



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월25일
(11) 등록번호 10-1870915
(24) 등록일자 2018년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 38/1725 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7007747(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년04월06일
심사청구일자 2017년03월21일
(85) 번역문제출일자 2017년03월21일
(65) 공개번호 10-2017-0034941
(43) 공개일자 2017년03월29일
(62) 원출원 특허 10-2013-7029501
원출원일자(국제) 2012년04월06일
심사청구일자 2013년11월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/032650
(87) 국제공개번호 WO 2012/139081
국제공개일자 2012년10월11일
(30) 우선권주장
61/473,698 2011년04월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Molecular Immunology 44 (2007) 3838-3849
Eye (Lond). 2011 Jun; 25(6): 683-693
J Immunol October 1, 2010, 185 (7) 4169-4178
J Immunol February 1, 2006, 176 (3) 1305-1310

(73) 특허권자
유니버시티 오브 레스터
영국 엘리1 7알에치 레스터서 레스터 유니버시티
로드
오메로스 코퍼레이션
미국, 워싱턴 98119, 시애틀, 201 엘리엇 에버뉴
웨스트
(72) 발명자
데모폴로스 그레고리 에이.
미국 워싱턴 98040 머서 아일랜드 포레스트 애비
뉴 사우스이스트 4845
두들러 톰
미국 워싱턴 98005 벨레뷰 노스이스트 36티에이치
스트리트 13410
슈와에블 한스-윌헬름
영국 레스터서 엘리12 7에이에프 마운트소렐 더
그린 36
(74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 19 항

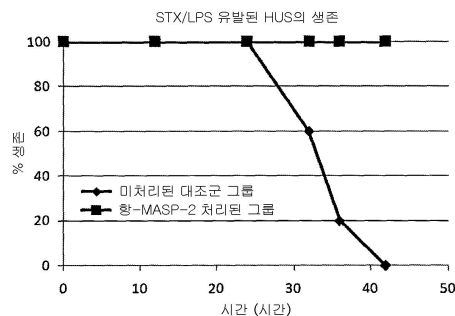
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 MASP-2 의존적 보체 활성화와 관련된 질병을 치료하는 방법

(57) 요약

한 양태에서, 본 발명은 살아있는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화의 효과를 억제하는 방법을 제공한다. 방법은 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 MASP-2 억제제의 유효량을 이것이 필요한 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2-매개된 대체 보체 경로 활성화와 관련된 세포적 손상을 (뒷면에 계속)

대표도



억제하는 한편, 면역 시스템의 고전적 (C1q-의존적) 경로 성분을 온전하게 유지한다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 렉틴-의존적 보체 활성화의 효과를 억제하는 조성물을 제공하며, MASP-2 억제제의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 39/39566 (2013.01)

A61K 39/44 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 단클론성 MASP-2 항체 또는 이들의 항원 결합 단편을 포함하고, MASP-2 단클론성 항체 또는 이들의 항원 결합 단편은 SEQ ID NO:6의 부분에 특이적으로 결합하는, 비-인자 H-의존적 부정형 용혈성 요독성 증후군(atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS)으로 고통받거나 걸릴 위험이 있는 대상체를 치료하기 위한 의약.

청구항 2

제1 항에 있어서, 의약을 투여하기 전에, 대상체는 (i) 빈혈증, (ii) 혈소판감소증, (iii) 신부전 및 (iv) 크레아티닌 증가로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 증상을 나타내는 것으로 결정되고, 의약은 상기 하나 이상의 증상을 개선하기에 충분한 기간에 걸쳐 유효량의 투여를 위해 제형화되는 것을 특징으로 하는 의약.

청구항 3

제1 항에 있어서, 대상체는 인자 I, 인자 B 또는 막 보조인자 CD46과 관련된 aHUS로 고통받는 것을 특징으로 하는 의약.

청구항 4

삭제

청구항 5

부정형 용혈성 요독성 증후군(atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS)에 걸릴 위험의 증가와 관련된 것으로 알려진 유전적 마커를 가지는 대상체가 aHUS와 관련된 임상적 증상으로 고통받을 가능성을 감소시키는 의약의 제조에, MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하고 SEQ ID NO:6의 부분에 특이적으로 결합하는 MASP-2 억제제를 사용하는 방법.

청구항 6

제5 항에 있어서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체 또는 이들의 항원 결합 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제5 항에 있어서, 대상체는 보체 인자 H(CFH), 인자 I(CFI), 인자 B(CFB), 막 보조인자 CD46, C3, 보체 인자 H-관련 단백질 1(CFHR1), 항응고 단백질 트롬보스플린(THBD), 보체 인자 H-관련 단백질 3(CFHR3) 또는 보체 인자 H-관련 단백질 4 (CFHR4)를 암호화하는 유전자 내에 aHUS 에 걸릴 위험의 증가와 관련된 것으로 알려진 유전적 마커를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제5 항에 있어서, 의약은 aHUS 임상적 증상을 촉발하는 것과 관련된 것으로 알려진 사건의 발생 전, 발생 도중 또는 발생 후에 대상체를 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9 항에 있어서, aHUS 임상적 증상을 촉발하는 것과 관련된 사건은 약물 노출, 감염, 악성 종양, 손상, 기관 또는 조직 이식 및 임신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제10 항에 있어서, 감염은 박테리아 감염인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제5 항에 있어서, 의약은 피하 투여용으로 제형화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

감염에 2차적인 부정형 용혈성 요독성 증후군(atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS)으로 고통받거나 걸릴 위험이 있는 대상체를 치료하기 위한 의약의 제조에, MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하고 SEQ ID NO: 6의 부분에 특이적으로 결합하는 MASP-2 억제제를 사용하는 방법.

청구항 14

제13 항에 있어서, 대상체는 에스. 뉴모니아(*S. pneumonia*) 감염과 관련된 비-장내 aHUS로 고통받거나 걸릴 위험이 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제13 항에 있어서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체 또는 이들의 항원 결합 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

삭제

청구항 17

부정형 용혈성 요독성 증후군(atypical hemolytic uremic syndrome: aHUS)으로 고통받고 있는 대상체를 치료하기 위한 의약의 제조에, MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하고 SEQ ID NO: 6의 부분에 특이적으로 결합하는 MASP-2 억제제를 사용하는 방법으로서, 의약은 정맥 내 카테터 또는 다른 전달 방법을 통해 대상체에 투여되도록 제형화되는, 방법.

청구항 18

제17 항에 있어서, 의약은 혈장반출법으로 치료를 받고 있는 대상체를 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제17 항에 있어서, 의약은 혈장반출법의 부재하에 대상체를 치료하기 위한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제19 항에 있어서, 의약은 1차 기간 동안 카테터를 통해 투여되도록 제형화되고, 의약은 2차 기간 동안 피하 투여되도록 제형화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제20 항에 있어서, 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여, 의약으로 치료받은 대상체 내의 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정이 의약으로 계속된 치료의 필요성을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제17 항에 있어서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체 또는 이들의 항원 결합 단편인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 본 출원은 2011년 4월 8일 출원된 가특허 출원 번호 61/473,698의 이익을 주장하며, 이것은 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0003] 서열 목록에 관한 진술

[0004] 본 출원과 관련된 서열 목록은 서류 사본 대신에 텍스트 포맷으로 제공되며 명세서 내에 참고로 포함된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 이름은_MP1_0126_US2_SequenceListingsAsFiled.txt이다. 텍스트 파일은 110 KB 이고; 2012년 3월 30일에 생성되었고; 명세서의 출원과 함께 EFS-Web에 제출되었다.

배경 기술

[0005] 보체 시스템은 사람 및 다른 척추동물에서 미생물 감염 및 다른 급성 상해에 대한 면역 반응을 시작하고, 증폭하고 조율하는, 초기 작동 메카니즘을 제공한다 (M.K. Liszewski and J.P. Atkinson, 1993, in Fundamental Immunology, Third Edition, edited by W.E. Paul, Raven Press, Ltd., New York). 보체 활성화는 잠재적 병원체에 대한 귀중한 1선 방어를 제공하는 한편, 보호적 면역 반응을 촉진하는 보체의 활성화는 또한 숙주에 대한 잠재적 위협을 나타낼 수 있다 (K.R. Kalli, et al., Springer Semin. Immunopathol. 15:417-431, 1994; B.P. Morgan, Eur. J. Clinical Investig. 24:219-228, 1994). 예를 들어, C3 및 C5 단백질 가수분해 생성물은 호중구를 모집하고 활성화한다. 숙주의 방어에 필수적인 한편, 활성화된 호중구는 파괴적 효소의 방출에서 무차별적이고 기관 손상을 유발할 수도 있다. 게다가, 보체 활성화는 숙주 세포, 뿐만 아니라 미생물 표적의 근처에 용해성 보체 성분의 침착을 유발할 수도 있으며, 숙주 세포 용해를 일으킨다.

[0006] 보체 시스템은 또한 심근 경색 (myocardial infarction), 뇌졸중 (stroke), ARDS, 재관류 손상 (reperfusion injury), 패혈성 쇼크 (septic shock), 열 화상에 따른 모세관 누출, 후심폐 바이패스 염증 (postcardiopulmonary bypass inflammation), 이식 거부 (transplant rejection), 류머티스성 관절염 (rheumatoid arthritis), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 중증 근무력증 (myasthenia gravis), 및 알츠하이머 병 (Alzheimer's disease)을 포함하는, 많은 급성 및 만성 질환 상태의 발병의 원인이 되었다. 이들 질병 중 대부분에서, 보체는 발병의 원인이 아니지만 이에 수반된 인자 중 하나이다. 그럼에도 불구하고, 보체 활성화는 주요 병리학적 메카니즘일 수도 있고 이들 질병 상태 중 많은 것에서 임상적 조절을 위한 효과적인 시점을 나타낸다. 다양한 질병 상태에서 보체-매개된 조직 손상의 중요성의 증가하는 인식은 효과적인 보체 억제제에 대한 필요성을 강조한다. 지금까지, 에쿨리주맙 (Solaris®), C5에 대한 항체는 사람 사용에 대하여 승인된 유일한 보체-표적화 약물이다. 하지만, C5는 보체 시스템의 "다운스트림"에 위치한 여러 효과기 분자 중 하나이고, C5의 차단은 보체 시스템의 활성화를 억제하지 않는다. 그러므로, 보체 활성화의 시작 단계의 억제제는 "다운스트림" 보체 억제제보다 큰 이점을 가질 것이다.

[0007] 현재, 세 개의 뚜렷한 경로를 통해 보체 시스템이 활성화될 수 있다는 것이 널리 인정된다: 고전적 경로, 렉틴 경로, 및 대체 경로. 고전적 경로는 보통 외부 입자 (즉, 항원)에 결합된 숙주 항체로 구성된 복합체에 의해 촉발되고 따라서 특이적 항체 반응의 발생을 위해 항원에 노출 전에 필요하다. 고전적 경로의 활성화가 숙주에 의한 이전의 적응성 면역 반응에 의존적이기 때문에, 고전적 경로는 후천적 면역 시스템의 일부이다. 반대로, 렉틴 및 대체 경로 둘 다는 적응성 면역력 면역에 독립적이고 선천적 면역 시스템의 일부이다.

[0008] 보체 시스템의 활성화는 세린 프로테아제 치모젠의 순차적인 활성화를 일으킨다. 고전적 경로의 활성화의 첫 번째 단계는 항원-결합된 IgG 및 IgM 분자에 특이적 인식 분자, C1q의 결합이다. C1q는 C1으로 불리는 복합체로서 C1r 및 C1s 세린 프로테아제 프로 효소와 관련된다. 면역 복합체에 C1q의 결합시, C1r의 Arg-Ile 부위의 자가 단백질 가수분해 절단은 C1r-매개된 절단 및 C1s의 활성화로 이어지며, 그로 인해 C4 및 C2를 절단하는 능력을 얻는다. C4는 두 개의 단편으로 절단되고 C4a 및 C4b로 지정되고, 유사하게, C2는 C2a 및 C2b로 절단된다. C4b 단편은 인접한 히드록실 또는 아미노기와 공유결합을 형성하고 활성화된 C2의 C2a 단편과 비공유 상호작용을 통해 C3 컨버타제 (C4b2a)를 발생시킬 수 있다. C3 컨버타제 (C4b2a)는 C3a 및 C3b 하위 성분으로 단백질 가수분해 절단에 의해 C3를 활성화하고 C5 컨버타제 (C4b2a3b)의 발생으로 이어지며, 이것은 C5를 절단함으로써 세포막을 붕괴하여 세포 용해로 이어질 수 있는 막 공격 복합체 (C6, C7, C8 및 C9와 결합된 C5b, "MAC"로도 불림)의 형성으로 이어진다. C3 및 C4의 활성화된 형태 (C3b 및 C4b)는 외부 표적 표면에 공유결합으로 침착되며, 이것은 다수의 식세포 상의 보체 수용체에 의해 인식된다.

- [0009] 독립적으로, 렉틴 경로를 통한 보체 시스템의 활성화의 첫 번째 단계는 또한 특이적 인식 분자의 결합이며, 이것은 관련된 세린 프로테아제 프로효소 (proenzyme)의 활성화로 이어진다. 하지만, C1q에 의한 면역 복합체의 결합 대신에, 렉틴 경로의 인식 분자는 탄수화물-결합 단백질 (만난-결합 렉틴 (MBL), H-피콜린, M-피콜린, L-피콜린 및 C-타입 렉틴 CL-11)의 그룹을 포함하며, 전체적으로 렉틴으로 불린다. J. Lu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1572:387-400, (2002); Holmskov et al., *Annu. Rev. Immunol.* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000)를 참고하면 된다. 또한 J. Luet et al., *Biochim Biophys Acta* 1572:387-400 (2002); Holmskov et al., *Annu Rev Immunol* 21:547-578 (2003); Teh et al., *Immunology* 101:225-232 (2000); Hansen et al., *J. Immunol* 185(10):6096-6104 (2010)를 참고하면 된다.
- [0010] Ikeda et al.은 처음에 C1q와 유사하게, MBL은 C4-의존적 방식으로 효모 만난-코팅된 적혈구에 결합시 보체 시스템을 활성화할 수 있다 (Ikeda et al., *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454, (1987)). MBL, 콜렉틴 단백질 패밀리의 멤버는 피라노스 고리의 적도면 (equatorial plane) 방향의 3- 및 4-히드록시 기를 가진 탄수화물과 결합하는 칼슘-의존적 렉틴이다. 따라서 MBL에 대한 중요한 리간드는 D-만노스 및 N-아세틸-D-글루코사민인 한편, 이 입체적 필요조건에 맞지 않는 탄수화물은 MBL에 대한 검출 불가능한 친화도를 갖는다 (Weis et al., *Nature* 360:127-134, (1992)). MBL 및 일가 당 사이의 상호작용은 매우 약하며, 해리는 전형적으로 한자리 밀리 몰 단위로 일정하다. MBL은 서로 매우 근접하게 위치한 다중 단당류 잔기와의 결합력에 의해, 즉, 이들과 동시에 상호작용함으로써 글리칸 리간드에 단단하고, 특이적인 결합을 달성한다 (Lee et al., *Archiv. Biochem. Biophys.* 299:129-136, (1992)). MBL은 보통 박테리아, 효모, 기생충 및 특정 바이러스와 같은 미생물을 장식하는 탄수화물 패턴을 인식한다. 반대로, MBL은 D-갈락토스 및 시알산, 포유동물 혈장 및 세포 표면 당단백질에 존재하는 일반적으로 "성숙한" 복합체 당접합체를 장식하는 끝에서 두 번째 및 마지막 당을 인식하지 않는다. 이 결합 특이성은 "외부" 표면의 인식을 촉진하고 "자가 활성화"로부터 보호를 돕는 것으로 생각된다. 하지만, MBL은 포유동물 세포의 소포체 및 골지체에서 격리된, N-결합된 당단백질 및 당지질 상에서 고-만노스 "전구체" 글리칸의 클러스터 (cluster)에 높은 친화도로 결합한다 (Maynard et al., *J. Biol. Chem.* 257:3788-3794, (1982)). 그러므로, 손상된 세포는 MBL 결합을 통해 렉틴 경로 활성화에 대한 잠재적 표적이다. 피콜린은 MBL 이외에 피브리노겐-유사 도메인으로 불리는, 다른 타입의 렉틴 도메인을 소유한다. 피콜린은 Ca^{++} -의존적 방식으로 당 잔기에 결합한다. 사람에서, 세 종류의 피콜린 (L-피콜린, M-피콜린 및 H-피콜린)이 확인되었다. 두 개의 혈청 피콜린, L-피콜린 및 H-피콜린은 N-아세틸-D-글루코사민에 대한 일반적인 특이성을 갖지만, H-피콜린은 또한 N-아세틸-D-갈락토사민에 결합한다. L-피콜린, H-피콜린, CL-11, 및 MBL의 당 특이성의 차이는 다른 렉틴이 상보적일 수도 있고, 중첩을 통해, 다른 당접합체를 표적화할 수도 있다는 것을 의미한다. 이 개념은 렉틴 경로에서 알려진 렉틴 중에, 유일하게 L-피콜린만이 리포테이코산, 모든 그람 양성 박테리아에서 발견된 세포 벽 당접합체에 특이적으로 결합한다는 최근 보고에 의해 지지가 된다 (Lynch et al., *J. Immunol.* 172:1198-1202, (2004)). 콜렉틴 (즉, MBL) 및 피콜린은 아미노산 서열에서 큰 유사성을 함유하지 않는다. 하지만, 두 그룹의 단백질은 유사한 도메인 조직을 갖고, C1q와 유사하게, 올리고머 구조로 조립되며, 이것은 다점 결합의 가능성을 최대화한다.
- [0011] MBL의 혈청 농도는 건강한 집단에서 매우 가변적이고 이것은 MBL 유전자의 프로모터 및 암호화 영역 둘 다의 다형현상/돌연변이에 의해 유전적으로 조절된다. 급성기 단백질로서, MBL의 발현은 염증 동안 더 상향조절된다. L-피콜린은 MBL의 그것과 유사한 농도로 혈청에 존재한다. 그러므로, 렉틴 경로의 L-피콜린 가지는 힘이 MBL 팔과 잠재적으로 비슷하다. MBL 및 피콜린은 또한 옵소닌으로서 기능 할 수 있으며, 이것은 식세포가 MBL- 및 피콜린-장식된 표면을 표적화할 수 있게 한다 (Jack et al., *J Leukoc Biol.*, 77(3):328-36 (2004), Matsushita 및 Fujita, *Immunobiology*, 205(4-5):490-7 (2002), Aoyagi et al., *J Immunol*, 174(1):418-25 (2005)를 참고하면 된다. 이 옵소닌화는 식세포 수용체와 이들 단백질의 상호작용을 필요로 하며 (Kuhlman et al., *J. Exp. Med.* 169:1733, (1989); Matsushita et al., *J. Biol. Chem.* 271:2448-54, (1996)), 이것의 정체는 확립되지 않았다.
- [0012] 사람 MBL은 그것의 콜라겐-유사 도메인을 통해, MBL-관련 세린 프로테아제 (MASP)로 불리는, 독특한 C1r/C1s-유사 세린 프로테아제와 특이적 및 고-친화도 상호작용을 형성한다. 지금까지, 세 개의 MASP가 설명되었다. 먼저, 단일 효소 "MASP"를 확인하였고 보체 캐스케이드의 시작 (즉, C2 및 C4를 절단)의 원인이 되는 효소로서 특징지어졌다 (Matsushita et al., *J Exp Med* 176(6):1497-1502 (1992); Ji et al., *J. Immunol.* 150:571-578, (1993)). MASP 활성화는, 사실은, 두 개의 프로테아제의 혼합물인 것을 이후에 결정되었다: MASP-1 및 MASP-2 (Thiel et al., *Nature* 386:506-510, (1997)). 하지만, MBL-MASP-2 복합체 단독은 보체 활성화에 충분한 것이 입증되었다 (Vorup-Jensen et al., *J. Immunol.* 165:2093-2100, (2000)). 게다가, 유일한 MASP-2는 높은 속도

로 C2 및 C4를 절단하였다 (Ambrus et al., J. Immunol. 170:1374-1382, (2003)). 그러므로, MASP-2는 C3 콘버타제, C4b2a를 발생시키는 C4 및 C2의 활성화의 원인이 되는 프로테아제이다. 이것은 두 개의 특이적 세린 프로테아제 (C1r 및 C1s)의 협조적 작용이 보체 시스템의 활성화로 이어지는 경우, 고전적 경로의 C1 복합체와 큰 차이이다. 게다가, 세 번째 새로운 프로테아제, MASP-3이 분리되었다 (Dahl, M.R., et al., Immunity 15:127-35, 2001). MASP-1 및 MASP-3은 같은 유전자의 대안으로 스플라이스된 생성물이다.

[0013] MASP는 C1r 및 C1s, C1 복합체의 효소 성분의 그것과 동일한 도메인 조직을 공유한다 (Sim et al., Biochem. Soc. Trans. 28:545, (2000)). 이들 도메인은 N-말단 C1r/C1s/성게 VEGF/뼈 형태형성 단백질 (CUB) 도메인, 외피 성장 인자-유사 도메인, 제 2 CUB 도메인, 보체 조절 단백질 도메인의 탠덤 (tandem), 및 세린 프로테아제 도메인을 포함한다. C1 프로테아제에서와 같이, MASP-2의 활성화는 세린 프로테아제 도메인에 인접하게 결합된 Arg-Ile의 절단을 통해 발생하며, 이것은 효소를 이황화-결합된 A 및 B 사슬로 분열하였고, 후자는 세린 프로테아제 도메인으로 구성된다.

[0014] MBL은 또한 19 kDa (Map19)의 MBL-관련 단백질 또는 작은 MBL-관련 단백질 (sMAP)로 알려진, MASP-2의 대안으로 슬라이스된 (sliced) 형태와 관련될 수 있으며, 이것은 MASP 2의 촉매 활성이 결핍된다 (Stover, J. Immunol. 162:3481-90, (1999); Takahashi et al., Int. Immunol. 11:859-863, (1999)). Map19는 MASP-2의 처음 두 개의 도메인에 이어서, 네 개의 독특한 아미노산의 추가 서열을 포함한다. Map19의 기능은 불분명하다 (Degen et al., J Immunol. Methods, 2011). MASP-1 및 MASP-2 유전자는 각각 사람 염색체 3 및 1에 위치한다 (Schwaebler et al., Immunobiology 205:455-466, (2002)).

[0015] 여러 줄의 증거는 다른 MBL-MASP 복합체가 있고 혈청에 MASP의 큰 분획이 MBL과 복합체를 형성하지 않는다는 것을 제안한다 (Thiel, et al., J. Immunol. 165:878-887, (2000)). MBL과 마찬가지로, H- 및 L-피콜린 둘 다는 모든 MASP에 결합하고 렉틴 보체 경로를 활성화한다 (Dahl et al., Immunity 15:127-35, (2001); Matsushita et al., J. Immunol. 168:3502-3506, (2002)). 렉틴 및 고전적 경로 둘 다는 일반적인 C3 콘버타제 (C4b2a)를 형성하고 두 개의 경로는 이 단계에서 만나게 된다.

