BCG(卡介苗疫苗)引發的六周齡的兔，通過注射在無菌鹽水溶液中以100 μg/ml的100 μg MASP-2多肽進行免疫。注射每4周完

成，其中如實施例5中所述，通過ELISA測定監測抗體滴度。收集培養上清液，用於通過蛋白A親和層析的純化抗體。

【0731】 實施例5

【0732】 本實施例描述了用於產生針對大鼠或人MASP-2多肽的鼠單選殖抗體的方法。

【0733】 材料和方法：

【0734】 8-12周齡的雄性A/J小鼠(Harlan，Houston，Tex.)，用100 μg人或大鼠rMASP-2和rMASP-2A多肽(如實施例3中所述進行製備)進行皮下注射，所述多肽在200 μl磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)pH 7.4中的完全弗氏佐劑(Difco Laboratories，Detroit，Mich.)中。以兩周間隔，小鼠用在不完全弗氏佐劑中的50 μg人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽進行兩次皮下注射。在第四周時，小鼠用在PBS中的50 μg人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽進行注射，並且4天后進行融合。

【0735】 對於每次融合，由免疫小鼠的脾臟製備單細胞懸浮液，並且用於與Sp2/0骨髓瘤細胞的融合。在含有50%聚乙二醇(M.W. 1450)(Kodak，Rochester，N.Y.)和5%二甲基亞碸(Sigma Chemical Co.，St. Louis，Mo.)的培養基中，使5x10^8個Sp2/0細胞和5x10^8個脾細胞融合。然後將細胞調整至Iscove培養基(Gibco，Grand Island，N.Y.)中每200 μl懸浮液1.5x10^5個脾細胞的濃度，所述培養基補充有10%胎牛血清、100單位/ml青黴素、100 μg/ml鏈黴素、0.1 mM次黃嘌呤、0.4 μM胺基蝶呤和16 μM胸苷。將200微升的細胞懸浮液加入約二十塊96孔微量培養板的每個孔中。在約十天后，抽取培養上清液，用於在ELISA測定中篩選與純化的因子MASP-2的反應性。

【0736】 ELISA測定：通過在室溫下添加50 μl的50 ng/ml純化hMASP-2或大鼠rMASP-2(或rMASP-2A)，將Immulon® 2(Dynatech Laboratories，Chantilly，Va.)微量測試板的孔包被過夜。用於包被的低濃度的MASP-2使得能夠選擇高親和力的抗體。在通過輕彈板去除包被溶液後，將200 μl BLOTTO(脫脂奶粉)的PBS溶液加入每個孔中一小時，以封閉非特異性位點。一小時後，然後用緩衝液PBST(含有0.05% Tween 20的PBS)洗滌孔。收集來自每個融合孔的50微升的培養上清液，並且與50 μl BLOTTO混合，然後加入微量測試板的各個孔中。在溫育一小時後，將孔用PBST進行洗滌。然後通過與辣根過氧化物酶(HRP)綴合的山羊抗小鼠IgG(Fc特異性)(Jackson ImmunoResearch Laboratories，West Grove，Pa.)反應，來檢測結合的鼠抗體，並且在BLOTTO中以1:2,000進行稀釋。將含有0.1% 3,3,5,5四甲基聯苯胺(Sigma，St. Louis，Mo.)和0.0003%過氧化氫(Sigma)的過氧化物酶底物溶液加入孔中，用於顯色30分鐘。通過加入50 μl 2M H_2SO_4/孔來終止反應。用BioTek® ELISA Reader(BioTek® Instruments，Winooski，Vt.)，讀取反應混合物在450 nm處的光密度。

【0737】 MASP-2結合測定：

【0738】 可以在結合測定中測試在上述MASP-2 ELISA測定中測試呈陽性的培養上清液，以確定MASP-2抑制劑對於MASP-2具有的結合親和力。類似的測定也可以用於確定抑制劑是否與補體系統中的其它抗原結合。

【0739】 聚苯乙烯微量滴定板孔(96孔中等結合板，Corning Costar，Cambridge，MA)用在磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)pH 7.4中的MASP-2(20 ng/100μl/孔，Advanced Research Technology，San Diego，CA)在4℃下包被過夜。在吸出MASP-2溶液後，將孔用含有1%牛血清白蛋白(BSA；Sigma Chemical)的PBS在

室溫下封閉2小時。不含MASP-2包被的孔充當背景對照。將封閉溶液中以不同濃度的雜交瘤上清液或純化的抗MASP-2 MoAb的等分試樣加入孔中。在室溫下溫育2小時之後，將孔用PBS進行充分清洗。通過在封閉溶液中加入過氧化物酶綴合的山羊抗小鼠IgG(Sigma Chemical)，來檢測MASP-2結合的抗MASP-2 MoAb，允許其在室溫下溫育1小時。將板再次用PBS充分清洗，並且添加100 μl的3,3',5,5'-四甲基聯苯胺(TMB)底物(Kirkegaard and Perry Laboratories，Gaithersburg，MD)。通過添加100 μl 1M磷酸猝滅TMB的反應，並且在微板閱讀器(SPECTRA MAX 250，Molecular Devices，Sunnyvale，CA)中，在450 nm處讀取板。

【0740】 然後在功能測定例如實施例2中所述的C4切割測定中，測試來自陽性孔的培養上清液抑制補體活化的能力。然後通過有限稀釋來選殖陽性孔中的細胞。如上所述，在ELISA測定中再次測試MoAb與hMASP-2的反應性。所選擇的雜交瘤在旋轉瓶中生長，並且收集耗盡的培養上清液，用於通過蛋白A親和層析的抗體純化。

【0741】 實施例6

【0742】 本實施例描述了人源化的鼠抗MASP-2抗體和抗體片段的生成和產生。

【0743】 如實施例5中所述，在雄性A/J小鼠中生成鼠抗MASP-2單選殖抗體。然後通過用其人配對物替換鼠恒定區，以生成抗體的嵌合IgG和Fab片段，如下所述將鼠抗體人源化，以降低其免疫原性，其根據本發明可用於抑制人受試者的MASP-2依賴性補體活化的不良作用。

【0744】 1. 從鼠雜交瘤細胞中選殖抗MASP-2可變區基因。遵循製造商的方案(Biotech，Houston，Tex.)，使用RNAzol，從分泌抗MASP-2 MoAb的雜交瘤細胞(如實施例7中所述獲得)中分離總RNA。使用寡聚dT作為引物，從總RNA合成第一鏈cDNA。使用免疫球蛋白恒定C區衍生的3'引物、以及衍生自鼠V_H或V_K基因的前導肽或第一構架區的簡並引物組作為5'引物，來執行PCR。如通過Chen和Platuscas所述(Chen，P.F.，Scand. J. Immunol. 35:539-549，1992)，來進行錨定PCR。為了選殖V_K基因，使用Notl-MAK1引物(5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO:38)，來製備雙鏈cDNA。將退火的銜接子AD1(5'-GGAATTCACTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO:39)和AD2(5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO:40)連接到雙鏈cDNA的5'和3'末端兩者。通過NotI消化去除在3'端處的銜接子。然後將消化的產物用作PCR中的模板，其中AD1寡核苷酸作為5'引物，且MAK2(5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO:41)作為3'引物。將大約500 bp的DNA片段選殖到pUC19內。選擇幾個選殖用於序列分析，以驗證選殖的序列包含預計的鼠免疫球蛋白恒定區。Not1-MAK1和MAK2寡核苷酸衍生自V_K區，並且距Cκ基因第一個鹼基對下游分別為182和84 bp。選擇包括完整V_K和前導肽的選殖。

【0745】 為了選殖V_H基因，使用Not1 MAG1引物(5'-CGCGGCCGCAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO:42)，來製備雙鏈cDNA。將退火的銜接子AD1和AD2連接到雙鏈cDNA的5'和3'末端兩者。通過NotI消化去除在3'端處的銜接子。將消化的產物用作PCR中的模板，其中AD1寡核苷酸和MAG2(5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID

NO:43)作為引物。將長度為500至600 bp的DNA片段選殖到pUC19內。Not1-MAG1和MAG2寡核苷酸衍生自鼠Cγ.7.1區，並且距鼠Cγ.7.1基因的第一個bp下游分別為180和93bp。選擇包含完整V_H和前導肽的選殖。

【0746】 2. 用於嵌合MASP-2 IgG和Fab的表達載體的構建。上述選殖的V_H和V_K基因用作PCR反應中的模板，以將Kozak共有序列加入核苷酸序列的5'端，並且將剪接供體加入核苷酸序列的3'端。在分析序列以確認不存在PCR錯誤後，將V_H和VK V_K分別插入含有人C. γ1和C.κ的表達載體盒內，以得到pSV2neoV_H-huCγ1和pSV2neoV-huCγ。重鏈和輕鏈載體的CsCl梯度純化的質粒DNA用於通過電穿孔轉染COS細胞。在48小時後，通過ELISA測試培養上清液，以確認大約200 ng/ml的嵌合IgG的存在。收穫細胞並製備總RNA。使用寡聚dT作為引物，從總RNA合成第一鏈cDNA。該cDNA用作PCR中的模板，以生成Fd和κ DNA片段。對於Fd基因，使用5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAACT-3'(SEQ ID NO:44)作為5'引物和CH1衍生的3'引物(5'-CGGGATCCTCAAACTTTCTTGTCCACCTTGG-3' SEQ ID NO:45)，來進行PCR。DNA序列確認為含有人IgG1的完整V_H和CH1結構域。在用適當的酶消化後，將Fd DNA片段在表達載體盒pSV2dhfr-TUS的HindIII和BamHI限制位點處插入，以得到pSV2dhfrFd。pSV2質粒是商購可得的，並且由來自各種來源的DNA區段組成：pBR322 DNA(細線)含有pBR322的DNA複製起點(pBR ori)和內醯胺酶氨苄青黴素抗性基因(Amp)；以更寬的陰影線表示並標記的SV40 DNA含有SV40的DNA複製起點(SV40 ori)、早期啟動子(dhfr和neo基因的5')和多聚腺苷

酸化信號(dhfr和neo基因的3')。SV40衍生的多聚腺苷酸化信號(pA)也置於Fd基因的3'端處。

【0747】 對於κ基因，使用5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3'(SEQ ID NO:46)作為5'引物和C_K衍生的3'引物(5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO:47)，來進行PCR。DNA序列確認為含有完整的V_K和人C_K區。在用適當的限制性酶消化後，將κ DNA片段在表達載體盒pSV2neo-TUS的HindIII和BamHI限制位點處插入，以得到pSV2neoK。Fd和κ基因兩者的表達均由HCMV衍生的增強子和啟動子元件驅動。由於Fd基因不包括涉及鏈間二硫鍵的半胱胺酸胺基酸殘基，因此這種重組嵌合Fab含有非共價連接的重鏈和輕鏈。這種嵌合Fab被指定為cFab。

【0748】 為了獲得具有重鏈和輕鏈間二硫鍵的重組Fab，可以將上述Fd基因擴展為包括來自人IgG1的鉸鏈區的另外9個胺基酸的編碼序列(EPKSCDKTH SEQ ID NO:48)。編碼在Fd基因的3'端處的30個胺基酸的BstEII-BamHI DNA區段可以替換為編碼擴展Fd的DNA區段，導致pSV2dhfrFd/9aa。

【0749】 3. 嵌合抗MASP-2 IgG的表達和純化

【0750】 為了生成分泌嵌合抗MASP-2 IgG的細胞系，通過電穿孔，用pSV2neoV_H-huC. γ1和pSV2neoV-huCκ的純化質粒DNA轉染NSO細胞。在0.7 mg/ml G418的存在下選擇轉染的細胞。使用含血清的培養基，使細胞在250 ml旋轉瓶中生長。

【0751】 將100 ml旋轉培養物的培養上清液裝載到10-ml PROSEP-A柱(Bioprocessing，Inc.，Princeton，N.J.)上。將柱用10柱床體積的PBS進行洗滌。

用50 mM檸檬酸鹽緩衝液，pH 3.0來洗脫結合的抗體。將等體積的1 M Hepes，pH 8.0加入含有純化抗體的級分中，以將pH調整至7.0。通過Millipore膜超濾(M.W.截斷：3,000)，通過與PBS的緩衝液交換去除殘留的鹽。純化抗體的蛋白質濃度通過BCA方法(Pierce)來確定。

【0752】 4. 嵌合抗MASP-2 Fab的表達和純化

【0753】 為了生成分泌嵌合抗MASP-2 Fab的細胞系，通過電穿孔，用pSV2dhfrFd(或pSV2dhfrFd/9aa)和pSV2neoκ的純化質粒DNA轉染CHO細胞。在G418和氨甲蝶呤的存在下選擇轉染的細胞。所選擇的細胞系在濃度漸增的氨甲蝶呤下進行擴增。細胞通過有限稀釋進行單細胞亞選殖。然後使用無血清培養基，使高生產性單細胞亞選殖細胞系在100 ml旋轉培養物中生長。

【0754】 通過使用針對MASP-2 MoAb的小鼠抗獨特型MoAb的親和層析，來純化嵌合抗MASP-2 Fab。可以通過用與鑰孔血藍蛋白(KLH)綴合的鼠抗MASP-2 MoAb來免疫小鼠，並且篩選可以與人MASP-2競爭的特異性MoAb結合，來製備抗獨特型MASP-2 MoAb。對於純化，將來自產生cFab或cFab/9aa的CHO細胞的旋轉培養物的100 ml上清液，裝載到與抗獨特型MASP-2 MoAb偶聯的親和柱上。然後將柱用PBS進行充分清洗，然後用50 mM二乙胺，pH 11.5洗脫結合的Fab。如上所述，通過緩衝液交換去除殘留的鹽。純化Fab的蛋白質濃度通過BCA方法(Pierce)來確定。

【0755】 嵌合的MASP-2 IgG、cFab和cFAb/9aa抑制MASP-2依賴性補體途徑的能力，可以通過使用實施例2或實施例7中所述的抑制測定來確定。

【0756】 實施例7

【0757】 本實施例描述了用作功能篩選的體外C4切割測定，以鑒定能夠經由L-纖維膠凝蛋白/P35、H-纖維膠凝蛋白、M-纖維膠凝蛋白或甘露聚糖，來阻斷MASP-2依賴性補體活化的MASP-2抑制劑。

【0758】 C4切割測定：C4切割測定已通過Petersen，S.V.等人，J. Immunol. Methods 257:107，2001進行描述，其測量了起因於來自金黃色葡萄球菌的脂磷壁酸(LTA)的凝集素途徑活化，所述脂磷壁酸結合L-纖維膠凝蛋白。

【0759】 試劑：福爾馬林固定的金黃色葡萄球菌(DSM20233)如下進行製備：細菌在胰蛋白酶大豆血液培養基中在37ºC下生長過夜，用PBS洗滌3次，然後在室溫下在PBS/0.5%福爾馬林中固定1小時，然後用PBS進一步洗滌3次，然後重懸浮於包被緩衝液(15 mM Na_2Co_3、35 mM $NaHCO_3$，pH 9.6)中。

【0760】 測定：Nunc MaxiSorb®微量滴定板(Nalgene Nunc International，Rochester，NY)的孔用以下進行包被：100 µl在包被緩衝液中的福爾馬林固定的金黃色葡萄球菌DSM20233(OD_{550}=0.5)，其中在包被緩衝液中具有1 µg L-纖維膠凝蛋白。在過夜溫育後，將孔用0.1%人血清白蛋白(HSA)的TBS(10 mM Tris HCl、140 mM NaCl，pH 7.4)溶液進行封閉，然後用含有0.05% Tween 20和5 mM $CaCl_2$的TBS(洗滌緩衝液)進行洗滌。人血清樣品在20 mM Tris-HCl、1 M NaCl、10 mM $CaCl_2$、0.05% Triton X-100、0.1% HSA，pH 7.4中進行稀釋，其防止內源C4活化並且使C1複合物(由C1q、C1r和C1s組成)解離。MASP-2抑制劑包括抗MASP-2 MoAb和抑制性肽以不同的濃度加入血清樣品中。將稀釋的樣品加入板中，並且在4ºC下溫育過夜。在24小時後，將板用洗滌緩衝液進行充分洗滌，然後將在100 µl 4 mM巴比妥、145 mM NaCl、2 mM $CaCl_2$、1 mM

$MgCl_2$，pH 7.4中的0.1 μg純化人C4(如Dodds，A.W.，Methods Enzymol. 223:46，1993中所述獲得)加入每個孔中。在37℃下1.5 小時後，將板再次洗滌，並且C4b沉積使用鹼性磷酸酶綴合的雞抗人C4c抗體(從Immunsystem，Uppsala，瑞典獲得)進行檢測，並且使用比色底物對硝基苯磷酸鹽進行測量。

【0761】 在甘露聚糖上的C4測定：上述測定適於在加入與各種MASP-2抑制劑混合的血清之前，通過用LSP和甘露聚糖包被板，來測量經由MBL的凝集素途徑活化。

【0762】 在H-纖維膠凝蛋白(Hakata Ag)上的C4測定：上述測定適於在加入與各種MASP-2抑制劑混合的血清之前，通過用LPS和H-纖維膠凝蛋白包被板，來測量經由H-纖維膠凝蛋白的凝集素途徑活化。

【0763】 實施例8

【0764】 下述測定證實了野生型和MASP-2-/-小鼠中的經典途徑活化的存在。

【0765】 方法：通過在室溫下，用在10 mM Tris、140 mM NaCl，pH 7.4中的0.1%人血清白蛋白包被微量滴定板(MaxiSorb®，Nunc，目錄號442404，Fisher Scientific)共1小時，隨後為在4°C下，與在TBS/tween/Ca^{2+}中1:1000稀釋的綿羊抗全血清抗血清(Scottish Antibody Production Unit，Carluke，蘇格蘭)的過夜溫育，來原位生成免疫複合物。從野生型和MASP-2-/-小鼠獲得血清樣品，並且加入包被的板中。製備了其中C1q從野生型和MASP-2/血清樣品中耗盡的對照樣品。根據供應商的說明書，使用由兔抗人C1q IgG(Dako，Glostrup，丹麥)包被的蛋白A偶聯的Dynabeads®(Dynal Biotech，Oslo，挪威)，來製備C1q耗盡的小鼠血清。使板在37°C下溫育90分鐘。用在TBS/tw/Ca^{++}中以

1:1000稀釋的多選殖抗人C3c抗體(Dako A 062)，來檢測結合的C3b。二抗是山羊抗兔IgG。

【0766】 結果：圖7顯示了在野生型血清、MASP-2-/-血清、C1q耗盡的野生型和C1q耗盡的MASP-2-/-血清中，用IgG包被的板上的相對C3b沉積水平。這些結果證實了，經典途徑在MASP-2-/-小鼠品系中是完整的。

【0767】 實施例9

【0768】 通過分析MASP-2抑制劑在其中經典途徑通過免疫複合物啟動的條件下的效應，下述測定用於測試MASP-2抑制劑是否阻斷經典途徑。

【0769】 方法：為了測試MASP-2抑制劑對其中經典途徑通過免疫複合物啟動的補體活化條件的作用，使一式三份的含有90% NHS的50 μl樣品在10 μg/ml免疫複合物(IC)或PBS的存在下在37ºC下溫育，並且在37ºC溫育期間還包括平行的一式三份樣品(+/-IC)，其含有200 nM抗備解素單選殖抗體。在37ºC下溫育2小時後，向所有樣品中添加13 mM EDTA，以停止進一步的補體活化，並且將樣品立即冷卻至5ºC。然後將樣品貯存於70°C下，然後遵循製造商的說明書，使用ELISA試劑盒(Quidel，目錄號A015和A009)，來測定補體活化產物(C3a和sC5b-9)。

【0770】 實施例10

【0771】 本實施例描述了阻斷MASP-2活性的高親和力抗MASP-2 Fab2抗體片段的鑒定。

【0772】 背景和原理：MASP-2是複雜的蛋白質，具有許多分開的功能結構域，包括：MBL和纖維膠凝蛋白的結合位點、絲胺酸蛋白酶催化位點、蛋白酶解底物C2的結合位點、蛋白酶解底物C4的結合位點、MASP-2酶原的自活化

的MASP-2切割位點和兩個Ca^{++}結合位點。鑒定了以高親和力與MASP-2結合的Fab2抗體片段，並且在功能測定中測試了所鑒定的Fab2片段，以確定它們是否能夠阻斷MASP-2功能活性。

【0773】 為了阻斷MASP-2功能活性，抗體或Fab2抗體片段必須結合並干擾MASP-2上對於MASP-2功能活性必需的結構表位。因此，許多或所有高親和力結合抗MASP-2 Fab2可能並不抑制MASP-2功能活性，除非它們與MASP-2上直接涉及MASP-2功能活性的結構表位結合。

【0774】 測量凝集素途徑C3轉化酶形成的抑制的功能測定用於評估抗MASP-2 Fab2的“阻斷活性”。已知MASP-2在凝集素途徑中的主要生理作用是生成凝集素介導的補體途徑的下一個功能性組分，即凝集素途徑C3轉化酶。凝集素途徑C3轉化酶是關鍵的酶促複合物(C4bC2a)，其將C3蛋白酶解切割成C3a和C3b。MASP-2不是凝集素途徑C3轉化酶(C4bC2a)的結構組分；然而，需要MASP-2功能活性，以便生成構成凝集素途徑C3轉化酶的兩種蛋白質組分(C4b、C2a)。此外，上文列出的MASP-2的所有分開的功能活性似乎是必需的，以便使MASP-2用於生成凝集素途徑C3轉化酶。出於這些原因，認為用於評估抗MASP-2 Fab2的“阻斷活性”的優選測定是功能測定，其測量凝集素途徑C3轉化酶形成的抑制。

【0775】 高親和力Fab2的生成：人可變輕鏈和重鏈抗體序列的噬菌體展示文庫、以及用於鑒定與所選目的配體反應的Fab2的自動化抗體選擇技術，用於產生針對大鼠MASP-2蛋白(SEQ ID NO:55)的高親和力Fab2。已知量的大鼠MASP-2(~1 mg，>85%純的)蛋白用於抗體篩選。利用三輪擴增來選擇具有最佳

親和力的抗體。挑選表達抗體片段的大約250個不同命中，用於ELISA篩選。隨後對高親和力命中進行測序，以確定不同抗體的獨特性。

【0776】 純化了五十種獨特的抗MASP-2抗體，並且250 μg每種純化的Fab2抗體用於MASP-2結合親和力的表徵和補體途徑功能測試，如下文更詳細地描述的。

【0777】 用於評估抗MASP-2 Fab2的抑制(阻斷)活性的測定

【0778】 1. 測量凝集素途徑C3轉化酶形成的抑制的測定：

【0779】 背景：凝集素途徑C3轉化酶是酶促複合物(C4bC2a)，其將C3蛋白酶解切割成兩種有力的促炎片段：過敏毒素C3a和調理素C3b。就介導炎症而言，C3轉化酶的形成似乎是凝集素途徑中的關鍵步驟。MASP-2不是凝集素途徑C3轉化酶(C4bC2a)的結構組分；因此，抗MASP-2抗體(或Fab2)並不直接抑制預先存在的C3轉化酶的活性。然而，需要MASP-2絲胺酸蛋白酶活性，以便生成構成凝集素途徑C3轉化酶的兩種蛋白質組分(C4b、C2a)。因此，抑制MASP-2功能活性的抗MASP-2 Fab2(即，阻斷性抗MASP-2 Fab2)將抑制凝集素途徑C3轉化酶的從頭形成。C3含有罕見且高反應性的硫酯基團作為其結構的部分。在該測定中通過C3轉化酶切割C3後，C3b上的硫酯基可以與大分子上的羥基或胺基形成共價鍵，所述大分子經由酯或醯胺鍵合固定在塑料孔的底部上，因此促成在ELISA測定中的C3b檢測。

【0780】 酵母甘露聚糖是凝集素途徑的已知活化劑。在測量C3轉化酶形成的下述方法中，使包被有甘露聚糖的塑料孔與稀釋的大鼠血清在37ºC下一起溫育30分鐘，以活化凝集素途徑。然後將孔進行洗滌，並且使用標準ELISA方法測定固定在孔上的C3b。在該測定中生成的C3b的量是凝集素途徑C3轉化酶

的從頭形成的直接反映。以所選濃度的抗MASP-2 Fab2在該測定中就其抑制C3轉化酶形成和後續C3b生成的能力進行測試。

【0781】 方法：

【0782】 使96孔Costar Medium Binding板在5ºC下與以1 μg/50 μL/孔的甘露聚糖一起溫育過夜，所述甘露聚糖在50 mM碳酸鹽緩衝液，pH 9.5中進行稀釋。在過夜溫育後，每個孔用200 μL PBS洗滌3次。然後將孔用100 μL/孔的1%牛血清白蛋白的PBS溶液進行封閉，並且在室溫下伴隨輕柔混合溫育一小時。然後每個孔用200 μL PBS洗滌3次。抗MASP-2 Fab2樣品在5ºC下在含有Ca^{++}和Mg^{++}的GVB緩衝液(4.0 mM巴比妥、141 mM NaCl、1.0 mM $MgCl_2$、2.0 mM $CaCl_2$、0.1%明膠，pH 7.4)中稀釋至所選濃度。將0.5%大鼠血清在5ºC下加入上述樣品中，並且將100 μL轉移到每個孔中。將板覆蓋並且在37°C水浴中溫育30分鐘，以允許補體活化。通過將板從37ºC水浴轉移到含有冰水混合物的容器中，來終止反應。每個孔用200 μL PBS Tween 20(0.05% Tween 20的PBS溶液)洗滌5次，然後用200 μL PBS洗滌兩次。將100 μL/孔的1:10,000稀釋的一抗(兔抗人C3c，DAKO A0062)加入含有2.0 mg/ml牛血清白蛋白的PBS中，並且在室溫下伴隨輕柔混合溫育1小時。每個孔用5 x 200 μL PBS進行洗滌。將100 μL/孔的1:10,000稀釋的二抗(過氧化物酶綴合的山羊抗兔IgG，American Qualex A102PU)加入含有2.0 mg/ml牛血清白蛋白的PBS中，並且在室溫下在振盪器上伴隨輕柔混合溫育一小時。每個孔用200 μL PBS洗滌5次。加入100 μL/孔的過氧化物酶底物TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)，並且在室溫下溫育10分鐘。通過加入100 μL/孔的1.0 M H_3PO_4來終止過氧化物酶反應，並且測量OD_{450}。

【0783】 2. 測量MASP-2依賴性C4切割的抑制的測定

【0784】 背景：MASP-2的絲胺酸蛋白酶活性是高度特異性的，並且僅鑒定了MASP-2的兩種蛋白質底物：C2和C4。C4的切割生成C4a和C4b。抗MASP-2 Fab2可以與MASP-2上直接涉及C4切割的結構表位(例如，C4的MASP-2結合位點；MASP-2絲胺酸蛋白酶催化位點)結合，並且從而抑制MASP-2的C4切割功能活性。

【0785】 酵母甘露聚糖是凝集素途徑的已知活化劑。在測量MASP-2的C4切割活性的下述方法中，使包被有甘露聚糖的塑料孔與稀釋的大鼠血清在37ºC下一起溫育30分鐘，以活化凝集素途徑。由於這種ELISA測定中使用的一抗僅識別人C4，因此稀釋的大鼠血清中還補充有人C4(1.0 µg/ml)。然後將孔進行洗滌，並且使用標準ELISA方法測定固定在孔上的人C4b。在該測定中生成的C4b的量是MASP-2依賴性C4切割活性的量度。以所選濃度的抗MASP-2 Fab2在該測定中就其抑制C4b切割的能力進行測試。

【0786】 方法：使96孔Costar Medium Binding板在5ºC下與1.0 µg/50 µL/孔的甘露聚糖一起溫育過夜，所述甘露聚糖在50 mM碳酸鹽緩衝液，pH 9.5中進行稀釋。每個孔用200 µL PBS洗滌3X。然後將孔用100 µL/孔的1%牛血清白蛋白的PBS溶液進行封閉，並且在室溫下伴隨輕柔混合溫育一小時。每個孔用200 µL PBS洗滌3X。抗MASP-2 Fab2樣品在5ºC下在含有Ca^{++}和Mg^{++}的GVB緩衝液(4.0 mM巴比妥、141 mM NaCl、1.0 mM $MgCl_2$、2.0 mM $CaCl_2$、0.1%明膠，pH 7.4)中稀釋至所選濃度。這些樣品中還包括1.0 µg/ml人C4(Quidel)。將0.5%大鼠血清在5ºC下加入上述樣品中，並且將100 µL轉移到每個孔中。將板覆蓋並且在37°C水浴中溫育30分鐘，以允許補體活化。通過將板從37ºC水浴轉移到含

有冰水混合物的容器中，來終止反應。每個孔用5 x 200 μL PBS-Tween 20(0.05% Tween 20的PBS溶液)進行洗滌，每個孔然後用200 μL PBS洗滌2X。將100 μL/孔的1:700稀釋的生物素綴合的雞抗人C4c(Immunsystem AB，Uppsala，瑞典)加入含有2.0 mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的PBS中，並且在室溫下伴隨輕柔混合溫育一小時。每個孔用5 x 200 μL PBS進行洗滌。將100 μL/孔的0.1 μg/ml過氧化物酶綴合的鏈黴抗生物素蛋白(Pierce Chemical #21126)加入含有2.0 mg/ml BSA的PBS中，並且在室溫下在振盪器上伴隨輕柔混合溫育一小時。每個孔用5 x 200 μL PBS進行洗滌。加入100 μL/孔的過氧化物酶底物TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)，並且在室溫下溫育16分鐘。通過加入100 μL/孔的1.0 M H_3PO_4來終止過氧化物酶反應，並且測量OD_{450}。

【0787】 3. 抗大鼠MASP-2 Fab2與‘天然’大鼠MASP-2的結合測定

【0788】 背景：MASP-2通常作為MASP-2二聚體複合物存在於血漿中，所述複合物還包括特異性凝集素分子(甘露糖結合蛋白(MBL)和纖維膠凝蛋白)。因此，如果有興趣研究抗MASP-2 Fab2與MASP-2生理相關形式的結合，則重要的是開發這樣的結合測定，其中使用Fab2和血漿中的‘天然’MASP-2，而不是純化的重組MASP-2之間的相互作用。在這種結合測定中，首先將來自10%大鼠血清的‘天然’MASP-2 MBL複合物固定到甘露聚糖包被的孔上。然後使用標準ELISA方法，研究了各種抗MASP-2 Fab2與固定的‘天然’MASP-2的結合親和力。

【0789】 方法：使96孔Costar High Binding板在5ºC下與1 μg/50 μL/孔的甘露聚糖一起溫育過夜，所述甘露聚糖在50 mM碳酸鹽緩衝液，pH 9.5中進行稀釋。每個孔用200 μL PBS洗滌3X。將孔用100 μL/孔的0.5%脫脂奶粉的PBST(具

有0.05% Tween 20的PBS)溶液進行封閉，並且在室溫下伴隨輕柔混合溫育一小時。每個孔用200 μL TBS/Tween/Ca^{++}洗滌緩衝液(Tris緩衝鹽水，0.05% Tween 20，含有5.0 mM $CaCl_2$，pH 7.4)洗滌3X。在冰上製備在高鹽結合緩衝液(20 mM Tris、1.0 M NaCl、10 mM $CaCl_2$、0.05% Triton-X100、0.1%(w/v)牛血清白蛋白，pH 7.4)中的10%大鼠血清，加入100 μL/孔，並在5ºC下溫育過夜。孔用200 μL TBS/Tween/Ca^{++}洗滌緩衝液洗滌3X。孔隨後用200 μL PBS洗滌2X。加入100 μL/孔的所選濃度的抗MASP-2 Fab2，其在含有Ca^{++}和Mg^{++}的GVB緩衝液(4.0 mM巴比妥、141 mM NaCl、1.0 mM $MgCl_2$、2.0 mM $CaCl_2$、0.1%明膠，pH 7.4)中進行稀釋，並且在室溫下伴隨輕柔混合溫育一小時。每個孔用5 x 200 μL PBS進行洗滌。加入100 μL/孔的HRP綴合的山羊抗Fab2(Biogenesis，目錄號0500-0099)，其在2.0 mg/ml牛血清白蛋白的PBS溶液中進行1:5000稀釋，並且在室溫下伴隨輕柔混合溫育一小時。每個孔用5 x 200 μL PBS進行洗滌。加入100 μL/孔的過氧化物酶底物TMB(Kirkegaard & Perry Laboratories)，並且在室溫下溫育70分鐘。通過加入100 μL/孔的1.0 M H_3PO_4來終止過氧化物酶反應，並且測量OD_{450}。

【0790】結果：

【0791】挑選以高親和力與大鼠MASP-2蛋白反應的大約250種不同的Fab2，用於ELISA篩選。對這些高親和力的Fab2進行測序，以確定不同抗體的獨特性，並且純化了50種獨特的抗MASP-2抗體用於進一步分析。250 μg每種純化的Fab2抗體用於MASP-2結合親和力的表徵和補體途徑功能測試。這種分析的結果顯示於下表6中。

【0792】 表6：阻斷凝集素途徑補體活化的抗MASP-2 Fab2

Fab2 抗體#	C3 轉化酶 (IC_{50}(nM)	K_d	C4 切割 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

【0793】 如上表6中所示，在測試的50種抗MASP-2 Fab2中，17種Fab2被鑒定為MASP-2阻斷性Fab2，其有力地抑制C3轉化酶形成，具有等於或小於10 nM Fab2的IC_{50}(34%的陽性命中率)。鑒定的17種Fab2中的8種具有在亞納摩爾範圍內的IC_{50}。此外，表6中所示的所有17種MASP-2阻斷性Fab2，在凝集素途徑C3轉化酶測定中給出C3轉化酶形成的基本完全抑制。圖8A以圖形方式示出了，關於Fab2抗體#11的C3轉化酶形成測定的結果，所述Fab2抗體#11是所測試的其它Fab2抗體的代表，其結果顯示於表6中。這是重要的考慮因素，因為即

使當每個MASP-2分子由Fab2結合時，“阻斷” Fab2可能僅部分地抑制MASP-2功能，這在理論上是可能的。

【0794】 儘管甘露聚糖是凝集素途徑的已知活化劑，但大鼠血清中的抗甘露聚糖抗體的存在也可能活化經典途徑，並且經由經典途徑C3轉化酶生成C3b，這在理論上是可能的。然而，本實施例中列出的17種阻斷性抗MASP-2 Fab2各自有力地抑制C3b生成(>95%)，因此證實了該測定對於凝集素途徑C3轉化酶的特異性。

【0795】 還對所有17種阻斷性Fab2執行結合測定，以便計算關於各自的表觀K_d。表6中也顯示了關於六種阻斷性Fab2，抗大鼠MASP-2 Fab2與天然大鼠MASP-2的結合測定結果。圖8B以圖形方式示出了，用Fab2抗體#11的結合測定結果。還對於其它Fab2進行了類似的結合測定，其結果顯示於表6中。一般而言，對於6種Fab2各自與‘天然’MASP-2結合而獲得的表觀K_d，與C3轉化酶功能測定中關於Fab2的IC_{50}合理地良好對應。存在MASP-2在其蛋白酶活性活化後，經歷了從‘無活性’到‘活性’形式的構象變化的證據(Feinberg等人，EMBO J 22:2348-59(2003)；Gal等人，J. Biol. Chem. 280:33435-44(2005))。在用於C3轉化酶形成測定的正常大鼠血漿中，MASP-2主要以‘無活性’酶原構象存在。相比之下，在結合測定中，MASP-2作為複合物的部分存在，所述複合物具有與固定的甘露聚糖結合的MBL；因此，MASP-2處於‘活性’構象(Petersen等人，J. Immunol Methods 257:107-16，2001)。因而，對於在這兩種功能測定中測試的17種阻斷性Fab2中的每種，不一定預計IC_{50}與K_d之間的確切對應，因為在每種測定中，Fab2結合不同構象形式的MASP-2。然而，除了Fab2 #88之外，對於在

兩種測定中測試的其它16種Fab2中的每種，IC_{50}與表觀Kd之間似乎存在合理地緊密對應(參見表6)。

【0796】 幾種阻斷性Fab2就MASP-2介導的C4切割的抑制進行評估。圖8C以圖形方式示出了C4切割測定的結果，顯示了用Fab2 #41的抑制，具有IC_{50}=0.81 nM(參見表6)。如圖9中所示，所有測試的Fab2被發現抑制C4切割，其IC_{50}與C3轉化酶測定中獲得的IC_{50}相似(參見表6)。

【0797】 儘管甘露聚糖是凝集素途徑的已知活化劑，但大鼠血清中的抗甘露聚糖抗體的存在也可能活化經典途徑，並且從而通過C1s介導的C4切割而生成C4b，這在理論上是可能的。然而，已鑒定了幾種抗MASP-2 Fab2，其有力地抑制C4b生成(>95%)，因此證實了這種測定對於MASP-2介導的C4切割的特異性。如同C3，C4含有罕見且高反應性的硫酯基團作為其結構的部分。在該測定中通過MASP-2切割C4後，C4b上的硫酯基可以與大分子上的羥基或胺基形成共價鍵，所述大分子經由酯或醯胺鍵固定在塑料孔的底部上，因此促成在ELISA測定中的C4b檢測。

【0798】 這些研究明確地證實針對大鼠MASP-2蛋白的高親和力Fab2的產生，所述Fab2在功能上阻斷C4和C3轉化酶活性兩者，從而防止了凝集素途徑活化。

【0799】 實施例11

【0800】 本實施例描述了關於幾種阻斷性抗大鼠MASP-2 Fab2抗體的表位作圖，所述抗體如實施例10中所述生成。

【0801】 方法：

【0802】 如圖10中所示，使用pED4載體，在CHO細胞中表達全部具有N末端6X His標簽的下述蛋白質：

【0803】 大鼠MASP-2A，通過將在活性中心處的絲胺酸改變為丙胺酸(S613A)而失活的全長MASP-2蛋白；

【0804】 大鼠MASP-2K，進行改變以降低自活化(R424K)的全長MASP-2蛋白；

【0805】 CUBI-II，大鼠MASP-2的N末端片段，其僅含有CUBI、EGF樣和CUBII結構域；和

【0806】 CUBI/EGF樣，大鼠MASP-2的N末端片段，其僅含有CUBI和EGF樣結構域。

【0807】 如先前所述(Chen等人，J. Biol. Chem. 276:25894-02(2001))，通過鎳親和層析，從培養上清液中純化這些蛋白質。

【0808】 使用pTrxFus(Invitrogen)，含有大鼠MASP-2的CCPII和絲胺酸蛋白酶結構域的C末端多肽(CCPII-SP)，作為硫氧還蛋白融合蛋白在大腸桿菌中進行表達。使用Thiobond親和樹脂，從細胞裂解產物中純化蛋白質。硫氧還蛋白融合配偶體作為陰性對照由空pTrxFus進行表達。

【0809】 將所有重組蛋白質透析到TBS緩衝液內，並且通過測量在280 nm處的OD來確定其濃度。

【0810】 斑點印跡分析：

【0811】 將上文描述和圖10中所示的5種重組MASP-2多肽(以及作為用於CCPII-絲胺酸蛋白酶多肽的陰性對照的硫氧還蛋白多肽)的系列稀釋物，點樣到硝酸纖維素膜上。點樣的蛋白質的量範圍從100 ng到6.4 pg，在五倍步驟中。在

以後的實驗中，點樣的蛋白質的量範圍從50 ng下降到16 pg，再次在五倍步驟中。膜用5%脫脂奶粉的TBS(封閉緩衝液)溶液進行封閉，然後與在封閉緩衝液(含有5.0 mM Ca^{2+})中的1.0 μg/ml抗MASP-2 Fab2一起溫育。使用HRP綴合的抗人Fab(AbD/Serotec；1/10,000稀釋的)和ECL檢測試劑盒(Amersham)，來檢測結合的Fab2。一種膜與作為陽性對照的多選殖兔抗人MASP-2 Ab(在Stover等人，J Immunol 163:6848-59(1999)中進行描述)一起溫育。在這種情況下，使用HRP綴合的山羊抗兔IgG(Dako；1/2,000稀釋的)檢測結合的Ab。

【0812】 MASP-2結合測定

【0813】 ELISA板在4ºC下用在碳酸鹽緩衝液(pH 9.0)中的1.0 μg/孔的重組MASP-2A或CUBI-II多肽包被過夜。將孔用1% BSA的TBS溶液進行封閉，然後將抗MASP-2 Fab2的系列稀釋物加入含有5.0 mM Ca^{2+}的TBS中。使板在RT下溫育一小時。在用TBS/tween/Ca^{2+}洗滌3次後，加入在TBS/Ca^{2+}中1/10,000稀釋的HRP綴合的抗人Fab(AbD/Serotec)，並且使板在RT下進一步溫育一小時。使用TMB過氧化物酶底物試劑盒(Biorad)來檢測結合的抗體。

【0814】 結果：

【0815】 下表7中提供了證實Fab2與各種MASP-2多肽的反應性的斑點印跡分析結果。表7中提供的數值指示了，得到大約一半最大信號強度所需的點樣的蛋白質的量。如所示的，所有多肽(除了單獨的硫氧還蛋白融合配偶體之外)都被陽性對照Ab(兔中產生的多選殖抗人MASP-2血清)識別。

【0816】 表7：在斑點印跡上與各種重組大鼠MASP-2多肽的反應性

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

【0817】 NR = 無反應。陽性對照抗體是在兔中產生的多選殖抗人MASP-2血清。

【0818】 所有Fab2都與MASP-2A以及MASP-2K反應(數據未顯示)。大多數Fab2識別CCPII-SP多肽，但不識別N末端片段。Fab2 #60和Fab2 #57是兩個例外。Fab2 #60識別MASP-2A和CUBI-II片段，但不識別CUBI/EGF樣多肽或CCPII-SP多肽，提示了它與CUBII中或跨越CUBII和EGF樣結構域的表位結合。Fab2 # 57識別MASP-2A，但不識別任何測試的MASP-2片段，指示了這種Fab2識別CCP1中的表位。Fab2 #40和#49僅與完整MASP-2A結合。在圖11中所示的ELISA結合測定中，Fab2 #60也與CUBI-II多肽結合，儘管具有略微更低的表觀親和力。

【0819】 這些發現證實了針對MASP-2蛋白的多重區域的獨特阻斷性Fab2的鑒定。

【0820】 實施例12

【0821】 本實施例描述了使用噬菌體展示的全人scFv抗體鑒定，所述全人scFv抗體與MASP-2結合並抑制凝集素介導的補體活化，同時使免疫系統的經典(C1q依賴性)途徑組分保持原樣。

【0822】 概述：

【0823】 通過篩選噬菌體展示文庫，鑒定了全人的高親和力MASP-2抗體。抗體的可變輕鏈和重鏈片段以scFv形式和全長IgG形式兩者進行分離。人MASP-2抗體可用於抑制與凝集素途徑介導的補體途徑活化相關的細胞損傷，同時使免疫系統的經典(C1q依賴性)途徑組分保持原樣。在一些實施方案中，主題MASP-2抑制性抗體具有下述特徵：(a)對於人MASP-2的高親和力(例如，10 nM或更小的K_D)，和(b)抑制90%人血清中的MASP-2依賴性補體活性，其IC_{50}為30 nM或更小。

【0824】 方法：

【0825】 全長無催化活性的MASP-2的表達：

【0826】 將編碼具有前導序列的人MASP-2多肽(SEQ ID NO:5)的人MASP-2的全長cDNA序列(SEQ ID NO:4)，亞選殖到哺乳動物表達載體pCI-Neo(Promega)內，所述表達載體在CMV增強子/啟動子區的控制下，驅動真核生物表達(在Kaufman R.J.等人，Nucleic Acids Research 19:4485-90，1991；Kaufman，Methods in Enzymology，185:537-66(1991)中進行描述)。

【0827】 為了生成無催化活性的人MASP-2A蛋白，如在此引入本文作為參考的US2007/0172483中所述進行定點誘變。PCR產物在瓊脂糖凝膠電泳和條帶製備後進行純化，並且使用標準加尾程序生成單個腺苷重疊。然後將腺苷加尾的MASP-2A選殖到pGEM-T easy載體內，並且轉化到大腸桿菌內。將人MASP-2A進一步亞選殖到哺乳動物表達載體pED或pCI-Neo內。

【0828】 使用標準磷酸鈣轉染程序(Maniatis等人，1989)，將上述MASP-2A表達構建體轉染到DXB1細胞內。MASP-2A在無血清培養基中產生，以確保製劑不被其它血清蛋白質污染。每隔一天從融合細胞中收穫培養基(總共四次)。重組MASP-2A的水平平均起來大約1.5 mg/L培養基。通過在MBP-A瓊脂糖柱上的親和層析，來純化MASP-2A(上述Ser-Ala突變體)

【0829】 關於通過淘選/scFv轉換和過濾篩選鑒定的ScFv候選選殖的MASP-2A ELISA

【0830】 使人免疫球蛋白輕鏈和重鏈可變區序列的噬菌體展示文庫經受抗原淘選，隨後為自動化抗體篩選和選擇，以鑒定針對人MASP-2蛋白的高親和力scFv抗體。進行scFv噬菌體文庫針對加上HIS標簽或加上生物素標簽的MASP-2A的三輪淘選。第三輪淘選首先用MBL進行洗脫，然後用TEA(鹼性)進行洗脫。為了監測展示針對靶MASP-2A的scFv片段的噬菌體的特異性富集，進行了針對固定的MASP-2A的多選殖噬菌體ELISA。將來自第3輪淘選的scFv基因選殖到pHOG表達載體內，並且在小規模過濾篩選中運行，以尋找針對MASP-2A的特異性選殖。

【0831】 挑選含有編碼來自第三輪淘選的scFv片段的質粒的細菌菌落，在硝酸纖維素膜上柵格化(gridded)，並且在非誘導培養基上生長過夜，以產生母

板(master plate)。從第三輪淘選中挑選並分析了總共18,000個菌落，一半來自競爭性洗脫，且一半來自隨後的TEA洗脫。scFv噬菌粒文庫針對MASP-2A的淘選，隨後為scFv轉換和過濾篩選，產生了137個陽性選殖。108/137個選殖在ELISA測定中對於MASP-2結合呈陽性(數據未顯示)，其中45個選殖進一步分析了阻斷正常人血清中的MASP-2活性的能力。

【0832】 測量凝集素途徑C3轉化酶形成的抑制的測定

【0833】 測量凝集素途徑C3轉化酶形成的抑制的功能測定用於評估抗MASP-2 scFv候選選殖的“阻斷活性”。 需要MASP-2絲胺酸蛋白酶活性，以便生成構成凝集素途徑C3轉化酶的兩種蛋白質組分(C4b、C2a)。因此，抑制MASP-2功能活性的抗MASP-2 scFv(即，阻斷性MASP-2 scFv)將抑制凝集素途徑C3轉化酶的從頭形成。C3含有罕見且高反應性的硫酯基團作為其結構的部分。在該測定中通過C3轉化酶切割C3後，C3b上的硫酯基可以與大分子上的羥基或胺基形成共價鍵，所述大分子經由酯或醯胺鍵固定在塑料孔的底部上，因此促成在ELISA測定中的C3b檢測。

【0834】 酵母甘露聚糖是凝集素途徑的已知活化劑。在測量C3轉化酶形成的下述方法中，使包被有甘露聚糖的塑料孔與稀釋的人血清一起溫育，以活化凝集素途徑。然後將孔進行洗滌，並且使用標準ELISA方法測定固定在孔上的C3b。在該測定中生成的C3b的量是凝集素途徑C3轉化酶的從頭形成的直接反映。以所選濃度的MASP-2 scFv選殖在該測定中就其抑制C3轉化酶形成和後續C3b生成的能力進行測試。

【0835】 方法：

【0836】將如上所述鑒定的45個候選選殖表達，純化並稀釋至相同的原液濃度，其再次在含有Ca^{++}和Mg^{++}的GVB緩衝液(4.0 mM巴比妥、141 mM NaCl、1.0 mM $MgCl_2$、2.0 mM $CaCl_2$、0.1%明膠，pH 7.4)中進行稀釋，以確保所有選殖都具有相同量的緩衝。scFv選殖各自以2 μg/mL的濃度一式三份進行測試。陽性對照是OMS100 Fab2，且以0.4 μg/mL進行測試。在scFv/IgG選殖的存在和不存在下監測C3c形成。

【0837】將甘露聚糖在50mM碳酸鹽緩衝液(15mM Na_2CO_3 + 35mM $NaHCO_3$ + 1.5 mM NaN_3)，pH 9.5中稀釋至20 μg/mL(1 μg/孔)的濃度，並且在ELISA板上在4ºC下包被過夜。第二天，甘露聚糖包被的板用200 μl PBS洗滌3次。然後將100 μl的1% HSA封閉溶液加入孔中，並在室溫下溫育1小時。板用200 μl PBS洗滌3次，並且用200 μl PBS貯存於冰上直至加入樣品。

【0838】將正常人血清在CaMgGVB緩衝液中稀釋至0.5%，並且將scFv選殖或OMS100 Fab2陽性對照以0.01 μg/mL一式三份加入；向該緩衝液中加入1 μg/mL(僅OMS100對照)和10 μg/mL，並且在冰上預溫育45分鐘，然後加入封閉的ELISA板中。反應通過在37ºC下溫育一小時來啟動，並且通過將板轉移到冰浴而終止。用兔α-小鼠C3c抗體，隨後為山羊α-兔HRP檢測山羊C3b沉積。陰性對照是無抗體的緩衝液(無抗體 = 最大C3b沉積)，並且陽性對照是具有EDTA的緩衝液(無C3b沉積)。通過進行相同的測定來確定背景，除了不含甘露聚糖的孔之外。從含甘露聚糖的孔中的信號中扣除針對不含甘露聚糖的板的背景信號。截斷標準設定為無關scFv選殖(VZV)和單獨緩衝液的活性的一半。

【0839】結果：基於截斷標準，發現總共13個選殖阻斷了MASP-2的活性。選擇並測序產生> 50%途徑壓制的所有13個選殖，得到10個獨特的選殖。

發現所有十個選殖都具有相同的輕鏈亞類λ3，但具有三個不同的重鏈亞類：VH2、VH3和VH6。在功能測定中，使用0.5%人血清，十個候選scFv選殖中的五個給出小於25 nM靶標準的IC_{50} nM值。

【0840】 為了鑒定具有改善效力的抗體，使如上所述鑒定的三個母scFv選殖經受輕鏈改組。這個過程涉及組合文庫的生成，所述組合文庫由與衍生自6個健康供體的首次用於實驗的、人λ輕鏈(VL)文庫配對的每個母選殖的VH組成。然後在該文庫中篩選具有改善的結合親和力和/或功能性的scFv選殖。

【0841】 表8：前導子選殖及其各自的母選殖(都採取scFv形式)的IC_{50}(nM)中的功能效力比較

scFv 選殖	1%人血清 C3 測定 (IC_{50} nM)	90%人血清 C3 測定 (IC_{50} nM)	90%人血清 C4 測定 (IC_{50} nM)
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

【0842】 下文呈現的是關於上表8中所示的母選殖和子選殖的重鏈可變區(VH)序列。

【0843】 Kabat CDR(31-35(H1)、50-65(H2)和95-107(H3))是粗體的；並且Chothia CDR(26-32(H1)、52-56(H2)和95-101(H3))是加下劃線的。

【0844】 17D20_35VH-21N11VL重鏈可變區(VH)(SEQ ID NO:67，由SEQ ID NO:66編碼)

【0845】 QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS**RG**KMGVSWIRQP PGKALEW**LA**HIFSS**DEKSYRTSLK**SRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTA T**YYCARIRRGGIDY**WGQGTLVTVSS

【0846】 d17N9重鏈可變區(VH)(SEQ ID NO:68)

【0847】 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSS**TSAA**WNWIRQSP SRGLEW**LGRTYYRSKWYNDYAV**SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT **AVYYCARDPFGVPFDI**WGQGTMVTVSS

【0848】 下文呈現的是關於上表8中所示的母選殖和子選殖的輕鏈可變區(VL)序列。

【0849】 Kabat CDR(24-34(L1)；50-56(L2)；和89-97(L3)是粗體的；並且Chothia CDR(24-34(L1)；50-56(L2)和89-97(L3)是加下劃線的。無論是通過Kabat系統還是通過Chothia系統編號，這些區域都是相同的。

【0850】 17D20m_d3521N11輕鏈可變區(VL)(SEQ ID NO:69，由SEQ ID NO:70編碼)

【0851】 QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS**GEKLGDKYAYW**YQQKPGQS PVLVMYQ**DKQRPSG**IPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ**AWDSS TAVF**GGGTKLTVL

【0852】 17N16m_d17N9輕鏈可變區(VL)(SEQ ID NO:71)

【0853】 SYELIQPPSVSVAPGQTATITCA**GDNLGKKRVHW**YQQRPGQ APVLVIYD**DSDRPSG**IPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQ**VWDIA TDHV**VFGGGTKLTVLAAAGSEQKLISE

【0854】 已被證實以高親和力與人MASP-2結合，並且具有阻斷功能性補體活性的能力的MASP-2抗體OMS100和MoAb_d3521N11VL(包含如SEQ ID

NO:67所示的重鏈可變區以及如SEQ ID NO:69所示的輕鏈可變區，也稱為“OMS646”和“mAb6”)，通過斑點印跡分析就表位結合進行分析。結果顯示了，OMS646和OMS100抗體對於MASP-2是高度特異性的，並且不與MASP-1/3結合。抗體既不與MAp19結合，也不與不含MASP-2的CCP1結構域的MASP-2片段結合，導致結合位點包含CCP1的結論。

【0855】 當與C1s、C1r或MASP-1進行比較時，MASP-2抗體OMS646確定為以>5000倍的選擇性，與重組MASP-2親合地結合(Kd 60-250pM)(參見下表9)：

【0856】 表9：如通過固相ELISA研究評價的，OMS646 MASP-2抗體-MASP-2相互作用的親和力和特異性

抗原	K_D(pM)
MASP-1	>500,000
MASP-2	62±23*
MASP-3	>500,000
純化的人C1r	>500,000
純化的人C1s	~500,000

【0857】 *平均值±SD；n=12

【0858】 OMS646特異性阻斷末端補體組分的凝集素依賴性活化

【0859】 方法：

【0860】 使用凝集素途徑、經典途徑和替代途徑的途徑特異性條件，分析了OMS646對膜攻擊複合物(MAC)沉積的作用。為此，遵循製造商的說明書，使用Wieslab Comp300補體篩選試劑盒(Wieslab，Lund，瑞典)。

【0861】 結果：

【0862】 圖12A以圖形方式示出了，在凝集素途徑特異性測定條件下，在抗MASP-2抗體(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉積水平。圖12B以圖形方式示出了，在經典途徑特異性測定條件下，在抗MASP-2抗體(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉積水平。圖12C以圖形方式示出了，在替代途徑特異性測定條件下，在抗MASP-2抗體(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉積水平。

【0863】 如圖12A中所示，OMS646阻斷凝集素途徑介導的MAC沉積活化，其IC_{50}值為大約1 nM。然而，OMS646對由經典途徑介導的活化(圖12B)或替代途徑介導的活化(圖12C)生成的MAC沉積沒有作用。

【0864】 在靜脈內(IV)或皮下(SC)施用於小鼠之後，OMS646的藥代動力學和藥效學

【0865】 在小鼠中的28天單一劑量PK/PD研究中，評估了OMS646的藥代動力學(PK)和藥效學(PD)。該研究測試了皮下(SC)施用的5mg/kg和15mg/kg OMS646的劑量水平，以及靜脈內(IV)施用的5mg/kg OMS646的劑量水平。

【0866】 關於OMS646的PK概況，圖13以圖形方式示出了，在以指示劑量施用OMS646後，根據時間的OMS646濃度(n=3只動物/組的平均值)。如圖13中所示，在5mg/kg SC下，OMS646在給藥後大約1-2天達到5-6 μg/mL的最大血漿濃度。OMS646在5 mg/kg SC下的生物利用度為大約60%。如圖13中進一步所示，在15 mg/kg SC下，OMS646在給藥後大約1至2天達到10-12 μg/mL的最大血

漿濃度。對於所有組，OMS646從全身循環中緩慢清除，具有大約8-10天的終末半衰期。OMS646的概況對於小鼠中的人抗體是典型的。

【0867】 OMS646的PD活性在圖14A和14B中以圖示方式示出。圖14A和14B顯示了對於5mg/kg IV(圖14A)和5mg/kg SC(圖14B)組中的每只小鼠的PD應答(系統性凝集素途徑活性的下降)。虛線指示了測定的基線(最大抑制；在測定前在體外用過量OMS646摻料的首次用於實驗的小鼠血清)。如圖14A中所示，在5mg/kg OMS646的IV施用之後，系統性凝集素途徑活性立即下降至接近無法檢測的水平，並且經過28天的觀察期，凝集素途徑活性僅顯示適度的恢復。如圖14B中所示，在用5mg/kg OMS646 SC給藥的小鼠中，觀察到凝集素途徑活性的時間依賴性抑制。凝集素途徑活性在藥物施用的24小時內下降至接近無法檢測的水平，並且保持在低水平下至少7天。凝集素途徑活性隨著時間過去逐漸增加，但在28天的觀察期內，並未恢復到劑量前水平。在15mg/kg SC施用後觀察到的凝集素途徑活性相對於時間曲線，類似於5mg/kg SC劑量(數據未顯示)，指示了PD終點的飽和。數據進一步指示了，IV和SC施用的5mg/kg OMS646的每週一次劑量，足以實現小鼠中的系統性凝集素途徑活性的連續壓制。

【0868】 實施例13

【0869】 本實施例描述了抑制MASP-2的重組抗體的生成，所述重組抗體包括包含一個或多個cDNA的重鏈和/或輕鏈可變區，所述CDR與MASP-2和至少一個SGMI核心肽序列特異性結合(也稱為荷有SGMI肽的MASP-2抗體或其抗原結合片段)。

【0870】 背景/原理：

【0871】 稱為SGMI-2的MASP-2特異性抑制劑的生成在Heja等人，J Biol Chem 287:20290(2012)和Heja等人，PNAS 109:10498(2012)中進行描述，所述參考文獻各自在此引入本文作為參考。SGMI-2是36胺基酸的肽，其選自沙漠蝗蟲(Schistocerca gregaria)蛋白酶抑制劑2的變體的噬菌體文庫，其中蛋白酶結合環的八個位置中的六個是完全隨機化的。隨後的體外進化得到具有單位數nM K_I值的單特異性抑制劑(Heja等人，J. Biol. Chem. 287:20290，2012)。結構研究揭示了，優化的蛋白酶結合環形成了主要的結合位點，其限定了兩種抑制劑的特異性。延伸的二級和內部結合區的胺基酸序列是兩種抑制劑共有的，並且促成接觸界面(Heja等人，2012. J. Biol. Chem. 287:20290)。在機制上，SGMI-2阻斷補體活化的凝集素途徑，而不影響經典途徑(Heja等人，2012. Proc. Natl. Acad. Sci. 109:10498)。

【0872】 SGMI-2抑制劑的胺基酸序列在下文闡述：

【0873】 SGMI-2-全長：

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ(SEQ ID NO:72)

【0874】 SGMI-2-中等：

TCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ(SEQ ID NO:73)

【0875】 SGMI-2-短：……TCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ(SEQ ID NO:74)

【0876】 如本實施例中所述以及WO2014/144542中所述，通過將SGMI-2肽胺基酸序列(例如，SEQ ID NO:72、73或74)融合到人MASP-2抗體的重鏈和/或輕鏈的胺基或羧基末端上，來生成荷有SGMI-2肽的MASP-2抗體及其片段。

如WO2014/144542中所述，當在使用人血清的C3b或C4b沉積測定中進行測量時，與不含SGMI-2肽序列的裸露的MASP-2支架抗體相比，荷有SGMI-2肽的MASP-2抗體和片段具有增強的抑制活性，並且當在體內小鼠模型中進行測量時，與裸露的MASP-2支架抗體相比，還具有增強的抑制活性。下文描述了生成荷有SGMI-2肽的MASP-2抗體的方法。

【0877】 方法：

【0878】 生成表達構建體，以編碼四種示例性荷有SGMI-2肽的MASP-2抗體，其中SGMI-2肽與代表性MASP-2抑制性抗體OMS646的重鏈或輕鏈的N末端或C末端融合(如實施例12中所述生成)。

【0879】 表10：MASP-2抗體/SGMI-2融合物

抗體參考	在抗體上的肽定位				SEQ ID NO:
	H-N	H-C	L-N	L-C	
HL-M2 (裸的 MASP-2 OMS646)	-	-	-	-	67 + 70
H-M2-SGMI-2-N	SGMI-2	-	-	-	75 + 70
H-M2-SGMI-2-C	-	SGMI-2	-	-	76 +70
L-M2-SGMI-2-N	-	-	SGMI-2	-	67+ 77
L-M2-SGMI-2-C	-	-	-	SGMI-2	67+ 78

【0880】 表10中的縮寫：

【0881】 “H-N”=重鏈的胺基末端

【0882】 “H-C”=重鏈的羧基末端

【0883】 “L-N”=輕鏈的胺基末端

【0884】 “L-C”=輕鏈的羧基末端

【0885】 “M2”=MASP-2 ab支架(代表性OMS646)

【0886】 對於表10中所示的N末端融合，在SGMI-2肽和可變區之間添加了肽接頭(‘GTGGGSGSSS’ SEQ ID NO: 79)。

【0887】 對於表10中所示的C末端融合，在恒定區和SGMI-2肽之間添加了肽接頭(‘AAGGSG’ SEQ ID NO: 80)，並且在融合多肽的C末端處添加了第二肽“GSGA”(SEQ ID NO:81)，以保護C末端SGMI-2肽免受降解。

【0888】 下文提供了下述代表性MASP-2抗體/SGMI-2融合物的胺基酸序列：

【0889】 H-M2ab6-SGMI-2-N(SEQ ID NO:75，由SEQ ID NO:82編碼)：

【0890】 LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGGSGSSSQVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKALEWLAHIFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARIRRGGIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

【0891】 [491 aa蛋白，aa 1-36=SGMI-2(加下劃線的)，aa37-46 =接頭(斜體的)；aa47-164=MASP-2 ab#6的重鏈可變區(加下劃線的)；aa165-491 =具有鉸鏈突變的IgG4恒定區。]

【0892】 H-M2ab6-SGMI-2-C(SEQ ID NO:76，由SEQ ID NO:83編碼)：

【0893】 QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPP GKALEWLAHIFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATY YCARIRRGGIDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTC NVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKAAGGSGLEVTCEPGT TFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

【0894】 [491aa蛋白，aa1-118=MASP-2 ab#6的重鏈可變區(加下劃線的)；aa 119-445=具有鉸鏈突變的IgG4恒定區；aa 446-451 =第1接頭(斜體的)；aa 452-487=SGMI-2；aa488-491=第2接頭(斜體的)。]

【0895】 L-M2ab6-SGMI-2-N(SEQ ID NO:77，由SEQ ID NO:84編碼)：

【0896】 LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGTGGG SGSSSQPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVM YQDKQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGG GTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD SSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS

【0897】 [258aa蛋白，aa1-36=SGMI-2(加下劃線的)；aa37-46=接頭(斜體的)；aa47-152=MASP-2 ab#6的輕鏈可變區(加下劃線的)；aa153-258 =人Igλ恒定區]

【0898】 L-M2ab6-SGMI-2-C(SEQ ID NO:78，由SEQ ID NO:85編碼)：

【0899】 QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVMYQDKQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSAAGGSGLEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQGSGA

【0900】 [258aa蛋白，aa1-106=MASP-2 ab#6的輕鏈可變區(加下劃線的)；aa 107-212=人Igλ恒定區；aa 213-218=第1接頭；aa219-254=SGMI-2；aa255-258=第2接頭]

【0901】 功能測定：

【0902】 四種MASP-2-SGMI-2融合抗體構建體在Expi293F細胞(Invitrogen)中進行瞬時表達，通過蛋白A親和層析進行純化，並且在如下所述的甘露聚糖包被的珠測定中，在10%正常人血清中測試C3b沉積的抑制。

【0903】 在甘露聚糖包被的珠測定中，測試MASP-2-SGMI-2融合物的C3b沉積

【0904】 在甘露聚糖包被的珠上的C3b沉積測定中，就凝集素途徑抑制評價MASP-2-SGMI-2融合抗體。通過流式細胞術確定活性程度的這種測定，提供了比Wieslab®測定更高的分辨率。凝集素途徑珠測定如下進行：在碳酸鹽-碳酸

氫鹽緩衝液(pH 9.6)中，將甘露聚糖在4ºC下吸附到直徑7 μM的聚苯乙烯珠(Bangs Laboratories；Fishers，IN，USA)過夜。將珠在PBS中進行洗滌，並且暴露於10%人血清或者與抗體或抑制劑預溫育的10%血清。血清-珠混合物在室溫下在攪動的同時溫育一小時。在血清溫育之後，將珠洗滌，並且通過用抗C3c兔多選殖抗體(Dako North America；Carpinteria，CA，USA)、以及PE-Cy5綴合的山羊抗兔二抗(Southern Biotech；Birmingham，AL，USA)的檢測，來測量珠上的C3b沉積。在染色程序之後，使用FACSCalibur流式細胞儀分析珠。使用前向散射和側向散射將珠門控為均勻群體，並且C3b沉積明顯為FL3陽性顆粒(FL-3或“FL-3通道”指示細胞儀上的第3通道或紅色通道)。相對於抗體/抑制劑濃度，繪製群體對於每種實驗條件的幾何平均熒光強度(MFI)，以評估凝集素途徑抑制。

【0905】 使用GraphPad PRISM軟件計算IC_{50}值。具體地，通過應用可變斜率(四參數)、對數非線性擬合(抗體)相對於從細胞計數測定獲得的平均熒光強度曲線，來獲得IC_{50}值。

【0906】 結果顯示於表11。

【0907】 表11：在10%人血清中的C3b沉積(甘露聚糖包被的珠測定)

構建體	IC_{50}(nM)
裸的N2 ab(mAb#6)	≥ 3.63 nM
H-M2-SGMI-2-N	2.11 nM
L-M2-SGMI-2-C	1.99 nM
H-M2-SGMI-2-N	2.24 nM

L-M2-SGMI-2-N	3.71 nM

【0908】 結果：

【0909】 對照，不含SGMI的MASP-2“裸”支架抗體(mAb#6)，在該測定中是抑制性的，具有≥ 3.63 nM的IC50值，其與實施例12中觀察到的抑制結果一致。值得注意的是，如表11中所示，所有測試的SGMI-2-MASP-2抗體融合物在該測定中都改善了MASP-2支架抗體的效力，提示了增加的效價也可能在C3b沉積的抑制中是有益的。

【0910】 在用10%人血清的甘露聚糖包被的珠測定中，測試MASP-2-SGMI-2融合物的C4b沉積測定

【0911】 使用與上文對於C3b沉積測定描述的相同的測定條件，伴隨下述修改，用10%人血清進行C4b沉積測定。在流式細胞術分析之前，通過用抗C4b小鼠單選殖抗體(1:500，Quidel)對沉積反應進行染色，並且用與PE Cy5綴合的二級山羊抗小鼠F(ab')2(1:200，Southern Biotech)染色，來進行C4b檢測和流式細胞術分析。

【0912】 結果：

【0913】 與MASP-2支架抗體(HL-M2：IC50=0.78nM)相比，荷有SGMI-2-的MASP-2-N末端抗體融合物(H-M2-SGMI-2-N: IC50=0.34nM)、L-M2-SGMI-2-N: IC50=0.41 nM))具有增加的效力。

【0914】 類似地，與MASP-2支架抗體(HL-M2: IC_{50}=1.2 nM)相比，荷有單個SGMI-2的C末端MASP-2抗體融合物(H-M2-SGMI-2-C: IC_{50}=0.45nM和L-M2-SGMI-2C: IC_{50}=0.47 nM)兩者均具有增加的效力。

【0915】 在用10%小鼠血清的甘露聚糖包被的珠測定中，測試MASP-2-SGMI-2融合物的C3b沉積。

【0916】 如上所述，用10%小鼠血清進行關於C3b沉積的甘露聚糖包被的珠測定。與在人血清中觀察到的結果相似，確定與小鼠血清中的MASP-2支架抗體相比，荷有SGMI-2的MASP-2融合物具有增加的效力。

【0917】 結果概括：本實施例中的結果證實了，所有測試的SGMI-2-MASP-2抗體融合物都改善了MASP-2支架抗體的效力。

【0918】 實施例14

【0919】 本實施例提供了使用在MASP-2 -/-缺陷和MASP-2 +/+充分的小鼠中的腎纖維化的單側輸尿管梗阻(UUO)模型生成的結果，以評估凝集素途徑在腎纖維化中的作用。

【0920】 背景/原理：

【0921】 腎纖維化和炎症是晚期腎臟疾病的佔優勢特徵。腎小管間質性纖維化是進行性過程，涉及持續的細胞損傷、異常癒合、駐留和浸潤性腎細胞的活化、細胞因子釋放、炎症和腎細胞的表型活化以產生細胞外基質。腎小管間質性(TI)纖維化是多重腎病理狀況的共同終點，並且代表了旨在預防慢性腎臟疾病(CKD)中的進行性腎功能受損的潛在療法的關鍵靶。腎TI損傷與腎小球疾病中的腎功能下降密切聯繫(Risdon R.A.等人，Lancet 1: 363-366，1968；Schainuck L.I.等人，Hum Pathol 1: 631-640，1970；Nath K.A.，Am J Kid Dis 20:1-17，1992)，並且是CKD特有的，其中存在肌成纖維細胞的積累，並且小管和小管周圍毛細血管之間的潛在空間變得被基質佔據，所述基質由膠原和其它蛋白聚糖組成。TI肌成纖維細胞的起源仍然存在激烈爭議，但纖維化一般在

炎症之前，最初的特徵在於T淋巴細胞的TI積累，且以後的特徵在於巨噬細胞(Liu Y.等人，Nat Rev Nephrol 7:684-696，2011；Duffield J.S.，J Clin Invest 124:2299-2306，2014)。

【0922】 UUO的齧齒類動物模型生成進行性腎纖維化，實際上任何病因的進行性腎疾病的標誌(Chevalier等人，Kidney International 75:1145-1152，2009)。已報告，C3基因表達在UUO之後的野生型小鼠中增加，並且與野生型小鼠相比，膠原沉積在UUO之後的C3-/-敲除小鼠中顯著降低，提示了補體活化在腎纖維化中的作用(Fearn等人，Mol Immunol 48:1666-1733，2011)。還已報告，在小管間質性損傷的模型中，C5缺乏導致腎纖維化的主要組分的顯著改善(Boor P.等人，J of Am Soc of Nephrology: 18:1508-1515，2007)。然而，在通過本發明人進行的本文所述的研究之前，涉及腎纖維化的特定補體組分尚未明確定義。因此，進行了下述研究，以評估單側輸尿管梗阻(UUO)模型中的MASP-2(-/-)和MASP-2(+/+)雄性小鼠。

【0923】 方法：

【0924】 MASP-2-/-小鼠如實施例1中所述生成，並且與C57BL/6回交10代。將雄性野生型(WT)C57BL/6小鼠、以及在C57BL/6背景下的純合的MASP-2缺陷(MASP-2-/-)小鼠，保持在12/12日/夜循環的標準條件下，餵食標準食物團塊，並且給予對食物和水的自由接近。十周齡的小鼠，6只/組，用在1.5 L/分鐘氧中的2.5%異氟烷進行麻醉。兩組十周齡的雄性C56/BL6小鼠(野生型和MASP-2-/-)的右輸尿管進行手術結紮。通過1cm脅腹切口暴露右腎。使用6/0 polyglactin縫合線，在兩個點處使右輸尿管完全梗阻。圍手術期每12小時提供