[0016] 렉틴 경로는 나이브 (naive) 숙주의 감염에 대한 숙주 방어에서 중요한 역할을 갖는 것으로 널리 생각된다. 숙주 방어에서 MBL의 수반에 대한 강한 증거는 기능적 MBL의 감소한 혈청 수준을 갖는 환자의 분석으로부터 생긴다 (Kilpatrick, Biochim. Biophys. Acta 1572:401-413, (2002)). 이러한 환자는 반복되는 박테리아 및 균류 감염에 민감성을 나타낸다. 이들 증상은 보통 젊을 때, 모체 유도된 항체 역가가 감소되는 만큼 겉보기에 취약한 동안, 하지만 항체 반응의 전체 레퍼토리가 발달하기 전에 분명하다. 이 증후군은 종종 MBL의 콜라겐성 부분의 여러 부위에서의 돌연변이로부터 발생하며, 이것은 MBL 올리고머의 적절한 형성을 방해한다. 하지만, MBL이 보체와 관계없이 옵소닌으로 기능 할 수 있기 때문에, 감염에 대한 증가한 민감성은 어느 정도가 손상된 보체 활성화로 인한 것인지 알려져 있지 않다.

[0017] 고전적 및 렉틴 경로와 달리, 대체 경로의 개시자 (initiator)는 C1q 및 렉틴이 다른 두 개의 경로로 수행한다는 인식 기능을 수행하는 것으로 발견되지 않았다. 현재 대체 경로가 자발적으로 낮은 수준의 턴오버 (turnover) 활성화를 경험하며, 이것은 자발적으로 보체 활성화를 억제하는 적절한 분자 요소가 없는 외부 또는 다른 비정상적인 표면 (박테리아, 효모, 바이러스 감염된 세포 또는 손상된 조직)에서 쉽게 증폭될 수 있다는 것이 널리 인정된다. 대체 경로의 활성화에 직접적으로 수반된 네 개의 혈장 단백질이 있다: C3, 인자 B 및 D, 및 프로페린.

[0018] 비-감염성 사람 질환의 발생시 고전적 및 대체 보체 경로 둘 다와 연관된 광범위한 증거가 있지만, 렉틴 경로의 역할은 막 평가되기 시작한다. 최근 연구는 렉틴 경로의 활성화가 허혈성/재관류 손상시 보체 활성화 및 관련 염증의 원인이 될 수 있다는 증거를 제공한다. Collard et al. (2000)은 산화적 스트레스를 받은 배양된 내피 세포가 MBL에 결합하고 사람 혈청에 노출시 C3의 침착을 나타내는 것을 보고하였다 (Collard et al., Am. J. Pathol. 156:1549-1556, (2000)). 게다가, 차단 항-MBL 단클론성 항체로 사람 혈청의 치료는 MBL 결합 및 보체 활성화를 억제하였다. 이들 발견은 래트 MBL과 관련된 차단 항체가 처리된 래트가 대조군 항체가 처리된 래트보다 관상 동맥의 폐색 시 훨씬 더 적은 심근 장애를 나타낸 심근 허혈-재관류의 래트 모델로 확장되었다 (Jordan et al., Circulation 104:1413-1418, (2001)). 산화적 스트레스 후에 혈관 내피에 결합하는 MBL의 분자적 메커니즘은 불분명하다; 최근 연구는 산화적 스트레스 후 렉틴 경로의 활성화가 혈관 내피 시토허라틴에 결합하지만, 당접합체에는 아닌 MBL에 의해 매개 될 수도 있다는 것을 제안한다 (Collard et al., Am. J. Pathol. 159:1045-1054, (2001)). 다른 연구는 허혈/재관류 손상의 발생시 고전적 및 대체 경로와 연관되고 이 질환에서 렉틴 경로의 역할은 논란이 남아있다 (Riedermann, N.C., et al., Am. J. Pathol. 162:363-367,

2003).

- [0019] 최근 연구는 MASP-1 (및 또한 아마도 MASP-3)은 대체 경로 활성화 효소 인자 D를 그것의 치모겐 형태로부터 그것의 효소의 의해 활성화된 형태로 전환하기 위해 필요하다 (Takahashi M. et al., J Exp Med 207(1):29-37 (2010)을 참고하면 된다). 이 과정의 생리학적 중요성은 MASP-1/3-결핍 마우스의 혈장의 대체 경로 기능적 활성화의 부재에 의해 강조된다. 원래의 C3으로부터 C3b의 단백질 가수분해 발생은 대체 경로가 기능 하기 위해 필요하다. 대체 경로 C3 컨버타제 (C3bBb)가 필수 서브유닛으로 C3b를 함유하기 때문에, 대체 경로를 통한 첫 번째 C3b의 기원과 관련된 질문은 당혹스러운 문제를 제시하고 상당한 연구를 자극했다.
- [0020] C3은 티오에스테르 결합으로 알려진 드문 번역 후 변형을 함유하는 단백질의 패밀리에 속한다 (C4 및 α -2 매크로글로불린과 함께). 티오에스테르 기는 말단 카르보닐기가 세 개의 아미노산 떨어진 시스테인의 술폰딜 기와 공유결합에 의해 티오에스테르 결합을 형성하는 글루타민으로 구성된다. 이 결합은 불안정하고
- [0021] 친전자성 글루타밀-티오에스테르는 히드록실 또는 아미노 기와 같은 친핵성 모이어티와 반응할 수 있고 따라서 다른 분자와 공유결합을 형성할 수 있다. 티오에스테르 결합은 온전한 C3의 소수성 포켓 내에 격리될 때 상당히 안정적이다. 하지만, C3a 및 C3b로 C3의 단백질 가수분해 절단은 C3b상에서 매우 반응성인 티오에스테르 결합의 노출에 이은, 히드록실 또는 아미노 기를 포함하는 인접한 모이어티에 의한 친핵성 공격을 일으키고, C3b는 공유결합에 의해 표적과 결합한다. 보체 표적에 C3b의 공유결합에 의한 부착시 그것의 잘 기록된 역할 이외에, C3 티오에스테르는 또한 대체 경로를 촉발하는데 있어서 중심 역할을 하는 것으로 생각된다. 널리 인정된 "틱-오버 (tick-over) 이론"에 따라, 대체 경로는 유체상 컨버타제, iC3Bb의 발생에 의해 시작되며, 이것은 가수분해된 티오에스테르 (iC3; C3(H₂O)) 및 인자 B를 가진 C3으로부터 형성된다 (Lachmann, P.J., et al., Springer Semin. Immunopathol. 7:143-162, (1984)). C3b-유사 C3(H₂O)는 단백질의 내부 티오에스테르의 느린 자발적인 가수분해에 의해 원래의 C3으로부터 발생한다 (Pangburn, M.K., et al., J. Exp. Med. 154:856-867, 1981). C3(H₂O)Bb 컨버타제의 활성을 통해, C3b 분자는 표적 표면에 침착되고 그로 인해 대체 경로를 시작한다.
- [0022] 대체 경로의 활성화의 개시자에 대하여 알려진 것은 매우 적다. 활성화제는 효모 세포벽 (치모산), 많은 순수한 다당류, 토끼 적혈구, 특정 면역글로불린, 바이러스, 균류, 박테리아, 동물 종양 세포, 기생충, 및 손상된 세포를 포함하는 것으로 생각된다. 이들 활성화제에 일반적인 유일한 특징은 탄수화물의 존재이지만, 탄수화물 구조의 복잡성 및 다양성은 인식된 공유 분자 결정인자를 입증하는 것을 어렵게 만든다. 대체 경로 활성화는 이 경로의 억제 조절 성분, 예를 들어, 인자 H, 인자 I, DAF, 및 Cr1 및 프로퍼딘 사이의 좋은 균형을 통해 조절되며, 이것은 대체 경로의 유일한 양성 조절기이라는 것이 널리 인정되어 있다 (Schwaebler W.J. 및 Reid K.B., Immunol Today 20(1):17-21 (1999)로 알려져 있다).
- [0023] 상기 설명된, 겔보기에 미조절된 활성화 메카니즘 이외에, 발생한 어떤 C3b도 추가적인 대체 경로 C3 컨버타제 (C3bBb)의 형성에 있어서 인자 B와 함께 참여할 수 있기 때문에, 대체 경로는 또한 렉틴/고전적 경로 C3 컨버타제 (C4b2a)에 대한 강력한 증폭 루프를 제공할 수 있다. 대체경로 C3 컨버타제는 프로퍼딘의 결합에 의해 안정화된다. 프로퍼딘은 대체 경로 C3 컨버타제 반감기를 6 내지 10배로 확장된다. 대체 경로 C3 컨버타제에 C3b의 추가는 대체 경로 C5 컨버타제의 형성으로 이어진다.
- [0024] 모든 세 개의 경로 (즉, 고전적, 렉틴 및 대체)는 C5에서 만나는 것으로 생각되며, 이것은 절단되어 다수의 염증 전 효과를 갖는 생성물을 형성한다. 만나게 된 경로는 말단 보체 경로로 나타난다. C5a는 가장 강한 아나필라톡신이며, 민무늬근 및 혈관 긴장도, 뿐만 아니라 혈관 삼투성을 포함한다. 그것은 또한 강력한 케모타xin이고 호중구 및 단핵구 둘 다의 활성화제이다. C5a-매개된 세포 활성화는 시토킨, 가수분해 효소, 아라키돈산 대사산물, 및 활성산소종을 포함하는, 다수의 추가적인 염증 매개자의 방출을 유발함으로써 염증 반응을 크게 증폭시킬 수 있다. C5 절단은 막 공격 복합체 (membrane attack complex; MAC)로도 알려진, C5b-9의 형성으로 이어진다. 현재 저 용해 MAC 침착이 용해성 기공 형성 복합체로서 그것의 역할 이외에 염증에 있어서 중요한 역할을 할 수도 있다는 강한 증거가 있다.
- [0025] 면역 방어에 있어서 그것의 필수적인 역할 이외에, 보체 시스템은 많은 임상적 질병의 조직 손상에 기여한다. 따라서, 이들 부작용을 방지하기 위해 치료적으로 유효한 보체 억제제를 개발할 긴급한 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0026] 이 개요는 하기 상세한 설명에 추가로 설명된 단순화된 형태로 개념의 선택을 도입하기 위해 제공된다. 이 개요는 주장된 대상 물질의 주요 특징을 확인하기 위한 것이 아니고, 주장된 대상 물질의 범위의 결정에 대한 지원으로서 사용되기 위한 것도 아니다.
- [0027] 한 양태에서, 본 발명은 살아있는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화의 부작용을 억제하는 방법을 제공한다. 방법은 이를 필요로 하는 대상체에, MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태에서, MASP-2 억제제는 C1q-의존적 시스템이 기능을 유지하도록, 고전적 또는 C1q-의존적 시스템을 통해 실질적으로 보체 활성화를 억제하지 않고 렉틴-의존적 MASP-2 시스템을 통해 보체 활성화를 억제한다.
- [0028] 본 발명의 이들 양태의 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체 또는 이들의 단편이다. 추가의 구체예에서, 항-MASP-2 항체는 효과기 기능을 감소시켰다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2 억제제 펩티드 또는 비-펩티드 MASP-2 억제제이다.
- [0029] 또 다른 양태에서, 본 발명은 MASP-2-의존적 보체 활성화의 부작용을 억제하는 조성물을 제공하며, MASP-2 억제제의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 이들이 필요한 살아있는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화의 부작용을 억제하는데 사용되는 약을 제조하는 방법이 또한 제공된다. 본원에서 하기 설명된 각 질병, 질환 및 장애의 치료를 위해 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는데 사용되는 약을 제공하는 방법이 또한 제공된다.
- [0030] 본 발명의 방법, 조성물 및 약은 포유동물 대상체에서 생체 내 MASP-2-의존적 보체 활성화의 부작용을 억제하는데 유용하며, 본원에 추가로 설명된 바와 같이 급성 또는 만성 병리학적 질병 또는 손상으로 고통받는 사람을 포함한다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 양태에서, 발작성야간혈색소뇨증 (paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)으로 고통받는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법이 제공되며, 대상체에 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하는 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은 비-인자 H-의존적 부정형 용혈성 요독성 증후군 (atypical hemolytic uremic syndrome; aHUS)으로 고통받거나 이에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공하며, 대상체에 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0033] 또 다른 양태에서, 본 발명은 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS)에 걸릴 위험이 있는 대상체가 (a) aHUS와 관련된 것으로 알려진 대상체에서 유전적 마커의 존재를 결정하는 단계; (b) 빈혈증 (anemia), 혈소판감소증 (thrombocytopenia), 신부전 (renal insufficiency) 및 크레아티닌 증가로 구성된 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 증상의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 대상체를 주기적으로 관찰하는 단계; 및 (c) 빈혈증, 혈소판감소증, 신부전 또는 크레아티닌 증가 중 적어도 하나의 존재를 결정할 때, 대상체에 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 aHUS와 관련된 임상적 증상으로 고통받을 가능성을 감소시키는 방법을 제공하며, 조성물은 상기 하나 이상의 증상을 개선하기 위한 유효량으로 및 충분한 기간 동안 투여된다.
- [0034] 또 다른 양태에서, 본 발명은 감염에 2차적인 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS)으로 고통받거나, 이에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공하며, 대상체에 MASP-2 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0035] 또 다른 양태에서, 본 발명은 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS)으로 고통받는 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 대상체에 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, MASP-2 억제제는 정맥 내 카테터 (catheter) 또는 다른 전달 방법을 통해 투여된다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 용혈성 요독성 증후군 (HUS)에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 손상된 신장 기능에 걸릴 가능성을 감소시키는 방법을 제공하며, 대상체에 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0037] 또 다른 양태에서, 본 발명은 용혈성 요독성 증후군 (HUS)으로 고통받는 환자를 치료하는 방법을 제공하며, 대상체에 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, MASP-2 억제제의 투여는 정맥 내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 대상체에

전달된다.

- [0038] 또 다른 양태에서, 본 발명은 혈전성 혈소판감소성 자반병 (thrombotic thrombocytopenic purpura; TTP)으로 고통받거나, TTP의 진단과 일치하는 증상을 나타내는 대상체를 치료하는 방법을 제공하며, 대상체에 MASP-2의 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, MASP-2 억제제의 투여는 대상체에 정맥 내 카테터 또는 다른 카테터 전달 방법을 통해 투여된다.
- [0039] 또 다른 양태에서, 본 발명은 난치성 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP)으로 고통받는 대상체를 치료하는 방법을 제공하며 대상체에 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에서, 한랭글로불린혈증 (cryoglobulinemia)으로 고통받는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법이 또한 제공되며, 대상체에 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태에서, 한랭응집소병 (cold agglutinin disease)으로 고통받는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법이 또한 제공되며, 대상체에 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 양태에서, 녹내장 (glaucoma)으로 고통받는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법이 또한 제공되며, 대상체에 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 양태에서, 급성 방사선 증후군 (acute radiation syndrome)에 걸릴 위험이 있거나 이로 고통받는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법이 또한 제공되며, 대상체에 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 항-MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체이다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 방사선 노출 전에 (예를 들어, 방사선 치료 전에, 또는 방사선에 예측된 노출 전에) 예방적으로 대상체에 투여된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 방사선에 노출 후 24 내지 48시간 내에 투여된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 방사선에 노출 전에 및/또는 후에 급성 방사선 증후군과 관련된 하나 이상의 증상을 개선하기 위해 충분한 양으로 투여된다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 본 발명의 상기 언급된 양태 및 수반된 이점 중 많은 것은 같은 것이 동반된 도면과 함께 취해질 때, 다음 상세한 설명에 대한 참고로서 더 잘 이해되는 것처럼 더 쉽게 인정될 것이며;
- 도 1은 사람 MASP-2의 계층 구조를 도시하는 도면이다;
- 도 2a는 사람 MASP-2 단백질의 도메인 구조를 도시하는 개략도이다;
- 도 2b는 사람 Map19 단백질의 도메인 구조를 도시하는 개략도이다;
- 도 3은 쥐 MASP-2 넥아웃 계층을 도시하는 도면이다;
- 도 4는 사람 MASP-2 미니유전자 구조를 도시하는 도면이다;
- 도 5a는 실시예 2에 설명된 바와 같이, MASP-2-결핍은 만난 상의 C4b 침착에 의해 측정된 바와 같이 렉틴-경로-매개된 C4 활성화의 손실로 이어진다는 것을 입증하는 결과를 제공한다;
- 도 5b는 실시예 2에 설명된 바와 같이, MASP-2-결핍은 치모산 상의 C4b 침착에 의해 측정된 바와 같이 렉틴-경로-매개된 C4 활성화의 손실로 이어진다는 것을 입증하는 결과를 제공한다;
- 도 5c는 실시예 2에 설명된 바와 같이, MASP-2-결핍은 만난 및 치모산 상의 C4b 침착에 의해 측정된 바와 같이 MASP-2+/-; MASP-2-/- 및 야생형 균주로부터 얻은 혈액 샘플의 상대적 C4 활성화 수준을 입증하는 결과를 제공한다;
- 도 6은 실시예 2에 설명된 바와 같이, 만난 상의 C4b 침착에 의해 측정된 바와 같이, MASP-2-/- 혈청 샘플에 쥐 재조합 MASP-2의 추가가 단백질 농도 의존적 방식으로 렉틴-경로-매개된 C4 활성화를 회복시킨다는 것을 입증하는 결과를 제공한다;

도 7은 실시예 8에 설명된 바와 같이, MASP-2^{-/-} 균주에서 고전적 경로가 기능적이라는 것을 입증하는 결과를 제공한다;

도 8a는 실시예 10에 설명된 바와 같이, 항-MASP-2 Fab2 항체 #11이 C3 콘버타제 형성을 억제한다는 것을 입증하는 결과를 제공한다;

도 8b는 실시예 10에 설명된 바와 같이, 항-MASP-2 Fab2 항체 #11이 원래의 래트 MASP-2에 결합한다는 것을 입증하는 결과를 제공한다;

도 8c는 실시예 10에 설명된 바와 같이, 항-MASP-2 Fab2 항체 #41은 C4 절단을 억제한다는 것을 입증하는 결과를 제공한다;

도 9는 실시예 10에 설명된 바와 같이, C3 콘버타제 형성을 억제한, 테스트된 항-MASP-2 Fab2 항체 모두가 C4 절단을 억제하는 것으로 발견되었다는 것을 입증하는 결과를 제공한다;

도 10은 실시예 11에 설명된 바와 같이, 항-MASP-2 차단 Fab2 항체의 에피토프 매핑에 사용된 래트 MASP-2로부터 유도된 재조합 폴리펩티드를 도시하는 도면이다.;

도 11은 실시예 11에 설명된 바와 같이, 래트 MASP-2 폴리펩티드에 항-MASP-2 Fab2 #40 및 #60의 결합을 입증하는 결과를 제공한다;

도 12는 실시예 12에 설명된 바와 같이, 신장 허혈/재관류 손상 모델에서 재관류 후 24 및 48시간에 야생형 (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에 대한 혈액 요소 질소 제거를 입증하는 결과를 제공한다;

도 13a는 실시예 13에 설명된 바와 같이, 야생형 (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스로부터 분리된 RPE-맥락막 복합체의 기저 VEGF 단백질 수준을 나타내는 결과를 제공한다;

도 13b는 실시예 13에 설명된 바와 같이, 황반 변성 (macular degeneration) 모델에서 레이저 유발된 손상에 따른 야생형 (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에서 제 3일에 RPE-맥락막 복합체의 VEGF 단백질 수준을 나타내는 결과를 제공한다;

도 14는 실시예 13에 설명된 바와 같이, 야생형 (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에서 레이저 유발된 손상에 따른 제 7일에 평균 맥락막 신혈관 형성 (CNV) 양을 나타내는 결과를 제공한다;

도 15a 및 15b는 실시예 14에 설명된 바와 같이, 정상 래트 혈청에서 MASP-2 Fab2 항체의 투여에 따른 C4b 침착의 억제 (도 15a) 및 트롬빈 활성화의 억제 (도 15b)에 대한 용량 반응 곡선을 제공한다;

도 16a 및 16b는 실시예 15에 설명된 바와 같이, 치료되지 않은 야생형 마우스 및 파종성 혈관 내 응고 (disseminated intravascular coagulation)의 국부화된 슈바르츠만 반응 모델 (Schwartzman reaction model)에서 보체 경로가 고갈제 코브라 독 인자 (CVF) 및 말단 경로 억제제 (C5aR 길항제)에 의해 억제되는 야생형 마우스의 혈소판 응집과 비교하여 (도 16a) MASP-2 (-/-) 마우스 (도 16b)에서 측정된 혈소판 응집 (응집 영역으로 표현됨)을 제공한다;

도 17은 실시예 16에 설명된 바와 같이, WT (+/+) (B6) 또는 WT (+/+) 기증자 신장의 MASP-2 (-/-) 이식 수령자 마우스에서 측정된 혈액 요소 질소 (BUN) 수준을 그래프로 도시한다;

도 18은 실시예 17에 설명된 바와 같이, 맹장 결찰 및 천자 (CLP) 모델에서 미생물 감염 후 날짜의 수의 함수로서 WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스의 퍼센트 생존을 그래프로 도시한다;

도 19는 실시예 17에 설명된 바와 같이, 맹장 결찰 및 천자 (CLP) 모델에서 미생물 감염 후 WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-)에서 측정된 박테리아의 수를 그래프로 도시한다;

도 20은 실시예 18에 설명된 바와 같이, 슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)의 비강 내 투여의 시도 6일 후 WT (+/+) , MASP-2 (-/-) 및 C3 (-/-) 마우스의 퍼센트 생존을 도시하는 카플란 마이어 플롯이다;

도 21은 실시예 19에 설명된 바와 같이, WT 마우스에서 0.6 mg/kg의 마우스 항-MASP-2 단클론성 항체의 복강 내 투여 후 다양한 시점에서 채취된 샘플에서, 대조군의 %로 측정된, C4b 침착의 수준을 그래프로 도시한다;

도 23은 실시예 20에 설명된 바와 같이, 0.3 mg/kg 또는 1.0 mg/kg 마우스 항-MASP-2 단클론성 항체의 단일 복강 내 주사로 미리 치료된 WT (+/+) 마우스에서 레이저 유발된 손상 후 제 7일에 평균 맥락막 신혈관 형성 (CNV) 양을 그래프로 도시한다;

도 24a는 실시예 21에 설명된 바와 같이, 5×10^8 /100 μ l cfu 엔. 메닝기티디스 (*N. meningitidis*)로 감염 후 MASP-2 (-/-) 및 WT (+/+) 마우스의 퍼센트 생존을 그래프로 도시한다;

도 24b는 실시예 21에 설명된 바와 같이, 5×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스로 감염 후 MASP-2 KO (-/-) 및 WT (+/+) 마우스로부터 채취한 혈액 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다;