丁丙諾啡鎮痛，最多5個劑量，取決於疼痛評分。局部布比卡因麻醉在手術期間給予一次。

【0925】 在手術7天后處死小鼠，並且收集腎組織，固定並在石蠟塊中包埋。在麻醉下通過心臟穿刺從小鼠中收集血液，並且在腎切除術後通過放血將小鼠處死。允許血液在冰上凝固2小時，並且血清通過離心進行分離且作為等分試樣在-80ºC下保持冷凍。

【0926】 腎臟組織的免疫組織化學

【0927】 為了測量如通過膠原沉積指示的腎纖維化程度，如Whittaker P.等人，Basic Res Cardiol 89:397-410，1994中所述，用天狼星紅，膠原特異性染劑，對5微米石蠟包埋的腎臟切片進行染色。簡而言之，使腎臟切片脫石蠟，再水化，並且用在500 mL苦味酸飽和水溶液中的天狼星紅水溶液(0.5 gm天狼星紅，Sigma，Dorset UK)，將膠原染色1小時。玻片在酸化水(在蒸餾水中的0.5%冰乙酸)中洗滌兩次，各5分鐘，然後脫水並固定。

【0928】 為了測量如通過巨噬細胞浸潤指示的炎症程度，如下用巨噬細胞特異性抗體F4/80，對腎臟切片進行染色。使福爾馬林固定、石蠟包埋的5微米腎臟切片脫石蠟並再水化。抗原修復在檸檬酸鹽緩衝液中在95ºC下執行20分鐘，隨後為通過在3% H_2O_2中的10分鐘溫育，來猝滅內源性過氧化物酶活性。使組織切片在封閉緩衝液(磷酸鹽緩衝液(PBS)中的具有1%牛血清白蛋白的10%熱滅活的正常山羊血清)中，在室溫下溫育1小時，隨後為抗生物素蛋白/生物素封閉。在每個步驟後，將組織切片在PBS中洗滌3次，共5分鐘。將在封閉緩衝液中1:100稀釋的F4/80巨噬細胞一抗(Santa Cruz，Dallas，TX，USA)施加1小時。然後將1:200稀釋的生物素化的山羊抗大鼠二抗施加30分鐘，隨後為辣根過

氧化物酶(HRP)綴合的酶30分鐘。染色使用二胺基聯苯胺(DAB)底物(Vector Labs，Peterborough UK)顯色10分鐘，然後將玻片在水中進行洗滌，脫水並無需複染而固定，以促進基於計算機的分析。

【0929】 圖像分析

【0930】 如Furness P. N.等人，J Clin Pathol 50:118-122，1997中所述，確定腎皮質染色的百分比。簡而言之，從圍繞腎臟切片整個外圍的腎囊正下方的腎皮質的序貫非重疊區域捕獲24位彩色圖像。在每次圖像捕獲後，NIH圖像用於提取作為8位單色圖像的紅色通道。使用沒有切片就位的照明顯微鏡視野的預記錄圖像，來扣除背景照明中的不均勻度。使圖像經受固定的閾值，以鑒定與染色陽性相對應的圖像區域。然後計算黑色像素的百分比，並且在腎臟周圍的所有圖像已以這種方式進行測量後，記錄平均百分比，提供與腎臟切片中的染色區域百分比相對應的值。

【0931】 基因表達分析

【0932】 如下通過定量PCR(qPCR)，測量小鼠腎臟中與腎臟炎症和纖維化有關的幾種基因的表達。根據製造商的說明書，使用Trizol®(ThermoFisher Scientific，Paisley，UK)，從腎皮質中分離總RNA。用Turbo DNA-free試劑盒(ThermoFisher Scientific)處理提取的RNA，以消除DNA污染，然後使用AMV Reverse Transcription System(Promega，Madison，WI，USA)，來合成第一鏈cDNA。通過使用TaqMan GAPDH Assay(Applied Biosystems，Paisley UK)的單次qPCR反應，隨後為使用Custom TaqMan Array 96孔板(Life Technologies，Paisley，UK)的qPCR反應，來確認cDNA完整性。

【0933】 在該分析中研究了十二種基因：

【0934】 膠原IV型α1(col4α1；測定ID：Mm01210125_m1)

【0935】 轉化生長因子β-1(TGFβ-1；測定ID：Mm01178820_m1)；

【0936】 鈣粘蛋白1(Cdh1；測定ID：Mm01247357_m1)；

【0937】 纖連蛋白1(Fn1；測定ID：Mm01256744_m1)；

【0938】 白細胞介素6(IL6；測定ID Mm00446191_m1)；

【0939】 白細胞介素10(IL10；測定ID Mm00439614_m1)；

【0940】 白細胞介素12a(IL12a；測定ID Mm00434165_m1)；

【0941】 波形蛋白(Vim；測定ID Mm01333430_m1)；

【0942】 肌動蛋白α1(Actn1；測定ID Mm01304398_m1)；

【0943】 腫瘤壞死因子-α(TNF-α；測定ID Mm00443260_g1)

【0944】 補體組分3(C3；測定ID Mm00437838_m1)；

【0945】 干擾素γ(Ifn-γ；測定ID Mm01168134)

【0946】 使用了下述管家對照基因：

【0947】 3-磷酸甘油醛脫氫酶(GAPDH；測定ID Mm99999915_g1)；

【0948】 葡糖醛酸酶β(Gusβ；測定ID Mm00446953_m1)；

【0949】 真核18S rRNA(18S；測定ID Hs99999901_s1)；

【0950】 次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HPRT；測定ID Mm00446968_m1)

【0951】 20 μL反應使用TaqMan Fast Universal Master Mix(Applied Biosystems)擴增40個循環。使用Applied Biosystems 7000 SDS v1.4軟件，分析實時PCR擴增數據。

【0952】 結果：

【0953】 在單側輸尿管梗阻(UUO)之後，梗阻腎臟經歷炎性細胞特別是巨噬細胞的流入，隨後為纖維化的迅速發展，如通過膠原的積累連同小管擴張和近端小管上皮的變薄所證明的(參見Chevalier R. L.等人，Kidney Int 75:1145-1152，2009)。

【0954】 圖15以圖形方式示出了，用天狼星紅染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，其中所述組織切片得自在輸尿管梗阻(UUO)7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、或假手術的對照小鼠。如圖15中所示，與MASP-2-/-小鼠相比，在輸尿管梗阻7天之後的野生型小鼠的腎臟切片顯示了顯著更多的膠原沉積(p值=0.0096)。在野生型和MASP-2-/-組中，關於UUO手術小鼠的平均值±平均值的標準誤分別為24.79±1.908(n=6)和16.58±1.3(n=6)。如圖15中進一步所示，如預計的，來自假手術的對照野生型和假手術的對照MASP-2-/-小鼠的組織切片，顯示了非常低水平的膠原染色。

【0955】 圖16以圖形方式示出了，用F4/80巨噬細胞特異性抗體染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，其中所述組織切片得自在輸尿管梗阻7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、或假手術的對照小鼠。如圖16中所示，與野生型小鼠相比，在輸尿管梗阻7天之後，從來自MASP-2-/-小鼠的UUO腎臟獲得的組織顯示出明顯更少的巨噬細胞浸潤(WT中染色的%巨噬細胞面積：2.23±0.4相對於MASP-2-/-：0.53±0.06，p=0.0035)。如圖16中進一步所示，來自假手術的野生型和假手術的MASP-2-/-小鼠的組織切片，並未顯示可檢測的巨噬細胞染色。

【0956】 在得自輸尿管梗阻7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的野生型和MASP-2-/-小鼠的腎臟組織切片中，進行與腎炎症和纖維化相

聯繫的各種基因的基因表達分析。圖17-20中顯示的數據是相對於野生型假手術樣品的相對定量的Log10，並且條表示平均值的標準誤。關於纖維化有關基因的基因表達分析結果，圖17以圖形方式示出了，在得自輸尿管梗阻7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的對照小鼠的腎臟組織切片中，如通過qPCR測量的，膠原IV型α1(膠原-4)的相對mRNA表達水平。圖18以圖形方式示出了，在得自輸尿管梗阻7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的對照小鼠的腎臟組織切片中，如通過qPCR測量的，轉化生長因子β-1(TGFβ-1)的相對mRNA表達水平。如圖17和18中所示，與野生型小鼠中假手術的腎臟相比，來自野生型小鼠的梗阻腎臟證實了纖維化有關基因膠原IV型(圖17)和TGFβ-1(圖18)的表達顯著增加，證實了這些纖維化有關基因在野生型小鼠中的UUO損傷後被誘導，如預計的。相比之下，如圖17和18中進一步所示，與經受UUO損傷的野生型小鼠相比，來自經受UUO損傷的MASP-2-/-的梗阻腎臟，顯示出膠原IV型表達的顯著降低(圖17，p=0.0388)和TGFβ-1表達的顯著降低(圖18，p=0.0174)。

【0957】 關於炎症相關基因的基因表達分析結果，圖19以圖形方式示出了，在得自輸尿管梗阻7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的對照小鼠的腎臟組織切片中，如通過qPCR測量的，白細胞介素6(IL-6)的相對mRNA表達水平。圖20以圖形方式示出了，在得自輸尿管梗阻7天之後的野生型和MASP-2-/-小鼠、以及假手術的對照小鼠的腎臟組織切片中，如通過qPCR測量的，干擾素-γ的相對mRNA表達水平。如圖19和20中所示，與野生型小鼠中的假手術腎臟相比，來自野生型小鼠的梗阻腎臟，證實了炎症有關基因白細胞介素-6(圖19)和干擾素-γ(圖20)的表達顯著增加，證實了這些炎症有關基因在野生

型小鼠中的UUO損傷後被誘導。相比之下，如圖19和20中進一步所示，與經由UUO損傷的野生型小鼠相比，來自經受UUO損傷的MASP-2-/-的梗阻腎臟，顯示出白細胞介素6(圖19，p=0.0109)和干擾素-γ表達的顯著降低(圖20，p=0.0182)。

【0958】 注意到，在從野生型和MASP-2-/-小鼠兩者獲得的UUO腎臟中，發現Vim、Actn-1、TNFα、C3和IL-10的基因表達都是顯著上調的，其中這些特定基因在野生型和MASP-2-/-小鼠之間的表達水平沒有顯著差異(數據未顯示)。在來自任何組中的動物的梗阻腎臟中，Cdh-1和IL-12a的基因表達水平都沒有改變(數據未顯示)。

【0959】 討論：

【0960】 齧齒類動物中的UUO模型被公認為在梗阻腎臟中誘導早期、活躍和嚴重的損傷，伴隨在梗阻之後的一到兩周內降低的腎血流量、間質性炎症和快速纖維化，並且已被廣泛用於理解腎臟中的炎症和纖維化的常見機制和介質(參見例如，Chevalier R.L.，Kidney Int 75:1145-1152，2009；Yang H.等人，Drug Discov Today Dis Models 7:13-19，2010)。

【0961】 在本實施例中描述的結果證實了，相對於野生型(+/+)對照小鼠，在MASP-2(-/-)小鼠中的UUO手術的腎臟中，膠原沉積和巨噬細胞浸潤的顯著降低。在MASP-2-/-動物中，在組織學和基因表達水平兩者上，顯示了腎損傷的顯著降低的出乎意料結果，證實了補體活化的凝集素途徑顯著促成梗阻腎臟中的炎症和纖維化的發展。儘管不希望受特定理論的束縛，但認為凝集素途徑通過觸發且維持促炎刺激，關鍵性地促成纖維化疾病的病理生理學，所述促炎刺激使其中細胞損傷驅動炎症的惡性循環長期存在，所述炎症繼而又引起進

一步的細胞損傷、瘢痕形成和組織喪失。鑒於這些結果，預計用抑制劑抑制或阻斷MASP-2在腎纖維化的抑制或預防方面，以及對於一般而言的纖維化抑制或預防(即，不依賴於組織或器官)，具有預防和/或治療效應。

【0962】 實施例15

【0963】 本實施例描述了單選殖MASP-2抑制性抗體在單側輸尿管梗阻(UUO)模型(腎纖維化的鼠模型)中的功效分析。

【0964】 背景/原理：

【0965】 多重腎病理狀況的共同終點，腎小管間質性纖維化的改善，代表了旨在預防進行性腎疾病的治療策略的關鍵靶。鑒於靶向腎疾病中的炎症性促纖維化途徑的新的和現有治療的匱乏，迫切需要開發新療法。蛋白尿性腎疾病的許多患者顯示出小管間質性炎症和進行性纖維化，其與腎功能下降密切平行。蛋白尿本身誘導小管間質性炎症和蛋白尿性腎病的發展(Brunskill N.J.等人，J Am Soc Nephrol 15:504-505，2004)。不管原發性腎臟疾病如何，小管間質性炎症和纖維化在具有進行性腎受損的患者中常常看到，並且與排泄功能下降密切相關聯(Risdon R.A.等人，Lancet 1:363-366，1968；Schainuck L.I.等人，Hum Pathol 1: 631-640，1970)。具有中斷導致纖維化的關鍵常見細胞途徑潛力的療法，有希望在腎病症中具有廣泛應用性。

【0966】 如實施例14中所述，在非蛋白尿性腎纖維化的UUO模型中，確定與野生型對照動物相比，MASP-2-/-小鼠顯示出顯著更少的腎纖維化和炎症，如通過炎症細胞浸潤(75%降低)和纖維化的組織學標記物如膠原(三分之一降低)所示，從而確立凝集素途徑在腎纖維化中的關鍵作用。

【0967】 如實施例13中所述，生成了單選殖MASP-2抗體(OMS646-SGMI-2融合物，包含與OMS646重鏈的C末端融合的SGMI-2肽)，其特異性阻斷人凝集素途徑的功能，還已顯示阻斷小鼠的凝集素途徑。在本實施例中，在野生型小鼠的腎纖維化的UUO小鼠模型中分析了OMS646-SGMI-2，以確定MASP-2的特異性抑制劑是否能夠抑制腎纖維化。

【0968】 方法：

【0969】 這項研究評估了在雄性WT C57BL/6小鼠中，與人IgG4同種型對照抗體(10 mg/kg ET904)和媒介物對照相比，MASP-2抑制性抗體(10 mg/kg OMS646-SGMI-2)的效應。在UUO手術之前的第7天、第4天和第1天時，以及再次在手術後第2天時，通過腹膜內(ip)注射，將抗體(10 mg/kg)施用於9只小鼠的組。在抗體施用之前以及在實驗結束時獲取血樣，以評價凝集素途徑的功能活性。

【0970】 使用實施例14中描述的方法進行UUO手術、組織收集、以及用天狼星紅和巨噬細胞特異性抗體F4/80的染色。

【0971】 根據製造商的說明書，使用特異性比色測定測試試劑盒(Sigma)，來測量小鼠腎臟的羥脯胺酸含量。

【0972】 為了評價MASP-2抑制性mAb在小鼠中的藥效學效應，通過在MASP-2 mAb或對照mAb i.p.施用於小鼠後的指示時間收集的最低限度稀釋的血清樣品中，定量凝集素誘導的C3活化，來評估系統性凝集素途徑活性。簡而言之，通過在碳酸氫鈉緩衝液(pH 9.6)中與30μg/mL甘露聚糖(Sigma)一起過夜溫育，7 μM直徑的聚苯乙烯微球(Bangs Laboratories，Fisher IN，USA)用甘露聚糖進行包被，然後洗滌，用1%胎牛血清的PBS溶液進行封閉，並且以1x10^8個

珠/mL的最終濃度重懸浮於PBS中。通過將2.5 μL甘露聚糖包被的珠(~250,000個珠)加入50 μL最低限度稀釋的小鼠血清樣品(90%最終血清濃度)中，啟動補體沉積反應，隨後為在4ºC下的40分鐘溫育。在通過加入250 μL冰冷的流式細胞術緩衝液(FB：含有0.1%胎牛血清的PBS)終止沉積反應之後，珠通過離心進行收集，並且用300 μL冰冷的FB再洗滌兩次。

【0973】 為了定量凝集素誘導的C3活化，使珠與50 μL在FB中稀釋的兔抗人C3c抗體(Dako，Carpenteria，CA，USA)一起在4°C下溫育1小時。在用FB洗滌兩次以去除未結合的材料後，使珠與50 μL在FB中稀釋的綴合至PE-Cy5的山羊抗兔抗體(Southern Biotech，Birmingham，AL，USA)一起在4ºC下溫育30分鐘。在用FB洗滌兩次以去除未結合的材料後，將珠重懸浮於FB中，並通過FACS Calibur細胞儀進行分析。使用前向散射和側向散射將珠門控為均勻群體，並且將每個樣品中的C3b沉積定量為平均熒光強度(MFI)。

【0974】 結果：

【0975】 膠原沉積的評價：

【0976】 圖21以圖形方式示出了，用天狼星紅染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，其中所述組織切片在輸尿管梗阻7天之後，得自用MASP-2抑制性抗體或同種型對照抗體治療的野生型小鼠。如圖21中所示，與來自梗阻腎臟(其得自用IgG4同種型對照治療的野生型小鼠)的組織切片中的膠原沉積量相比，來自梗阻(UUO)後7天收穫的腎臟(其得自用MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠)的組織切片，顯示了膠原沉積的顯著降低(p=0.0477)。

【0977】 羥脯胺酸含量的評價：

【0978】 在腎臟組織中測量羥脯胺酸作為膠原含量的指標。羥脯胺酸是高度指示在該模型中誘導的疾病的病理生理進展的參數。

【0979】 圖22以圖形方式示出了，來自得自野生型小鼠的梗阻(UUO)後7天收穫的腎臟的羥脯胺酸含量，所述野生型小鼠用MASP-2抑制性抗體或IgG4同種型對照進行治療。如圖22中所示，與來自用IgG4同種型對照mAb治療的小鼠的腎臟相比，來自用MASP-2抑制性抗體治療的小鼠的梗阻腎臟組織證實了顯著更少的羥脯胺酸——膠原含量的指標(p=0.0439)。

【0980】 炎症評價：

【0981】 來自野生型、同種型對照抗體治療的動物和用MASP-2抑制性抗體治療的野生型動物的梗阻腎臟，證實了巨噬細胞的明確浸潤。仔細的定量並未揭示在這兩組之間的巨噬細胞染色面積百分比的顯著差異(數據未顯示)。然而，儘管等價數目的浸潤性巨噬細胞，但如通過天狼星紅染色判斷的，與來自同種型對照注射的動物的梗阻腎臟相比，來自MASP-2抑制性抗體注射動物的梗阻腎臟顯示出明顯更少的纖維化，所述結果與下述結果一致：與用IgG4同種型對照mAb治療的腎臟相比，來自用MASP-2抑制性抗體治療的小鼠的梗阻腎臟組織具有顯著更少的羥脯胺酸。

【0982】 討論

【0983】 本實施例中所述的結果證實了，MASP-2抑制性抗體的使用在UUO模型中提供了免於腎纖維化的保護，這與實施例14中所述的結果一致，證實了野生型小鼠相比，MASP-2-/-小鼠在UUO模型中具有顯著降低的腎纖維化和炎症。本實施例中的結果顯示了，用MASP-2抑制性抗體治療的小鼠中的纖維化降低。在具有MASP-2依賴性凝集素途徑活性的降低或阻斷的動物中的

UUO腎臟中，纖維化降低的發現是非常顯著的新發現。總之，實施例14和本實施例中呈現的結果證實了MASP-2抑制對腎小管間質性炎症、小管細胞損傷、促纖維化細胞因子釋放和瘢痕形成的有益效應。腎纖維化的緩解仍然是腎治療學的關鍵目標。UUO模型是加速腎纖維化的嚴重模型，並且在該模型中降低纖維化的干預，例如MASP-2抑制性抗體的使用，很可能用於抑制或預防腎纖維化。來自UUO模型的結果很可能可轉移到特徵在於腎小球和/或蛋白尿性小管損傷的腎疾病。

【0984】 實施例16

【0985】 本實施例提供了使用MASP-2-/-和野生型小鼠中的腎纖維化、炎症和小管間質性損傷的蛋白質超負荷蛋白尿模型生成的結果，以評估凝集素途徑在蛋白尿性腎病中的作用。

【0986】 背景/原理：

【0987】 不管原發性腎疾病如何，蛋白尿都是關於腎纖維化發展和腎排泄功能喪失的風險因素(Tryggvason K.等人，J Intern Med 254:216-224，2003，Williams M.，Am J. Nephrol 25:77-94，2005)。蛋白尿性腎病的概念描述了由於腎小球滲透選擇性受損，過量蛋白質進入近端小管的毒性效應(Brunskill N.J.，J Am Soc Nephrol 15:504-505，2004，Baines R.J.，Nature Rev Nephrol 7:177-180，2011)。許多腎小球疾病共有的這種現象導致腎臟中的促炎性瘢痕形成環境，並且特徵在於由於通過蛋白尿小管流體刺激的信號傳導途徑失調，近端小管細胞生長、細胞凋亡、基因轉錄和炎性細胞因子產生的變化。蛋白尿性腎病一般被公認為多種原發性腎病共有的進行性腎損傷的關鍵貢獻者。

【0988】 慢性腎臟疾病影響美國大於15%的成年人口，並且負責全世界每年大約750,000例死亡(Lozano R.等人，Lancet第380卷，Issue 9859:2095-2128，2012)。蛋白尿是慢性腎臟疾病的指標，以及促進疾病進展的因素。蛋白尿性腎疾病的許多患者顯示出小管間質性炎症和進行性纖維化，其與腎功能下降密切平行。蛋白尿本身誘導小管間質性炎症和蛋白尿性腎病的發展(Brunskill N.J.等人，J Am Soc Nephrol 15:504-505，2004)。在蛋白尿性腎臟疾病中，過量的白蛋白和其它大分子通過腎小球過濾，並且被近端小管上皮細胞重新吸收。這引起由補體活化介導的炎性惡性循環，導致細胞因子和白細胞浸潤，其引起小管間質性損傷和纖維化，從而加劇蛋白尿並導致腎功能喪失，並且最終進展為終末期腎衰竭(參見例如，Clark等人，Canadian Medical Association Journal 178:173-175，2008)。調節炎症和蛋白尿的這種有害循環的療法預計改善慢性腎臟疾病中的結果。

【0989】 考慮到MASP-2抑制在小管性間質損傷的UUO模型中的有益效應，進行了下述實驗，以確定MASP-2抑制是否降低蛋白質超負荷模型中的腎損傷。如Ishola等人，European Renal Association 21:591-597，2006中所述，這項研究採用蛋白質超負荷來誘導蛋白尿性腎臟疾病。

【0990】 方法：

【0991】 MASP-2-/-小鼠如實施例1中所述生成，並且與BALB/c回交10代。當前的研究在如下的蛋白質超負荷蛋白尿模型中，比較了野生型和MASP-2-/- BALB/c小鼠的結果。

【0992】 在實驗前一周，在蛋白質超負荷攻擊前，對小鼠進行單側腎切除術，以便觀察最佳應答。所使用的蛋白尿誘導劑是在正常鹽水中i.p.給予

WT(n=7)和MASP-2 -/-小鼠(n=7)的低內毒素牛血清白蛋白(BSA，Sigma)，其以下述劑量：各一個劑量的2mg BSA/gm、4mg BSA/gm、6mg BSA/gm、8mg BSA/gm、10 mg BSA/gm和12mg BSA/gm體重，以及9個劑量的15mg BSA/gm體重，在15天的時期內總共15個i.p.施用的劑量。對照WT(n=4)和MASP-2-/-(n=4)小鼠僅接受i.p施用的鹽水。在最後一個劑量施用後，將動物分開關在代謝籠中24小時，以收集尿。通過在麻醉下的心臟穿刺收集血液，允許血液在冰上凝固2小時，並且通過離心分離血清。在第15天的實驗結束時收集血清和尿樣品，貯存並冷凍用於分析。

【0993】 在第15天時的最後一次BSA施用後24小時處死小鼠，並且收集各種組織用於分析。收穫腎臟並加工用於H&E和免疫染色。免疫組織化學染色如下進行。使來自每只小鼠的福爾馬林固定、石蠟包埋的5微米腎臟組織切片脫石蠟並再水化。抗原修復在檸檬酸鹽緩衝液中在95ºC下執行20分鐘，隨後為使組織在3% H_2O_2中溫育10分鐘。然後使組織在具有10%抗生物素蛋白溶液的封閉緩衝液(來自二抗在其中產生的物種的10%血清和1%BSA的PBS溶液)中，在室溫下溫育1小時。在每個步驟後，將切片在PBS中洗滌3次，各5分鐘。然後將一抗在具有10%生物素溶液的封閉緩衝液中應用1小時，其濃度對於抗體F4/80(Santa Cruz目錄# sc-25830)、TGFβ(Santa Cruz目錄# sc-7892)、IL-6(Santa Cruz目錄# sc-1265)為1:100，並且對於TNFα抗體(Santa Cruz目錄# sc-1348)為1:50。然後將生物素化的二抗應用30分鐘，其濃度對於F4/80、TGFβ和IL-6切片為1:200，並且對於TNFα切片為1:100，隨後為HRP綴合的酶另外30分鐘。使用二胺基聯苯胺(DAB)底物試劑盒(Vector labs)顯色10分鐘，並且將玻片在水中進

行洗滌，脫水並無需複染而固定，以促進基於計算機的分析。通過數字圖像捕獲分析來自腎皮質的染色組織切片，隨後為使用自動化圖像分析軟件的定量。

【0994】 如下通過用末端脫氧核苷酸轉移酶dUTP缺口末端標記(TUNEL)染色，來評價組織切片中的細胞凋亡。如下使用ApopTag® Peroxidase試劑盒(Millipore)，對腎臟切片中的凋亡細胞進行染色。使來自每只小鼠的石蠟包埋、福爾馬林固定的腎臟切片脫石蠟，再水化，然後使用蛋白酶K(20 µg/mL)對蛋白質進行滲透化處理，所述蛋白酶K在室溫下對每個樣本應用15分鐘。樣本在步驟之間在PBS中進行洗滌。通過使組織在3% H_2O_2中溫育10分鐘，來猝滅內源性過氧化物酶活性。然後使組織在平衡緩衝液中溫育，隨後為與TdT酶在37ºC下一起溫育1小時。在終止/洗滌緩衝液中洗滌10分鐘後，將抗洋地黃毒苷綴合物在室溫下應用30分鐘，隨後為洗滌。在DAB底物試劑盒中顯色4分鐘，隨後為在水中的洗滌。使組織在蘇木精中複染並在DBX中固定。使用Leica DBXM光學顯微鏡，在來自皮質的連續選擇的20個高倍視野中，手動計數TUNEL染色的(棕色著色的)凋亡細胞的頻率。

【0995】 結果：

【0996】 蛋白尿的評價

【0997】 為了確認小鼠中蛋白尿的存在，在第15天分析血清中的總蛋白，並且在研究的第15天時，在經過24小時時期收集的尿樣品中，測量了尿中的總排泄蛋白。

【0998】 圖23以圖形方式示出了，在僅接受鹽水的野生型對照小鼠(n=2)、接受BSA的野生型小鼠(n=6)和接受BSA的MASP-2-/-小鼠(n=6)中，在第15天測量的血清蛋白質總量(mg/ml)。如圖23中所示，BSA的施用使野生型和

MASP-2-/-組兩者中的血清總蛋白水平增加至僅接受鹽水的對照組濃度的兩倍，其中在治療的組之間無顯著差異。

【0999】 圖24以圖形方式示出了，來自僅接受鹽水的野生型對照小鼠(n=2)、接受BSA的野生型(n=6)和接受BSA的MASP-2-/-小鼠(n=6)，在第15天，在經過24小時時期收集的尿中的排泄蛋白質總量(mg)。如圖24中所示，在這項研究的第15天時，與僅接受鹽水的假治療的對照組相比，在BSA治療的組中的尿中的總排泄蛋白中存在大約六倍增加。圖23和24中顯示的結果證實了蛋白尿模型如預計的工作。

【1000】 腎臟中的組織學變化評價

【1001】 圖25顯示了在蛋白質超負荷研究的第15天時，從下述小鼠組收穫的代表性H&E染色的腎組織切片：(小圖A)野生型對照小鼠；(小圖B)MASP-2-/-對照小鼠，(小圖C)用BSA治療的野生型小鼠；以及(小圖D)用BSA治療的MASP-2-/-小鼠。如圖25中所示，在相同水平的蛋白質超負荷攻擊下，與野生型超負荷組(小圖C)相比，在MASP-2-/-超負荷組(小圖D)中存在程度高得多的組織保存。例如，與野生型對照組中的鮑氏囊(小圖A)相比，觀察到用BSA治療的野生型小鼠(超負荷)的鮑氏囊是極大擴展的(小圖C)。相比之下，用相同水平的BSA治療的MASP-2-/-小鼠(超負荷)中的鮑氏囊(小圖D)，保留了類似於MASP-2-/-對照小鼠(小圖B)和野生型對照小鼠(小圖A)的形態。如圖25中進一步所示，在野生型腎臟切片的近端小管和遠端小管中(小圖C)，已積累了較大的蛋白管型結構，與MASP-2-/-小鼠(小圖D)相比，所述蛋白管型結構更大且更豐富。

【1002】 還應注意的是，通過透射電子顯微鏡分析來自這項研究的腎臟切片顯示了，用BSA治療的小鼠對遠端和近端小管細胞的睫狀邊界具有整體損

害，其中細胞內含物和核突入小管腔內。相比之下，組織在用BSA治療的MASP-2-/-小鼠中得到保存。

【1003】 腎臟中的巨噬細胞浸潤評價

【1004】 為了測量如通過巨噬細胞浸潤指示的炎症程度，還使用Boor等人，J of Am Soc of Nephrology 18:1508-1515，2007中描述的方法，用巨噬細胞特異性抗體F4/80，對收穫腎臟的組織切片進行染色。

【1005】 圖26以圖形方式示出了，用巨噬細胞特異性抗體F4/80染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，顯示了巨噬細胞的平均染色面積(%)，其中所述組織切片在蛋白質超負荷研究的第15天得自野生型對照小鼠(n=2)、用BSA治療的野生型小鼠(n=6)、以及用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=5)。如圖26中所示，用F4/80抗巨噬細胞抗體染色的腎臟組織切片顯示了，雖然與野生型假對照相比，用BSA治療的兩組顯示了腎臟巨噬細胞浸潤的顯著增加(作為% F4/80抗體染色面積測量的)，但與來自BSA治療的野生型小鼠的組織切片中的巨噬細胞浸潤相比，在來自BSA治療的MASP-2-/-小鼠的組織切片中觀察到巨噬細胞浸潤的顯著降低(p值=0.0345)。

【1006】 圖27A以圖形方式示出了，通過相對於巨噬細胞浸潤(平均染色面積%)，繪製來自24小時樣品的尿中測量的總排泄蛋白，關於用BSA治療的每只野生型小鼠(n=6)中的巨噬細胞-蛋白尿相關性的存在的分析。如圖27A中所示，來自野生型腎臟的大多數樣品顯示了在存在的蛋白尿水平與巨噬細胞浸潤程度之間的正相關。

【1007】 圖27B以圖形方式示出了，通過相對於巨噬細胞浸潤(平均染色面積%)，繪製在24小時樣品的尿中的總排泄蛋白，關於用BSA治療的每只

MASP-2-/-小鼠(n=5)中的巨噬細胞-蛋白尿相關性的存在的分析。如圖27B中所示，在MASP-2-/-小鼠中並未觀察到在野生型小鼠中觀察到的、蛋白尿水平與巨噬細胞浸潤程度之間的正相關(圖27A中所示)。儘管不希望受任何特定理論的束縛，但這些結果可能指示了在MASP-2-/-小鼠中的高蛋白尿水平下的炎症清除機制的存在。

【1008】 細胞因子浸潤的評價

【1009】 白細胞介素6(IL-6)、轉化生長因子β(TGFβ)和腫瘤壞死因子α(TNFα)是促炎細胞因子，其已知在蛋白尿症模型中的野生型小鼠近端小管中是上調的(Abbate M.等人，Journal of the American Society of Nephrology: JASN，17: 2974-2984，2006；David S.等人，Nephrology，Didalysis，Transplantation，Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association- European Renal Association 12: 51-56，1997)。如上所述，用細胞因子特異性抗體，對腎臟的組織切片進行染色。

【1010】 圖28以圖形方式示出了，在用BSA治療的野生型小鼠(n=4)和用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=5)中，用抗TGFβ抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% TGFβ抗體染色面積測量的)。如圖28中所示，與MASP-2-/- BSA治療的(超負荷)組相比，在野生型BSA治療的(超負荷)組中觀察到TGFβ染色的顯著增加(p=0.026)。

【1011】 圖29以圖形方式示出了，在用BSA治療的野生型小鼠(n=4)和用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=5)中，用抗TNFα抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% TNFα抗體染色面積測量的)。如圖29中所示，與

MASP-2-/- BSA治療的(超負荷)組相比，在野生型BSA治療的(超負荷)組中觀察到TNFα染色的顯著增加(p=0.0303)。

【1012】 圖30以圖形方式示出了，在野生型對照小鼠、MASP-2-/-對照小鼠、用BSA治療的野生型小鼠(n=7)和用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=7)中，用抗IL-6抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% IL-6抗體染色面積測量的)。如圖30中所示，與MASP-2-/-BSA治療的組相比，在野生型BSA治療的組中觀察到IL-6染色的高度顯著增加(p=0.0016)。

【1013】 細胞凋亡評價

【1014】 通過用末端脫氧核苷酸轉移酶dUTP缺口末端標記(TUNEL)染色，來評價組織切片中的細胞凋亡，並且在從皮質中連續選擇的20個高倍視野(HPF)中，計數TUNEL染色的凋亡細胞的頻率。

【1015】 圖31以圖形方式示出了，在野生型對照小鼠(n=1)、MASP-2-/-對照小鼠(n)、用BSA治療的野生型小鼠(n=7)和用BSA治療的MASP-2-/-小鼠(n=7)中，從來自腎皮質的組織切片中連續選擇的20個高倍視野(HPF)中計數的TUNEL凋亡細胞的頻率。如圖31中所示，與得自用BSA治療的MASP-2-/-小鼠的腎臟相比，在得自用BSA治療的野生型小鼠的腎臟中，觀察到在皮質中的顯著更高的細胞凋亡率(p=0.0001)。

【1016】 結果和結論的總體概括：

【1017】 本實施例中的結果證實了，MASP-2-/-小鼠在蛋白質超負荷模型中具有降低的腎損傷。因此，MASP-2抑制劑，例如MASP-2抑制性抗體，預計抑制或預防炎症和蛋白尿的有害循環，並且改善慢性腎臟疾病中的結果。

【1018】 實施例17

【1019】 本實施例描述了關於在降低和/或預防野生型小鼠中的小鼠蛋白質超負荷蛋白尿模型中的腎炎症和小管間質性損傷中的功效，來分析單選殖MASP-2抑制性抗體。

【1020】 背景/原理：

【1021】 如實施例16中所述，在蛋白尿的蛋白質超負荷模型中，確定MASP-2-/-小鼠顯示出比野生型小鼠顯著更好的結果(例如，更少的小管間質性損傷和更少的腎臟炎症)，暗示了凝集素途徑在蛋白尿性腎臟疾病中的致病作用。

【1022】 如實施例13中所述，生成了單選殖MASP-2抑制性抗體(OMS646-SGMI-2)，其特異性阻斷人凝集素途徑的功能，並且還顯示阻斷小鼠中的凝集素途徑。在本實施例中，在小鼠蛋白質超負荷蛋白尿模型中，分析了MASP-2抑制性抗體OMS646-SGMI-2在降低和/或預防野生型小鼠的腎炎症和小管間質性損傷中的功效。

【1023】 方法：

【1024】 這項研究評估了與人IgG4同種型對照抗體ET904(10 mg/kg)和鹽水對照比較，MASP-2抑制性抗體(10 mg/kg OMS646-SGMI-2)的效應。

【1025】 與實施例16中描述的研究相似，這項研究利用蛋白質超負荷來誘導蛋白尿性腎臟疾病(Ishola等人，European Renal Association 21:591-597，2006)。通過用遞增劑量(2 g/kg至15 g/kg)的低內毒素牛血清白蛋白(BSA)的每天i.p.注射，總共15天，在單側腎切除的Balb/c小鼠中誘導蛋白尿，如實施例16中所述。

【1026】 通過在蛋白尿誘導前7天起始的每兩週一次的i.p.注射施用抗體治療，並且在研究自始至終繼續。基於先前的PK/PD和藥理學研究選擇了這種給藥方案，證實了持續的凝集素途徑壓制(數據未顯示)。在第15天時處死小鼠，並且收穫腎臟並加工用於H&E和免疫染色。通過數字圖像捕獲分析來自腎皮質的染色組織切片，隨後為使用自動化圖像分析軟件的定量。

【1027】 如實施例16所述進行免疫組織化學染色和細胞凋亡評價。

【1028】 結果：

【1029】 蛋白尿的評價

【1030】 為了確認小鼠中蛋白尿的存在，在第15天(實驗結束)，在經過24小時時期收集的尿樣品中，測量了尿中的總排泄蛋白。確定了與未用BSA治療的對照組相比，在用BSA治療的組中，尿樣品顯示了總蛋白質水平中幾乎六倍增加的平均值(數據未顯示)，確認了用BSA治療的小鼠中蛋白尿的存在。在BSA治療的組之間的蛋白質水平中沒有觀察到顯著差異。

【1031】 組織學變化的評價

【1032】 圖32顯示了在用BSA治療後的第15天，來自下述小鼠組的代表性H&E染色的組織切片：(小圖A)用鹽水治療的野生型對照小鼠，(小圖B)同種型抗體治療的對照小鼠，以及(小圖C)用MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠。

【1033】 如圖32中所示，在相同水平的蛋白質超負荷攻擊下，與用鹽水(小圖A)或同種型對照(小圖B)治療的野生型組相比，在MASP-2抑制性抗體治療的組(小圖C)中存在程度高得多的組織保存。

【1034】 細胞凋亡評價

【1035】 通過用末端脫氧核苷酸轉移酶dUTP缺口末端標記(TUNEL)染色，來評價組織切片中的細胞凋亡，並且在從皮質中連續選擇的20個高倍視野(HPF)中，計數TUNEL染色的凋亡細胞的頻率。圖33以圖形方式示出了，在用鹽水對照和BSA治療的野生型小鼠(n=8)、用同種型對照抗體和BSA治療的野生型小鼠(n=8)、以及用MASP-2抑制性抗體和BSA治療的野生型小鼠(n=7)中，從來自腎皮質的組織切片中連續選擇的20個高倍視野(HPF)中計數的TUNEL凋亡細胞的頻率。如圖33中所示，與鹽水和同種型對照治療的組相比，在從MASP-2抑制性抗體治療的組獲得的腎臟中，觀察到皮質的細胞凋亡率的高度顯著減少(相對於MASP-2抑制性抗體，對於鹽水對照，p=0.0002；相對於MASP-2抑制性抗體，對於同種型對照，p=0.0052)。

【1036】 細胞因子浸潤的評價

【1037】 在這項研究中獲得的腎臟組織切片中，評價了白細胞介素6(IL-6)、轉化生長因子β(TGFβ)和腫瘤壞死因子α(TNFα)，其為已知在蛋白尿症模型中的野生型小鼠近端小管中是上調的促炎細胞因子。

【1038】 圖34以圖形方式示出了，在用BSA和鹽水治療的野生型小鼠(n=8)、用BSA和同種型對照抗體治療的野生型小鼠(n=7)、以及用BSA和MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠(n=8)中，用抗TGFβ抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% TGFβ抗體染色面積測量的)。如圖34中所示，與鹽水和同種型對照抗體治療的對照組相比，TGFβ染色區域的定量顯示了MASP-2抑制性抗體治療的小鼠中的TGFβ水平的顯著降低(分別為p值= 0.0324和0.0349)。

【1039】 圖35以圖形方式示出了，在用BSA和鹽水治療的野生型小鼠(n=8)、用BSA和同種型對照抗體治療的野生型小鼠(n=7)、以及用BSA和MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠(n=8)中，用抗TNFα抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% TNFα抗體染色面積測量的)。如圖35中所示，與鹽水對照組(p=0.011)以及同種型對照組(p=0.0285)相比，染色切片的分析顯示了MASP-2抑制性抗體治療的組中的TNFα水平的顯著降低。

【1040】 圖36以圖形方式示出了，在用BSA和鹽水治療的野生型小鼠(n=8)、用BSA和同種型對照抗體治療的野生型小鼠(n=7)、以及用BSA和MASP-2抑制性抗體治療的野生型小鼠(n=8)中，用抗IL-6抗體的染色組織切片的基於計算機的圖像分析結果(作為% IL-6抗體染色面積測量的)。如圖36中所示，與鹽水對照組(p=0.0269)以及同種型對照組(p=0.0445)相比，染色切片的分析顯示了MASP-2抑制性抗體治療的組中的IL-6水平的顯著降低。

【1041】 結果和結論的總體概括：

【1042】 本實施例中的結果證實了，MASP-2抑制性抗體的使用在蛋白質超負荷模型中提供了免於腎損傷的保護，其與實施例16中所述的結果一致，證實了MASP-2-/-小鼠在蛋白尿模型中具有降低的腎損傷。

【1043】 實施例18

【1044】 本實施例提供了在MASP-2-/-和野生型小鼠中，使用阿黴素誘導的腎纖維化、炎症和小管間質性損傷的腎病模型生成的結果，以評估凝集素途徑在阿黴素誘導的腎病中的作用。

【1045】 背景/原理：

【1046】阿黴素是用於廣泛多樣的癌症治療中的蒽環類抗腫瘤抗生素，所述癌症包括血液系統惡性腫瘤、軟組織肉瘤和許多類型的癌症。阿黴素誘導的腎病是充分確立的慢性腎臟疾病的齧齒類動物模型，其已使得能夠更好地理解慢性蛋白尿的進展(Lee和Harris，Nephrology，16:30-38，2011)。阿黴素誘導的腎病中的結構和功能損傷類型與人中的慢性蛋白尿性腎疾病非常相似(Pippin等人，American Journal of Renal Physiology 296:F213-29，2009)。

【1047】阿黴素誘導的腎病的特徵在於對足細胞的損傷，隨後為腎小球硬化、小管間質性炎症和纖維化。在許多研究中已顯示了，阿黴素誘導的腎病受免疫和非免疫衍生機制兩者的調節(Lee和Harris，Nephrology，16:30-38，2011)。作為腎臟疾病的模型，阿黴素誘導的腎病具有幾個優勢。首先，它是高度可再現和可預測的腎損傷模型。這是因為它的特徵在於在藥物施用的幾天內的腎損傷誘導，其允許簡化實驗設計，因為損傷的時機是一致的。它也是其中組織損傷的程度很嚴重，同時與可接受的死亡率(<5%)和發病率(重量減輕)相關的模型。因此，由於阿黴素引起的腎病中腎損傷的嚴重性和時機，它是適合於測試保護免於腎損傷的干預的模型。

【1048】如實施例16和17中所述，在蛋白尿的蛋白質超負荷模型中，確定MASP-2-/-小鼠和用MASP-2抑制性抗體治療的小鼠，顯示出比野生型小鼠明顯更好的結果(例如，更少的小管間質性損傷和更少的腎炎症)，暗示了凝集素途徑在蛋白尿性腎臟疾病中的致病作用。

【1049】在本實施例中，MASP-2-/-小鼠在阿黴素誘導的腎病模型(AN)中與野生型小鼠比較進行分析，以確定MASP-2缺乏是否降低和/或預防由阿黴素誘導的腎炎症和小管間質性損傷。

【1050】 方法：

【1051】 1. 劑量和時間點優化

【1052】 進行了初始實驗，以確定阿黴素的劑量、以及在其下BALB/c小鼠發展適合於測試治療干預的腎炎症水平的時間點。

【1053】 三組野生型BALB/c小鼠(n=8)用IV施用的單一劑量的阿黴素(10.5 mg/kg)進行注射。在三個時間點將小鼠處死：在阿黴素施用後的一周、兩周和四周。對照小鼠僅用鹽水進行注射。

【1054】 結果：如通過H&E染色確定的，三組中的所有小鼠都顯示了腎小球硬化和蛋白尿的症狀，具有如通過腎臟中的巨噬細胞浸潤測量的，逐步增加的組織炎症程度(數據未顯示)。組織損傷的程度在一周組中是輕度的，在兩周組中是中度的，且在四周組中是重度的(數據未顯示)。選擇了兩周時間點用於研究的剩餘部分。

【1055】 2. 在野生型和MASP-2-/-小鼠中阿黴素誘導的腎病的分析

【1056】 為了闡明補體的凝集素途徑在阿黴素誘導的腎病中的作用，在相同劑量的阿黴素下，將MASP-2-/-小鼠(BALB/c)組與野生型小鼠(BALB/c)進行比較。將MASP-2-/-小鼠與BALB/c小鼠回交10代。

【1057】 野生型(n=8)和MASP-2-/-(n=8)用阿黴素(10.5 mg/kg)進行IV注射，並且每個品系的三隻小鼠僅給予鹽水作為對照。在治療後兩周將所有小鼠處死，並收集組織。通過H&E染色評價組織病理學損傷的程度。

【1058】 結果：

【1059】 圖37顯示了在僅用阿黴素或鹽水(對照)治療後的第14天，來自下述小鼠組的代表性H&E染色的組織切片：(小圖A-1、A-2、A-3)僅用鹽水治療

的野生型對照小鼠；(小圖B-1、B-2、B-3)用阿黴素治療的野生型小鼠；以及(小圖C-1、C-2、C-3)用阿黴素治療的MASP-2-/-小鼠。每張照片(例如，小圖A-1、A-2、A-3)代表不同的小鼠。

【1060】 如圖37中所示，與用相同劑量的阿黴素治療的野生型組相比，在用阿黴素治療的MASP-2-/-組中存在程度高得多的組織保存。

【1061】 圖38以圖形方式示出了，用巨噬細胞特異性抗體F4/80染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，顯示了在僅用阿黴素或鹽水(野生型對照)治療後的第14天，來自下述小鼠組的巨噬細胞的平均染色面積(%)：僅用鹽水治療的野生型對照小鼠；用阿黴素治療的野生型小鼠；僅用鹽水治療的MASP-2-/-小鼠，以及用阿黴素治療的MASP-2/-小鼠。如圖38中所示，與用阿黴素治療的野生型小鼠相比，用阿黴素治療的MASP-2-/-小鼠具有降低的巨噬細胞浸潤(**p=0.007)。

【1062】 圖39以圖形方式示出了，用天狼星紅染色的腎臟組織切片的基於計算機的圖像分析結果，顯示了在僅用阿黴素或鹽水(野生型對照)治療後的第14天，來自下述小鼠組的膠原沉積的染色面積(%)：僅用鹽水治療的野生型對照小鼠；用阿黴素治療的野生型小鼠；僅用鹽水治療的MASP-2-/-小鼠，以及用阿黴素治療的MASP-2/-小鼠。如圖39中所示，與用阿黴素治療的野生型小鼠相比，用阿黴素治療的MASP-2-/-小鼠具有降低的膠原沉積(**p=0.005)。

【1063】 總體概括和結論：

【1064】 腎小管間質性炎症的改善是腎臟疾病治療的關鍵靶。本文呈現的結果指示了補體活化的凝集素途徑顯著促成腎小管間質性炎症的發展。如本

文進一步證實的，MASP-2抑制劑，例如MASP-2抑制性抗體，可以用作治療蛋白尿性腎病、阿徽素腎病和改善腎小管間質性炎症的新治療方法。

【1065】 實施例19

【1066】 本實施例描述了進行中的2期臨床試驗的初步結果，以評估全人單選殖MASP-2抑制性抗體在類固醇依賴型免疫球蛋白A腎病(IgAN)的成人、以及類固醇依賴型膜性腎病(MN)的成人中的安全性和臨床功效。

【1067】 背景：

【1068】 慢性腎臟疾病影響美國多於2000萬人(Drawz P.等人，Ann Intern Med 162(11)；ITC1-16，2015)。腎小球性腎病(GN)，包括IgAN和MN是其中腎小球被損害，且頻繁導致終末期腎疾病和透析的腎臟疾病。存在幾種類型的原發性GN，最常見的是IgAN。這些患者中的許多具有持續的腎炎症和進行性惡化。這些患者經常用皮質類固醇或免疫抑制劑進行治療，其具有許多嚴重的長期不良後果。即使處於這些治療下，許多患者仍繼續惡化。不存在批准用於治療IgAN或MN的治療。

【1069】 IgA腎病

【1070】 免疫球蛋白A腎病(IgAN)是自身免疫性腎臟疾病，導致腎內炎症和腎臟損傷。IgAN是全球最常見的原發性腎小球疾病。具有大約2.5/100,000的年發病率，估計美國1400人中的1個發展IgAN。多達40%的IgAN患者發展終末期腎臟疾病(ESRD)。患者通常呈現有顯微鏡性血尿，具有輕度至中度蛋白尿和可變水平的腎功能不全(Wyatt R.J.等人，N Engl J Med 368(25):2402-14，2013)。臨床標記物如腎功能受損、持續性高血壓和重度蛋白尿(超過1 g/天)與預後不良相關(Goto M等人，Nephrol Dial Transplant 24(10):3068-74，2009；

Berthoux F.等人，J Am Soc Nephrol 22(4):752-61，2011)。蛋白尿是在多重大型觀察研究和前瞻性試驗中，不依賴於其它風險因素的最強預後因素(Coppo R.等人，J Nephrol 18(5):503-12，2005；Reich H. N.等人，J Am Soc Nephrol 18(12):3177-83，2007)。如果不予以治療，估計15-20%的患者在疾病發作的10年內達到ESRD(D'Amico G.，Am J Kidney Dis 36(2):227-37，2000)。

【1071】 IgAN的診斷標誌是腎小球系膜中佔優勢的單獨或者與IgG、IgM或兩者一起的IgA沉積。在IgAN中，腎臟活組織檢查揭示了甘露聚糖結合凝集素(MBL)的腎小球沉積，所述MBL是關於MASP-2(補體系統的凝集素途徑的效應酶)活化的關鍵識別分子。通常與IgA共定位並指示補體活化的腎小球MBL沉積物、以及高水平的尿MBL與IgAN中的不利預後相關，其中這些患者證實了比不具有MBL沉積或具有高水平的尿MBL的患者更嚴重的組織學改變和系膜增生(Matsuda M.等人，Nephron 80(4):408-13，1998；Liu LL等人，Clin Exp Immunol 169(2):148-155，2012；Roos A.等人，J Am Soc Nephrol 17(6):1724-34，2006；Liu LL等人，Clin Exp Immunol 174(1):152-60，2013)。緩解率對於具有MBL沉積的患者也基本上更低(Liu LL等人，Clin Exp Immunol 174(1):152-60，2013)。

【1072】 用於IgAN的目前療法包括血壓控制，以及頻繁地，用於嚴重疾病(例如新月體性IgAN)的皮質類固醇和/或其它免疫抑制劑，例如環磷醯胺、硫唑嘌呤或黴酚酸酯。Kidney Disease Improving Global Outcomes(KDIGO)Guidelines for Glomerulonephritis(Int. Soc of Nephrol 2(2):139-274，2012)，建議皮質類固醇應該施用於蛋白尿大於或等於1 g/天的患者，具有6個月的通常治療持續時間。然而，即使用侵襲性免疫抑制治療(其與嚴重的長

期後遺症相關)，一些患者具有腎功能的逐漸惡化。不存在用於IgAN的批准治療，並且即使使用血管緊張素轉化酶(ACE)抑制劑或血管緊張素受體阻滯劑(ARB)來控制血壓，增加的蛋白尿在某些患者中持續存在。在處於疾病迅速發展的風險中的患者中，這些治療無一已顯示停止或甚至減緩IgAN的進展。

【1073】 膜性腎病

【1074】 膜性腎病(MN)的年發病率為大約10-12/1,000,000。MN患者可以具有可變的臨床病程，但大約25%發展終末期腎疾病。

【1075】 膜性腎病是免疫介導的腎小球疾病，以及成人中的腎病症候群的最常見原因之一。該疾病的特徵在於腎小球基底膜的外面上的免疫沉積物(主要是IgG4)形成，其含有足細胞抗原以及對那些抗原特異性的抗體，導致補體活化。MN的最初表現與腎病症候群有關：蛋白尿、低白蛋白血症、高脂血症和水腫。

【1076】 儘管MN可能無需治療自發地緩解，但在診斷後5年的中值下，多達三分之一的患者證實了腎臟功能的逐漸喪失和進展為ESRD。皮質類固醇經常用於治療MN，並且需要開發替代療法。另外，基於蛋白尿的嚴重性，確定為處於進展的中度風險中的患者用與環磷醯胺或鈣調蛋白抑制劑結合的潑尼松進行治療，並且這兩種治療一起經常與嚴重的全身性不良作用相關。

【1077】 方法：

【1078】 在健康志願者中進行的兩項1期臨床試驗已證實了，MASP-2抑制性抗體OMS646的靜脈內和皮下給藥均導致持續的凝集素途徑抑制。

【1079】 本實施例描述了來自MASP-2抑制性抗體OMS646在患有IgAN和MN的受試者中的進行中的2期、非對照、多中心研究的中期結果。納入標準要

求這項研究中的所有患者，不管腎疾病亞型如何，在研究入選之前已維持在穩定劑量的皮質類固醇下至少12周(即，患者是類固醇依賴性的)。該研究是單組(arm)先導性研究，具有12周治療期和6周隨訪期。

【1080】 計劃入選大約四個受試者/疾病。該研究設計為評估OMS646是否可以改善IgAN和MN受試者的腎功能(例如，改善蛋白尿)，且減少皮質類固醇需求。迄今為止，2個IgA腎病患者和2個膜性腎病患者已完成了該研究中的治療。

【1081】 在研究進入時，儘管用穩定的皮質類固醇劑量的持續治療，每個受試者必須具有在尿中高水平的蛋白質。這些標準選擇了在研究期過程中不太可能自發地改善的患者。

【1082】 受試者在篩選時為≥18歲，並且僅在他們具有下述診斷之一時才被納入研究中：在腎臟活組織檢查時診斷的IgAN或在腎臟活組織檢查時診斷的原發性MN。入選患者還必須滿足所有下述納入標準：

【1083】 (1)在篩選期過程中的2次就診的每一次之前，具有來自連續且每天收集的三個樣品的平均尿白蛋白/肌酐比> 0.6。

【1084】 (2)在篩選就診1之前，已處於≥10 mg潑尼松或等價劑量下至少12周；

【1085】 (3)如果處於免疫抑制治療(例如環磷醯胺、黴酚酸酯)下，則在篩選就診1之前已處於穩定劑量下至少2個月，對於研究持續時間沒有預計的劑量變化；

【1086】 (4)具有通過MDRD方程[1]計算的估計腎小球濾過率(eGFR)≥ 30 mL/分鐘/1.73m^2；

【1087】 (5)處於醫生指導的、穩定、優化的用血管緊張素轉化酶抑制劑(ACEI)和/或血管緊張素受體阻滯劑(ARB)的治療，並且具有在休息時<150 mmHg的收縮壓和<90mmHg的舒張壓；

【1088】 (6)在篩選就診1的6個月內，未使用貝利木單抗、依庫珠單抗或利妥昔單抗；和

【1089】 (7)沒有腎臟移植史。

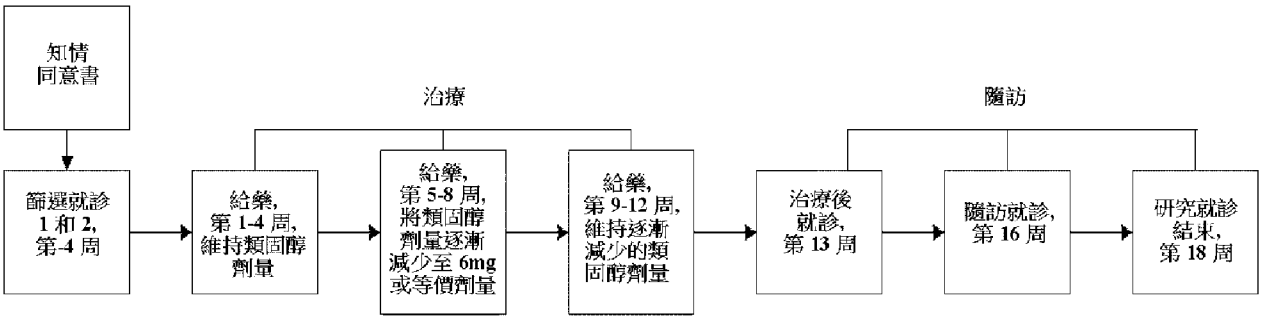
【1090】 [1]MDRD方程：eGFR(mL/分鐘/1.73m^2)= 175 x$(SCr)^{-1.154}$ x$(年齡)^{-0.203}$ x(如果是女性則為0.742)x(如果是非裔美國人則為1.212)。注意：SCr =血清肌酐測量應為mg/dL。

【1091】 這項研究中使用的單選殖抗體OMS646是結合並抑制人MASP-2的全人IgG4單選殖抗體。MASP-2為凝集素途徑的效應酶。如實施例12中證實的，OMS646與重組MASP-2親合地結合(表觀平衡解離常數在100 pM的範圍內)，並且顯示出超過同源蛋白C1、C1r和MASP-1大於5,000倍的選擇性。在功能測定中，OMS646以納摩爾效力(導致大約3 nM的50%抑制[IC_{50}]的濃度)抑制人凝集素途徑，但對經典途徑沒有顯著作用。通過對小鼠、非人靈長類動物和人的靜脈內(IV)或皮下(SC)注射施用的OMS646導致高血漿濃度，其與離體測定中凝集素途徑活化的壓制相關。

【1092】 在這項研究中，OMS646原料藥以100 mg/mL的濃度提供，所述濃度進一步稀釋用於IV施用。使用注射器從小瓶中抽取適當計算體積的OMS646 100 mg/mL注射溶液，用於劑量製備。輸液袋在製備後的四個小時內施用。

【1093】 研究由篩選(28天)、治療(12周)和隨訪(6周)期組成，如下文的研究設計示意圖中所示。

【1094】 研究設計示意圖



【1095】 在篩選期內且在第一個OMS646劑量之前，同意的受試者提供在兩個連續三天時期各自的三個尿樣品(每天收集一次)，以建立尿白蛋白/肌酐比的基線值。在篩選期之後，合格的受試者接受每週一次的OMS646 4 mg/kg IV，共12周(治療期)。在OMS646的最後一個劑量後存在6周的隨訪期。

【1096】 在用OMS646治療的最初4周過程中，受試者維持在其穩定的研究前皮質類固醇劑量下。在12周治療期的最初4周結束時，受試者經歷皮質類固醇逐漸減少(即，降低皮質類固醇劑量)，如果耐受，則持續4周，隨後為在此期間維持所得的皮質類固醇劑量的4周。目標是每天逐漸減少至≤ 6 mg潑尼松(或等價劑量)。經過這個時期，如通過研究者確定的，逐漸減少在具有腎功能惡化的受試者中停止。通過皮質類固醇逐漸減少和整個12周的治療，用OMS646來治療受試者。然後，在其最後一次治療後，對患者再隨訪6周。皮質類固醇的逐漸減少和OMS646治療，允許評價OMS646是否允許維持穩定腎功能所需的皮質類固醇劑量的減少。

【1097】 這項研究中的關鍵功效測量是從基線到12周，尿白蛋白/肌酐比率(uACR)和24小時蛋白質水平的變化。尿蛋白或白蛋白的測量照常規用於評價腎臟牽涉，並且持續高水平的尿蛋白與腎疾病進展相關聯。uACR在臨床上用於評價蛋白尿。

【1098】 功效分析

【1099】 uACR的分析值定義為對於某個時間點獲得的所有值的均值。uACR的計劃數目為在每個計劃的時間點三個。uACR的基線值定義為兩次篩選就診時的分析值的均值。

【1100】 結果：

【1101】 圖40以圖形方式示出了，在用4 mg/kg MASP-2抑制性抗體(OMS646)的每週治療的十二周研究過程期間，兩個IgAN患者中的uACR。如圖40中所示，距離基線的變化通過未轉化的分析，在時間點“a”(p=0.003)；時間點“b”(p=0.007)和時間點“c”(p=0.033)下是統計上顯著的。表12提供了關於用OMS646治療的兩個IgAN患者的24小時尿蛋白數據。

【1102】 表12：OMS646治療的IgAN患者中的24小時尿蛋白(mg/天)

樣品的時間	患者#1 (mg/24小時)	患者#2 (mg/24小時)	平均值
基線	3876	2437	3156
第85天	1783	455	1119
p= 0.017			

【1103】 如圖40和表12中所示，經過研究的過程，IgAN患者證實了腎臟功能的臨床和統計上顯著的改善。存在uACR(參見圖40)和24小時尿蛋白濃度(參見表12)兩者統計上顯著的減少。如圖40中的uACR數據中所示，平均基線uACR為1264 mg/g，並且在治療結束時達到525 mg/g(p=0.011)，在隨訪期結束時減少至128 mg/g。如圖40中進一步所示，治療效應在隨訪期自始至終得到維持。24小時尿蛋白排泄的測量跟蹤uACR，具有從3156 mg/24小時到1119 mg/24小時的平均降低(p=0.017)。跨越兩個患者的治療效應是高度一致的。兩個患者經歷了大約2000 mg/天的降低，並且均達到部分緩解(定義為24小時尿蛋白排泄的大於50百分比降低和/或所得的蛋白排泄少於1000 mg/天；完全緩解定義為蛋白質排泄少於300 mg/天)。兩個IgA腎病患者的24小時蛋白尿降低量級與腎存活的顯著改善相關。兩個IgA腎病患者也能夠基本上逐漸減少其類固醇的劑量，各自將日劑量降低至≤ 5 mg(60 mg至0 mg；30 mg至5 mg)。

【1104】 兩個MN患者也證實了在用OMS646治療期間的uACR降低。一個MN患者具有從1003 mg/g到69 mg/g的uACR減少，並且在隨訪期自始至終維持在這個低水平下。另一個MN患者具有從1323 mg/g到673 mg/g的uACR減少，具有在治療後的可變過程。第一個MN患者顯示24小時尿蛋白水平的顯著降低(在基線時的10,771 mg/24小時到在第85天時的325 mg/24小時)，達到部分緩解和幾乎完全緩解，而另一個患者保持基本不變(在基線時的4272 mg/24小時到在第85天時的4502 mg/24)。類固醇在兩個MN患者中逐漸減少，從30 mg到15 mg，且從10 mg到5 mg。

【1105】 總之，在用MASP-2抑制性抗體OMS646治療的IgAN和MN受試者中，觀察到腎功能的一致改善。OMS646治療在IgAN患者中的效應是穩固且

一致的，提示了強功效信號。這些效應通過MN患者中的結果得到支持。在治療期間uACR變化的時間過程和量級在所有四個IgAN和MN患者中是一致的。沒有觀察到重大的安全問題。這項研究中的患者代表了難以治療組，並且這些患者中的療效被認為預測在IgAN和MN患者中用MASP-2抑制性抗體如OMS646的功效，所述患者例如患有類固醇依賴性IgAN和MN的患者(即，在用MASP-2抑制性抗體治療之前，經歷用穩定皮質類固醇劑量的治療的患者)，包括處於迅速進展為終末期腎疾病的風險中的患者。

【1106】根據前述內容，在一個實施方案中，本發明提供了治療患有IgAN或MN的人受試者的方法，其包括將包含有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物施用於受試者。在一個實施方案中，該方法包括將足以改善腎功能(例如，改善蛋白尿)的量的MASP-2抑制性抗體施用於患有IgAN或MN的人受試者。在一個實施方案中，受試者患有類固醇依賴性IgAN。在一個實施方案中，受試者患有類固醇依賴性MN。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體以足以改善所述受試者的腎功能和/或減少皮質類固醇劑量的量施用於患有類固醇依賴性IgAN或類固醇依賴性MN的受試者。

【1107】在一個實施方案中，該方法進一步包括在將包含有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物施用於受試者的步驟之前，鑒定患有類固醇依賴性IgAN的人受試者。

【1108】在一個實施方案中，該方法進一步包括在將包含有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制性抗體的組合物施用於受試者的步驟之前，鑒定患有類固醇依賴性MN的人受試者。

【1109】根據本文公開的實施方案中的任一個，MASP-2抑制性抗體顯示出下述特徵中的至少一個或多個：所述抗體以10 nM或更小的K_D結合人MASP-2，所述抗體結合MASP-2的CCP1結構域中的表位，所述抗體在體外測定中，以10 nM或更小的IC_{50}抑制1%人血清中的C3b沉積，所述抗體以30 nM或更小的IC_{50}抑制90%人血清中的C3b沉積，其中所述抗體為選自Fv、Fab、Fab'、$F(ab)_2$和$F(ab')_2$的抗體片段，其中所述抗體是單鏈分子，其中所述抗體是IgG2分子，其中所述抗體是IgG1分子，其中所述抗體是IgG4分子，其中所述IgG4分子包含S228P突變。在一個實施方案中，該抗體結合MASP-2並選擇性地抑制凝集素途徑，並且基本上不抑制經典途徑(即，抑制凝集素途徑，同時使經典補體途徑保持原樣)。

【1110】在一個實施方案中，施用MASP-2抑制性抗體，其量有效改善至少一種或多種腎功能相關的臨床參數，例如蛋白尿的改善(例如，uACR的減少和/或24小時尿蛋白濃度的減少，例如24小時尿蛋白排泄的大於20百分比降低，或例如24小時尿蛋白排泄的大於30百分比降低，或例如24小時尿蛋白排泄的大於40百分比降低，或例如24小時尿蛋白排泄的大於50百分比降低)。

【1111】在一些實施方案中，該方法包括對於第一時間段(例如，至少一天至一周或兩周或三周或四周或更長時間)，經由導管(例如，靜脈內)，將MASP-2抑制性抗體施用於患有IgAN(例如，類固醇依賴性IgAN)的受試者，隨後為對於第二時間段(例如，至少兩周或更長時間的慢性期)，將MASP-2抑制性抗體皮下施用於受試者。

【1112】在一些實施方案中，該方法包括對於第一時間段(例如，至少一天至一周或兩周或三周或四周或更長時間)，經由導管(例如，靜脈內)，將

MASP-2抑制性試劑施用於患有MN(例如，類固醇依賴性MN)的受試者，隨後為對於第二時間段(例如，至少兩周或更長時間的慢性期)，將MASP-2抑制性抗體皮下施用於受試者。

【1113】在一些實施方案中，該方法包括將MASP-2抑制性抗體靜脈內、肌內或皮下施用於患有IgAN(例如類固醇依賴性IgAN)或MN(例如類固醇依賴性MN)的受試者。治療可以是慢性的，並且每天至每月施用，但優選至少每兩周或每週至少一次，例如每週兩次或每週三次。

【1114】在一個實施方案中，該方法包括治療患有IgAN(例如類固醇依賴性IgAN)或MN(例如類固醇依賴性MN)的受試者，其包括向受試者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些實施方案中，該組合物包括包含以下的MASP-2抑制性抗體：(a)重鏈可變區，其包含：i)包含來自SEQ ID NO:67的31-35的胺基酸序列的重鏈CDR-H1；和ii)包含來自SEQ ID NO:67的50-65的胺基酸序列的重鏈CDR-H2；和iii)包含來自SEQ ID NO:67的95-107的胺基酸序列的重鏈CDR-H3，以及b)輕鏈可變區，其包含：i)包含來自SEQ ID NO:69的24-34的胺基酸序列的輕鏈CDR-L1；和ii)包含來自SEQ ID NO:69的50-56的胺基酸序列的輕鏈CDR-L2；和iii)包含來自SEQ ID NO:69的89-97的胺基酸序列的輕鏈CDR-L3，或(II)其變體，其包含與SEQ ID NO:67具有90%的同一性(例如，與SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少

99%的同一性)的重鏈可變區，以及與SEQ ID NO:69具有90%的同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的同一性)的輕鏈可變區。

【1115】 在一些實施方案中，該方法包括向受試者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體包括包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區、以及包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的輕鏈可變區。

【1116】 在一些實施方案中，該方法包括向受試者施用包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體特異性識別人MASP-2上由參考抗體OMS646識別的表位的至少一部分，所述參考抗體OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重鏈可變區和如SEQ ID NO:69中所示的輕鏈可變區。

【1117】 在一些實施方案中，該方法包括向患有或處於發展IgAN(例如，類固醇依賴性IgAN)或MN(例如，類固醇依賴性MN)的風險中的受試者，施用包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體包括包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區、以及包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的輕鏈可變區，其劑量為1 mg/kg至10 mg/kg(即，1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg)，每週至少一次(例如每週至少兩次或每週至少三次)，持續至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的時期。

【1118】 實施例20

【1119】本實施例描述了在患有或處於發展冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群的風險中的受試者治療中，使用MASP-2抑制性抗體OMS646的研究。

【1120】背景/原理：

【1121】急性呼吸窘迫症候群是冠狀病毒感染的嚴重併發症。SARS-CoV在2002年和2003年從中國的動物市場上循環的冠狀病毒中出現，導致呼吸系統疾病的全球暴發，具有超過8,000個人病例和10%的死亡率(Rota P.A.等人，Science 300:1394-1999，2003)。在2012年，在中東鑒定了新的有關冠狀病毒，指定為中東呼吸症候群冠狀病毒(MERS-CoV)，其引起嚴重的呼吸系統疾病，具有大於35%的死亡率(Zaki A.M.等人，N Engl J Med 367:1814-1820，2012)。冠狀病毒病2019(COVID-19)是在2019年出現的傳染病，並且由嚴重急性呼吸症候群冠狀病毒2(SARS冠狀病毒2或SARS-CoV-2)引起，所述病毒是與SARS病毒密切相關的病毒(世界衛生組織，2/11/2020，Novel Coronavirus Situation Report 22)。COVID-19、SARS-CoV和MERS-CoV全都引起從無症狀病例到嚴重急性呼吸窘迫症候群(冠狀病毒誘導的ARDS)和呼吸衰竭的一系列疾病。受COVID-19影響的那些人可能發展發燒、乾咳、疲勞和呼吸短促。在計算機斷層掃描上的發現可以顯示肺部磨玻璃影和雙側絮狀陰影。病例可能進展為呼吸功能障礙，包括肺炎、嚴重急性呼吸窘迫症候群，其可以導致多器官衰竭和敗血性休克、以及最脆弱的人的死亡(參見例如，Hui D.S.等人，Int J Infect Dis 91:264-266，2020年1月14日，以及等人OI:10.1056/NEJMoa2002032)。不存在疫苗或特異性抗病毒治療，其管理涉及症狀的治療和支持性護理。因此，迫切需要開發治療上有效的試劑，以治療、抑制和/或預防冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群。

【1122】 已觀察到補體活化促成冠狀病毒誘導的嚴重急性呼吸症候群的發病機制。發現與受SARS-CoV感染的C57BL/6J對照小鼠相比，補體組分3缺陷的受SARS-CoV感染的小鼠(C3-/-小鼠)，顯示出顯著更少的重量減輕和更少的呼吸功能障礙，儘管肺中的等價病毒載量(Gralinski L.E.等人，mBio 9:e01753-18，2018)。進一步觀察到，與受感染的對照小鼠相比，在受SARS-CoV感染的C3-/-小鼠的肺部中，存在顯著更少的嗜中性粒細胞和炎性單核細胞，以及與受感染的對照小鼠相比，在受SARS-CoV感染的C3-/-小鼠的肺中，減輕的肺病理狀況以及更低的細胞因子和趨化因子水平(例如，IL-5、IL-6)(Gralinski L.E.等人，mBio 9:e01753-18，2018)。