도 25a는 실시예 21에 설명된 바와 같이, 2×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스로 감염 후 MASP-2 KO (-/-) 및 WT (+/+) 마우스의 퍼센트 생존을 그래프로 도시한다;

도 25b는 실시예 21에 설명된 바와 같이, 2×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스로 감염된 WT (+/+) 마우스로부터 채취된 혈액 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다;

도 25c는 실시예 21에 설명된 바와 같이, 2×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스로 감염된 MASP-2 (-/-) 마우스로부터 채취된 혈액 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시한다;

도 26a는 실시예 22에 설명된 바와 같이, C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시하며, MASP-2 (-/-) 마우스가 기능적 고전적 경로를 유지한다는 것을 입증한다;

도 26b는 실시예 22에 설명된 바와 같이, 치모산 코팅된 플레이트 상의 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시하며, MASP-2 (-/-) 마우스가 기능적 고전적 경로를 유지한다는 것을 입증한다;

도 27a는 실시예 22에 설명된 바와 같이, C4 (-/-) 마우스 (n=6) 및 해당 WT 한배 새끼 대조군 (n=7)에서 관상 동맥 (LAD) 및 재관류의 좌 전하행지 분지 (left anterior descending branch)의 결찰 후 심근 허혈/재관류 손상 (MIRI)-유발된 조직을 그래프로 도시하며, 위험 영역 (AAR) 및 경색 크기 (INF)를 나타낸다;

도 27b는 실시예 22에 설명된 바와 같이, 도 42a에 설명된 바와 같이 처리된 C4 (-/-) 및 WT 마우스에서 위험 영역 (AAR)의 함수로서 경색 크기 (INF)를 그래프로 도시하며, C4 (-/-) 마우스는 WT 대조군 (점선)으로서 MIRI에 민감하다는 것을 입증한다;

도 28a는 실시예 22에 설명된 바와 같이, WT 마우스, C4 (-/-) 마우스의 혈청 및 만난과 함께 미리 배양된 C4 (-/-) 마우스의 혈청을 사용하는 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 28b는 실시예 22에 설명된 바와 같이, 항-쥐 MASP-2 mAb (mAbM11)의 다양한 농도와 혼합된 WT, C4 (-/-), 및 MASP-2 (-/-) 마우스의 혈청 상의 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 28c는 실시예 22에 설명된 바와 같이, WT (C4 충분)의 사람 혈청 및 C4 결핍 혈청, 및 만난과 함께 미리 배양된 C4 결핍 대상체의 혈청 상의 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 28d는 실시예 22에 설명된 바와 같이, 항-사람 MASP-2 mAb (mAbH3)와 혼합된 WT (C4 충분) 및 C4 결핍 대상체의 사람 혈청 상의 C3b 침착 검정의 결과를 그래프로 도시한다;

도 29a는 실시예 22에 설명된 바와 같이, 렉틴 활성화 경로 특이적 검정 조건 하에, 또는 고전적 활성화 경로 특이적 검정 조건 하에 테스트된 다양한 보체 결핍 마우스 군주의 혈장에서 C3 콘버타제 활성의 비교 분석을 그래프로 도시한다;

도 29b는 실시예 22에 설명된 바와 같이, 렉틴 활성화 경로 특이적 조건 하에 테스트된 다양한 보체 결핍 마우스 군주의 혈장에서 C3 콘버타제 활성의 시간-분해 동역학을 그래프로 도시한다;

도 30은 실시예 23에 설명된 바와 같이, a' 사슬의 존재에 의해, 트롬빈 기질 FXIa 및 FXa에 의해 나타난, 사람 C3의 활성화를 나타내는 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한다;

도 31은 실시예 23에 설명된 바와 같이, WT, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) 및 C4 (-/-)로부터 얻은 혈청 샘플 상의 C3 침착 검정의 결과를 나타낸다;

도 32a는 실시예 29에 설명된 바와 같이, 대조군 마우스 및 항-쥐 MASP-2 항체 (mAbM11) 또는 항-사람 MASP-2 항체 (mAbH6)가 처리된 마우스에서 7.0 Gy 방사선에 노출 후 시간이 흐름에 따른 퍼센트 생존을 나타내는 카플란-마이어 생존 플롯이다;

도 32b는 실시예 29에 설명된 바와 같이, 대조군 마우스 및 항-쥐 MASP-2 항체 (mAbM11) 또는 항-사람 MASP-2 항체 (mAbH6)가 처리된 마우스에서 6.5 Gy 방사선에 노출 후 시간이 흐름에 따른 퍼센트 생존을 나타내는 카플란-마이어 생존 플롯이다;

도 33는 실시예 30에 설명된 바와 같이, 2.6×10^7 cfu의 엔. 메닝기티디스 혈청군 A Z2491의 감염성 용량의 투여 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 퍼센트 생존을 그래프로 도시하는 카플란-마이어 플롯이며, MASP-2 결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 유발된 치사로부터 보호된다는 것을 입증한다;

도 34는 실시예 30에 설명된 바와 같이, 6×10^6 cfu의 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58의 감염성 용량의 투여 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 퍼센트 생존을 그래프로 도시하는 카플란-마이어 플롯이며, MASP-2-결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58 유발된 치사로부터 보호된다는 것을 입증한다;

도 35는 실시예 30에 설명된 바와 같이, 6×10^6 cfu의 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58로 복강 내 감염 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스로부터 채취된 혈액 샘플에서 다양한 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시하며 (마우스의 그룹 둘 다에 대하여 다른 시점마다 $n=3$, 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 나타냄), MASP-2 KO 마우스가 WT 마우스와 같은 용량의 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58로 감염되었고, MASP-2 KO 마우스는 WT에 비해 균혈증 (bacteraemia)의 제거를 향상시킨다는 것을 입증한다;

도 36은 실시예 30에 설명된 바와 같이, 6×10^6 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58로 감염 후 3, 6, 12 및 24시간에 MASP-2 및 WT 마우스의 평균 질병 점수를 그래프로 도시하며, MASP-2 결핍 마우스가 감염에 대한 높은 저항성을 나타냈고, 훨씬 더 낮은 질병 점수를 갖는다는 것을 입증한다;

도 37은 실시예 31에 설명된 바와 같이, 4×10^6 /100 μ l cfu 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58의 감염성 용량의 투여 후 이어서, 억제 항-MASP-2 항체 (1 mg/kg) 또는 대조군 이소타입 항체의 감염 3시간 후 투여 후 마우스의 퍼센트 생존을 그래프로 도시하는 카플란 마이어 플롯이며, 항-MASP-2 항체는 엔. 메닝기티디스로 감염된 대상체의 생존을 치료하고 개선하는데 효과적이다;

도 38은 실시예 32에 설명된 바와 같이, (A) 정상 사람 혈청 (NHS) 플러스 사람 항-MASP-2 항체; (B) 정상 사람 혈청 (NHS) 플러스 이소타입 대조군 항체; (C) MBL-/- 사람 혈청; (D) 정상 사람 혈청 (NHS) 및 (E) 열 불활성화된 정상 사람 혈청 (NHS)의 존재시 배양 후 0, 30, 60 및 90분에 6.5×10^6 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58로 복강 내 감염 후 20% 사람 혈청 농도에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스 혈청군 B-MC58의 생균 측정의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시하며, 사람 혈청에서 엔. 메닝기티디스의 보체 의존적 살해가 사람 항-MASP-2 항체의 추가에 의해 크게 향상되었다는 것을 나타낸다;

도 39는 실시예 32에 설명된 바와 같이, 마우스 혈청 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스 혈청군 B-MC58의 생균 측정의 로그 cfu/ml을 그래프로 도시하며, MASP-2 -/- 마우스 혈청은 엔. 메닝기티디스에 대하여 WT 마우스 혈청보다 더 높은 수준의 살균 작용을 갖는다;

도 40는 혈청 농도의 범위 내에서 사람 혈청에 의해 만난-코팅된 쥐 적혈구의 용혈 (광도 측정에 의해 측정된 상층액으로 용해된 마우스 적혈구 (Crry/C3-/-)의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다. 테스트된 혈청은 실시예 33에 설명된 바와 같이, 열 불활성화된 (HI) NHS, MBL-/-, NHS+항-MASP-2 항체 및 NHS 대조군을 포함하였다;

도 41은 혈청 농도의 범위 내에서 사람 혈청에 의해 비-코팅된 쥐 적혈구의 용혈 (광도 측정에 의해 측정된 상층액으로 용해된 WT 마우스 적혈구의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다. 실시예 33에 설명된 바와 같이, 테스트된 혈청은 열 불활성화된 (HI) NHS, MBL-/-, NHS+항-MASP-2 항체 및 NHS 대조군을 포함하였으며, MASP-2를 억제하는 것이 비-민감성 WT 마우스 적혈구의 보체-매개된 용해를 억제한다는 것을 입증한다;

도 42는 혈청 농도의 범위 내에서 사람 혈청에 의해 비-코팅된 쥐 적혈구의 용혈 (광도 측정에 의해 측정된 상층액으로 용해된 마우스 적혈구 (CD55/59 -/-)의 헤모글로빈 방출에 의해 측정됨)을 그래프로 도시한다. 실시예 33에 설명된 바와 같이, 테스트된 혈청은 열 불활성화된 (HI) NHS, MBL-/-, NHS+항-MASP-2 항체 및 NHS 대조군을 포함하였다;

도 43은 실시예 34에 설명된 바와 같이, 대조군 마우스 및 항-사람 MASP-2 항체 (mAbH6)가 처리된 마우스에서 8.0 Gy 방사선에 노출 후 시간 (일)이 흐름에 따른 퍼센트 생존을 그래프로 도시한다;

도 44는 실시예 35에 설명된 바와 같이, MASP-2 $-/-$ 및 WT 마우스에서 LPS 감염 후 미소혈관 폐색이 시작하는 시간을 그래프로 도시하며, 혈전 형성을 갖는 마우스의 퍼센트는 60분 동안 측정했다는 것을 나타내고, 혈전 형성이 WT 마우스에서 15분 후 검출된다는 것을 입증하였고, 최대 80%의 WT 마우스가 60분에 혈전 형성을 입증하였으나, 이와 달리, MASP-2 $-/-$ 마우스 중 아무것도 60분 기간 동안 혈전 형성을 나타내지 않았다 (로그 랭크: $p=0.0005$); 및

도 45는 실시예 36에 설명된 바와 같이, 시간 (시간)이 흐름에 따라 HUS의 STX/LPS-유발된 모델에서 식염수 처리된 대조군 마우스 ($n=5$) 및 항-MASP-2 항체 처리된 마우스 ($n=5$)의 퍼센트 생존을 그래프로 도시하며, 대조군 마우스의 모두가 42시간까지 죽는 반면에, 반대로 항-MASP-2 항체-처리된 마우스의 100%는 실험의 시간 과정 동안 생존하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

서열 목록의 설명

- [0045] SEQ ID NO: 1 사람 MAP19 cDNA
- [0046] SEQ ID NO: 2 사람 MAP19 단백질 (선도 서열을 가짐)
- [0047] SEQ ID NO: 3 사람 MAP19 단백질 (성숙한)
- [0048] SEQ ID NO: 4 사람 MASP-2 cDNA
- [0049] SEQ ID NO: 5 사람 MASP-2 단백질 (선도 서열을 가짐)
- [0050] SEQ ID NO: 6 사람 MASP-2 단백질 (성숙한)
- [0051] SEQ ID NO: 7 사람 MASP-2 gDNA (엑손 1-6)
- [0052] 항원: (MASP-2 성숙한 단백질에 대한 참고)
- [0053] SEQ ID NO: 8 CUBI 서열 (aa 1-121)
- [0054] SEQ ID NO: 9 CUBEGF 서열 (aa 1-166)
- [0055] SEQ ID NO: 10 CUBEGFCUBII (aa 1-293)
- [0056] SEQ ID NO: 11 EGF 영역 (aa 122-166)
- [0057] SEQ ID NO: 12 세린 프로테아제 도메인 (aa 429-671)
- [0058] SEQ ID NO: 13 세린 프로테아제 도메인 불활성 (Ser618이 Ala 돌연변이된 aa 610-625)
- [0059] SEQ ID NO: 14 TPLGPKWPEPVFGRL (CUB1 펩티드)
- [0060] SEQ ID NO: 15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (CUB1 펩티드)
- [0061] SEQ ID NO: 16 TFRSDYSN (MBL 결합 영역 코어)
- [0062] SEQ ID NO: 17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL 결합 영역)
- [0063] SEQ ID NO: 18 IDECQVAPG (EGF 펩티드)
- [0064] SEQ ID NO: 19 ANMLCAGLESGGKDSRGDSGGALV (세린 프로테아제 결합 코어)상세한 설명
- [0065] 펩티드 억제제:
- [0066] SEQ ID NO: 20 MBL 전체 길이 cDNA
- [0067] SEQ ID NO: 21 MBL 전체 길이 단백질
- [0068] SEQ ID NO: 22 OGK-X-GP (공통 결합)
- [0069] SEQ ID NO: 23 OGKLG
- [0070] SEQ ID NO: 24 GLR GLQ GPO GKL GPO G

- [0072] SEQ ID NO: 25 GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GPO GPO
- [0073] SEQ ID NO: 26 GKDGRDGTKGEKGEPEGQLRGLQGPOGKLGPOG
- [0074] SEQ ID NO: 27 GAOGSOGKEKGAOGPOGPOGPOGKMGPKGEOGDO (사람 h-피콜린)
- [0075] SEQ ID NO: 28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOGEO (사람 피콜린 p35)
- [0076] SEQ ID NO: 29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (C4 절단 부위)
- [0077] 발현 억제제:
- [0078] CUBI-EGF 도메인의 SEQ ID NO: 30 cDNA (SEQ ID NO: 4의 뉴클레오티드 22-680)
- [0079] SEQ ID NO: 31
- [0080] MASP-2 번역 시작 부위 (센스)를 포함하는 SEQ ID NO: 4의 5' CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3' 뉴클레오티드 12-45
- [0081] SEQ ID NO: 32
- [0082] MASP-MBL 결합 부위 (센스)를 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO: 4의 5' GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG 3' 뉴클레오티드 361-396
- [0083] SEQ ID NO: 33
- [0084] CUBII 도메인을 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO: 4의 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3' 뉴클레오티드 610-642
- [0085] 클로닝 프라이머:
- [0086] SEQ ID NO: 34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (CUB에 대하여 5' PCR)
- [0087] SEQ ID NO: 35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (CUB에 대하여 3' PCR)
- [0088] SEQ ID NO: 36 GGAATTCCTACAGGGCGCT (CUBIEGF에 대하여 3' PCR)
- [0089] SEQ ID NO: 37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (CUBIEGFCUBII에 대하여 3' PCR)
- [0090] SEQ ID NOS: 38-47은 사람화된 항체에 대한 클로닝 프라이머이다
- [0091] SEQ ID NO: 48은 9 aa 펩티드 결합이다
- [0092] 발현 벡터:
- [0093] SEQ ID NO: 49는 MASP-2 미니유전자 삽입이다
- [0094] SEQ ID NO: 50는 쥐 MASP-2 cDNA이다
- [0095] SEQ ID NO: 51은 쥐 MASP-2 단백질 (선도 서열을 가짐)이다
- [0096] SEQ ID NO: 52는 성숙한 쥐 MASP-2 단백질이다
- [0097] SEQ ID NO: 53 래트 MASP-2 cDNA
- [0098] SEQ ID NO: 54는 래트 MASP-2 단백질 (선도 서열을 가짐)이다
- [0099] SEQ ID NO: 55는 성숙한 래트 MASP-2 단백질이다
- [0100] SEQ ID NO: 56-59는 사람 MASP-2A를 발생시키기 위해 사용된 사람 MASP-2의 부위-관련 돌연변이 생성을 위한 올리고뉴클레오티드이다
- [0101] SEQ ID NO: 60-63는 쥐 MASP-2A를 발생시키기 위해 사용된 쥐 MASP-2의 부위-관련 돌연변이 생성을 위한 올리고뉴클레오티드이다
- [0102] SEQ ID NO: 64-65는 래트 MASP-2A를 발생시키기 위해 사용된 래트 MASP-2의 부위-관련 돌연변이 생성을 위한 올리고뉴클레오티드이다

[0103] 상세한 설명

[0104] 본 발명은 고전적 경로를 온전하게 유지하면서 렉틴 매개된 MASP-2 경로를 억제하는 것이 가능하다는, 본 발명자에 의한 놀라운 발견에 기초한다. 본 발명은 또한 면역 시스템의 고전적 (C1q-의존적) 경로 성분을 온전하게 유지하면서 렉틴-매개된 보체 경로 활성화와 관련된 세포 손상을 억제하는 치료적 표적으로서 MASP-2의 사용을 설명한다.

[0105] 1. 정의

[0106] 본원에 특이적으로 정의되지 않으면, 본원에 사용된 모든 용어는 본 발명의 당업자들에 의해 이해된 것들과 같은 의미가 있다. 다음 정의는 용어들이 본 발명을 설명하기 위해 명세서 및 청구범위에 사용되기 때문에, 용어에 관한 명확성을 제공하기 위해 제공된다.

[0107] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "MASP-2-의존적 보체 활성화"는 렉틴 경로의 MASP-2-의존적 활성화를 포함하며, 이것은 렉틴 경로 C3 콘버타제 C4b2a의 형성으로 이어지는 생리학적 조건 하에 (즉, Ca^{++} 의 존재시) 및 C3 절단 생성물 C3b의, 이후에 C5 콘버타제 C4b2a(C3b)_n으로 축적시 발생하며, 이것은 주로 옵소닌화를 유발하는 것으로 결정되었다.

[0108] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대체 경로"는 균류 및 효모 세포벽의 치모산, 그람 음성 외막, 토끼 적혈구, 뿐만 아니라 많은 순수한 다당류, 토끼 적혈구, 바이러스, 박테리아, 동물 종양 세포, 기생충 및 손상된 세포의 지질다당류 (LPS)에 의해 촉발되는 보체 활성화를 나타내며, 전통적으로 보체 인자 C3의 C3b의 자발적 단백질 가수분해 발생으로부터 발생하는 것으로 생각되어 왔다.

[0109] 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "렉틴 경로"는 만난-결합 렉틴 (MBL), CL-11 및 피콜린 (H-피콜린, M-피콜린, 또는 L-피콜린)을 포함하는, 혈청 및 비-혈청 탄수화물-결합 단백질의 특이적 결합을 통해 발생하는 보체 활성화를 나타낸다.

[0110] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "고전적 경로"는 외부 입자에 결합된 항체에 의해 촉발된 보체 활성화를 나타내고 인식 분자 C1q의 결합을 필요로 한다.

[0111] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "MASP-2 억제제"는 MASP-2에 결합하거나 직접적으로 상호작용하는 어떤 약제도 나타낼 수 있고 MASP-2-의존적 보체 활성화를 효과적으로 억제하며, 항-MASP-2 항체 및 이들의 MASP-2 결합 단편, 천연 및 합성 펩티드, 작은 분자, 가용성 MASP-2 수용체, 발현 억제제 및 분리된 천연 억제제를 포함하고, 또한 렉틴 경로에서 또 다른 인식 분자 (예를 들어, MBL, H-피콜린, M-피콜린, 또는 L-피콜린)에 결합에 대하여 MASP-2와 경쟁하는 펩티드를 포함하지만, 이러한 다른 인식 분자에 결합하는 항체를 포함하지 않는다. 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 MASP-2-의존적 보체 활성화를 20% 이상, 예를 들어, 50% 이상, 예를 들어, 90% 이상 감소시킬 수도 있다. 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존적 보체 활성화를 90% 이상 감소시킨다 (즉, 10% 미만의 MASP-2 보체 활성화를 일으킴).

[0112] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 표적 폴리펩티드, 예를 들어, MASP-2, 폴리펩티드 또는 이들의 일부에 특이적으로 결합하는 항체 및 이들의 항체 단편을 포함하며, 어떤 항체-생산 포유동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 및 사람을 포함하는 영장류), 또는 히브리도마 (hybridoma), 파지 선택, 재조합 발현 또는 형질전환된 동물 (또는 항체 또는 항체 단편을 생산하는 다른 방법)로부터 유도된다. 용어 "항체"는 항체의 공급원 또는 그것이 만들어진 방식 (예를 들어, 히브리도마, 파지 선택, 재조합 발현, 형질전환 동물, 펩티드 합성, 등에 의해)에 관하여 제한하기 위한 것은 아니다. 전형적인 항체는 다클론성, 단클론성 및 재조합 항체; 팬-특이적, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이특이적 항체, 삼특이적 항체); 사람화된 항체; 쥐 항체; 키메라, 마우스-사람, 마우스-영장류, 영장류-사람 단클론성 항체; 및 항-이디오타입 항체를 포함하고, 어떤 온전한 항체 또는 이들의 단편일 수도 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체"는 온전한 다클론성 또는 단클론성 항체, 뿐만 아니라 이들의 단편 (예를 들어, dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬 (ScFv), 이들의 합성 변이체, 자연 발생 변이체, 원하는 특이성의 항원-결합 단편을 갖는 항체 일부를 포함하는 융합 단백질, 사람화된 항체, 키메라 항체, 및 항원-결합 부위 또는 원하는 특이성을 갖는 단편 (에피토프 인식 부위)을 포함하는 면역글로불린 분자의 어떤 다른 변형된 구조도 포함한다.

[0113] "단클론성 항체"는 동질의 항체 집단을 나타내며 여기에서 단클론성 항체는 에피토프의 선택적 결합에 수반되는 아미노산 (자연 발생 및 비-자연 발생)으로 구성된다. 단클론성 항체는 표적 항원에 매우 특이적이다. 용어 "단클론성 항체"는 온전한 단클론성 항체 및 전체-길이 단클론성 항체, 뿐만 아니라 이들의 단편 (예를 들어, Fab,

Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬 (ScFv), 이들의 변이체, 항원-결합 부분을 포함하는 융합 단백질, 사람화된 단클론성 항체, 키메라 단클론성 항체, 원하는 특이성 및 에피토프에 결합하는 능력의 항원-결합 단편 (에피토프 인식 부위)을 포함하는 면역글로불린 분자의 어떤 다른 변형된 구조도 포함한다. 항체의 공급원 또는 그것이 만들어진 방식 (예를 들어, 하이브리도마, 파지 선택, 재조합 발현, 형질전환 동물, 등에 의해)에 관하여 제한되는 것은 아니다. 용어는 전체 면역글로불린, 뿐만 아니라 "항체"의 정의 하에 상기 설명된 단편 등을 포함한다.

[0114] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "항체 단편"은 전체-길이 항체로부터 유도된 또는 이와 관련된 부분을 나타내며, 예를 들어, 항-MASP-2 항체는 일반적으로 항원 결합 또는 이들의 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 구체적인 예는 Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ 및 Fv 단편, scFv 단편, 이중체, 선형 항체, 단일 사슬 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같이, "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 V_H 및 V_L 도메인을 포함하며, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. Fv 폴리펩티드는 V_H 및 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 결합자를 추가로 포함하며, 이것은 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 한다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같이, "키메라 항체"는 비-사람 종 (예를 들어, 설치류) 항체로부터 유도된 가변 도메인 및 상보성-결정 영역을 함유하는 재조합 단백질인 한편, 항체 분자의 나머지는 사람 항체로부터 유도된다.

[0117] 본원에 사용된 바와 같이, "사람화된 항체"는 사람 항체 프레임워크에 이식된 비-사람 면역글로불린으로부터 유도된 특이적 상보성-결정 영역에 따르는 최소 서열을 포함하는 키메라 항체이다. 사람화된 항체는 전형적으로 유일하게 항체 상보성-결정 영역은 비-사람 기원인 재조합 단백질이다.

[0118] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "만난-결합 력" ("MBL")은 만난-결합 단백질 ("MBP")과 동등하다.

[0119] 본원에 사용된 바와 같이, "막 공격 복합체" ("MAC")는 막으로 삽입되고 이를 붕괴하는 말단 다섯 개의 보체 성분 (C6, C7, C8 및 C-9와 결합된 C5b)의 복합체를 나타낸다 (C5b-9로도 불림).

[0120] 본원에 사용된 바와 같이, "대상체"는 모든 포유동물을 포함하며, 제한 없이 사람, 비-사람 영장류, 개, 고양이, 말, 양, 염소, 소, 토끼, 돼지 및 설치류를 포함한다.

[0121] 본원에 사용된 바와 같이, 아미노산 잔기는 다음과 같이 줄여쓴다: 알라닌 (Ala;A), 아스파라긴 (Asn;N), 아스파르트산 (Asp;D), 아르기닌 (Arg;R), 시스테인 (Cys;C), 글루탐산 (Glu;E), 글루타민 (Gln;Q), 글리신 (Gly;G), 히스티딘 (His;H), 이소류신 (Ile;I), 류신 (Leu;L), 리신 (Lys;K), 메티오닌 (Met;M), 페닐알라닌 (Phe;F), 프롤린 (Pro;P), 세린 (Ser;S), 트레오닌 (Thr;T), 트립토판 (Trp;W), 티로신 (Tyr;Y), 및 발린 (Val;V).

[0122] 넓은 의미에서, 자연 발생한 아미노산은 각각의 아미노산의 측쇄의 화학적 특성에 기초하여 그룹으로 나누어질 수 있다. "소수성" 아미노산은 Ile, Leu, Met, Phe, Trp, Tyr, Val, Ala, Cys 또는 Pro를 의미한다. "친수성" 아미노산은 Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Asp, Glu, Lys, Arg 또는 His를 의미한다. 아미노산의 이 그룹은 다음과 같이 추가적 하위 등급으로 분류될 수 있다. "비전하 친수성" 아미노산은 Ser, Thr, Asn 또는 Gln을 의미한다. "산성" 아미노산은 Glu 또는 Asp를 의미한다. "염기성" 아미노산은 Lys, Arg 또는 His를 의미한다.

[0123] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "보존적 아미노산 치환"은 다음 각 그룹 내에 아미노산 중에서 치환에 의해 설명된다: (1) 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 이소류신, (2) 페닐알라닌, 티로신, 및 트립토판, (3) 세린 및 트레오닌, (4) 아스파르테이트 및 글루타메이트, (5) 글루타민 및 아스파라긴, 및 (6) 리신, 아르기닌 및 히스티딘.

[0124] 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 본원에 사용된 바와 같이, 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머 또는 이들의 모방체를 나타낸다. 이 용어는 또한 자연 발생한 뉴클레오타이드, 당 및 공유결합된 뉴클레오타이드 사이 (백본) 결합, 뿐만 아니라 비-자연 발생한 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 구성된 올리고핵 염기를 커버한다.

[0125] 본원에 사용된 바와 같이, "에피토프"는 항체에 의해 결합된 단백질 (예를 들어, 사람 MASP-2 단백질) 상의 부위를 나타낸다. "중첩 에피토프"는 적어도 하나의 (예를 들어, 둘, 셋, 넷, 다섯, 또는 여섯) 공통 아미노산 잔기(들)를 포함하며, 선형 및 비-선형 에피토프를 포함한다.

[0126] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "폴리펩티드," "펩티드," 및 "단백질"은 교체 가능하게 사용되고 길이 또는 변

역 후 변형에 상관없이, 아미노산의 어떤 펩티드-결합된 사슬도 의미한다. 여기에 설명된 MASP-2 단백질은 야생형 단백질을 함유할 수 있거나 야생형 단백질일 수 있거나 50개 이하 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 50 이하)의 보존적 아미노산 치환을 갖는 변이체일 수 있다. 보존적 치환은 전형적으로 다음 그룹 내 치환을 포함한다: 글리신 및 알라닌; 발린, 이소류신, 및 류신; 아스파르트산 및 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민, 세린 및 트레오닌; 리신, 히스티딘 및 아르기닌; 및 페닐알라닌 및 티로신.

[0127] 일부 구체예에서, 사람 MASP-2 단백질은 SEQ ID NO: 5에 설명된 아미노산을 갖는 사람 MASP-2 단백질과 70 (예를 들어, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100) % 이상 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0128] 일부 구체예에서, 펩티드 단편은 길이가 적어도 6개 (예를 들어, 적어도 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 또는 600개 이상)인 아미노산 잔기 (예를 들어, SEQ ID NO: 5의 적어도 6개의 인접한 아미노산 잔기)일 수 있다. 일부 구체예에서, 사람 MASP-2 단백질의 항원성 펩티드 단편은 길이가 500개 이하 (예를 들어, 450, 400, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 95, 90, 85, 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 또는 6개 이하)의 아미노산 잔기 (예를 들어, SEQ ID NOS: 5 중 어느 하나에서 500개 이하의 인접한 아미노산 잔기)이다.

[0129] 퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성은 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해, 필요하면, 서열을 배열하고 갭 (gap)을 도입한 후 참고 서열의 아미노산과 동일한 후보 서열의 아미노산 퍼센트로서 정의된다. 퍼센트 서열 동일성을 결정할 목적의 배열은 업계 내에 있는 다양한 방법, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 으로 달성될 수 있다. 비교되는 서열의 전체 길이의 최대 배열을 달성하기 위해 필요한 어떤 알고리즘도 포함하는, 배열을 측정하는 적절한 파라미터는 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0130] II. 본 발명의 개요

[0131] 렉틴 (MBL, M-피콜린, H-피콜린, L-피콜린 및 CL-11)은 선천적 보체 시스템을 촉발하는 특이적 인식 분자이고 시스템은 말단 보체 효과기 분자의 렉틴-시작된 활성화를 증폭하는 렉틴 시작 경로 및 관련 말단 경로 증폭 루프를 포함한다. C1q는 후천적 보체 시스템을 촉발하는 특이적 인식 분자이고 시스템은 말단 보체 효과기 분자의 C1q-시작된 활성화를 증폭하는 고전적 시작 경로 및 관련 말단 경로 증폭 루프를 포함한다. 우리는 이들 두 개의 주요 보체 활성화 시스템을 각각 렉틴-의존적 보체 시스템 및 C1q-의존적 보체 시스템으로 나타낸다.

[0132] 면역 반응에서 그것의 필수적인 역할 이외에, 보체 시스템은 많은 임상적 질병의 조직 손상에 기여한다. 따라서, 이들 부작용을 방지하는 치료적으로 유효한 보체 억제제를 개발할 긴급한 필요가 있다.

[0133] 고전적 경로를 온전하기 유지하면서 렉틴 매개된 렉틴 매개된 MASP-2 경로를 억제하는 것이 가능하다는 인식은 보체의 면역 방어 능력을 완전히 폐쇄하지 않고 특정 병리학을 유발하는 보체 활성화 시스템만을 특이적으로 억제하는 것이 매우 바람직한 것으로 실현된다. 예를 들어, 보체 활성화가 대부분 렉틴-의존적 보체 시스템에 의해 매개되는 질병 상태에서, 이 시스템만을 특이적으로 억제하는 것이 이로울 것이다. 이것은 C1q-의존적 보체 활성화 시스템을 온전하게 유지하여 면역 복합체 가공을 조작하고 감염에 대한 숙주 방어를 지원한다.

[0134] 렉틴-의존적 보체 시스템을 특이적으로 억제하기 위한 치료제의 개발에 있어서 표적에 대한 바람직한 단백질 성분은 MASP-2이다. 렉틴-의존적 보체 시스템의 모든 알려진 단백질 성분 중에 (MBL, H-피콜린, M-피콜린, L-피콜린, MASP-2, C2-C9, 인자 B, 인자 D, 및 프로페린), MASP-2만이 렉틴-의존적 보체 시스템에 유일하고 시스템이 기능하는데 필요하다. 렉틴 (MBL, H-피콜린, M-피콜린, L-피콜린 및 CL-11)은 또한 렉틴-의존적 보체 시스템의 독특한 성분이다. 하지만, 렉틴 성분 중 어느 하나의 손실도 렉틴 중복으로 인한 시스템의 활성화를 반드시 억제하지 않을 것이다. 렉틴-의존적 보체 활성화 시스템의 억제를 보장하기 위해 모든 다섯 개의 렉틴을 억제하는 것이 필수적이다. 게다가, MBL 및 피콜린이 또한 보체와 독립적으로 옵소닌 활성을 갖는 것으로 알려져 있기 때문에, 렉틴 기능의 억제는 감염에 대하여 이 유익한 숙주 방어 메커니즘의 손실을 일으킨다. 반대로, 이 보체-독립적 렉틴 옵소닌 활성은 MASP-2가 억제 표적인 경우 온전하게 유지된다. 렉틴-의존적 보체 활성화 시스템을 억제하는 치료적 표적으로서 MASP-2의 추가된 이점은 MASP-2의 혈장 농도가 어떤 보체 단백질 중 가장 낮은 수

준이다 (500 ng/ml); 그러므로, MASP-2의 고-친화도 억제제의 상대적으로 낮은 농도는 전체 억제를 얻기 위해 충분할 수도 있다 (Moller-Kristensen, M., et al., J. Immunol Methods 282:159-167, 2003).

[0135] **III. 다양한 질환 및 질병에서 MASP-2의 역할 및 masp-2 억제제를 사용하는 치료 방법**

[0136] **신장 질환**

[0137] 보체 시스템의 활성화는 다양한 신장 질환의 발병의 원인이었으며; 혈관 사이 증식성 사구체 신염 (mesangioproliferative glomerulonephritis) (IgA-신증 (IgA-nephropathy), 버거스 병 (Berger's disease)) (Endo, M., et al., Clin. Nephrology 55:185-191, 2001), 막성 사구체 신염 (Kerjashki, D., Arch B Cell Pathol. 58:253-71, 1990; Brenchley, P.E., et al., Kidney Int., 41:933-7, 1992; Salant, D.J., et al., Kidney Int. 35:976-84, 1989), 막성 증식성 사구체 신염 (membranoproliferative glomerulonephritis) (모세관 사이 사구체 신염 (mesangiocapillary glomerulonephritis)) (Bartlow, B.G., et al., Kidney Int. 15:294-300, 1979; Meri, S., et al., J. Exp. Med. 175:939-50, 1992), 급성 감염 후 사구체 신염 (acute postinfectious glomerulonephritis) (용렌균 감염 후 사구체 신염 (poststreptococcal glomerulonephritis)), 한랭글로불린혈증 사구체 신염 (cryoglobulinemic glomerulonephritis) (Ohsawa, I., et al., Clin Immunol. 101:59-66, 2001), 홍반성 신염 (lupus nephritis) (Gatenby, P.A., Autoimmunity 11:61-6, 1991), 및 헤노흐-쾨라인 자반성 신염 (Henoch-Schonlein purpura nephritis) (Endo, M., et al., Am. J. Kidney Dis. 35:401-407, 2000). 신장 질환에 보체의 수반은 수십 년 동안 인정되어왔지만 신장 질환의 발병, 발달 및 해결 단계에 있어서 그것의 정확한 역할에 대한 주요 논의가 남았다. 정상 조건 하에 보체의 기여는 숙주에게 이롭지만, 부적절한 활성화 및 보체의 침착은 조직 손상에 기여할 수도 있다.

[0138] 사구체 신염, 사구체의 염증이 종종 사구체 또는 보체 활성화, 염증 및 조직 손상을 촉발하는 관 구조에 면역 복합체의 침착에 의해 시작된다는 실질적인 증거가 있다. Kahn 및 Sinniah는 다양한 형태의 사구체 신염에 걸린 환자로부터 채취한 생체 조직의 관형 기저 막에서 C5b-9의 증가된 침착을 입증하였다 (Kahn, T.N., et al., Histopath. 26:351-6, 1995). IgA 신증에 걸린 환자의 연구에서 (Alexopoulos, A., et al., Nephrol. Dial. Transplant 10:1166-1172, 1995), 관형 내피/기저 막 구조에서 C5b-9 침착은 혈장 크레아티닌 수준과 연관성이 있다. 막성 신증의 또 다른 연구는 임상적 결과 및 소변 sC5b-9 수준 사이의 관계를 입증하였다 (Kon, S.P., et al., Kidney Int. 48:1953-58, 1995). 향상된 sC5b-9 수준은 불량한 예후와 긍정적인 연관성이 있다. Lehto et al.은 CD59, 혈장 막의 막 공격 복합체를 억제하는 보체 조절 인자, 뿐만 아니라 막성 사구체 신염에 걸린 환자의 소변의 C5b-9의 증가된 수준을 측정하였다 (Lehto, T., et al., Kidney Int. 47:1403-11, 1995). 이들 같은 환자로부터 채취한 생체 조직 샘플의 병리조직학적 분석은 사구체에서 C3 및 C9 단백질의 침착을 입증한 반면에, 이들 조직에서 CD59의 발현은 정상 신장 조직의 그것에 비해 감소하였다. 이들 다양한 연구는 진행중인 보체-매개된 사구체 신염이 조직 손상 및 질환 예후의 정도와 관련된 보체 단백질의 소변 배출을 일으킨다.

[0139] 사구체 신염의 다양한 동물 모델에서 보체 활성화의 억제는 또한 질환의 병인학 (etiology)에서 보체 활성화의 중요성을 입증하였다. 막성 증식성 사구체 신염 (MPGN)의 모델에서, C6-결핍 래트 (C5b-9를 형성할 수 없음)의 항-Thy1 항혈청의 투입은 90% 더 적은 사구체 세포 증식, 혈소판 및 대식세포 침투의 80% 감소, 감소된 콜라겐 타입 IV 합성 (혈관 사이 매트릭스 확장에 대한 마커), 및 C6+ 정상 래트보다 50% 더 적은 단백질뇨증을 일으켰다 (Brandt, J., et al., Kidney Int. 49:335-343, 1996). 이들 결과는 C5b-9 래트 항-흉선 세포 혈청 모델에서 보체에 의한 조직 손상의 주요 매개자로서 C5b-9를 연루시킨다. 사구체 신염의 또 다른 모델에서, 토끼 항-래트 사구체 기저 막의 등급별 용량의 투여는 다형핵 백혈구 (PMN)의 용량-의존적 유입을 생산하였다 (Scandrett, A.L., et al., Am. J. Physiol. 268:F256-F265, 1995). 코브라 독 인자-처리된 래트는 또한 대조군 래트보다 감소한 조직병리학, 감소한 장기간 단백질뇨, 및 더 낮은 크레아티닌 수준을 나타냈다. 래트에서 GN의 세 가지 모델 (항-흉선 세포 혈청, Con A 항-Con A, 및 수동적 헤이만 신염 (Heymann nephritis))을 이용하여, Couser et al.은 재조합 sCR1 단백질을 사용함으로써 보체를 억제하는 접근법의 잠재적인 치료적 효능을 입증하였다 (Couser, W.G., et al., J. Am. Soc. Nephrol. 5:1888-94, 1995). sCR1이 처리된 래트는 대조군 래트에 비해 크게 감소된 PMN, 혈소판 및 대식 세포 유입, 감소한 혈관 사이 용해, 및 단백질뇨를 나타냈다. 사구체 신염에서 보체 활성화의 중요성에 대한 추가의 증거는 NZB/W F1 마우스 모델에서 항-C5 MoAb의 사용에 의해 제공되었다. 항-C5 MoAb는 C5의 절단을 억제하고, 따라서 C5a 및 C5b-9의 발생을 차단한다. 6개월 동안 항-C5 MoAb로 지속적인 치료는 사구체 신염의 경과의 상당한 개선을 일으켰다. 사람 보체 성분 C5의, 그것의 염증 전 성분으로의 절단을 방지하는 사람화된 항-C5 MoAb 단클론성 항체 (5G1.1)는 사구체 신염에 대한 잠재적 치료로서 Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut에 의해 개발중이다.

- [0140] 신장 손상에서 보체의 병리학적 역할에 대한 직접적인 증거는 특정 보체 성분이 유전적으로 결핍된 환자의 연구에 의해 제공된다. 많은 보고서는 보체 조절 인자 H의 결핍과 신장 질환의 관계를 기록하였다 (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet.* 31:424-8, 2002). 인자 H 결핍은 인자 B 및 C3의 낮은 혈장 수준 및 C5b-9의 소모를 일으킨다. 부정형 막성 증식성 사구체 신염(MPGN) 및 특발성 용혈성 요독성 증후군 (HUS) 둘 다는 인자 H 결핍과 관련된다. 인자 H 결핍 돼지 (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int.* 53:331-49, 1998) 및 인자 H 녹아웃 마우스 (Pickering, M.C., 2002)는 MPGN-유사 증상을 나타내며, 보체 조절에 있어서 인자 H의 중요성을 확인한다. 다른 보체 성분의 결핍은 전신 홍반성 루푸스 (systemic lupus erythematosus; SLE)의 발달에 2차적인 신장 질환과 관련된다 (Walport, M.J., Davies, et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997). C1q, C4 및 C2에 대한 결핍은 면역 복합체 및 아콤포시스성 물질의 불량한 제거와 관련된 메커니즘을 통한 SLE의 발달에 매우 취약하다. 이들 SLE 환자 중 많은 사람들에서 홍반성 신염이 발생하며, 사구체에 걸친 면역 복합체의 침착을 특징으로 한다.
- [0141] 보체 활성화 및 신장 질환과 관련된 추가의 증거는 보체 성분에 관한 자가 항체의 환자에서 확인에 의해 제공되었으며, 이것들 중 일부는 신장 질환에 직접적으로 관련된다 (Trouw, L.A., et al., *Mol. Immunol.* 38:199-206, 2001). 많은 이들 자가 항체는 신장 질환과 이런 높은 정도의 연관성을 나타내며 용어 신장 인자 (nephritic factor; NeF)가 이 활성을 나타내기 위해 도입되었다. 임상 연구에서, 신장 인자에 양성인 환자 중 약 50%는 MPGN에 걸렸다 (Spitzer, R.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64:177-83, 1992). C3NeF는 대체 경로 C3 콘버타제 (C3bBb)와 관련된 자가 항체이고 그것은 이 콘버타제를 안정화하고, 그로 인해 대체 경로 활성화를 촉진한다 (Daha, M.R., et al., *J. Immunol.* 116:1-7, 1976). 유사하게, C4NeF로 불리는, 고전적 경로 C3 콘버타제 (C4b2a)에 대한 특이성을 갖는 자가 항체는 이 콘버타제를 안정화하고 그로 인해 고전적 경로 활성화를 촉진한다 (Daha, M.R. et al., *J. Immunol.* 125:2051-2054, 1980; Halbwachs, L., et al., *J. Clin. Invest.* 65:1249-56, 1980). 항-C1q 자가 항체는 SLE 환자의 신염과 관련된 것으로 설명되었고 (Hovath, L., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 19:667-72, 2001; Siegert, C., et al., *J. Rheumatol.* 18:230-34, 1991; Siegert, C., et al., *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:19-23, 1992) 이들 항-C1q 자가 항체의 역가의 증가는 신염의 플레어 (flare)를 예측하는 것으로 보고되었다 (Coremans, I.E., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 26:595-601, 1995). SLE 환자의 사후 신장으로부터 용출된 면역 침착물은 이들 항-C1q 자가 항체의 누적을 나타냈다 (Mannick, M., et al., *Arthritis Rheumatol.* 40:1504-11, 1997). 이들 사실 모두는 이들 자가 항체에 대한 병리학적 역할을 가리킨다. 하지만, 항-C1q 자가 항체를 가진 모든 환자가 신장 질환에 걸리는 것은 아니고 또한 일부 건강한 개인도 저 역가 항-C1q-자가 항체를 갖는다 (Siegert, C.E., et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67:204-9, 1993).
- [0142] 보체 활성화의 대체 및 고전적 경로 이외에, 렉틴 경로는 또한 신장 질환에서 중요한 병리학적 역할을 가질 수도 있다. MBL, MBL-관련 세린 프로테아제 및 보체 활성화 생성물의 증가한 수준은 헤노흐-쇤라인 자반성 신염 (Endo, M., et al., *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000), 한랭글로불린혈증 사구체 신염 (Ohsawa, I., et al., *Clin. Immunol.* 101:59-66, 2001) 및 IgA 신증 (Endo, M., et al., *Clin. Nephrology* 55:185-191, 2001)를 포함하는, 여러 다른 신장 질환으로 진단된 환자로부터 얻은 신장 생체 조직 재료상에서 면역조직화학적 기술에 의해 검출되었다. 그러므로, 보체 및 신장 질환 사이의 연관성이 수십 년 동안 알려져 있었다는 사실에도 불구하고, 보체가 정확하게 이들 신장 질환에 영향을 미치는 방법에 대한 데이터는 완벽하지 않다.
- [0143] 따라서 본 발명의 한 양태는 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 장애로 고통받는 대상체에 투여함으로써 혈관 사이 증식성 사구체 신염, 막성 사구체 신염, 막성 증식성 사구체 신염 (모세관 사이 사구체 신염), 급성 감염 후 사구체 신염 (용렌균 감염 후 사구체 신염), 한랭글로불린혈증 사구체 신염, 홍반성 신염, 헤노흐-쇤라인 자반성 신염 또는 IgA 신증을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 신장 질환의 치료와 관련된다. MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 피하에 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 비-펩티드성 약제에 대하여 잠재적으로 경구 투여에 의해 투여될 수도 있다. MASP-2 억제제는 만성 질환의 치료군 또는 대조군에 대하여 연장된 기간 동안 주기적으로 투여될 수도 있거나, 급성 외상 또는 손상 이전, 동안 또는 이후의 기간에 일 회 또는 반복 투여될 수도 있다.
- [0144] **혈액 장애**
- [0145] 패혈증은 침입 미생물에 대한 환자의 압도적인 반응에 의해 유발된다. 보체 시스템의 주요 기능은 침입 박테리아 및 다른 병원체에 대한 염증 반응을 조절하는 것이다. 이 생리학적 역할과 일치하게, 보체 활성화는 많은 연구에서 패혈증의 발병에 있어서 주요 역할을 갖는 것으로 나타났다 (Bone, R.C., *Annals. Internal. Med.*

115:457-469, 1991). 패혈증의 임상적 징후의 정의가 발전하고 있다. 패혈증은 보통 감염에 대한 전신성 숙주 반응으로서 정의된다. 하지만, 많은 경우에, 감염에 대한 임상적 증거 (예를 들어, 양성 박테리아 혈액 배양)는 패혈성 증상에 걸린 환자에서 발견되지 않는다. 이 차이는 용어 "전신성 염증 반응 증후군" (SIRS)이 확립되었을 때 1992년 합의 회의 (Consensus Conference)에서 처음 고려되었으며, 이것에 대해서는 박테리아 감염의 한정 가능한 존재가 필요하지 않았다 (Bone, R.C., et al., Crit. Care Med. 20:724-726, 1992). 현재 패혈증 및 SIRS가 염증 반응을 조절할 수 없는 능력에 의해 동반된다는 일반적인 합의가 있다. 이 간략한 리뷰의 목적을 위해, 우리는 중증 패혈증, 패혈성 쇼크, 및 SIRS를 또한 포함하도록 패혈증의 임상적 정의를 고려할 것이다.