【1123】 研究還已顯示了，SARS-CoV感染的許多倖存者發展肺纖維化，具有在老年患者中的更高患病率(Hui D.S.等人，Chest 128:2247-2261，2005)。存在用於治療肺部纖維化例如冠狀病毒誘導的纖維化的有限選項。傳統上，皮質類固醇用於治療ARDS和肺纖維化，然而，在病毒感染期間，這種治療障礙免疫應答並且可以導致疾病惡化(Gross T.J.等人，N Engl J Med 345:517-525，2001)。

【1124】 如先前注意到的，尚無用於COVID-19的有效治療，並且該疾病正在快速傳播中。儘管死亡率評價仍為早期，但世界衛生組織報告了在2020年3月上旬3.4%的死亡率(worldwideweb.who.int/dg/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--2020年3月3日)。需要用於嚴重COVID-19感染的患者的有效治療。

【1125】 如本文所述，凝集素途徑是補體的三種活化途徑之一。其它途徑是經典途徑和替代途徑。所有活化途徑都導致過敏毒素C3a和C5a的產生，以及靶細胞上C5b-9或膜攻擊複合物(MAC)的產生。

【1126】 凝集素途徑是先天免疫系統的部分，並且被微生物或受損細胞活化。微生物展示基於碳水化合物的病原體相關分子模式(PAMP)，並且受損的宿主細胞展示損害相關分子模式(DAMP)。DAMP並不在健康細胞上展示，但隨著細胞損傷而變得暴露。

【1127】 循環凝集素，例如甘露糖結合凝集素(MBL)、纖維膠凝蛋白和膠原凝集素識別並結合PAMP和DAMP。與PAMP或DAMP結合的凝集素將補體活化定位於細胞膜的附近。這些凝集素攜帶甘露聚糖結合凝集素相關絲胺酸蛋白酶2(MASP-2)，其切割補體因子2和4以產生C3轉化酶，所述C3轉化酶本身然後切割C3，以形成C5轉化酶。除凝集素途徑活化之外，替代途徑也可以被活化並擴大補體活化。所有這些都導致MAC插入受損細胞的膜內，使細胞進一步損傷，具有更多的DAMP暴露。攜帶MASP-2的循環凝集素識別並結合DAMP，導致進一步的凝集素途徑活化和另外的細胞損傷。以這種方式，凝集素途徑可以放大並惡化由初始補體活化引起的細胞損傷。

【1128】 如本文所述，OMS646(也稱為OMS721或納索利單抗)是針對MASP-2的研究性人IgG4單選殖抗體。如本文進一步所述，通過阻斷MASP-2，抑制了凝集素途徑的活化。這可能破壞上述補體介導的細胞損傷循環。迄今為止，OMS646已施用於大約230個健康志願者、血栓性微血管病(TMA)患者、以及腎小球性腎病例如免疫球蛋白A [IgA]腎病患者。

【1129】 凝集素途徑可能在冠狀病毒誘導的ARDS中啟動且持續補體活化中起關鍵作用，並且經由MASP-2抑制劑(例如MASP-2抑制性抗體OMS646)的凝集素途徑抑制，可能解決與冠狀病毒感染有關的補體介導的肺部損傷。如本文所述，發明人發現對補體系統的凝集素途徑的關鍵調節劑即甘露聚糖結合凝集素相關絲胺酸蛋白酶2(MASP-2)的抑制，顯著降低了纖維化疾病的各種動物模型中的炎症和纖維化。例如，本文實施例14和15中呈現的結果證實了MASP-2抑制對腎小管間質性炎症、小管細胞損傷、促纖維化細胞因子釋放和瘢痕形成的有益作用。如實施例17中所述，在關於降低和/或預防野生型小鼠中的小鼠蛋白質超負荷蛋白尿模型中的腎炎症和小管間質性損傷中的功效，單選殖MASP-2抑制性抗體的分析中，確定與鹽水對照組(p=0.0269)以及同種型對照組(p=0.0445)相比，存在MASP-2抑制性抗體治療的組中的IL-6水平的顯著降低，如圖36中所示。

【1130】 方法：

【1131】 進行下述研究，以分析OMS646在治療患有冠狀病毒(例如COVID-19-病毒)感染的一個或多個患者中的用途，以便測量OMS646用於治療、抑制、減輕或預防所述患者的急性呼吸窘迫症候群中的功效。

【1132】 該方法涉及鑒定由冠狀病毒例如SARS-CoV-2、MERS-CoV或SARS-CoV感染的受試者，其可以通過進行診斷測試，例如分子測試(例如，rRT-PCR)或血清學測試，或參考含有此類信息的數據庫來確定。用於SARS-CoV-2、MERS-CoV和SARS-CoV的示例性測試在疾病控制中心(Centers For Disease Control)網站(world-wide-web.cdc.gov/coronavirus/mers/lab/lab-testing.html#molecular)上找到。

【1133】 受試者可能患有COVID-19誘導的ARDS，或處於發展ARDS的風險中，例如患有肺炎的受試者。肺炎是ARDS發展的最常見風險因素(Sweeney R.M.和McAuley，D.F.，Lancet第388卷:2416-30，2016)。

【1134】 COVID-19誘導的ARDS定義為這樣的臨床症候群，其在由SARS-CoV-2感染後發展，並且滿足下述ARDS標準中的一種或多種(Sweeney R.M.和McAuley，D.F.，Lancet第388卷:2416-30，2016)，基於柏林定義(JAMA 307:2526，2012)：

【1135】 ● 氧合(mm Hg)：輕度(PaO_2/FiO_2 200-300)；中度($PaO_2/Fi\ O_2$ 100-199)；嚴重(PaO_2/FiO_2 <100)

【1136】 ● 呼氣末正壓(PEEP)(cm H_2O)：要求的最低PEEP為5

【1137】 ● 胸部射線照相上的浸潤：涉及額葉射線照相或CT上的兩個或更多個象限的雙側浸潤

【1138】 ● 心力衰竭：不足以單獨負責臨床狀態的左心衰竭

【1139】 ● 嚴重性：基於氧合標準

【1140】 治療施用

【1141】 患有COVID-19並經歷一種或多種呼吸道症狀(例如上文列出的那些標準)的受試者，經由靜脈內輸注用4mg/kg OMS646給藥。治療每週施用兩次。劑量頻率由對療法的患者應答指導。如果患者證實維持4周的臨床改善，則劑量可以減少至每週一次4mg/kg。如果患者在每週一次接受4mg/kg共4周時維持治療應答，則可能中止治療。

【1142】 當在呼吸功能例如一種或多種呼吸道症狀，例如一種或多種ARDS標準中觀察到改善時，確定對治療的陽性應答。

【1143】根據前述內容，在一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防由感染冠狀病毒的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群或疾病的其它表現的方法，其包括向受試者施用有效抑制MASP-2依賴性補體活化(即，抑制凝集素途徑活化)的量的MASP-2抑制劑。在一些實施方案中，受試者患有一種或多種呼吸道症狀，並且該方法包括向受試者施用有效改善MASP-2依賴性補體活化(即，改善呼吸功能)的量的MASP-2抑制劑。

【1144】在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由SARS-CoV-2感染的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由SARS-CoV感染的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由MERS-CoV感染的受試者。在一個實施方案中，在施用MASP-2抑制劑之前，受試者被鑒定為具有冠狀病毒(即，SARS-CoV-2、SARS-CoV或MERS-CoV)。

【1145】在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是抑制MASP-2依賴性補體活化的小分子。

【1146】在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。

【1147】在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其IC_{50}為30 nM或更小。

【1148】在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所

示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列。

【1149】在一些實施方案中，該方法包括向由冠狀病毒感染的受試者施用包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體包括包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區、以及包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的輕鏈可變區，其劑量為1 mg/kg至10 mg/kg(即，1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg)，每週至少一次(例如每週至少兩次或每週至少三次)，持續至少2周(例如至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周)的時期。

【1150】在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量為約4 mg/kg(即3.6 mg/kg至4.4 mg/kg)。

【1151】在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量是約300 mg至約450 mg(即，約300 mg至約400 mg、或約350 mg至約400 mg)，例如約300 mg、約305 mg、約310 mg、約315 mg、約320 mg、約325 mg、約330 mg、約335 mg、約340 mg、約345 mg、約350 mg、約355 mg、約360 mg、約365 mg、約370 mg、約375 mg、約380 mg、約385 mg、約390 mg、約395 mg、約400 mg、約405 mg、約410 mg、約415 mg、約420 mg、約425 mg、約430 mg、約435 mg、約440 mg、約445 mg和約450 mg)的固定劑量。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量是約370 mg(±10%)的固定劑量。

【1152】 在一個實施方案中，該方法包括每週兩次向由冠狀病毒感染的受試者，靜脈內施用以約370 mg(±10%)的固定劑量的MASP-2抑制性抗體，持續至少8周的治療期。

【1153】 在一個實施方案中，將MASP-2抑制劑全身性地遞送至受試者。在一個實施方案中，將MASP-2抑制劑經口、皮下、腹膜內、肌內、動脈內、靜脈內或作為吸入劑施用。

【1154】 實施例21

【1155】 COVID-19患者中的OMS646(納索利單抗)治療

【1156】 本實施例描述了使用實施例20中所述的方法，在COVID-19患者的治療中使用納索利單抗(OMS646)。本實施例中所述的結果確認了納索利單抗在實施例20中所述的COVID-19患者中的功效。

【1157】 背景/原理：

【1158】 嚴重急性呼吸症候群冠狀病毒2(SARS-CoV-2；COVID-19)在2019年12月在中國湖北省被鑒定為臨床症候群，並且快速傳播(Zhou F，Yu T，Du R等人Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan，China: a retrospective cohort study. Lancet，395: 1054-62，2020)。到2020年2月下旬，在意大利北部的Lombardy地區診斷了數目快速增長的COVID-19病例(Remuzzi A，Remuzzi G. COVID-19 and Italy: what next? The Lancet)。COVID-19的主要死亡原因是嚴重的呼吸功能障礙。已死於COVID-19的患者中的肺組織顯示高濃度的SARS-CoV RNA(Wichmann D.等人，Ann Intern Med，2020)，並且相同強度的炎性變化在先前報告的冠狀病毒SARS-CoV(SARS)和MERS-CoV(MERS)中可見，並且抗炎策略正在針對COVID-19治

療進行評估(Xu Z.等人，Lancet Respir Med，8(4):420-2，2020；Horby P.等人，medRxiv 2020: 2020.06.22.20137273；Gritti G.等人，medRxiv 2020: 2020.04.01.20048561)。血栓形成也已在SARS和SARS-CoV-2感染中得到報告(Wichmann D.等人，Ann Intern Med 2020；Magro C.等人，Transl Res 2020；Ding Y.等人，J Pathol 200(3):28209，2003)。如同SARS和MERS，COVID-19可以引起危及生命的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)(Guan W.J，Ni Z.Y，Hu Y等人 Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. N Engl J Med 2020 [提前在線出版])。

【1159】 COVID-19和ARDS滲出期的關鍵病理組分是內皮損傷和活化(Varga Z.等人，Lancet 2020；Ackermann M.等人，N Engl J Med 2020；Green S. J.等人，Microbes Infect 22(4-5):149-50，2020；Teuwen L.A.等人，Nat Rev Immunol 20(7):389-91，2020；Goshua G.等人，Lancet Haematol 2020；Thompson B.T.等人，N Engl J Med 377(19):1904-5，2017)。ARDS中增加的毛細血管滲透性和肺水腫的根本原因，內皮損傷也可以引起微血管血管病和血栓形成。內皮損傷也可以引起微血管血管病和血栓形成。內皮活化進一步增強了局部炎症環境。重要的是，如在人體外和動物研究中證實的，內皮損傷特異性活化內皮細胞表面上的補體的凝集素途徑(Collard CD，Väkevä A，Morrissey MA等人Complement Activation after Oxidative Stress: Role of the Lectin Complement Pathway. Am J Pathol 2000；156(5):1549–1556)。

【1160】 如實施例20中所述，與MSP-2結合並阻斷凝集素途徑活化的高親和力單選殖抗體，OMS646(也稱為納索利單抗)預計有效治療COVID-19患者。與實施例20中的描述一致，在動物模型中，MASP-2已與冠狀病毒感染中的肺

損傷直接聯繫。參見Gao等人，medRxiv 3/30/2020。MASP-2還直接作用於凝血級聯和接觸系統，將凝血酶原切割為凝血酶並形成纖維蛋白凝塊。納索利單抗不僅抑制凝集素途徑活化，還阻斷微血管損傷相關的血栓形成、以及MASP-2介導的激肽釋放酶和因子XII的活化。

【1161】 尚未顯示有效治療COVID-19的疾病特異性療法。鑒於意大利的沉重疾病負擔，我們在Bergamo的Papa Giovanni XXIII Hospital，在同情使用計劃下，用納索利單抗治療具有嚴重COVID-19感染和ARDS的患者。這代表凝集素途徑抑制劑已首次用於治療COVID-19的患者。在此處，我們報告了這種初步的臨床經驗。

【1162】 方法

【1163】 研究監督

【1164】 本實施例中所述的調查在意大利Bergamo的Azienda Socio-Sanitaria Territoriale Papa Giovanni XXIII進行，並且得到機構倫理委員會和Agenzia Italiana del Farmaco的批准。按照標準臨床實踐收集實驗室值，包括血細胞計數、LDH、C反應蛋白(CRP)。所有用納索利單抗(OMS646)治療的患者都提供了知情同意書。這項研究使用實施例20中所述的方法進行，如下文進一步所述。

【1165】 組織病理學

【1166】 對得自COVID-19患者的病理屍檢的福爾馬林固定、石蠟包埋的樣品執行標準蘇木精和曙紅染色(H&E)和免疫組織化學。H&E染色的切片通過兩個病理學家進行審查。為了確認診斷，用Bond Ready-to-Use Antibody CD34(Clone QBEnd/10，Leica Biosystems，德國)，已對於Bond Polymer Refine

Detection使用特異性優化的即用型產品，執行人內皮細胞標記物(CD34)的免疫組化分析。如通過製造商推薦的，使用基於熱的抗原修復技術(Bond Epitope Retrieval溶液2，共20分鐘)，在自動化染色器平臺(Leica Bond-3，Leica，德國)上執行測定。肺泡毛細血管中的內皮的細胞質染色指示陽性結果。

【1167】 循環內皮細胞(CEC)的鑒定和計數

【1168】 通過對用EDTA收集的外周血樣品執行的流式細胞術分析來測試CEC。在紅細胞裂解步驟後，樣品用下述單選殖抗體在室溫下標記20分鐘：抗CD45 V500(選殖2D1，Becton Dickinson，San Jose`，CA)、抗CD34 PerCP-CY5.5(選殖8G12，Becton Dickinson，San Jose`，CA)、抗CD146 PE(選殖P1H12BD，Pharmingen，CA)。通過流式細胞術(FACSLyric，BD Biosciences)，獲得具有總白細胞形態的至少1×10^6個事件/樣品。為了降低操作者引起的變異性，這項研究中的所有樣品始終由同一位實驗室技術人員進行分析。如先前報告的，使用淋巴細胞子集作為參考群體，通過雙平臺計數法計算CEC/ml數(Almici C.等人，Bone Marrow Transplant 52:1637-42，2017)。

【1169】 細胞因子的血清水平

【1170】 通過流式細胞術(BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit，Becton Dickinson，San Jose，CA)，在單個血清樣品中分析白細胞介素8(IL-8)、白細胞介素1β(IL-1β)、白細胞介素6(IL-6)、白細胞介素10(IL-10)、腫瘤壞死因子(TNF)和白細胞介素12p70(IL-12p70)的水平。

【1171】 患者

【1172】 在2020年3月11日至3月23日之間，所有納索利單抗治療的患者都入院。經過這13天的跨度，在病房住院的COVID-19患者的每日總數範圍為

405至542。在這個相同時間段期間，平均每天利用140個頭盔持續氣道正壓通氣(CPAP)裝置，並且ICU每天管理82個患者的中值(範圍66-91)。在這些ICU患者中，在2020年3月11日的61個以及在2020年3月23日的80個，符合ARDS的柏林標準(PaO2/FiO2比<100是重度ARDS；100 – 200是中度；>200和≤300是輕度)(Ferguson N.D等人，Intensive Care Med 38(10): 1573-82，2012；Fagiuoli S.等人，N Engl J Med 382(21)e71，2020)。

【1173】 在這項研究中治療的所有患者都具有通過定量逆轉錄酶-聚合酶鏈反應測定診斷的實驗室確認的SARS-CoV-2感染。通過不同的分子方法檢測來自鼻和呼吸道樣品的SARS-CoV-2基因組，所述分子方法包括GeneFinder™ Covid-19 Plus RealAmp Kit(ELIThech Group，92800 Puteaux，法國)、以及Allplex™ 2019-nCoV Assay(Seegene Inc，Arrow Diagnostics S.r.l.，意大利)。從臨床樣品中純化病毒RNA後，根據世界衛生組織方案(Corman V.M.等人，Euro Surveill 25，2020)，通過實時聚合酶鏈反應獲得RdRp、E和N病毒基因的檢測。為了對於用納索利單抗治療合格，要求確認COVID-19的患者為成人(>18歲)，並且根據柏林標準患有ARDS(Ferguson ND等人Intensive Care 38(10):1573–1582，2012；還參見Sweeney R.M.和McAuley，D.F.，Lancet第388卷:2416-30，2016；JAMA 307:2526，2012)，並且要求根據機構指南通過持續氣道正壓通氣(CPAP)的非侵入性機械通氣，用於呼吸支持。雖然所有入選患者都憑經驗每天接受一次500 mg阿奇黴素，但患有需要抗菌治療的活動性全身細菌或真菌感染的患者對於納索利單抗治療是不合格的。

【1174】 納索利單抗治療、支持療法和結果評價

【1175】 如實施例20中所述，納索利單抗(OMS646)是由免疫球蛋白γ4(IgG4)重鏈和λ輕鏈恒定區組成的全人單選殖抗體。它以亞納摩爾親和力結合並抑制MASP-2。根據實施例20中所述的方法，納索利單抗每週兩次以4 mg/kg的劑量靜脈內施用於6個由COVID-19感染的患者，共2至4周，最多6至8個劑量(共兩周、三周或四周)。在研究啟動時，給藥持續時間設定為2周，但當用納索利單抗治療的第一個患者在第2周治療停止後經歷臨床和實驗室標記物復發時，根據經驗增加給藥持續時間，隨後因另外一周的給藥而消退。在研究時，所有患者都按照醫院的指南接受了標準的支持護理，包括預防性依諾肝素(Clexane，Sanofi Aventis)4,000 IU/0 4 mL、阿奇黴素(Zitromax，Pfizer SpA，意大利)每天一次500 mg、羥氯喹(Plaquenil，Sanofi Aventis)每天兩次200 mg、達蘆那韋和考比司他(Rezolsta，Janssen-Cilag S.p.A.，意大利)每天一次800/150 mg。從3月27日開始，按照最新機構指南，醫院中的所有COVID-19患者都接受甲潑尼龍1 mg/kg。相應地，在納索利單抗治療啟動之後，6個納索利單抗治療的患者中的總共5個也接受了全身性皮質類固醇(甲潑尼龍1 mg/kg)。所有呼吸支持都根據機構治療算法提供。這6個患者的臨床特點概括於下表13中。

【1176】 除CEC計數和細胞因子水平之外，還按照標準臨床實踐，對所有納索利單抗治療的患者收集臨床和實驗室測量，包括血細胞計數、LDH和C反應蛋白(CRP)水平。在每個納索利單抗劑量之前收集常規血液檢查，然後每週兩次。每天評估呼吸功能。在入院時對所有患者執行胸部計算機斷層成像(CT)掃描，以記錄典型的間質性肺炎，並且如果臨床上指示，則記錄肺栓塞。在治療過程期間，按照臨床要求執行胸部射線照相。

【1177】 統計分析

【1178】 人口統計和臨床患者數據呈現為具有分類變量的百分比的頻率、以及具有關於連續變量的範圍的中值。正常患者和COVID-19患者之間的CEC值差異通過曼懷二氏U檢驗進行評價。在適當的時間點執行重複測量分析，以測試在納索利單抗治療期間，CEC和細胞因子水平的差異；使用非參數弗裡德曼檢驗，並且使用成對的威爾科克森符號秩檢驗執行配對比較。在觀察和時間之間，用非參數斯皮爾曼檢驗評估了在治療期間LDH和CRP水平的下降趨勢。顯著性固定在5%下。使用R軟件(版本3·6·2)來執行分析。

【1179】 表13概括了6個納索利單抗治療的患者的臨床特點。

【1180】 表13：用納索利單抗治療的COVID-19患者的人口統計學

臨床特點	所有患者(N=6)
年齡 – 歲，中值(範圍)	56.5 歲(47-63)
性別 – 數目(%) ….女性 ….男性	 1(17%) 5(83%)
重量- 千克，中值(範圍) BMI- 千克/m^2，中值(範圍)	86(82-100) 28(26.8-32)
從疾病發作到住院的時間 - 天，中值(範圍)	8.5(3-12)
入院時發燒## – 數目(%)	6(100%)
其它症狀 – 數目(%) ……咳嗽 ……食慾減退 ……疲勞 ……呼吸短促 ……噁心或嘔吐 ……腹瀉	 1(17%) 2(33%) 4(67%) 5(83%) 1(17%) 2(33%) 1(17%)

……頭痛	
共存病症 - 數目(%) ……糖尿病 ……高血壓 ……血脂異常 ……肥胖(BMI)≥30 kg/m^2 ……超重≥25 kg/m^2	 1(17%)# 1(17%) 2(33%) 2(33%) 4(66%)
入選時的 ARDS 嚴重性 – 數目(%) ……輕度 ……中度 ……重度	 3(50%) 2(33%) 1(17%)
從住院到治療起始的時間 - 天，中值(範圍)	2 天(1-4)
從 CPAP 放置到治療起始的時間 - 數目(%) …….0-24 小時 ……24-48 小時	 4(67%) 2(33%)
放射學發現	
胸部放射學異常 – 數目(%) ……雙側間質異常	 6(100%)
實驗室發現	
PaO_2:FiO_2 比 – 中值(範圍)	175(57.5-288)
循環內皮細胞計數 - 中值(範圍) 白細胞計數/mm^3，中值(範圍) ……>10,000/mm^3 – 數目(%) ……<4000/mm^3 – 數目(%)	334(0-9315) 8335(6420-10,120) 2(33%) 0(0)
淋巴細胞計數/mm^3 中值(範圍)	875(410-1290)
血小板計數 x 10^3/mm^3 中值(範圍)	282(199-390)
血紅蛋白– g/dL，中值(範圍)	13.4(13.2-14.1)
其它發現的分佈(實驗室參考範圍)	
C 反應蛋白(0.0-1.0 mg/dL)	14(9.5-31.3)
乳酸脫氫酶(120/246 U/L)	518.5(238-841)

天冬胺酸胺基轉移酶(13-40 U/L)	78.5(51-141)
丙胺酸胺基轉移酶(7-40 U/L)	73(37-183)
肌酐(0.3-1.3 mg/dL)	0.85(0.38-1.33)
D-二聚體*(<500 ng/mL)	1250.5(943-1454)
結合珠蛋白(36-195 mg/dL)	368.5(270-561)
補體 C3**(79-152 mg/dL)	101(60-126)
補體 C4**(16-38 mg/dL)	21(2-37)
伴隨治療	
抗逆轉錄病毒療法 – 數目(%) ……達蘆那韋+考比司他	 6(100%)
全身類固醇療法 – 數目(%) ……在第 1 個納索利單抗劑量後 ……在第 2 個納索利單抗劑量後 ……在第 3 個納索利單抗劑量後 ……在第 4 個納索利單抗劑量後	5(83%) 2(33%) 1(17%) 1(17%) 1(17%)

【1181】 ARDS：急性呼吸窘迫症候群；ICU：重症監護病房；CPAP：持續氣道正壓通氣。

【1182】 *：僅對於4個患者可獲得的數據

【1183】 **：僅對於5個患者可獲得的數據

【1184】 #最初將幾個患者分類為患有糖尿病，但後來被再分類為超重但未患有糖尿病。

【1185】 ##定義為體溫>37.5°C

【1186】 結果：

【1187】 COVID-19患者中的血栓形成和內皮細胞損害

【1188】 從3月13日到3月16日，在Bergamo地區令人注目的COVID-19暴發開始後不久，該醫院的病理科開始對20個已故患者的初始組執行屍檢。在其死亡之前，與當前研究中用納索利單抗治療的患者一樣，所有患者都需要用CPAP或侵入性機械通氣的晚期呼吸支持。與經常致命的肺血栓栓塞的臨床現象一致，發現許多患者的肺和肝受到血栓形成事件的廣泛影響，如下所述。

【1189】 在組織病理學水平上，通過血栓形成過程的動脈牽涉在COVID-19患者肺的中隔血管中顯而易見，還包括不受破壞性炎症過程影響的區域。CD41(內皮標記物)的免疫組織化學染色證實了嚴重的內皮損害，伴隨細胞皺縮、變性的水溶細胞質以及在內皮表面上的淋巴細胞粘附，如圖41A-D中所示。

【1190】 圖41A-D顯示了取自COVID-19患者的組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像，顯示了這些患者中的血管損害。

【1191】 圖41A顯示了來自COVID-19患者肺的中隔血管組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像。如圖41A中所示，在肺的中隔血管中存在通過血栓形成過程的動脈牽涉；注意到動脈腔中的血栓的初始組構(H&E，400x)。

【1192】 圖41B顯示了來自COVID-19患者肺的中隔血管組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像。如圖41B中所示，如圖41A中所示的類似的病理特徵在不受破壞性炎症過程影響的肺區域中的大多數間隔血管中十分顯著(H&E，400x)。

【1193】 圖41C顯示了來自COVID-19患者的中等直徑肺中隔血管的組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像。如圖41C中所示，具有完全管腔血栓形成的中等直徑的肺中隔血管(圓圈部分)；CD34(內皮標記物)的免疫組織化學

棕色染色證實了嚴重的內皮損害，伴隨細胞皺縮、變性的水溶細胞質(參見在右側上的箭頭)、以及在內皮表面上的淋巴細胞粘附(參見在左側上的箭頭)。

【1194】 圖41D顯示了來自COVID-19患者的肝實質組織切片的免疫組織化學分析的代表性圖像。如圖41D中所示，在肝實質中還觀察到血管改變，具有大血管部分管腔血栓形成(H&E，400x)。

【1195】 循環內皮細胞(CEC)的鑒定和計數

【1196】 循環內皮細胞(CEC)已用作內皮細胞功能障礙的生物標記物(參見Farinacci M等人，Res Pract Thromb Haemost 3:49-58，2019)，並且已顯示與沒有ARDS的膿毒症患者相比，CEC計數在膿毒症有關的ARDS患者中是升高的(Moussa M等人，Intensive Care Med 41(2):231-8，2015)。結果也已在急性移植物抗宿主病(GvHD)的背景下發表，其中免疫介導的血管內皮細胞攻擊導致其脫離血管壁並動員進入血流內(參見例如，Almici等人，Bone Marrow Transplant 52:1637-1642，2017)。

【1197】 基於這些初步觀察和發表的急性移植物抗宿主病(GvHD)中的發現，在用納索利單抗的研究啟動之前，我們開始在我們醫院中隨機選擇的分子確認的COVID-19患者的非研究隊列中測量CEC計數。在33個COVID-19患者的這個非研究隊列中，我們發現外周血的CEC/mL(中值110，範圍38-877)與健康對照(中值7，範圍0-37)相比顯著增加(P=0.0004)，如圖42A中所示。

【1198】 在這項研究中，在用納索利單抗治療之前和之後的COVID-19患者中測量CEC/ml數目。如上文注意到的，有趣的是，確定當與健康的正常受試者(中值7，範圍0-37)相比時，外周血的CEC/ml數目(中值110，範圍38-877)在COVID-19患者的獨立隊列中顯著增加(參見圖42A)。在選擇用於由納索利單抗

治療的6個患者中，也確認了CEC/ml的數目增加(中值334，範圍0-9315)。在用納索利單抗治療後，在前兩個劑量後記錄到CEC/ml數目的快速減少(中值92 CEC/mL，範圍18-460)，並且在第四個劑量後得到確認(中值73，範圍0-593)，如圖42B中所示。進一步確認了，CEC/mL的數目在第六個納索利單抗劑量後也是減少的(中值59，範圍15-276)(數據未在圖42B中顯示)。

【1199】 圖42A以圖形方式示出了，與並非這項研究的部分的COVID-19患者(n=33)中的CEC/ml計數相比，在正常健康對照(n-6)中的CEC/ml計數。如圖42A中所示，確定當與健康正常受試者相比時，CEC/ml的數目在這個獨立的COVID-19患者隊列顯著增加。

【1200】 圖42B以圖形方式示出了，在用納索利單抗治療之前(基線)和之後，對於這項研究選擇的6個患者中的CEC/ml計數，方框代表了從第一四分位數到第三四分位數的值，水平線顯示了中值，而須線指示了最小值和最大值。如圖42B中所示，增加的CEC/ml在選擇用於由納索利單抗治療的6個患者中也得到確認，其在用納索利單抗治療後快速減少。

【1201】 因為我們的醫院在這項研究啟動後16天，制定了對於COVID-19患者實施標準類固醇使用的指導原則，所以在納索利單抗啟動之後2至10天開始，將類固醇治療給予6個患者中的5個作為支持療法的部分。為此，還在僅接受類固醇的四個患者(全部為女性，中值年齡83歲，其範圍為62至90歲，三個需要通過面罩供氧，並且一個處於CPAP下)的分開組中評估了CEC/ml的數目。在這四個患者中，發現在48小時後評估的CEC計數不受類固醇施用的影響(p=0·38)。在另外兩個僅接受類固醇的患者中，在基線時以及在包括類固醇在內支持治療4周後評估CEC計數。在其臨床病程逐漸惡化的第一個患者中，CEC

計數保持不受影響(271/mL相對於247/mL)，而在第二個患者中，臨床改善伴隨CEC的同時減少(165相對於65/mL)。

【1202】 在6個納索利單抗治療的患者中，CEC/mL在基線時顯著增加(中值334，範圍0-9315)。使用納索利單抗，在第二個(中值92 CEC/mL，範圍18-460)、第四個(中值72·5，範圍0-593)和第六個(中值59，範圍15-276)治療劑量後，CEC計數快速減少(p=0·01)。使用納索利單抗治療，IL-6、IL-8、CRP和LDH的血清濃度也顯著減少，如下文進一步所述。

【1203】 C反應蛋白(CRP)、乳酸脫氫酶(LDH)和細胞因子的血清水平

【1204】 圖43以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，6個COVID-19患者的C反應蛋白(CRP)的血清水平(中值；四分位數間距(IQR))。如表13中所示，健康受試者的CRP血清水平在(0.0-1.0 mg/dl)的範圍內，並且在治療起始之前的6個COVID-19患者的CRP中值水平為14 mg/dl。如圖43中所示，在用納索利單抗治療2周後，6個COVID-19患者的CRP水平降低至接近0.0 mg/dl的中值水平，其在健康受試者的正常範圍內。

【1205】 圖44以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，6個COVID-19患者的乳酸脫氫酶(LDH)的血清水平(中值；IQR)。如表13中所示，健康受試者的LDH血清水平在(120-246 U/l)的範圍內，並且在治療起始之前的6個COVID-19患者的LDH中值水平為518 U/l。如圖44中所示，在用納索利單抗治療2周後，COVID-19患者的LDH水平降低至約200 U/l的中值水平，其在健康受試者的正常範圍內。

【1206】 圖45以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，6個COVID-19患者的白細胞介素6(IL-6)的血清水平pg/mL(中值；四分位數間距(IQR))。如圖45中所示，在治療前的基線時，COVID-19患者的IL-6中值水平為約180 pg/mL。在納索利單抗的1個劑量後(劑量2前)，COVID-19患者的IL-6中值水平降低至約40 pg/mL，並且在納索利單抗的2個劑量後(劑量3前)，COVID-19患者的IL-6中值水平進一步降低至約10 pg/mL。

【1207】 圖46以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，6個COVID-19患者的白細胞介素8(IL-8)的血清水平pg/mL(中值；四分位數間距(IQR))。在第1天、第4天、第7天、第11天和第14天時給予用納索利單抗的治療。如圖46中所示，在治療前的基線時，COVID-19患者的IL-8中值水平為約30 pg/mL。在納索利單抗的1個劑量後(劑量2前)，COVID-19患者的IL-8中值水平降低至約20 pg/mL，並且在納索利單抗的2個劑量後(劑量3前)，COVID-19患者的IL-8中值水平進一步降低至約15 pg/mL。

【1208】 在用納索利單抗治療後的臨床結果

【1209】 表13中概括了選擇用於由納索利單抗治療的6個患者的臨床特點。中值年齡為56.5歲，且大多數患者為男性(83%)。基於體重指數(BMI)≥ 25和≥ 30，所有患者都是超重或肥胖的。在入選時，所有患者都患有需要CPAP的肺炎/ARDS，其中兩個患者快速惡化且在入選後不久需要插管。在距離用CPAP的非侵入性通氣開始的48小時內，起始用納索利單抗的治療。在下表14中呈現了在用納索利單抗治療的這些患者中觀察到的臨床結果的概括，所述結

果已更新以反映治療後的患者狀態。患者接受每週兩次的納索利單抗施用。在治療之後，4個患者(67%)的呼吸窘迫得到改善，並且在3 個納索利單抗劑量的中值(範圍2-3)後，他們將通氣支持從CPAP減輕到高流量氧氣。氧氣支持然後在3個患者中減少並停止，直到出院。如通過造影增強CT掃描所證實的，患者#4在治療起始後的第4天發展大塊肺栓塞。為此，在進行中的納索利單抗之上添加低分子量肝素，並且在7天后記錄到臨床和CT掃描圖像的快速改善。在最後兩個患者(#5和#6)中，在入選後不久，記錄到重度ARDS的快速和進行性惡化。在病例#5中，重度ARDS(其PiO_2/FiO_2值為57)導致患者在第4天被插管。儘管如此，隨後的臨床結果是快速有利的，並且患者在3天后從ICU出院。在CPAP 2天后，他目前在低流量氧氣支持下是穩定的。在病例#6中，在入選4天后發展重度ARDS，並且患者需要插管。與先前的病例相似，她被放回CPAP中，並且由於快速臨床改善，隨後被放入高流量氧氣中，且後來出院。

【1210】在這項研究中沒有報告治療有關不良事件。

【1211】表14：迄今為止的患者結果

患者	納索利單抗的給藥	迄今為止的結果
1	6 個劑量	在治療啟動的 1 周內中止 CPAP，在第 18 天時出院，無類固醇
2	5 個劑量	在治療啟動的 1 周內中止 CPAP，類固醇在第 10 天時起始，在第 16 天時出院
3	5 個劑量 *更新: 7 個劑量	入院前在家中超過 1 周，具有快速進行性呼吸窘迫；在治療啟動後的 11 天內中止 CPAP，在第 10 天時起始類固醇，在第 22 天時出院*

4	迄今為止4個劑量，給藥繼續 **更新：8個劑量	病程通過在納索利單抗治療之前確定的多重肺栓塞而複雜化；在第1天時起始類固醇，在第4天時發展肺栓塞，到第7天時改善，具有改善的CT掃描，在12天內中止CPAP，用納索利單抗得到穩定，仍在改善，且給藥繼續**更新：在第26天時鼻插管，在第28天時室內空氣，且在第33天時出院。
5	迄今為止3個劑量，給藥繼續 ***更新：8個劑量	在第3天時起始類固醇，在需要插管之前僅能夠接受2個納索利單抗劑量，並且在第4天時轉移至ICU；用納索利單抗得到穩定，改善，拔管並轉移至過渡監護病房(step-down unit)，在第7天時回到CPAP，在第9天時中止CPAP，仍在改善，且給藥繼續***更新：在第25天時鼻插管，在第27天時室內空氣，且在第33天時出院。
6	迄今為止3個劑量，給藥繼續 ****更新：8個劑量	在第1天時起始類固醇，在需要插管之前僅能夠接受1個納索利單抗劑量，並在第3天時轉移到ICU，在納索利單抗下得到穩定並保持插管；改善和給藥繼續****更新：在第20天時拔管並轉移到CPAP，在第82天時中止CPAP，並在第85天移至鼻內插管，室內空氣，並在第90天時出院。

【1212】*、**、***、****參見關於下文所述的患者3-6的更新。

【1213】討論

【1214】這項研究中的發現指示了，內皮損傷和血栓形成對COVID-19有關的肺損傷的病理生理學是關鍵的。患有嚴重呼吸衰竭的患者不僅證實了CRP、LDH、IL-6和IL-8的水平顯著升高，還證實了循環內皮細胞(CEC)的水平顯著升高。這個新觀察與在肺和肝中檢測到的組織病理學發現一致，其顯示了

在COVID-19患者中明顯的內皮損傷和血栓形成。多器官微血管的組織病理學變化，具體地微血管血栓的形成，與HSCT-TMA類似，進一步支持了內皮損傷在COVID-19有關的肺部損傷中的作用。內皮損傷已知是ARDS中存在的補體活化的病理生理學的關鍵組分(Thompson BT等人，N Engl J Med，377(6):562–572，2017)。補體活化還已在SARS和MERS的模型中得到報告，並且在特徵在於內皮損傷的其它條件下是重要的。血管內皮損傷，ARDS中增加的毛細血管滲透性和肺水腫的根本原因，也可能引起微血管血管病和血栓形成。

【1215】 補體系統是免疫系統的重要部分。三種途徑響應不同的啟動事件來活化補體：經典途徑、凝集素途徑和替代途徑。補體的凝集素途徑是先天性免疫應答的部分。模式識別系統，凝集素途徑的活化通過MASP酶家族(MASP-1、MASP-2和MASP-3)的成員啟動。這些蛋白酶作為酶原合成，所述酶原在血液中與凝集素，具體地甘露聚糖結合凝集素(MBL)、纖維膠凝蛋白和膠原凝集素形成複合物。這些凝集素識別並結合在病原微生物或受損宿主細胞的表面上發現的碳水化合物模式，將MASP靶向其作用位點並導致其活化。以這種方式，凝集素途徑活化在損害的內皮細胞的表面上發生。如實施例20中所述，凝集素途徑活化預計在COVID-19有關的內皮損傷的背景下發生。

【1216】 MASP-2是負責凝集素途徑活化的關鍵酶，一旦活化，MASP-2就切割補體組分2(C2)和C4，啟動導致C3和C5活化的一系列酶促步驟，產生過敏毒素C3a和C5a，以及C5b-9(膜攻擊複合物)的形成。臨床前，C3a和C5a已誘導與內皮損傷和促炎變化、白細胞募集和內皮細胞凋亡相關的內皮活化。膜結合的C5b-9也可以引起細胞裂解。即使在亞裂解時，C5b-9也引起另外的細胞損傷，其誘導促血栓因子的分泌、血小板活化、粘附分子的上調和內皮中的功能

失調的形態變化(Kerr H，Richards A. Immunobiology 217(2):195–203，2012)。這些補體介導的活性可以擴大內皮損傷和功能障礙，引起或惡化臨床狀況。通過Gao等人medRxiv 2020的最新出版物，報告了MASP-2和凝集素途徑在動物模型中SARS和MERS的病理生理學中的核心牽涉。然而，關於Gao等人中所述的LPS誘導的肺損傷的小鼠模型(其並非ARDS模型，而是膿毒症模型)，首先用Ad-SARS N感染小鼠，然後在第6天時，用200 μg/kg抗MASP-2抗體注射，並且在30分鐘後，用LPS誘導且測量小鼠存活。進一步注意到，在Gao等人中描述的這種動物模型中使用的抗MASP-2抗體(200 ug/kg)(即，HyCult Biotech(HBT)抗MASP-2抗體選殖8B5或選殖6G12)就C3b抑制活性進行測定，並且確定mAb 8B5和6G12均不能抑制正常人血清或小鼠血清中的C3b沉積，而在同一測定中，陽性對照抗體OMS646能夠抑制正常人血清和小鼠血清中的C3b沉積)。

【1217】 MASP-2，負責凝集素途徑活化的關鍵酶，結合並經歷通過COVID-19 N蛋白的活化(Gao等人，medRxiv 2020，2020.03.29.20041962)，並且已在嚴重COVID-19患者的肺組織的微血管系統中發現(Magro C.等人，Transl Res 2020；doi.org/10.1016/j.trsl.2020.04.007)。活化的MASP-2啟動一系列酶促步驟，其導致過敏毒素C3a和C5a的產生、以及膜攻擊複合物C5b-9的形成(Dobo等人，Front Immunol 9:1851，2018)，其可以誘導促炎應答並導致細胞裂解和死亡。MASP-2還可以通過C4旁路直接切割C3(Yaseen S.等人，FASEB J 31(5):2210-9，2017)。重要的是，MASP-2位於凝集素途徑的上游，因此MASP-2的抑制並不干擾經典途徑的裂解組(即C1r/C1s驅動的C3和C5轉化酶形成)，保存了對抗感染所需的適應性免疫應答(Schwaeble等人，Proc Natl Acad Sci 108(18):7523-8，2011)。

【1218】除其在補體中的作用之外，MASP-2還直接作用於凝血級聯和接觸系統，將凝血酶原切割為凝血酶並形成纖維蛋白凝塊(Gulla K.C.，Immunology 129(4):482-95，2010；Krarup A.等人，PLoS One 2(7):e623，2007)。如在此引入本文作為參考的WO2019246367中所述，納索利單抗不僅抑制凝集素途徑活化，還阻斷微血管損傷相關的血栓形成、以及MASP-2介導的激肽釋放酶和因子XII的活化。這些活性可以通過抑制微血管血栓形成而促成有益效應，所述有益效應可能已在納索利單抗治療的患者(特別是患有大塊肺栓塞的患者)中發揮重要的治療作用。納索利單抗並不延長出血時間，它也不影響凝血酶原或活化部分凝血活酶時間，並且在納索利單抗治療的患者中並未觀察到出血。儘管不希望受任何特定理論的束縛，但認為納索利單抗可能阻斷起因於內皮損害的(與因子XII活化相關的)凝血，但不阻斷細胞外基質有關的(因子VII驅動的)凝血。

【1219】凝集素途徑抑制先前並未作為用於COVID-19的治療進行調查。這項研究中的所有患者都患有COVID-19相關的呼吸衰竭。在當前的研究中，通過納索利單抗抑制MASP-2和凝集素途徑，與所有用該藥物治療的COVID-19患者的臨床改善和存活相關。在用MASP-2抑制劑納索利單抗治療之後，所有6個患者都恢復並且能夠出院。在用納索利單抗治療之後，在患有COVID-19有關的呼吸衰竭的患者中觀察到臨床改善，所述納索利單抗抑制MASP-2和凝集素途徑的活化，進一步支持了凝集素途徑在COVID-19病理生理學中的重要作用。如本實施例中所述，所有6個COVID-19患者在納索利單抗治療之後都證實了臨床改善。在每種情況下，COVID-19肺損傷在納索利單抗治療之前已進展為ARDS，並且所有患者都接受非侵入性機械通氣，各自在入院時啟動。在第

一個納索利單抗劑量之後，兩個患者經歷了持續惡化，並且需要侵入性機械通氣。隨後，這兩個患者用繼續的納索利單抗治療後能夠完全中止機械通氣。兩個患者(一個插管，且另一個處於CPAP下)經歷了大塊雙側肺栓塞，並且兩個患者用納索利單抗完全恢復，這可能獲益於該藥物的抗凝效應。實驗室標記物(CEC、IL-6、IL-8、CRP和LDH)的時間模式與觀察到的臨床改善、以及提議的納索利單抗的作用機制一致。特別地，CEC計數似乎是評估該疾病中的內皮損害和治療應答的可靠工具。值得注意的是，IL-6水平和IL-8水平的改善也在時間上與納索單抗治療相關聯，提示了凝集素途徑活化可能先於COVID-19中的細胞因子風暴升高，並且凝集素途徑抑制對COVID-19感染的患者中所述的細胞因子風暴具有潛在的有益作用。(Xiong Y等人，Emerg Microbes Infect 9(1):761–770，2020)。最初計劃兩周的納索利單抗給藥，但當給藥第一次中止時，患者#1的CEC升高之後，給藥增加到3至4周。在納索利單抗治療的3至4周之後，並未觀察到反彈的肺部徵狀和症狀。我們沒有看到在納索利單抗治療的患者中病毒防禦受損的證據，也沒有觀察到納索利單抗有關的不良事件。值得注意的是，納索利單抗並不抑制替代或經典補體途徑，並且不干擾適應性免疫應答或抗原-抗體複合化。在臨床試驗中沒有觀察到納索利單抗有關的感染風險的證據。除抑制凝集素途徑活化之外，納索利單抗還已證實阻斷MASP-2介導的凝血酶原切割為凝血酶(Krarup A等人，PLoS One ；2(7):e623，2007)、激肽釋放酶的活化、以及因子XII自活化為XIIa。這些活性可以通過抑制微血管血栓形成而促成有益效應。納索利單抗並不延長出血時間，它也不影響凝血酶原或活化部分凝血活酶時間。(Krarup PLoS One 2007)

【1220】 在本實施例中描述的結果強烈暗示了在COVID-19有關的肺損傷的病理生理學中，由內皮損傷引起的MASP-2介導的凝集素途徑活化。在納索利單抗治療之後的臨床狀態和實驗室發現的改善是值得注意的。這些發現強烈提示了有意義的臨床功效，具有與該藥物的作用機制和疾病的病理生理學有關的支持證據。通過納索利單抗的凝集素途徑抑制似乎是COVID-19有關的肺損傷的有希望的潛在治療。

【1221】 來自本實施例中描述的臨床研究的補充數據

【1222】 如本實施例中所述，6個實驗室確認的COVID-19和ARDS(根據柏林標準)的患者用納索利單抗(4 mg/kg靜脈內(IV))每週治療兩次，共3到4周。所有患者都接受了標準的支持護理，包括預防性依諾肝素(Clexane，Sanofi Aventis)4,000 IU/0.4 mL、阿奇黴素(Zitromax，Pfizer SpA，意大利)每天一次500 mg、羥氯喹(Plaquenil，Sanofi Aventis)每天兩次200 mg、以及達蘆那韋和考比司他(Rezolsta，Janssen-Cilag S.p.A.，意大利)每天一次800/150 mg。從3月27日開始，按照最新機構指南，醫院中的所有Covid-19患者都接受甲潑尼龍(1 mg/kg)，其施用於6 個納索利單抗治療的患者中的5個。

【1223】 對未用納索利單抗治療的已故COVID-19患者執行組織病理學評估。按照標準實踐，對納索利單抗治療的患者和未用納索利單抗治療的患者收集臨床和實驗室測量，包括血細胞計數、LDH和CRP水平。在每個納索利單抗劑量之前收集常規血液檢查，然後每週兩次。通過流式細胞術連續評價循環內皮細胞計數以及IL-6和IL-8水平。每天評估呼吸功能。所有患者在入院時都接受胸部計算機斷層掃描(CT)，以記錄間質性肺炎，如果臨床上指示了，則在住院期間記錄肺栓塞。還如臨床上指示的執行胸部射線照相。

【1224】 數據呈現為具有分類變量的百分比的頻率、以及具有關於連續變量的範圍的中值。用非參數弗裡德曼檢驗，評估了時間點之間的臨床和實驗室測量的差異。使用成對的威爾科克森符號秩檢驗執行配對比較。顯著性固定在5%下。使用R軟件(版本3·6·2)來執行分析。

【1225】 如本實施例中所述，對20個已故COVID-19患者的初始組執行屍檢。與經常致命的肺血栓栓塞的臨床現象一致，發現大多數患者的肺和肝受到栓塞的廣泛影響。在組織學上，動脈栓塞在肺的中隔血管中顯而易見，包括不受破壞性炎症過程影響的區域。CD34(內皮標記物)的免疫組織化學染色證實了嚴重的內皮損害，伴隨細胞皺縮、變性的水溶細胞質和淋巴細胞粘附至內皮表面，如圖41A-D中所示。

【1226】 如本實施例所述，通過納索利單抗抑制補體的凝集素途徑與這項研究中的臨床改善相關。用納索利單抗的治療與快速且持續的CEC降低相關，與血清IL-6、IL-8、CRP和LDH的伴隨降低平行。特別地，CEC計數似乎是評估該疾病中的內皮損害和治療應答的可靠工具。IL-6和IL-8用納索利單抗治療的暫時改善提示了，對Covid-19感染的患者中所述的細胞因子風暴的潛在有益作用((Xiong Y等人，Emerg Microbes Infect 9(1):761–770，2020)。這項研究的發現指示了內皮損傷對COVID-19有關的肺損傷的病理生理學是關鍵的。患有嚴重呼吸衰竭的患者不僅證實了C反應蛋白(CRP)和乳酸脫氫酶(LDH)的水平顯著升高，還證實了IL-6、IL-8和循環內皮細胞(CEC)的水平顯著升高。這個新觀察與在肺和肝中的組織病理學發現一致，其顯示了在COVID-19患者中明顯的內皮損傷和血栓形成。微血管的組織病理學變化與內皮損傷症候群HSCT-

TMA非常相似，進一步支持了內皮損傷在COVID-19有關的肺部損傷中的作用。

【1227】 最初計劃兩周的給藥，但當給藥第一次中止時，患者#1的CEC升高之後，給藥增加到3-4周。使用第三周的給藥，該患者的CEC計數再次改善。在納索利單抗治療的4周之後，並未觀察到反彈的肺部徵狀和症狀。我們沒有看到在納索利單抗治療的患者中病毒防禦受損的證據。值得注意的是，納索利單抗並不抑制經典或替代補體途徑，並且不干擾適應性免疫應答或抗原-抗體複合化。在臨床試驗中沒有觀察到納索利單抗有關的感染風險的證據。除抑制凝集素途徑活化之外，納索利單抗還已顯示阻斷MASP-2介導的凝血酶原切割為凝血酶、激肽釋放酶的活化、以及因子XII自活化為XIIa。這些活性可以通過抑制微血管血栓形成而促成有益效應，並且這可能已發揮重要的治療作用，特別是在患有大塊肺栓塞的那些患者中。納索利單抗並不延長出血時間，它也不影響凝血酶原或活化部分凝血活酶時間，並且在我們治療的患者中沒有觀察到出血。

【1228】 我們的發現強烈暗示了在Covid-19有關的肺損傷的病理生理學中，由內皮損傷引起的凝集素途徑活化。通過納索利單抗抑制補體的凝集素途徑與這項研究中的所有患者的臨床改善相關。納索利單抗是良好耐受的，並且沒有報告不良的藥物反應。所有患者在治療過程中都得到改善並存活。在納索利單抗治療之後的臨床狀態和實驗室發現的改善是值得注意的。這些發現強烈提示了有意義的臨床功效，具有與該藥物的作用機制和疾病的病理生理學有關的支持證據。通過納索利單抗的凝集素途徑抑制似乎是Covid-19有關的肺損傷的有希望的潛在治療。

【1229】 從本實施例中描述的臨床研究中提供了另外的數據。

【1230】 表13中概括了6個納索利單抗治療的患者的臨床特點。納索利單抗4 mg/kg每週靜脈內施用兩次，共3至4周。在治療之後，所有患者在臨床上得到改善。

【1231】 在4個患者中，由於CT掃描記錄的肺栓塞(患者#4和#6)、醫療決策(患者#3)和需要插管的呼吸功能快速惡化(患者#5)，依諾肝素以治療劑量(100 IU/kg，每天兩次)給予。中值隨訪為27天(16-90)，並且患者每週施用納索利單抗兩次，具有總共8個納索利單抗劑量的中值(範圍為5-8)。在治療之後，所有患者都在臨床上得到改善。在3個納索利單抗劑量的中值(範圍2-3)後，四個患者(67%)將通氣支持從CPAP減輕到高流量氧氣(非循環呼吸器或文士里氧氣面罩)。

【1232】 圖50以圖形方式示出了，用納索利單抗治療的6個COVID-19患者的臨床結果。

【1233】 如圖50中所示，在這些患者的3個中，氧氣支持先撤除然後停止，並且他們在6(5-8)個納索利單抗總劑量的中值之後出院。

【1234】 在患者#4中，在入選之後4天，通過造影增強CT掃描記錄到大塊雙側肺栓塞。將依諾肝素加入正在進行的納索利單抗給藥中，並且在11天后，記錄到快速的臨床和射線照相(重複CT掃描)改善(圖47A和圖47B)，並隨後出院。

【1235】 在剩下的2個患者(#5和#6)中，在入選後不久記錄到快速且逐漸惡化為重度ARDS。

【1236】 在患者#5中，重度ARDS(PaO_2/FiO_2為55)導致在第4天的插管。儘管如此，隨後的臨床結果是快速有利的，並且患者在3天后從重症監護病房出院。在CPAP 2天之後，他在低流量氧氣支持下得到穩定。隨後，他不需要氧氣並且出院。

【1237】 患者#6在入選時具有PaO2/FiO2 60和重度ARDS，並且2天后需要插管。她的病程通過大塊雙側肺栓塞和醫院甲氧西林抗性金黃色葡萄球菌(MRSA)感染複雜化。她的狀況得到改善，並且在18天后，她拔管，切開氣管(由於幽閉恐懼症)並且得到低流量氧氣的支持。她的狀況得到改善，去除了氧氣支持，且在第90天，她出院了。(第33天到第90天未在圖50中顯示)

【1238】 在這項研究中沒有報告治療有關的不良事件。

【1239】 如上所述，在患者#4中，在入選之後4天，通過造影增強CT掃描記錄到大塊雙側肺栓塞。將依諾肝素加入正在進行的納索利單抗給藥中，並且在11天后，記錄到快速的臨床和射線照相(重複CT掃描)改善，如圖47A,B中所示。

【1240】 圖47A和圖47B是來自用納索利單抗治療的患有COVID-19肺炎的患者#4的肺獲得的CT掃描的圖像。

【1241】 圖47A顯示了自入選以後(即，在用納索利單抗治療後)的第5天時，患者#4的CT掃描，其中觀察到患者患有嚴重的間質性肺炎，具有涉及周圍和中央區域兩者的彌漫性磨玻璃影。尤其是在左肺的下葉中的實變。大塊雙側肺栓塞，伴隨在葉間和節段動脈中的充盈缺損(未顯示)。

【1242】 圖47B顯示了自入選以後(即，在用納索利單抗治療後)的第16天時，患者#4的CT掃描，其中磨玻璃影顯著降低，伴隨實質實變的幾乎完全消

退。尤其是在下葉中觀察到具有外圍分佈的“碎石路”症。明顯的縱隔氣腫。右肺的亞節段動脈的最低限度的充盈缺損(未顯示)。

【1243】 圖48以圖形方式示出了，在用納索利單抗治療的患者中，在基線時以及在納索利單抗治療後的不同時間點(在2個劑量後，在4個劑量後)，IL-6的血清水平(pg/mL)。方框代表了從第一四分位數到第三四分位數的值，水平線顯示了中值，而點顯示了所有患者的值。圖48提供了圖45中呈現的IL-6數據的更新。

【1244】 圖49以圖形方式示出了，在用納索利單抗治療的患者中，在基線時以及在納索利單抗治療後的不同時間點(在2個劑量後，在4個劑量後)，IL-8的血清水平(pg/mL)。方框代表了從第一四分位數到第三四分位數的值，水平線顯示了中值，而點顯示了所有患者的值。圖49提供了圖46中呈現的IL-8數據的更新。

【1245】 圖50以圖形方式示出了，用納索利單抗治療的6個COVID-19患者的臨床結果。條顏色指示了不同的氧氣支持(CPAP：黃色；帶插管的機械通氣：紅色；非循環呼吸器式氧氣面罩：綠色；通過鼻插管的低流量氧氣：淺綠色；室內空氣：藍色)。納索利單抗劑量由藍色箭頭標記。黑色圓圈指示類固醇治療的開始。菱形符號指示TEP。星號(*)指示出院。CPAP=持續氣道正壓通氣。NRM=非循環呼吸器式氧氣面罩。VM=文士里面罩。TEP=肺血栓栓塞。

【1246】 圖51A以圖形方式示出了，在納索利單抗治療之前和之後的天冬胺酸胺基轉移酶(AST)的血清水平(單位/升，U/L)。黑線代表了中值和四分位數間距(IQR)。紅線代表了正常水平，而點顯示了所有患者的值。

【1247】 圖51B以圖形方式示出了，在用納索利單抗治療起始之前其基線值可用的四個患者中，D-二聚體值的血清水平(ng/ml)。黑色圓圈指示了何時啟動類固醇治療。紅線代表了正常水平。

【1248】 總之，在這項研究中，首次使用凝集素途徑抑制劑來治療COVID-19，具有需要持續氣道正壓通氣(CPAP)或插管的ARDS的6個COVID-19患者接受了納索利單抗。患者的中值年齡為57歲(範圍47 - 63歲)，83%為男子，並且全部都患有共病(comorbidity)。在基線時，循環內皮細胞(CEC)計數以及白細胞介素6(IL-6)、白細胞介素8(IL-8)、C反應蛋白(CRP)、乳酸脫氫酶(LDH)、D-二聚體和天冬胺酸胺基轉移酶(AST)- 內皮/細胞損害和/或炎症的所有標記物 – 的血清水平顯著升高。在機械通氣啟動後的48小時內開始納索利單抗治療。給藥為每週兩次，共兩到四周。

【1249】 研究結果

【1250】 ● 所有納索利單抗治療的患者都完全恢復，存活並且出院

【1251】 ● 納索利單抗治療與跨越所有評價的內皮/細胞損害和/或炎症標記物 - CEC、IL-6、IL-8、CRP LDH、D-二聚體和AST - 的快速且持續的降低/正常化相關

【1252】 o實驗室標記物的時間模式與觀察到的臨床改善一致

【1253】 o特別地，CEC計數似乎是評估該疾病中的內皮損害和治療應答的可靠工具

【1254】 o IL-6和IL-8用納索利單抗治療的暫時改善提示了，凝集素途徑活化可能先於COVID-19中的細胞因子升高，並且凝集素途徑抑制對COVID-19感染患者中所述的細胞因子風暴具有有益作用

【1255】● 兩個患者的病程(一個插管，且另一個處於CPAP下)通過大塊雙側肺栓塞而進一步複雜化，並且兩個患者使用納索利單抗完全恢復，這可能獲益於該藥物的抗凝效應

【1256】● 納索利單抗在研究中是良好耐受的，並且沒有報告不良的藥物反應

【1257】● 具有相似入圍標準和基線特點的兩個對照組用於回顧性比較，兩者均顯示了32%和53%的大量死亡率。

【1258】結論

【1259】如本實施例中證實的，用納索利單抗抑制補體的凝集素途徑可能代表了通過降低Covid-19有關的內皮細胞損傷，並且因此降低炎症狀態和血栓形成風險，對於Covid-19患者的有效治療。凝集素途徑抑制先前並未作為用於COVID-19的治療進行調查。這項研究中的所有患者都患有COVID-19有關的呼吸衰竭。在用MASP-2抑制劑納索利單抗治療之後，所有患者都恢復並且能夠出院，進一步支持了凝集素途徑在COVID-19病理生理學中的重要性。

【1260】其它補體抑制劑在COVID-19中的使用已得到報告。ACOM-101，基於坎普他汀的C3抑制劑(Mastaglio S.等人，Clin Immunol 215:108450，2020)用於一個患者中，並且依庫珠單抗連同抗病毒和抗凝治療一起施用於四個患者(Diurno F.等人，Eur Rev Med Pharmacol Sci 24(7):4040-7，2020。這五個患者處於CPAP下並存活。兩個處於高流量鼻氧氣下的COVID-19患者接受了與支持療法結合的C5a抗體，包括抗病毒療法，隨後為類固醇治療，並且這兩個患者也存活。這些報告共同支持了我們對於納索利單抗的發現。然而，與C3和C5抑制劑不同，MASP-2抗體納索利單抗完全維持了經典補體途徑功能，並且不

干擾適應性免疫應答或抗原-抗體複合物介導的裂解應答(Schwaeble W.等人，Proc Natl Acad Sci 108(18):7523-8，2011)。在納索利單抗臨床試驗中，並未觀察到納索利單抗有關的感染風險的證據。

【1261】 雖然這是同情使用的單組研究，但兩個不同的對照組提供了回顧性比較。第一個在通過Gritti等人最近發表的論文(medRxiv 2020:2020.04.01.20048561)中進行描述，該論文評估了IL-6抑制劑司妥昔單抗在COVID-19患者中的使用。司妥昔單抗研究和我們的納索利單抗研究共享相同的主要研究者(G.G.和A.R.)，入圍標準和患者特點(即，人口統計學、症狀、共病、ARDS嚴重性、實驗室值和在入選時的呼吸支持)。在該研究中，司妥昔單抗治療的組和對照組中的死亡率分別為33%和53%。第二個回顧性比較者由33個患者代表，所述患者是在我們的醫院內隨機選擇的，以評價COVID-19患者中CEC測量的可行性。在這33個患者中，22個符合與納索利單抗治療的患者相同的入圍標準，並且具有相似的基線特點。然而，與納索利單抗治療的組相比，對照組的中值基線CEC計數分別為101/mL相對於334/mL。引人關注的是，這22個患者中的20個(91%)用IL-6抑制劑(托珠單抗或司妥昔單抗)和/或類固醇進行治療，並且該組具有32%的總體30天死亡率。當結果分析限於與納索利單抗治療的患者年齡相匹配的16個患者(中值58歲，範圍51-65歲)時，死亡率仍為31%。在後一組中，94%接受了IL-6和/或類固醇治療，並且以55/mL的中值基線CEC計數是納索利單抗治療的患者中的6分之一。

【1262】 在COVID-19中使用類固醇已導致混合結果的報告(Veronese N.等人，Front Med(Lausanne)7:170，2020)。最近以來，COVID-19療法(RECOVERY)試驗的隨機化評估證實了，地塞米松使處於侵入性機械通氣下的

患者的28天死亡率降低了28.7%(29.0%相對於用常規護理的40.7%)、在接受無需非侵入性機械通氣的氧氣支持的患者中降低了14%(21.5%相對於用常規護理的25.0%)，並且對在隨機化時未接受呼吸支持的患者中的死亡率沒有作用(17.0%相對於用常規護理的13.2%)(Horby P.等人，medRxiv 2020:2020.06.22.20137273)。基於這些數據和我們醫院的經驗，我們認為類固醇在治療具有呼吸功能障礙的COVID-19患者中發揮一定作用，作用於減輕炎症應答。在納索利單抗治療的組中，6個患者中的1個(患者#1)並未接受類固醇。隨後，在三月下旬，機構指南進行更新，要求我們醫院中的所有患者都接受類固醇。在接受類固醇的5個納索利單抗治療的患者中，2個(患者#2和#3)在已經改善後啟動治療，使得不再需要CPAP或在第二天中止。如先前所述，我們評估了僅對於短持續時間接受類固醇的四個患者的分開組中的CEC計數，並且發現該計數不受類固醇施用的影響。這提示了類固醇對COVID-19相關的內皮損害的任何有益作用都可能延遲，並且對患者#2和#3的恢復過程具有很小的作用。

【1263】總的來說，我們的發現強烈提示了，內皮損傷誘導的MASP-2活化和凝集素途徑在COVID-19有關的肺損傷的病理生理學中發揮關鍵作用。在納索利單抗治療之後的臨床狀態和實驗室發現中的改善是值得注意的。這些發現強烈提示了有意義的臨床功效，並且提供了與該藥物的作用機制和疾病的病理生理學有關的支持證據。通過納索利單抗的凝集素途徑抑制似乎是COVID-19有關的肺損傷和內皮損害相關的栓塞的有希望治療。

【1264】來自本實施例中描述的臨床研究的進一步補充數據

【1265】 如本實施例中所述，6個實驗室確認的COVID-19和ARDS(按照柏林標準)的患者用納索利單抗(4 mg/kg靜脈內(IV))每週治療兩次，持續3到4周。如本實施例中所述，這項研究中的所有6個患者都患有COVID-19有關的呼吸衰竭。在用MASP-2抑制劑納索利單抗治療之後，所有患者都恢復並且能夠出院。這些患者自出院以後已進行監測。截至2020年10月22日(在用納索利單抗治療之後5至6個月)，所有6個患者都是臨床上正常的，而沒有在未用納索利單抗治療的COVID-19患者已報告的任何長期後遺症的證據。截至2020年10月22日，所有6個患者的臨床實驗室測量也是正常的，包括D-二聚體的血清水平都發現在正常範圍內(參見下表15)。

【1266】 表15顯示了與在2020年10月(5至6個月後)獲得的實驗室測量相比，在用納索利單抗治療之前，在入院(基線)時從6個COVID-19患者獲得的基線實驗室測量。

【1267】 表15概括了在基線時(在治療之前，還參見表13)以及如2020年10月(治療後5至6個月)測量的6個納索利單抗治療的患者的臨床特點。

【1268】 表15：用納索利單抗治療的COVID-19患者(#1-6)的實驗室測量

實驗室發現	基線：在納索利單抗治療之前的所有患者 (2020 年 3 月-6 月) (N=6)	最後評估 (2020 年 10 月) (N=6) (出院後 5-6 個月)
白細胞計數/mm^3，中值(範圍)	8335(6420-10,120)	7320(3200-8770)
……>10,000/mm^3 – 數目(%)	2(33)	0(0)
……<4000/mm^3 – 數目(%)	0(0)	1(17)

淋巴細胞計數/mm^3 中值(範圍)	875(410-1290)	2815(810-3780)
血小板計數 x $10^3/mm^3$ 中值(範圍)	282(199-390)	238(170-354)
血紅蛋白– g/dL，中值(範圍)	13.4(13.2-14.1)	14.8(13.4-15.8)
其它發現的分佈(實驗室參考範圍)		
C 反應蛋白(0.0-1.0 mg/dL)	14(9.5-31.3)	0.15(0-0.5)
乳酸脫氫酶(120/246 U/L)	518.5(238-841)	212(119-249)
天冬胺酸胺基轉移酶(13-40 U/L)	78.5(51-141)	18(12-29)
丙胺酸胺基轉移酶(7-40 U/L)	73(37-183)	22.5(20-67)
肌酐(0.3-1.3 mg/dL)	0.85(0.38-1.33)	0.94(0.51-1.07)
D-二聚體(<500 ng/mL)		
<190 – 數目(%)	0(0)	3(50)
>190 – 中值(範圍)	1250.5(943-1454)	324(202-390)

【1269】 這些結果證實了，在這6個患者中用納索利單抗治療COVID-19患者已導致這些患者中的完全恢復，而沒有任何長期COVID後遺症的證據。

【1270】 如廣泛報告的，許多COVID-19患者，包括具有輕度症狀的患者、以及具有嚴重COVID-19有關的肺損傷(如ARDS和/或栓塞)的患者，患有來自COVID-19感染的立即併發症，以及即使從最初的感染恢復後的長期後遺症，也稱為“長途運輸者”。如Marshall M.(“The lasting misery of coronavirus long-haulers,” Nature第585卷，9/17/2020，第339-341頁)中所述，患有更嚴重的COVID-19感染的人可能經歷在其肺、心臟、免疫系統、大腦、中樞神經系統、腎臟、腸道及其它地方的長期損害，並且即使COVID-19感染的輕微病例也可能引起類似於慢性疲勞症候群的持續不適。如Marshall(2020)中進一步所述，來自COVID-19感染引起的立即和長期後遺症包括心血管併發症(包括心肌損傷、心肌病、心肌炎、血管內凝血、中風、靜脈和動脈併發症以及肺栓塞)；

神經系統併發症(包括認知困難、意識模糊、也稱為“腦霧”的記憶喪失、頭痛、中風、頭暈、暈厥、癲癇發作、食慾減退、失眠、嗅覺喪失、味覺喪失、肌陣攣、神經性疼痛、肌痛；神經系統疾病如阿爾茨海默氏病、格巴二氏症候群、米勒-費希爾症候群、帕金森氏病)的進展；腎臟損傷(例如急性腎臟損傷(AKI))、肺部併發症(包括肺纖維化、呼吸困難、肺栓塞)；炎性病況例如川崎病、川崎樣病、兒童的多系統炎症症候群；以及多系統器官衰竭。還參見Troyer A.等人，Brain，Behavior and Immunity 87:43-39，2020；Babapoor-Farrokhram S.等人，Life Sciences 253:117723，2020；以及Heneka M.等人，Alzheimer’s Research & Therapy，第12卷:69，2020。如Yelin D.等人，Lancet Infect Dis 2020，9/1/2020中進一步所述，從急性COVID-19中恢復的人的長期抱怨包括：極度疲勞、肌無力、低燒、注意力不集中、記憶差錯、情緒變化、睡眠困難、手臂和腿部中的針痛、腹瀉和嘔吐、味覺和嗅覺喪失、喉嚨痛和吞咽困難、糖尿病和高血壓的新發作、皮疹、呼吸短促、胸痛和心悸。

【1271】 如本實施例中所述，在這6個患者中用納索利單抗治療COVID-19患者已導致這些患者的完全恢復，而沒有來自COVID-19感染的任何長期後遺症的證據。

【1272】 實施例22

【1273】 在COVID-19患者#7中的OMS646(納索利單抗)治療

【1274】 本實施例描述了使用實施例20和實施例21中描述的方法，在第七個COVID-19患者(患者#7)中使用納索利單抗(OMS646)。本實施例中描述的結果與實施例21中用6個COVID-19患者觀察到的結果一致，並且進一步確認了納索利單抗在受COVID-19感染的患者治療中的功效。

【1275】 方法和結果：

【1276】 患者#7是受SARS-CoV-2感染的76歲肥胖的糖尿病男子，具有很長的吸煙史和COPD，其也已經歷了用於前列腺癌的手術(即，分類為關於COVID-19有關併發症的“高危”患者)。患者進入Bergamo醫院，最初需要通過鼻插管的供氧。他的呼吸狀態迅速惡化，首先需要通過面罩的氧合，隨後為具有持續氣道正壓通氣的機械通氣，然後是插管。在插管後，啟動用納索利單抗(OMS646)的治療，所述納索利單抗(OMS646)是由免疫球蛋白γ4(IgG4)重鏈和λ輕鏈恒定區組成的全人單選殖抗體。納索利單抗以亞納摩爾親和力結合並抑制MASP-2。根據實施例20和實施例21中所述的方法，用納索利單抗治療患者#7以每週靜脈內施用兩次的4 mg/kg劑量進行，共2至4周，最多6至8個劑量(即，給藥持續時間為兩周、三周或四周)。迄今為止，患者#7已接受了4個納索利單抗劑量。在用納索利單抗治療後，患者#7快速改善，並且他在第二個劑量後拔管。他的實驗室發現顯示於下文描述的圖52A-E中，其給藥通過每個圖上的垂直箭頭指出。

【1277】 圖52A以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，患有COVID-19的危重病患者#7中的D-二聚體值的血清水平(ng/mL)。用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示。紅色水平線代表正常水平。

【1278】 圖52B以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，患有COVID-19的危重病患者#7的C反應蛋白(CRP)的血清水平。用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示。紅色水平線代表正常水平。

【1279】 圖52C以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在納索利單抗治療後的不同時間點，患有COVID-19的危重病患者#7的天冬胺酸胺基轉移酶(AST)的血清水平(單位/升，U/L)。用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示。紅色水平線代表正常水平。

【1280】 圖52D以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在納索利單抗治療後的不同時間點，患有COVID-19的危重病患者#7的丙胺酸胺基轉移酶(ALT)的血清水平(單位/升，U/L)。用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示。紅色水平線代表正常水平。

【1281】 圖52E以圖形方式示出了，在治療之前的基線時(第0天)、以及在用納索利單抗治療後的不同時間點，患有嚴重COVID-19的患者#7的乳酸脫氫酶(LDH)的血清水平。用納索利單抗的給藥通過垂直箭頭指示。紅色水平線代表正常水平。

【1282】 結果概括：

【1283】 如圖52A至52E中所示，在入院時以及在用納索利單抗治療之前，患者#7具有D-二聚體(被認為是COVID-19中的可凝性的主要標記物)的高血清水平、C反應蛋白(炎症標記物)的高血清水平、天冬胺酸胺基轉移酶(COVID-19中的危重病的酶標記物)的高血清水平、丙胺酸胺基轉移酶(肝功能標記物)的高血清水平、以及乳酸脫氫酶(細胞死亡的標記物)的高血清水平。如圖52A至52E中進一步所示，患者#7在第一個納索利單抗劑量之後得到改善，其中所有上述實驗室測量在第四個劑量後都降至接近正常水平或降至正常水平。他在第二個納索利單抗劑量之後拔管。在用納索利單抗治療之後，ICU工作人員對他

的快速改善感到驚訝。如實施例21中所述，在本實施例中報告的患者#7的快速改善與在用納索利單抗治療後COVID-19患者#1-6的恢復是一致的。

【1284】 從本實施例中描述的臨床研究中提供了另外的數據：

【1285】 如本實施例中所述，患者#7在第一個納索利單抗劑量後得到改善，他在第二個劑量後拔管，並且所有上述實驗室測量在第四個劑量後都降至接近正常水平或降至正常水平。作為更新，患者#7接受了總共6個納索利單抗劑量並且出院。如圖53中所示，隨著時間過去來自患者#7的血清學數據指示了，在用納索利單抗治療期間生成了適當地高滴度的抗SARS-CoV-2抗體，指示了納索利單抗並不阻礙適應性免疫應答的效應子功能。

【1286】 除本文所述的患者#1-7之外，根據實施例20和實施例21中所述的方法，在同情使用下，已用納索利單抗以每週靜脈內施用兩次的4 mg/kg劑量治療了眾多的另外患有ARDS的COVID-19患者(總共n=19)，共2周至4周或5周，最多4至10個劑量(共兩周、三周、四周或五周)。本實施例中所述的所有另外患者在治療之前都患有COVID-19相關的ARDS的嚴重病，全部都被插管，其中大多數在插管後數天啟動納索利單抗，並且全部在啟動納索利單抗之前其它療法已失敗。在大多數用納索利單抗治療的患者中觀察到了驚人的積極結果，類似於對於本文所述的患者#1-7觀察到的結果。大多數用納索利單抗治療的COVID-19患者顯示了在臨床症狀和實驗室值方面的快速且明顯的改善，並且隨後出院。重要的是，關於其隨訪數據(在納索利單抗治療停止後5-6個月)可獲得的納索利單抗治療的COVID-19患者，並未顯示觀察到的長期後遺症的臨床或實驗室證據。還觀察到，用納索利單抗治療的存活的COVID-19患者發展適當地高抗SARS-CoV-2抗體，如上文對於患者#7所述。這些結果證實了，用納索利單抗

(其特異性抑制凝集素途徑，並且使補體的替代途徑和經典途徑保持完全功能性)的治療，保存了適應性免疫應答的抗感染效應子功能，並且維持了抗原-抗體複合物介導的裂解應答，其在殺死受病毒感染的細胞中起重要作用。

【1287】 下文提供了在意大利Bergamo用納索利單抗治療的危重病COV-19-19患者#8-15、以及在美國用納索利單抗治療的患者#1-4的治療過程的簡要描述：

【1288】 患者#8(Bergamo，意大利)

【1289】 患者#8是76歲的肥胖男子，患有充血性心力衰竭、高血壓、血脂異常和嚴重COVID-19。他在插管後3天啟動納索利單抗治療，並且在第3個劑量之後，死於先前存在的心肌病併發症。在1至2個納索利單抗劑量後，他的D-二聚體和LDH水平得到改善。血清學數據指示了他並未發展高滴度的抗SARS-CoV-2抗體。

【1290】 患者#9(Bergamo，意大利)

【1291】 患者#9是患有嚴重COVID-19的41歲的超重男子。他在插管後2天開始納索利單抗治療，且在第3個劑量後拔管。他接受了總共6個劑量，並且出院。在1至2個納索利單抗劑量後，他的D-二聚體和LDH水平得到改善。血清學數據指示了，他在用納索利單抗治療過程期間發展適當地高滴度的抗SARS-CoV-2抗體。

【1292】 患者#10(Bergamo，意大利)

【1293】 患者#10是患有嚴重COVID-19的65歲的超重男子。他在插管後3天開始納索利單抗治療，且在第4個劑量後拔管。他接受了總共8個納索利單抗劑量，並且出院。在1至2個納索利單抗劑量後，他的D-二聚體和LDH水平得到

改善。血清學數據指示了，他在用納索利單抗治療過程期間發展適當地高滴度的抗SARS-CoV-2抗體。

【1294】 患者#11(Bergamo，意大利)

【1295】 患者#11是68歲的超重男子，患有高血壓、血脂異常和嚴重COVID-19。他在插管後13天開始納索利單抗治療。他接受了總共7個劑量，並且死於多器官衰竭。血清學數據指示了他並未發展高滴度的抗SARS-CoV-2抗體。

【1296】 患者#12(Bergamo，意大利)

【1297】 患者#12是62歲的超重男子，患有糖尿病、高血壓、血脂異常和嚴重COVID-19。他在插管後2天開始納索利單抗治療，並且在5個劑量後拔管。他接受了總共6個納索利單抗劑量，然後發展醫院感染，需要再次插管和氣管造口術，其在9天后去除。他從醫院出院時被送往處於低流量氧氣下的康復設施。血清學數據指示了，他在用納索利單抗治療過程期間發展適當地高滴度的抗SARS-CoV-2抗體。

【1298】 患者#13(Bergamo，意大利)

【1299】 患者#13是62歲的超重男子，患有高血壓和嚴重COVID-19。他在插管後3天開始納索利單抗治療，並且在第6個劑量後切開氣管。他接受了總共8個納索利單抗劑量，隨後去除氣管造口術，並且他從醫院出院處於室內空氣下。血清學數據指示了，他在用納索利單抗治療過程期間發展適當地高滴度的抗SARS-CoV-2抗體。

【1300】 患者#14(Bergamo，意大利)

【1301】 患者#14是受SARS-CoV-2感染的64歲的超重男子，患有高血壓和嚴重COVID-19。他在插管後6天開始納索利單抗治療。他在第7個劑量後切開氣管。他接受了總共8個納索利單抗劑量，隨後去除氣管造口術，並且他從醫院出院處於室內空氣下。血清學數據指示了，他在用納索利單抗治療過程期間發展適當地高滴度的抗SARS-CoV-2抗體。

【1302】 患者#15(Bergamo，意大利)

【1303】 患者#15是79歲的超重男子，患有高血壓和嚴重COVID-19。他在插管後3天開始納索利單抗治療。他在3個納索利單抗劑量後拔管。他接受了總共6個納索利單抗劑量，並且出院。血清學數據指示了，他在用納索利單抗治療過程期間發展適當地高滴度的抗SARS-CoV-2抗體。

【1304】 患者#1(美國)

【1305】 患者#1是患有嚴重COVID-19的53歲的男子，其在其它治療方案(包括瑞德西韋、托珠單抗、初始類固醇治療和恢復期血漿)失敗後已插管約2周。他開始用納索利單抗的治療，並且同時接受依諾肝素和甲潑尼龍。他迅速響應，並且在第5個納索利單抗劑量後不久拔管。他被送往康復機構用於物理治療，繼續改善並於上個月恢復工作。據報告，他沒有COVID-19的長期後遺症。

【1306】 患者#2(美國)

【1307】 患者#2是55歲的非裔美國婦女，具有由於嚴重COVID-19而快速惡化的呼吸功能。她在插管後幾天開始用納索利單抗的治療。她的氧氣需求已成功撤除，但由於面罩不耐受，放置氣管造口術用於低水平的氧氣支持，並且

插入飼管。她被送往急症監護設施，然後回家。氣管造口術和飼管被去除，並且據報告，她完全恢復，而沒有長期臨床後遺症的證據。

【1308】 患者#3(美國)

【1309】 患者#3是患有嚴重COVID-19的80歲的男子。他在插管後幾天開始用納索利單抗的治療。他在第3個或第4個納索利單抗劑量後死亡。據報告他的死亡與氣壓傷以及機械通氣繼發的有關併發症相關。他的家人出於宗教原因拒絕接受體外膜式氧合(ECMO)治療。

【1310】 患者#4(美國)

【1311】 患者#4是61歲的男子，患有高血壓和嚴重COVID-19。在納索利單抗治療啟動之前，他已插管8天並經歷ECMO。他對用瑞德西韋、巴瑞替尼和大劑量類固醇的治療已失敗。他接受了3個納索利單抗劑量且死亡。

【1312】 總之，納索利單抗已用於治療本文所述的19個患者，具有驚人的結果。所有用納索利單抗治療的COVID-19患者都具有需要機械通氣的ARDS – CPAP(4)或插管(14)。所有患者都具有高危特點/共病。大多數用納索利單抗治療的COVID-19患者顯示了在症狀(即不再需要補充氧氣)和實驗室值方面的快速且顯著的改善，並且隨後出院。如本文進一步所述，其隨訪(5-6個月)數據可獲得的納索利單抗治療的COVID-19患者，並未顯示觀察到的長期COVID後遺症的臨床或實驗室證據。納索利單抗治療的COVID-19患者發展適當地高滴度的SARS-CoV-2抗體，指示了與用其它補體抑制劑的治療不同，納索利單抗並不阻礙適應性免疫應答的效應子功能。

【1313】 表16：患者#7-#15(Bergamo，意大利)的臨床特點

(2022 年 11 月修正)

臨床特點	患者 #7	患者 #8	患者 #9	患者 #10	患者 #11	患者 #12	患者 #13	患者 #14	患者 #15
年齡(歲)	76	76	41	65	68	62	62	64	79
男性/女性	M	M	M	M	M	M	M	M	M
重量(kg) BMI(kg/m2)	90 32	100 >30	90 29	90 27.8	85 29	85 n/a	90 27.8	105 32.5	75 26.0
從疾病發作到住院的時間(天)	10	n/a	4	7	4	2	5	7	1
從入院到重症監護的時間(天)	6	0	2	2	1	1	13	5	2
入院時發燒	是	是	是	是	是	是	是	是	否
入選時的 ARDS 嚴重性	中度	重度	中度	中度	重度	中度	中度	中度	輕度
從住院到用納索利單抗的治療起始的時間	6	3	4	5	14	3	16	11	5
從插管到用納索利單抗的治療起始的時間	0-24 小時	0-24 小時	0-24 小時	>48 小時	>48 小時	>48 小時	>48 小時	>48 小時	24-48 小時
在胸部射線照相時的雙側間質異常	是	是	是	是	是	是	是	是	是
實驗室發現									
PaO2:FiO2 比	130	45	186	110	95	119	160	162	250
白細胞計數/ $mm^{3,}$	7480	7410	10270	10620	19640	8190	21520	8810	8470
淋巴細胞計數/ $mm^{3,}$	550	480	1320	700	390	500	1940	490	350
血小板計數 x $10^3/mm^3$	181	192	313	268	307	154	247	205	210
血紅蛋白– g/dL	13.3	11.4	13.0	12.0	10.9	15.4	12.4	12.7	11.3

C 反應蛋白(0.0-1.0 mg/dL)	16	16.4	6	17.3	12	6.1	6.8	16.3	14.5
乳酸脫氫酶 (120/246 U/L)	496	623	582	491	354	513	315	360	350
天冬胺酸胺基轉移酶(13-40 U/L)	81	149	19	55	52	69	89	37	71
丙胺酸胺基轉移酶 (7-40 U/L)	70	68	24	22	86	30	252	44	54
肌酐(0.3-1.3 mg/dL)	0.82	1.4	0.48	0.71	0.35	0.79	0.79	0.88	1.13
D-二聚體(<500 ng/mL)	3949	2026	4299	4471	1126	808	429	2410	354
用納索利單抗治療的結果									
納索利單抗的劑量總數	6	3	5	8	8	6	8	8	6
出院	是	否，死亡	是	是	否，死亡	是	是	是	是

【1314】 流感病毒

【1315】 如實施例20、21和22中所述，已證實了凝集素途徑促成COVID-19感染中的肺部損傷，並且代表性的MASP-2抑制性抗體納索利單抗有效緩解COVID-19患者中的肺部症狀。在流感H5N1病毒感染模型中，補體活化也已證實為促成肺部損傷。肺組織病理學變化在具有H5N1感染和SARS-CoV感染的患者中非常相似。在H5N1鼠模型中，MASP-2 RNA、C3a受體RNA和C5a受體RNA的表達在感染之後的第一天全部都增加。使用C3aR拮抗劑或眼鏡蛇毒因子的補體抑制減輕肺損傷和臨床症狀。存活也是增加的(參見Sun等人，Am J Respir Cell Mol Biol 49(2):221-30，2013)。相應地，預計MASP-2抑制劑也將有

效用於治療、抑制、減輕或預防由流感病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群或疾病的其它表現的方法中。

【1316】 實施例23

【1317】 用於MASP-2的酶促測定

【1318】 基於其天然底物C2的切割位點，MASP-2測定利用了熒光底物。該測定在室溫下在含有20 mM Hepes，pH 7.4，140 mM NaCl和0.1% Tween 20的測定緩衝液中運行。這樣調整測定參數，使得測定相對於時間、酶和底物濃度呈線性。在這些優化的測定條件下，IC_{50}值等價於Ki值，除了“緊密結合”抑制劑的少數情況之外。通過Copeland R.A.(2013)Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery. 第2版，John Wiley and Sons，Inc.，第5-7章中所述的方法，來處理“緊密結合”或可能的“緩慢結合”抑制劑的情況。

【1319】 MASP-2測定方案如下進行。將測試化合物在DMSO中連續稀釋，然後將100 nL每種稀釋物轉移至測定板。加入10 μL測定緩衝液，隨後為在測定緩衝液中的15 μL酶(MASP-2(CCP1-CCP2-SP)。然後加入在測定緩衝液中的15 μL底物並混合，以起始反應。在室溫下20分鐘後，加入15 μL終止溶液(0.1 M乙酸)，混合，並在SpectraMax i3x Microplate Reader上讀取板，並作為Excel文件輸出。每塊測定板包括“無抑制劑”(僅DMSO)對照、“無酶”對照和參考抑制劑對照。%活性值=100*(平均測試化合物熒光–平均“無酶”熒光)/(平均“僅DMSO”熒光–平均“無酶”熒光)。IC_{50}和Ki值是非常可重現的，良好地落入±2倍內。

【1320】 實施例24

【1321】 用小分子化合物治療的人血清中的凝集素途徑活化測定

【1322】 微量滴定ELISA板用來自釀酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)的甘露聚糖(Sigma-Aldrich，M7504)，在包被緩衝液[15 mM Na_2CO_3、35 mM $NaHCO_3$]中在4°C下包被過夜。板用在Tris緩衝鹽水(TBS)[10 mM Tris-HCl，140 mM NaCl]中的1%牛血清白蛋白(BSA)(Sigma-Aldrich，A3294)在室溫下封閉2小時。使1%人血清與在GVB++ [4 mM巴比妥、145 mM NaCl、0.2 mM $MgCl_2$、0.2 mM $CaCl_2$、1%明膠]中的小化合物的系列稀釋物一起溫育，並在室溫下溫育15分鐘。然後將100 μL的這種混合物加入板中，並且使板在37°C下伴隨200 rpm的輕柔振盪溫育長達一個小時。這之後，將板在洗滌緩衝液[含有5 mM $CaCl_2$和0.05% Tween-20的TBS]中洗滌三次，然後添加100 μL在洗滌緩衝液中1:5000稀釋的兔抗人C3c(Dako，A0062)，並且在37°C下溫育30分鐘。將板洗滌，並且添加在洗滌緩衝液中1:8000稀釋的100 μL HRP山羊抗兔IgG(Southern Biotech，4050-05)，並在室溫下溫育30分鐘。這之後，將板洗滌3次，然後加入100 μL/孔的TMB比色底物(Thermo Scientific，34029)，並在室溫下溫育5分鐘，並且通過加入100 μL/孔的0.1 N硫酸(BDH7230)來終止反應，並在450 nm處測量吸光度。

【1323】 實施例25. 關於凝血酶的酶促測定

【1324】 凝血酶測定利用熒光肽底物(Boc-VPR-AMC(R&D Systems)，並且在室溫下在含有20 mM Hepes，pH 7.4，140 mM NaCl和0.1% Tween 20的測定緩衝液中運行。這樣調整測定參數，使得測定相對於時間、酶和底物濃度呈線性。在這些優化的測定條件下，IC_{50}值等價於Ki值，除了“緊密結合”抑制劑的少數情況之外。通過Copeland R.A.(2013)Evaluation of Enzyme Inhibitors in

Drug Discovery. 第2版，John Wiley and Sons，Inc.，第5-7章中所述的方法，來處理“緊密結合”或可能的“緩慢結合”抑制劑的情況。

【1325】 凝血酶測定方案如下進行。將測試化合物在DMSO中連續稀釋，然後將100 nl每種稀釋物轉移至測定板。加入10 μL測定緩衝液，隨後為在測定緩衝液中的15 μL酶(人α-凝血酶(BioPharm Lab.))。然後加入在測定緩衝液中的15 μL底物並混合，以起始反應。在室溫下20分鐘後，加入15 μL終止溶液(0.1 M乙酸)，混合，並在SpectraMax i3x Microplate Reader上讀取板，並作為Excel文件輸出。每塊測定板包括“無抑制劑”(僅DMSO)對照、“無酶”對照和參考抑制劑對照。%活性值=100*(平均測試化合物熒光–平均“無酶”熒光)/(平均“僅DMSO”熒光–平均“無酶”熒光)。IC_{50}和Ki值是非常可重現的，良好地落入±2倍內。

【1326】 關於表4A-4E中列出化合物的生物測定結果在下表17A、17B和17C中列出。

【1327】 表17A：關於化合物1000-1229的MASP-2/凝血酶/凝集素途徑抑制

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1000	***	ND	***	ND	+
1001	**	ND	***	ND	--
1002	**	ND	****	ND	ND
1003	***	ND	****	ND	--
1004	***	ND	****	ND	--
1005	**	ND	****	ND	--
1006	****	****	****	ND	--

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1007	****	**	*	ND	***
1008	***	ND	****	+	--
1009	**	ND	***	ND	--
1010	****	ND	--	ND	****
1011	****	ND	****	++	--
1012	***	ND	--	ND	***
1013	**	ND	*	ND	**
1014	**	ND	--	ND	**
1015	***	*	--	+	*
1016	***	*	--	+	**
1017	****	ND	****	ND	--
1018	**	ND	**/***	--	--
1019	***	ND	***	ND	--
1020	****	ND	****	ND	--
1021	**	--	--	--	***
1022	*	ND	***	ND	--
1023	***	ND	****	+	--
1024	****	ND	****	+++/++++	**
1025	****	ND	--	++	****
1026	***	ND	****	ND	**
1027	****	ND	****	++/+++	--
1028	**	ND	****	ND	--
1029	**	ND	***	ND	--
1030	****	****	**	++	***
1031	***	ND	*	ND	**
1032	****	ND	**	ND	****
1033	**	ND	**	ND	--
1034	****	ND	***	+/++	*
1035	****	ND	****	++++	**
1036	****	****	***/**	+++/++++	****
1037	****	ND	***	ND	***

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1038	****	ND	****	+++/++++	*
1039	**	*	--	ND	***
1040	****	****	--	++	****
1041	***	ND	****	+	--
1042	****	ND	****	++++	**
1043	****	****	***	++/+++	**
1044	****	****	****	ND	**
1045	****	****	****	ND	**
1046	****	****	****	ND	**
1047	****	****	****	++/+++	**
1048	****	****	****	++/+++	**
1049	****	ND	****	ND	**
1050	****	ND	**	ND	ND
1051	**	ND	****	+	--
1053	****	ND	**	++	**
1054	***	ND	**	+	*
1055	***	ND	****	+	--
1056	****	ND	***	ND	****
1057	****	ND	***	ND	****
1058	****	ND	****	++/+++	--
1059	****	****	--	++/+++	****
1060	****/***	--	--	--	***
1061	****	ND	***	ND	*
1062	***	ND	*	ND	***
1063	****	ND	***	ND	**
1064	***	ND	**	ND	**
1065	****	****	*	++++	****
1066	****	ND	--	ND	***
1067	****	****	**	ND	****
1068	***	ND	*	ND	**
1069	****	ND	****	++	--

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1070	**	ND	--	ND	*
1071	****	****	**	ND	***
1072	****	****	****	ND	**
1073	****	****	****	ND	**
1074	****	****	****	ND	**
1075	****	****	****	ND	**
1076	****	ND	****	ND	**
1077	**	ND	****	ND	--
1078	****	ND	ND	++	ND
1079	****	ND	ND	+	ND
1080	****	****	****	++/+++	**
1081	****	****	****	++/+++	**
1082	****	ND	****	ND	*
1083	****	ND	****	+	--
1084	****	ND	****	ND	**
1085	****	ND	****	ND	**
1086	****	ND	****	ND	**
1087	****	ND	****	ND	**
1088	****	****	***	+++	**
1089	****	ND	**	ND	***
1090	****	****	**/*	++	***
1091	***	****	--	+	***
1092	****	****	****	++/+++	--
1093	****	ND	****	ND	--
1094	****	ND	****	+	--
1095	**	ND	**	ND	*
1096	***	ND	****	+/++	--
1097	****	****	****	ND	***
1098	****	ND	ND	++++	ND
1099	****	ND	****	+++	--
1100	***	ND	****	ND	--

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1101	****	****	***	ND	*
1102	***	ND	****	ND	--
1103	****	****	****	+++	**
1104	*	ND	***	ND	--
1105	**	ND	***	ND	--
1106	***	ND	****	ND	--
1107	****	ND	****	++/+	--
1108	****	****	****	ND	*
1109	**	ND	****	--	--
1110	****	ND	****	+++/++++	*
1111	****	ND	****	ND	*
1112	****	ND	****	ND	**
1113	**	ND	***	ND	--
1114	****	ND	****	++	--
1115	****	ND	****	++	--
1116	***	ND	****	+	--
1117	**	ND	****	ND	--
1118	****	****	****	ND	**
1119	****	ND	***	ND	**
1120	****	ND	****	ND	**
1121	**	ND	***	ND	--
1122	****	ND	****	ND	--
1123	****	ND	***	++	**
1124	****	ND	****	+++/++++	--
1125	****	****	****	ND	--
1126	****	ND	****	ND	--
1127	***	ND	****	+	--
1128	****	****	****	ND	*
1129	****	ND	****	++	--
1130	****	ND	****	ND	--
1131	****	ND	****	++	--

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1132	***	ND	ND	ND	ND
1133	****	ND	****	+	--
1134	****	****	****	ND	--
1135	****	ND	***	ND	*
1136	****	ND	***	ND	***
1137	***	ND	ND	--	ND
1138	**	ND	****	ND	--
1139	****	**	***	+	*
1140	****	ND	****	ND	--
1141	****	ND	****	ND	--
1142	****	ND	****	ND	*
1143	****	****	****	ND	--
1144	***	ND	ND	ND	ND
1145	****	ND	ND	+++	ND
1146	****	ND	***	ND	*
1147	***	ND	***	ND	*
1148	****	ND	ND	ND	ND
1149	****	****	****	ND	**
1151	****	ND	****	ND	--
1152	****	ND	****	ND	*
1153	****	ND	****	ND	****
1154	****	ND	****	ND	--
1156	*	ND	***/****	ND	--
1157	*	ND	--	ND	*
1158	*	ND	****	ND	--
1170	****	*	--	ND	****
1171	*	*	--	--	*
1192	*	ND	--	ND	*
1194	*	ND	**	ND	--
1195	*	ND	*	ND	--
1207	**	ND	***	ND	--

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1211	****	ND	****	ND	--
1213	*	ND	--	ND	*
1215	**	*	--	ND	*
1218	****	ND	****	ND	--
1223	****	****	****	ND	***
1229	**	ND	**	ND	*
999(美拉加群對照)	****	****	****	+/++	--

【1328】 MASP-2抑制和凝血酶抑制Ki值：

【1329】 * 小於25 μM的K_i

【1330】 ** 小於10 μM的K_i

【1331】 *** 小於2.5 μM的K_i

【1332】 ****小於0.5 μM的K_i

【1333】 -- >25 μM的K_i

【1334】 凝集素途徑抑制

【1335】 -- >50 μM的IC_{50}值

【1336】 + 在5 μM至50 μM的範圍內的IC_{50}值

【1337】 ++ 在0.5 μM至5 μM的範圍內的IC_{50}值

【1338】 +++ 在0.05 μM至0.5 μM的範圍內的IC_{50}值

【1339】 ++++ IC_{50}值< 0.05 μM

【1340】 化合物對於MASP-2的抑制相對於凝血酶的選擇性：

【1341】 --小於1.0倍

【1342】 * 1.0至5.0倍

【1343】 ** 5.0至25倍

【1344】 *** 25至100倍

【1345】 **** >100倍

【1346】 ND未確定

【1347】 表17B. 關於化合物1230-1497的MASP-2/凝血酶/凝集素途徑抑制

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1230	****	****	*	++++	****
1231	****	****	**	ND	****
1232	***	ND	****	ND	--
1233	****	****	***	ND	*
1234	****	****	*	ND	***
1235	****	ND	*	ND	***
1236	****	****	****	ND	*
1237	*	ND	***	ND	--
1238	****	****	**	ND	***
1239	****	****	**	++	**
1240	***	ND	*	++	**
1241	****	****	****	ND	*
1242	***	**	**	ND	**
1243	*	ND	--	ND	ND
1244	***	ND	--	ND	**
1245	****	*	*	ND	****
1246	*	ND	*	ND	*
1247	****	****	***	ND	***
1248	****	****	***	ND	**
1249	****	****	*	ND	****
1250	****	****	****	ND	*

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1251	***	ND	****	ND	--
1252	****	ND	**	ND	***
1253	****	***	--	+++	ND
1254	****	ND	*	ND	***
1255	***	ND	--	ND	ND
1256	****	ND	****	ND	*
1257	****	*	--	ND	***
1258	**	ND	--	ND	ND
1259	**	ND	--	ND	ND
1260	**	ND	--	ND	ND
1261	*	*	--	ND	*
1262	****	ND	***	ND	***
1263	**	**	--	ND	ND
1264	**	*	--	ND	ND
1265	****	**	--	ND	****
1266	***	--	--	ND	**
1267	**	--	--	ND	ND
1268	****	****	****	ND	*
1269	***	*	--	ND	**
1270	****	****	****	ND	**
1271	**	--	--	ND	ND
1272	****	****	***	ND	***
1273	*	*	--	ND	ND
1274	**	*	--	ND	**
1275	***	--	--	ND	***
1276	****	****	***	ND	***
1277	****	****	****	ND	**
1278	****	****	**	ND	***
1279	***	--	**	ND	**
1280	**	*	--	ND	ND
1281	**	--	--	ND	ND

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1282	*	--	--	ND	ND
1283	****	***	**	ND	***
1284	****	****	****	ND	*
1285	***	***	**	ND	**
1286	**	****	***	ND	--
1287	*	--	--	ND	ND
1288	**	**	--	ND	ND
1289	****	****	****	ND	--
1290	****	****	***	ND	**
1291	***	*	--	ND	ND
1292	**	*	--	ND	ND
1293	**	**	--	ND	*
1294	**	**	--	ND	ND
1295	****	****	**	ND	***
1296	**	--	--	ND	**
1297	****	****	*	ND	****
1298	****	**	--	ND	ND
1299	****	*	--	ND	****
1300	****	****	**	ND	***
1301	**	--	--	ND	ND
1302	****	****	***	ND	***
1303	****	**	--	ND	***
1304	****	***	***	+++	***
1305	***	****	--	ND	**
1306	****	****	****	ND	*
1307	****	****	--	+++	****
1308	***	***	*	ND	**
1309	****	****	--	ND	****
1310	***	--	--	ND	***
1311	**	**	--	ND	*
1312	****	****	****	ND	*

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1313	**	--	*	ND	*
1314	*	--	--	ND	*
1315	***	****	**	ND	*
1316	****	****	***	ND	***
1317	****	***	--	ND	ND
1318	****	****	**	ND	****
1319	****	*	**	ND	**
1320	****	***	***	ND	**
1321	*	--	--	ND	ND
1322	****	***	*	ND	***
1323	--	*	--	ND	ND
1324	****	****	***	+++	***
1325	***	*	****	ND	--
1326	****	****	*	ND	***
1327	****	****	****	ND	***
1328	****	****	***	+++	****
1329	****	****	***	ND	*
1330	****	****	****	ND	***
1331	****	****	--	+++	****
1332	*	**	--	ND	ND
1333	**	*	--	ND	ND
1334	****	****	****	+++	--
1335	****	****	**	ND	***
1336	*	--	--	ND	ND
1337	****	****	***	++	****
1338	****	****	--	+++	****
1339	****	****	****	++++	**
1340	****	****	****	ND	**
1341	*	--	***	ND	--
1342	****	***	*	ND	****
1343	****	****	**	+++	****

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1344	****	****	**	ND	****
1345	****	****	****	++++	****
1346	*	--	--	ND	ND
1347	****	****	***	++++	***
1348	****	****	****	++++	***
1349	***	**	--	ND	**
1350	****	****	**	++	****
1351	****	****	--	++++	****
1352	****	****	***	+++	***
1353	****	****	****	++++	***
1354	****	***	**	ND	***
1355	****	*	--	ND	ND
1356	****	****	--	+++	****
1357	****	****	--	++++	****
1358	***	--	--	ND	ND
1359	***	*	--	ND	**
1360	****	****	--	+++	****
1361	****	****	--	++++	****
1362	***	***	***	ND	*
1363	****	****	**	+++	****
1364	***	*	--	ND	ND
1365	****	****	--	++++	****
1366	**	**	--	ND	ND
1367	****	*	--	ND	ND
1368	***	*	--	+++	**
1369	****	****	--	ND	****
1370	****	***	--	+++	ND
1371	****	***	****	+++	--
1372	****	****	****	+++	**
1373	****	****	***	+++	***
1374	****	****	--	ND	ND

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1375	***	*	*	++	**
1376	***	--	--	ND	ND
1377	***	--	*	+++	**
1378	****	****	***	++	*
1379	****	****	--	++	****
1380	***	****	--	--	***
1381	***	*	*	++	**
1382	****	**	--	+	***
1383	***	**	--	+	ND
1384	*	--	--	ND	*
1385	****	****	****	+++	**
1386	*	--	--	ND	ND
1387	**	*	--	ND	ND
1388	****	****	--	++++	****
1389	****	**	--	++	****
1390	**	--	--	ND	ND
1391	****	****	--	++	****
1392	****	****	***	++	***
1393	****	****	****	+++	*
1394	**	--	*	ND	*
1395	***	**	--	+	ND
1396	****	****	--	++	****
1397	****	****	--	+++	****
1398	****	***	--	+++	ND
1399	****	****	*	+++	****
1400	****	**	--	++	ND
1401	****	***	--	ND	ND
1402	****	***	****	ND	*
1403	****	***	--	ND	ND
1404	****	****	****	ND	**
1405	****	***	***	ND	**

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1406	****	****	**	+++	****
1407	****	****	**	+++	****
1408	****	**	**	ND	**
1409	****	**	****	++	*
1410	****	***	***	++	***
1411	****	****	--	+++	ND
1412	****	**	--	ND	ND
1413	***	**	--	ND	***
1414	****	****	****	+++	--
1415	****	****	****	+++	*
1416	****	****	****	+++	**
1417	***	**	--	ND	ND
1418	**	*	--	ND	ND
1419	****	****	****	++++	*
1420	****	****	**	+++	****
1421	****	***	*	ND	****
1422	****	****	**	++	****
1423	****	****	**	+++	****
1424	***	***	****	ND	ND
1425	**	***	--	ND	ND
1426	****	***	***	++++	***
1427	****	****	--	ND	****
1428	****	***	*	++	****
1429	****	****	**	++	****
1430	****	****	--	++	****
1431	****	****	*	+++	****
1432	****	****	*	++	****
1433	****	****	***	+++	****
1434	*	*	--	ND	ND
1435	****	****	*	++	****
1436	***	--	*	ND	**

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1437	***	**	--	ND	**
1438	****	***	****	++	**
1439	****	**	--	ND	ND
1440	****	**	--	ND	ND
1441	****	****	--	+++	ND
1442	****	****	--	++	ND
1443	****	****	***	++	***
1444	****	****	****	++	**
1445	****	***	--	+	****
1446	****	***	--	+	****
1447	****	****	**	++	****
1448	****	**	--	ND	****
1449	****	****	**	++	****
1450	****	****	**	+++	****
1451	****	****	*	++	****
1452	****	****	***	++	****
1453	****	****	*	++++	****
1454	****	****	***	++	***
1455	****	****	--	ND	****
1456	****	***	--	+	ND
1457	*	**	--	ND	ND
1458	****	****	--	ND	****
1459	****	****	**	ND	****
1460	****	****	--	ND	****
1461	****	****	***	ND	****
1462	***	**	*	ND	**
1463	****	****	--	ND	ND
1464	****	****	--	ND	ND
1465	****	***	****	ND	*
1466	****	****	*	ND	****
1467	****	***	--	ND	****

(2022 年 11 月修正)

化合物	MASP-2 K_i(μM)	mMASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素途徑 IC_{50}(μM)	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
1468	****	****	--	ND	****
1469	****	****	**	ND	****
1470	****	****	**	ND	****
1471	**	**	--	ND	ND
1472	****	****	**	ND	****
1473	****	****	--	ND	ND
1474	****	****	--	ND	****
1475	****	****	*	ND	****
1476	****	****	**	ND	****
1477	****	****	*	ND	****
1478	****	****	*	ND	****
1479	****	****	*	ND	****
1480	****	***	--	ND	****
1481	****	****	**	ND	****
1482	****	****	***	ND	***
1483	****	****	*	ND	****
1484	***	***	--	ND	ND
1485	****	****	***	ND	**
1486	***	****	**	ND	**
1487	****	ND	--	ND	***
1488	****	**	****	++	--
1489	****	***	****	ND	--
1490	****	**	****	+	--
1491	***	****	****	+	--
1492	****	****	****	+++	**
1493	*	--	*	ND	*
1494	****	****	**	ND	****
1495	**	***	--	ND	**
1496	****	***	--	ND	ND
1497	****	**	**	ND	**

【1348】 MASP-2抑制和凝血酶抑制Ki值：

【1349】 * 10 μM<K_i ≤25 μM

【1350】 ** 2.5 μM ≤ K_i < 10 μM

【1351】 *** 0.5 μM ≤ K_i < 2.5 μM

【1352】 **** K_i < 0.5 μM

【1353】 -- >25 μM的K_i

【1354】 ND未確定

【1355】 凝集素途徑抑制

【1356】 + 5 μM<IC_{50} ≤50 μM

【1357】 ++ 0.5 μM ≤ IC_{50} < 5 μM

【1358】 +++ 0.05 μM ≤ K_i < 0.5 μM

【1359】 ++++ K_i < 0.05 μM

【1360】 -- IC_{50} >50 μM

【1361】 化合物對於MASP-2的抑制相對於凝血酶的選擇性：

【1362】 --<1.0倍

【1363】 * ≥1.0至<5.0倍

【1364】 ** ≥5.0至<25倍

【1365】 *** ≥25至<100倍

【1366】 **** ≥100倍

【1367】 ND未確定

【1368】 表17C. MASP-2/凝血酶/凝集素途徑抑制

(2022 年 11 月修正)

化合物編號	MASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素 K_i	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
2000	****(+Zn) --(+EDTA)	**(+Zn) --(+EDTA)	ND	++(+Zn)
2001	****(+Zn) --(+EDTA)	***(+Zn) --(+EDTA)	ND	++(+Zn)
2002	***(+Zn) --(+EDTA)	*(+Zn) --(+EDTA)	ND	++(+Zn)
2003	*****(+Zn) --(+EDTA)	***(+Zn) --(+EDTA)	ND	+++(+Zn)
2004	****(+Zn) --(+EDTA)	****(+Zn) --(+EDTA)	ND	+(+Zn)
2005	*****(+Zn) --(+EDTA)	*****(+Zn) --(+EDTA)	ND	+(+Zn)
2006	**(+Zn) --(+EDTA)	--(+Zn) --(+EDTA)	ND	+(+Zn)
2007	****(+Zn) --(+EDTA)	***(+Zn) --(+EDTA)	ND	++(+Zn)
2008	****(+Zn) --(+EDTA)	**(+Zn) --(+EDTA)	ND	+++(+Zn)
2009	****(+Zn) --(+EDTA)	***(+Zn) *(+EDTA)	ND	++(+Zn)
2010	*****(+Zn) --(+EDTA)	***(+Zn) *(+EDTA)	ND	++(+Zn)
2011	****(+Zn) --(+EDTA)	***(+Zn) --(+EDTA)	ND	++(+Zn)
2012	*****(+Zn) --(+EDTA)	****(+Zn) --(+EDTA)	ND	+(+Zn)
2013	****(+Zn) --(+EDTA)	**(+Zn) --(+EDTA)	ND	++++(+Zn)
2014	****(+Zn) --(+EDTA)	***(+Zn) *(+EDTA)	ND	+++(+Zn)

(2022 年 11 月修正)

化合物編號	MASP-2 K_i(μM)	凝血酶 K_i(μM)	凝集素 K_i	MASP-2 相對於凝血酶選擇性
2015	***(- Zn) *****(+Zn) --(+EDTA)]	***(- Zn) ****(+Zn) --(+EDTA)]	ND	+(+Zn)
2016	****(+Zn) --(+EDTA)	*(+Zn) *(+EDTA)	ND	+++(+Zn)
2017	***	--	ND	>++
2018	***	--	ND	>++
2019	**	--	ND	>+
2020	*	--	ND	>+
2021	**	--	+	>++

【1369】 MASP-2抑制和凝血酶抑制Ki值：

【1370】 * 小於25 μM的K_i

【1371】 ** 小於10 μM的K_i

【1372】 *** 小於2.5 μM的K_i

【1373】 ****小於0.5 μM的K_i

【1374】 *****小於0.05 μM的K_i

【1375】 -- >25 μM的K_i

【1376】 凝集素途徑抑制：

【1377】 -- >50 μM的IC_{50}值

【1378】 + 在5 μM至50 μM的範圍內的IC_{50}值

【1379】 化合物對於MASP-2相對於凝血酶的選擇性：

【1380】 --小於1.0倍

【1381】 + 1.0至5.0倍

【1382】 ++ 5.0至25倍

【1383】 +++ 25至100倍

【1384】 ++++ >100倍

【1385】 ND未確定

【1386】 根據前述內容，在一個方面，本發明提供了用於治療、抑制、減輕或預防哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群或疾病的其它表現例如血栓形成的方法，所述哺乳動物受試者由冠狀病毒或流感病毒感染，所述方法包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化(即，抑制凝集素途徑活化)的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。在一些實施方案中，受試者患有一種或多種呼吸道症狀和/或血栓形成，並且該方法包括將有效改善至少一種呼吸道症狀(即，改善呼吸功能)和/或減輕血栓形成的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。

【1387】 在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由COVID-19感染的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由SARS-CoV感染的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由MERS-CoV感染的受試者。在一個實施方案中，在MASP-2抑制劑施用之前，受試者被鑒定為具有冠狀病毒(即COVID-19、SARS-CoV或MERS-CoV)。在一個實施方案中，受試者被鑒定為由COVID-19感染，並且需要補充氧氣，並且將MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體例如納索利單抗施用於患者，其劑量和時間段有效消除對於補充氧氣的需要。

【1388】 在一個實施方案中，受試者被鑒定為患有COVID-19，並且患有或處於發展COVID-19誘導的血栓形成的風險中，並且該方法包括以治療有效

量施用包含MASP-2抑制劑(例如MASP-2抑制性抗體，例如納索利單抗)的組合物，以治療、預防或降低所述受試者中的凝血或血栓形成的嚴重性。在一些實施方案中，本發明的方法提供了抗凝和/或抗血栓形成和/或抗血栓栓塞，而不影響止血。在一個實施方案中，在患有COVID-19的受試者中測量D-二聚體水平，以確定所述受試者中血栓形成的存在或不存在，其中高於標準範圍的D-二聚體水平指示血栓形成的存在，並且受試者用治療有效量的MASP-2抑制劑(例如MASP-2抑制性抗體，例如納索利單抗)進行治療，以治療、預防或降低所述受試者的凝血或血栓形成的嚴重性，其可以例如通過D-二聚體水平降低到健康受試者的正常範圍內的水平進行測量。

【1389】 在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由流感病毒感染的受試者，所述流感病毒例如甲型流感病毒(H1N1(引起1918年的“西班牙流感”和2009年的“豬流感”)；H2N2(引起1957年的“亞洲流感”)、H3N2(引起1968年的“香港流感”)、H5N1(引起2004年的“禽流感”)、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9和H6N1)；或乙型流感病毒或丙型流感病毒。在一個實施方案中，在MASP-2抑制劑施用之前，受試者被鑒定為具有流感病毒。

【1390】 在一個實施方案中，與對照健康受試者或群體的循環內皮細胞水平相比，在用MASP-2抑制劑治療之前，受試者被確定為在從受試者獲得的血液樣品中具有增加水平的循環內皮細胞。在一些實施方案中，該方法包括施用足以降低由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者的循環內皮細胞數目的量的MASP-2抑制劑。

【1391】在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是抑制MASP-2依賴性補體活化的小分子。

【1392】在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。

【1393】在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其IC_{50}為30 nM或更小。

【1394】在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列。

【1395】在一些實施方案中，該方法包括向由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者施用包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體包括包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區、以及包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的輕鏈可變區，其劑量為1 mg/kg至10 mg/kg(即，1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg)，每週至少一次(例如每週至少兩次或每週至少三次)，持續至少2周(例如至少3周、或至少4周、或至少5周、

或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周)的時期。

【1396】 在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量為約4 mg/kg(即3.6 mg/kg至4.4 mg/kg)。

【1397】 在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體(例如，納索利單抗)的劑量以約4 mg/kg(即，3.6 mg/kg至4.4 mg/kg)的劑量施用於患有COVID-19的受試者，每週至少兩次，持續至少兩周、或至少三周、或至少四周(例如，兩周至四周)的時間段。

【1398】 在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量是約300 mg至約450 mg(即，約300 mg至約400 mg、或約350 mg至約400 mg)，例如約300 mg、約305 mg、約310 mg、約315 mg、約320 mg、約325 mg、約330 mg、約335 mg、約340 mg、約345 mg、約350 mg、約355 mg、約360 mg、約365 mg、約370 mg、約375 mg、約380 mg、約385 mg、約390 mg、約395 mg、約400 mg、約405 mg、約410 mg、約415 mg、約420 mg、約425 mg、約430 mg、約435 mg、約440 mg、約445 mg和約450 mg)的固定劑量。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量是約370 mg(±10%)的固定劑量。

【1399】 在一個實施方案中，該方法包括每週兩次向由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者，靜脈內施用以約370 mg(±10%)的固定劑量的MASP-2抑制性抗體，持續至少8周的治療期。

【1400】 在一個實施方案中，將MASP-2抑制劑全身性地遞送至受試者。在一個實施方案中，將MASP-2抑制劑經口、皮下、腹膜內、肌內、動脈內、靜脈內或作為吸入劑施用。

【1401】在一個實施方案中，受試者患有COVID-19誘導的肺炎或ARDS，並且將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)施用足以減輕肺炎或ARDS的一種或多種症狀的時間。在一個實施方案中，受試者處於機械呼吸機上，並且MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)以足以中止對於機械通氣的需要的劑量和時間段施用。在一個實施方案中，受試者處於侵入性機械呼吸機上。在一個實施方案中，受試者處於非侵入性機械呼吸機上。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)以足以中止對於補充氧氣的使用的劑量和時間段施用。

【1402】在一個實施方案中，將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)作為單一療法，施用於由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者。在一些實施方案中，將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)與一種或多種另外的治療劑組合，施用於由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者，例如在包含MASP- 2抑制劑和一種或多種抗病毒劑、或一種或多種抗凝劑、或一種或多種治療性抗體、或者一種或多種治療性小分子化合物的組合物中。在一些實施方案中，將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)施用於由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者，其中所述受試者經歷用一種或多種另外的治療劑的治療，所述一種或多種另外的治療劑例如一種或多種抗病毒劑、或一種或多種抗凝劑、或一種或多種治療性抗體、或者一種或多種治療性小分子化合物。

【1403】根據前述內容，在另一個方面，本發明提供了用於治療、改善、預防或降低哺乳動物受試者發展一種或多種長期後遺症的風險的方法，所述哺乳動物受試者由冠狀病毒或流感病毒感染，所述方法包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化(即，抑制凝集素途徑活化)的量的MASP-2抑制劑施用

於受試者。在一些實施方案中，受試者患有一種或多種呼吸道症狀和/或血栓形成，並且該方法包括將有效改善至少一種呼吸道症狀(即，改善呼吸功能)和/或減輕血栓形成的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。

【1404】在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由COVID-19感染的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由SARS-CoV感染的受試者。在一個實施方案中，該方法包括將組合物施用於由MERS-CoV感染的受試者。在一個實施方案中，在MASP-2抑制劑施用之前，受試者被鑒定為具有冠狀病毒(即COVID-19、SARS-CoV或MERS-CoV)。在一個實施方案中，受試者被鑒定為由SARS-CoV-2感染，並且需要補充氧氣，並且將MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體例如納索利單抗施用於患者，其劑量和時間段有效消除對於補充氧氣的需要。

【1405】在一個實施方案中，受試者被鑒定為由COVID-19感染並且經歷輕度症狀，並且將MASP-2抑制劑例如MASP-2抑制性抗體例如納索利單抗施用於受試者，其劑量和時間段有效治療、改善、預防或降低所述受試者中發展一種或多種COVID-19有關的長期後遺症的風險。在一些實施方案中，該方法可用於治療、改善、預防或降低患有COVID-19或先前由COVID-19感染的受試者的一種或多種COVID-19有關的長期後遺症的風險，其中所述長期後遺症選自已由COVID-19感染的受試者的心血管併發症(包括心肌損傷、心肌病、心肌炎、血管內凝血、中風、靜脈和動脈併發症以及肺栓塞)；神經系統併發症(包括認知困難、意識模糊、也稱為“腦霧”的記憶喪失、頭痛、中風、頭暈、暈厥、癲癇發作、食慾減退、失眠、嗅覺喪失、味覺喪失、肌陣攣、神經性疼痛、肌痛；神經系統疾病如阿爾茨海默氏病、格巴二氏症候群、米勒-費希爾症

候群、帕金森氏病)的進展；腎臟損傷(例如急性腎臟損傷(AKI))、肺部併發症(包括肺纖維化、呼吸困難、肺栓塞)，以及炎性病況例如川崎病、川崎樣病、兒童的多系統炎症症候群(MIS-C)和多系統器官衰竭。最近發表的數據顯示了，兒童中的SARS-CoV-2感染導致不依賴於臨床嚴重性的TMA的高發病率(參見Diorio C.等人，Blood Advances第4卷(23)，Dec 8，2020)。還已報告，兒童中的SARS-CoV-2感染可以導致多系統炎症症候群(MIS-C)(參見Radia T.等人，Paediatr Respri Rev 2020年8月11日)。

【1406】 多個國際團體最近已發表報告，多於60%的“恢復的” COVID-19患者患有嚴重的後遺症，包括認知/CNS、肺、心臟、肝和其它異常(參見Bonow等人，JAMA Cardiology第5卷(7)2020年7月；Del Rio等人，JAMA第324卷(17)，2020年11月；Lindner等人，JAMA Cardiology 第5卷(11)，2020年11月；Marchiano S.等人，bioRxiv，2020年8月30日；Puntmann V.等人，JAMA Cardiology 第5卷(11)，2020年11月；Xiong Q.等人，Clin Microbial Infect 2020)。例如，如Yelin D.等人，Lancet Infect Dis 2020，9/1/2020中所述，從急性COVID-19中恢復的人的長期抱怨包括：極度疲勞、肌無力、低燒、注意力不集中、記憶差錯、情緒變化、睡眠困難、手臂和腿部的針痛、腹瀉和嘔吐、味覺和嗅覺喪失、喉嚨痛和吞咽困難、糖尿病和高血壓的新發作、皮疹、呼吸短促、胸痛和心悸。值得注意的是，如本文實施例21和22中所述，關於最初的6個Bergamo研究中用納索利單抗治療的COVID-19患者的5至6個月隨訪，並未顯示長期COVID-19後遺症的臨床或實驗室證據。

【1407】 在一個實施方案中，與對照健康受試者或群體的循環內皮細胞水平相比，在用MASP-2抑制劑治療之前，受試者被確定為在從受試者獲得的

血液樣品中具有增加水平的循環內皮細胞。在一些實施方案中，該方法包括施用足以降低由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者的循環內皮細胞數目的量的MASP-2抑制劑。

【1408】 在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是抑制MASP-2依賴性補體活化的小分子。

【1409】 在一個實施方案中，MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。

【1410】 在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體是特異性結合人MASP-2的單選殖抗體或其片段。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體基本上不抑制經典途徑。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其IC_{50}為30 nM或更小。

【1411】 在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列。

【1412】 在一些實施方案中，該方法包括向由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者施用包含MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段的組合物，所述MASP-2抑制性抗體包括包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的重鏈可變區、以及包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的輕鏈可變區，其劑量為1

mg/kg至10 mg/kg(即，1 mg/kg、2 mg/kg、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg、6 mg/kg、7 mg/kg、8 mg/kg、9 mg/kg或10 mg/kg)，每週至少一次(例如每週至少兩次或每週至少三次)，持續至少2周(例如至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周)的時期。

【1413】 在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量為約4 mg/kg(即3.6 mg/kg至4.4 mg/kg)。

【1414】 在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體(例如，納索利單抗)的劑量以約4 mg/kg(即，3.6 mg/kg至4.4 mg/kg)的劑量施用於患有COVID-19的受試者，每週至少兩次，持續至少兩周、或至少三周、或至少四周、或至少五周、或至少六周、或至少七周或至少八周(例如，兩周至四周、或兩周至五周、或兩周至六周、或兩周至七周、或兩周至八周)的時間段。

【1415】 在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量是約300 mg至約450 mg(即，約300 mg至約400 mg、或約350 mg至約400 mg)，例如約300 mg、約305 mg、約310 mg、約315 mg、約320 mg、約325 mg、約330 mg、約335 mg、約340 mg、約345 mg、約350 mg、約355 mg、約360 mg、約365 mg、約370 mg、約375 mg、約380 mg、約385 mg、約390 mg、約395 mg、約400 mg、約405 mg、約410 mg、約415 mg、約420 mg、約425 mg、約430 mg、約435 mg、約440 mg、約445 mg和約450 mg)的固定劑量。在一個實施方案中，MASP-2抑制性抗體的劑量是約370 mg(±10%)的固定劑量。

【1416】在一個實施方案中，該方法包括每週兩次向由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者，靜脈內施用約370 mg(±10%)的固定劑量的MASP-2抑制性抗體，持續至少8周的治療期。

【1417】在一個實施方案中，將MASP-2抑制劑全身性地遞送至受試者。在一個實施方案中，將MASP-2抑制劑經口、皮下、腹膜內、肌內、動脈內、靜脈內或作為吸入劑施用。

【1418】在一個實施方案中，受試者患有COVID-19誘導的肺炎或ARDS，並且將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)施用足以減輕肺炎或ARDS的一種或多種症狀，和足以減輕或預防COVID-19有關的長期後遺症的時間。在一個實施方案中，受試者處於機械呼吸機上，並且MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)以足以中止對於機械通氣的需要的劑量和時間段施用。在一個實施方案中，受試者處於侵入性機械呼吸機上。在一個實施方案中，受試者處於非侵入性機械呼吸機上。在一個實施方案中，MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)以足以中止對於補充氧氣的使用的劑量和時間段施用。

【1419】在一個實施方案中，將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)作為單一療法施用於由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者。在一些實施方案中，將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)與一種或多種另外的治療劑組合，施用於由冠狀病毒或流感病毒感染的受試者，例如在包含MASP- 2抑制劑和一種或多種抗病毒劑、或一種或多種抗凝劑、或一種或多種治療性抗體、或者一種或多種治療性小分子化合物的組合物中。在一些實施方案中，將MASP-2抑制劑(例如，MASP-2抑制性抗體)施用於由冠狀病毒或流感病毒感染

的受試者，其中所述受試者經歷用一種或多種另外的治療劑的治療，所述一種或多種另外的治療劑例如一種或多種抗病毒劑、或一種或多種抗凝劑、或一種或多種治療性抗體、或者一種或多種治療性小分子化合物。

【1420】 其它實施例

【1421】 I. 用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒感染的受試者的急性呼吸窘迫症候群的方法。

【1422】 1. 一種用於治療、抑制、減輕或預防由冠狀病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群、肺炎或者冠狀病毒感染的一些其它肺部表現或其它表現例如血栓形成的方法，其包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。

【1423】 2. 段落1的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2抗體或其片段。

【1424】 3. 段落2的方法，其中所述MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。

【1425】 4. 段落2的方法，其中所述MASP-2抗體或其片段與包含SEQ ID NO:6的多肽特異性結合，其中親和力是其與補體系統中不同抗原結合的至少10倍。

【1426】 5. 段落2的方法，其中所述抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。

【1427】 6. 段落2的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體選擇性地抑制凝集素途徑補體活化，而基本上不抑制C1q依賴性補體活化。

【1428】 7. 段落2的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制10%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1429】 8. 段落2的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1430】 9. 段落2的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

【1431】 10. 段落2的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:69的輕鏈可變區。

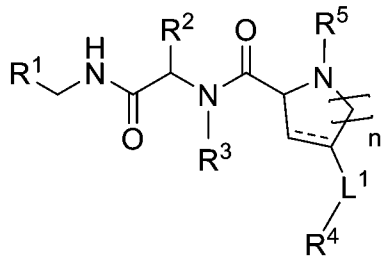
【1432】 11. 段落1的方法，其中所述MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【1433】 12. 段落11的方法，其中所述MASP-2抑制性化合物是合成或半合成的小分子。

【1434】 13. 段落1的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。

【1435】 14. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)或(VIIB)中任一個的化合物。

【1436】 15. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是具有下述結構的化合物：

【1437】 

【1438】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【1439】 ----代表雙鍵或單鍵；

【1440】 R^1為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【1441】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、羥烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【1442】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基，或者R^2和R^3連同它們各自與之連接的碳和氮一起形成任選取代的4-7元雜環基；

【1443】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【1444】 R^5為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_mC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$、$(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$或$C(=O)NR^6R^7$；

【1445】 在每次出現時，R^6和R^7獨立地為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基或芳基烷基；

【1446】 L^1為直接鍵、$-CR^{8a}R^{8b}-$、$-S(O)_t-$、NR^{8c}或-O-；

【1447】 R^{8a}和R^{8b}各自獨立地為氫、烷基，或者R^{8a}和R^{8b}連同它們與之連接的碳一起，形成任選取代的3-6元環烷基；

【1448】 R^{8c}為氫、烷基、鹵代烷基、(C=O)烷基、(C=O)O烷基、(C=O)環烷基、(C=O)O環烷基、(C=O)芳基、(C=O)O芳基、(C=O)雜芳基、(C=O)O雜芳

基、(C=O)雜環基、(C=O)O雜環基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、取代或未取代的雜環基、取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的雜芳基烷基、取代或未取代的環烷基烷基、或者取代或未取代的雜環基烷基；

【1449】 n為1或2；

【1450】 m為1、2、3、4、5或6；和

【1451】 t為0、1或2。

【1452】 16. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是表4A、4B、4C、4D或4E的化合物。

【1453】 17. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是分子量為200 Da至2,000 Da、250 Da至2,000 Da、300 Da至2,000 Da、300 Da至1,000 Da、300 Da至600 Da、350 Da至2,000 Da、350 Da至1,500 Da、350 Da至1,200 Da、350 Da至1,000 Da、350 Da至900 Da、350 Da至800 Da、350 Da至700 Da、350 Da至600 Da的小分子。

【1454】 18. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有選自胍基和苄脒基的零至一個鹼性基團。

【1455】 19. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有小於約25 μM、小於約10 μM、小於約2.5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.1 μM的MASP-2抑制Ki值。

【1456】 20. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是其凝集素途徑抑制IC_{50}小於約50 μM、小於約5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.05 μM的凝集素途徑抑制劑。

【1457】 21. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是選擇性MASP-2抑制劑，相對於凝血酶抑制，其對於MASP-2抑制的選擇性為大於約2倍、大於約5倍、大於約10倍、大於約25倍、大於約50倍、或大於約100倍。

【1458】 22. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物對於MASP-2具有的親和力大於對於凝血酶的，其中MASP-2:凝血酶的選擇性比為至少1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1或30:1。

【1459】 22. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是MASP-2的共價抑制劑。

【1460】 23. 段落11的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是內源性MASP-2配體或底物。

【1461】 24. 段落1至23中任一項的方法，其中將所述MASP-2抑制劑皮下、腹膜內、肌內、動脈內、靜脈內、經口或作為吸入劑施用。

【1462】 25. 段落1至24中任一項的方法，其中所述冠狀病毒是嚴重急性呼吸症候群冠狀病毒2(又被稱為SARS冠狀病毒2或SARS-CoV-2)。

【1463】 26. 段落1至24中任一項的方法，其中所述冠狀病毒是嚴重急性呼吸症候群冠狀病毒(SARS-CoV)。

【1464】 27. 段落1至24中任一項的方法，其中所述冠狀病毒是中東呼吸症候群冠狀病毒(MERS-CoV)。

【1465】 28. 段落1至27中任一項的方法，其中在所述MASP-2抑制劑施用之前，所述受試者被鑒定為具有冠狀病毒。

【1466】 29. 段落1至28中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段以有效改善呼吸功能的量施用。

【1467】 30. 段落1-29中任一項的方法，其中所述哺乳動物受試者是人受試者。

【1468】 II. 用於治療患有COVID-19誘導的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)或肺炎的人受試者的方法

【1469】 1. 一種用於治療患有COVID-19誘導的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)或肺炎的人受試者的方法，其包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。

【1470】 2. 段落1的方法，其中所述受試者在治療之前處於機械呼吸機上，並且所述MASP-2抑制劑以足以中止對於機械通氣的需要的劑量和時間段施用。

【1471】 3. 段落2的方法，其中所述受試者處於侵入性機械呼吸機上。

【1472】 4. 段落2的方法，其中所述受試者處於非侵入性機械呼吸機上。

【1473】 5. 段落1的方法，其中所述受試者在治療之前需要補充氧氣，並且所述MASP-2抑制劑以足以中止對於補充氧氣的使用的劑量和時間段施用。

【1474】 6. 段落1至5中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2抗體或其片段。

【1475】 7. 段落6的方法，其中所述MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。

【1476】 8. 段落6或7的方法，其中所述MASP-2抗體或其片段與包含SEQ ID NO:6的多肽特異性結合，其中親和力是其與補體系統中不同抗原結合的至少10倍。

【1477】 9. 段落6至8中任一項的方法，其中所述抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。

【1478】 10. 段落6至9中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體選擇性地抑制凝集素途徑補體活化，而基本上不抑制C1q依賴性補體活化。

【1479】 11. 段落6至10中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制10%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1480】 12. 段落6至10中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1481】 13. 段落6至12中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

【1482】 14. 段落6至13中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:69的輕鏈可變區。

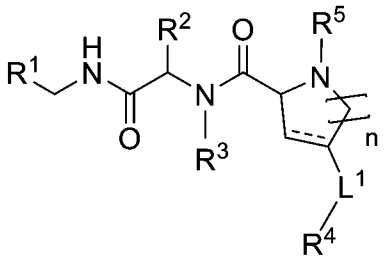
【1483】 15. 段落1至5中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【1484】 16. 段落15的方法，其中所述MASP-2抑制性化合物是合成或半合成的小分子。

【1485】 17. 段落1的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。

【1486】 18. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)或(VIIB)中任一個的化合物。

【1487】 19. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是具有下述結構的化合物：

【1488】 

【1489】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【1490】 ----代表雙鍵或單鍵；

【1491】 R^1為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【1492】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、羥烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【1493】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基，或者R^2和R^3連同它們各自與之連接的碳和氮一起形成任選取代的4-7元雜環基；

【1494】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【1495】 R^5為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_mC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$、$(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$或$C(=O)NR^6R^7$；

【1496】 在每次出現時，R^6和R^7獨立地為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基或芳基烷基；

【1497】 L^1為直接鍵、$-CR^{8a}R^{8b}-$、$-S(O)_t-$、NR^{8c}或-O-；

【1498】 R^{8a}和R^{8b}各自獨立地為氫、烷基，或者R^{8a}和R^{8b}連同它們與之連接的碳一起，形成任選取代的3-6元環烷基；

【1499】 R^{8c}為氫、烷基、鹵代烷基、(C=O)烷基、(C=O)O烷基、(C=O)環烷基、(C=O)O環烷基、(C=O)芳基、(C=O)O芳基、(C=O)雜芳基、(C=O)O雜芳基、(C=O)雜環基、(C=O)O雜環基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、取代或未取代的雜環基、取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的雜芳基烷基、取代或未取代的環烷基烷基、或者取代或未取代的雜環基烷基；

【1500】 n為1或2；

【1501】 m為1、2、3、4、5或6；和

【1502】 t為0、1或2。

【1503】 20. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是表4A、4B、4C、4D或4E的化合物。

【1504】 21. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是分子量為200 Da至2,000 Da、250 Da至2,000 Da、300 Da至2,000 Da、300 Da至1,000 Da、300 Da至600 Da、350 Da至2,000 Da、350 Da至1,500 Da、350 Da至1,200 Da、350 Da至1,000 Da、350 Da至900 Da、350 Da至800 Da、350 Da至700 Da、350 Da至600 Da的小分子。

【1505】 22. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有選自胍基和苄脒基的零至一個鹼性基團。

【1506】 23. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有小於約25 μM、小於約10 μM、小於約2.5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.1 μM的MASP-2抑制Ki值。

【1507】 24. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是其凝集素途徑抑制IC_{50}小於約50 μM、小於約5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.05 μM的凝集素途徑抑制劑。

【1508】 25. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是選擇性MASP-2抑制劑，相對於凝血酶抑制，其對於MASP-2抑制的選擇性為大於約2倍、大於約5倍、大於約10倍、大於約25倍、大於約50倍、或大於約100倍。

【1509】 26. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物對於MASP-2具有的親和力大於對於凝血酶的，其MASP-2:凝血酶的選擇性比為至少1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1或30:1。

【1510】 27. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是MASP-2的共價抑制劑。

【1511】 28. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是內源性MASP-2配體或底物。

【1512】 29. 段落1至28中任一項的方法，其中將所述MASP-2抑制劑皮下、腹膜內、肌內、動脈內、靜脈內、經口或作為吸入劑施用。

【1513】 III. 用於治療、抑制、減輕或預防由SARS-CoV-2感染的人受試者的血栓形成的方法

【1514】 1. 一種用於治療、預防由SARS-CoV-2感染的人受試者的凝血或血栓形成或者降低其嚴重性的方法，其包括將有效治療、預防所述受試者的凝血或血栓形成或者降低其嚴重性的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。

【1515】 2. 段落1的方法，其中所述受試者具有的D-二聚體水平高於治療前的標準範圍，並且所述MASP-2抑制劑以足以將所述受試者的D-二聚體水平降低到健康受試者的正常範圍內的量和時間施用。

【1516】 3. 段落1或2的方法，其中所述MASP-2抑制劑提供抗凝和/或抗血栓形成效應，而不影響止血。

【1517】 4. 段落1至3中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2抗體或其片段。

【1518】 5. 段落4的方法，其中所述MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。

【1519】 6. 段落4或5的方法，其中所述MASP-2抗體或其片段與包含SEQ ID NO:6的多肽特異性結合，其中親和力是其與補體系統中不同抗原結合的至少10倍。

【1520】 7. 段落4至6中任一項的方法，其中所述抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。

【1521】 8. 段落4至7中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體選擇性地抑制凝集素途徑補體活化，而基本上不抑制C1q依賴性補體活化。

【1522】 9. 段落4至8中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制10%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1523】 10. 段落4至9中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1524】 11. 段落4至10中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

【1525】 12. 段落4至11中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:69的輕鏈可變區。

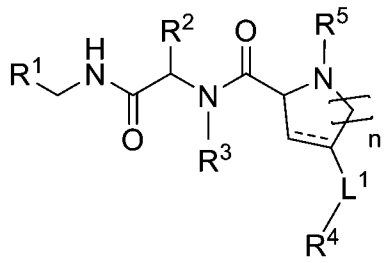
【1526】 13. 段落1至3中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【1527】 14. 段落13的方法，其中所述MASP-2抑制性化合物是合成或半合成的小分子。

【1528】 15. 段落1的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。

【1529】 16. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)或(VIIB)中任一個的化合物。

【1530】 17. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是具有下述結構的化合物：

【1531】 

【1532】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【1533】 ----代表雙鍵或單鍵；

【1534】 R^1為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【1535】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、羥烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【1536】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基，或者R^2和R^3連同它們各自與之連接的碳和氮一起形成任選取代的4-7元雜環基；

【1537】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【1538】 R^5為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_mC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$、$(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$或$C(=O)NR^6R^7$；

【1539】 在每次出現時，R^6和R^7獨立地為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基或芳基烷基；

【1540】 L^1為直接鍵、$-CR^{8a}R^{8b}-$、$-S(O)_t-$、NR^{8c}或-O-；

【1541】 R^{8a}和R^{8b}各自獨立地為氫、烷基，或者R^{8a}和R^{8b}連同它們與之連接的碳一起，形成任選取代的3-6元環烷基；

【1542】 R^{8c}為氫、烷基、鹵代烷基、(C=O)烷基、(C=O)O烷基、(C=O)環烷基、(C=O)O環烷基、(C=O)芳基、(C=O)O芳基、(C=O)雜芳基、(C=O)O雜芳基、(C=O)雜環基、(C=O)O雜環基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、取代或未取代的雜環基、取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的雜芳基烷基、取代或未取代的環烷基烷基、或者取代或未取代的雜環基烷基；

【1543】 n為1或2；

【1544】 m為1、2、3、4、5或6；和

【1545】 t為0、1或2。

【1546】 18. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是表4A、4B、4C、4D或4E的化合物。

【1547】 19. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是分子量為200 Da至2,000 Da、250 Da至2,000 Da、300 Da至2,000 Da、300 Da至1,000 Da、300 Da至600 Da、350 Da至2,000 Da、350 Da至1,500 Da、350 Da至1,200 Da、350 Da至1,000 Da、350 Da至900 Da、350 Da至800 Da、350 Da至700 Da、350 Da至600 Da的小分子。

【1548】 20. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有選自胍基和苄脒基的零至一個鹼性基團。

【1549】 21. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有小於約25 μM、小於約10 μM、小於約2.5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.1 μM的MASP-2抑制Ki值。

【1550】 22. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是其凝集素途徑抑制IC_{50}小於約50 μM、小於約5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.05 μM的凝集素途徑抑制劑。

【1551】 23. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是選擇性MASP-2抑制劑，相對於凝血酶抑制，其對於MASP-2抑制的選擇性為大於約2倍、大於約5倍、大於約10倍、大於約25倍、大於約50倍、或大於約100倍。

【1552】 24. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物對於MASP-2具有的親和力大於對於凝血酶的，其MASP-2:凝血酶的選擇性比為至少1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1或30:1。

【1553】 25. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是MASP-2的共價抑制劑。

【1554】 26. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是內源性MASP-2配體或底物。

【1555】 27. 段落1至26中任一項的方法，其中將所述MASP-2抑制劑皮下、腹膜內、肌內、動脈內、靜脈內、經口或作為吸入劑施用。

【1556】 IV. 一種用於治療、改善、預防已由SARS-CoV-2感染的人受試者的一種或多種COVID-19有關的長期後遺症或降低其發生的風險的方法

【1557】 1. 一種用於治療、改善、預防人受試者的一種或多種COVID-19有關的長期後遺症或降低其發生的風險的方法，所述人受試者目前由SARS-

CoV-2感染或已由SARS-CoV-2感染，所述方法包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。

【1558】 2. 段落1的方法，其中所述受試者患有COVID-19誘導的肺炎或ARDS，並且所述MASP-2抑制劑以有效改善呼吸功能的量施用。

【1559】 3. 段落1的方法，其中所述受試者患有COVID-19誘導的凝血或血栓形成，並且所述MASP-2抑制劑以有效治療、預防所述受試者的凝血或血栓形成或者降低其嚴重性的量施用於受試者。

【1560】 4. 段落1至3中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2抗體或其片段。

【1561】 5. 段落4的方法，其中所述MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。

【1562】 6. 段落4或5的方法，其中所述MASP-2抗體或其片段與包含SEQ ID NO:6的多肽特異性結合，其中親和力是其與補體系統中不同抗原結合的至少10倍。

【1563】 7. 段落4至6中任一項的方法，其中所述抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。

【1564】 8. 段落4至7中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體選擇性地抑制凝集素途徑補體活化，而基本上不抑制C1q依賴性補體活化。

【1565】 9. 段落4至8中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制10%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1566】 10. 段落4至9中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1567】 11. 段落4至10中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

【1568】 12. 段落4至11中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:69的輕鏈可變區。

【1569】 13. 段落1至3中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

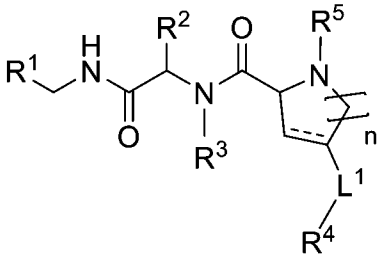
【1570】 14. 段落13的方法，其中所述MASP-2抑制性化合物是合成或半合成的小分子。

【1571】 15. 段落1的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。

【1572】 16. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)或(VIIB)中任一個的化合物。

【1573】 17. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是具有下述結構的化合物：

【1574】



【1575】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【1576】 ----代表雙鍵或單鍵；

【1577】 R^1為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【1578】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、羥烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【1579】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基，或者R^2和R^3連同它們各自與之連接的碳和氮一起形成任選取代的4-7元雜環基；

【1580】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【1581】 R^5為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_mC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$、$(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$或$C(=O)NR^6R^7$；

【1582】 在每次出現時，R^6和R^7獨立地為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基或芳基烷基；

【1583】 L^1為直接鍵、$-CR^{8a}R^{8b}-$、$-S(O)_t-$、NR^{8c}或-O-；

【1584】 R^{8a}和R^{8b}各自獨立地為氫、烷基，或者R^{8a}和R^{8b}連同它們與之連接的碳一起，形成任選取代的3-6元環烷基；

【1585】 R^{8c}為氫、烷基、鹵代烷基、(C=O)烷基、(C=O)O烷基、(C=O)環烷基、(C=O)O環烷基、(C=O)芳基、(C=O)O芳基、(C=O)雜芳基、(C=O)O雜芳基、(C=O)雜環基、(C=O)O雜環基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、取代或未取代的雜環基、取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的雜芳基烷基、取代或未取代的環烷基烷基、或者取代或未取代的雜環基烷基；

【1586】 n為1或2；

【1587】 m為1、2、3、4、5或6；和

【1588】 t為0、1或2。

【1589】 18. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是表4A、4B、4C、4D或4E的化合物。

【1590】 19. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是分子量為200 Da至2,000 Da、250 Da至2,000 Da、300 Da至2,000 Da、300 Da至1,000 Da、300 Da至600 Da、350 Da至2,000 Da、350 Da至1,500 Da、350 Da至1,200 Da、350 Da至1,000 Da、350 Da至900 Da、350 Da至800 Da、350 Da至700 Da、350 Da至600 Da的小分子。

【1591】 20. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有選自胍基和苄脒基的零至一個鹼性基團。