[0146] 1980년대 후반 전에 패혈성 환자에서 감염의 주요 공급원은 그람-음성 박테리아였다. 지질다당류 (LPS), 그람-음성 박테리아 세포벽의 주요 성분은 다양한 세포 타입에서 염증 매개자의 방출을 자극하고 동물에 주사될 때 급성 감염성 증상을 유발하는 것으로 알려져 있었다 (Haeney, M.R., et al., Antimicrobial Chemotherapy 41(Suppl. A):41-6, 1998). 흥미롭게도, 원인이 되는 미생물의 스펙트럼은 현재 불분명한 이유로, 1970년대 후반 및 1980년대에 주로 그람-음성 박테리아에서 현재 주로 그람-양성 박테리아로 옮겨진 것으로 나타난다 (Martin, G.S., et al., N. Eng. J. Med. 348:1546-54, 2003).

[0147] 많은 연구는 염증을 매개하고 쇼크, 특히 패혈성 및 출혈성 쇼크의 특징에 기여하는데 있어서 보체 활성화의 중요성을 나타냈다. 그람-음성 및 그람-양성 유기체 둘 다는 보통 패혈성 쇼크를 촉발시킨다. LPS는 항체에 의해 매개된 고전적 경로 활성화가 또한 발생하지만, 주로 대체 경로를 통한 보체의 강한 활성화제이다 (Fearon, D.T., et al., N. Engl. J. Med. 292:937-400, 1975). 그람-양성 세포 벽의 주요 성분은 펩티도글리칸 및 리포테이코산이고, 성분들 둘 다는 대체 보체 경로의 강한 활성화제이지만, 특이적 항체의 존재시 그것들이 고전적 보체 경로를 활성화할 수 있다 (Joiner, K.A., et al., Ann. Rev. Immunol. 2:461-2, 1984).

[0148] 보체 시스템은 초기에 아나필라톡신 C3a 및 C5a가 패혈증 중에도 발생할 수 있는 다양한 염증 반응을 매개한다는 것이 연구원들에 의해 지적되었을 때 패혈증의 발병에 연루되었다. 이들 아나필라톡신은 혈관 확장을 유발하고 미세 혈관 삼투성을 증가시키며, 이벤트는 패혈성 쇼크에서 중심 역할을 한다 (Schumacher, W.A., et al., Agents Actions 34:345-349, 1991). 또한, 아나필라톡신은 기관지 경련 (bronchospasm), 비만세포로부터 히스타민 방출, 및 혈소판의 응집을 유발한다. 게다가, 그것들은 주화성, 응집, 부착, 리보솜 효소의 방출, 독성 과산화물 음이온의 발생 및 류코트리엔의 형성과 같은, 과립구의 많은 효과를 발휘한다 (Shin, H.S., et al., Science 162:361-363, 1968; Vogt, W., 보체 3:177-86, 1986). 이들 생물학적 효과는 쇼크 또는 급성 호흡 장애 증후군 (acute respiratory distress syndrome; ARDS)과 같은 패혈증의 합병증의 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Hammerschmidt, D.E., et al., Lancet 1:947-949, 1980; Slotman, G.T., et al., Surgery 99:744-50, 1986). 게다가, 아나필라톡신 C3a의 증가한 수준은 패혈증의 치명적인 결과와 관련된다 (Hack, C.E., et al., Am. J. Med. 86:20-26, 1989). 쇼크의 일부 동물 모델에서, 특정 보체-결핍 균주 (예를 들어, C5-결핍된 것)는 LPS 투입의 효과에 대하여 더 저항성이다 (Hseuh, W., et al., Immunol. 70:309-14, 1990).

[0149] 설치류에서 패혈증의 시작 중에 항체로 C5a 발생의 차단은 생존을 크게 개선하는 것으로 나타났다 (Czermak, B.J., et al., Nat. Med. 5:788-792, 1999). C5a 수용체 (C5aR)가 항체 또는 저 분자 억제제로 차단될 때 유사한 결과를 얻었다 (Huber-Lang, M.S., et al., FASEB J. 16:1567-74, 2002; Riedemann, N.C., et al., J. Clin. Invest. 110:101-8, 2002). 원숭이의 초기 실험 연구는 C5a의 항체 차단이 이. 콜리 (E. coli)-유발된 패혈성 쇼크 및 성인 호흡 장애 증후군을 악화시킨다는 것을 제안하였다 (Hangen, D.H., et al., J. Surg. Res. 46:195-9, 1989; Stevens, J.H., et al., J. Clin. Invest. 77:1812-16, 1986). 패혈증에 걸린 사람에서, 덜 심각한 패혈성 환자 및 생존자의 그것과 비교할 때, C5a가 증가되었고 다기관 기능 부전과 함께 크게 감소된 생존율과 관련된다 (Nakae, H., et al., Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 84:189-95, 1994; Nakae, et al., Surg. Today 26:225-29, 1996; Bengtson, A., et al., Arch. Surg. 123:645-649, 1988). C5a가 패혈증 중에 그것의 해로운 효과를 발휘하는 메카니즘은 아직 더 상세히 조사되어야 하지만, 최근 데이터는 패혈증 중에 C5a의 발생이 혈액 호중구의 선천적 면역 기능 (Huber-Lang, M.S., et al., J. Immunol. 169:3223-31, 2002), 호흡 폭발을 표현하는 그것들의 능력, 및 시토킨을 발생시키는 그것들의 능력 (Riedemann, N.C., et al., Immunity 19:193-202, 2003)을 저해한다는 것을 제안한다. 또한, 패혈증 중에 C5a 발생은 응고 촉진 효과를 갖는 것으로 나타난다 (Laudes, I.J., et al., Am. J. Pathol. 160:1867-75, 2002). 보체-매개 단백질 CI INH는 또한 패혈증 및 ARDS의 동물 모델에서 효능을 나타내었다 (Dickneite, G., Behring Ins. Mitt. 93:299-305, 1993).

[0150] 렉틴 경로는 또한 패혈증의 발병에 있어서 중요한 역할을 할 수도 있다. MBL은 그람-음성 및 그람-양성 박테리

아를 포함하는, 다양한 임상적으로 중요한 미생물에 결합하고, 렉틴 경로를 활성화하는 것으로 나타났다 (Neth, O., et al., Infect. Immun. 68:688, 2000). 리포테이코산 (LTA)은 점점더 LPS의 그람-양성 대응물로 생각된다. 그것은 단핵 식세포 및 전혈로부터 시토킨 방출을 유발하는 강한 면역자극제이다 (Morath, S., et al., J. Exp. Med. 195:1635, 2002; Morath, S., et al., Infect. Immun. 70:938, 2002). 최근 L-피콜린이 스타필로코쿠스 아우레우스 (Staphylococcus aureus)를 포함하는, 많은 그람-양성 박테리아 종으로부터 분리된 LTA에 특이적으로 결합하고, 렉틴 경로를 활성화한다는 것이 입증되었다 (Lynch, N.J., et al., J. Immunol. 172:1198-02, 2004). MBL은 또한 폴리글리세로포스페이트 사슬이 글리코실 기로 치환되는 엔테로코쿠스 종 (Enterococcus spp)으로부터 분리된 LTA에 결합하지만, 에스. 아우레우스를 포함하는 다른 9개의 종의 LTA에는 결합하지 않는 것으로 나타났다 (Polotsky, V.Y., et al., Infect. Immun. 64:380, 1996).

[0151] 따라서 본 발명의 양태는 패혈증 또는 제한 없이 중증 패혈증, 패혈성 쇼크, 패혈증으로부터 발생한 급성 호흡 장애 증후군, 및 전신성 염증 반응 증후군을 포함하는, 패혈증으로부터 발생한 질병으로 고통받는 대상체에 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 투여함으로써 패혈증 또는 패혈증으로부터 발생하는 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 출혈성 쇼크, 용혈성 빈혈증, 자가 면역 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP), 용혈성 요독성 증후군 (HUS), 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS), 또는 다른 골수/혈액 파괴적 질병을 포함하는, 다른 혈액 장애를, 이러한 질병으로 고통받는 대상체에 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 투여함으로써 치료하는, 관련된 방법이 제공된다. MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입 (특히 ARDS의 경우에), 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 잠재적으로 비-필티드성 약제에 대하여 경구 투여에 의해 투여된다. MASP-2 억제제 조성물은 패혈증 및/또는 쇼크의 후유증을 방지하기 위해 하나 이상의 추가적 치료제와 결합될 수도 있다. 발전한 패혈증 또는 쇼크 또는 그것으로부터 발생한 곤란 질병에 대하여, MASP-2 억제 조성물은 신속하게 작용하는 투약 형태로, 예를 들어, MASP-2 억제제 조성물을 함유하는 용액의 볼투스의 정맥 내 또는 동맥 내 전달에 의해 적합하게 투여될 수도 있다. 반복된 투여는 질병이 해결될 때까지 의사의 결정에 따라 수행될 수도 있다.

[0152] **발작성야간혈색소뇨증에서 MASP-2의 역할 및 masp-2 억제제를 사용하는 치료 방법**

[0153] PNH의 개요

[0154] 때때로 마르키아파바-미첼리 증후군 (Marchiafava-Micheli syndrome)으로도 불리는, 발작성야간혈색소뇨증 (PNH)은 후천적, 잠재적으로 생명을 위협하는 혈액 질환이다. PNH는 그 자체에서 발달할 수도 있으며, "1차 PNH"로 불리거나 무형성 빈혈증과 같은 다른 골수 장애의 맥락에서 발달할 수도 있으며, "2차 PNH"로 불린다. 대부분의 경우는 1차 PNH이다. PNH는 적혈구의 보체-유발된 파괴 (용혈), 적은 적혈구 세포 수 (빈혈증), 혈전 및 골수 부전을 특징으로 한다. PNH에서 연구실 발견은 가능한 원인으로서 자가 반응성 RBC-결합 항체의 부재시 혈관 내 용혈성 빈혈증과 일치하는 변화를 나타낸다: 적은 헤모글로빈, 증가한 락테이트 데히드로게나제, 증가한 망상적혈구 수 (파괴된 세포를 대체하기 위해 골수에 의해 방출된 미성숙한 적혈구 세포), 증가한 빌리루빈 (헤모글로빈의 분해 생성물).

[0155] PNH의 홀마크 (hallmark)는 순환 RBC의 표면상에, 막 공격 복합체를 포함하는, 말단 보체 성분의 조절되지 않는 활성화에 의해 유발된 만성 보체-매개된 용혈이다. PNH RBC는 그것들의 표면상에 보체 조절자 CD55 및 CD59의 부재로 인한 조절되지 않는 보체 활성화 및 용혈을 받는다 (Lindorfer, M.A., et al., Blood 115(11):2283-91 (2010), Risitano, et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11:528-535 (2011)). CD55 및 CD59는 정상 RBC 및 대조군 보체 활성화에서 풍부하게 발현되었다. CD55는 대체 경로의 음성 조절자로서 작용하며, 대체 경로 C3 컨버타제 (C3bBb) 복합체의 조립을 억제하고 미리 형성된 컨버타제의 붕괴를 가속화하고, 따라서 막 공격 복합체 (MAC)의 형성을 차단한다. CD59는 직접적으로 C5b678 복합체와 결합하고 C9를 결합 및 폴리머화로부터 방지함으로써 보체 막 공격 복합체를 억제한다.

[0156] 용혈 및 빈혈증이 PNH의 주요 임상적 특징인 한편, 질환은 임상적 발견의 일부로서 혈전증 및 골수 부전을 추가로 포함하는 복합성 혈액 장애이다 (Risitano et al, Mini Reviews in Med Chem11:528-535 (2011)). 분자 수준에서, PNH는 기능적 PIG A 유전자가 없는 조혈 줄기 세포의 비정상 클론성 확장에 의해 유발된다. PIG A는 CD55 및 CD59를 포함하는, GPI-고정된 등급 A 당단백질의 안정한 표면 발현에 필요한 글리코실-포스파티딜 이노시톨 (GPI) 트랜스퍼라제를 암호화하는 X-결합된 유전자이다. 현재 조사 중인 이유로, 자발적 체세포 돌연변이의 결과로서 발생한 역기능적 PIG A 유전자를 가진 조혈 줄기 세포는 그것들의 자손이 말초성 조혈 세포 풀 (pool)의 상당 부분을 구성하는 지점으로 클론성 확장을 경험할 수 있다. 돌연변이 줄기 세포 클론의 적혈구 및 림프구 자손 둘 다는 CD55 및 CD59가 없고, 유일하게 RBC는 그것들이 순환에 들어온 후 명백한 용해를 경험한다.

[0157] PNH에 대한 현재의 치료는 빈혈증에 대하여 혈액 수혈, 혈전증에 대하여 항응고 및 단클론성 항체 에쿨리주맙 (Soliris®)의 사용을 포함하며, 이것은 보체 시스템을 억제함으로써 면역 파괴에 대하여 혈액 세포를 보호한다 (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-559 (2004)). 에쿨리주맙 (Soliris®)은 보체 성분 C5를 표적으로 하는, 사람화된 단클론성 항체이며, C5 콘버타제에 의해 그것의 절단을 차단하고, 그로 인해 C5a의 생산 및 MAC의 조립을 방지한다. 에쿨리주맙으로 PNH 환자의 치료는 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 의해 측정된 바와 같이 혈관 내 용혈의 감소를 일으켰고, 환자 중 약 반의 헤모글로빈 안정화 및 수혈 독립성으로 이어진다 (Risitano et al, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11(6) (2011)). 에쿨리주맙으로 치료를 경험한 거의 모든 환자가 정상적인 또는 거의 정상적인 LDH 수준을 달성하는 한편 (혈관 내 용혈의 조절로 인한), 환자 중 약 3분의 1만이 약 11 gr/dL의 헤모글로빈 값에 도달하고, 나머지 환자는, 같은 비율로, 중간 내지 중증 (즉, 수혈-의존적) 빈혈증을 계속해서 나타낸다 (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11:528-535 (2011)에 설명된 바와 같이, 에쿨리주맙의 PNH 환자는 그것들의 PNH 적혈구에 결합된, 대량의 C3 단편을 함유한다는 것이 입증되었다. (치료되지 않은 환자는 그렇지 않음). 이 결과는 쿨리주맙-처리된 PNH 환자에서, C5 차단으로 인해 더 이상 용혈되지 않는 PNH RBC는 현재 막-결합 C3 단편의 엄청난 양을 축적할 수 있으며, 옅소닌으로 작동하고, 특이적 C3 수용체를 통한 세망내피계 세포에서 그것들의 엔트랩먼트 (entrapment) 및 이후의 혈관 외 용혈을 일으킨다는 인식으로 이어졌다. 따라서, 혈관 내 용혈 및 결과의 후유증을 방지하면서, 에쿨리주맙 치료는 간단하게 이들 RBC의 침착을 혈관 내로부터 혈관 외 용혈로 전환하며, 많은 환자에서 실질적인 나머지 치료되지 않은 빈혈증을 일으킨다 (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). 그러므로, 에쿨리주맙의 사용 이외에 치료 계획은 그것들이 계속해서 적혈구 수혈을 필요로 하기 때문에, C3-단편 매개 혈관 외 용혈이 발달하는 이들 환자에게 필요하다. 이러한 C3 단편 표적화 접근법은 실험 시스템의 유용성을 입증하였다 (Lindorfer et al., Blood 115:2283-91, 2010).

[0158] PNH의 보체-개시 메카니즘

[0159] PNH의 음성 보체 조절기 CD55 및 CD59의 결함이 있는 발현 사이의 임시적 결합은 혈관 내 용혈을 방지하는데 있어서 에쿨리주맙의 유효성과 결합하였고, PNH를 보체 시스템에 의해 유발된 질병으로서 분명히 정의한다. 이 패러다임은 널리 인정되는 한편, 보체 활성화를 개시하는 사건, 및 수반된 보체 활성화와 경로(들)의 특징은 해결되지 않은 채로 남아있다. CD55 및 CD59가 모든 보체 개시 경로에 공통적인 보체 캐스케이드의 말단 증폭 단계를 부정적으로 조절하기 때문에, 이들 분자의 부족은 보체 활성화가 선택적 경로, 고전적 경로 또는 대체 경로의 자발적인 턴오버에 의해 개시되는지에 상관없이 과장된 말단 보체 활성화로 이어질 것이다. 따라서, PNH 환자에서, RBC 표면에 C3b 침착으로 이어지는 어떤 보체 활성화 사건도 이후의 증폭 및 병리학적 용혈 (혈관 내 및/또는 혈관 외)을 촉발하고 용혈성 위기를 침전시킨다. PNH 환자의 용혈성 위기를 촉발하는 분자적 사건의 분명한 기계론적 이해는 애매하게 남아있다. 보체 개시 사건이 용혈성 위기를 겪은 PNH 환자에서 명백하게 분명하고, 지배적인 관점은 PNH에서 보체 활성화가 대체 경로의 낮은 수준의 턴-오버 활성화 때문에 자발적으로 발생할 수도 있으며, 이것은 CD55 및 CD59의 부족으로 인한 말단 보체 활성화의 부적절한 조절에 의해 이후에 확대된다.

[0160] 하지만, 그것의 자연적인 역사에서, PNH는 보통 특정 사건, 예를 들어, 감염 또는 손상 후에 발달하거나 악화시키며 (Risitano, Biologics 2:205-222 (2008)), 이것은 보체 활성화를 촉발하는 것으로 나타났다. 이 보체 활성화 반응은 자극적 병원체에 대한 숙주의 이전 면역력에 의존적이지 않고, 따라서 고전적 경로를 수반하지 않을 가능성이 높다. 오히려, 이 보체 활성화 반응이 미생물 제제 또는 손상된 숙주 조직의 표면에 발현된 외부 또는 "변화된 자체" 탄수화물 패턴에 결합하는 선택에 의해 개시된다는 것을 나타낸다. 따라서, PNH에서 용혈성 위기를 촉발시키는 사건은 선택을 통해 개시된 보체 활성화에 단단히 결합된다. 이것은 선택 활성화 경로가 궁극적으로 PNH 환자의 용혈로 이어지는 개시 촉발을 제공하는 것을 매우 가능성이 높게 만든다.

[0161] 세망내피계 시스템을 통해 PNH RBC의 옅소닌화 및 혈관 외 용혈을 차단하는 MASP-2 억제제

[0162] 이 섹션은 PNH의 시험관 내 모델에서 용혈에 대한 MASP-2 억제제의 억제 효과를 설명한다. 결과는 PNH의 양태로부터 고통받는 대상체를 치료하는 MASP-2-차단제의 유용성, 및 또한 에쿨리주맙과 같은 C5-억제제로 치료를 경험한 PNH 환자에서 C3-단편-매개된 혈관 외 용혈의 효과를 개선하기 위해 MASP-2의 억제제의 사용을 지지한다 (MASP-2에 결합하고 이것의 기능을 차단하는 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않음).

[0163] 상기 상세히 설명된 바와 같이, PNH 환자는 순환으로부터 RBC 제거의 두 개의 뚜렷한 메카니즘 때문에 빈혈이 된다: 막 공격 복합체 (MAC)의 활성화를 통한 혈관 내 용혈, 및 혈관 외 용혈 후 C3b로 옅소닌화 및 이후의 제거 후 세망내피계 시스템에 의한 보체 수용체 결합 및 흡수. 혈관 내 용혈은 환자가 에쿨리주맙으로 치료될 때

대부분 방지된다. 에쿨리주맵이 보체-개시 활성화, 뿐만 아니라 이후의 옵소닌화의 다운스트림을 발생시키는 말단 용해 효과기 메커니즘을 차단하기 때문에, 에쿨리주맵은 혈관 외 용혈을 차단하지 않는다 (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). 대신에, 치료되지 않은 PNH 환자에서 용혈을 경험한 RBC는 현재 그것들의 표면에 활성화된 C3b 단백질을 축적시킬 수 있으며, 이것은 세망내피계 시스템에 의한 흡수를 증가시키고 그것들의 혈관 외 용혈을 향상시킨다. 따라서, 에쿨리주맵 처리는 RBC 기질을 혈관 내 용혈에서 혈관 외 용혈로 효과적으로 전환한다. 결과로서, 일부 에쿨리주맵-처리된 PNH 환자는 빈혈을 유지한다. 보체 활성화 업스트림을 차단하고 PNH RBC의 옵소닌화를 방지하는 약제가 에쿨리주맵에 의해 차단되지 않는 혈관 외 용혈을 차단하기에 특히 적합할 수도 있다는 것은 틀림없다.

[0164] 여기에 제공된 데이터는 MASP-2 의존적 보체 활성화가 렉틴-의존적 옵소닌화에 대한 지배적인 루트인 것을 입증한다. 그러므로, MASP-2 억제제는 PNH에서 옵소닌화를 제한하고 혈관 외 용혈을 억제하는데 효과적인 것으로 예상된다.

[0165] PNG의 시험관 내 모델을 사용하여, 우리는 PNH에서 보체 활성화 및 결과의 용혈이 MASP-2 의존적 보체 활성화에 의해, 적어도 부분적으로, 확실히 개시되고 그것은 독립적인 기능은 아니라는 것을 입증했다. 이들 연구는 다양한 마우스 균주의 만난-민감성 RBC를 사용하였고, Crry-결핍 마우스의 RBC (마우스의 말단 보체 경로의 중요한 음성 조절기), 뿐만 아니라 CD55/CD59-결핍 마우스의 RBC를 포함하며, 이것은 PNH 환자에 없는 같은 보체 조절기가 결핍된다. 만난-민감성 Crry-결핍 RBC는 보체-충분한 사람 혈청에 노출되었고, RBC는 3%의 혈청 농도에서 효과적으로 용혈시키는 한편 (도 40), 보체-결핍 혈청 (HI: 열 불활성화된)은 용혈성이 아니었다. 현저하게, 보체-충분한 혈청은 항-MASP-2 항체의 존재시 용혈성 활성을 감소시켰고, 6% 혈청은 효과적인 용혈에 필요하였다 (도 40). 유사한 관찰은 CD55/CD59-결핍 RBC가 테스트될 때 이루어졌다 (도 42). 항-MASP-2 단클론성 항체가 보충된 보체-충분한 사람 혈청은 용혈을 지지하는데 있어서 처리되지 않은 혈청보다 약 2배 덜 효과적이다. 게다가, 항-MASP-2 단클론성 항체가 처리된 더 높은 농도의 혈청은 처리되지 않은 혈청과 비교하여 처리되지 않은 WT RBC의 효과적인 용혈을 촉진하기 위해 필요했다 (도 40). 전체적으로, 이들 데이터는 MASP-2 의존적 보체 활성화가 용혈 반응에 크게 기여한다는 것을 나타낸다. 여기에 제공된 데이터는 PNH에서 빈혈증에 대한 다음 병원성 메커니즘을 나타낸다: 말단 보체 성분의 조절되지 않은 활성화 및 MAC의 형성에 의한 RBC의 용해로 인한 혈관 내 용혈, 및 C3b에 의한 RBC의 옵소닌화에 의해 유발된 혈관 외 용혈, 여기에서, 이것은 MASP-2 의존적 보체 활성화에 의해 대부분 개시된다. 따라서, MASP-2-억제제는 PNH 환자의 혈관 내 용혈을 크게 감소시키는 것으로 예상된다.