【1592】 21. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有小於約25 μM、小於約10 μM、小於約2.5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.1 μM的MASP-2抑制Ki值。

【1593】 22. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是其凝集素途徑抑制IC_{50}小於約50 μM、小於約5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.05 μM的凝集素途徑抑制劑。

【1594】 23. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是選擇性MASP-2抑制劑，相對於凝血酶抑制，其對於MASP-2抑制的選擇性為大於約2倍、大於約5倍、大於約10倍、大於約25倍、大於約50倍、或大於約100倍。

【1595】 24. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物對於MASP-2具有的親和力大於對於凝血酶的，其MASP-2:凝血酶的選擇性比為至少1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1或30:1。

【1596】 25. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是MASP-2的共價抑制劑。

【1597】 26. 段落13的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是內源性MASP-2配體或底物。

【1598】 27. 段落1至26中任一項的方法，其中將所述MASP-2抑制劑皮下、腹膜內、肌內、動脈內、靜脈內、經口或作為吸入劑施用。

【1599】 28. 段落1至27中任一段的方法，其中所述一種或多種COVID-19有關的長期後遺症選自心血管併發症(包括心肌損傷、心肌病、心肌炎、血管內凝血、中風、靜脈和動脈併發症以及肺栓塞)；神經系統併發症(包括認知困難、意識模糊、也稱為“腦霧”的記憶喪失、頭痛、中風、頭暈、暈厥、癲癇發作、食慾減退、失眠、嗅覺喪失、味覺喪失、肌陣攣、神經性疼痛、肌痛；神經系統疾病如阿爾茨海默氏病、格巴二氏症候群、米勒-費希爾症候群、帕金森氏病)的進展；腎臟損傷(例如急性腎臟損傷(AKI))、肺部併發症(包括肺纖維化、呼吸困難、肺栓塞)；炎性病況例如川崎病、川崎樣病、兒童的多系統炎症症候群、多系統器官衰竭、極度疲勞、肌無力、低燒、注意力不集中、記憶差錯、情緒變化、睡眠困難、手臂和腿部的針痛、腹瀉和嘔吐、味覺和嗅覺喪

失、喉嚨痛和吞咽困難、糖尿病和高血壓的新發作、皮疹、呼吸短促、胸痛和心悸。

【1600】 29. 根據請求項28的方法，其中所述受試者已從COVID-19誘導的肺炎或ARDS中恢復，並且所述MASP-2抑制劑以治療或改善一種或多種長期後遺症的量施用。

【1601】 30. 根據請求項28的方法，其中所述受試者已從COVID-19誘導的凝血或血栓形成中恢復，並且所述MASP-2抑制劑以治療或改善一種或多種長期後遺症的量施用。

【1602】 V. 用於治療、抑制、減輕或預防由流感病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群、肺炎或者流感病毒感染的一些其它肺部表現或其它表現形式的方法

【1603】 1. 一種用於治療、抑制、減輕或預防由流感病毒感染的哺乳動物受試者的急性呼吸窘迫症候群、肺炎或者流感病毒感染的一些其它肺部表現或其它表現的方法，其包括將有效抑制MASP-2依賴性補體活化的量的MASP-2抑制劑施用於受試者。

【1604】 2. 段落1的方法，其中所述流感病毒是甲型流感病毒、乙型流感病毒或丙型流感病毒。

【1605】 3. 段落2的方法，其中甲型流感病毒選自H1N1、H2N2、H3N2、H5N1、H7N7、H1N2、H9N2、H7N2、H7N3、H10N7、H7N9和H6N1。

【1606】 4. 段落1至3中任一項的方法，其中在所述MASP-2抑制劑施用之前，所述受試者被鑒定為具有流感病毒。

【1607】 5，段落1至4中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑以有效改善呼吸功能的量施用。

【1608】 6. 段落1至5中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2抗體或其片段。

【1609】 7. 段落6的方法，其中所述MASP-2抑制劑是與SEQ ID NO:6的一部分特異性結合的MASP-2單選殖抗體或其片段。

【1610】 8. 段落6或7的方法，其中所述MASP-2抗體或其片段與包含SEQ ID NO:6的多肽特異性結合，其中親和力是其與補體系統中不同抗原結合的至少10倍。

【1611】 9. 段落6至8中任一項的方法，其中所述抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。

【1612】 10. 段落6至9中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體選擇性地抑制凝集素途徑補體活化，而基本上不抑制C1q依賴性補體活化。

【1613】 11. 段落6至10中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制10%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1614】 12. 段落6至10中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體抑制90%人血清中的C3b沉積，其中IC_{50}為30 nM或更小。

【1615】 13. 段落6至12中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如SEQ ID NO:67所示的胺基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3，所述輕鏈可變區包含如SEQ ID NO:69所示的胺基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

【1616】 14. 段落6至13中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制性抗體或其抗原結合片段包括包含SEQ ID NO:67的重鏈可變區和包含SEQ ID NO:69的輕鏈可變區。

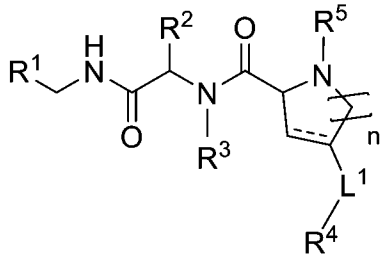
【1617】 15. 段落1至5中任一項的方法，其中所述MASP-2抑制劑是小分子MASP-2抑制性化合物。

【1618】 16. 段落15的方法，其中所述MASP-2抑制性化合物是合成或半合成的小分子。

【1619】 17. 段落1的方法，其中所述MASP-2抑制劑是MASP-2的表達抑制劑。

【1620】 18. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是式(IA)、(IB)、(IIA)、(IIB)、(III)、(IV)、(VA)、(VB)、(VIA)、(VB)、(VIIA)或(VIIB)中任一個的化合物。

【1621】 19. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是具有下述結構的化合物：

【1622】 

【1623】 或者其立體異構體、互變異構體或藥學上可接受的鹽，其中：

【1624】 ----代表雙鍵或單鍵；

【1625】 R^1為取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的雜芳基；

【1626】 R^2為氫、烷基、烷氧基、鹵代烷基、羥烷基、鹵代烷氧基或環烷基；

【1627】 R^3為氫、烷基、鹵代烷基或環烷基，或者R^2和R^3連同它們各自與之連接的碳和氮一起形成任選取代的4-7元雜環基；

【1628】 R^4為取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、或者取代或未取代的雜環基；

【1629】 R^5為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基、膦烷基、$(CH_2)_mC(=O)OR^6$、$C(=O)R^6$、$C(=O)OR^6$、$(CH_2)_mNR^6S(O)_2R^7$或$C(=O)NR^6R^7$；

【1630】 在每次出現時，R^6和R^7獨立地為氫、烷基、鹵代烷基、環烷基或芳基烷基；

【1631】 L^1為直接鍵、$-CR^{8a}R^{8b}-$、$-S(O)_t-$、NR^{8c}或-O-；

【1632】 R^{8a}和R^{8b}各自獨立地為氫、烷基，或者R^{8a}和R^{8b}連同它們與之連接的碳一起，形成任選取代的3-6元環烷基；

【1633】 R^{8c}為氫、烷基、鹵代烷基、(C=O)烷基、(C=O)O烷基、(C=O)環烷基、(C=O)O環烷基、(C=O)芳基、(C=O)O芳基、(C=O)雜芳基、(C=O)O雜芳基、(C=O)雜環基、(C=O)O雜環基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的雜芳基、取代或未取代的環烷基、取代或未取代的雜環基、取代或未取代的芳基烷基、取代或未取代的雜芳基烷基、取代或未取代的環烷基烷基、或者取代或未取代的雜環基烷基；

【1634】 n為1或2；

【1635】 m為1、2、3、4、5或6；和

【1636】 t為0、1或2。

【1637】 20. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是表4A、4B、4C、4D或4E的化合物。

【1638】 21. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是分子量為200 Da至2,000 Da、250 Da至2,000 Da、300 Da至2,000 Da、300 Da至1,000 Da、300 Da至600 Da、350 Da至2,000 Da、350 Da至1,500 Da、350 Da至1,200 Da、350 Da至1,000 Da、350 Da至900 Da、350 Da至800 Da、350 Da至700 Da、350 Da至600 Da的小分子。

【1639】 22. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有選自胍基和苄脒基的零至一個鹼性基團。

【1640】 23. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物具有小於約25 μM、小於約10 μM、小於約2.5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.1 μM的MASP-2抑制Ki值。

【1641】 24. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是其凝集素途徑抑制IC_{50}小於約50 μM、小於約5 μM、小於約1 μM、小於約0.5 μM、或小於約0.05 μM的凝集素途徑抑制劑。

【1642】 25. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物是選擇性MASP-2抑制劑，相對於凝血酶抑制，其對於MASP-2抑制的選擇性為大於約2倍、大於約5倍、大於約10倍、大於約25倍、大於約50倍、或大於約100倍。

【1643】 26. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物對於MASP-2具有的親和力大於對於凝血酶的，其MASP-2:凝血酶的選擇性比為至少1.1:1、1.25:1、1.5:1、1.75:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、

11:1、12:1、13:1、14:1、15:1、16:1、17:1、18:1、19:1、20:1、21:1、22:1、23:1、24:1、25:1或30:1。

【1644】 27. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是MASP-2的共價抑制劑。

【1645】 28. 段落15的方法，其中所述小分子MASP-2抑制性化合物不是內源性MASP-2配體或底物。

【1646】 29. 段落1至28中任一項的方法，其中將所述MASP-2抑制劑皮下、腹膜內、肌內、動脈內、靜脈內、經口或作為吸入劑施用。

【1647】 本說明書中提到的所有出版物、專利申請和專利都引入本文作為參考。

【1648】 本發明的所述方法和組合物的各種修改和變化對本領域技術人員將是顯而易見的，而不脫離本發明的範圍和精神。儘管已與具體的期望的實施方案結合描述了本發明，但應當理解，請求保護的本發明不應不適當地限於此類具體實施方案。

【1649】 儘管已示出且描述了說明性實施方案，但應當理解，可以在其中製備各種改變，而不脫離本發明的精神和範圍。

【符號說明】

無

序　列　表

<110> 美商奧默羅斯公司

<120> 用於治療和/或預防冠狀病毒誘導的急性呼吸窘迫症候群的抑制MASP-2的方法

<130> MP.1.0312.TW

<150> 62/986,566
<151> 2020-03-06

<150> 63/008,540
<151> 2020-04-10

<150> 63/015,299
<151> 2020-04-24

<150> 63/054,298
<151> 2020-07-21

<150> 63/062,843
<151> 2020-08-07

<150> 63/104,229
<151> 2020-10-22

<150> 63/105,637
<151> 2020-10-26

<150> 63/140,591
<151> 2021-01-22

<160> 85

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 725
<212> DNA
<213> 智人

<220>
<221> CDS
<222> (27)..(584)

<400> 1
ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt　53
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu

1 5

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

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

gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg        197
Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu
            45                  50                  55

cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag        245
Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu
        60                  65                  70

tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg        293
Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu
    75                  80                  85

tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act        341
Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr
90                  95                  100                 105

ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac        389
Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr
                110                 115                 120

tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag        437
Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu
            125                 130                 135

gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac        485
Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp
        140                 145                 150

cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca        533
His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala
    155                 160                 165

ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc ctc        581
Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
170                 175                 180                 185

tag cctcccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc             634

tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcacccacc      694
```

atggacccaa taataaacct ggccccaccc c 725

<210> 2
<211> 185
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
180 185

<210> 3
<211> 170
<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 2460
<212> DNA
<213> 智人

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

<400> 4

```
ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg          51
                       Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu
                       1               5                   10

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

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

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

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

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

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

tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc         387
Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser
```

```
            110                 115                 120

aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac        435
Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp
        125                 130                 135

att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac        483
Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His
    140                 145                 150

cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc        531
His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly
155                 160                 165                 170

tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc        579
Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly
                175                 180                 185

cag gtc ttc acc cag agg tct ggg gag ctc agc agc cct gaa tac cca        627
Gln Val Phe Thr Gln Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro
            190                 195                 200

cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag        675
Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu
        205                 210                 215

gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag        723
Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu
    220                 225                 230

aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca        771
Thr His Pro Glu Thr Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr
235                 240                 245                 250

gac aga gaa gaa cat ggc cca ttc tgt ggg aag aca ttg ccc cac agg        819
Asp Arg Glu Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg
                255                 260                 265

att gaa aca aaa agc aac acg gtg acc atc acc ttt gtc aca gat gaa        867
Ile Glu Thr Lys Ser Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu
            270                 275                 280

tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag        915
Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln
        285                 290                 295

cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg        963
Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val
    300                 305                 310
```

caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act 1011
Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr
315 320 325 330

ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca 1059
Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala
335 340 345

gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc 1107
Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser
350 355 360

att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag 1155
Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu
365 370 375

tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac 1203
Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr
380 385 390

agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat 1251
Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr
395 400 405 410

gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca 1299
Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser
415 420 425

ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga 1347
Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly
430 435 440

ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg 1395
Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp
445 450 455

caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat 1443
Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr
460 465 470

gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat 1491
Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His
475 480 485 490

gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca 1539
Asp Ala Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser
495 500 505

cct cat tat aca caa gcc tgg tct gaa gct gtt ttt ata cat gaa ggt 1587
Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly

```
            510                 515                 520

tat act cat gat gct ggc ttt gac aat gac ata gca ctg att aaa ttg      1635
Tyr Thr His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu
        525                 530                 535

aat aac aaa gtt gta atc aat agc aac atc acg cct att tgt ctg cca      1683
Asn Asn Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro
    540                 545                 550

aga aaa gaa gct gaa tcc ttt atg agg aca gat gac att gga act gca      1731
Arg Lys Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala
555                 560                 565                 570

tct gga tgg gga tta acc caa agg ggt ttt ctt gct aga aat cta atg      1779
Ser Gly Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met
                575                 580                 585

tat gtc gac ata ccg att gtt gac cat caa aaa tgt act gct gca tat      1827
Tyr Val Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr
            590                 595                 600

gaa aag cca ccc tat cca agg gga agt gta act gct aac atg ctt tgt      1875
Glu Lys Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys
        605                 610                 615

gct ggc tta gaa agt ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga      1923
Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly
    620                 625                 630

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

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

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

att agt gat ttt taa cttgcgtgtc tgcagtcaag gattcttcat ttttagaaat      2122
Ile Ser Asp Phe
        685

gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg    2182

gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact    2242
```

tgccagttta attccagcct tacccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca 2302

gtcatctttg cccacccagt gtaatgtcac tgctcaaatt acatttcatt accttaaaaa 2362

gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg 2422

tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaaa aaaaaaaa 2460

<210> 5
<211> 686
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly
245 250 255

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

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

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro Met
290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu
305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln
325 330 335

Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro
355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly
370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
385 390 395 400

Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly
405 410 415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 671
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

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

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

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly

420 425 430

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 4900
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7
cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc 60

ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga 120

ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg 180

gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggt gggagcacag gcctgggcct caccgccccct 240

gccctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccacccccct 300

taggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atcccccggc tttccagggg 360

agtatgccaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc acccccccggc taccgcctgc 420

gcctctactt cacccacttc gacctggagc tctcccacct ctgcgagtac gacttcgtca 480

aggtgccgtc agacgggagg gctggggttt ctcagggtcg gggggtcccc aaggagtagc 540

cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg 600

ggtcttgcct tcactccctg tgacacctga ccccacagct gagctcgggg gccaaggtgc 660

tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccctggc aaggacactt 720

tctactcgct gggctccagc ctggacatta ccttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780

cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgagggtga gccaagaggg gtcctgcaac 840

atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900

tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggcctgacat catccacaat 960

gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag 1020

ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgac gcagggactg gccgggcgcg gcagctcacg 1080

cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt 1140

caaggccagc cagggcaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200

gggcgtggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactaggga ggctgaggca ggagaattgc 1260

ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtgaa cagagattgc accactacac tccacctggg 1320

cgacagacta gactccgtct caaaaaacaa aaaacaaaaa ccacgcaggg ccgagggccc 1380

atttacaagc tgacaaagtg ggccctgcca gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440

gatcccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500

tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc tgtagccccg ccccctgggt ttgattgact 1560

cccctcatta gctgggtgac ctcggccgga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620

gatgtttgca tctttctccc agcgctgctg ggagcttgca gcgaccctag gcctgtaagg 1680

tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctcctc tgaggtccac 1740

tctgaggtca tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga 1800

cggcctgcct ggccctgcct ctcccccaga cattgacgag tgccaggtgg ccccgggaga 1860

ggcgcccacc tgcgaccacc actgccacaa ccacctgggc ggtttctact gctcctgccg 1920

cgcaggctac gtcctgcacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgagggag gctgcctggg 1980

ccccaacgca ccctctcctg ggatacccgg ggctcctcag ggccattgct gctctgccca 2040

ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc 2100

cccttctcag ccctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtgccac cctgccctag 2160

cactgagact aattctaaca tcccactgtg tacctggttc cacctgggct ctgggaaccc 2220

ctcatgtagc cacgggagag tcggggtatc taccctcgtt ccttggactg ggttcctgtt 2280

ccctgcactg ggggacgggc cagtgctctg gggcgtgggc agccccaccc tgtggcgctg 2340

accctgctcc cccgactcgg tttctcctct cggggtctct ccttgcctct ctgatctctc 2400

ttccagagca gagcctctag cctcccctgg agctccggct gcccagcagg tcagaagcca 2460

gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactcccatt 2520

cacccaccat ggacccaata ataaacctgg ccccacccca cctgctgccg cgtgtctctg 2580

gggtgggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctct gcctaccctc ctcacagcct 2640

catgaacccc aggtctgtgg gagcctcctc catggggcca cacggtcctt ggcctcaccc 2700

cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgctc gagtccaggt 2760

ccccagaggc tgagcccaga gtaatcttga accacccccа ttcagggtct ggcctggagg 2820

agcctgaccc acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtccccc 2880

gcaaatccag gggtgattcc cactgcccca taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca 2940

atgttggggc tcctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgcccccca ctgcagctgg 3000

gggtggggtg gtggtatggg atggggacca agccttcctt gaaggataga gcccagccca 3060

acaccccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc 3120

agtcatgatc actgttgcct tgaacttcca agaacagccc cagggcaagg gtcaaaacag 3180

gggaaagggg gtgatgagag atccttcttc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg 3240

ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg 3300

tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggctcgagg agatgctcct 3360

ctcttttccc gaattcccag ggacccagga gagtgtccct tcttcctctt cctgtgtgtc 3420

catccacccc cgccccccgc cctggcagag ctggtggaac tcagtgctct agcccctacc 3480

ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgctccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540

tgtgcgctcc atcccgagtg ctgcctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc 3600

ctctctaagc ggcccctcag ccatcgggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggcctcaggg 3660

gctggccacc tgcagggccc agcccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg 3720

tcccagtttc ctgctcccca aggcatccac cctgctgttg gtgcgagggc tgatagaggg 3780

cacgccaagt cactcccctg cccttccctc cttccagccc tgtgctccgg ccaggtcttc 3840

acccagaggt ctggggagct cagcagccct gaatacccac ggccgtatcc caaactctcc 3900

agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag 3960

tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg 4020

ctcctgggcc cctcatcttg tcccagatcc tccccccttca gcccagctgc acccccctact 4080

tcctgcagca tggcccccac cacgttcccg tcaccctcgg tgaccccacc tcttcaggtg 4140

ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200

caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg 4260

gttacttccc tccgcccagg ccagacccag gcagctgctc cccagctttc atgagcttct 4320

ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggcccattc tgtgggaaga cattgcccca 4380

caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga 4440

ccacacaggc tggaagatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg 4500

tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgta gggctcttct 4560

gggcaggact aggaagggac accaggttta gtggtgctga ggtctgaggc agcagcttct 4620

aaggggaagc acccgtgccc tcctcagcag cacccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680

ccacccattc acccatcact catcttttac ccacccaccc tttgccactc atccttctgt 4740

ccctcatcct tccaaccatt catcaatcac ccacccatcc atcctttgcc acacaaccat 4800

ccacccattc ttctacctac ccatcctatc catccatcct tctatcagca tccttctacc 4860

acccatcctt cgttcggtca tccatcatca tccatccatc 4900

<210> 8
<211> 136
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

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

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
130 135

<210> 9
<211> 181
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser
180

<210> 10
<211> 293
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly

245 250 255

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

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

Trp Lys Ile His Tyr
290

<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

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

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

Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys
35 40

<210> 12
<211> 242
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

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

Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn
20 25 30

Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val
210 215 220

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

Asp Phe

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 13

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

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 14

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

<210> 15
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 15

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

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

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

<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 16

Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn
1 5

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 17

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

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe
20 25

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 18

Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly
1 5

<210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 19

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

Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val
20 25

<210> 20
<211> 960
<212> DNA
<213> 智人

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

<400> 20
attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56
Met Ser
1

ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct 104
Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser
5 10 15

tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca 152
Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala
20 25 30

gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat 200
Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp
35 40 45 50

ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc 248
Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu
55 60 65

```
aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca        296
Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro
            70                  75                  80

ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga        344
Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly
        85                  90                  95

aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct        392
Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala
    100                 105                 110

ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctc acc ttc tct ctg        440
Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu
115                 120                 125                 130

ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg        488
Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met
                135                 140                 145

acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg        536
Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val
            150                 155                 160

gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc        584
Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile
        165                 170                 175

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

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

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

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

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

ttttactgca acccacaggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc      887
```

atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca 947

aagcaataat agt 960

<210> 21
<211> 248
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile
245

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置1處的X代表羥脯氨酸

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中在位置4處的X代表疏水性殘基

<400> 22

Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 其中X代表羥脯氨酸

<400> 23

Xaa Gly Lys Leu Gly
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(15)
<223> 其中在位置9和15處的X代表羥脯氨酸

<400> 24

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

<210> 25
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(27)
<223> 其中在位置3、6、15、21、24、27處的X代表羥脯氨酸

<400> 25

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

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

<210> 26
<211> 53
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(26)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (32)..(32)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (35)..(35)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (41)..(41)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (50)..(50)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 26

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

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

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

Asp Xaa Gly Lys Ser
50

<210> 27
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(33)
<223> 其中在位置3、6、12、18、21、30、33處的X代表羥脯氨酸

<400> 27

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

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

Xaa

<210> 28
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(45)
<223> 其中在位置3、6、9、27、30、36、42、45處的X代表羥脯氨酸

<400> 28

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

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

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

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 29

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

Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile
20

<210> 30
<211> 559
<212> DNA
<213> 智人

<400> 30
atgaggctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggcccg 60

aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120

aatgaccagg agcggcgctg gaccctgact gcacccccg gctaccgcct gcgcctctac 180

ttcacccact tcgacctgga gctctcccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240

tcgggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc 300

cctggcaagg acactttcta ctcgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac 360

tactccaacg agaagccgtt cacggggttc gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420

gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg 480

ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540

tcagccctgt gctccggcc 559

<210> 31
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 31
cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc 34

<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 32
gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag 33

<210> 33
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 33
agcagccctg aatacccacg gccgtatccc aaa 33

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 34
cgggatccat gaggctgctg accctc 26

<210> 35
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 35
ggaattccta ggctgcata 19

<210> 36
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 36
ggaattccta cagggcgct 19

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 37
ggaattccta gtagtggat 19

<210> 38
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 38
tgcggccgct gtaggtgctg tcttt 25

<210> 39
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 39
ggaattcact cgttattctc gga 23

<210> 40
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 40
tccgagaata acgagtg 17

<210> 41
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 41
cattgaaagc tttggggtag aagttgttc 29

<210> 42
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 42
cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga 27

<210> 43
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 43
cggtaagctt cactggctca gggaaata 28

<210> 44
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 44
aagaagcttg ccgccaccat ggattggctg tggaact 37

<210> 45
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 45
cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 46
<211> 36

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 46
aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

<210> 47
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 47
cgggatcctt ctccctctaa cactct 26

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 48

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
1 5

<210> 49
<211> 4960
<212> DNA
<213> 智人

<400> 49
ccggacgtgg tggcgcatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt 60

gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag 120

gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacaggga 180

gacccccatc tctacaaaaa acaaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac 240

aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga 300

agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt 360

ttttttttttt tttgaggtgg agtctcactc tgtcgtccag gctggagtgc agtggtgcga 420

tctcggatca ctgcaacctc cgcctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc 480

gagtagctgg gattataagt gcgcgctgcc acacctggat gatttttgta tttttagtag 540

agatgggatt tcaccatgtt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccaccc 600

accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg 660

acttctaagc ctgcaaggga atcgggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta 720

agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg 780

gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttcaa gaccagcctg accaacatgg 840

agaaacccca tccctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa 900

tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc 960

agtgagctat gattgcagca ctgcactgaa gccgggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa 1020

agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gtttccaggc tgttgttacc taggtccgac 1080

tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcatg 1140

gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tcactggaca 1200

aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc 1260

acaccatgag gtaggtgggc gcccacagcc tccctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg 1320

cctgggccct caccgccccct gccctgccca taggctgctg accctcctgg gccttctgtg 1380

tggctcggtg gccacccccct tgggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc 1440

atccccccggc tttccagggg agtatgccaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc 1500

acccccccggc taccgcctgc gcctctactt cacccacttc gacctggagc tctcccacct 1560

ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctggggtt tctcagggtc 1620

gggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680

ccaggaggga gatcaggcct gggtcttgcc ttcactccct gtgacacctg accccacagc 1740

tgagctcggg ggccaaggtg ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc 1800

gggcccctgg caaggacact ttctactcgc tgggctccag cctggacatt accttccgct 1860

ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggtg 1920

agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980

ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccacctttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040

tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc 2100

tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160

ggccgggcgc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga 2220

tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280

aaaactacaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag 2340

gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca 2400

ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa 2460

acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag 2520

cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct 2580

ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc 2640

cccgcccccc gggtttgatt gactcccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg 2700

aaactcccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatcttt ctcccagcgc tgctgggagc 2760

ttgcagcgac cctaggcctg taaggtgatt ggccccggcac cagtcccgca ccctagacag 2820

gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcatggatc tcctgggagg agtccaggct 2880

ggatcccgcc tctttccctc ctgacggcct gcctggcccc gcctctcccc cagacattga 2940

cgagtgccag gtggcccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct 3000

gggcggtttc tactgctcct gccgcgcagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060

ctcagccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120

atacccacgg ccgtatccca aactctccag ttgcacttac agcatcagcc tggaggaggg 3180

gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaaccct 3240

gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg 3300

gaagacattg ccccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg gtgaccatca cctttgtcac 3360

agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg 3420

cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct 3480

gaaagacagc ttctccatct tttgcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540

cctgaaatcc tttactgcag tttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc 3600

gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc agtggccgag tggagtacat 3660

cacaggtcct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt 3720

ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780

ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctgtt tgtggactat cagcccgcac 3840

aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaaacct ggtgattttc cttggcaagt 3900

cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac 3960

agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc gccctggaca ttcgaatggg 4020

caccctgaaa agactatcac ctcattatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca 4080

tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gcactgatta aattgaataa 4140

caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc 4200

ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaaccc aaaggggttt 4260

tcttgctaga aatctaatgt atgtcgacat accgattgtt gaccatcaaa aatgtactgc 4320

tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgtaact gctaacatgc tttgtgctgg 4380

cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tggtgtttct 4440

agatagtgaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctggggtt ccatgaattg 4500

tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga 4560

gaacataatt agtgattttt aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc atttttagaa 4620

atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca 4680

tggcagttgt tgctccaccc aaaaaaacag actccaggtg aggctgctgt catttctcca 4740

cttgccagtt taattccagc cttacccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga 4800

cagtcatctt tgcccaccca gtgtaatgtc actgctcaaa ttacatttca ttaccttaaa 4860

aagccagtct cttttcatac tggctgttgg catttctgta aactgcctgt ccatgctctt 4920

tgtttttaaa cttgttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 4960

<210> 50
<211> 2090
<212> DNA
<213> 鼠

<220>
<221> CDS
<222> (33)..(2090)

<400> 50

```
ggcgctggac tgcagagcta tggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg        53
                                    Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu
                                    1               5

ggt ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct       101
Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro
        10                  15                  20

gaa cct gta ttc ggg cgc ctg gtg tcc cct ggc ttc cca gag aag tat       149
Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr
    25                  30                  35

gct gac cat caa gat cga tcc tgg aca ctg act gca ccc cct ggc tac       197
Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr
40                  45                  50                  55

cgc ctg cgc ctc tac ttc acc cac ttt gac ctg gaa ctc tct tac cgc       245
Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg
                60                  65                  70

tgc gag tat gac ttt gtc aag ttg agc tca ggg acc aag gtg ctg gcc       293
Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala
            75                  80                  85

aca ctg tgt ggg cag gag agt aca gac act gag cag gca cct ggc aat       341
Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn
        90                  95                  100

gac acc ttc tac tca ctg ggt ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc       389
Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser
```

```
    105                 110                 115

gac tac tcc aat gag aag ccg ttc aca ggg ttt gag gcc ttc tat gca        437
Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala
120                 125                 130                 135

gcg gag gat gtg gat gaa tgc aga gtg tct ctg gga gac tca gtc cct        485
Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro
                140                 145                 150

tgt gac cat tat tgc cac aac tac ttg ggc ggc tac tat tgc tcc tgc        533
Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys
            155                 160                 165

aga gcg ggc tac att ctc cac cag aac aag cac acg tgc tca gcc ctt        581
Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu
        170                 175                 180

tgt tca ggc cag gtg ttc aca gga aga tct ggg tat ctc agt agc cct        629
Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro
    185                 190                 195

gag tac ccg cag cca tac ccc aag ctc tcc agc tgc acc tac agc atc        677
Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile
200                 205                 210                 215

cgc ctg gag gac ggc ttc agt gtc atc ctg gac ttc gtg gag tcc ttc        725
Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe
                220                 225                 230

gat gtg gag acg cac cct gaa gcc cag tgc ccc tat gac tcc ctc aag        773
Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys
            235                 240                 245

att caa aca gac aag ggg gaa cac ggc cca ttt tgt ggg aag acg ctg        821
Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu
        250                 255                 260

cct ccc agg att gaa act gac agc cac aag gtg acc atc acc ttt gcc        869
Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala
    265                 270                 275

act gac gag tcg ggg aac cac aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc        917
Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser
280                 285                 290                 295

aca gca cgg ccc tgc cct gat cca acg gcg cca cct aat ggc agc att        965
Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile
                300                 305                 310
```

```
tca cct gtg caa gcc acg tat gtc ctg aag gac agg ttt tct gtc ttc      1013
Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe
            315                 320                 325

tgc aag aca ggc ttc gag ctt ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aaa tca      1061
Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser
        330                 335                 340

ttc act gct gtc tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg ccg atg cca      1109
Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro
    345                 350                 355

gag tgc agc att att gat tgt ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc      1157
Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly
360                 365                 370                 375

cat gtg gac tat atc aca ggc cct caa gtg act acc tac aaa gct gtg      1205
His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val
                380                 385                 390

att cag tac agc tgt gaa gag act ttc tac aca atg agc agc aat ggt      1253
Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly
            395                 400                 405

aaa tat gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa      1301
Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu
        410                 415                 420

aaa ctc ccc ccg gtt tgt gag cct gtt tgt ggg ctg tcc aca cac act      1349
Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr
    425                 430                 435

ata gga gga cgc ata gtt gga ggg cag cct gca aag cct ggt gac ttt      1397
Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe
440                 445                 450                 455

cct tgg caa gtc ttg ttg ctg ggt caa act aca gca gca gca ggt gca      1445
Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala
                460                 465                 470

ctt ata cat gac aat tgg gtc cta aca gcc gct cat gct gta tat gag      1493
Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu
            475                 480                 485

aaa aga atg gca gcg tcc tcc ctg aac atc cga atg ggc atc ctc aaa      1541
Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys
        490                 495                 500

agg ctc tca cct cat tac act caa gcc tgg ccc gag gaa atc ttt ata      1589
Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile
```

```
    505                 510                 515

cat gaa ggc tac act cac ggt gct ggt ttt gac aat gat ata gca ttg       1637
His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu
520                 525                 530                 535

att aaa ctc aag aac aaa gtc aca atc aac gga agc atc atg cct gtt       1685
Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val
                540                 545                 550

tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act       1733
Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr
            555                 560                 565

gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga       1781
Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg
        570                 575                 580

aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc       1829
Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr
    585                 590                 595

acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg       1877
Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met
600                 605                 610                 615

ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac       1925
Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp
                620                 625                 630

agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt       1973
Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe
            635                 640                 645

gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc       2021
Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly
        650                 655                 660

cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag       2069
Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu
    665                 670                 675

aac ata ata agt aat ttc taa                                          2090
Asn Ile Ile Ser Asn Phe
680                 685
```

<210> 51
<211> 685
<212> PRT

<213> 鼠

<400> 51

```
Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr
1               5                  10                  15

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

Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
        35                  40                  45

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

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

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

Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser
            100                 105                 110

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
        115                 120                 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val
    130                 135                 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu
145                 150                 155                 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn
                165                 170                 175

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

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

Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly
245 250 255

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

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

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr
290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu
305 310 315 320

Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln
325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro
355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln
370 375 380

```
Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
385                 390                 395                 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe
                405                 410                 415

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

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln
        435                 440                 445

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

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

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn
                485                 490                 495

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

Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly
        515                 520                 525

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

Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser
545                 550                 555                 560

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

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

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

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

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

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

Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile
660 665 670

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

<210> 52
<211> 670
<212> PRT
<213> 鼠

<400> 52

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

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

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

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

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

65 70 75 80

Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
85 90 95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
115 120 125

Val Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
130 135 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln
145 150 155 160

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

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

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

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

Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His
225 230 235 240

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

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

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

Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val
290 295 300

Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu
305 310 315 320

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

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

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro
355 360 365

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

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

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

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly
420 425 430

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

Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu
450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu

465 470 475 480

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

Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala
500 505 510

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

Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala
530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 53
<211> 2091
<212> DNA
<213> 大鼠

<220>
<221> CDS
<222> (10)..(2067)

<400> 53

```
tggcacaca atg agg cta ctg atc gtc ctg ggt ctg ctt tgg agt ttg gtg       51
          Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val
          1               5                   10

gcc aca ctt ttg ggc tcc aag tgg cct gag cct gta ttc ggg cgc ctg        99
Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
15                  20                  25                  30

gtg tcc ctg gcc ttc cca gag aag tat ggc aac cat cag gat cga tcc       147
Val Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser
                35                  40                  45

tgg acg ctg act gca ccc cct ggc ttc cgc ctg cgc ctc tac ttc acc       195
Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr
            50                  55                  60

cac ttc aac ctg gaa ctc tct tac cgc tgc gag tat gac ttt gtc aag       243
His Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys
        65                  70                  75

ttg acc tca ggg acc aag gtg cta gcc acg ctg tgt ggg cag gag agt       291
Leu Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser
    80                  85                  90

aca gat act gag cgg gca cct ggc aat gac acc ttc tac tca ctg ggt       339
Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly
95                  100                 105                 110

ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc gac tac tcc aat gag aag cca       387
Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro
                115                 120                 125

ttc aca gga ttt gag gcc ttc tat gca gcg gag gat gtg gat gaa tgc       435
Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys
            130                 135                 140

aga aca tcc ctg gga gac tca gtc cct tgt gac cat tat tgc cac aac       483
Arg Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn
```

```
        145                 150                 155

tac ctg ggc ggc tac tac tgc tcc tgc cga gtg ggc tac att ctg cac        531
Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His
    160                 165                 170

cag aac aag cat acc tgc tca gcc ctt tgt tca ggc cag gtg ttc act        579
Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr
175                 180                 185                 190

ggg agg tct ggc ttt ctc agt agc cct gag tac cca cag cca tac ccc        627
Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro
                195                 200                 205

aaa ctc tcc agc tgc gcc tac aac atc cgc ctg gag gaa ggc ttc agt        675
Lys Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser
            210                 215                 220

atc acc ctg gac ttc gtg gag tcc ttt gat gtg gag atg cac cct gaa        723
Ile Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu
        225                 230                 235

gcc cag tgc ccc tac gac tcc ctc aag att caa aca gac aag agg gaa        771
Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu
    240                 245                 250

tac ggc ccg ttt tgt ggg aag acg ctg ccc ccc agg att gaa act gac        819
Tyr Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp
255                 260                 265                 270

agc aac aag gtg acc att acc ttt acc acc gac gag tca ggg aac cac        867
Ser Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His
                275                 280                 285

aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc aca gca cag ccc tgc cct gat        915
Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp
            290                 295                 300

cca acg gcg cca cct aat ggt cac att tca cct gtg caa gcc acg tat        963
Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr
        305                 310                 315

gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt       1011
Val Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu
    320                 325                 330

ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aag tca ttc act gct gtc tgt cag aaa       1059
Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys
335                 340                 345                 350
```

```
gat gga tct tgg gac cgg ccg ata cca gag tgc agc att att gac tgt      1107
Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys
                355                 360                 365

ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc cac gtg gac tat atc aca ggc      1155
Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly
            370                 375                 380

cct gaa gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac agc tgt gaa gag      1203
Pro Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu
        385                 390                 395

act ttc tac aca atg agc agc aat ggt aaa tat gtg tgt gag gct gat      1251
Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp
    400                 405                 410

gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tcc ctc ccg gtt tgc aag      1299
Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys
415                 420                 425                 430

cct gtc tgt gga ctg tcc aca cac act tca gga ggc cgt ata att gga      1347
Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly
                435                 440                 445

gga cag cct gca aag cct ggt gac ttt cct tgg caa gtc ttg tta ctg      1395
Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu
            450                 455                 460

ggt gaa act aca gca gca ggt gct ctt ata cat gac gac tgg gtc cta      1443
Gly Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu
        465                 470                 475

aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg      1491
Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu
    480                 485                 490

gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa      1539
Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln
495                 500                 505                 510

gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct      1587
Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala
                515                 520                 525

ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca      1635
Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr
            530                 535                 540

atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca      1683
Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala
```

```
        545                 550                 555

tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta      1731
Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu
    560                 565                 570

acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca      1779
Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro
575                 580                 585                 590

att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac      1827
Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr
                595                 600                 605

cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc      1875
Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg
            610                 615                 620

ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt      1923
Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
        625                 630                 635

cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg      1971
Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
    640                 645                 650

ggt tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa      2019
Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
655                 660                 665                 670

gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa      2067
Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
                675                 680                 685

tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa                                          2091


<210>  54
<211>  685
<212>  PRT
<213>  大鼠

<400>  54

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


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

Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
35 40 45

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

Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr
65 70 75 80

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

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

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr
130 135 140

Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu
145 150 155 160

Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn
165 170 175

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

Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu
195 200 205

Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr
210 215 220

Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln
225 230 235 240

Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly
245 250 255

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

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

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr
290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu
305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln
325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro
355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu
370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe
405 410 415

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

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln
435 440 445

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

Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala
465 470 475 480

Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile
485 490 495

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

Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe
515 520 525

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

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

Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln
565 570 575

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

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

Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly
610 615 620

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

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

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

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

<210> 55
<211> 670
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 55

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
115 120 125

Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
130 135 140

Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln
145 150 155 160

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

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

Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile
195 200 205

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

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

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

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

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

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

Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu

305 310 315 320

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

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly
340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro
355 360 365

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

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

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

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly
420 425 430

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

Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr
450 455 460

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

Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala
485 490 495

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

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

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

Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
545 550 555 560

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

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

Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly
595 600 605

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

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

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

Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
660 665 670

<210> 56
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 56

atgaggctgc tgaccctcct gggccttc 28

<210> 57
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 57
gtgcccctcc tgcgtcacct ctg 23

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 58
cagaggtgac gcaggagggg cac 23

<210> 59
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 59
ttaaaatcac taattatgtt ctcgatc 27

<210> 60
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠

<400> 60
atgaggctac tcatcttcct gg 22

<210> 61
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠

<400> 61
ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23

<210> 62
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠

<400> 62
ccccccctgc gtcacctctg cag 23

<210> 63
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 鼠

<400> 63
ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29

<210> 64
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠

<400> 64
gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt 29

<210> 65

<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 大鼠

<400> 65
ctagaaacac taatgcccct cctgcgtcac ctctgca 37

<210> 66
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 66
caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg 60

acctgcaccg tctctgggtt ctcactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt 120

cagcccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgagtga cgaaaaatcc 180

tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctccaa aaaccaggtg 240

gtccttacaa tgaccaacat ggaccctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300

cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 67
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 67

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly
20 25 30

Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 69

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 70
<211> 324
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 70
tcctatgagc tgatacagcc accctcggtg tcagtggccc caggacagac ggccaccatt 60

acctgtgcgg gagacaacct tgggaagaaa cgtgtgcact ggtaccagca gaggccaggc 120

caggcccctg tgttggtcat ctatgatgat agcgaccggc cctcagggat ccctgaccga 180

ttctctgcct ccaactctgg gaacacggcc accctgacca tcactagggg cgaagccggg 240

gatgaggccg actattattg tcaggtgtgg gacattgcta ctgatcatgt ggtcttcggc 300

ggagggacca agctcaccgt ccta 324

<210> 71
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 71

Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Arg Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Gly Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ile Ala Thr Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly
100 105 110

Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
115 120

<210> 72
<211> 36
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 72

Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn
1 5 10 15

Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu
20 25 30

Trp Cys Asn Gln
35

<210> 73
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 73

Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn Thr Cys Arg
1 5 10 15

Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu Trp Cys Asn
20 25 30

Gln

<210> 74
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 74

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

Trp Cys Asn Gln
20

<210> 75
<211> 491
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 75

Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn
1 5 10 15

Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu
20 25 30

Trp Cys Asn Gln Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gln Val

35 40 45

Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu Thr Leu
50 55 60

Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly Lys Met
65 70 75 80

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
85 90 95

Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser Leu Lys
100 105 110

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu
115 120 125

Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
130 135 140

Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
165 170 175

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
180 185 190

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
195 200 205

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
210 215 220

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
225 230 235 240

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
245 250 255

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
260 265 270

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
275 280 285

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
290 295 300

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
305 310 315 320

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
325 330 335

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
340 345 350

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
355 360 365

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
370 375 380

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
385 390 395 400

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
405 410 415

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
420 425 430

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe

435 440 445

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
450 455 460

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
465 470 475 480

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
485 490

<210> 76
<211> 491
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 76

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Val Leu Val Lys Pro Thr Glu
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Gly
20 25 30

Lys Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Phe Ser Ser Asp Glu Lys Ser Tyr Arg Thr Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Ala Ala Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp
450 455 460

Lys Cys Asn Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys
465 470 475 480

Thr Lys Leu Trp Cys Asn Gln Gly Ser Gly Ala
485 490

<210> 77

<211> 258
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 77

Leu Glu Val Thr Cys Glu Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn
1 5 10 15

Thr Cys Arg Cys Gly Ser Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu
20 25 30

Trp Cys Asn Gln Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gln Pro
35 40 45

Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln Thr Ala
50 55 60

Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala Tyr Trp
65 70 75 80

Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr Gln Asp
85 90 95

Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser
100 105 110

Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met Asp Glu
115 120 125

Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val Phe Gly
130 135 140

Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser
145 150 155 160

Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala

165 170 175

Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val
180 185 190

Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr
195 200 205

Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu
210 215 220

Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln
225 230 235 240

Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu
245 250 255

Cys Ser

<210> 78
<211> 258
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 78

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195 200 205

Thr Glu Cys Ser Ala Ala Gly Gly Ser Gly Leu Glu Val Thr Cys Glu
210 215 220

Pro Gly Thr Thr Phe Lys Asp Lys Cys Asn Thr Cys Arg Cys Gly Ser
225 230 235 240

Asp Gly Lys Ser Ala Val Cys Thr Lys Leu Trp Cys Asn Gln Gly Ser
245 250 255

Gly Ala

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 79

Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser
1 5 10

<210> 80
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 80

Ala Ala Gly Gly Ser Gly
1 5

<210> 81
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 81

Gly Ser Gly Ala
1

<210> 82
<211> 1533
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 82
atgatgtcct ttgtctctct gctcctggtt ggcatcctat tccatgccac ccaggccttg 60

gaagtgacgt gtgagcccgg aacgacattc aaagacaagt gcaatacttg tcggtgcggt 120

tcagatggga aatcggcggt ctgcacaaag ctctggtgta accagggcac cggtggaggg 180

tcgggatcca gctcacaggt caccttgaag gagtctggtc ctgtgctggt gaaacccaca 240

gagaccctca cgctgacctg caccgtctct gggttctcac tcagcagggg taaaatgggt 300

gtgagctgga tccgtcagcc cccagggaag gccctggagt ggcttgcaca catttttcg 360

agtgacgaaa aatcctacag gacatcgctg aagagcaggc tcaccatctc caaggacacc 420

tccaaaaacc aggtggtcct tacaatgacc aacatggacc ctgtggacac agccacgtat 480

tactgtgcac ggatacgacg tggaggaatt gactactggg gccagggaac cctggtcact 540

gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcc gtcttccccc tggcgccctg ctccaggagc 600

acctccgaga gcacagccgc cctgggctgc ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg 660

acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta 720

cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc 780

acgaagacct acacctgcaa cgtagatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga 840

gttgagtcca aatatggtcc cccatgccca ccatgcccag cacctgagtt cctgggggga 900

ccatcagtct tcctgttccc cccaaaaccc aaggacactc tcatgatctc ccggacccct 960

gaggtcacgt gcgtggtggt ggacgtgagc caggaagacc ccgaggtcca gttcaactgg 1020

tacgtggatg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagttcaac 1080

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag 1140

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaaggc ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc 1200

aaagccaaag ggcagccccg agagccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag 1260

atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc 1320

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 1380

ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg 1440

caggagggga atgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca 1500

cagaagagcc tctccctgtc tctcgggaaa tga 1533

<210> 83
<211> 1533
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 83
atgatgtcct ttgtctctct gctcctggtt ggcatcctat tccatgccac ccaggcccag 60

gtcaccttga aggagtctgg tcctgtgctg gtgaaaccca cagagaccct cacgctgacc 120

tgcaccgtct ctgggttctc actcagcagg ggtaaaatgg gtgtgagctg gatccgtcag 180

cccccaggga aggccctgga gtggcttgca cacatttttt cgagtgacga aaaatcctac 240

aggacatcgc tgaagagcag gctcaccatc tccaaggaca cctccaaaaa ccaggtggtc 300

cttacaatga ccaacatgga ccctgtggac acagccacgt attactgtgc acggatacga 360

cgtggaggaa ttgactactg gggccaggga accctggtca ctgtctcctc agcctccacc 420

aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480

gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600

tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720

cccccatgcc caccatgccc agcacctgag ttcctgggggg gaccatcagt cttcctgttc 780

cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg 840

gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020

tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080

cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260

ttcttcctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc 1320

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cacagaagag cctctccctg 1380

tctctcggga aagccgctgg tggtagtggt ttggaagtga cgtgtgagcc cggaacgaca 1440

ttcaaagaca agtgcaatac ttgtcggtgc ggttcagatg ggaaatcggc ggtctgcaca 1500

aagctctggt gtaaccaggg tagtggtgct tga 1533

<210> 84
<211> 834
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 84
atgatgtcct ttgtctctct gctcctggtt ggcatcctat tccatgccac ccaggccttg 60

gaagtgacgt gtgagcccgg aacgacattc aaagacaagt gcaatacttg tcggtgcggt 120

tcagatggga aatcggcggt ctgcacaaag ctctggtgta accagggcac cggtggaggg 180

tcgggatcca gctcacagcc agtgctgact cagcccccct cactgtccgt gtccccagga 240

cagacagcca gcatcacctg ctctggagag aaattggggg ataaatatgc ttactggtat 300

cagcagaagc caggccagtc ccctgtgttg gtcatgtatc aagataaaca gcggccctca 360

gggatccctg agcgattctc tggctccaac tctgggaaca cagccactct gaccatcagc 420

gggacccagg ctatggatga ggctgactat tactgtcagg cgtgggacag cagcactgcg 480

gtattcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggccagc ctaaggcggc gccctcggtc 540

accctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 600

ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 660

aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 720

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 780

acgcatgaag ggagcaccgt ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 834

<210> 85
<211> 834
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 85
atgatgtcct ttgtctctct gctcctggtt ggcatcctat tccatgccac ccaggcccag 60

ccagtgctga ctcagccccc ctcactgtcc gtgtccccag gacagacagc cagcatcacc 120

tgctctggag agaaattggg ggataaatat gcttactggt atcagcagaa gccaggccag 180

tcccctgtgt tggtcatgta tcaagataaa cagcggccct cagggatccc tgagcgattc 240

tctggctcca actctgggaa cacagccact ctgaccatca gcgggaccca ggctatggat 300

gaggctgact attactgtca ggcgtgggac agcagcactg cggtattcgg cggagggacc 360

aagctgaccg tcctaggcca gcctaaggcg gcgccctcgg tcaccctgtt cccgccctcc 420

tctgaggagc ttcaagccaa caaggccaca ctggtgtgtc tcataagtga cttctacccg 480

ggagccgtga cagtggcctg gaaggcagat agcagccccg tcaaggcggg agtggagacc 540

accacaccct ccaaacaaag caacaacaag tacgcggcca gcagctatct gagcctgacg 600

cctgagcagt ggaagtccca cagaagctac agctgccagg tcacgcatga agggagcacc 660

gtggagaaga cagtggcccc tacagaatgt tcagccgctg gtggtagtgg tttggaagtg 720

acgtgtgagc ccggaacgac attcaaagac aagtgcaata cttgtcggtg cggttcagat 780

gggaaatcgg cggtctgcac aaagctctgg tgtaaccagg gtagtggtgc ttag 834

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種使用一組合物於製造一用於治療患有 COVID-19 誘導的急性呼吸窘迫症候群(ARDS)或 COVID-19 誘導的肺炎的人受試者的藥物的用途，該組合物包含一與 SEQ ID NO:6 的一部分特異性結合的、且抑制凝集素途徑補體活化而不抑制 C1q 依賴性補體活化的 MASP-2 抑制性單選殖抗體或其片段，其中所述 MASP-2 抑制性單選殖抗體或其抗原結合片段包括包含 SEQ ID NO:67 的重鏈可變區和包含 SEQ ID NO:69 的輕鏈可變區。

【請求項2】 如請求項 1 的用途，其中所述受試者在治療之前處於機械呼吸機上，並且所述藥物有效的中止對於機械通氣的需要。

【請求項3】 如請求項 2 的用途，其中所述受試者處於侵入性機械呼吸機上。

【請求項4】 如請求項 2 的用途，其中所述受試者處於非侵入性機械呼吸機上。

【請求項5】 如請求項 1 的用途，其中所述受試者在治療之前需要補充氧氣，並且所述藥物有效的中止對於補充氧氣的使用。

【請求項6】 如請求項 1 的用途，其中所述 MASP-2 抑制性單選殖抗體或其片段與包含 SEQ ID NO:6 的多肽特異性結合，其中親和力是其與補體系統中不同抗原結合的親和力的至少 10 倍。

【請求項7】 如請求項 1 的用途，其中所述抗體或其片段選自重組抗體、效應子功能降低的抗體、嵌合抗體、人源化抗體和人抗體。

【請求項8】 如請求項 1 的用途，其中所述 MASP-2 抑制性單選殖抗體抑制 10%人血清中的 C3b 沉積，其中 IC_{50} 為 30 nM 或更小。

【請求項9】 如請求項 1 的用途，其中所述 MASP-2 抑制性單選殖抗體抑制 90%人血清中的 C3b 沉積，其中 IC_{50} 為 30 nM 或更小。

【請求項10】 如請求項 1 的用途，其中將所述藥物以皮下、腹膜內、肌內、動脈內、或靜脈內施用。

【請求項11】 一種使用一組合物於製造一用於治療、預防由 SARS-CoV-2 感染的人受試者的凝血或血栓形成或者降低其嚴重性的藥物的用途，該組合物包含一與 SEQ ID NO:6 的一部分特異性結合的、且抑制凝集素途徑補體活化而不抑制 C1q 依賴性補體活化的 MASP-2 抑制性單選殖抗體或其片段，其中所述 MASP-2 抑制性單選殖抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，所述重鏈可變區包含如 SEQ ID NO:67 所示的胺基酸序列，所述輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO:69 所示的胺基酸序列。

【請求項12】 如請求項 11 的用途，其中所述受試者具有的 D-二聚體水平高於治療前的標準範圍，並且所述藥物有效的將所述受試者的 D-二聚體水平降低到健康受試者的正常範圍內。

【請求項13】 如請求項 11 的用途，其中所述藥物提供抗凝和/或抗血栓形成效應，而不影響止血。

【請求項14】 一種使用一組合物於製造一用於治療、改善、預防或降低人受試者發展一種或多種 COVID-19 有關的長期後遺症的風險的藥物的用途，所述人受試者目前由 SARS-CoV-2 感染或已由 SARS-CoV-2 感染，該組合物包含一與 SEQ ID NO:6 的一部分特異性結合的、且抑制凝集素途徑補體活化而不抑制 C1q 依賴性補體活化的 MASP-2 抑制性單選殖抗體或其片段，其中所述 MASP-2 抑制性單選殖抗體或其抗原結合片段包含重鏈可變區和輕鏈可變區，

所述重鏈可變區包含如 SEQ ID NO:67 所示的胺基酸序列，所述輕鏈可變區包含如 SEQ ID NO:69 所示的胺基酸序列。

【請求項15】 如請求項 14 的用途，其中所述受試者患有 COVID-19 誘導的肺炎或 ARDS，並且所述藥物有效的改善呼吸功能。

【請求項16】 如請求項 14 的用途，其中所述受試者患有 COVID-19 誘導的凝血或血栓形成，並且所述藥物有效的治療、預防所述受試者的凝血或血栓形成或者降低其嚴重性。

【請求項17】 如請求項 16 的用途，其中所述一種或多種 COVID-19 有關的長期後遺症選自：心血管併發症(包括心肌損傷、心肌病、心肌炎、血管內凝血、中風、靜脈和動脈併發症以及肺栓塞)；神經系統併發症(包括認知困難、意識模糊、也稱為“腦霧”的記憶喪失、頭痛、中風、頭暈、暈厥、癲癇發作、食慾減退、失眠、嗅覺喪失、味覺喪失、肌陣攣、神經性疼痛、肌痛；神經系統疾病如阿爾茨海默氏病、格巴二氏症候群、米勒-費希爾症候群、帕金森氏病)的進展；腎臟損傷(例如急性腎臟損傷(AKI))、肺部併發症包括(肺纖維化、呼吸困難、肺栓塞)；炎性病況例如川崎病、川崎樣病、兒童的多系統炎症症候群、多系統器官衰竭、極度疲勞、肌無力、低燒、注意力不集中、記憶差錯、情緒變化、睡眠困難、手臂和腿部的針痛、腹瀉和嘔吐、味覺和嗅覺喪失、喉嚨痛和吞咽困難、糖尿病和高血壓的新發作、皮疹、呼吸短促、胸痛和心悸。

【請求項18】 如請求項 17 的用途，其中所述受試者已從 COVID-19 誘導的肺炎或 ARDS 中恢復，並且所述藥物有效的治療或改善一種或多種長期後遺症。

【請求項19】 如請求項 17 的用途，其中所述受試者已從 COVID-19 誘導的凝血或血栓形成中恢復，並且所述藥物有效的治療或改善一種或多種長期後遺症。

【發明圖式】

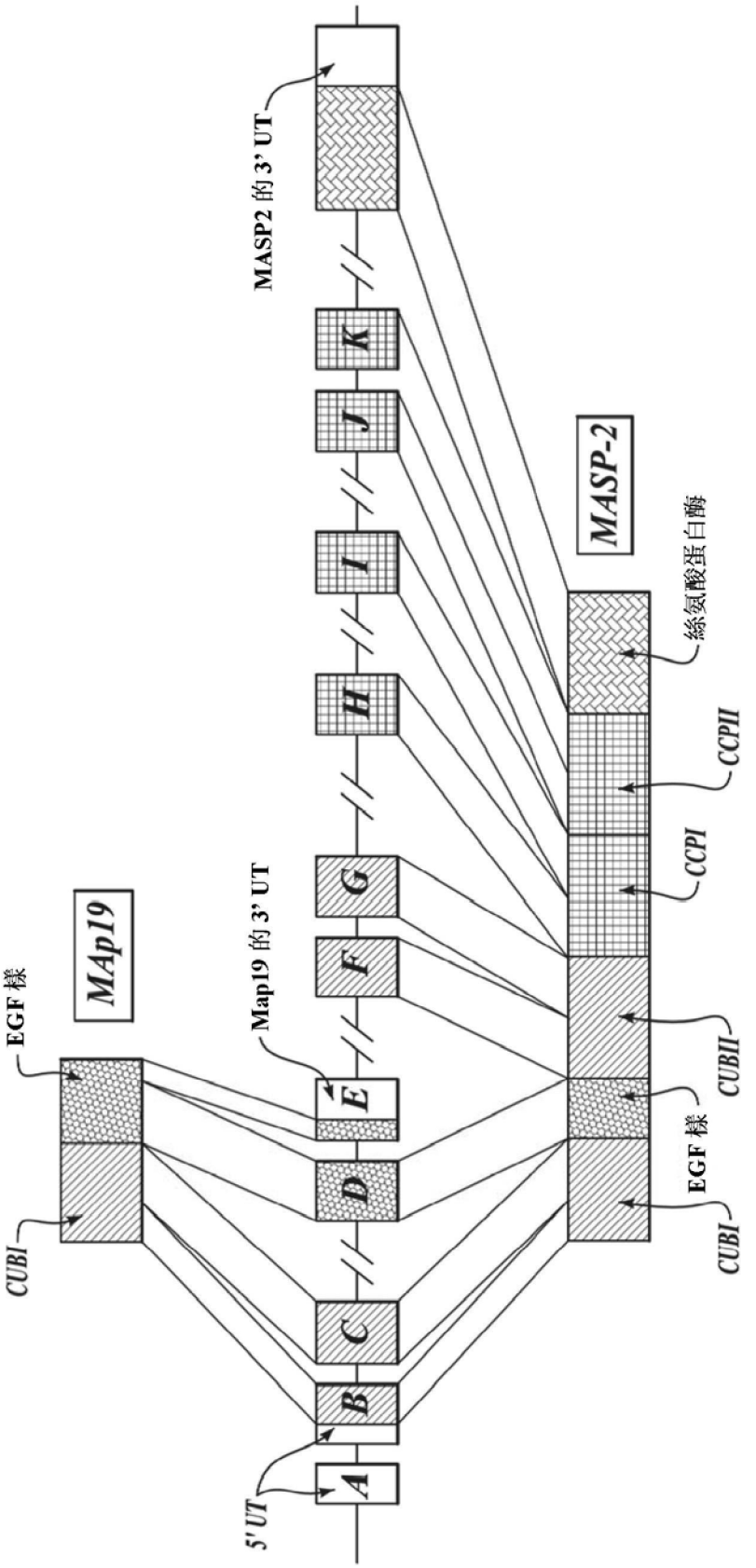

MASP2 的 3' UT
K
J
I
H
G
F
E
D
C
B
A
5' UT
MASP-2
絲氨酸蛋白酶
CCPII
CCPI
CUBII
EGF 樣
CUBI
MAp19
EGF 樣
Map19 的 3' UT
CUBI

圖 1

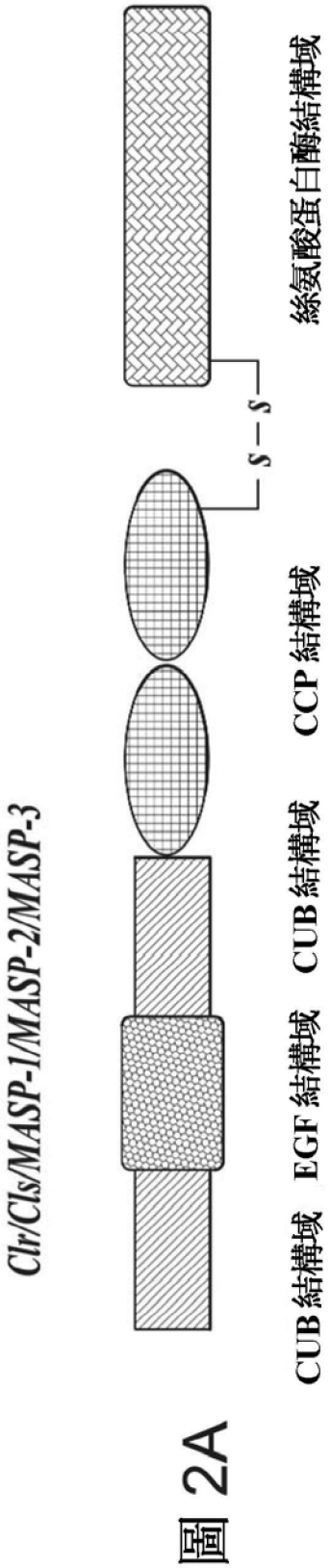

Clr/Cls/MASP-1/MASP-2/MASP-3
CUB 結構域
EGF 結構域
CUB 結構域
CCP 結構域
S — S
絲氨酸蛋白酶結構域

圖 2A

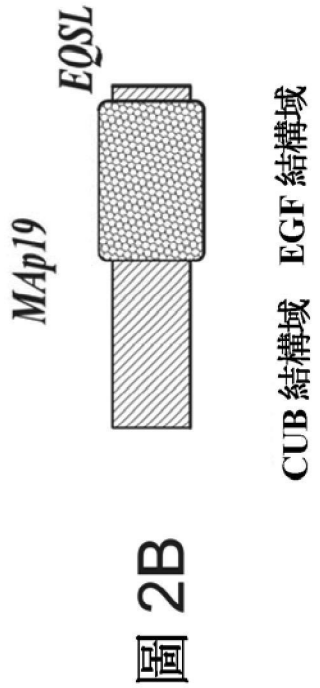

MAp19
EQSL
CUB 結構域
EGF 結構域

圖 2B

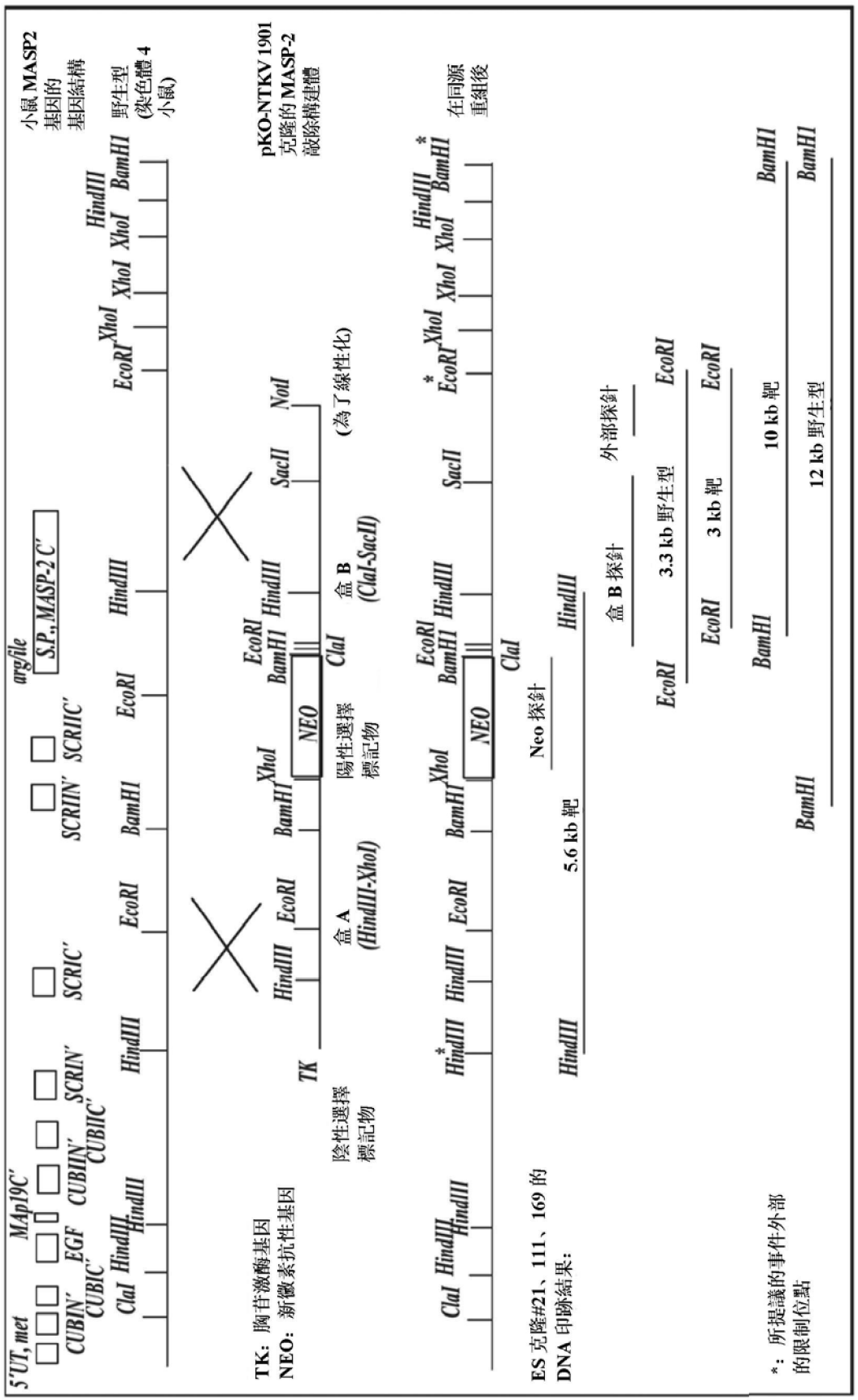

5'UT, met
MAp19C'
CUBIN'
EGF
CUBIIN'
CUBIIC'
SCRIN'
SCRIC'
SCRIIN'
SCRIIC'
argfile
S.P.,MASP-2 C'
小鼠 MASP2
基因的
基因結構
ClaI HindIII
HindIII
EcoRI
BamH1
EcoRI
HindIII
EcoRI
XhoI
XhoI
HindIII
BamH1
野生型
(突色體 4
小鼠)
TK: 胸苷激酶基因
NEO: 新黴素抗性基因
pKO-NTKV 1901
克隆的 MASP-2
敲除構建體
陰性選擇
標記物
TK
HindIII
EcoRI
盒 A
(HindIII-XhoI)
XhoI
BamH1
陽性選擇
標記物
NEO
ClaI
EcoRI
BamH1
HindIII
盒 B
(ClaI-SacII)
SacII
NotI
(為了線性化)
ES 克隆#21、111、169 的
DNA 印跡結果:
ClaI HindIII
HindIII
*HindIII
HindIII
EcoRI
BamH1
XhoI
NEO
ClaI
EcoRI
BamH1
HindIII
SacII
*EcoRI
XhoI
XhoI
HindIII
*BamH1
在同源
重組後
Neo 探針
HindIII
5.6 kb 靶
HindIII
盒 B 探針
外部探針
EcoRI
3.3 kb 野生型
EcoRI
EcoRI
3 kb 靶
EcoRI
BamH1
10 kb 靶
BamH1
BamH1
12 kb 野生型
BamH1
*: 所提議的事件外部
的限制位點

圖 3

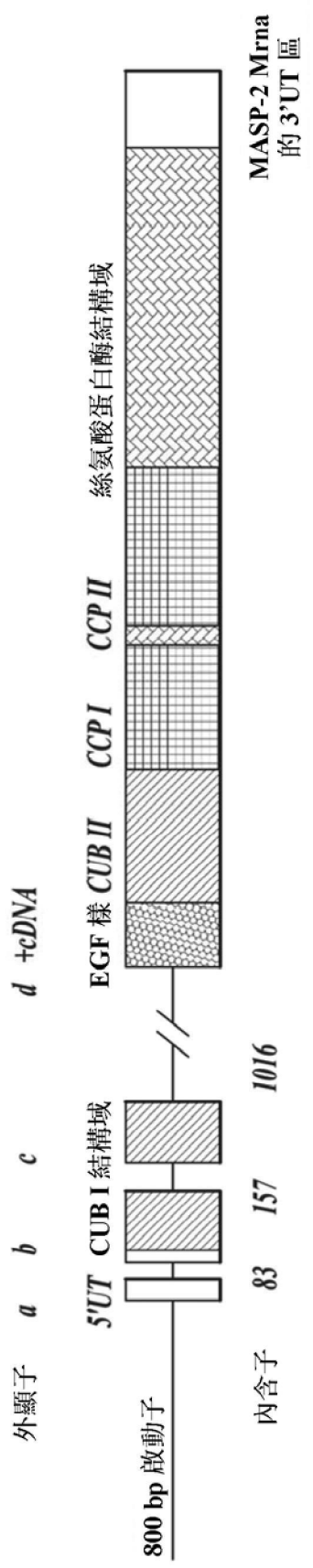

外顯子 a b c d +cDNA
5'UT CUB I 結構域 EGF 樣 CUB II CCP I CCP II 絲氨酸蛋白酶結構域
MASP-2 Mrna 的 3'UT 區
800 bp 啟動子
內含子 83 157 1016