[0166] 혈관 외 용혈, PNH에서 빈혈증으로 이어지는 RBC 파괴의 덜 극적이지만, 동등하게 중요한 메커니즘은 주로 C3b에 의한 옵소닌화의 결과이며, 이것은 대부분 MASP-2 의존적 보체 활성화에 의해 매개된다. 따라서, MASP-2-억제제는 PNH에서 우선적으로 RBC 옵소닌화 및 C3b 및 이후의 혈관 외 용혈을 차단할 것이다. MASP-2-억제제의 이 독특한 치료적 작용은 이 병원성 과정에 대한 치료가 현재 존재하지 않기 때문에 모든 PNH 환자에게 큰 치료 이익을 제공하는 것이 예상된다.

[0167] 말단 보체 차단제에 부가적 치료로서의 MASP-2 억제제:

[0168] 여기에 제공된 데이터는 PNH에서 RBC 제거 및 빈혈증에 대한 두 개의 병원성 메커니즘을 상세히 설명한다: MASP-2 의존적 보체 활성화에 의해, 적어도 부분적으로, 개시되고, 따라서 MASP-2-억제제에 의해 효과적으로 억제되는 것으로 예상되는 혈관 내 용혈, 및 MASP-2에 의해 구동되고, 따라서 MASP-2-억제제에 의해 효과적으로 방지되는 C3b 옵소닌화로 인한 혈관 외 용혈.

[0169] 용혈의 혈관 내 및 혈관 외 메커니즘 둘 다 PNH 환자에서 빈혈증으로 이어진다는 것은 잘 기록되어 있다 (Risitano et al., Blood 113:4094-4100 (2009)). 그러므로, PNH의 설정에서, MASP-2의 억제는 혈관 내 및 혈관 외 용혈 둘 다를 해결하는 것으로 예상되며, C5 억제제 에쿨리주맵을 통해 상당한 이점을 제공할 것이다. 따라서, 혈관 내 용혈을 억제하고 혈관 외 용혈을 방지하는 MASP-2-차단제는 PNH 환자에서 발달하는 빈혈증의 정도를 방지하는데 효과적인 것으로 예상된다.

[0170] C5-차단제 (예를 들어, 에쿨리주맵)가 혈관 내 용혈을 효과적으로 차단하지만 옵소닌화를 방해하지 않는다는 것이 또한 알려져 있다. 이것은 치료되지 않은 채로 유지되는 MASP-2 의존적 보체 활성화에 의해 매개된 혈관 외 용혈로 인해 항-C5-처리된 PNH 환자를 실질적인 나머지 빈혈증에 걸린 채로 둔다. 그러므로, 혈관 외 용혈을 방지하는 MASP-2 억제제와 조합된 혈관 내 용혈을 방지하는 C5-차단제 (예를 들어, 에쿨리주맵)는 PNH 환자에서 발달하는 빈혈증을 방지하는데 있어서 어떤 약제 단독보다 더 효과적일 것이다. 사실, 항-C5 및 MASP-2-억제제의 조합은 PNH에서 RBC 파괴의 모든 관련 메커니즘을 방지하고 따라서 PNH에서 빈혈증의 모든 증상을 감소시키

거나 차단하는 것으로 예상된다.

[0171] C5 활성화 및 MAC 침착으로 이어지는 보체 시스템의 발단 증폭 루프를 차단하는 다른 시약 (프로페딘, 인자 B 또는 인자 D를 차단하거나 인자 I, 인자 H 또는 다른 보체 억제 인자의 억제 작용을 향상시키는 약제를 포함하지만, 이에 제한되지 않음)은 혈관 내 용혈을 억제하는 것으로도 예상된다. 하지만, 이들 약제는 PNH 환자에서 MASP-2-매개된 용소닌화를 방해하는 것으로 예상되지 않는다. 이것은 이러한 약제로 치료된 PNH 환자를 치료되지 않은 채로 유지되는 MASP-2 의존적 보체 활성화에 의해 매개된 혈관 외 용혈로 인해 실질적인 나머지 빈혈증에 걸린 채로 둔다. 그러므로, 혈관 외 용혈을 방지하는 MASP-2-억제제와 조합된 혈관 내 용혈을 방지하는 이러한 약제로 치료는 PNH 환자에서 발달하는 빈혈증을 방지하는데 있어서 어떤 약제 단독 보다 더 효과적일 것으로 예상된다. 사실, 이러한 약제 및 MASP-2 억제제의 조합은 PNH에서 RBC 파괴의 모든 또는 대부분의 관련 메커니즘을 억제하고 따라서 PNH에서 빈혈증의 증상 모두 또는 대부분을 차단하는 것으로 예상된다.

[0172] MASP-2의 억제제는 네이세리아 메닝기티디스 (*Neisseria meningitidis*)로 감염된 대상체의 생존을 개선한다.

[0173] 실시예 30-32에 설명되고 도 33-37에 나타난 바와 같이, MASP-2의 억제제는 네이세리아 메닝기티디스로 감염 후 생존을 감소시키지 않는다. 반대로, 놀랍게도 이들 연구에서 MASP-2 억제제는 생존 (도 33 및 34), 뿐만 아니라 질병 점수 (도 37)도 크게 개선하였다는 것이 발견되었다. 항-MASP2 항체의 투여는 같은 결과를 수득하였으며 (도 37), 가능한 원인으로서는 넉아웃-마우스 군주에서 2차적인 또는 보상 효과를 제거한다. MASP-2-제거된 동물에서 이들 바람직한 결과는 혈액으로부터 네이세리아의 더 신속한 제거와 관련된 것이었다 (도 35). 또한, 여기에 설명된 바와 같이, 사람 혈청과 함께 네이세리아의 배양은 네이세리아를 죽였다 (도 38). 게다가, MASP-2-의존적 렉틴 경로 보체 활성화를 차단하는 사람 MASP-2에 특이적인 기능성 단클론성 항체의 추가는 이 죽이는 반응을 향상시켰지만, 이소타입 대조군 단클론성 항체의 투여는 아니었다. 네이세리아에 의한 렉틴-의존적 보체 활성화의 맥락에서, MASP-2의 차단은 시험관 내에서 유기체의 용해성 파괴를 향상시켰다 (도 38). 네이세리아의 용해가 나이트 숙주의 주요 보호 메커니즘이기 때문에, 생체 내 MASP-2의 차단은 네이세리아 제거를 증가시키고 향상된 죽음으로 이어진다. 이들 결과는 놀라운 일이고, 에콜리주맙의 처리를 통해 상당한 이점을 제공하며, 이것은 생물을 위협하고 치명적인 뇌척수막염균 감염에 대한 민감성을 증가시키는 것으로 나타났다 (Dmytrijuk A., et al., *The Oncologist* 13:993-1000 (2008)).

[0174] 상기 언급된 내용에 따라, 한 양태에서, 본 발명은 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 PNH 또는 PNH로부터 발생한 질병 (예를 들어, 빈혈증, 요증 헤모글로빈 및 혈전증)으로 고통받는 대상체에 투여함으로써, 발작성야간혈색소뇨증 (PNH)을 치료하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 PNH 또는 PNH로부터 발생한 질병으로 고통받는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 비-펩티드성 약제에 대하여 잠재적으로 경구 투여에 의해 투여된다.

[0175] **용혈성 요독성 증후군 (HUS), 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS) 및 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP)**을 포함하는, 혈전성 미소혈관증 (Thrombotic microangiopathy)에서 MASP-2의 역할, 및 masp-2 억제제를 사용하는 치료 방법

[0176] **개요**

[0177] 혈전성 미소혈관증 (TMA)은 작은 혈관의 혈전을 특징으로 하는 병리학이다 (Benz, K.; et al., *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19(3):242-7 (2010)). 근본적인 혈관 내피 세포에 대한 스트레스 또는 손상이 주요 요인으로 생각된다. TMA의 임상적 및 검사 결과는 혈소판감소증, 빈혈증, 자반병, 및 신부전을 포함한다. 고전적 TMA는 용혈성 요독성 증후군 (HUS) 및 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP)이다. TMA의 병리학적 특징에 기초하는 성질은 소동맥 및 소정맥에서 혈소판 활성화 및 미세혈전의 형성이다.

[0178] 신염에 걸린 숙주에서 보체의 병리학적 역할에 대한 직접적인 증거는 특정 보체 성분이 유전적으로 결핍된 환자의 연구에 의해 제공된다. 많은 보고서가 보체 조절 인자 H의 결핍과 신장 손상의 관계를 기록하였다 (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M., et al., *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C., et al., *Nat. Genet.* 31:424-8, 2002). 인자 H 결핍은 이들 성분의 활성화-관련 소모로 인해 인자 B 및 C3의 낮은 혈장 수준을 발생시킨다. C5b-9의 순환 수준이 또한 이들 환자의 혈청에서 증가되었으며, 보체 활성화를 나타낸다. 막성 증식성 사구체 신염 (MPGN) 및 특발성 용혈성 요독성 증후군 (HUS)은 인자 H 결핍 또는 인자 H의 돌연변이와 관련된다. 인자 H-결핍 돼지 (Jansen, J.H., et al., *Kidney Int.* 53:331-49, 1998) 및 인자-H 넉아웃 마우스 (Pickering, M.C., 2002)는 MPGN-유사 증상을 나타내며, 보체 조절에서 인자 H의 중요성을 확인하였다. 다른 보체 성분의 결핍은 전신 홍반성 루푸스 (SLE)의 발달에 2차적인, 신장 질환과 관련된다 (Walport, M.J.,

Davies, et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 815:267-81, 1997). C1q, C4 및 C2에 대한 결핍은 면역 복합체 및 아콕토시스성 물질의 결함이 있는 제거와 관련된 메커니즘을 통한 SLE의 발달에 매우 취약하다. 이들 SLE 환자 중 다수에서는, 홍반성 신염이 발생하며, 사구체 전체에 면역 복합체의 침착을 특징으로 한다.

[0179] aHUS

[0180] 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS)은 "혈전성 미소혈관증"으로 불리는 질병의 그룹 중 일부이다. 부정형 형태의 HUS (aHUS)에서, 질환은 결함 보체 조절과 관련되고 산발성 또는 가족성일 수 있다. 가족성 경우의 aHUS는 보체 활성화 또는 보체 조절 단백질에 대하여 암호화하는 유전자의 돌연변이와 관련되며, 보체 인자 H, 인자 I, 인자 B, 막 보조인자 CD46, 뿐만 아니라 보체 인자 H-관련 단백질 1 (CFHR1) 및 보체 인자 H-관련 단백질 3 (CFHR3)을 포함한다 (Zipfel, P.F., et al., PloS Genetics 3(3):e41 (2007)). aHUS와 관련된 유전적 돌연변이의 이 다양한 배열의 공통된 특징은 세포 또는 조직 표면에서 향상된 보체 활성화에 취약하다. 그러므로, 본 발명의 한 양태는 MASP-2 억제제의 유효량을 투여함으로써 인자 H 결핍증과 관련된 aHUS로 고통받는 환자를 치료하는 단계를 포함한다. 본 발명의 또 다른 양태는 MASP-2 억제제의 유효량을 투여함으로써 인자 I, 인자 B, 막 보조인자 CD46, CFHR1 또는 CFHR3 결핍과 관련된 HUS로 고통받는 환자를 치료하는 단계를 포함한다.

[0181] 중요한 과정은 돌연변이 보체 인자의 다양한 세트에 의해 유발된 aHUS에서 분자 병리학에 근본적인 향상된 보체 활성화를 생각하게 되었다. 이 메커니즘은 인자 H 돌연변이에 대하여 가장 잘 이해된다. 인자 H는 용액, 뿐만 아니라 숙주 세포 표면 둘 다에서 보체 활성화의 음성 조절기로서 작용하는 20개의 짧은 공통 반복 (SCR) 도메인을 포함하는 풍부한 혈청 단백질이다. 그것은 C3의 활성화된 형태를 표적으로 하고, 인자 I 및 다른 보조인자와 함께 그것의 불활성화를 촉진하며, 추가의 보체 활성화를 미리 방지한다. 숙주 세포 표면에서의 보체 활성화를 효과적으로 조절하기 위해, 인자 H는 숙주 세포와 상호작용할 필요가 있으며, 이것은 SCR 도메인 16-20에 의해 매개된다. 지금까지 설명된 aHUS와 관련된 모든 인자 H 돌연변이는 (SCR) 도메인 16-20을 포함하는 C-말단 영역에 모인다. 이들 돌연변이 인자 H 단백질은 용액에서 C3 활성화를 조절하는데 완벽하게 기능하지만, 숙주 세포 표면과 상호작용할 수 없고 그 결과 세포 표면에서의 C3 활성화를 조절할 수 없다 (Exp Med 204(6):1249-56 (2007)). 따라서, 돌연변이 인자 H 단백질이 숙주 세포 표면과 상호작용에 실패하여 미세혈관 내피 세포를 포함하는, 숙주 세포 표면에서의 보체 활성화를 효과적으로 하향 조절할 수 없기 때문에 인자 H의 특정 돌연변이는 aHUS와 관련된다. 결과로서, 초기 C3 활성화가 발생하면, 이후의 미세혈관 내피 표면에서의 보체 활성화는 인자 H 돌연변이된 환자에서 약화되지 않은 채로 진행된다. 보체의 이 조절되지 않는 활성화는 궁극적으로 혈관 내피 세포의 점진적 손상으로 이어지고, 이후의 혈소판 응집 및 미세혈관 응고, 및 부분적으로 폐색된 미세혈관을 통한 RBC 통과와 전단 응력 (shear stress)에 의해 유발된 용혈로 이어진다. 따라서, aHUS 질환 징후 및 임상적 및 검사 결과는 미세혈관 내피 세포의 표면에서 보체의 음성 조절의 결함과 직접적으로 관련된다.

[0182] 인자 H 돌연변이와 유사하게, 음성 보체 조절레이터 (modulator) 인자 I 및 막 보조인자 단백질 (CD46)의 기능 상실 돌연변이가 또한 aHUS와 관련된다. 그 반대가 인자 B에서 관찰되었고 aHUS가 이들 단백질의 기능 획득 돌연변이와 관련되는 것으로 발견되었다는 점에서 C3 단백질에서 관찰되었다 (Pediatr Nephrol 25(12):2431-42 (2010)). 따라서, 통합 데이터의 숙주는 aHUS 발병시 보체 활성화에 연루된다. 이 개념은 에콜리주맙, aHUS의 치료시 말단 보체 단백질 C5를 차단하는 단클론성 항체의 치료적 효능에 의해 가장 설득력이 있게 지지된다.

[0183] aHUS에서 효과기 메커니즘으로서 보체의 중심 역할이 널리 인정되는 한편, 보체 활성화를 개시하는 촉발 및 수반된 분자적 경로는 해결되지 않았다. 상기 설명된 돌연변이를 가진 모든 개체가 aHUS에 걸리지 않는다. 사실, 가족성 연구는 aHUS의 침투율은 단지 ~50%이라는 것을 제안하였다 (Ann Hum Genet 74(1):17-26 (2010)). 질환의 자연사는 aHUS가 감염성 에피소드 (episode) 또는 손상과 같은 초기 사건 후 가장 자주 발달한다는 것을 제안한다. 감염원은 보체 시스템을 활성화하는 것으로 잘 알려져 있다. 미리 존재하는 적응 면역력의 부재시, 감염원에 의한 보체 활성화는 주로 렉틴 경로를 통해 개시될 수도 있다. 따라서, 감염에 의해 촉발된 렉틴 경로 활성화는 aHUS-취약한 개체에서 보체 활성화의 이후의 병리학적 증폭을 위한 초기 촉발을 나타내며, 이것은 궁극적으로 질환 진행으로 이어진다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 MASP-2 억제제의 유효량을 투여함으로써 감염에 2차적인 aHUS로 고통받는 환자를 치료하는 단계를 포함한다.

[0184] 숙주 조직에 대한 손상의 또 다른 형태, 특히 혈관 내피 세포에 대한 손상은 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화할 것이다. 사람 혈관 내피 세포는 산화 스트레스를 경험하고, 예를 들어, 렉틴과 결합하고 보체의 렉틴 경로를 활성화하는 표면 모이어티를 발현함으로써 반응한다 (Am J. Pathol 156(6):1549-56 (2000)). 국부성 빈혈/재관류 혈관 손상은 또한 생체 내 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화한다 (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). 이 설정에서 렉틴 경로 활성화는 숙주에 대하여 병리학적 결과를 갖고, MASP-2의 차단에 의한 렉틴 경로의 억제는

추가로 숙주 조직 손상 및 부정적인 결과를 방지한다 (Schwaebler PNAS 2011).

- [0185] 따라서, aHUS를 침전시키는 다른 공정은 또한 보체의 렉틴 경로를 활성화하는 것으로 알려져 있다. 그러므로 렉틴 경로는 aHUS에 대한 유전적 소인을 가진 취약한 개체에서 규제 완화된 방식으로 부적절하게 증폭되는 초기 보체 활성화 메커니즘을 나타내고, 따라서 aHUS 발병을 개시할 가능성이 크다. 추론에 의하여, 항-MASP-2 항체를 포함하는, 렉틴 경로를 통해 보체의 활성화를 차단하는 약제는 aHUS에 민감한 개체에서 질환 진행을 방지하고 약화를 감소시키는 것으로 예상된다.
- [0186] 이 개념의 추가 지원에서, 최근 연구는 aHUS의 소아의 경우에서 중요한 유병기생충으로서 에스. 뉴모니아 (S. pneumonia)를 확인하였다 (Nephrology (Carlton), 17:48-52 (2012); Pediatr Infect Dis J. 30(9):736-9 (2011)). 이 특정 병인학은 큰 치사율 및 장기간 발병률과 함께, 바람직하지 않은 예후를 갖는 것으로 나타난다. 특히, 이 경우는 aHUS에 취약한 것으로 알려진 보체 유전자들의 동시 돌연변이의 증거 없이 미소혈관증 (microangiopathy), 요독증 (uremia) 및 용혈의 징후로 이어지는 비-장내 감염을 수반하였다. 에스. 뉴모니아가 보체를 활성화하는데 있어서 특히 효과적이고, 대부분 렉틴 경로를 통해 이루어진다는 것을 지적하는 것이 중요하다. 따라서, 폐렴구균 감염과 관련된 비-장내 HUS의 경우에, 미소혈관증, 요독증 및 용혈의 징후는 대부분 렉틴 경로의 활성화에 의해 구동되는 것으로 예상되고, 항-MASP-2 항체를 포함하는, 렉틴 경로를 차단하는 약제는 aHUS의 진행을 방지하고 이들 환자의 질환 심각성을 감소시키는 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양태는 MASP-2 억제제의 유효량을 투여함으로써 에스. 뉴모니아 감염과 관련된 비-장내 aHUS로 고통받는 환자를 치료하는 단계를 포함한다.
- [0187] 상기 언급된 내용에 따라, 일부 구체예에서, aHUS와 관련된 신부전에 걸릴 위험이 있는 대상체의 설정에서, 대상체에서 신부전을 개선하거나 방지하는데 유효한 기간 동안 MASP-2 억제제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, aHUS에 걸리거나, aHUS와 관련된 신부전에 걸릴 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 방법은 추가로 aHUS와 관련된 어떤 증상의 시작 전에 대상체가 aHUS에 걸릴 위험이 있는지 결정하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 방법은 대상체가 aHUS를 나타내는 적어도 하나 이상의 증상 (예를 들어, 빈혈증, 혈소판감소증 및/또는 신부전의 존재)의 시작시 및/또는 대상체로부터 얻은 생체 조직에서 혈전성 미소혈관증의 존재시 aHUS에 걸릴 위험이 있는지 결정하는 단계를 포함한다. 대상체가 aHUS에 걸릴 위험이 있는지의 결정은 대상체가 aHUS에 걸릴 유전적 소인을 갖는지 결정하는 단계를 포함하며, 이것은 유전 정보를 평가함으로써 (예를 들어, 대상체의 유전자형을 함유하는 데이터베이스로부터), 또는 게놈 시퀀싱 (sequencing) 또는 유전자-특이적 분석 (예를 들어, PCR 분석)을 통해 대상체에 대하여 적어도 한 번의 유전적 스크리닝 테스트를 수행하여 aHUS와 관련된 유전적 마커의 존재 또는 부재를 결정함으로써 (즉, 보체 인자 H (CFH), 인자 I (CFI), 인자 B (CFB), 막 보조인자 CD46, C3, 보체 인자 H-관련 단백질 1 (CFHR1), 또는 THBD (항응고 단백질 트롬보스플린을 암호화) 또는 보체 인자 H-관련 단백질 3 (CFHR3), 또는 보체 인자 H-관련 단백질 4 (CFHR4)을 암호화하는 유전자에서 aHUS와 관련된 유전적 돌연변이의 존재 또는 부재를 결정함으로써), 및/또는 대상체가 aHUS의 가족력을 갖는지 결정함으로써 수행될 수도 있다.
- [0188] aHUS와 관련된 유전적 돌연변이의 존재 또는 부재에 대한 유전적 스크리닝 방법이 잘 확립되어 있다. 예를 들어, Noris M et al. "Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome, 2007 Nov 16 [2011년 3월 10일 업데이트]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. GeneReviews™ Seattle (WA): University of Washington, Seattle을 참고하면 된다.
- [0189] 예를 들어, 보체 인자 H (CFH)의 돌연변이를 가진 개체에서 질환의 전체적인 침투율은 48%이고, CD46의 돌연변이에 대한 침투율은 53%이고, CFI의 돌연변이에 대한 침투율은 50%이고, C3의 돌연변이에 대한 침투율은 56%이고, THBD의 돌연변이에 대한 침투율은 64%이다 (Caprioli J. et al., Blood, 108:1267-79 (2006); Noris et al., Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59 (2010)). 상기, Caprioli et al., (2006)에 설명된 바와 같이, 보체 인자 H (CFH)의 돌연변이를 가진 많은 수의 개체는 aHUS에 절대 걸리지 않고, 이들 개체에서 차선의 CFH 활성화는 생리학적 조건에서 보체 활성화의 효과로부터 숙주를 보호하기 위해 충분하지만, 차선의 CFH 활성화는 보체를 활성화하는 약제에 노출이 정상적인 양의 C3b보다 더 많이 생산할 때 혈관 내피 세포에 침착된 것들로부터 C3b를 보호하기 위해 충분하지 않다고 가정된다. 따라서, 따라서, 한 구체예에서, 대상체에 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 비-인자 H-의존적 부정형 용혈성 요독성 증후군으로 고통받거나, 이에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법이 제공된다. 또 다른 구체예에서, 빈혈증, 혈소판감소증 또는 크레아티닌의 증가의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 주기적으로 대상체를 관찰하고, 빈혈증, 혈소판감소증, 또는 크레아티닌의 증가의 존재의 결정시 MASP-2 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 인자 H-의존적 부정형 용혈성 요독성 증후군에 걸릴 위험이

있는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법이 제공된다. 또 다른 구체예에서, aHUS를 촉발하는 임상적 증상, 예를 들어, 약물 노출 (예를 들어, 화학요법), 감염 (예를 들어, 박테리아 감염), 악성 종양, 손상, 기관 또는 조직 이식, 또는 임신과 관련된 것으로 알려진 사건 전에, 또는 도중에, 또는 후에 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, aHUS에 걸릴 위험이 있는 대상체가 aHUS와 관련된 임상적 증상으로 고통받을 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0190] 한 구체예에서, 빈혈증, 혈소판감소증 또는 크레아티닌의 증가의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 주기적으로 대상체를 관찰하고, 빈혈증, 혈소판감소증, 또는 크레아티닌의 증가의 존재의 결정시 MASP-2 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, aHUS에 걸릴 위험이 있는 대상체가 aHUS와 관련된 임상적 증상으로 고통받을 가능성을 감소시키는 단계를 제공한다.

[0191] 또 다른 구체예에서, aHUS를 촉발하는 임상적 증상, 예를 들어, 약물 노출 (예를 들어, 화학요법), 감염 (예를 들어, 박테리아 감염), 악성 종양, 손상, 기관 또는 조직 이식, 또는 임신과 관련된 것으로 알려진 사건 전에, 또는 도중에, 또는 후에 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, aHUS에 걸릴 위험이 있는 대상체가 aHUS와 관련된 임상적 증상으로 고통받을 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0192] 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 aHUS를 촉발하는 임상적 증상과 관련된 사건 전에, 도중에, 또는 후에, 적어도 1일, 2일, 3일, 4일 이상의 기간 동안 투여되고 질병이 해결되거나 조절될 때까지 의사의 결정에 따라 반복될 수도 있다. 전-aHUS 설정에서, MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수도 있다.

[0193] 일부 구체예에서, aHUS의 초기 진단의 설정에서, 또는 aHUS의 진단과 일치하는 하나 이상의 증상 (예를 들어, 빈혈증, 혈소판감소증 및/또는 신부전의 존재)을 나타내는 대상체에서, 대상체는 혈장반출법 (plasmapheresis)의 부재시, 또는 혈장반출법과 조합된 제 1선 치료로서 MASP-2 억제제 (예를 들어, 항-MASP-2 항체)의 유효량이 처리된다. 제 1선 치료로서, MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수도 있다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 혈장 기증자, 또는 혈장반출법에 불리한 대상체, 또는 혈장반출법을 이용할 수 없는 설정에서 출혈, 감염, 및 내재하는 장애 및/또는 알레르기에 노출을 포함하는 혈장반출법의 잠재적 합병증을 방지하기 위해 혈장반출법의 부재시 제 1선 치료로서 대상체에 투여된다.

[0194] 일부 구체예에서, 방법은 1차 기간 (예를 들어, 적어도 하루 내지 1주 또는 2주) 동안 카테터를 통해 (예를 들어, 정맥 내로) aHUS로 고통받는 대상체에 MASP-2 억제제를 투여한 후 이어서 2차 기간 (예를 들어, 적어도 2주 이상의 만성 단계) 동안 대상체에 MASP-2 억제제를 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 1차 및/또는 2차 기간 중 투여는 혈장반출법의 부재시 발생한다. 일부 구체예에서, 방법은 치료 전에, 및 선택적으로 치료 중에 대상체에서 적어도 하나의 보체 인자 (예를 들어, C3, C5)의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하며, 표준 값 또는 건강한 대조군 대상체와 비교할 때 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 MASP-2 억제제의 지속적인 처리가 필요하다는 것을 나타낸다.

[0195] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제, 예를 들어, 항-MASP-2 항체를 aHUS로 고통받거나, 이에 걸릴 위험이 있는 대상체에 정맥 내로, 근육 내로, 또는 바람직하게, 피하로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 만성이고 매일 내지 매달 투여될 수도 있지만, 바람직하게 2주마다 투여된다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 C5 억제제, 예를 들어, 에쿨리주맙과 조합하여 투여될 수도 있다.

[0196] HUS

[0197] 부정형 HUS와 유사하게, HUS의 전형적인 형태는 TMA의 모든 임상 및 검사 결과를 나타낸다. 하지만, 전형적인 HUS는 종종 소아 질환이고 보통 가족성 성분 또는 보체 유전자의 돌연변이와 직접적인 관련이 없다. 전형적인 HUS의 병인학은 특정 장 내 병원체로 강하게 연결된다. 환자는 전형적으로 급성 신부전, 헤모글로빈 요증, 및 혈소판감소증을 제공하며, 이것은 전형적으로 혈성 설사 (bloody diarrhea)의 에피소드를 따른다. 질병은 시겔라 디센테리아 (Shigella dysenteriae), 살모넬라 (Salmonella) 또는 이. 콜리 O157:H7와 같은 이. 콜리 (E. Coli)의 장내 출혈성 균주를 생산하는 시가 독소 (shiga toxin)-유사물로 장내 감염에 의해 유발된다. 병원체는 오염된 음식 또는 상수도로부터 얻어진다. HUS는 응급 상황이고 5-10% 치사율을 가지고 있다. 생존자 중 상당수는 만성 신장 질환에 걸리고 (Corrigan 및 Boineau, Pediatr Rev 22 (11): 365-9 (2011)) 신장 이식이 필요할 수도 있다.

[0198] 전형적인 HUS에서 미세혈관 응고는 대부분 신장 미소혈관에서 발생하지만, 독점적인 것은 아니다. 근본적인 병

리생리학은 시가 독소 (STX)에 의해 매개된다. 장질환 미생물에 의해 장의 루멘 (lumen)으로 배설되면, STX는 장막을 교차하고, 혈류로 들어가고 블로보트리아오실 세라미드 수용체 CD77를 통해 혈관 내피 세포에 결합하며 (Boyd and Lingwood Nephron 51:207 (1989)), 이것은 우선적으로 사구체 내피에서 발현되고 STX의 독성 효과를 매개한다. 내피에 결합되면, STX는 혈관 내피 세포를 손상시키고, 백혈구를 활성화하고 vWF-의존적 혈전 형성을 유발하는 일련의 사건을 유발한다 (Forsyth et al., Lancet 2: 411-414 (1989); Zoja et al., Kidney Int. 62: 846-856 (2002); Zanchi et al., J. Immunol. 181:1460-1469 (2008); Morigi et al., Blood 98: 1828-1835 (2001); Guessou et al., Infect. Immun., 73: 8306-8316 (2005)). 이들 미세혈전은 신장 및 다른 기관의 소동맥 및 모세혈관을 방해하거나 폐색한다. 소동맥 및 모세혈관에서 미세혈전에 의한 혈류의 폐쇄는 그것들이 좁아진 혈관을 통해 짜내기 때문에 RBC에 적용되는 전단력을 증가시킨다. 이것은 전단력에 의해 RBC의 파괴 및 분열적혈구 (schistocytes)로 불리는 RBC 단편의 형성을 일으킬 수 있다. 분열적혈구의 존재는 HUS에서 발견되는 성질이다. 이 메카니즘은 미소혈관성 용혈로 알려져 있다. 또한, 혈류의 폐쇄는 국부성 빈혈을 일으키고, 영향을 받은 기관에 추가적인 손상을 유발하는 보체-매개된 염증성 반응을 시작한다.

[0199] 보체의 렉틴 경로는 두 개의 원칙적 메카니즘에 의해 HUS의 발병에 기여한다: 1) 내피 손상에 의해 유발된 응고 캐스케이드의 MASP-2-매개된 직접적인 활성화, 및 2) 미세혈관 혈류의 초기 폐색으로부터 발생하는 국부성 빈혈에 의해 유발되는 렉틴-매개된 이후의 보체 활성화.

[0200] STX는 미세혈관 내피 세포를 손상시키고, 손상된 내피 세포는 보체 시스템을 활성화하는 것으로 알려져 있다. 상기 상세히 설명된 바와 같이, 내피 세포 손상에 이은 보체 활성화는 대부분 렉틴 경로에 의해 구동된다. 산화 스트레스를 받은 사람 혈관 내피 세포는 렉틴과 결합하고 보체의 렉틴 경로를 활성화하는 표면 모이어티를 발현함으로써 반응한다 (Collard et al., Am J Pathol. 156(5):1549-56 (2000)). 국부성 빈혈 재관류에 이은 혈관 손상은 또한 생체 내 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화한다 (Scand J Immunol 61(5):426-34 (2005)). 이 설정에서 렉틴 경로 활성화는 숙주에 대한 병리학적 결론을 갖고, MASP-2의 차단에 의한 렉틴 경로의 억제는 추가로 숙주 조직 손상 및 부정적인 결과를 방지한다 (Schwaeble et al., PNAS (2011)). 보체 활성화 이외에, MASP-2의 렉틴-의존적 활성화는 프로트롬빈의 절단을 일으켜서 트롬빈을 형성하고 응고를 촉진하는 것으로 나타났다. 따라서, 손상된 내피 세포에 의한 보체의 렉틴 경로 활성화는 응고 시스템을 직접적으로 활성화할 수 있다. 그러므로, 보체의 렉틴 경로는, MASP-2-매개된 프로트롬빈 활성화에 의해, STX에 의한 초기 내피 손상을 HUS에서 발생하는 응고 및 미세혈관 혈전증에 연관시키는 주요 분자적 경로일 것이다. 그러므로 MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 렉틴 경로 억제제는 HUS로 고통받는 환자의 미세혈관 응고, 혈전증 및 용혈을 방지하거나 완화시킬 것이다. 정말로, 항-MASP-2 항체의 투여는 전형적인 HUS의 모델에서 마우스를 완전히 보호한다. 실시예 36에 설명되고 도 45에 나타난 바와 같이, STX 및 LPS에 노출된 모든 대조군 마우스는 중증 HUS에 걸렸고 빈사상태가 되었고 48시간 내에 죽었다. 다른 한편으로는, 도 45에 추가로 나타난 바와 같이, 항-MASP-2 항체가 처리되고 STX 및 LPS에 노출된 모든 마우스는 생존하였다 (피셔의 정확 검정 (Fisher's exact) $p < 0.01$; $N = 5$). 따라서, 항-MASP-2 치료는 HUS의 이 모델에서 마우스를 완전히 보호한다. MASP-2 항체와 같은, MASP-2 억제제의 투여는 HUS 환자의 치료에 효과적인 것이고 장질환 이. 콜리 또는 다른 STX-생산 병원체에 감염에 의해 유발되는 미세혈관 응고, 혈전증, 및 용혈로부터 보호를 제공할 것이다.

[0201] 여기에 STX에 의해 유발된 HUS에 대해 나타나는 한편, 항-MASP-2 요법은 또한 다른 유독 물질에 의해 유발되는 내피 손상으로 인한 HUS-유사 증후군에 대하여 이로울 것으로 예상된다. 이것은 미토마이신, 티클로피딘, 시스플라틴, 퀴닌, 시클로스포린, 블레오마이신, 뿐만 아니라 다른 화학적 치료제 및 면역 억제제와 같은 약제를 포함한다. 따라서, 항-MASP-2 항체 요법, 또는 MASP-2 활성을 억제하는 다른 양상은 응고, 혈전 형성, 및 RBC 파괴를 효과적으로 방지하거나 제한하고 HUS 및 다른 TMA 관련 질환 (즉, aHUS 및 TTP)에서 신부전을 방지할 것이다.

[0202] HUS로 고통받는 환자는 종종 설사 및 구토를 제공하고, 그것들의 혈소판 수가 보통 감소되고 (혈소판감소증), RBC가 감소된다 (빈혈증). 사전 HUS 설사 단계는 전형적으로 약 4일 동안 지속되며, 이 동안에 HUS에 걸릴 위험이 있는 대상체는 전형적으로 중증 설사 외에 다음 증상 중 하나 이상을 나타낸다: 혈관 내 적혈구 파괴의 스미어 (smear) 증거의 30%보다 더 낮은 헤마토크리트 수준, 혈소판감소증 (혈소판 수 $< 150 \times 10^3/\text{mm}^3$), 및/또는 손상된 신기능의 존재 (나이에 대한 참고 범위의 상한선보다 더 큰 농도의 혈청 크레아티닌). 올리고아누리아 (oligoanuria)의 존재 (소변 배출=>1일 동안 0.5 mL/kg/h)는 HUS에 걸리는 방향으로 진행에 대한 측정값으로 사용될 수 있다 (C. Hickey et al., Arch Pediatr Adolesc Med 165(10):884-889 (2011)를 참고하면 된다). 테스트는 전형적으로 이. 콜리 박테리아 (E.coli O157:H7), 또는 시겔라 또는 살모넬라 종으로 감염의 존재에 대하여 수행된다. 장내 이. 콜리 (예를 들어, 이. 콜리 O157:H7)로 감염에 대하여 양성으로 테스트된 대상체에서,

항생제의 사용이 증가된 STX 생산을 통해 HUS에 걸릴 위험을 증가시킬 수도 있기 때문에 항생제의 사용이 금지된다 (Wong C. et al., N Engl J. Med 342:1930-1936 (2000)를 참고하면 된다). 시겔라 또는 살모넬라에 대하여 양성으로 테스트된 대상체에 대하여, 항생제는 전형적으로 감염을 제거하기 위해 투여된다. HUS에 대하여 다른 잘 확립된 제 1선 치료는 부피 팽창법, 투석 및 혈장반출법을 포함한다.

[0203] 상기 언급된 내용에 따라, 일부 구체예에서, 사전 HUS 단계와 관련된 하나 이상의 증상으로 고통받고 HUS에 걸릴 위험이 있는 대상체의 설정에서 (즉, 대상체는 다음 중 하나 이상을 나타낸다: 설사, 혈관 내 적혈구 파괴의 스미어 증거의 30%보다 더 낮은 헤마토크리트 수준, 혈소판감소증 ($150 \times 10^3/\text{mm}^3$ 보다 더 적은 혈소판 수), 및/또는 손상된 신기능의 존재시 (나이에 대한 참고 범위의 상한선보다 더 큰 혈청 크레아티닌 농도), 손상된 신기능을 개선하거나 방지하는데 유효한 기간 동안 MASP-2 억제제의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 HUS에 걸릴 위험을 감소시키거나, 신부전의 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 적어도 1, 2, 3, 4일 이상의 기간 동안 투여되고, 질병이 해결되었거나 조절될 때까지 의사의 결정에 따라 반복될 수도 있다. 사전 HUS 설정에서, MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 코, oral, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수도 있다.

[0204] 살균 항생제, 특히 β -락탐으로 이. 콜리 0157:H7 감염의 치료는 HUS에 걸릴 증가된 위험에 관련된다 (Smith et al., Pediatr Infect Dis J 31(1):37-41 (2012)). 일부 구체예에서, 대상체가 장내 이. 콜리 (예를 들어, 이. 콜리 0157:H7)로 감염된 것으로 알려져 있으며, 항생제의 사용이 금지된, 사전 HUS 단계와 관련된 증상으로 고통받는 대상체의 설정에서, 대상체에서 올리고아뉴리아의 존재를 억제하거나 방지하는데 유효한 기간 (예를 들어, 적어도 1, 2, 3 또는 4일) 동안 MASP-2의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, 1차 기간 동안 MASP-2 억제제의 투여가 항생제의 부재시 발생하는, 대상체에서 HUS에 걸릴 위험을 감소시키거나 신부전의 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 방법은 추가로 2차 기간 (예를 들어, 적어도 1 내지 2주) 동안 항생제와 조합하여 MASP-2 억제제를 대상체에 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0205] 다른 구체예에서, 대상체가 시겔라 또는 살모넬라로 감염된 것으로 알려져 있는, 사전 HUS 단계와 관련된 증상으로 고통받는 대상체의 설정에서, 대상체에서 올리고아뉴리아의 존재를 억제하거나 방지하는데 유효한 기간 동안 MASP-2의 유효량을 투여하는 단계를 포함하며, MASP-2 억제제가 적합한 항생제의 존재시 또는 부재시 투여되는, 대상체에서 HUS에 걸릴 위험을 감소시키거나 신부전의 가능성을 감소시키는 방법이 제공된다.

[0206] 일부 구체예에서, HUS의 초기 진단의 설정에서, 또는 HUS의 진단과 일치하는 하나 이상의 증상 (예를 들어, 낮은 피브리노겐, 또는 혈소판감소증의 부재시 신부전, 또는 미소혈관성 용혈성 빈혈증의 존재)을 나타내는 대상체에서, 대상체는 혈장반출법의 부재시, 또는 혈장반출법과 조합된 제 1선 치료로서 MASP-2 억제제 (예를 들어, 항-MASP-2 항체)의 유효량으로 치료된다. 제 1선 치료로서, MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수도 있다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 혈장 기증자, 또는 혈장반출법에 불리한 대상체, 또는 혈장반출법을 이용할 수 없는 설정에서 출혈, 감염, 및 내재하는 장애 및/또는 알레르기예 노출과 같은 혈장반출법의 합병증을 방지하기 위해 혈장반출법의 부재시 제 1선 치료로서 대상체에 투여된다.

[0207] 일부 구체예에서, 방법은 1차 기간 (예를 들어, 적어도 1일 내지 1주 또는 2주 동안 지속되는 급성기) 동안 카테터를 통해 (예를 들어, 정맥 내로) HUS로 고통받는 대상체에 MASP-2 억제제를 투여한 후 이어서 2차 기간 (예를 들어, 적어도 2주 이상의 만성 단계) 동안 피하로 대상체에 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 1차 및/또는 2차 기간의 투여는 혈장반출법의 부재시 발생한다. 일부 구체예에서, 방법은 치료 전에, 선택적으로 치료 중에 대상체에서 적어도 하나의 보체 인자 (예를 들어, C3, C5)의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하며, 표준 값 또는 건강한 대조군 대상체와 비교할 때 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 치료의 필요성을 나타내고, 정상 수준의 결정은 개선을 나타낸다.

[0208] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제, 예를 들어, 항-MASP-2 항체를 aHUS로 고통받거나, 이에 걸릴 위험이 있는 대상체에 피하로 또는 정맥 내로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 바람직하게 매일 수행되지만, 매주 또는 매달만큼 드물 수 있다. 치료는 적어도 1주 동안 및 3개월 만큼 계속될 것이다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 C5 억제제, 예를 들어, 에쿨리주맙과 조합하여 투여될 수도 있다.

[0209] **TTP:**

[0210] 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP)은 혈액 응고 시스템의 생명을 위협하는 장애이며, 응고 캐스케이드 또는 보체 시스템을 활성화하는 자가면역 또는 유전적 기능 장애에 의해 유발된다 (George, JN, N Engl J Med;

354:1927-35 (2006)). 이것은, 몸 전체의 작은 혈관에서, 많은 미세한 혈전, 또는 혈전증을 발생시킨다. 적혈구는 그것들의 막을 손상시키는 전단 응력을 받으며, 혈관 내 용혈로 이어진다. 결과의 감소된 혈류 및 내피 손상은 뇌, 심장, 및 신장을 포함하는, 기관 손상을 일으킨다. TTP는 임상적으로 혈소판감소증, 미소혈관성 용혈성 빈혈증, 신경학적 변화, 신부전 및 열을 특징으로 한다. 혈장 교환 전 시기에, 사망률은 급성 에피소드 동안 90%였다. 혈장 교환만으로, 6개월에 생존율은 약 80%였다.

[0211] TTP는 효소 ADAMTS-13, 본 빌레브란트 인자 (von Willebrand factor; vWF)의 큰 멀티머를 더 작은 단위로 절단하는 메탈로프로테아제의 유전적 또는 후천적 억제로부터 발생할 수도 있다. ADAMTS-13 억제 또는 결핍은 궁극적으로 증가된 응고를 일으킨다 (Tsai, H. J Am Soc Nephrol 14: 1072-1081, (2003)). ADAMTS-13은 vWF의 활성을 조절한다; 그것의 부재시, vWF는 혈소판과 결합할 가능성이 있는 큰 멀티머를 형성하고 환자를 미소혈관계의 혈소판 응집 및 혈전증에 취약하게 한다.

[0212] ADAMTS13의 많은 돌연변이가 TTP에 걸린 개체에서 확인되었다. 질병은 또한 ADAMTS-13에 대한 자가-항체로 인해 걸릴 수 있다. 또한, TTP는 유방암, 위장관 암, 또는 전립선 암 (George, JN., Oncology (Williston Park). 25:908-14 (2011)), 임신 (두 번째 임신 또는 산후), George JN., Curr Opin Hematol 10:339-344 (2003)) 중에 걸릴 수 있거나 HIV 또는 자가면역질환 유사 전신 홍반성 루푸스와 같은 질환과 관련된다 (Hamasaki K, et al., Clin Rheumatol.22:355-8 (2003)). TTP는 또한 헤파린, 퀴닌, 면역매개된 성분, 암 화학치료제 (블레오마이신, 시스플라틴, 시토신 아라비노시드, 다우노마이신 젬시타빈, 미토마이신 C, 및 타목시펜), 시클로스포린 A, 경구 피임약, 페니실린, 리팜핀 및 티클로피딘 및 클로피도그렐을 포함하는 항-혈소판 약물을 포함하는, 특정 약물 요법에 의해 유발될 수 있다 (Azarm, T. et al., J Res Med Sci., 16: 353-357 (2011)). TTP 관련된 다른 인자 또는 질병은 벌 독과 같은 독소, 패혈증, 지라의 격리 (splenic sequestration), 이식, 맥관염 (vasculitis), 혈관 수술, 및 스트렙토코쿠스 뉴모니아 (Streptococcus pneumonia) 및 시토크갈로바이러스 유사 감염이다 (Moake JL., N Engl J Med., 347:589-600 (2002)). 일시적인 기능성 ADAMTS-13 결핍으로 인한 TTP는 에스. 뉴모니아 감염과 관련된 내피 세포 손상의 결과로서 발생할 수 있다 (Pediatr Nephrol., 26:631-5 (2011)).