圖 4

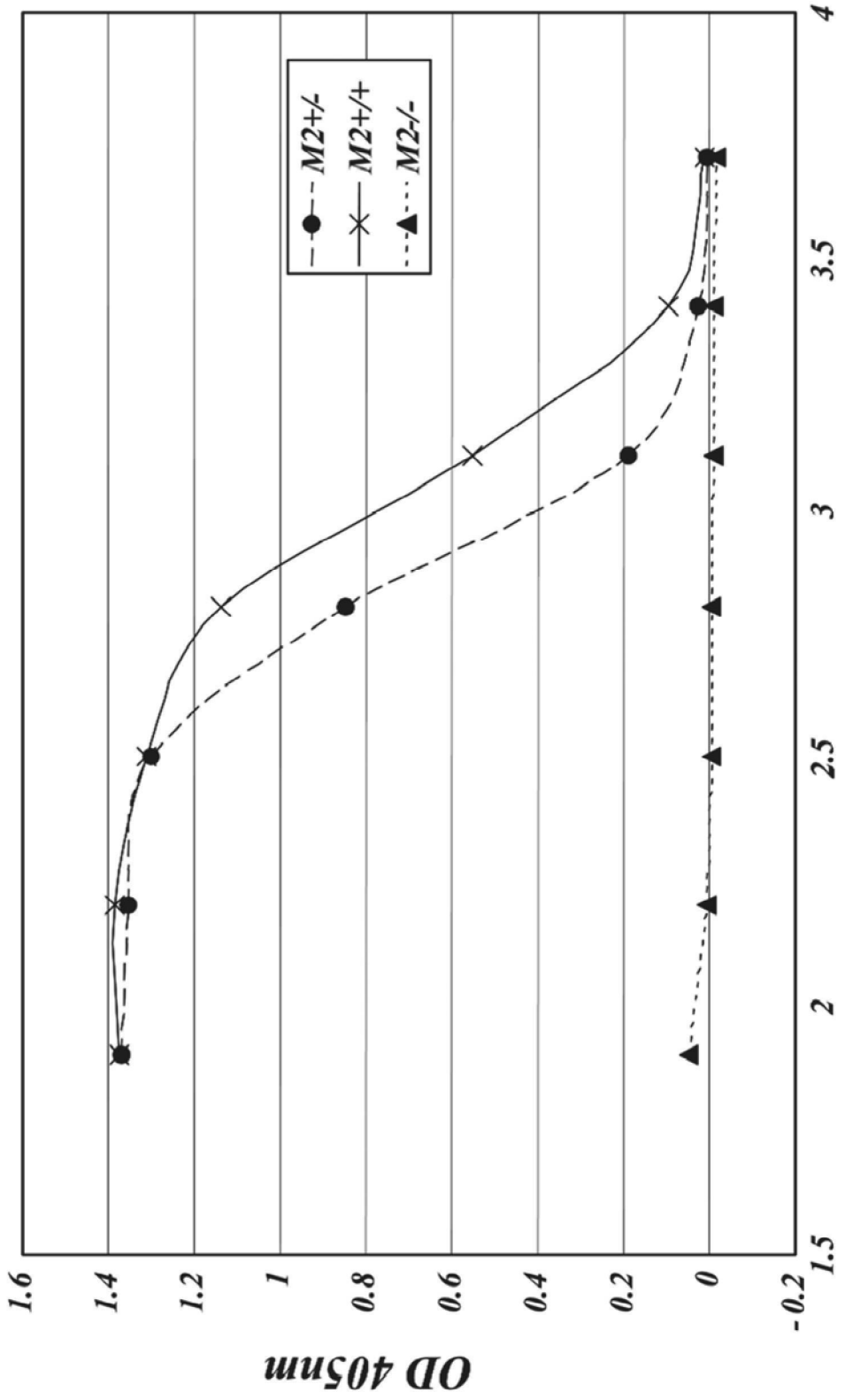


圖 5A

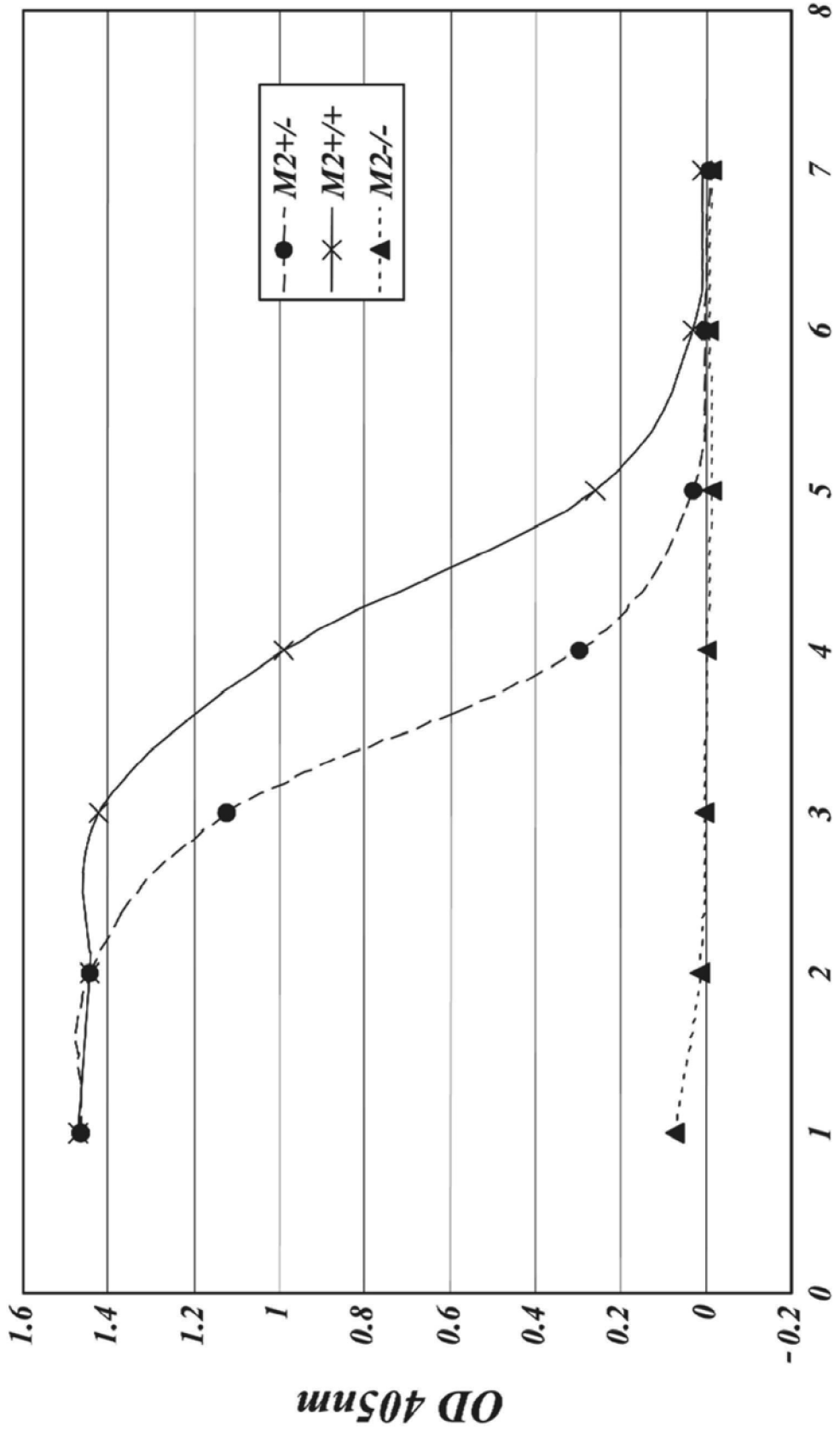


圖 5B

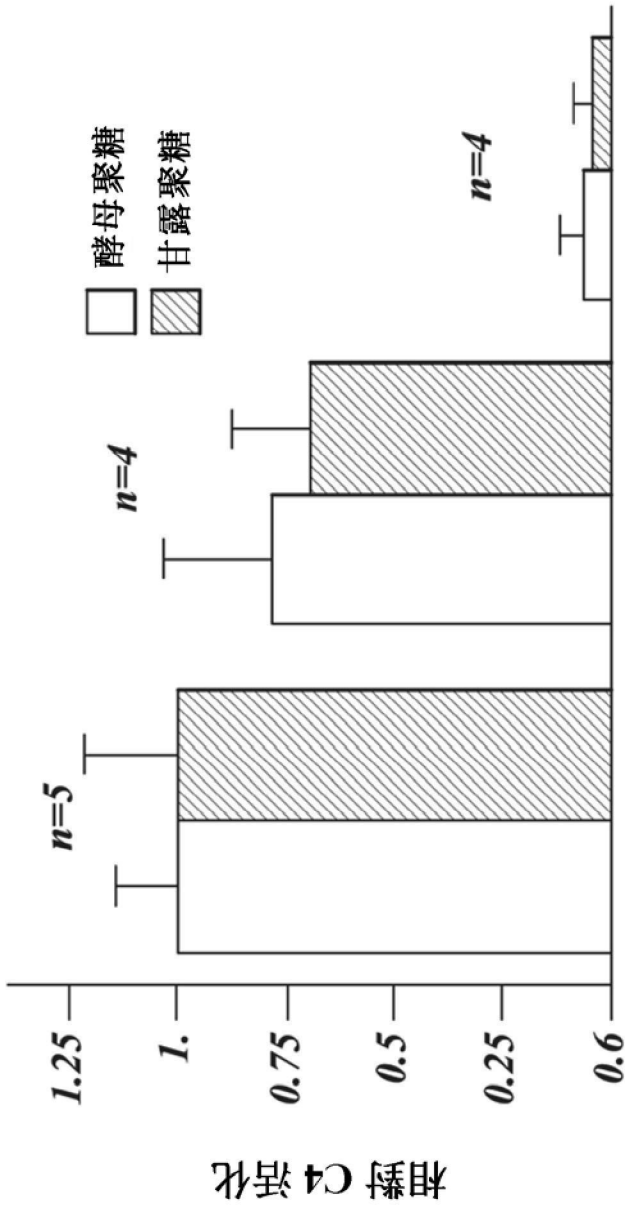


圖 5C

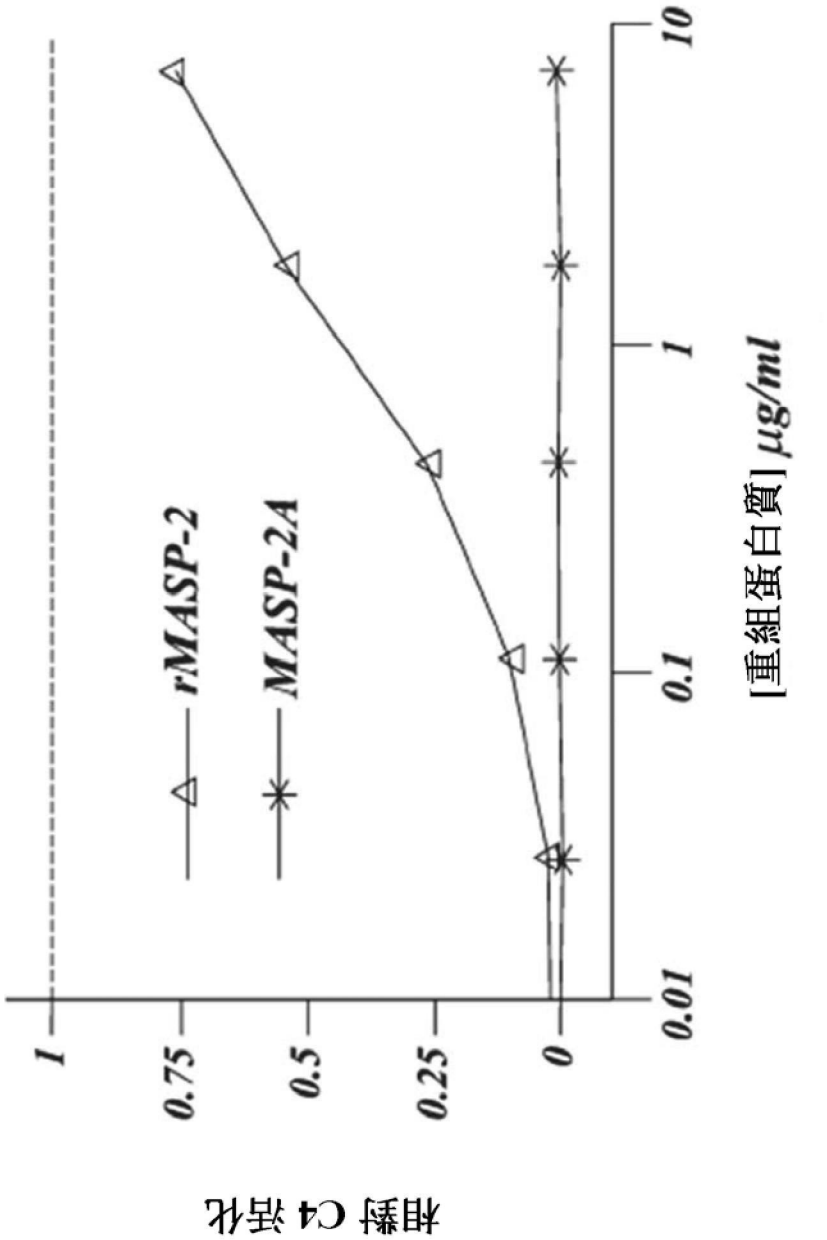


圖 6

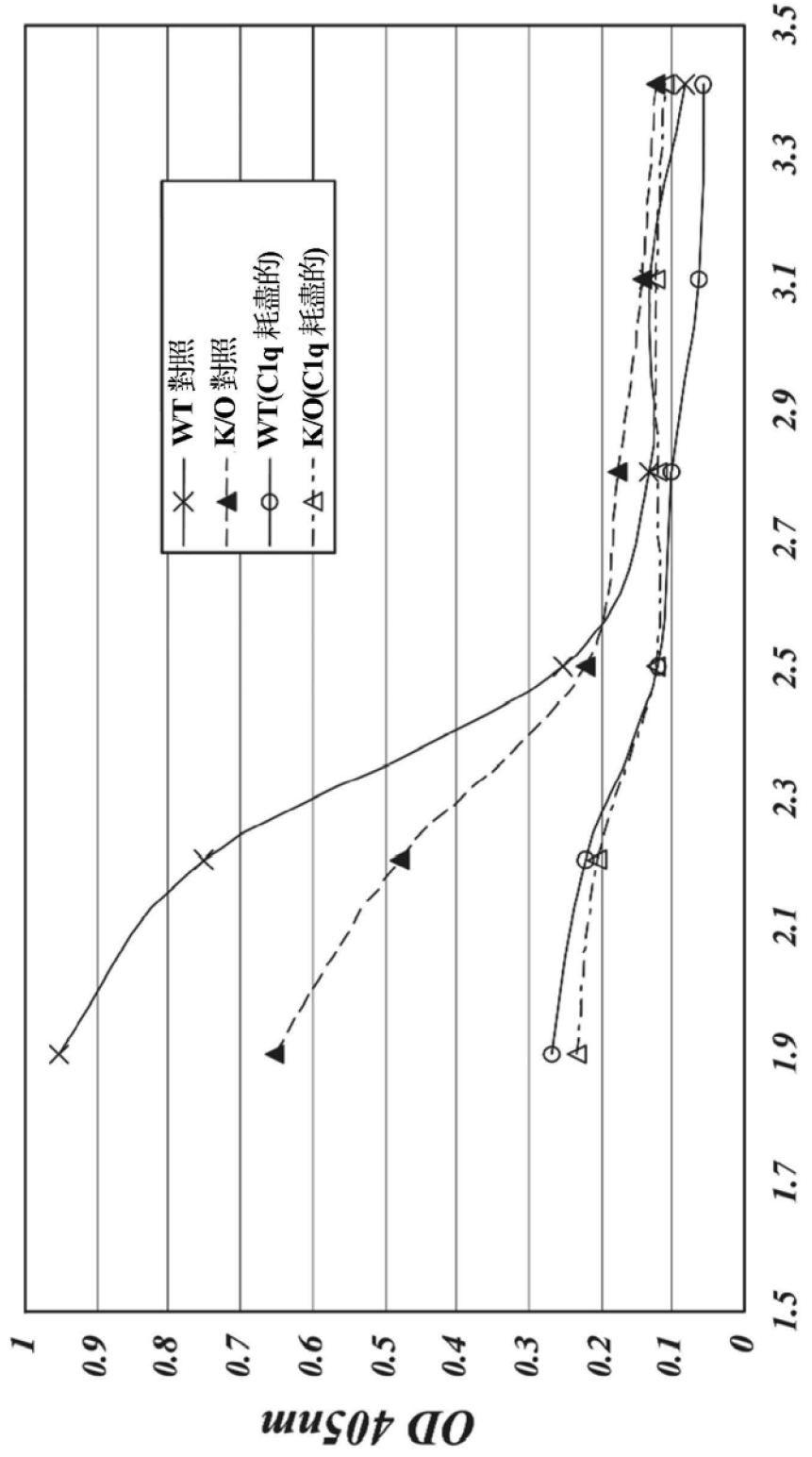

WT 對照
K/O 對照
WT(C1q 耗盡的)
K/O(C1q 耗盡的)
OD 405nm
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
1.5
1.7
1.9
2.1
2.3
2.5
2.7
2.9
3.1
3.3
3.5
對數血漿稀釋度

圖 7

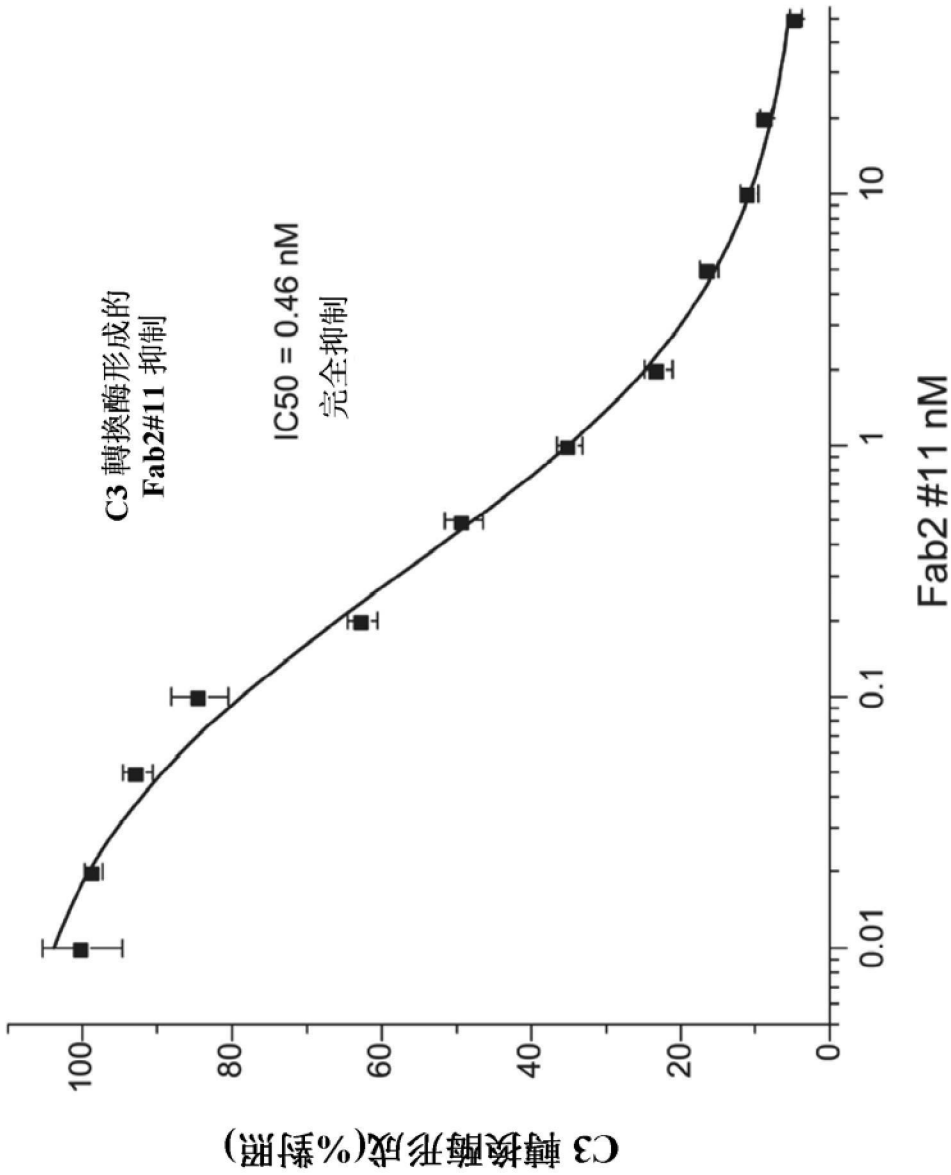

C3 轉換酶形成的
Fab2#11 抑制
IC50 = 0.46 nM
完全抑制
C3 轉換酶形成(%對照)
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
Fab2 #11 nM

圖 8A

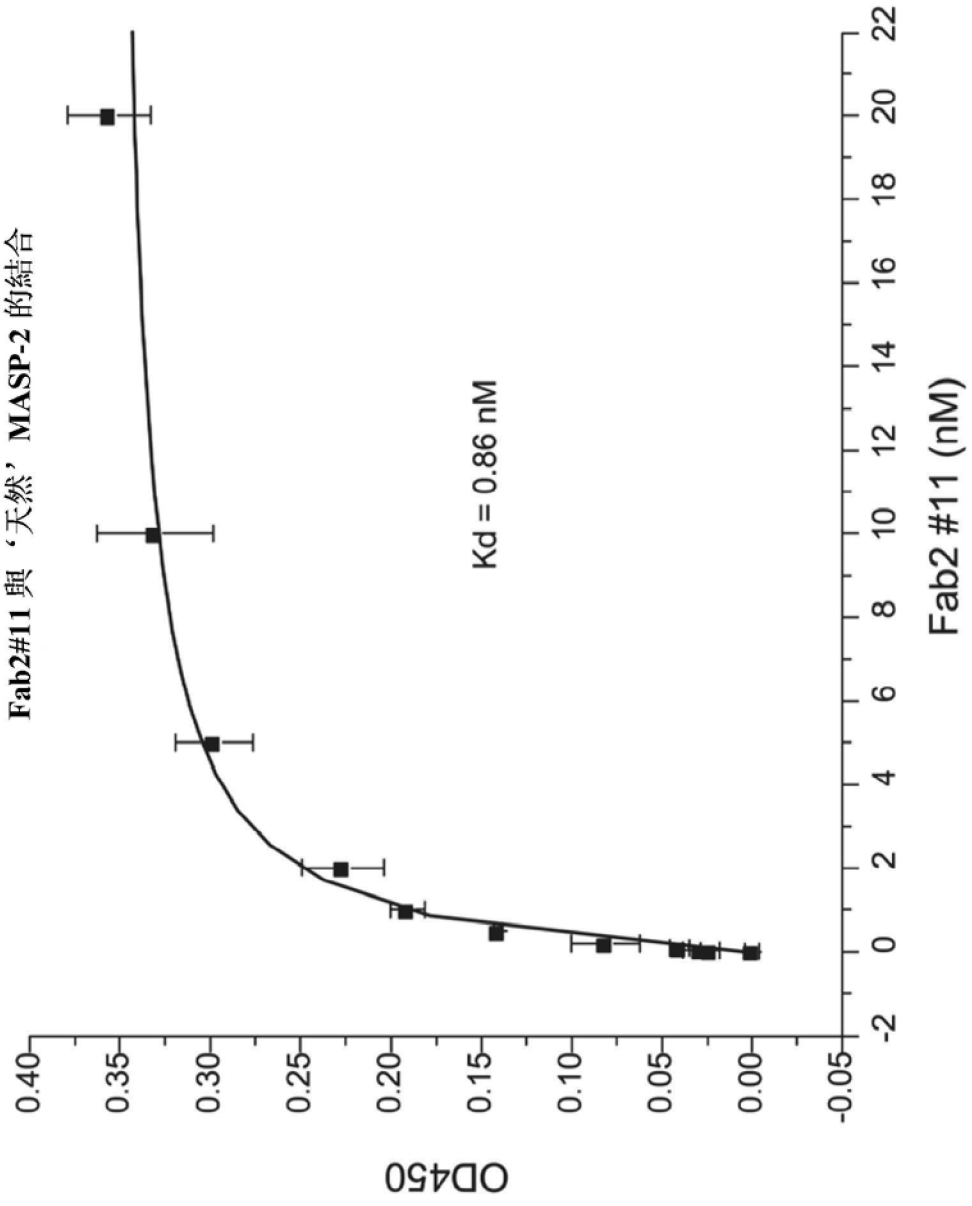

Fab2#11 與‘天然’MASP-2 的結合
Kd = 0.86 nM
OD450
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
Fab2 #11 (nM)

圖 8B

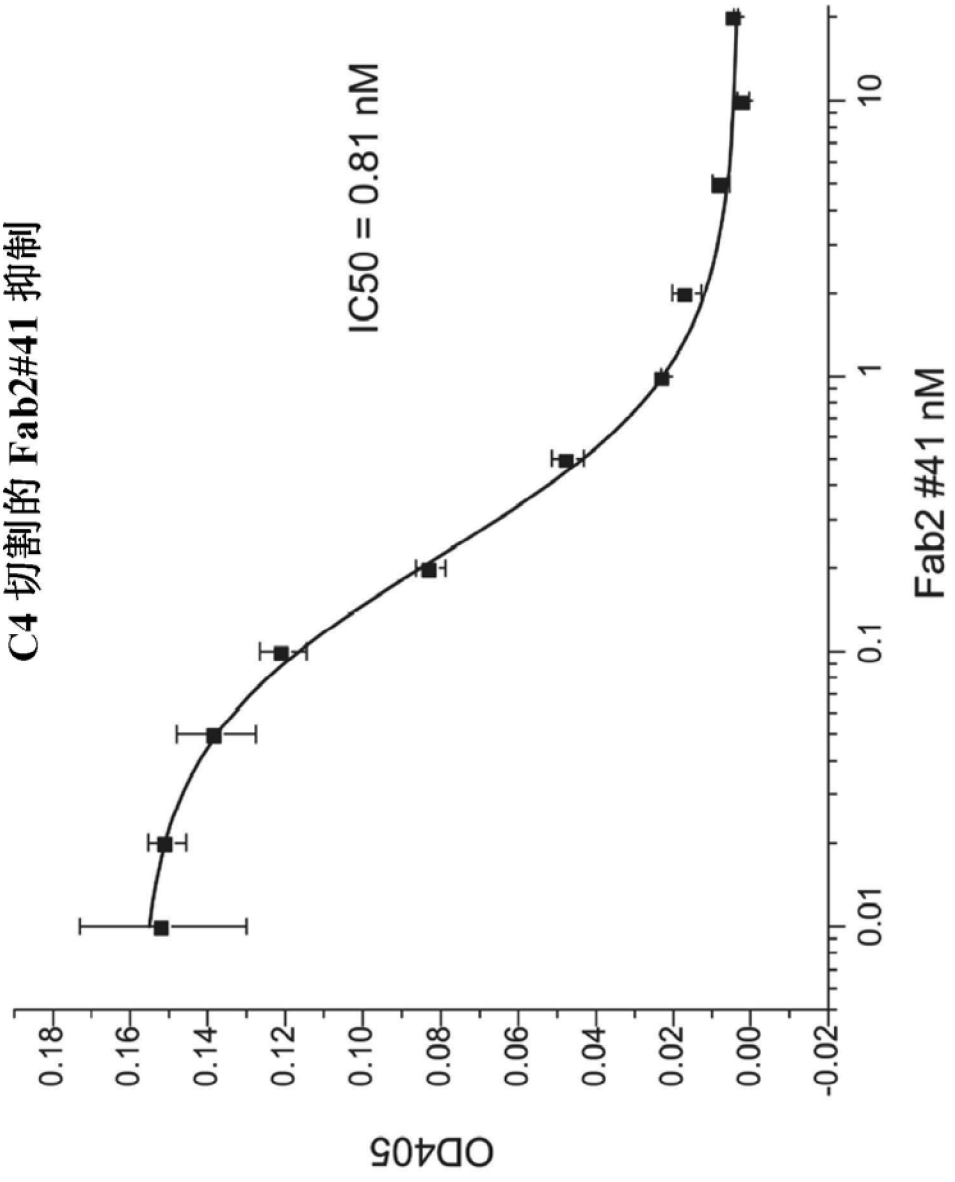

C4 切割的 Fab2#41 抑制
IC50 = 0.81 nM
OD405
0.18
0.16
0.14
0.12
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
-0.02
0.01
0.1
1
10
Fab2 #41 nM

圖 8C

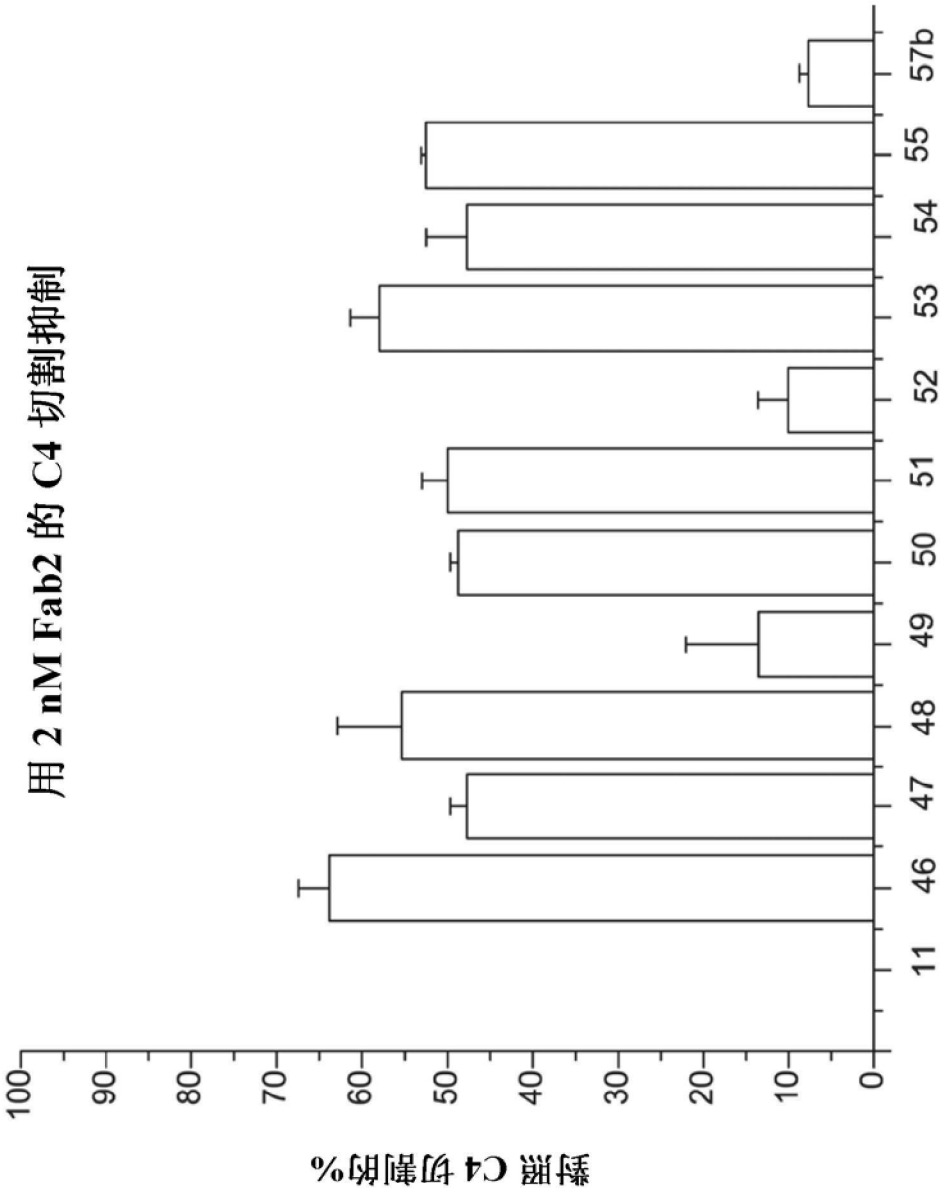

用 2 nM Fab2 的 C4 切割抑制
對照 C4 切割的%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
11
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
57b
抗 MASP2 Fab2

圖 9

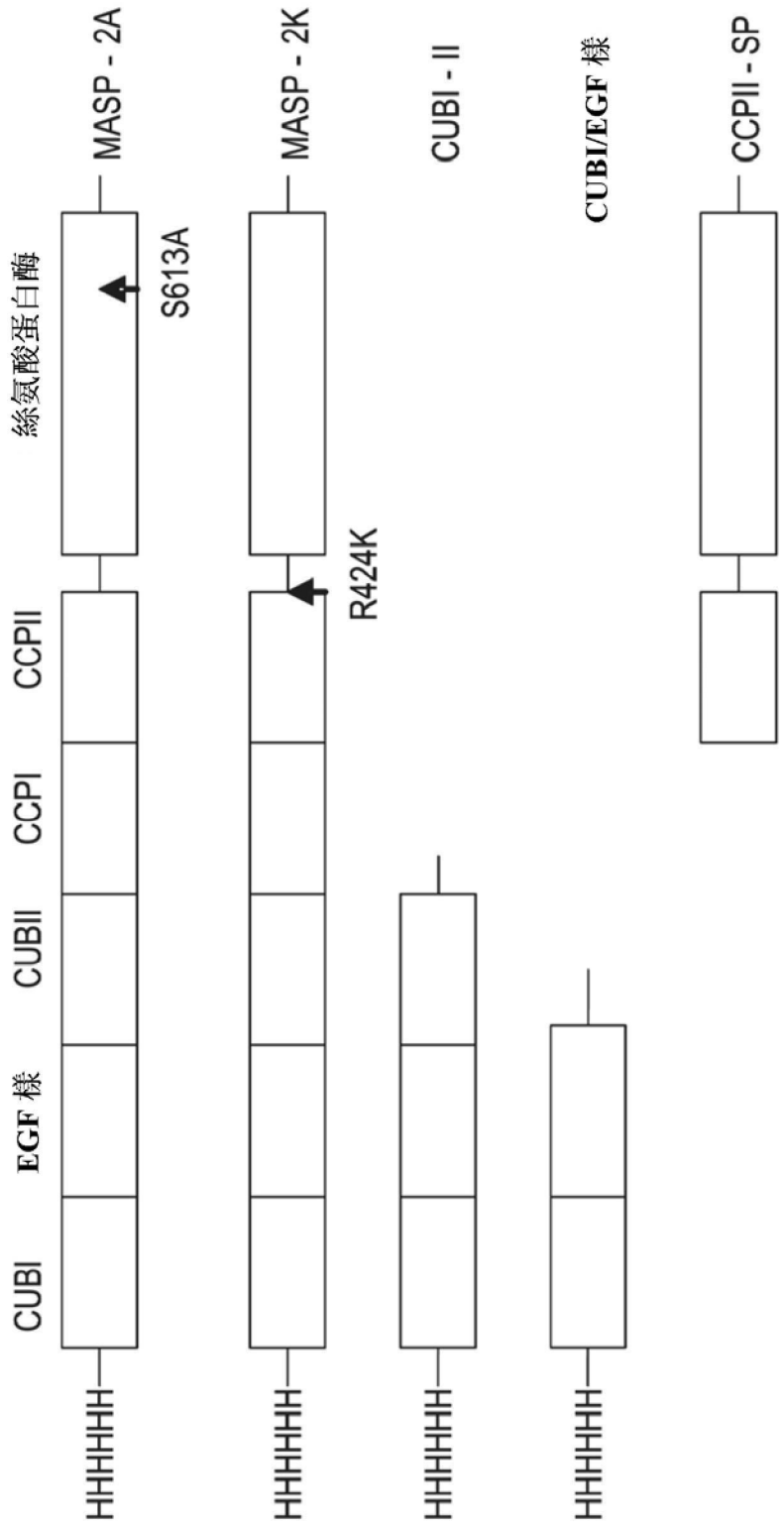

MASP - 2A
絲氨酸蛋白酶
S613A
CUBI
EGF 樣
CUBII
CCPI
CCPII
HHHHHH
MASP - 2K
R424K
HHHHHH
CUBI - II
HHHHHH
CUBI/EGF 樣
HHHHHH
CCPII - SP

圖 10

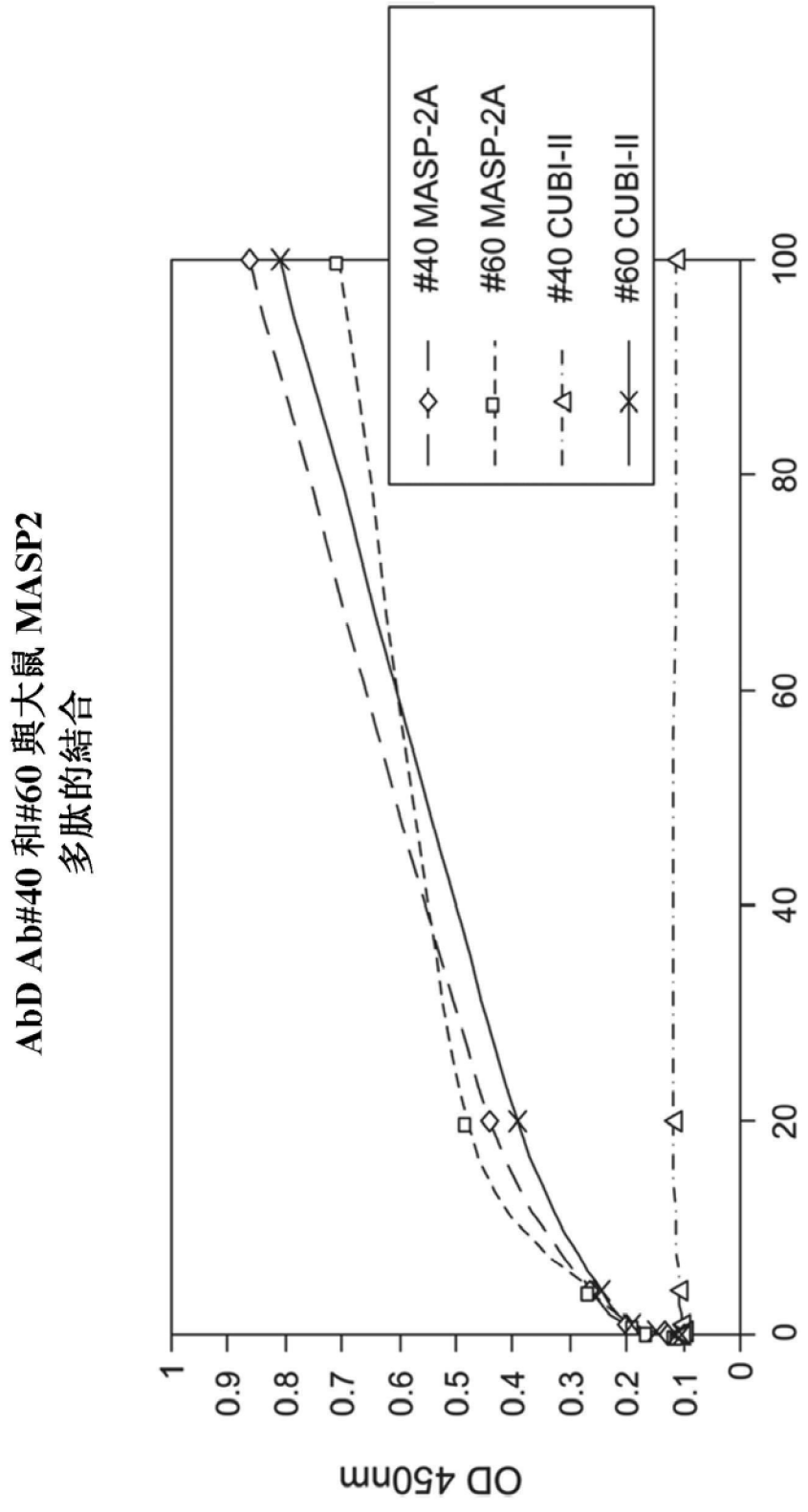

AbD Ab#40 和#60 與大鼠 MASP2
多肽的結合
#40 MASP-2A
#60 MASP-2A
#40 CUBI-II
#60 CUBI-II
OD 450nm
[Ab] nM
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1
0
20
40
60
80
100

圖 11

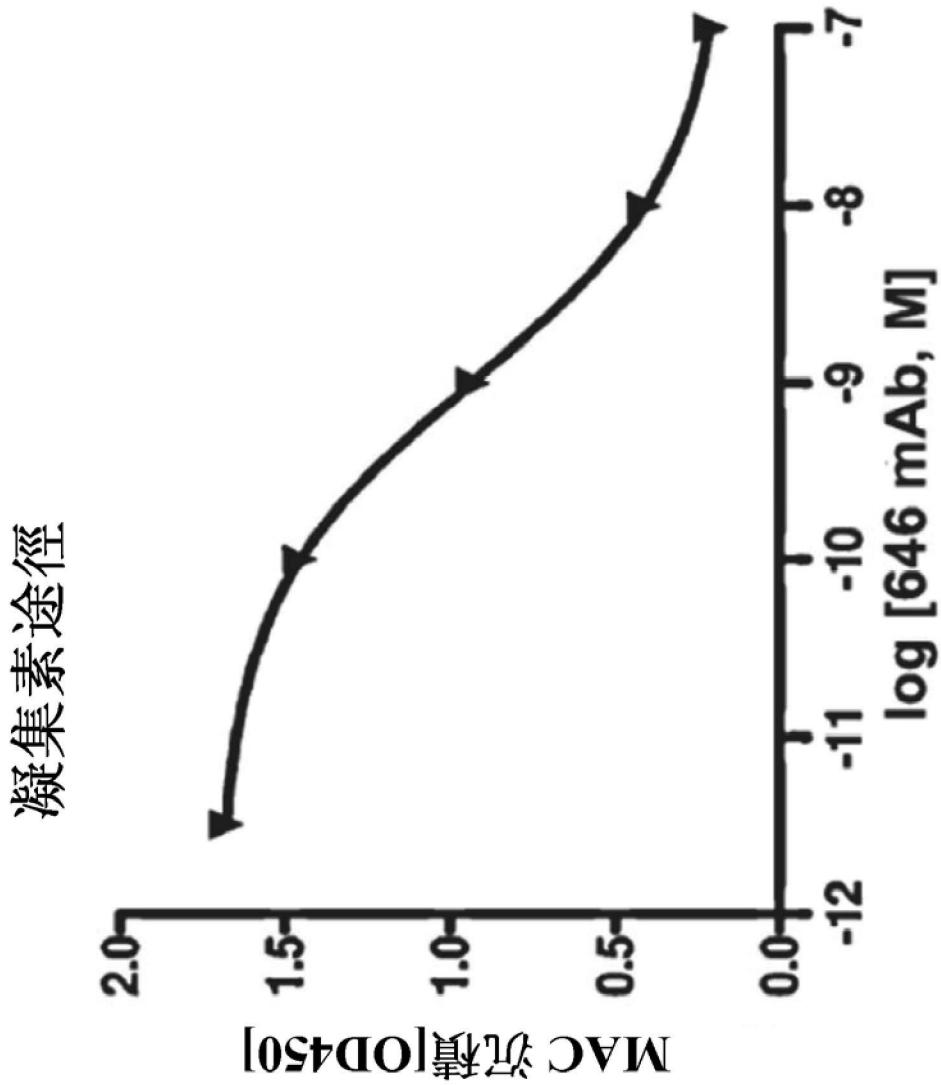


圖 12A

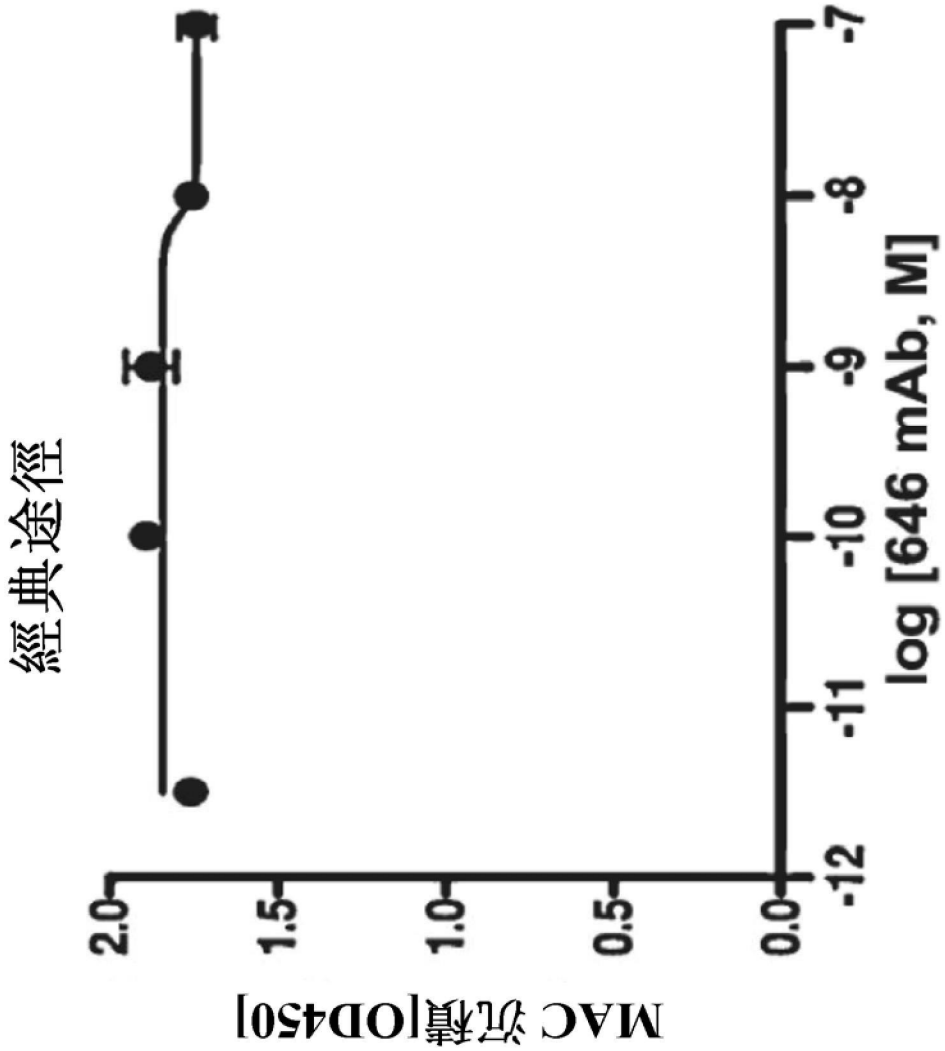


圖 12B

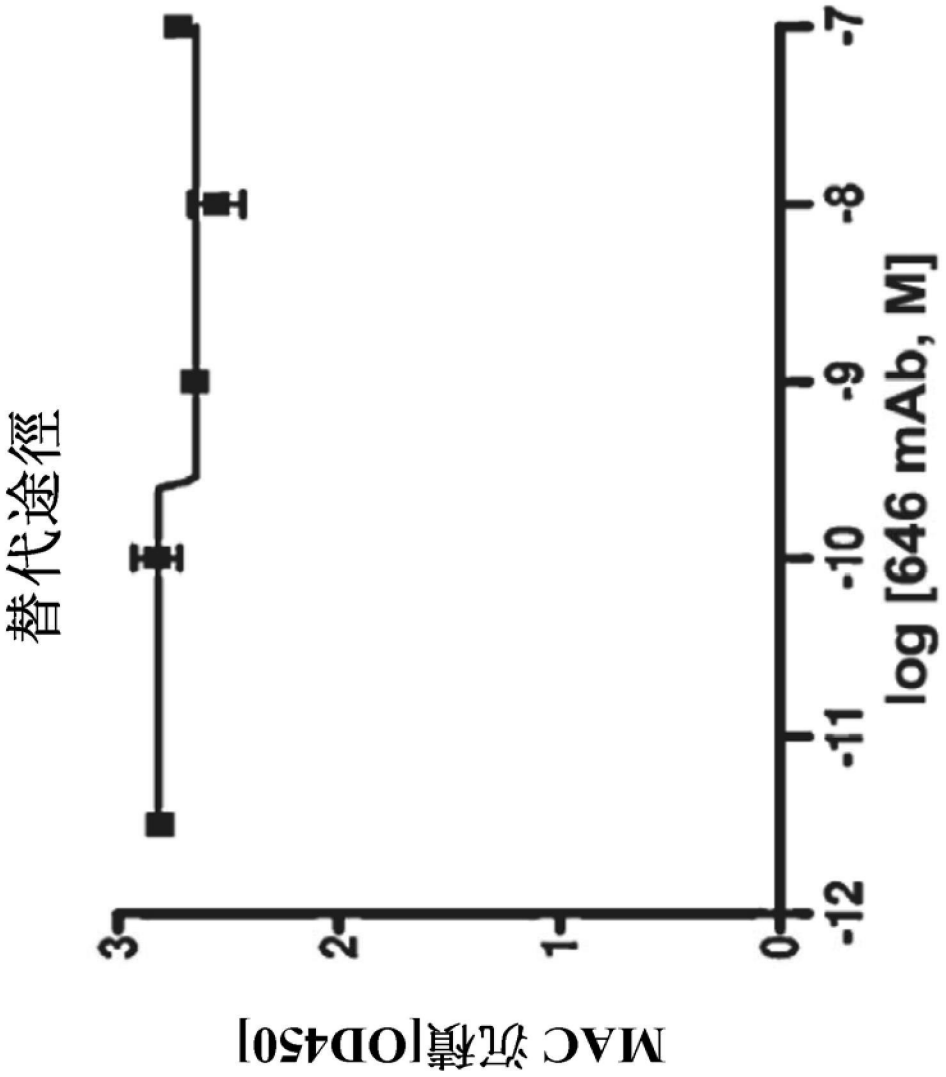


圖 12C

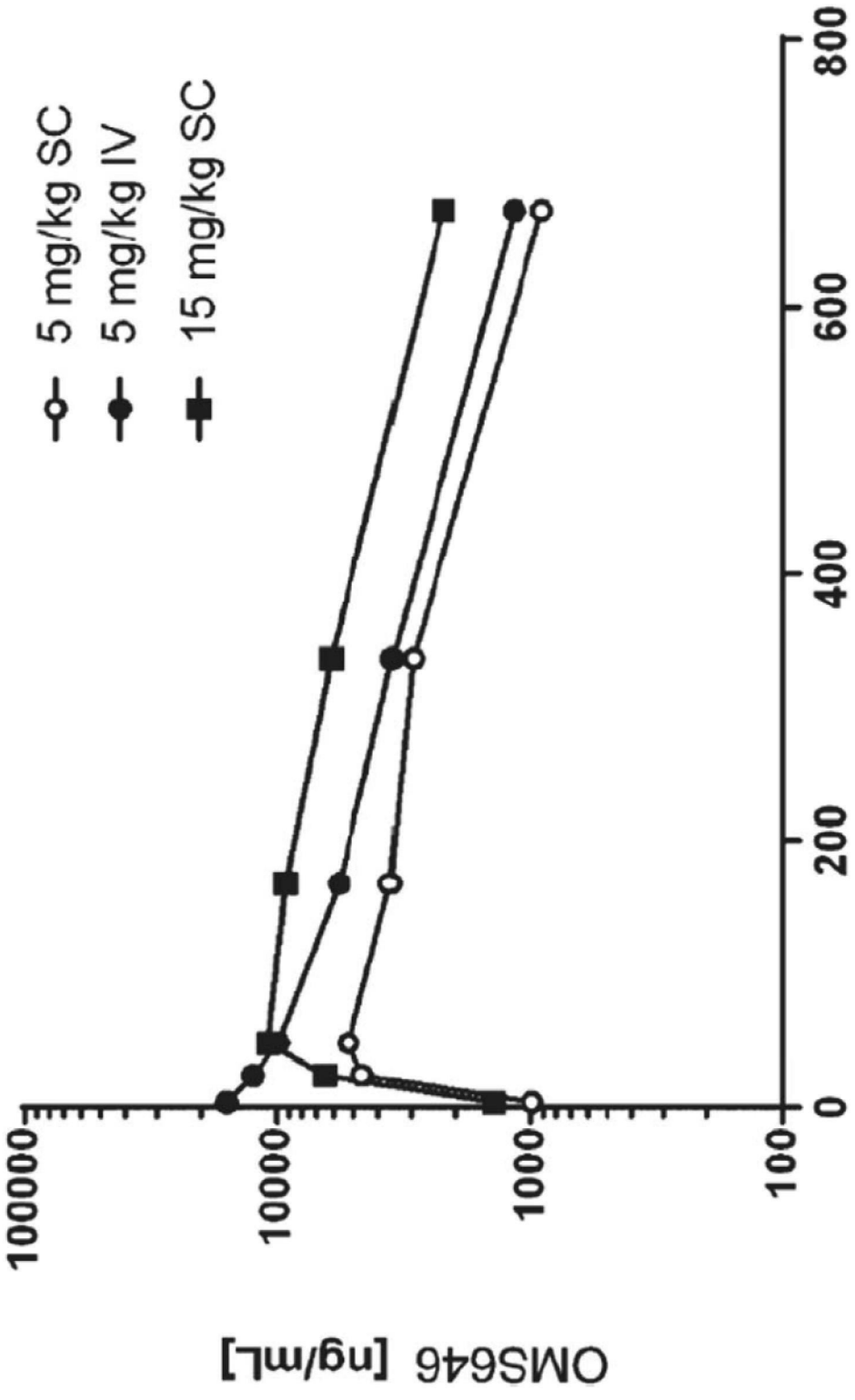

5 mg/kg SC
5 mg/kg IV
15 mg/kg SC
OMS646 [ng/mL]
100000
10000
1000
100
0
200
400
600
800
時間[小時]

圖 13

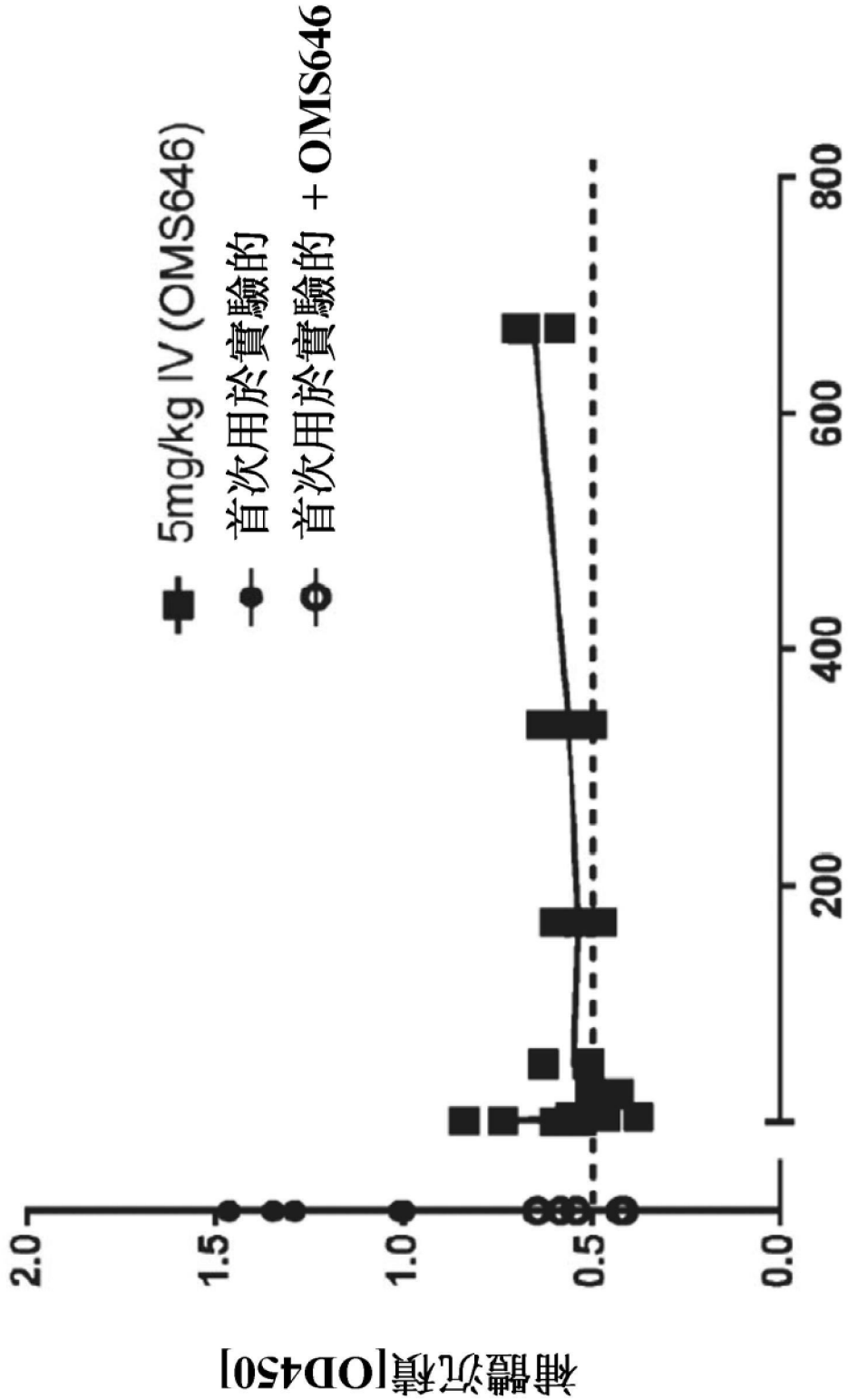

5mg/kg IV (OMS646)
首次用於實驗的
首次用於實驗的 + OMS646
補體沉積[OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
400
600
800
時間[小時]

圖 14A

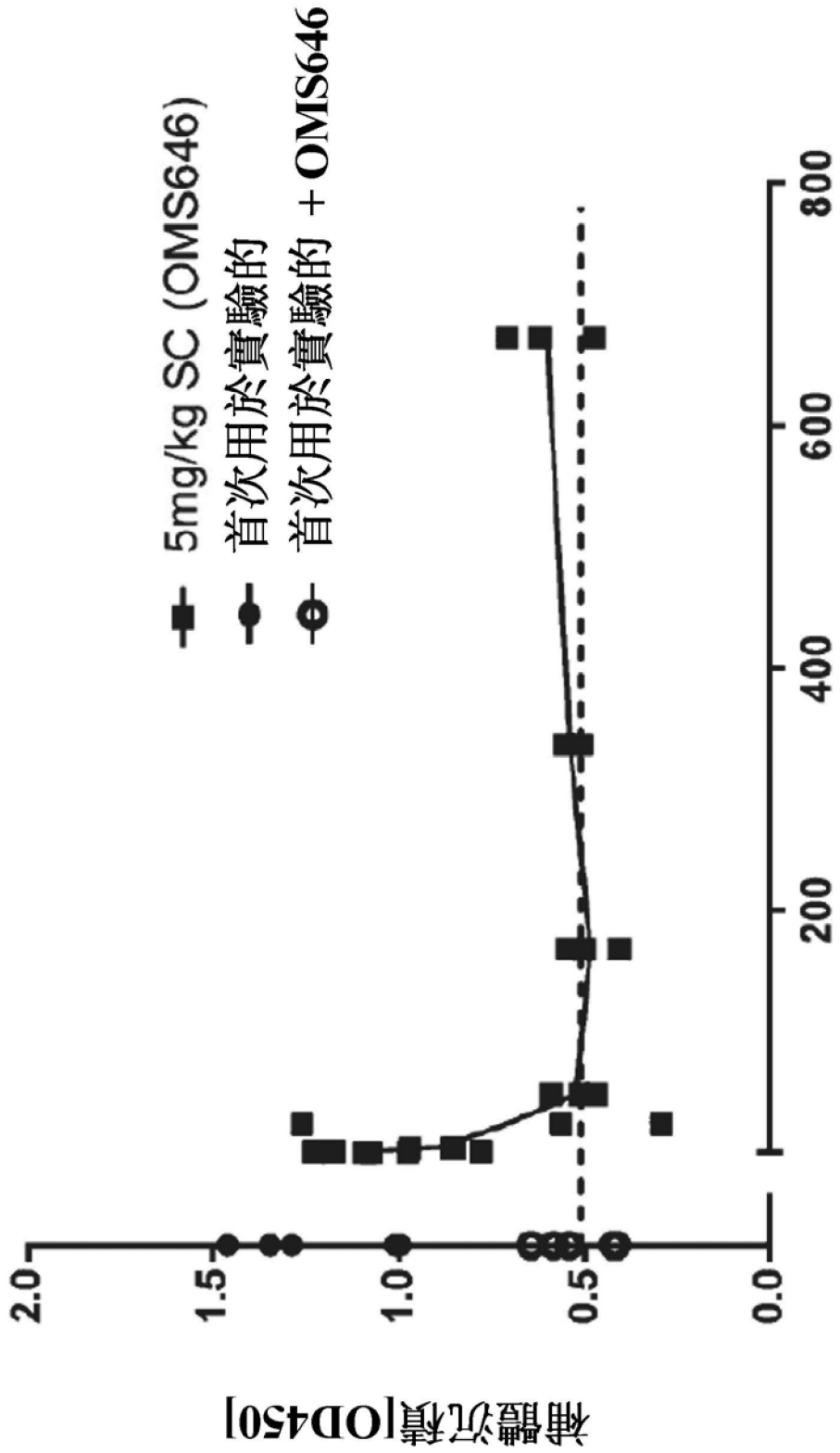

5mg/kg SC (OMS646)
首次用於實驗的
首次用於實驗的 + OMS646
補體沉積[OD450]
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
400
600
800
時間[小時]

圖 14B

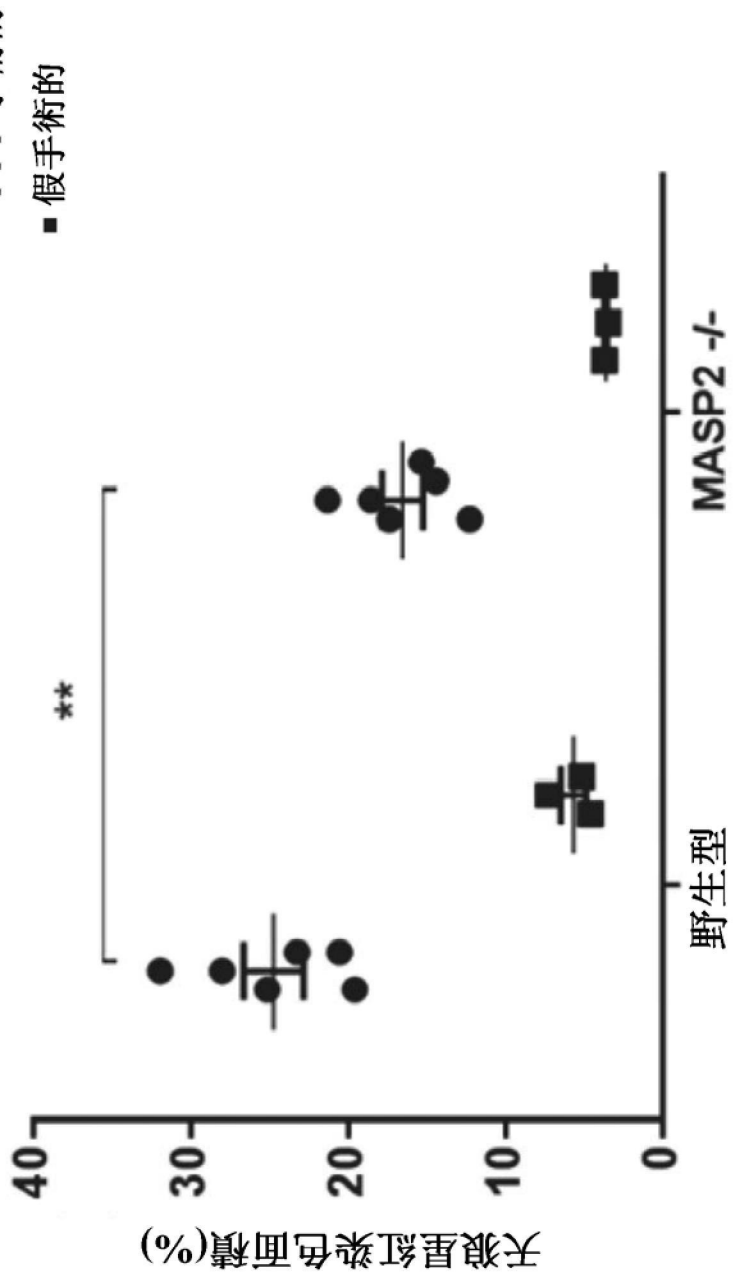


圖 15

**p= 0.0096

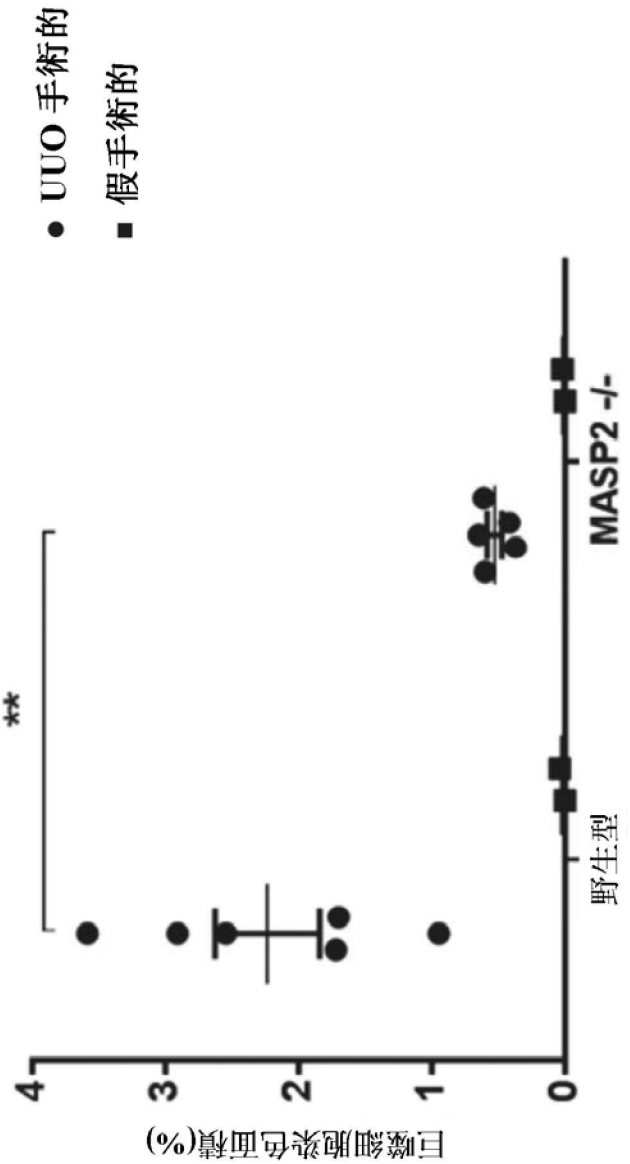


圖 16

**p=0.0035

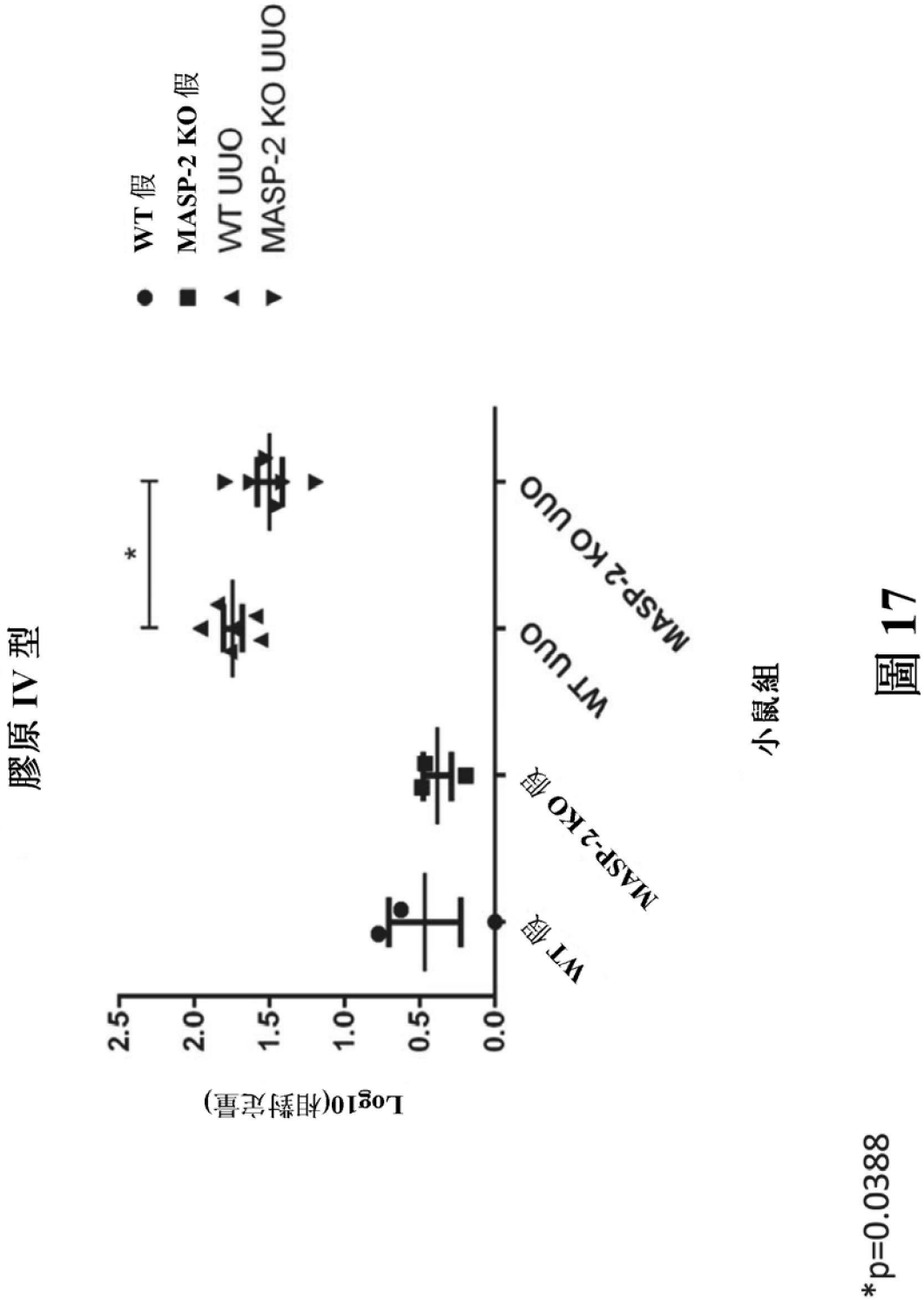

膠原 IV 型
WT 假
MASP-2 KO 假
WT UUO
MASP-2 KO UUO
*
Log10(相對定量)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
WT 假
MASP-2 KO 假
WT UUO
MASP-2 KO UUO
小鼠組

圖 17

*p=0.0388

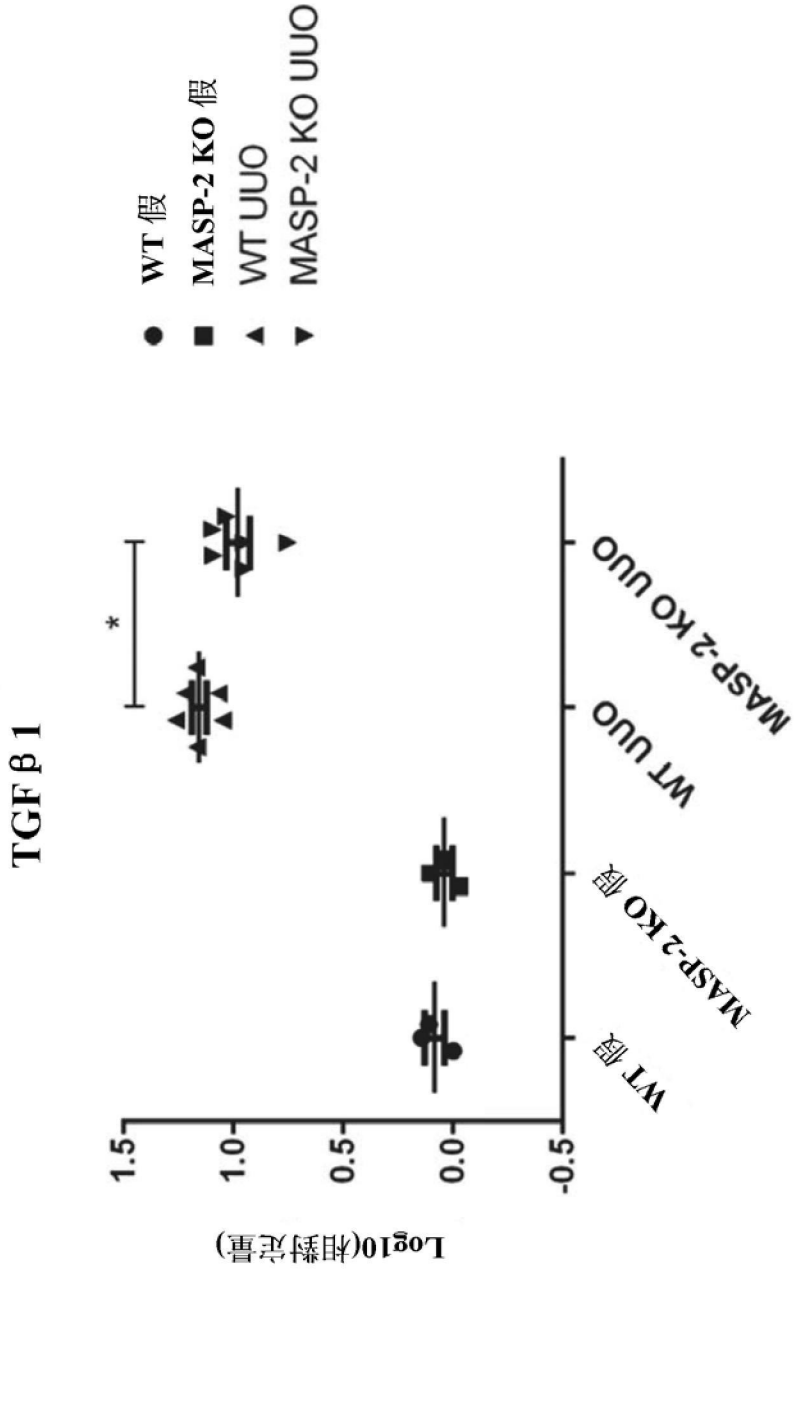

TGF β 1
WT 假
MASP-2 KO 假
WT UUO
MASP-2 KO UUO
*
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
Log10(相對定量)
WT 假
MASP-2 KO 假
WT UUO
MASP-2 KO UUO
小鼠組

圖 18

*p=0.0174

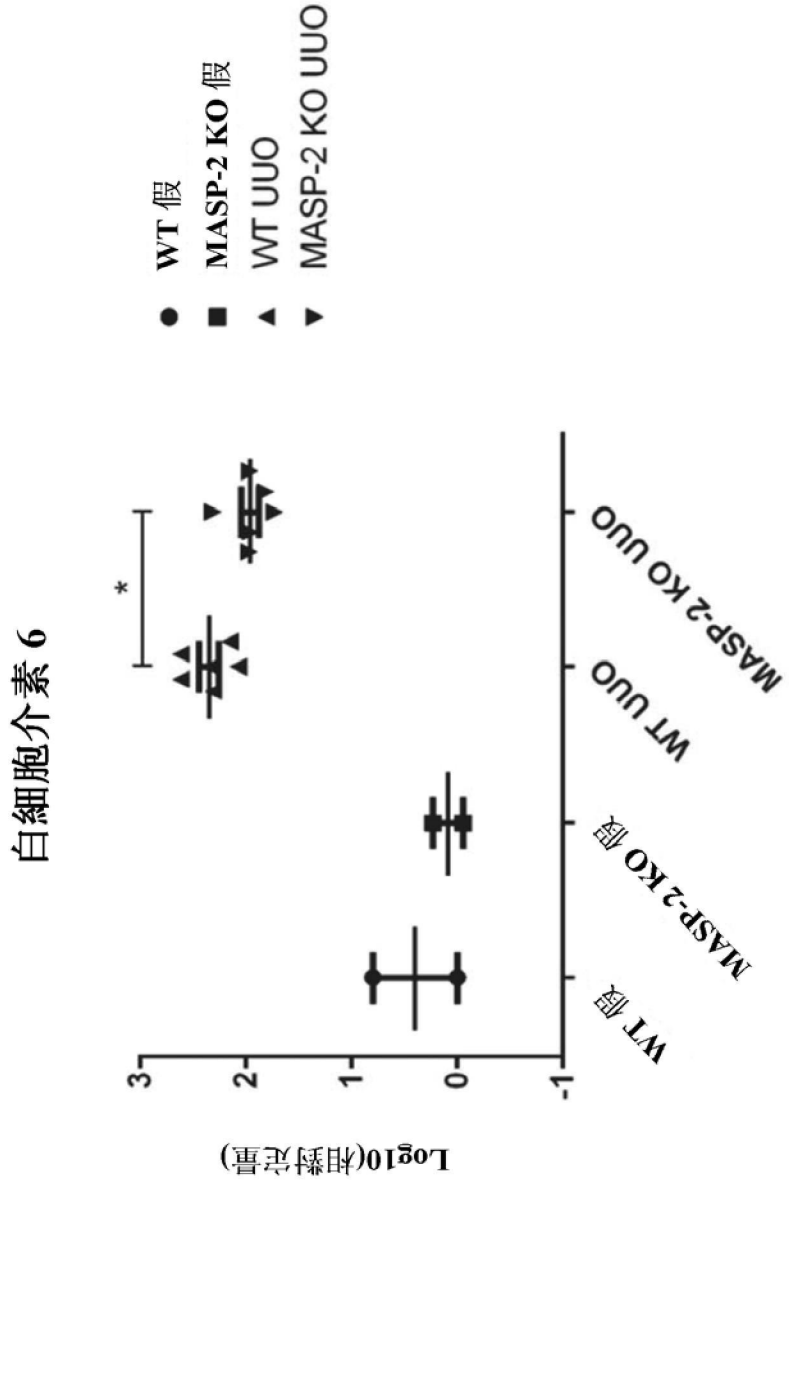

白細胞介素 6
WT 假
MASP-2 KO 假
WT UUO
MASP-2 KO UUO
*
Log10(相對定量)
3
2
1
0
-1
WT 假
MASP-2 KO 假
WT UUO
MASP-2 KO UUO
小鼠組

圖 19

*p=0.0109

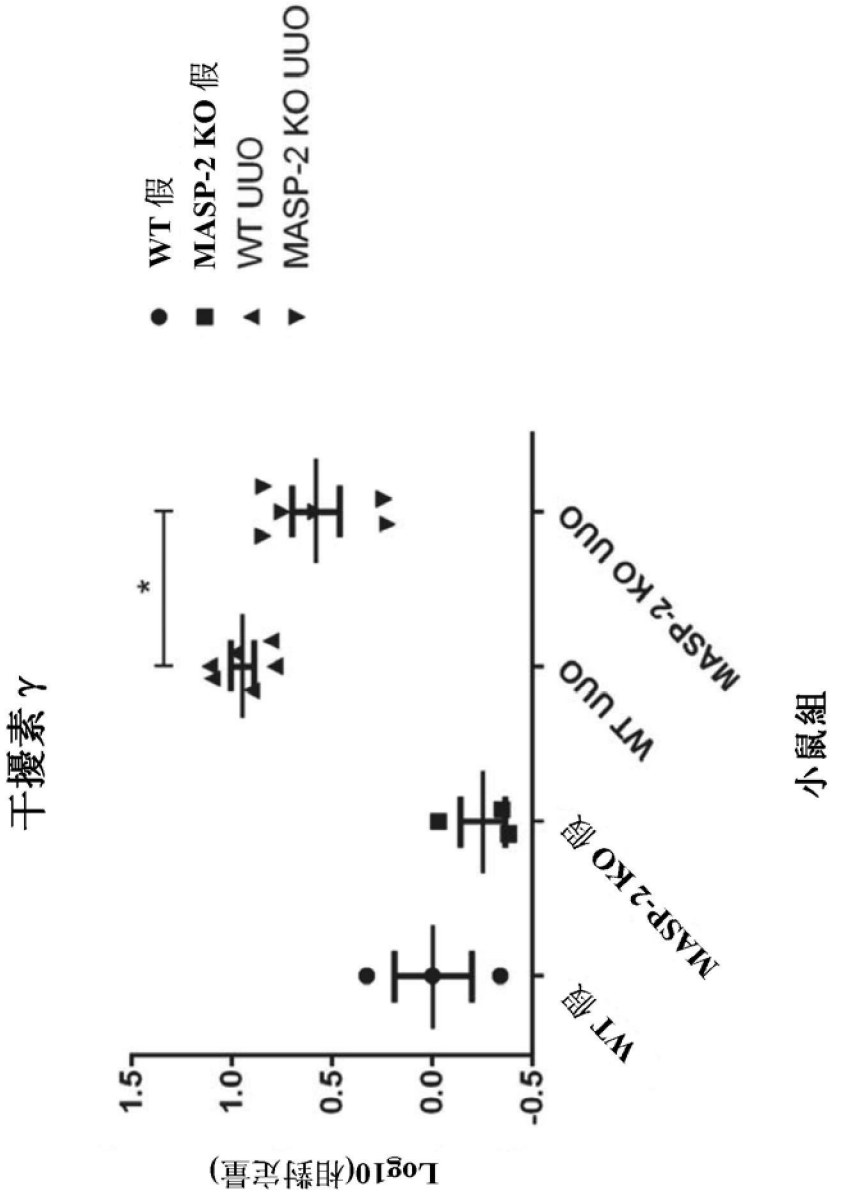

WT 假
MASP-2 KO 假
WT UUO
MASP-2 KO UUO
干擾素 γ
Log10(相對定量)
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
*
WT 假
MASP-2 KO 假
WT UUO
MASP-2 KO UUO
小鼠組

圖 20

*p=0.0182

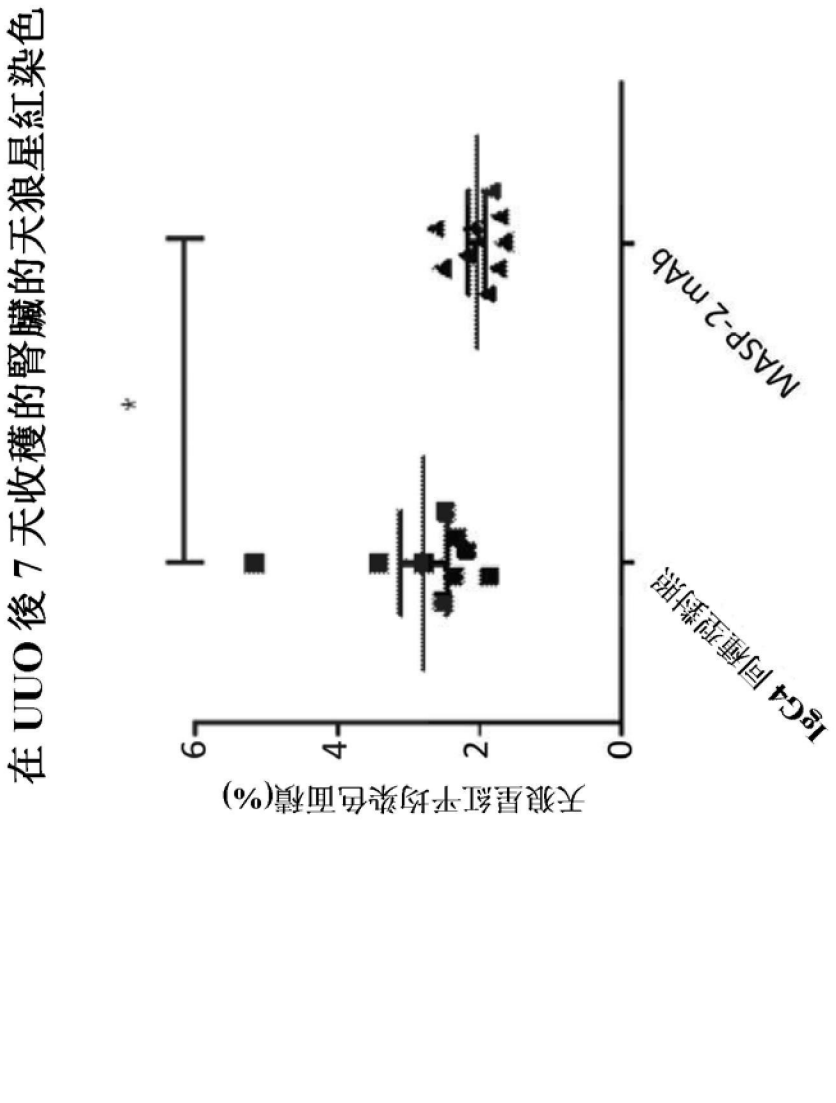

在 UUO 後 7 天收穫的腎臟的天狼星紅染色
天狼星紅平均染色面積(%)
0
2
4
6
*
IgG4 同種型對照
MASP-2 mAb
*p=0.0477

圖 21

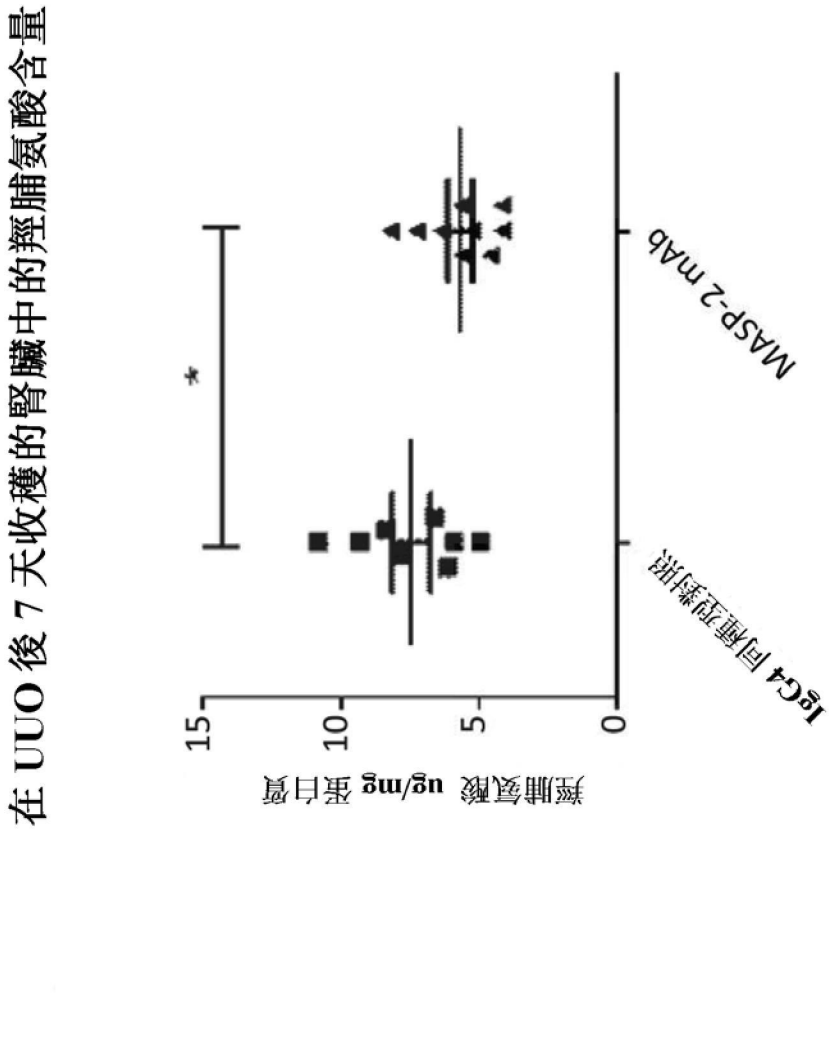

在 UUO 後 7 天收穫的腎臟中的羥脯氨酸含量
羥脯氨酸 ug/mg 蛋白質
15
10
5
0
*
IgG4 同種型對照
MASP-2 mAb

圖 22

*p=0.0439

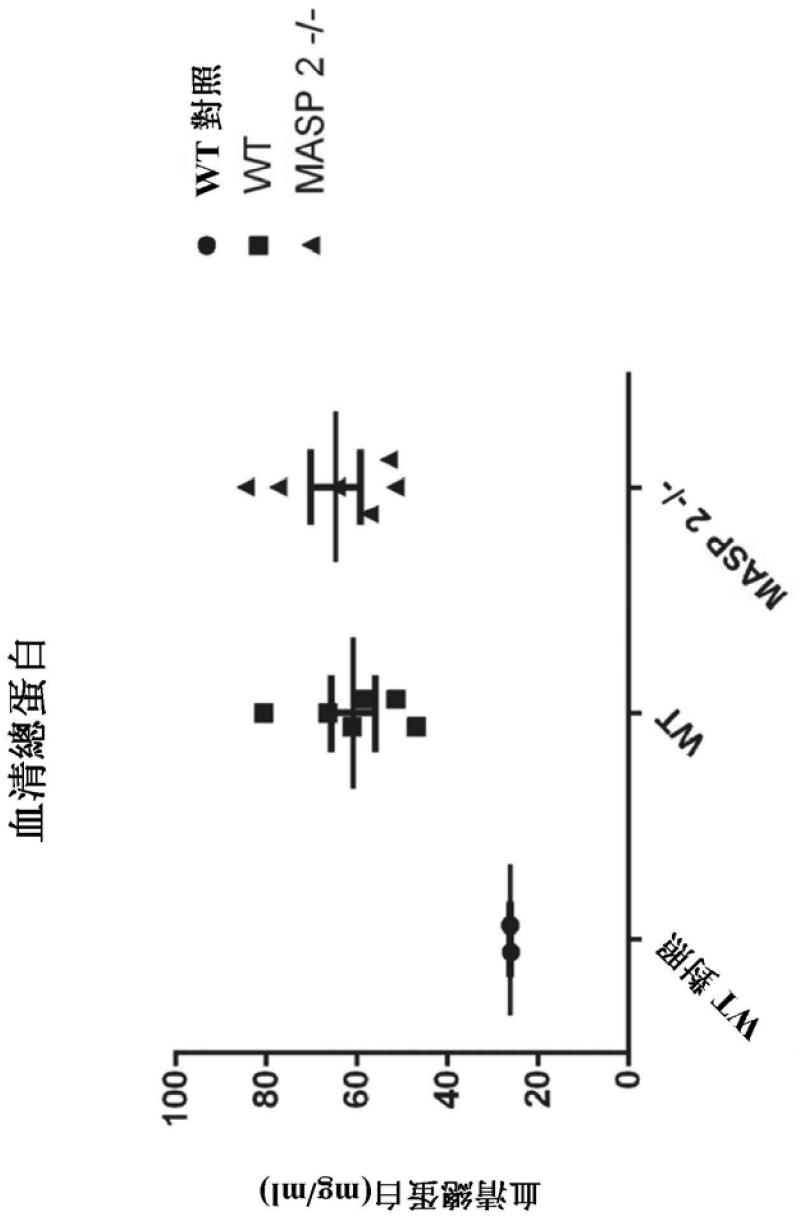


圖 23

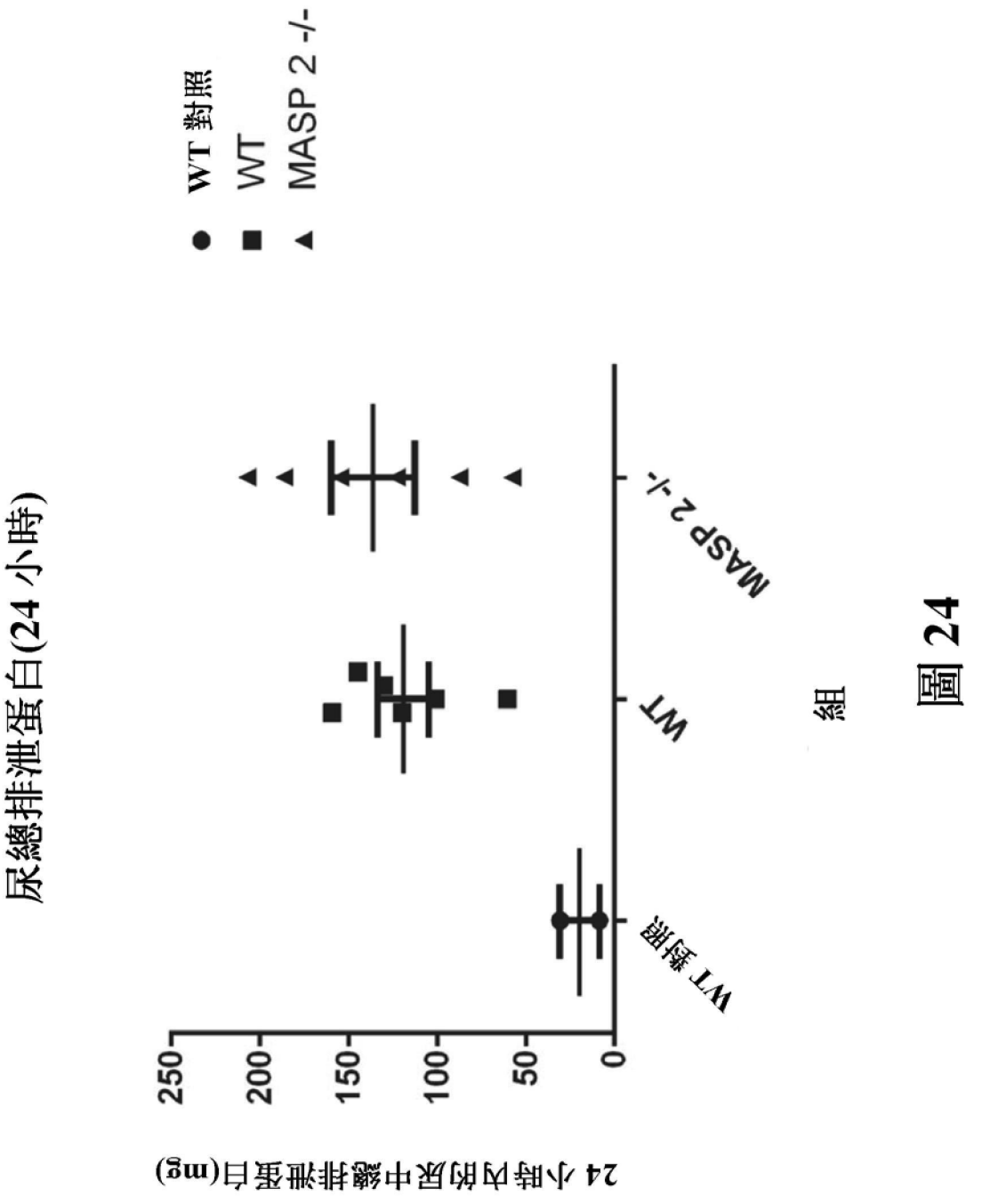

尿總排泄蛋白(24 小時)
WT 對照
WT
MASP 2 -/-
250
200
150
100
50
0
WT 對照
WT
MASP 2 -/-
組
24 小時內的尿中總排泄蛋白(mg)

圖 24

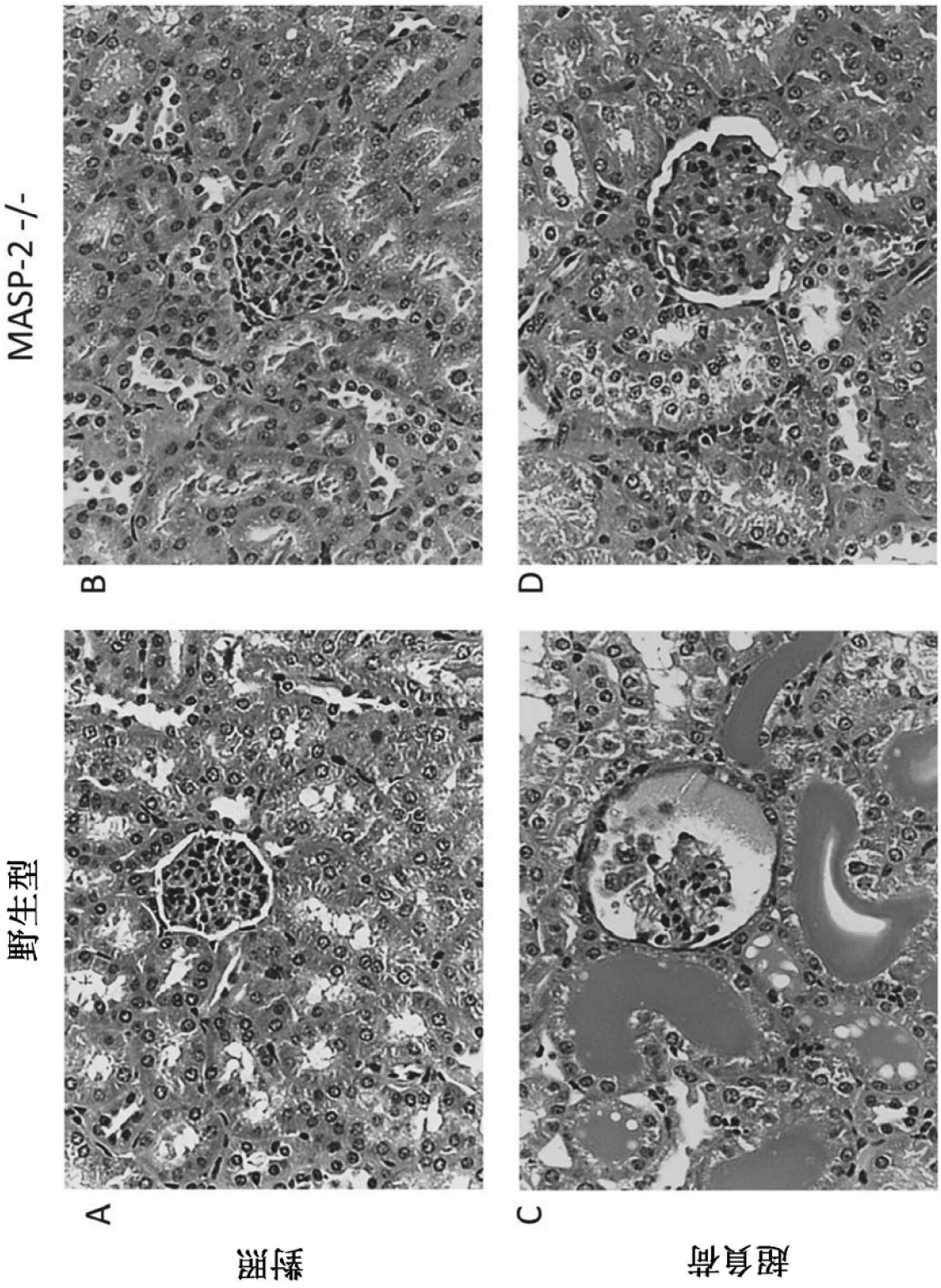


圖 25

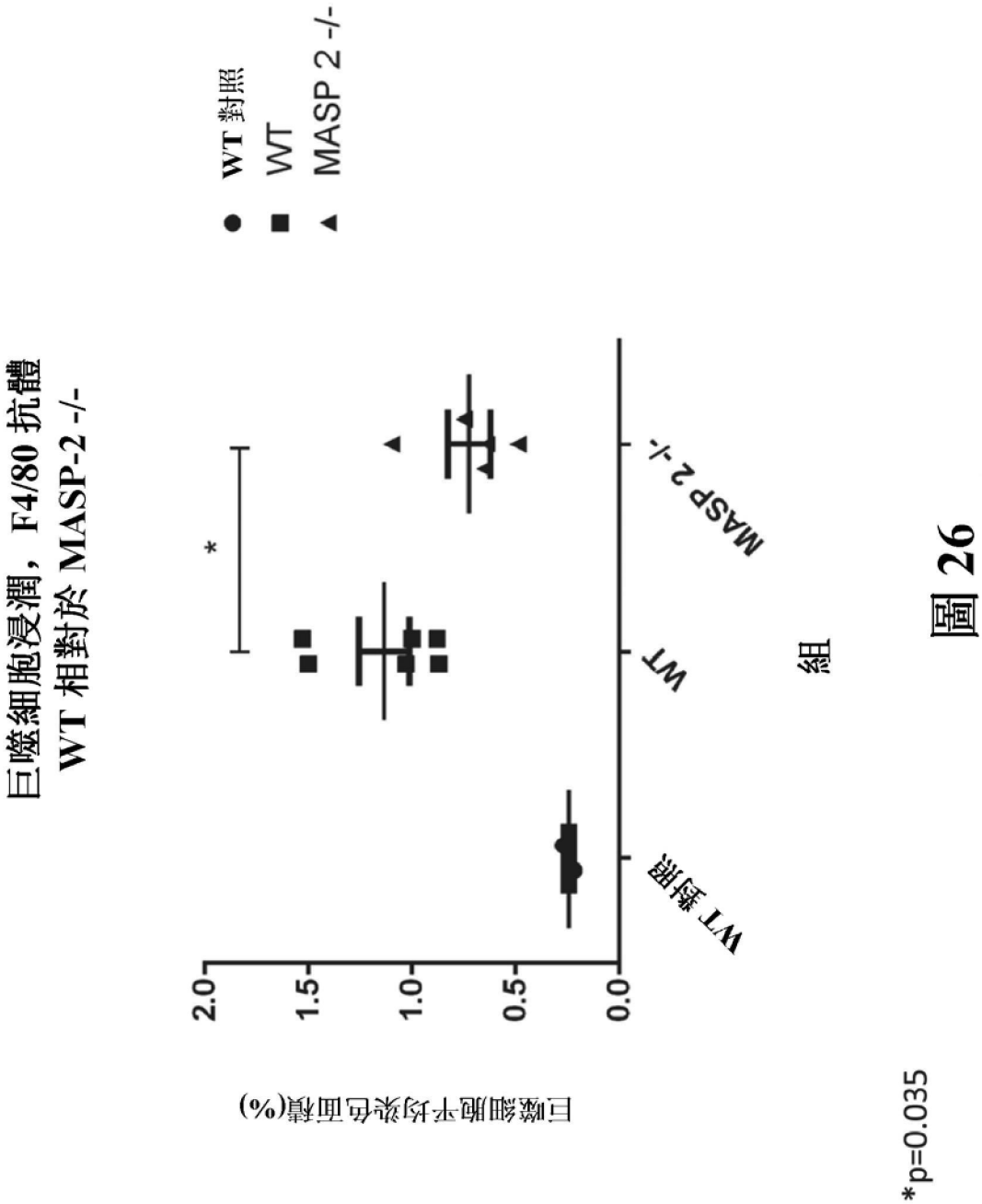

巨噬細胞浸潤，F4/80 抗體
WT 相對於 MASP-2 -/-
WT 對照
WT
MASP 2 -/-
巨噬細胞平均染色面積(%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
WT 對照
WT
MASP 2 -/-
組
*p=0.035

圖 26

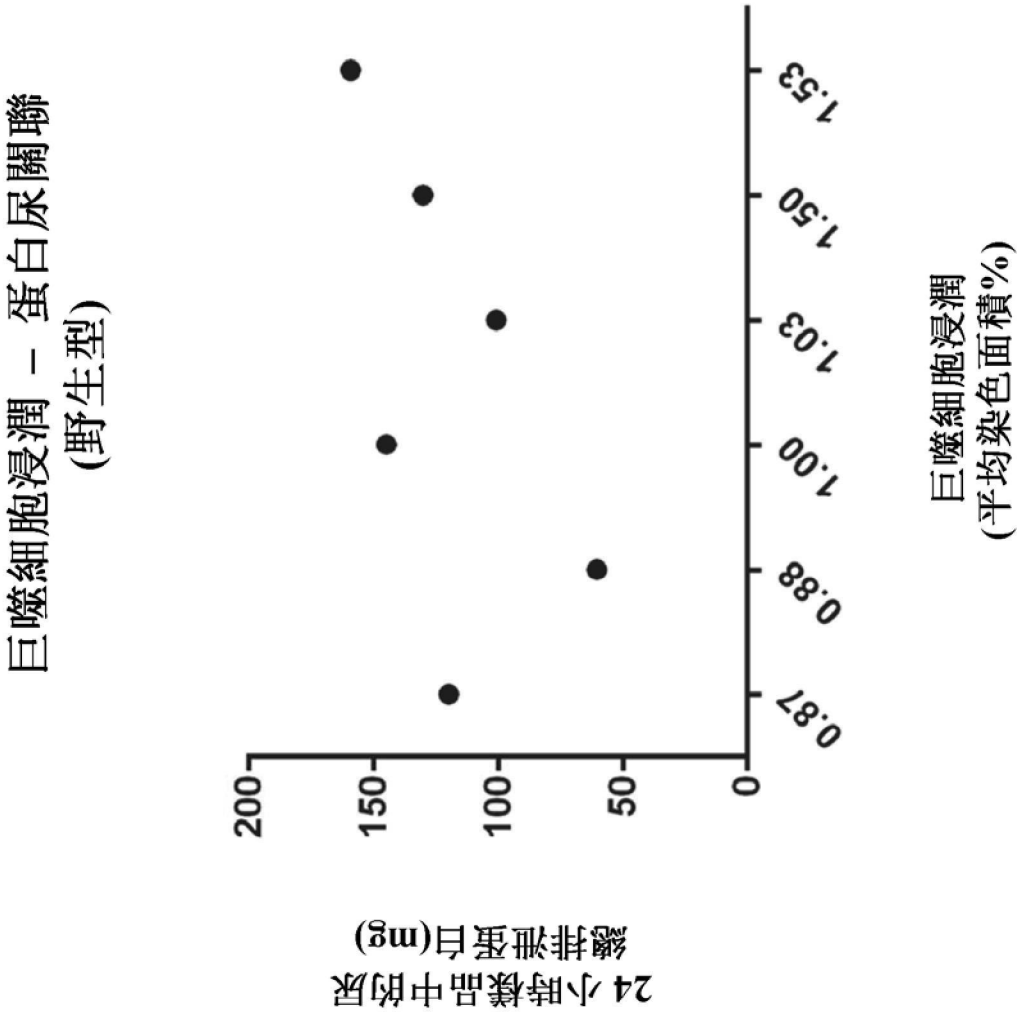

巨噬細胞浸潤 – 蛋白尿關聯
(野生型)
24小時樣品中的尿
總排泄蛋白(mg)
200
150
100
50
0
0.87
0.88
1.00
1.03
1.50
1.53
巨噬細胞浸潤
(平均染色面積%)

圖 27A

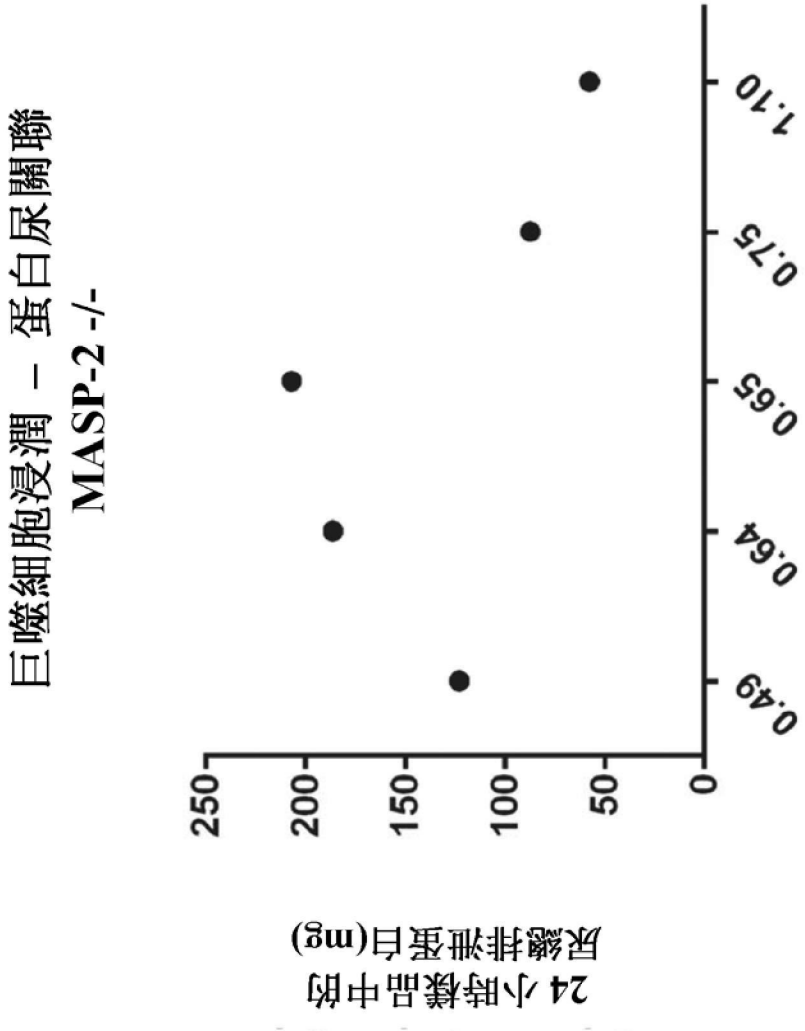

巨噬細胞浸潤 – 蛋白尿關聯
MASP-2 -/-
24 小時樣品中的
尿總排泄蛋白(mg)
250
200
150
100
50
0
0.49
0.64
0.65
0.75
1.10
巨噬細胞浸潤
(平均染色面積%)

圖 27B

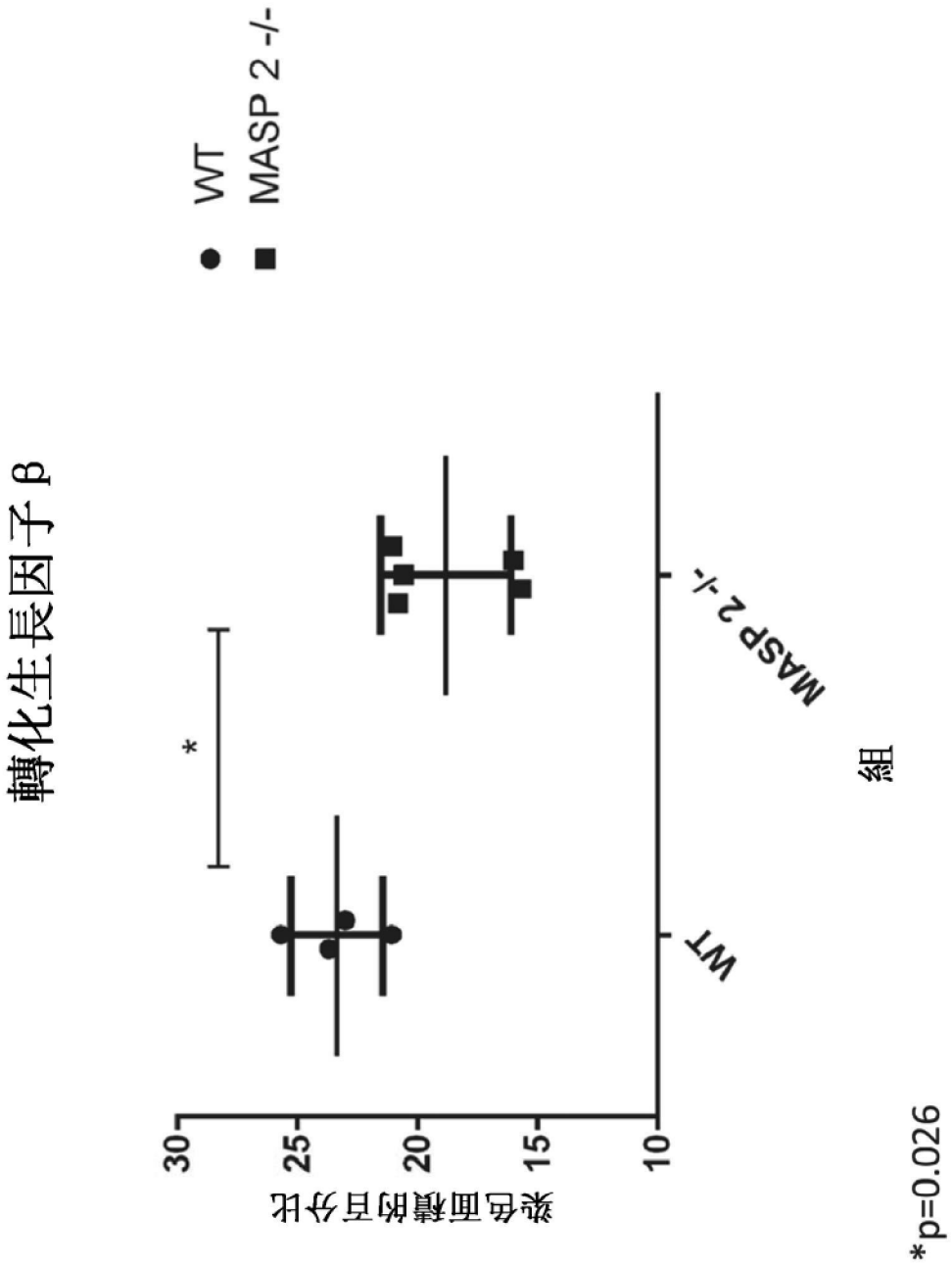


圖 28

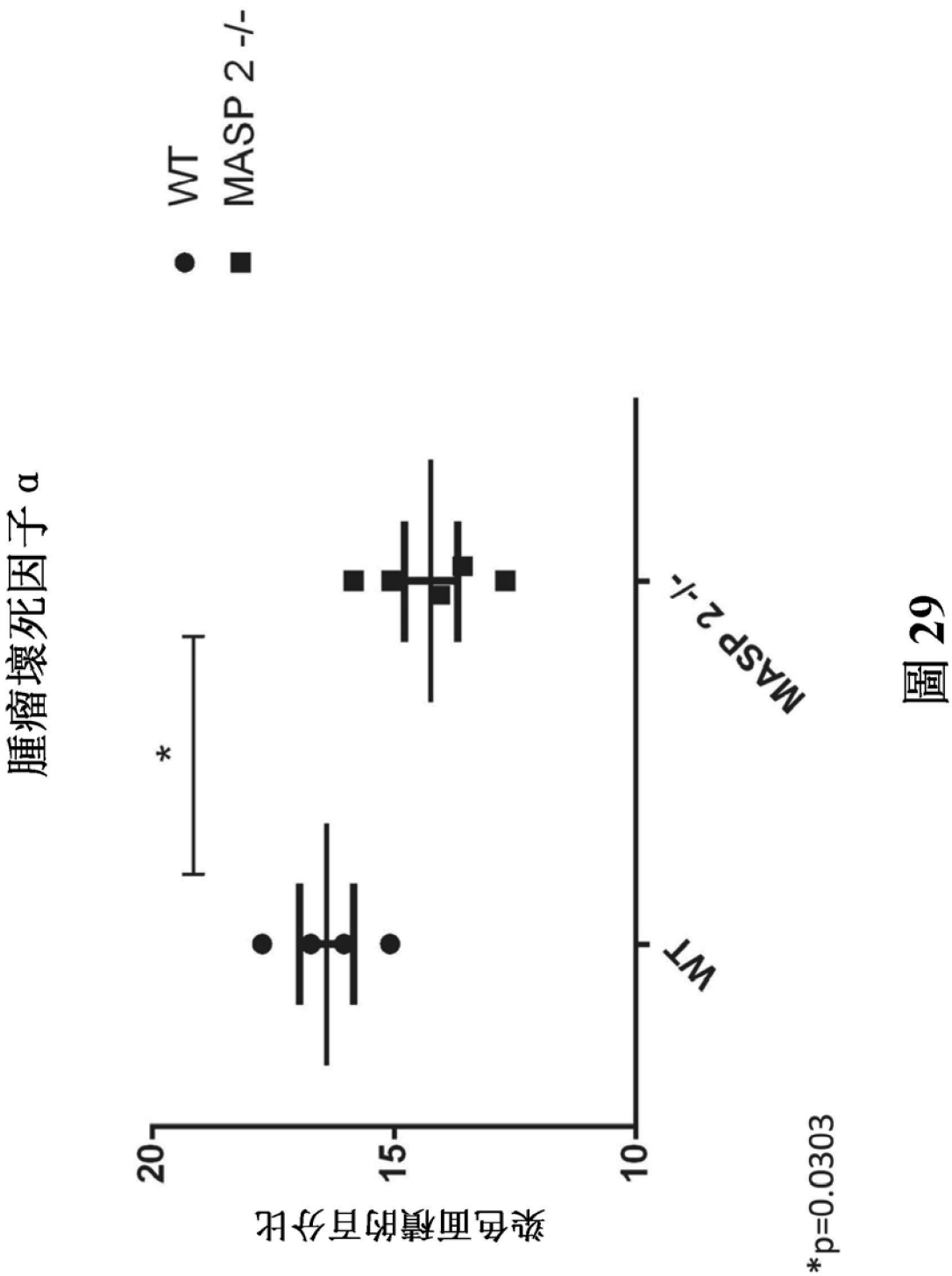


圖 29

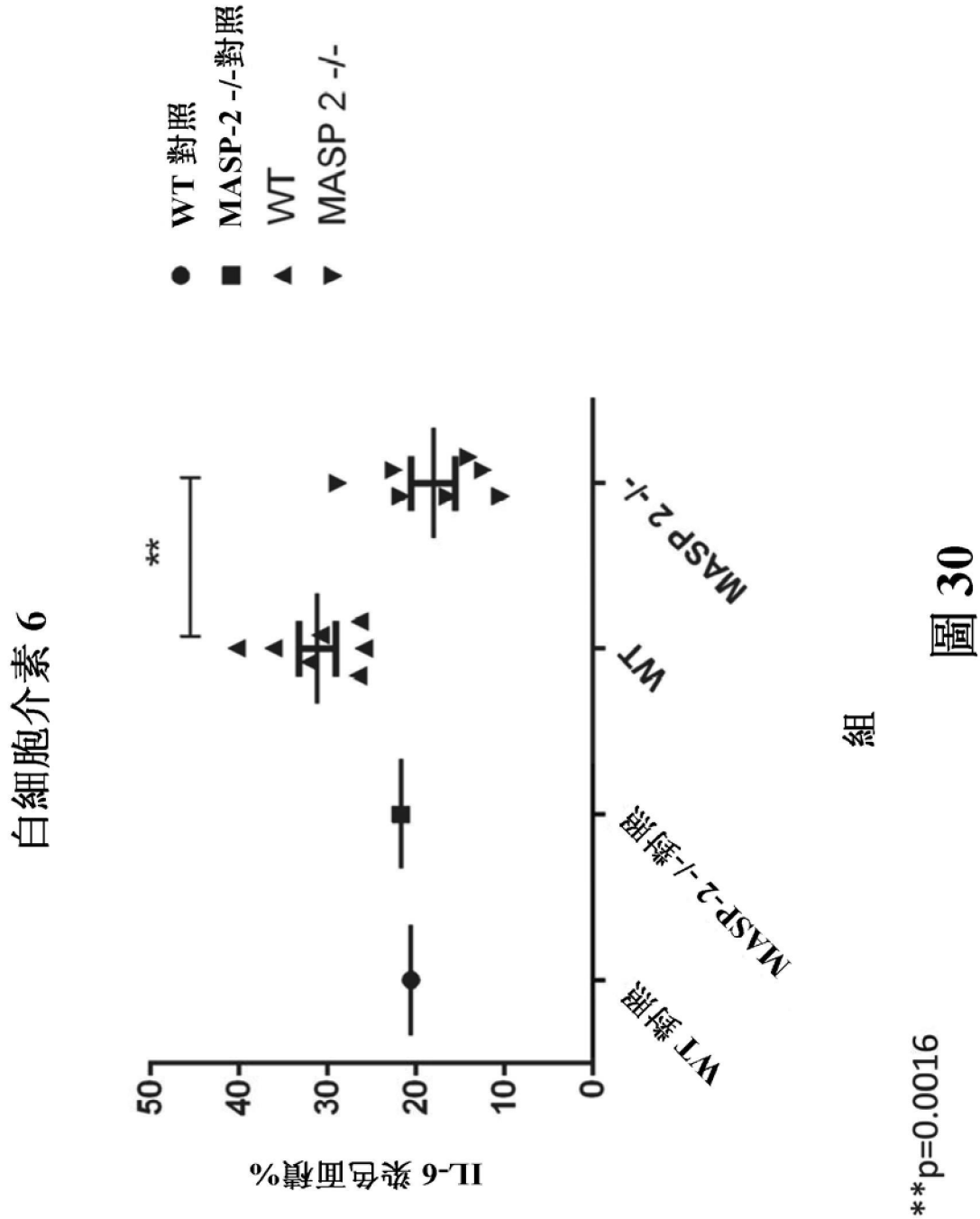

白細胞介素 6
WT 對照
MASP-2 -/-對照
WT
MASP 2 -/-
**
IL-6 染色面積%
50
40
30
20
10
0
WT 對照
MASP-2 -/-對照
WT
MASP 2 -/-
組
**p=0.0016

圖 30

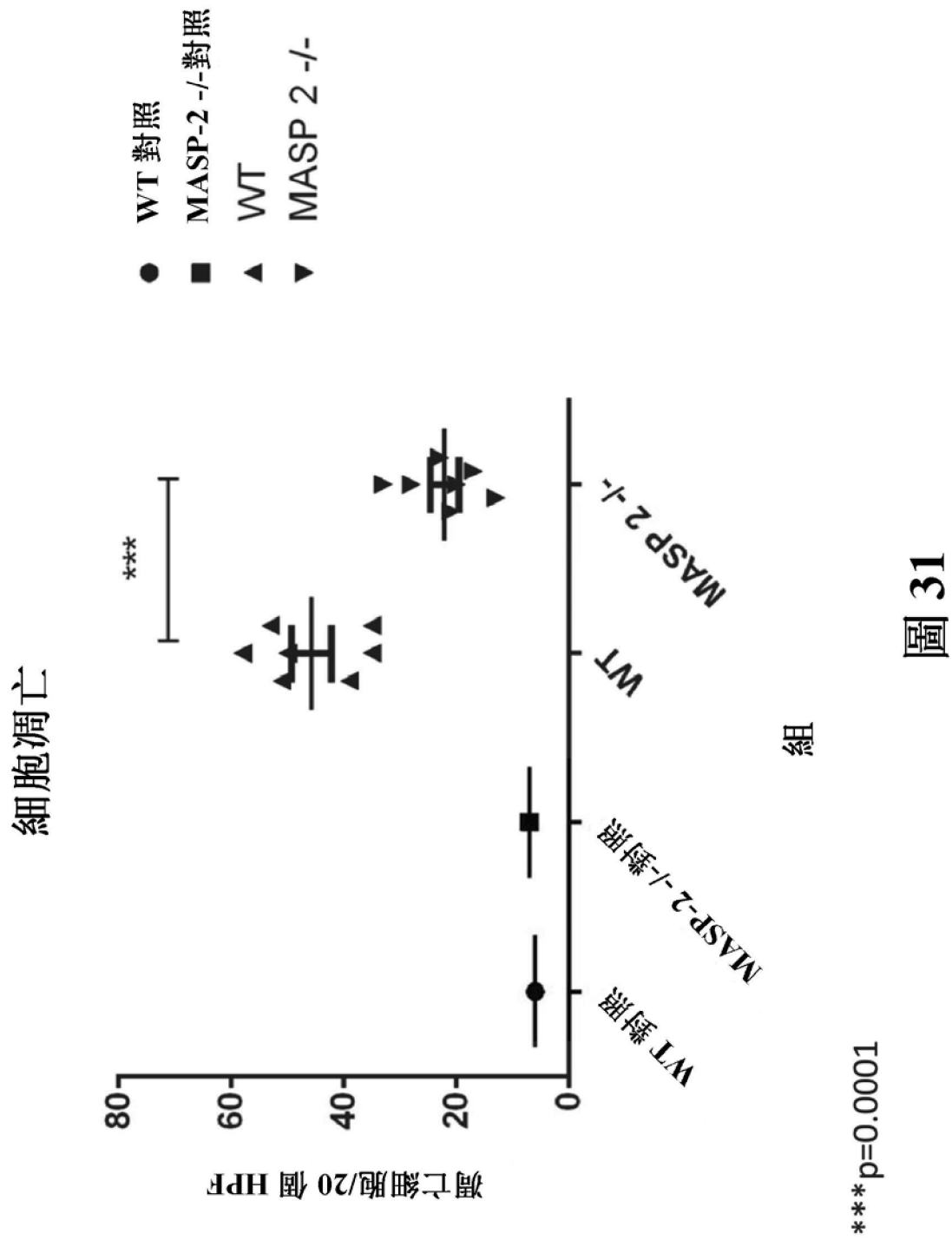

細胞凋亡
WT 對照
MASP-2 -/-對照
WT
MASP 2 -/-
***
凋亡細胞/20 個 HPF
80
60
40
20
0
WT 對照
MASP-2 -/-對照
WT
MASP 2 -/-
組
***p=0.0001

圖 31

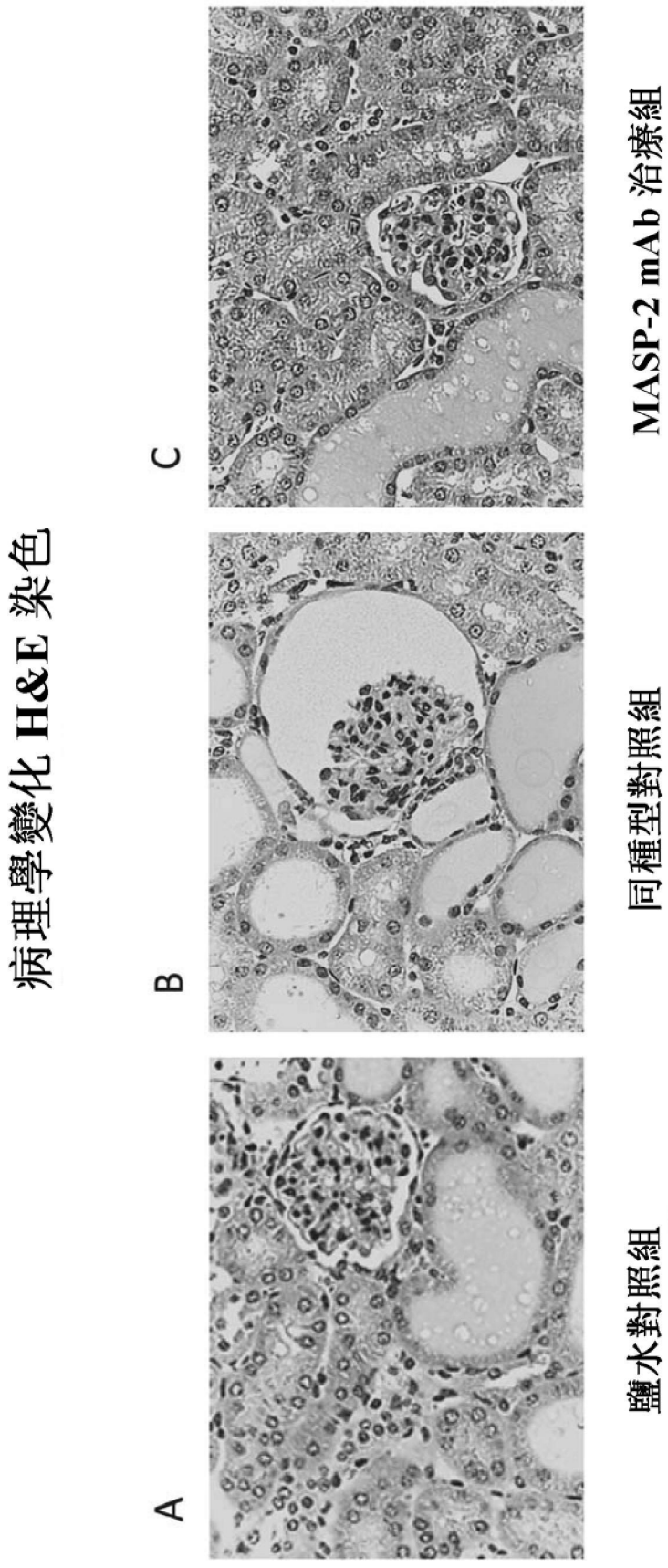


圖 32

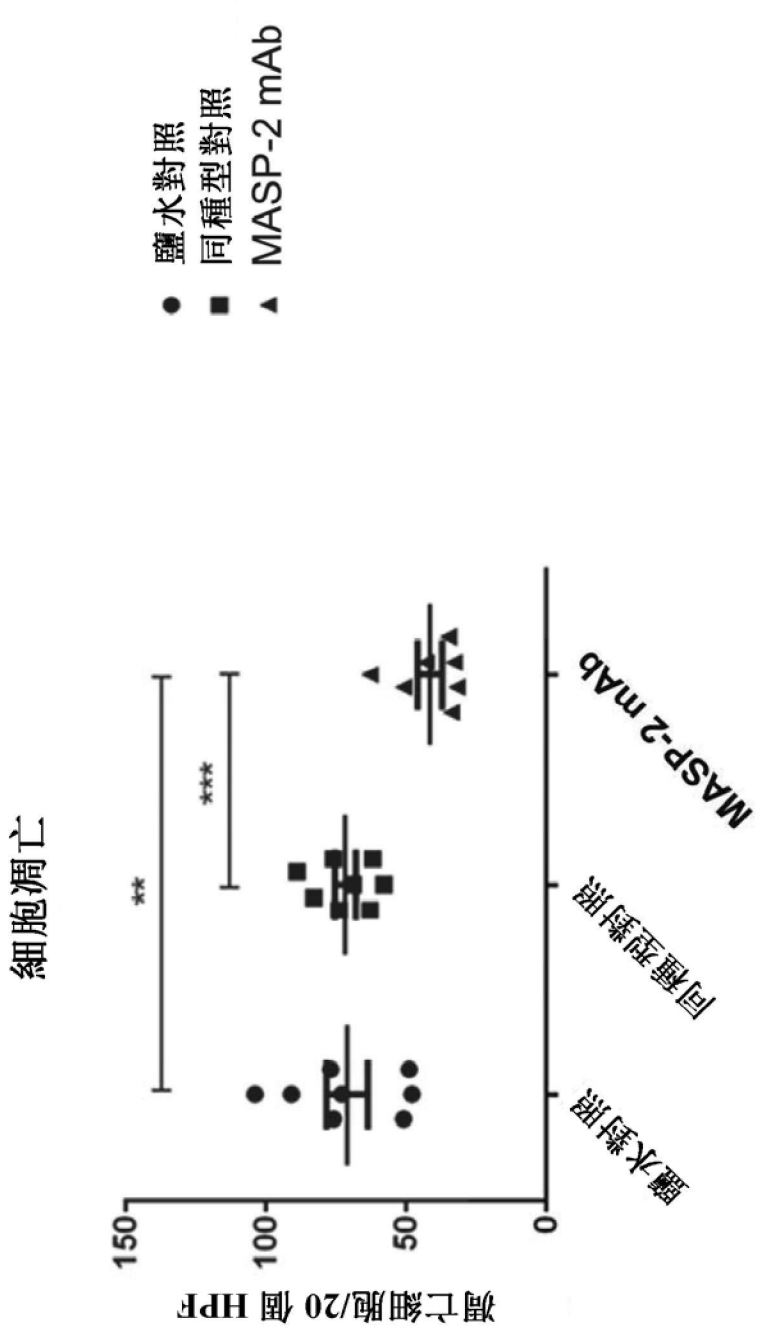


圖 33

**p=0.0002
***p=0.0052

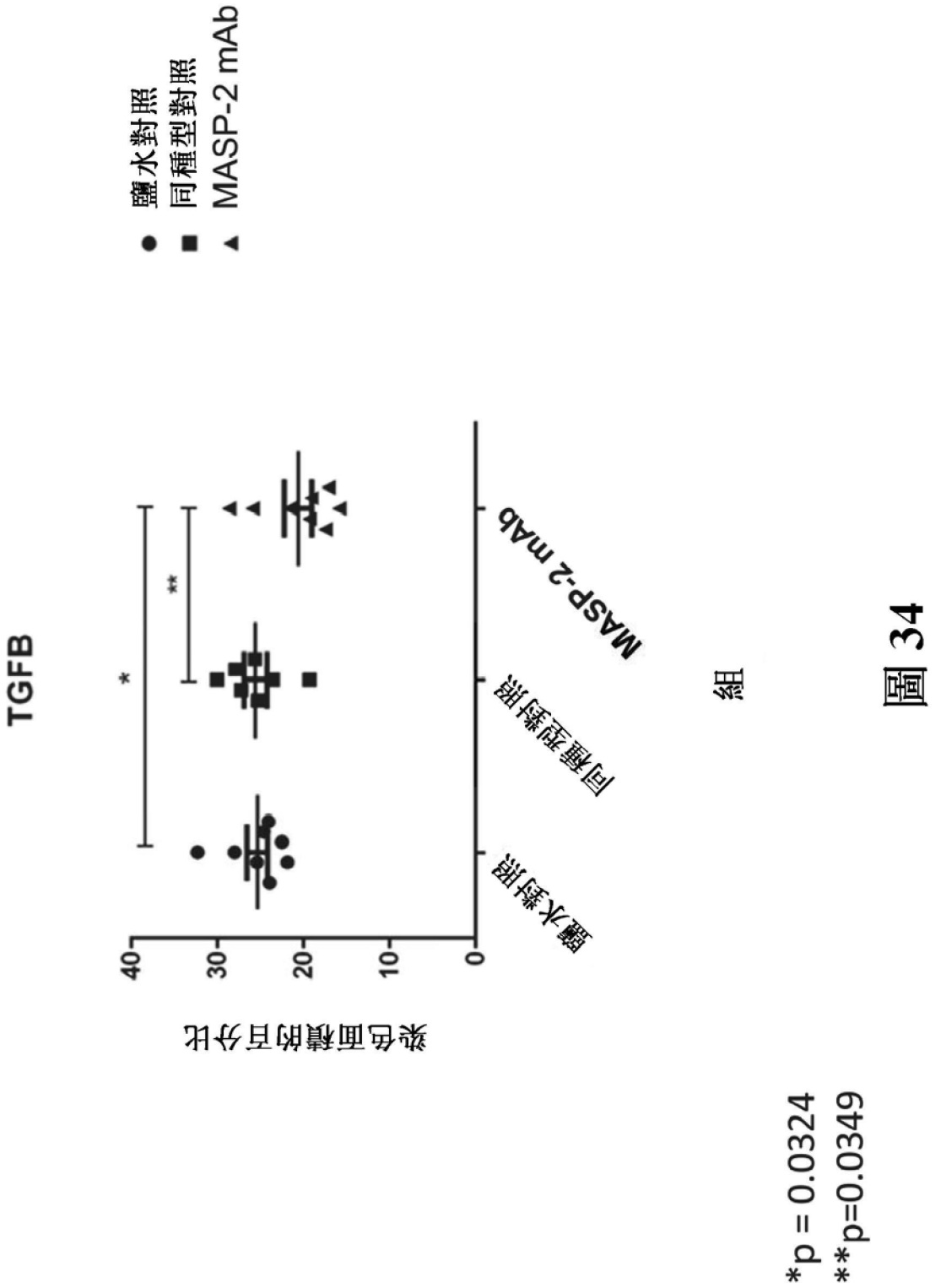

鹽水對照
同種型對照
MASP-2 mAb
TGFB
染色面積的百分比
40
30
20
10
0
*
**
鹽水對照
同種型對照
MASP-2 mAb
組
*p = 0.0324
**p=0.0349

圖 34

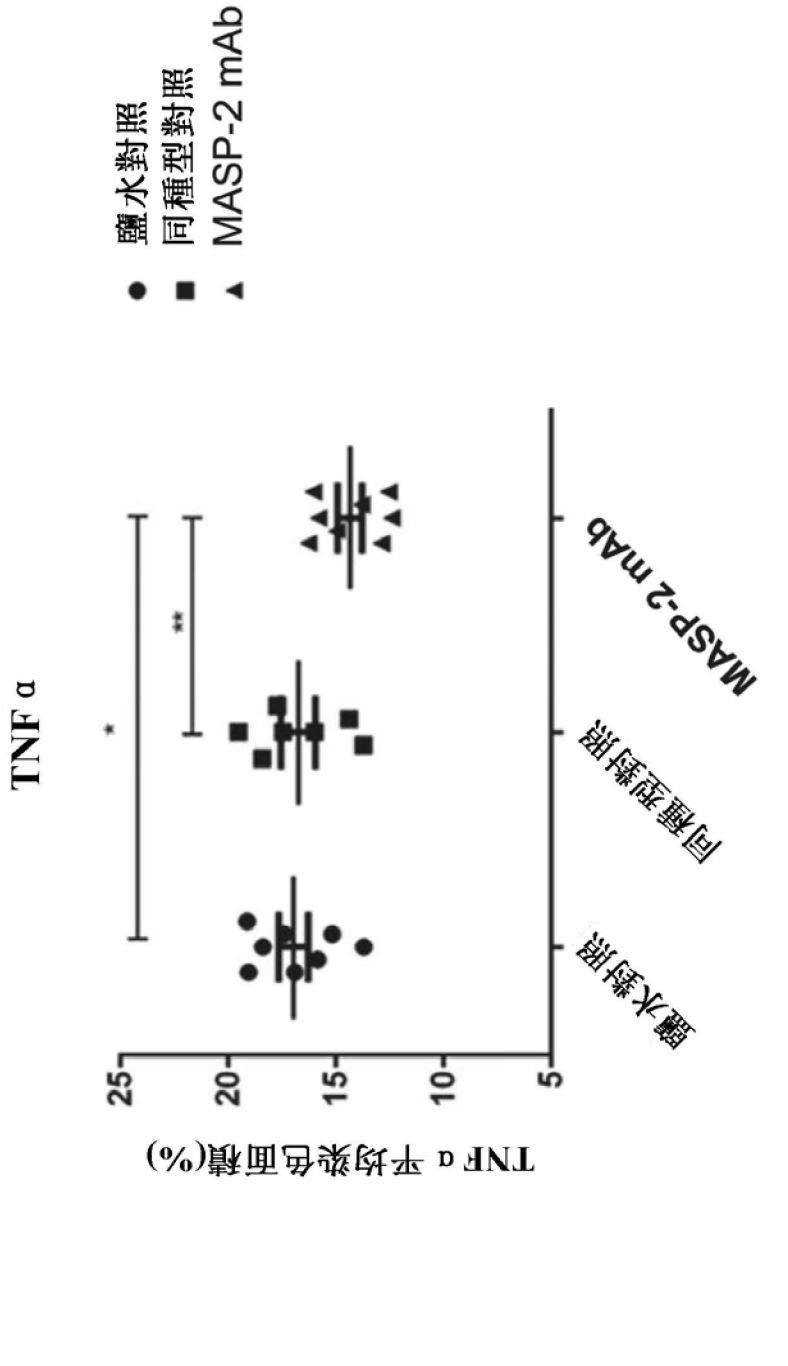

鹽水對照
同種型對照
MASP-2 mAb
TNF α
TNF α 平均染色面積(%)
25
20
15
10
5
*
**
鹽水對照
同種型對照
MASP-2 mAb
小鼠組
*p=0.011
**p=0.0285

圖 35

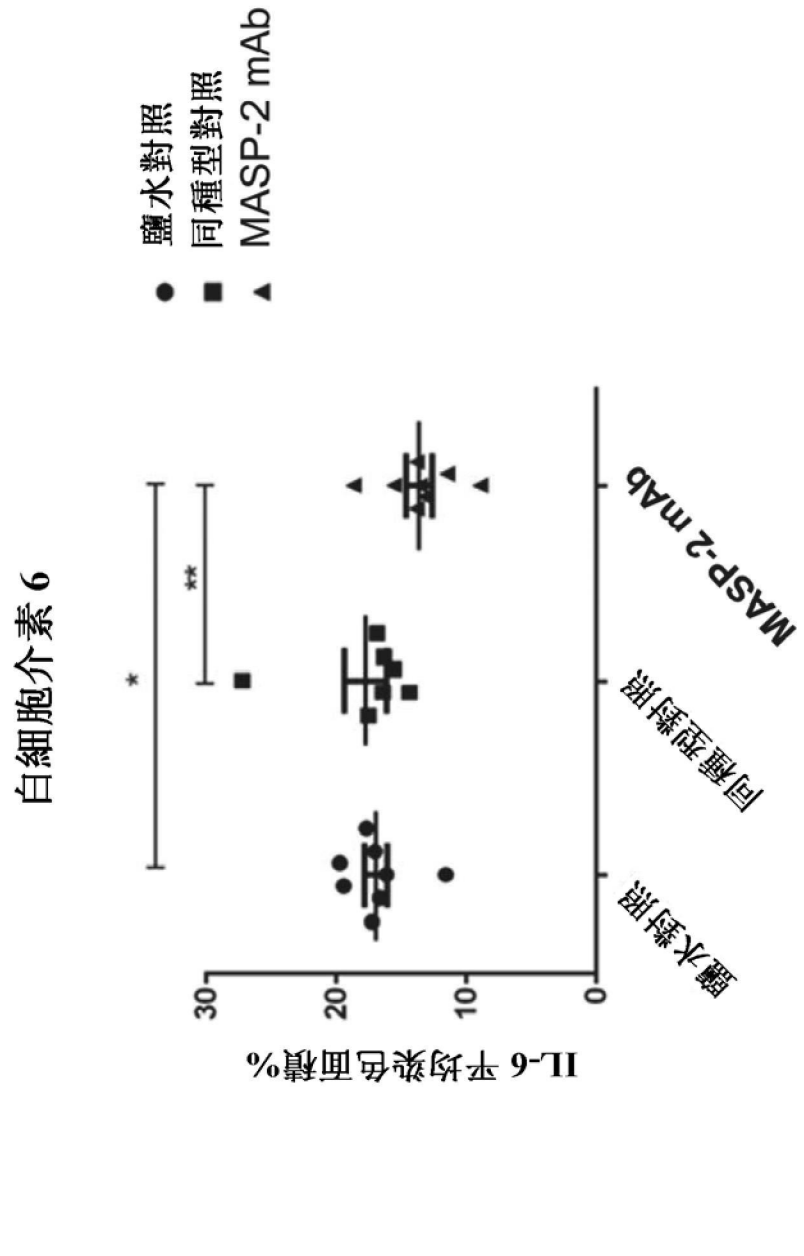

鹽水對照
同種型對照
MASP-2 mAb
白細胞介素 6
IL-6 平均染色面積%
30
20
10
0
*
**
鹽水對照
同種型對照
MASP-2 mAb
小鼠組
*p=0.0269
**p=0.0445

圖 36

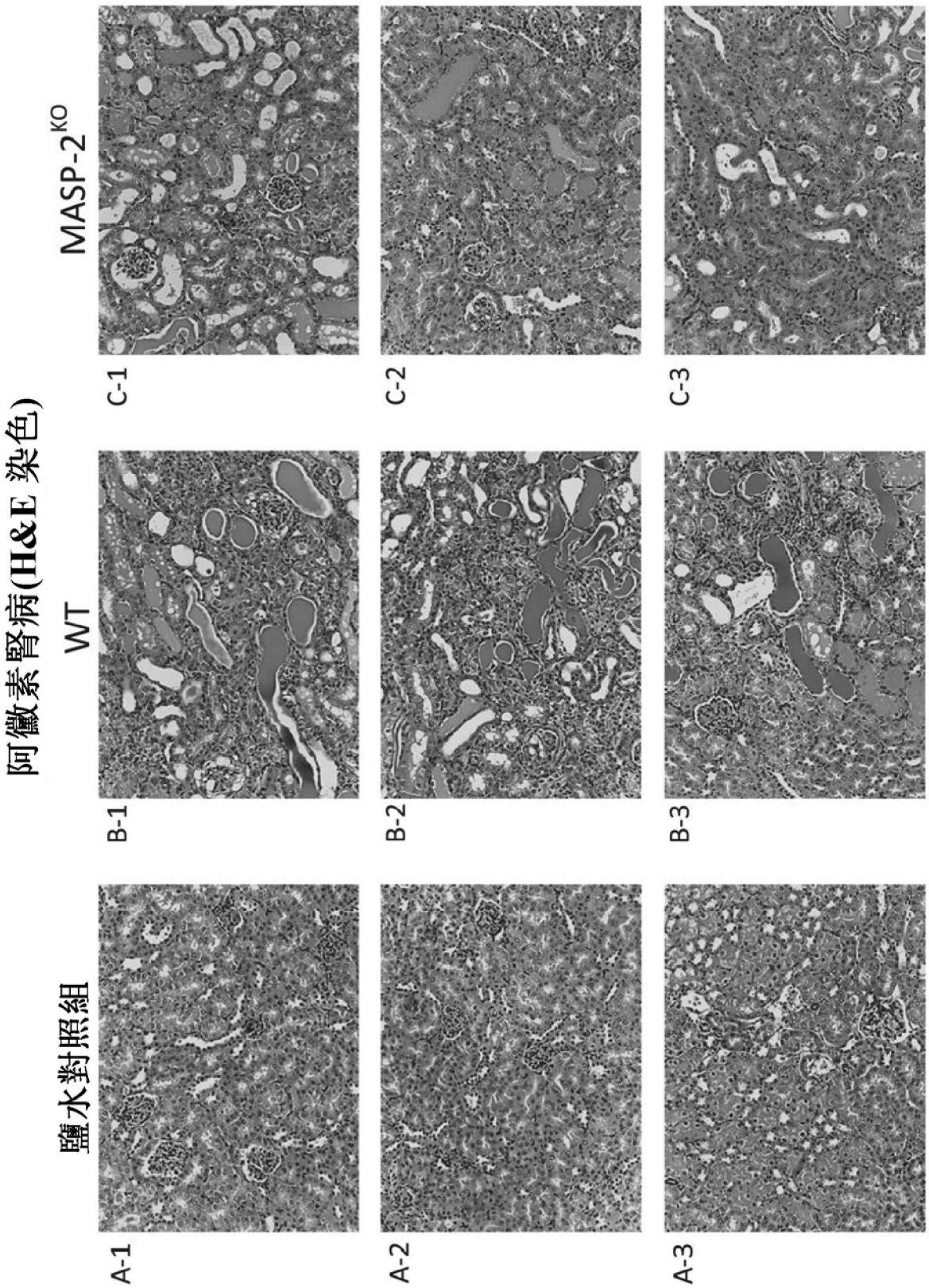


圖 37

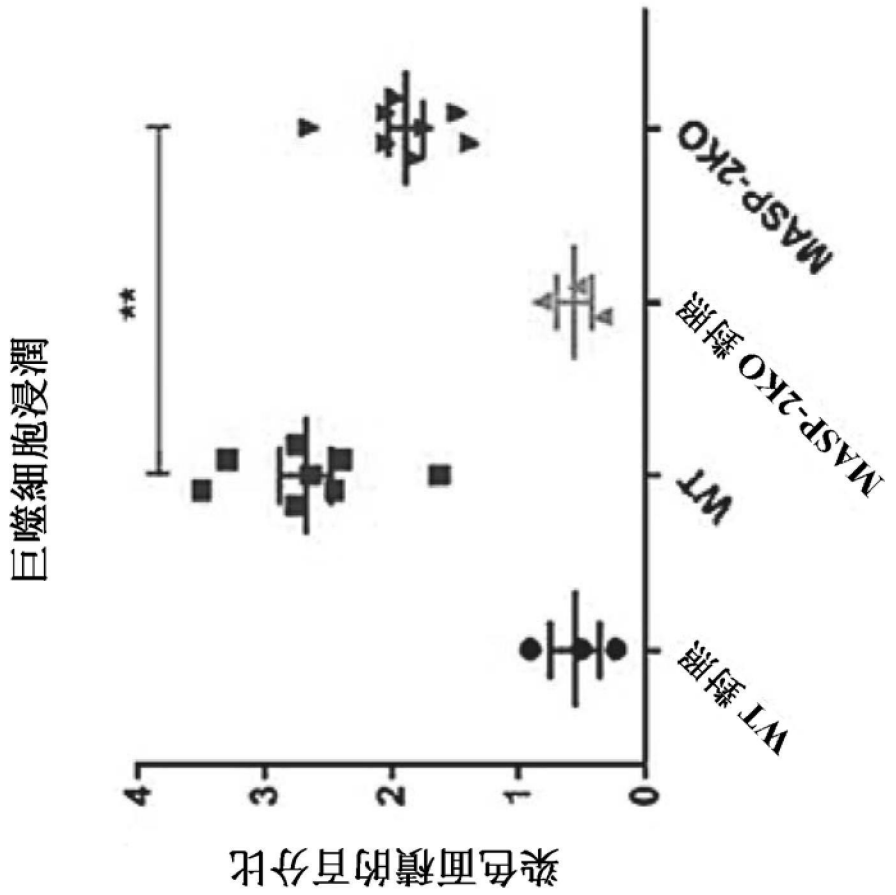


圖 38

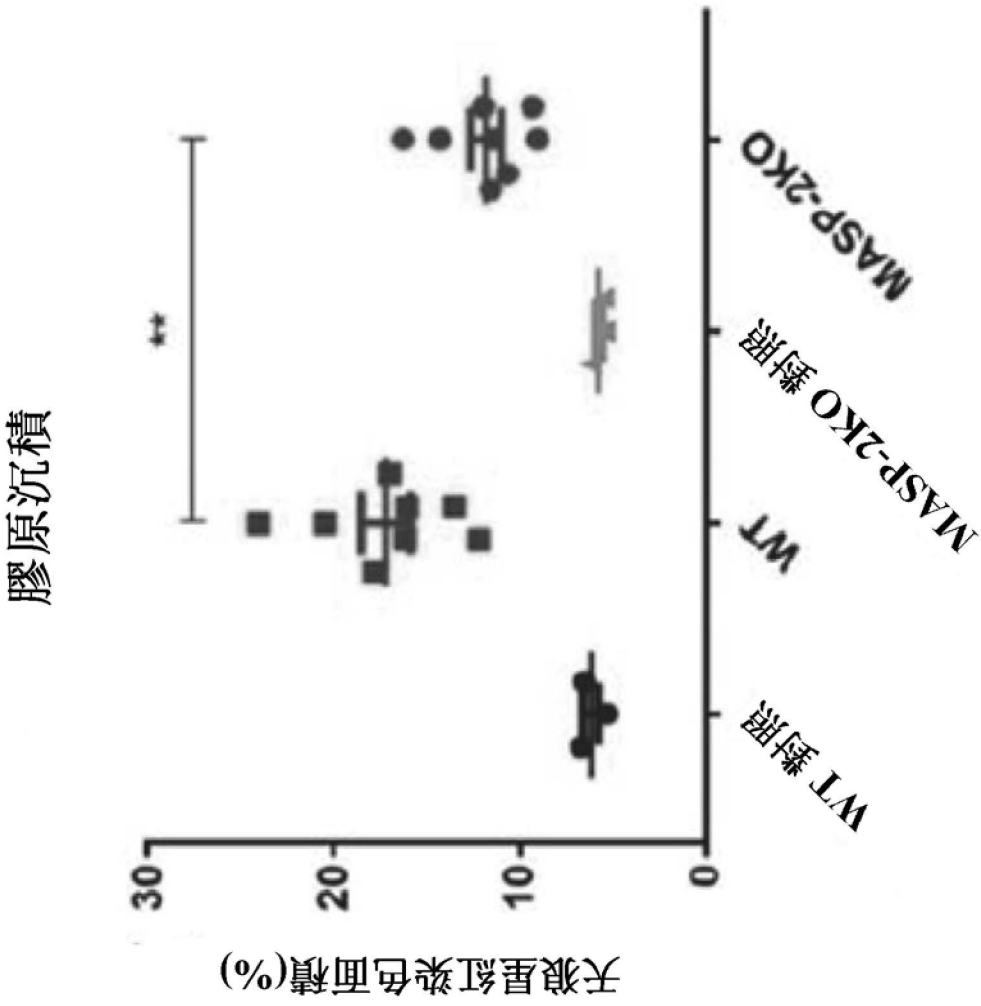


圖 39

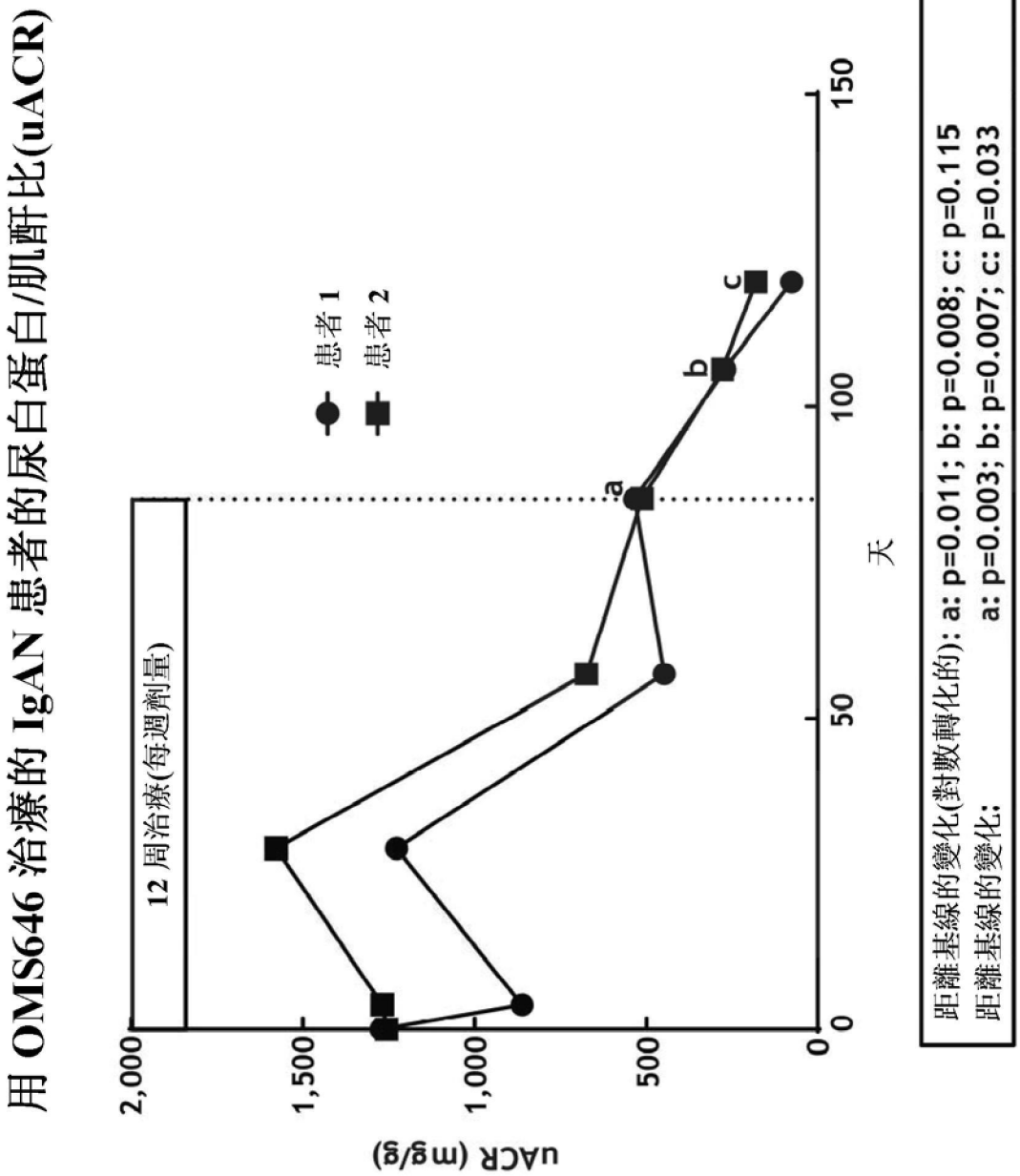

用 OMS646 治療的 IgAN 患者的尿白蛋白/肌酐比(uACR)
12 周治療(每週劑量)
患者 1
患者 2
uACR (mg/g)
2,000
1,500
1,000
500
0
0
50
100
150
天
a
b
c
距離基線的變化(對數轉化的): a: p=0.011; b: p=0.008; c: p=0.115
距離基線的變化: a: p=0.003; b: p=0.007; c: p=0.033

圖 40

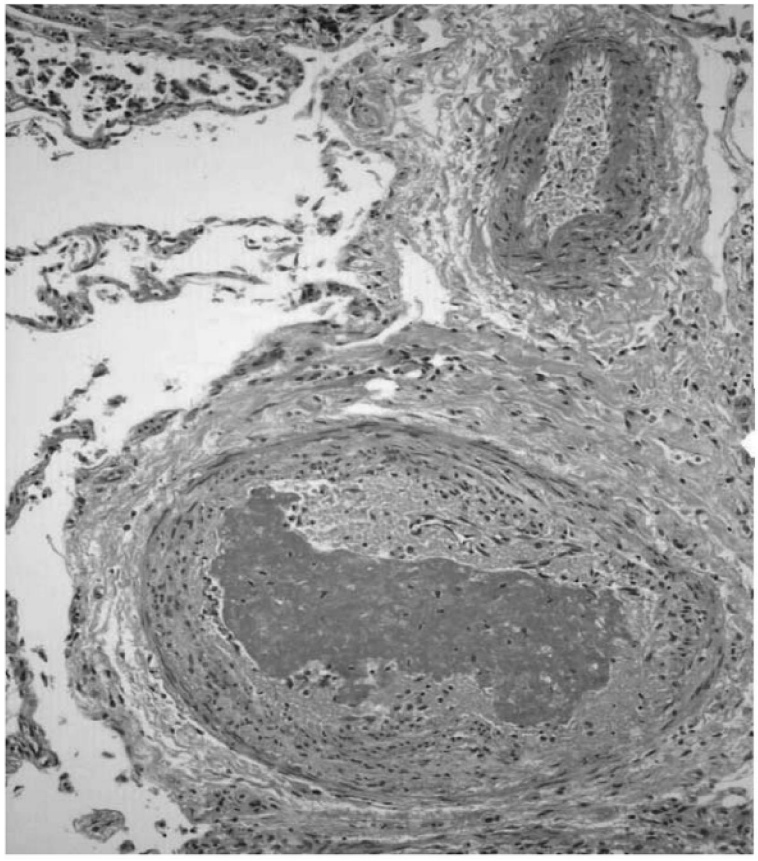


圖 41A

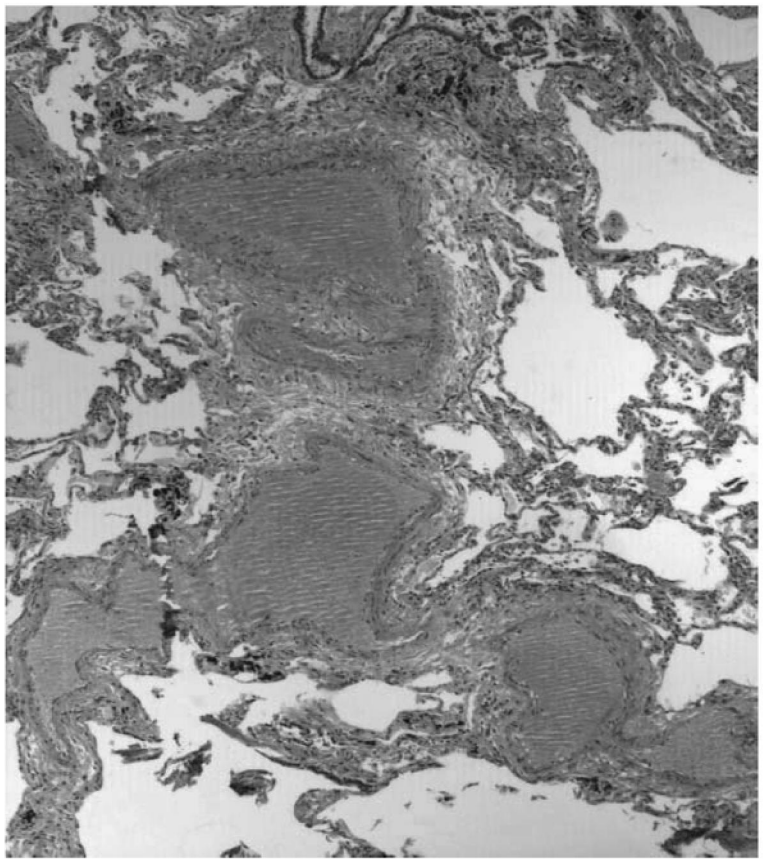


圖 41B

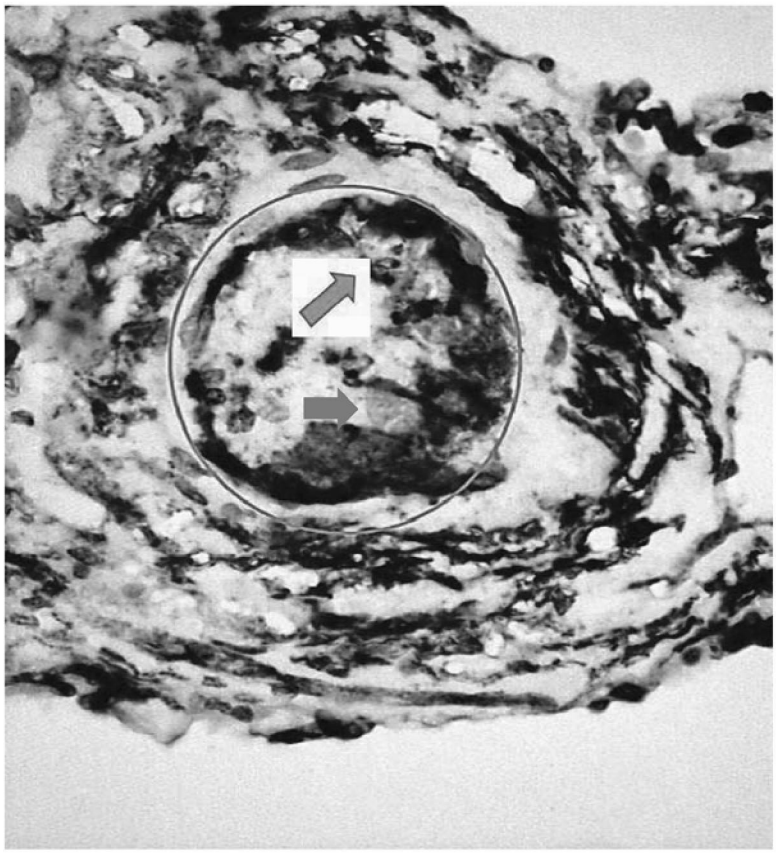


圖 41C

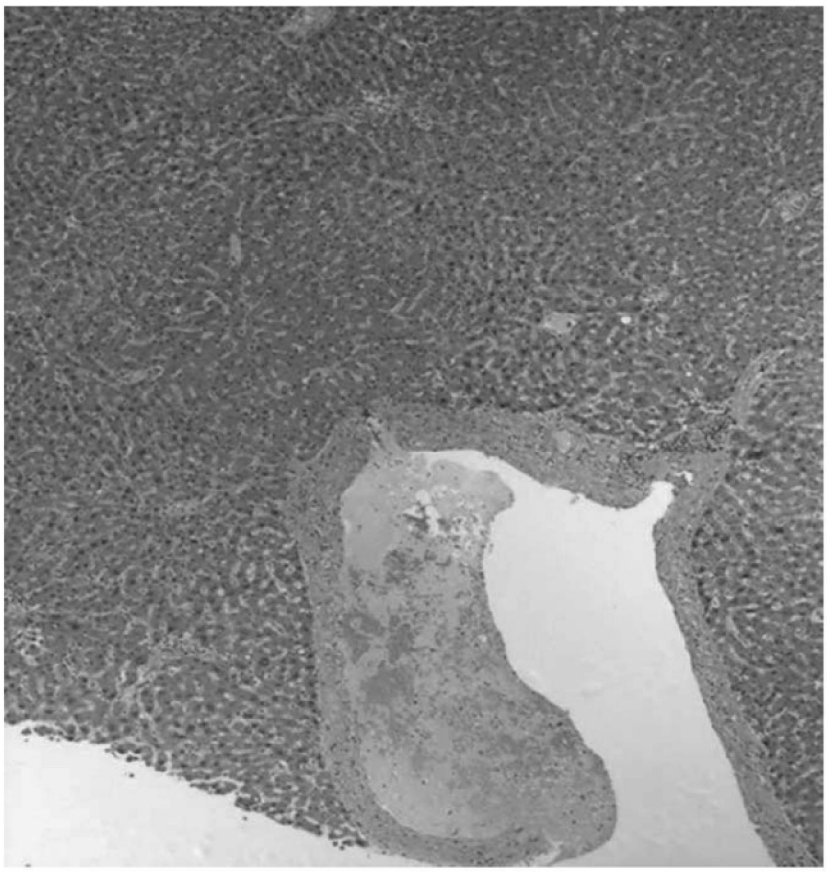


圖 41D

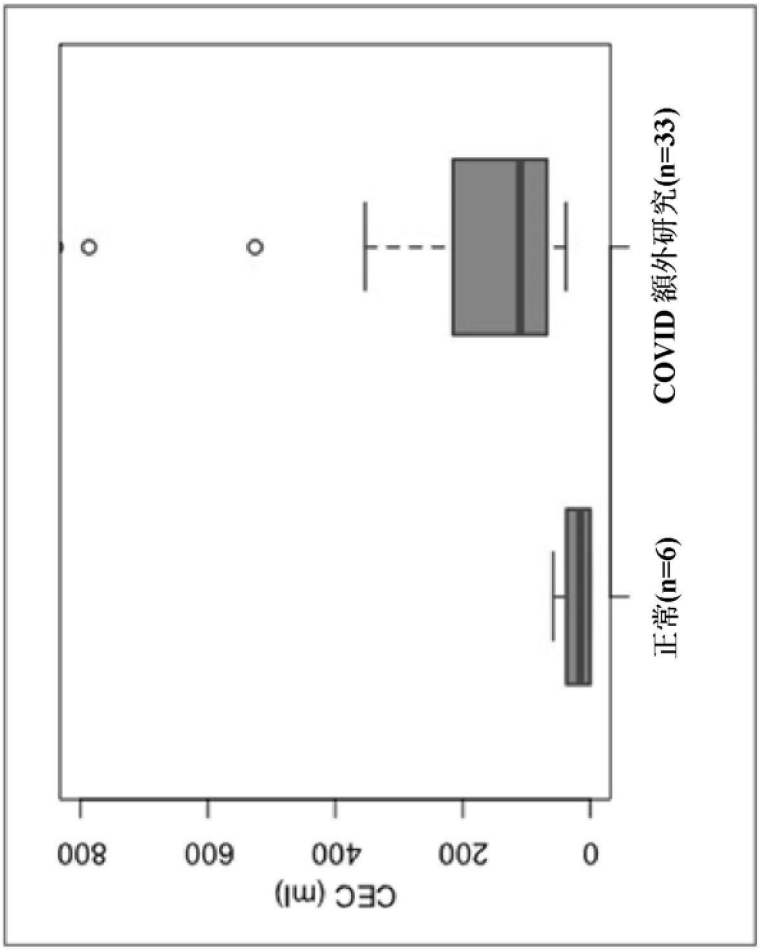


圖 42A

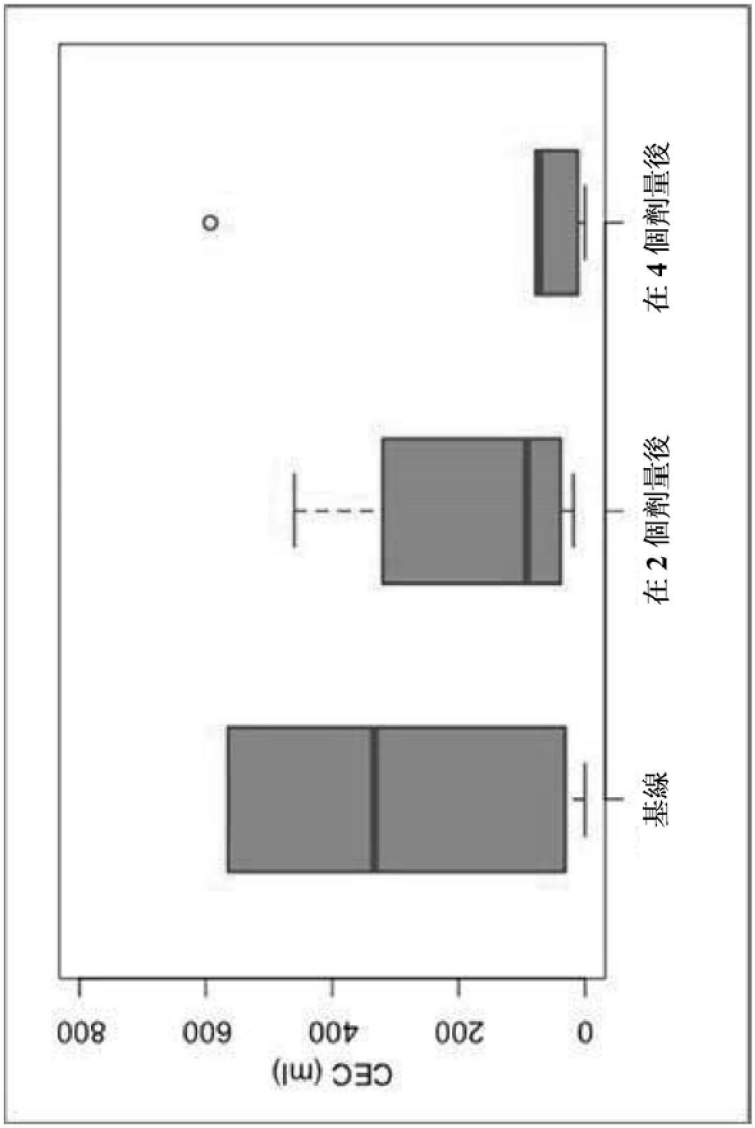


圖 42B

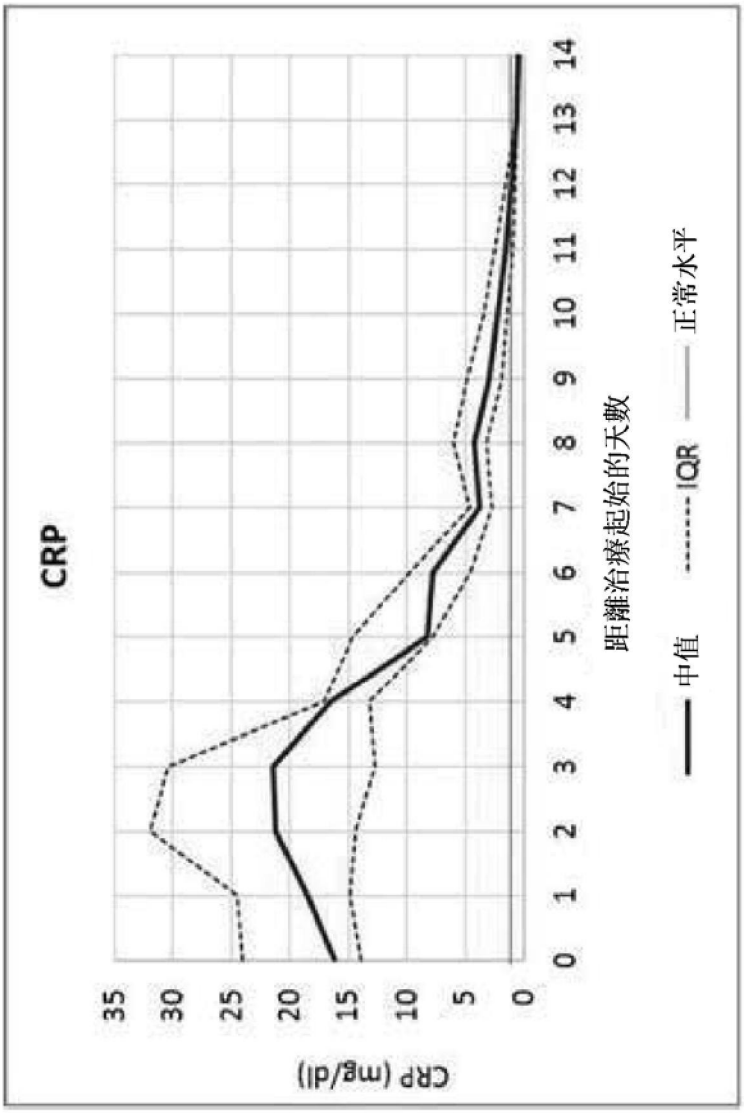

CRP
CRP (mg/dl)
35
30
25
20
15
10
5
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
距離治療起始的天數
中值
IQR
正常水平

圖 43

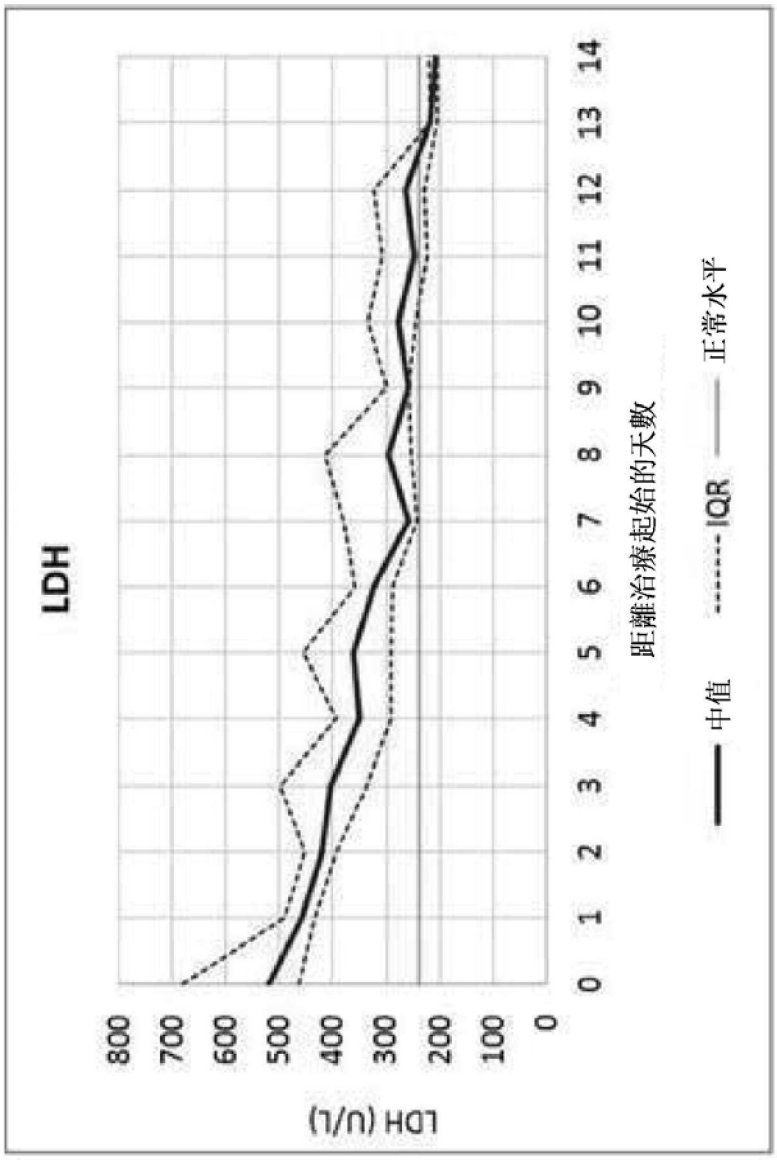

LDH
LDH (U/L)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
距離治療起始的天數
中值
IQR
正常水平

圖 44

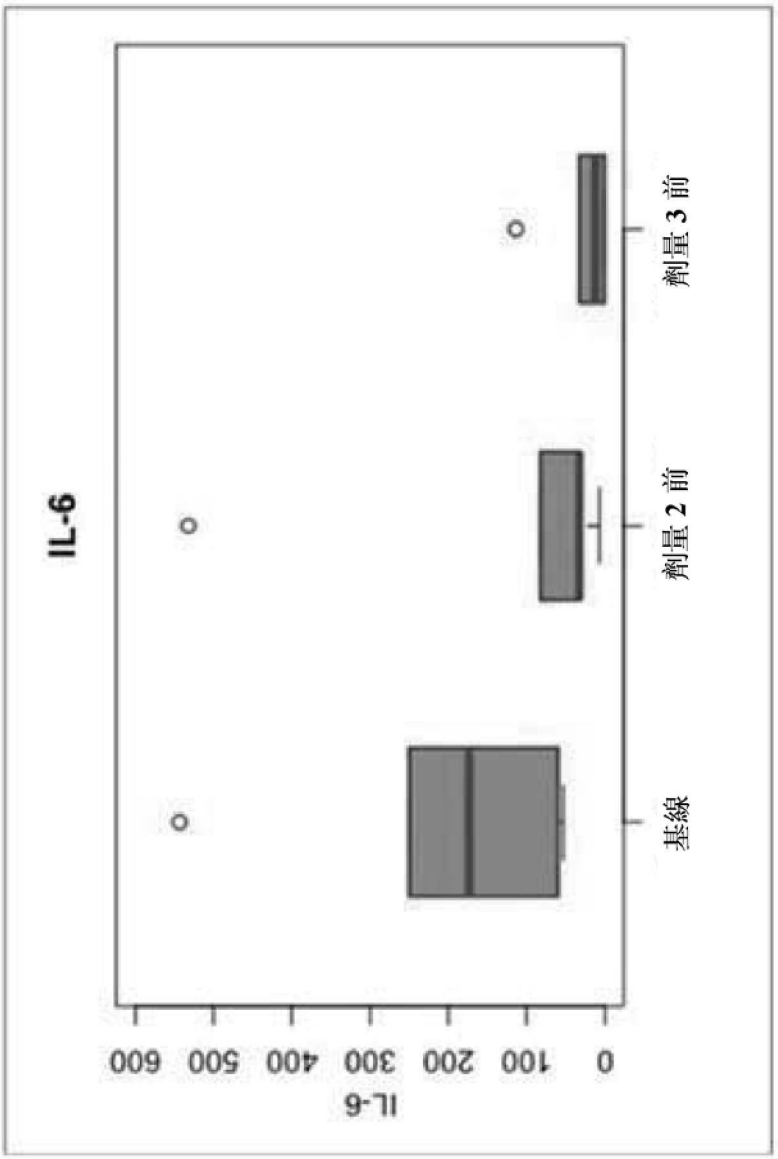


圖 45

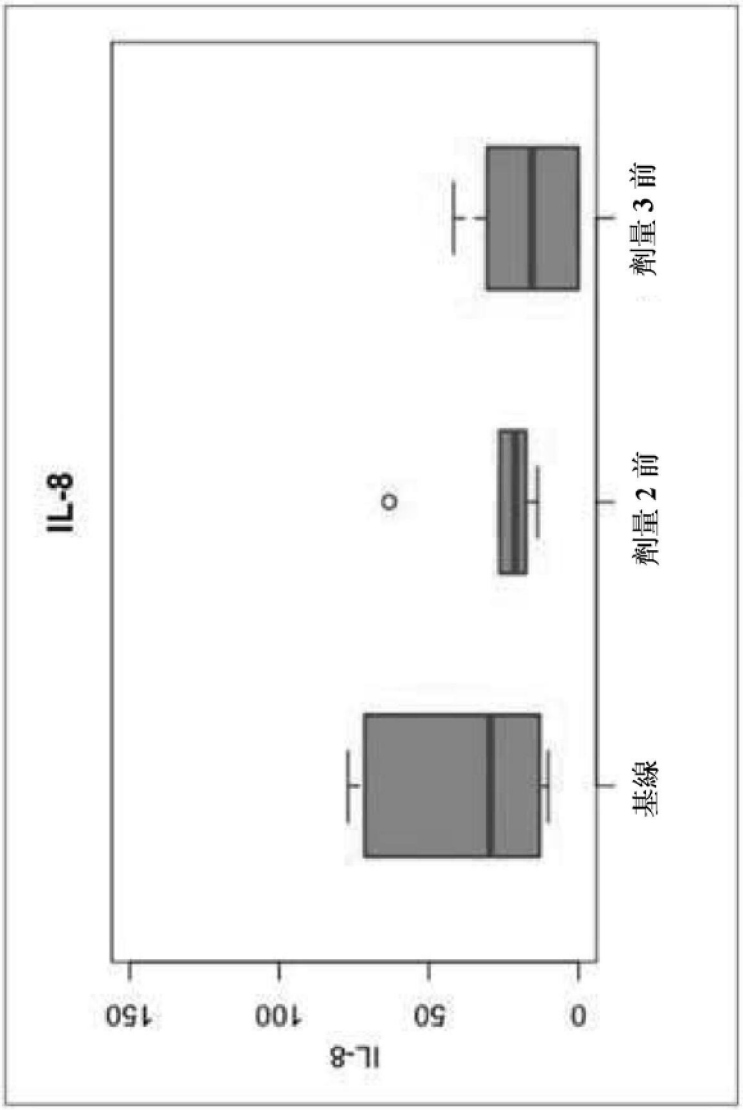


圖 46



圖 47B

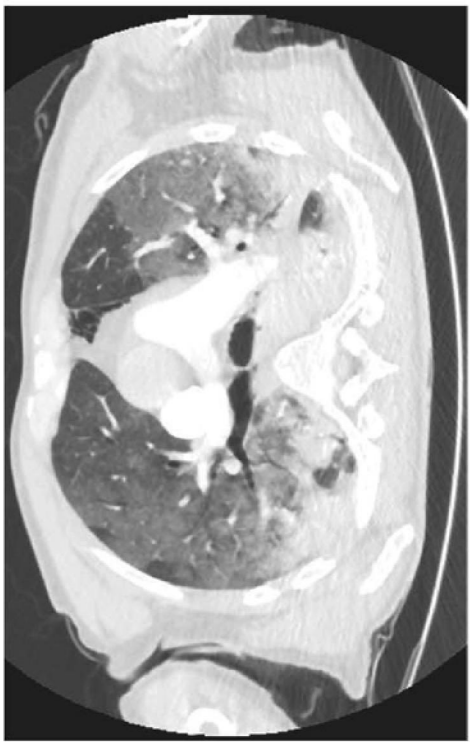


圖 47A

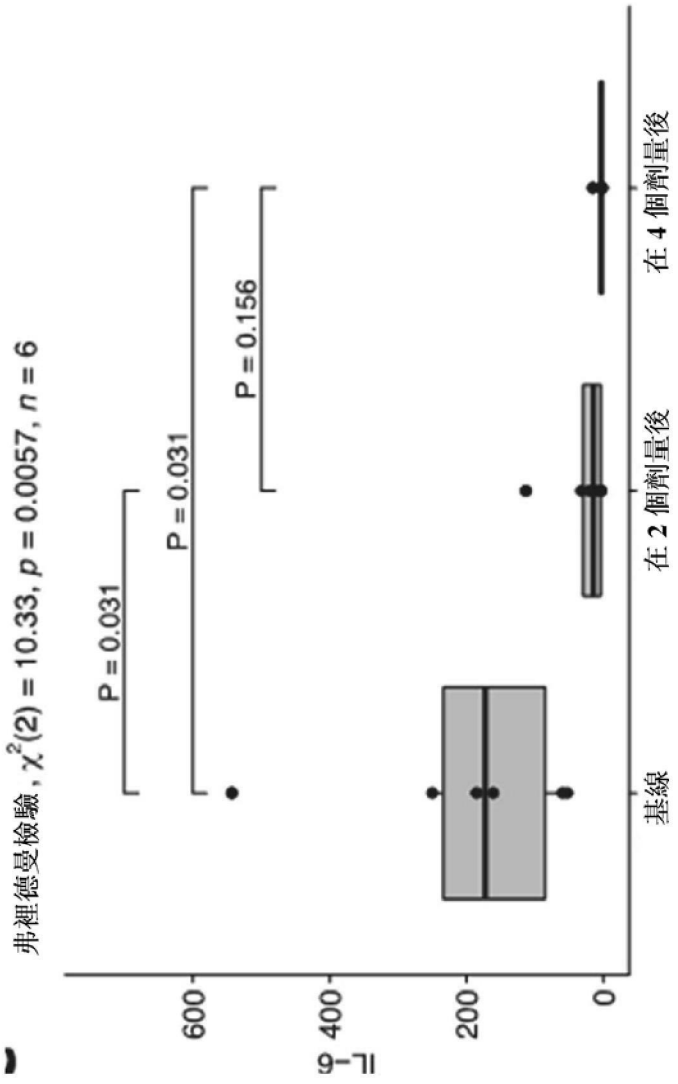

弗裡德曼檢驗，$\chi^2(2) = 10.33$, $p = 0.0057$, $n = 6$
P = 0.031
P = 0.031
P = 0.156
IL-6
600
400
200
0
基線
在 2 個劑量後
在 4 個劑量後

圖 48

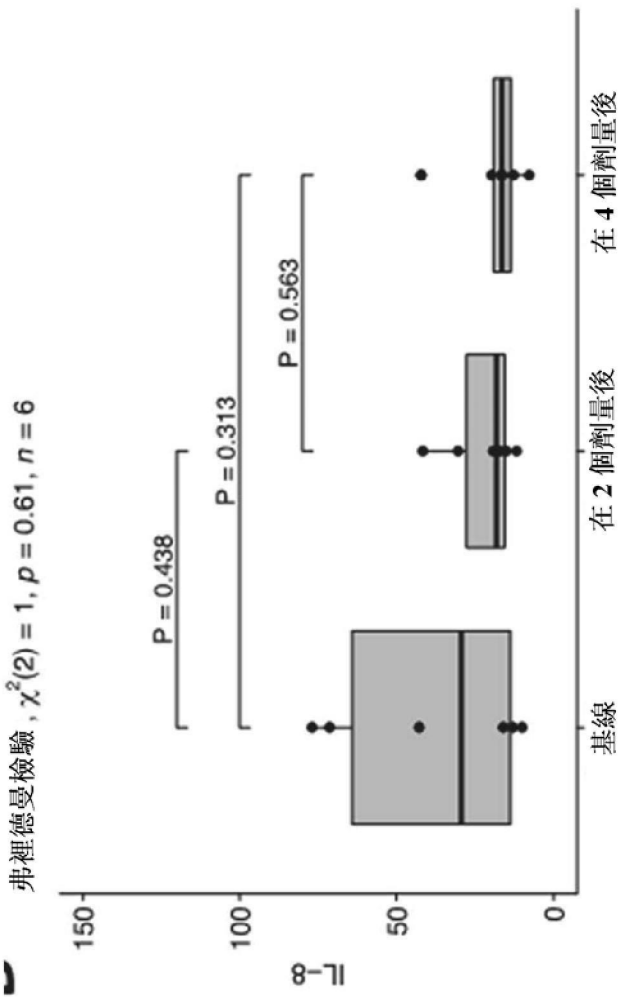

弗裡德曼檢驗，$\chi^2(2) = 1, p = 0.61, n = 6$
P = 0.438
P = 0.313
P = 0.563
IL-8
150
100
50
0
基線
在 2 個劑量後
在 4 個劑量後

圖 49

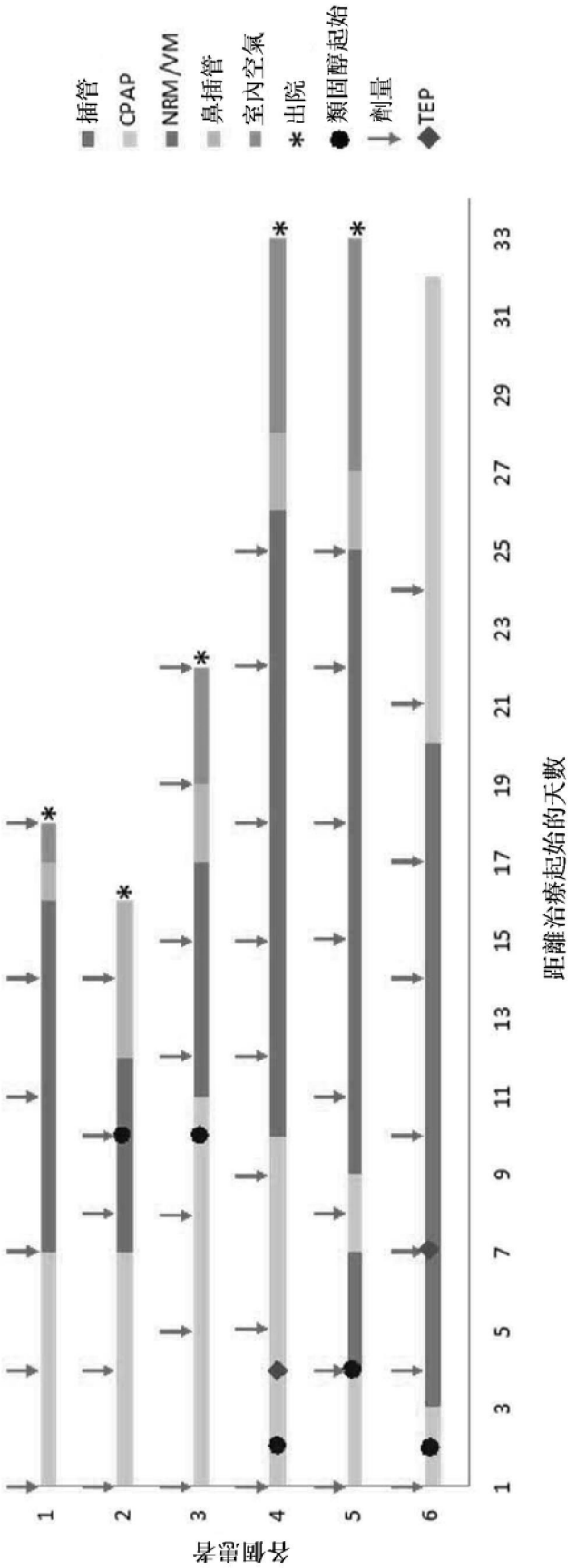

插管
CPAP
NRM/VM
鼻插管
室內空氣
出院
類固醇起始
劑量
TEP
各個患者
1
2
3
4
5
6
1
3
5
7
9
11
13
15
17
19
21
23
25
27
29
31
33
距離治療起始的天數

圖 50

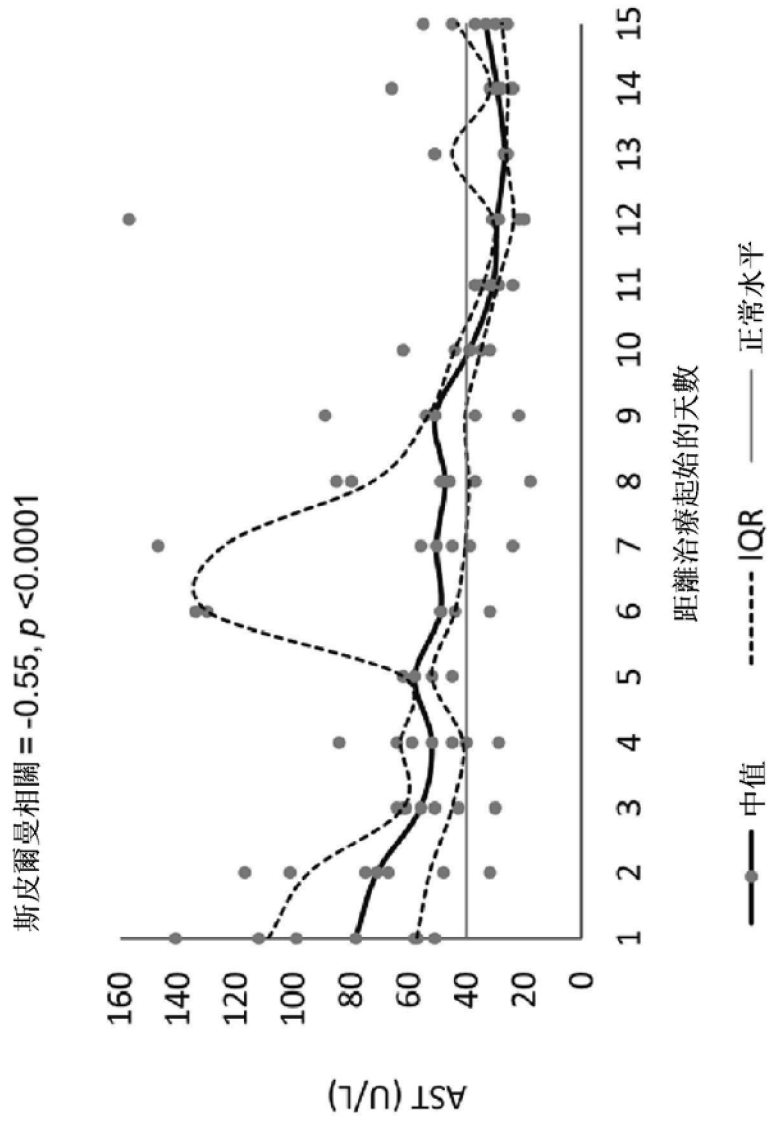

斯皮爾曼相關 = -0.55, p <0.0001
AST (U/L)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
距離治療起始的天數
中值
IQR
正常水平

圖 51A

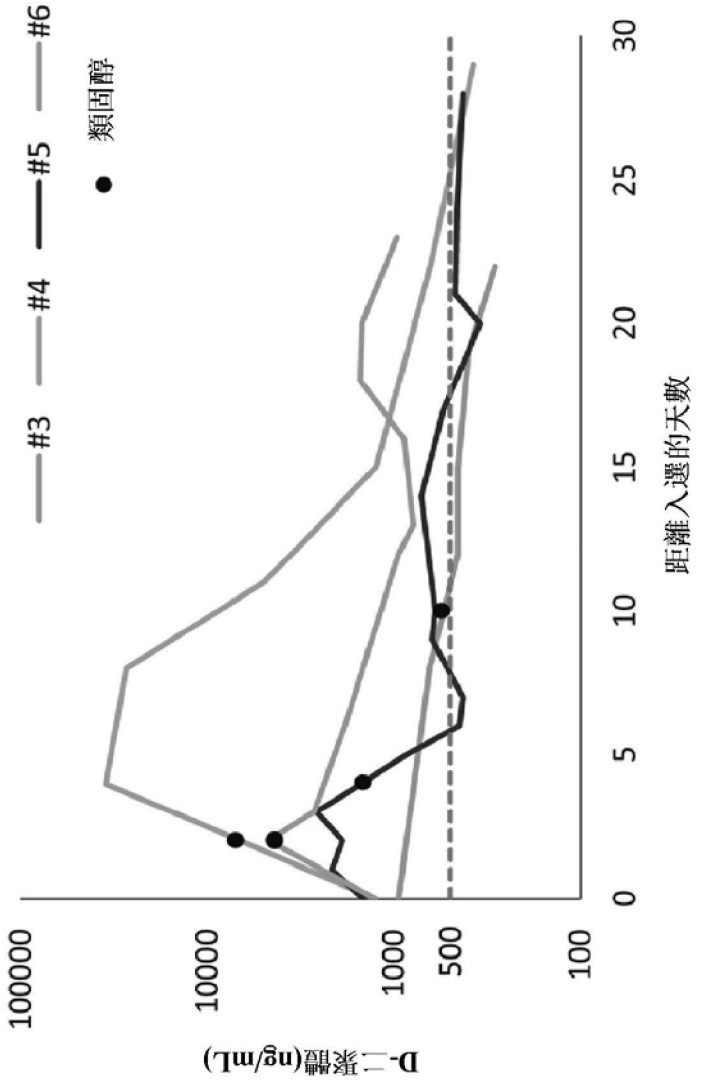

D-二聚體(ng/mL)
100000
10000
1000
500
100
0
5
10
15
20
25
30
距離入選的天數
類固醇
#3
#4
#5
#6

圖 51B

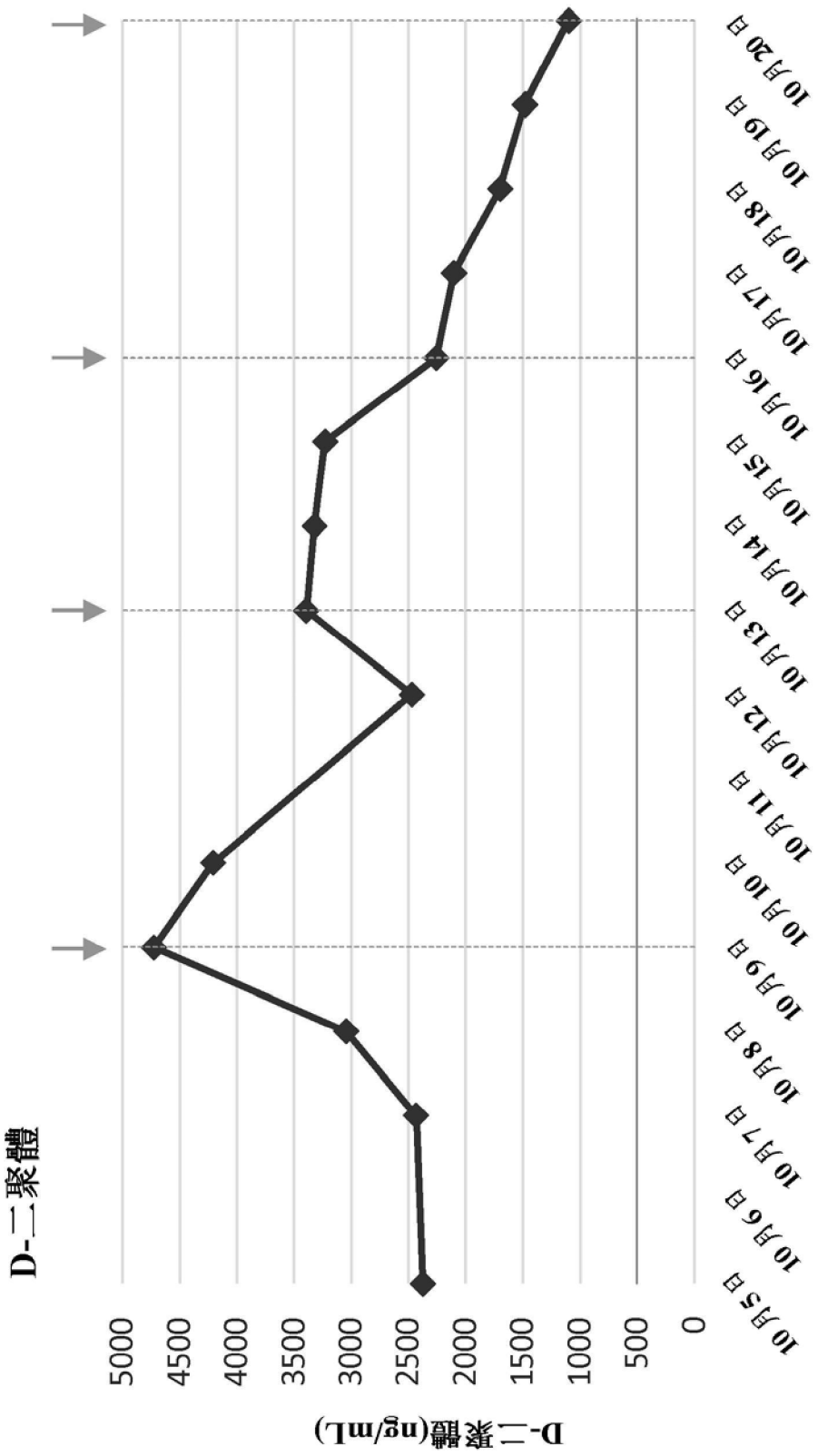

D-二聚體
D-二聚體(ng/mL)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10月5日
10月6日
10月7日
10月8日
10月9日
10月10日
10月11日
10月12日
10月13日
10月14日
10月15日
10月16日
10月17日
10月18日
10月19日
10月20日

圖 52A

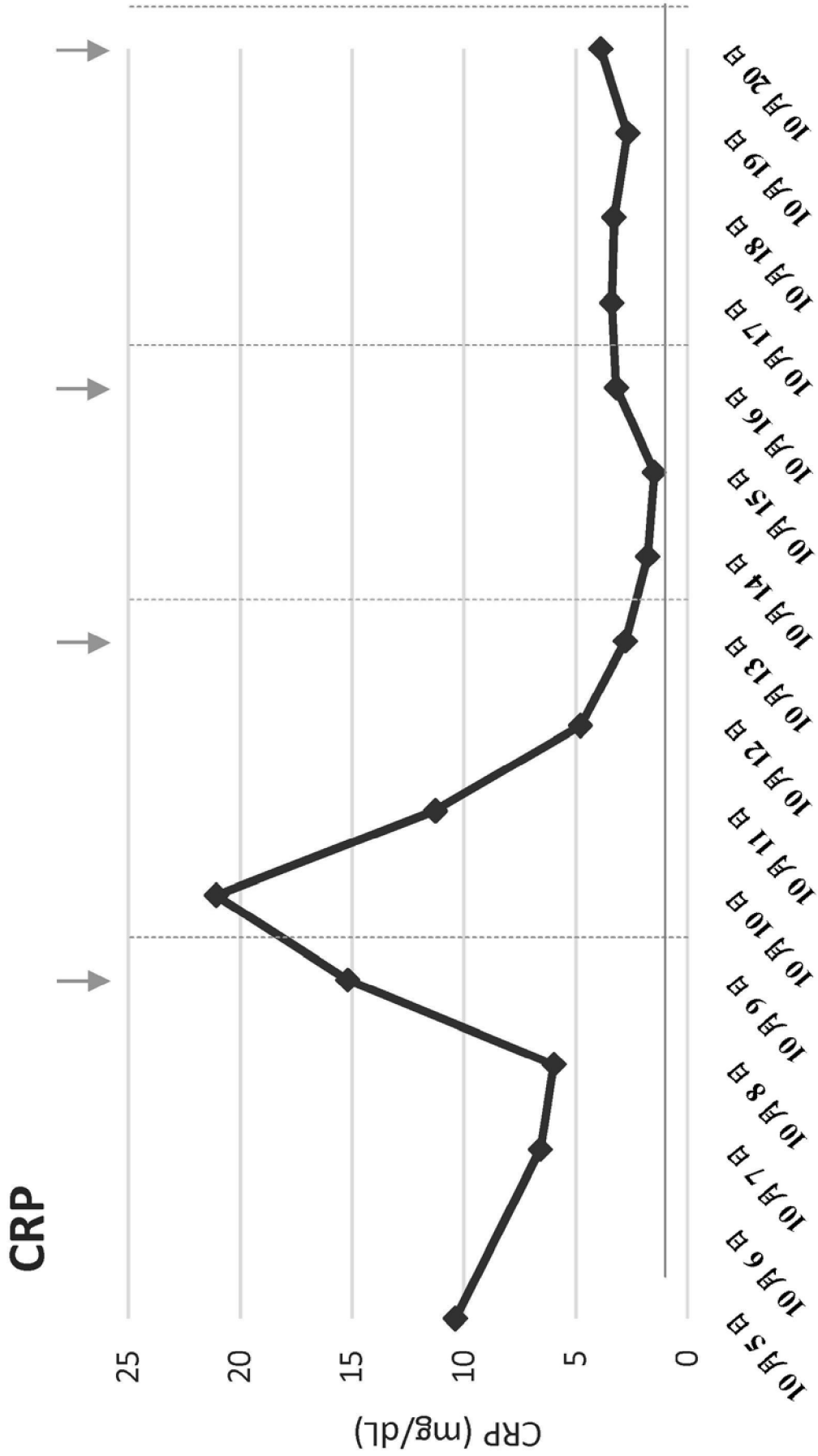

CRP
CRP (mg/dL)
25
20
15
10
5
0
10月5日
10月6日
10月7日
10月8日
10月9日
10月10日
10月11日
10月12日
10月13日
10月14日
10月15日
10月16日
10月17日
10月18日
10月19日
10月20日

圖 52B

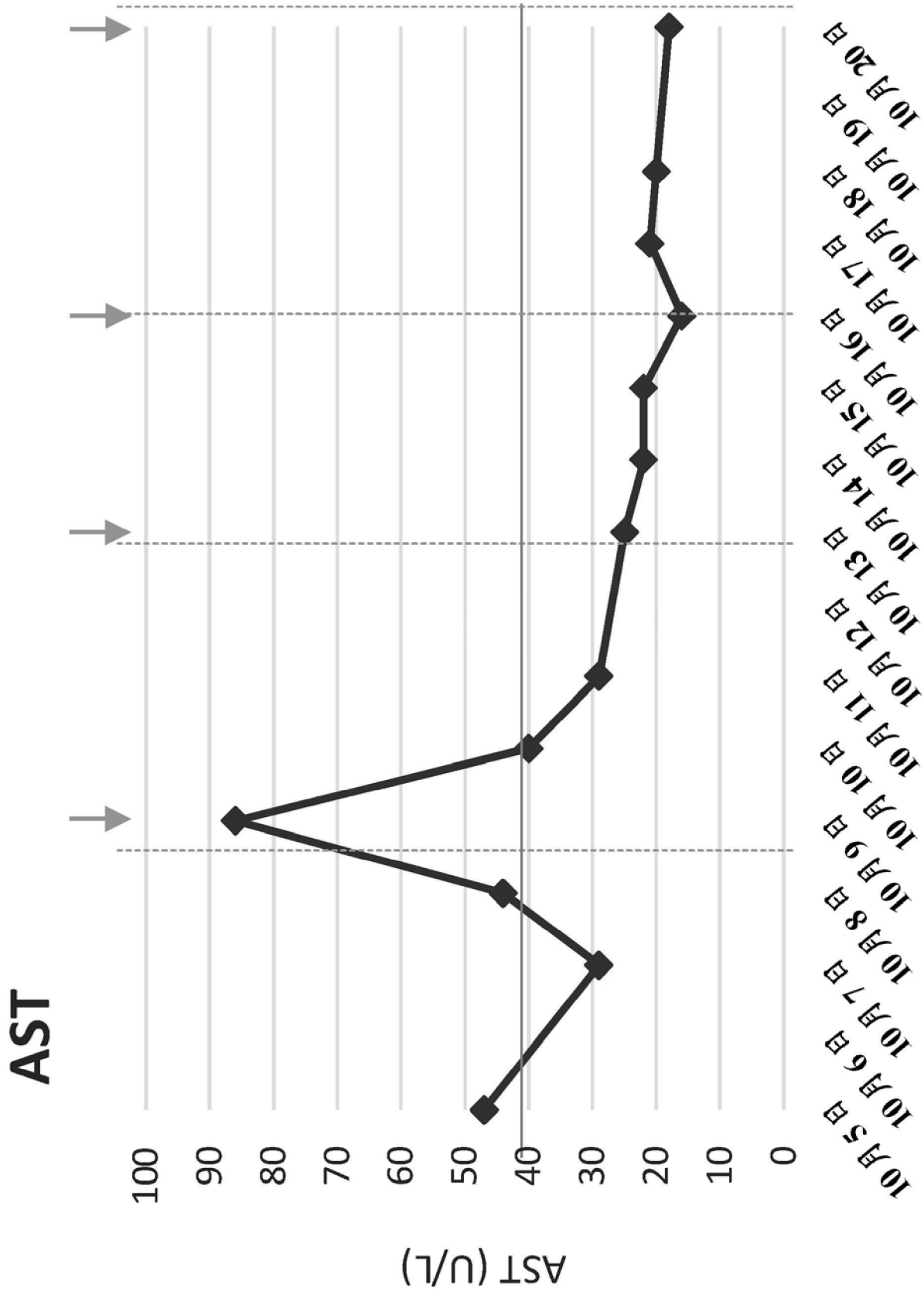

AST
AST (U/L)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10月5日
10月6日
10月7日
10月8日
10月9日
10月10日
10月11日
10月12日
10月13日
10月14日
10月15日
10月16日
10月17日
10月18日
10月19日
10月20日

圖 52C

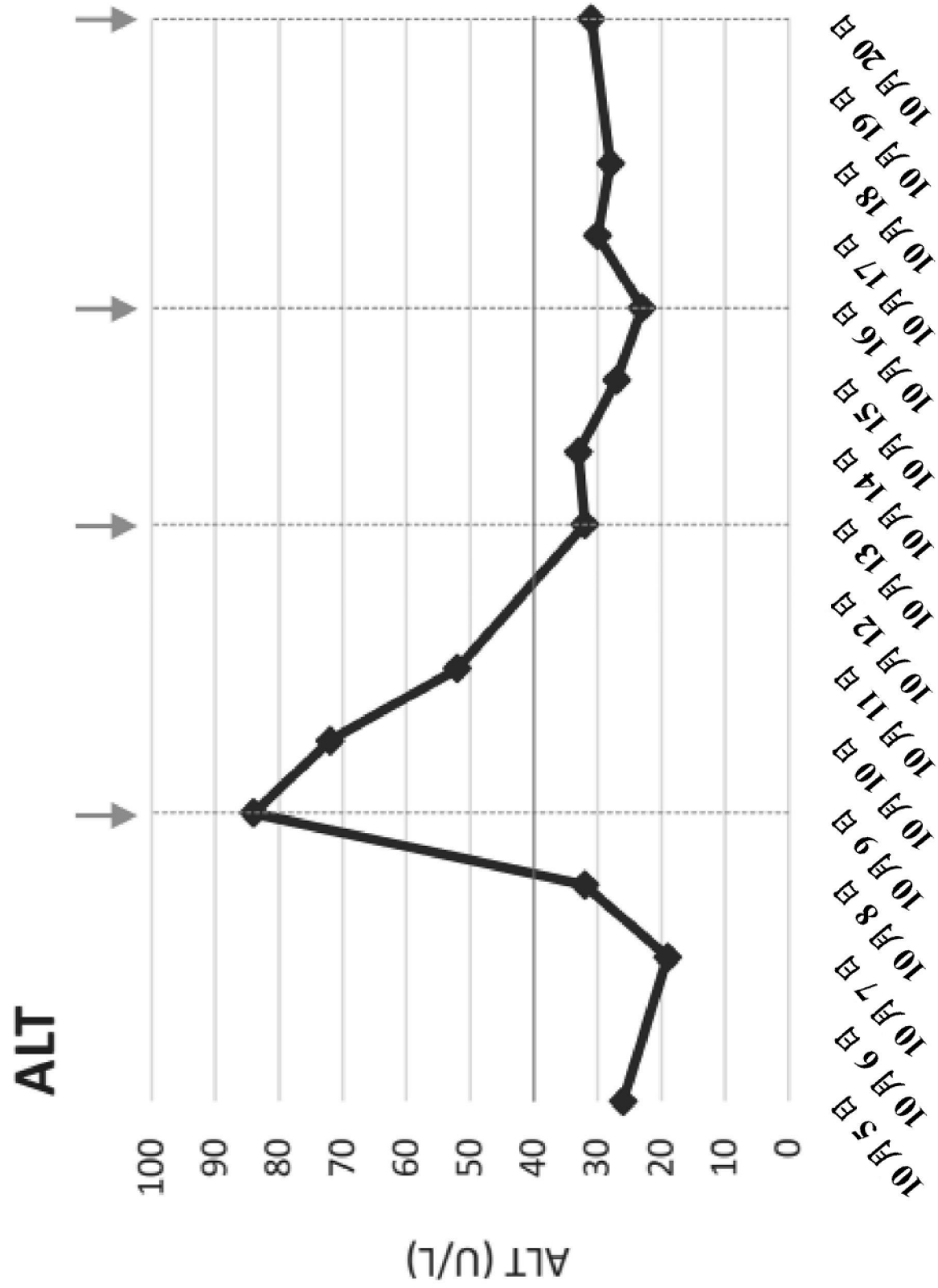

ALT
ALT (U/L)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10月5日
10月6日
10月7日
10月8日
10月9日
10月10日
10月11日
10月12日
10月13日
10月14日
10月15日
10月16日
10月17日
10月18日
10月19日
10月20日

圖 52D

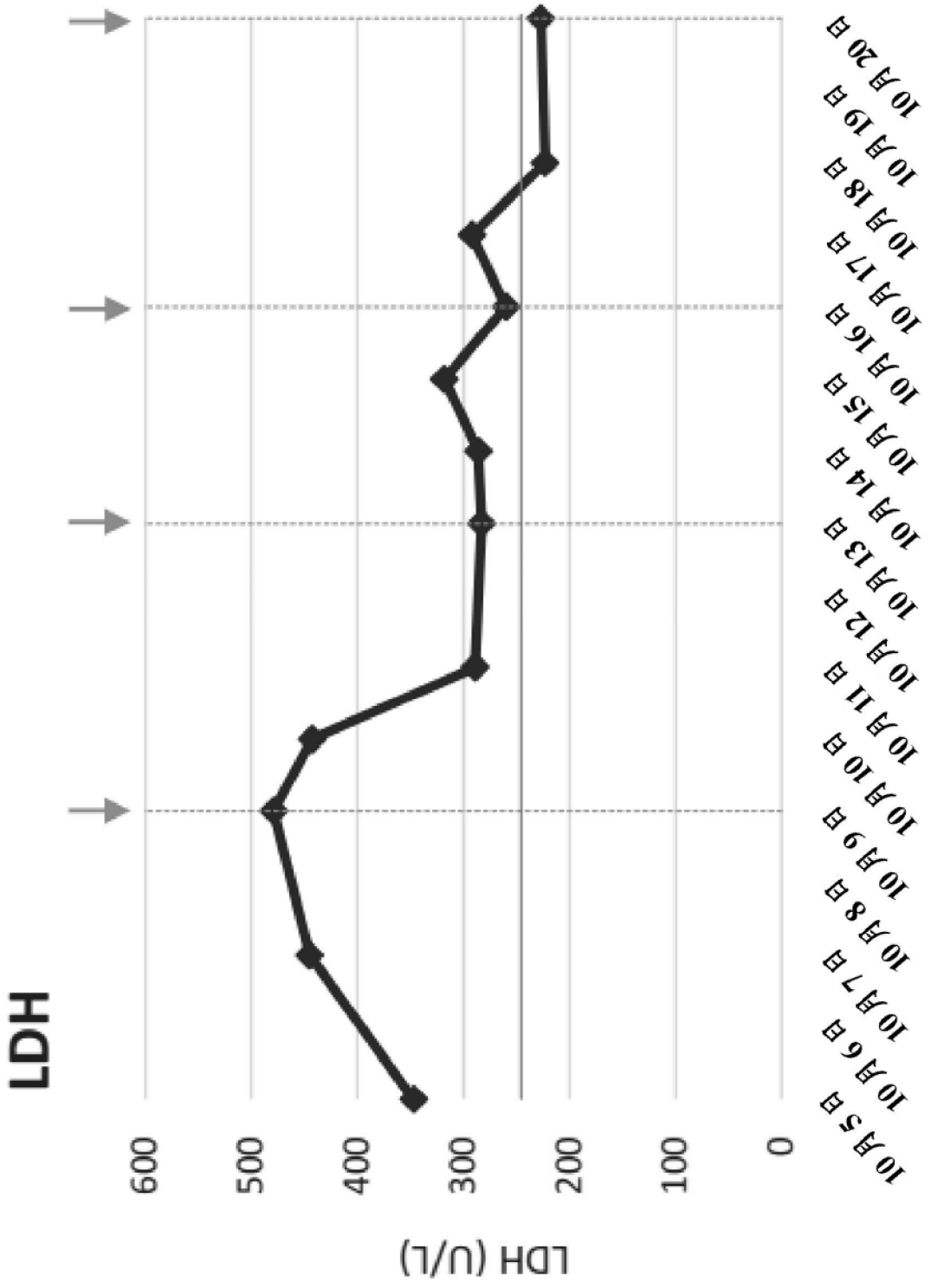

LDH
LDH (U/L)
600
500
400
300
200
100
0
10月5日
10月6日
10月7日
10月8日
10月9日
10月10日
10月11日
10月12日
10月13日
10月14日
10月15日
10月16日
10月17日
10月18日
10月19日
10月20日

圖 52E

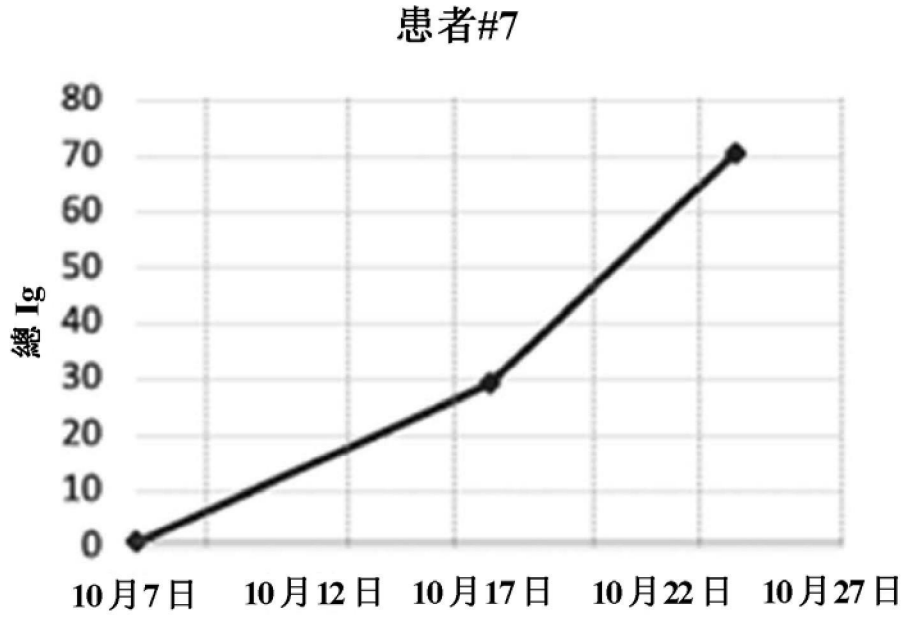

患者#7
總 Ig
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10月7日
10月12日
10月17日
10月22日
10月27日

圖 53