[0213] 혈장 교환은 TTP에 대한 표준 치료법이다 (Rock GA, et al., N Engl J Med 325:393-397 (1991)). 혈장 교환은 환자의 ADAMTS-13 활성을 유전적 결함으로 대체하고 후천적 자가면역 TTP에 걸린 그들 환자에서 ADAMTS-13 자가 항체를 제거한다 (Tsai, H-M, Hematol Oncol Clin North Am., 21(4): 609-v (2007)). 면역억제제와 같은 추가의 약제가 보통 치료에 추가된다 (George, JN, N Engl J Med, 354:1927-35 (2006)). 하지만, 혈장 교환은 환자 중 약 20%에 대해서는 성공적이지 않은데, 환자 중 3분의 1 이상에서 발생하고, 혈장교환법은 비용적으로 및 기술적으로 부담이 크다. 게다가, 많은 환자들이 혈장 교환을 견딜 수 없다. 그 결과, TTP에 대한 추가적이고 더 나은 치료에 대한 중요한 필요가 남아있다.

[0214] TTP가 혈액 응고 캐스케이드의 장애이기 때문에, 보체 시스템의 길항제로의 치료는 질병을 안정화하고 교정하는데 도움을 줄 수도 있다. 대체 보체 경로의 병리학적 활성화가 aHUS와 관련되는 한편, TTP에서 보체 활성화의 역할은 덜 분명하다. ADAMTS13의 기능 결핍은 TTP의 민감성에 중요하지만, 그것은 급성 에피소드를 유발하기에 충분하지 않다. 환경 인자 및/또는 다른 유전적 변이는 TTP의 징후에 기여할 수도 있다. 예를 들어, 응고 캐스케이드, vWF, 혈소판 기능, 내피 혈관 표면의 성분, 또는 보체 시스템의 조절에 수반된, 유전자를 암호화하는 단백질은 급성 혈전성 미소혈관증의 발달에 연루될 수도 있다 (Galbusera, M. et al., Haematologica, 94: 166-170 (2009)). 특히, 보체 활성화는 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다; ADAMTS-13 결핍과 관련된 혈전성 미소혈관증의 혈청은 C3 및 MAC 침착 및 보체 불활성화에 의해 폐기될 수도 있는, 이후의 호중구 활성화를 유발하는 것으로 나타났다 (Ruiz-Torres MP, et al., Thromb Haemost, 93:443-52 (2005)). 또한, TTP의 급성 에피소드 동안, 고전적/렉틴 및 대체 경로의 활성화와 일치하는, 증가된 수준의 C4d, C3bBbP, 및 C3a가 있다는 것이 나타났다 (M. Reti et al., J Thromb Haemost. Feb 28.(2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x. [상기 인쇄된 Epub]). 급성 에피소드에서 보체 활성화의 이 증가량은 말단 경로 활성화를 개시할 수도 있고 TTP의 추가의 약화의 원인일 수도 있다.

[0215] TTP에서 ADAMTS-13 및 vWF의 역할은 분명하게 혈소판의 활성화 및 응집에 대한 원인이고 미소혈관 장애에서 전단 응력 및 침착에서 그것들의 이후의 역할이다. 활성화된 혈소판은 보체의 고전적 및 대체 경로 둘 다와 상호 작용하고 촉발한다. 혈소판 매개된 보체 활성화는 염증성 매개자 C3a 및 C5a를 증가시킨다 (Peerschke E et al., Mol Immunol, 47:2170-5 (2010)). 따라서, 혈소판은 유전된 또는 자가면역 TTP에서 고전적인 보체 활성화의 표적의 역할을 할 수도 있다.

[0216] 상기 설명된 바와 같이, MASP-2 매개된 프로트롬빈 활성화에 의해, 보체의 렉틴 경로는 내피 손상을 HUS에서 발

생하는 응고 및 미세혈관 혈전증과 연관시키는 지배적인 분자적 경로이다. 유사하게, 보체의 렉틴 경로의 활성화는 TTP의 응고 시스템을 직접 구동할 수도 있다. 렉틴 경로 활성화는 TTP에서 ADAMTS-13 결핍에 의해 유발된 초기 내피 손상에 반응하여 개시될 수도 있다. 그러므로 MASP-2 기능을 차단하는 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 렉틴 경로 억제제는 TTP로 고통받는 환자에서 미세혈관 응고, 혈전증, 및 용혈과 관련된 미소혈관 장해를 완화할 것으로 예상된다.

[0217] 전형적으로 응급실에 존재하는, TTP로 고통받는 환자는 다음 중 하나 이상을 가진다: 뇌졸중을 포함하는, 자반병, 신부전, 적은 혈소판, 빈혈증 및/또는 혈전증. TTP에 대한 관리의 최근 표준은 2주 이상의 기간 동안, 전형적으로 1주에 세 번, 하지만 최대 매일 대체 혈장반출법의 카테터 내 전달 (예를 들어, 정맥 내 또는 카테터의 다른 형태)을 수반한다. 대상체가 ADAMTS13의 억제제 (즉, ADAMTS13에 대한 내인성 항체)의 존재에 대하여 양성으로 테스트하면, 혈장반출법이 면역억제 요법 (예를 들어, 코르티코스테로이드, 리툭산, 또는 시클로스포린)과 조합하여 수행될 수도 있다. 난치성 TTP에 걸린 대상체 (TTP 환자 중 약 20%)는 적어도 2주의 혈장반출 요법에 반응하지 않는다.

[0218] 상기 언급된 내용에 따라, 한 구체예에서, TTP의 초기 진단의 설정에서, 또는 TTP의 진단과 일치하는 하나 이상의 증상 (예를 들어, 중추 신경계 관여 (central nervous system involvement), 중증 혈소판감소증 (아스피린이 없으면 5000/ μ L 이하, 아스피린이 있으면 20,000/ μ L 이하의 혈소판 수), 중증 심장의 관여 (cardiac involvement), 중증 폐 침범 (pulmonary involvement), 위장 경색 (gastro-intestinal infarction) 또는 괴저 (gangrene))을 나타내는 대상체에서, 혈장반출법의 부재시, 또는 혈장반출법과 조합하여 제 1선 치료로서 MASP-2 억제제 (예를 들어, 항-MASP-2 항체)의 유효량을 대상체에 처리하는 방법이 제공된다. 제 1선 치료로서, MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해 투여될 수도 있다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 혈장 기증자, 또는 혈장반출법에 불리한 대상체, 또는 혈장반출법을 이용할 수 없는 설정에서 출혈, 감염, 및 내재하는 장애 및/또는 알레르기 노출을 포함하는 혈장반출법의 잠재적 합병증을 방지하기 위해 혈장반출법의 부재시 제 1선 치료로서 대상체에 투여된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 TTP로 면역억제제 (예를 들어, 코르티코스테로이드, 리툭산 또는 시클로스포린)와 조합하여 (동시-투여 포함) 및/또는 농축된 ADAMTS-13과 조합하여, 고통받는 대상체에 투여된다.

[0219] 일부 구체예에서, 방법은 1차 기간 (예를 들어, 1일 내지 1주 또는 2주 동안 지속되는 급성기) 동안 카테터를 통해 (예를 들어, 정맥 내로) 대상체에 MASP-2 억제제를 투여한 후 이어서 2차 기간 (예를 들어, 적어도 2주 이상의 만성 단계) 동안 피하로 대상체에 MASP-2 억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 1차 및/또는 2차 기간에 투여는 혈장반출법의 부재시 발생한다. 일부 구체예에서, 방법은 대상체가 TTP와 관련된 하나 이상의 증상으로 고통받는 것을 방지하도록 대상체를 유지하기 위해 사용된다.

[0220] 또 다른 구체예에서, TTP의 하나 이상의 증상을 감소시키기 위해 MASP-2 억제제의 유효량을 투여함으로써, 난치성 TTP로 고통받는 대상체 (즉, 적어도 2주의 혈장반출 요법에 반응하지 않는 대상체)를 치료하는 방법이 제공된다. 한 구체예에서, MASP-2 억제제 (예를 들어, 항-MASP-2 항체)는 피하 또는 다른 비경구 투여를 통해 적어도 2주 이상의 기간 동안 만성 질환에 기초하여 난치성 TTP에 걸린 대상체에 투여된다. 투여는 질병이 해결되었거나 조절될 때까지 의사의 결정에 따라 반복될 수도 있다.

[0221] 일부 구체예에서, 방법은 치료 전에, 및 선택적으로 치료 동안 대상체에서 적어도 하나의 보체 인자 (예를 들어, C3, C5)의 수준을 결정하는 단계를 추가로 포함하며, 표준 값 또는 건강한 대조군 대상체와 비교할 때 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 MASP-2 억제제로 지속적인 치료의 필요를 나타낸다.

[0222] 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제, 예를 들어, 항-MASP-2 항체를 TTP로 고통받거나, 이에 걸릴 위험이 있는 대상체에 피하로 또는 정맥 내로 투여하는 단계를 포함한다. 치료는 바람직하게 매일 수행되지만, 2주 마다와 같이 드물 수도 있다. 치료는 대상체의 혈소판 수가 적어도 연속 2주 동안 150,000/ μ L보다 더 커질 때까지 계속된다. 항-MASP-2 항체는 단독으로, 또는 C5 억제제, 예를 들어, 에컬리주맙과 조합하여 투여될 수도 있다.

[0223] 본 발명의 또 다른 양태는 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 한랭글로불린 혈증 또는 한랭글로불린혈증으로부터 발생한 질병으로 고통받는 대상체에 투여함으로써, 한랭글로불린혈증을 치료하는 방법을 제공한다. 한랭글로불린혈증은 혈청에 한랭글로불린의 존재를 특징으로 하며, 이것은 저온에서 가역적인 응집을 경험하는 단일 또는 혼합된 면역글로불린 (전형적으로 IgM 항체)이다. 한랭글로불린혈증으로부터 발생한 질병은 맥관염, 사구체 신염, 및 전신성 염증을 포함한다. MASP-2 억제제는 한랭글로불린혈증 또는 한랭글로불린혈증으로부터 발생한 질병으로 고통받는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 비-펩티드성 약제에 대하여 잠재적으로 경구 투여에 의해 투여

된다.

[0224] 또 다른 양태에서, 본 발명은 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 CAD 또는 CAD로부터 발생한 질병으로 고통받는 대상체에 투여함으로써, 한랭응집소병 (한랭응집소 disease; CAD)을 치료하는 방법을 제공한다. CAD 질환은 빈혈증으로서 나타나고 감염성 질환, 림프증식성 질환 또는 연결 조직 장애와 같은 "2차 CAD"로 불리는, 기저 질환 또는 장애에 의해 유발될 수 있다. 이들 환자는 저온에서 응집 반응을 촉발하는, 그것들의 적혈구에 대한 IgM 항체를 발달시킨다. MASP-2 억제제는 CAD 또는 CAD로부터 발생한 질병으로 고통받는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 비-캡티드성 약제에 대하여 잠재적으로 경구 투여에 의해 투여된다.

[0225] 응고장애

[0226] 상당한 신체적 외상에 2차적인 DIC와 같은, 파종성 혈관 내 응고 ("DIC")에서 보체 시스템의 역할에 대한 증거가 개발되었다.

[0227] 선행 연구는 C4-/- 마우스가 신장 재관류 손상으로부터 보호되지 않는다는 것을 나타냈다 (Zhou, W., et al, "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury," J Clin Invest 105:1363-1371 (2000)). C4-/- 마우스가 고전적 또는 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화할 수도 있는지 조사하기 위해, C4-/- 혈장의 C3 턴오버를 고전적, 또는 렉틴 경로 활성화 루트에 특이적인 검정으로 측정하였다. 고전적 경로를 통해 활성화를 촉발할 때 C3 절단이 발견될 수 없는 한편, C4 결핍 혈청에서 C3의 매우 효율적인 렉틴 경로-의존적 활성화가 관찰되었다 (도 30). 만난 및 치모산에 C3b 침착은, 대체 경로 활성화에 대한 많은 이전에 발표된 논문에 따라, 세 개의 경로 모두에게 허용되어야 하는 실험 조건 하에서도, MASP-2-/- 마우스에서 심각하게 손상되는 것으로 나타날 수 있다. 만난 또는 치모산 대신에 면역글로불린 복합체로 코팅된 웰에 같은 혈청을 사용할 때, C3b 침착 및 인자 B 절단은 MASP-2+/+ 마우스 혈청 및 MASP-2-/- 혈청에서 나타나지만, C1q 결핍된 혈청에서는 아니다. 이것은 초기 C3b가 고전적 활성을 통해 제공될 때 대체 경로 활성화가 MASP-2-/- 혈청에서 가능해진다는 것을 나타낸다. 도 30c는 C3가 C4 결핍 혈장에서 렉틴 경로-의존적 방식으로 효과적으로 활성화될 수 있다는 놀라운 발견을 나타낸다.

[0228] 이 "C4 바이패스"는 가용성 만난 또는 만노스와 함께 혈장의 사전 배양을 통한 렉틴 경로-활성화의 억제에 의해 폐지된다.

[0229] 보체 시스템의 변종 비-면역 활성화는 잠재적으로 사람에게 유해하고 혈액학적 경로 활성화, 특히 염증 및 혈액학적 경로 둘 다 활성화되는 중증 외상 상황에서 중요한 역할을 할 수도 있다. 정상적인 건강한 개체에서, C3 전환은 총 혈장 C3 단백질의 <5%이다. 패혈증 및 면역 복합성 질환을 포함하는, 만연한 감염시, C3 전환은 증가된 이용 및 풀 (pool) 분포의 변화로 인해, 그 자체를 정상보다 자주 더 낮은 보체 수준의 약 30%에서 재확립하였다. 30%보다 더 큰 즉각적인 C3 경로 활성화는 일반적으로 혈관 확장 및 조직으로 체액 유출의 명백한 임상적 증거를 생산한다. 30% C3 전환에서, 개시 메커니즘은 대부분 비-면역성이고 결과의 임상적 징후는 환자에게 해롭다. 건강한 개체 및 조절된 질환 개체에서 보체 C5 수준은 C3보다 훨씬 더 안정적인 것으로 나타난다. C5 수준의 큰 감소 및 또는 전환은 비정상 다발 외상 (예를 들어, 교통 사고) 및 쇼크 패 증후군의 발달 가능성에 대한, 환자의 반응과 관련된다. 따라서, 보체 C3 활성화의 어떤 증거도 혈관 풀 또는 어떤 C5 수반, 또는 둘 다의 30%를 넘는 보체 C3 활성화의 어떤 증거도 환자의 해로운 병리학적 변화의 조짐인 것으로 생각될 수 있다. C3 및 C5 둘 다는 혈관 확장 물질을 방출하는 비만 세포 및 호염기성 세포에서 작용하는 아나필라톡신 (C3a 및 C5a)를 유리시킨다. 그것들은 화학주성 성분이 다형핵 세포 (PMN)을 면역학적 장애의 중심으로 인도하도록 설정하지만 (이로운 반응), 여기에서 그것들은 이들 식세포에 대한 효과를 특이적 군집 (응집)을 갖기 때문에 다르며, 반응 부위로부터 그것들의 무작위의 이동을 방지한다. 감염의 정상 대조군에서, C3는 C5를 활성화하지만, 다발 외상시, C5는 널리 활성화되며, 전신에 C5a 아나필라톡신을 발생시키는 것으로 나타난다. 이 조절되지 않은 활성화는 다형체가 혈관 시스템 내 군집하는 것을 유발하고, 이 군집들은 폐의 모세혈관으로 들어오고, 그것들은 이것을 폐색하고 과산화물 유리의 결과로서 국부적 손상 효과를 발생시킨다. 이론에 의해 제한되고자 하는 것은 아니지만, 메커니즘은 아마 급성 호흡곤란 증후군 (ARDS)의 발병시 중요하지만, 이 관점이 최근에 시도되었다. C3a 아나필라톡신은 시험관 내 강한 혈소판 응집자인 것으로 나타날 수 있지만, 그것들의 생체 내 수반은 덜 정의되고 상처에서 혈소판 물질 및 플라스민의 방출은 2차적으로만 보체 C3을 수반할 수 있다. C3 활성화의 지속적인 향상은 DIC를 발생시키는데 필요할 것이다.

[0230] 외상 및 DIC 사이의 관계를 설명할 수 있다는 것으로 상기 개요가 서술된 활성화된 보체 성분의 세포 및 혈관 효과 이외에, 과학적 발견이 보체 및 응고 시스템 사이의 직접적은 분자 결합 및 기능적 혼선을 확인했다는 것

을 나타낸다. 지원 데이터를 C3 결핍 마우스의 연구로부터 얻었다. C3가 각각의 보체 경로에 대한 공유 성분이기 때문에, C3 결핍 마우스는 모든 보체 기능이 부족한 것으로 예측된다. 하지만, C3 결핍 마우스는 말단 보체 성분을 완전히 활성화할 수 있다 (Huber-Lang, M., et al., "Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway," Nat. Med 12:682-687 (2006)). 상세하게, 연구는 말단 보체 성분의 C3-독립적 활성화가 트롬빈, 응고 캐스케이드의 속도 제한 효소에 의해 매개된다는 것을 나타낸다 (Huber et al., 2006). 초기 보체 활성화에 이어 트롬빈 활성화를 매개하는 분자 성분은 애매하게 남아있다.

[0231] 본 발명자는 보체 및 응고 캐스케이드 사이의 혼선에 대한 분자적 근거인 것으로 생각되는 것을 설명하였고 두 개의 시스템을 결합하는 중심 기준점으로서 MASP-2를 확인하였다. MASP-2의 기질 특이성에 대한 생화학적 연구는 잘 알려진 C3 및 C4 보체 단백질 이외에, 가능한 기질로서 프로트롬빈을 확인하였다. MASP-2는 특이적으로 기능적으로 관련된 부위에서 프로트롬빈을 절단하며, 트롬빈, 응고 캐스케이드의 속도 제한 효소를 발생시킨다 (Krarup, A., et al., "Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2," PLoS. ONE. 2:e623 (2007)). MASP-2-발생된 트롬빈은 한정된 재구성된 시험관 내 시스템에서 피브린 침착을 촉진할 수 있으며, MASP-2 절단의 기능적 적절성을 입증한다 (Krarup et al., 2007). 여기에서 하기 실시예에 논의된 바와 같이, 본 발명자는 렉틴 경로 활성화에 이어 정상 설치류 혈청에서 트롬빈 활성화를 기록함으로써 이 발견의 생리학적 중요성을 추가로 입증하였고, 이 과정은 MASP-2 단클론성 항체를 중화함으로써 차단된다는 것을 입증하였다. MASP-2는 보체 및 응고 시스템의 활성화를 촉진할 수 있는, 렉틴 경로의 중앙 분기점을 나타낼 수도 있다. 렉틴 경로 활성화가 많은 타입의 외상성 손상에 대한 생리학적 반응이기 때문에, 본 발명자는 동시의 전신성 염증 (보체 성분에 의해 매개됨) 및 과중성 응고 (응고 경로를 통해 매개됨)는 두 경로를 활성화하는 MASP-2의 능력에 의해 설명될 수 있다고 생각한다. 이들 발견은 DIC 발생시 MASP-2의 역할 및 DIC를 치료하거나 방지하는데 있어서 MASP-2 억제제의 치료적 이점을 분명하게 제안한다. MASP-2는 보체 및 응고 시스템 사이의 분자적 관계를 제공할 수도 있고, 렉틴 경로의 활성화는, 그것이 외상의 설정에서 발생하기 때문에, 외상 및 DIC 사이의 기계적 결합을 제공하는, MASP-2-트롬빈 축을 통해 응고 시스템의 활성화를 직접적으로 개시할 수 있다. 본 발명의 양태에 따라, MASP-2의 억제는 렉틴 경로 활성화를 억제하고 아나필라톡신 C3a 및 C5a 둘 다의 발생을 감소시킨다. C3 활성화의 장기적인 향상은 DIC를 발생시키기 위해 필요한 것으로 생각된다.

[0232] 그러므로, 본 발명의 양태는 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량 (예를 들어, 항-MASP-2 항체 또는 이들의 단편, 펩티드 억제제 또는 저 분자 억제제)을 포함하는 조성물을 이러한 질병으로 고통받거나 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여함으로써 과중성 혈관 내 응고 또는 다른 보체 매개된 응고 장애를 치료하기 위해 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 이미 활성화된 MASP-2를 차단할 수 있다. MASP-2 억제 조성물은 적합하게 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 비-펩티드성 약제에 대하여 잠재적으로 경구 투여에 의해 투여된다. 질병이 해결되었거나 조절될 때까지 의사의 결정에 따라 투여가 반복될 수도 있다. 본 발명의 이 양태의 방법은 패혈증, 신경학적 외상 (예를 들어, 급성 두부 외상, Kumura, E., et al., Acta Neurochirurgica 85:23-28 (1987)을 참고하면 된다, 감염 (박테리아, 바이러스, 균류, 기생충), 암, 산과 합병증, 간 질환, 중증 독성 반응 (예를 들어, 사고상, 곤충자상, 수혈 반응)을 포함하는, 중증 외상, 쇼크, 열사병, 이식 거부, 혈관 동맥류, 간 부전, 화학요법 또는 방사선 요법의 의한 암 치료, 화상, 돌발성 방사선 노출, 및 다른 원인에 2차적인 DIC의 치료를 위해 이용될 수도 있다. 예를 들어, Becker J.U. 및 Wira C.R. "과중성 혈관 내 응고" emedicine.medscape.com/9/10/2009를 참고하면 된다. 외상 또는 다른 급성 사건에 2차적인 DIC에 대하여, MASP-2 억제 조성물은 외상성 손상 직후에 또는 예방을 위해 DIC에 걸릴 위험이 있는 것으로 간주되는 환자의 수술과 같은 외상-유발 손상 또는 상황 전에, 도중에, 직후에, 또는 1일 내지 7일 이상, 예를 들어, 24시간 내지 72시간 내에, 후에 투여될 수도 있다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제 조성물은 MASP-2 억제제 조성물을 함유하는 용액의 볼루스의 정맥 내 또는 동맥 내 전달과 같이, 빨리 작용하는 투약 형태로 적합하게 투여될 수도 있다.

[0233] 또 다른 양태에서, 본 발명은 혈전증, 미소 순환 응고 또는 미소 순환 응고 후 다기관 기능 부전으로 고통받거나 걸릴 위험이 있는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 생리학적 혈전 (혈전)은 손상된 혈관으로부터 혈액의 누출을 방지하기 위해 혈관 손상에 반응하여 형성된다.

[0234] 렉틴 경로는 다양한 병리학에 고나려진 근본적인 혈관 염증에 의해 촉발된 병리학적 혈전증에서 중요한 역할을 할 수도 있다. 예를 들어, 혈전은 동맥경화성 플라크 (동맥경화 플라크) 주위에 형성될 수 있으며, 이것은 렉틴 경로의 알려진 개시자이다. 따라서, MASP-2 억제제의 처리는 근본적인 아테롬성 동맥 경화증 (atherosclerosis)

s)에 걸린 환자에서 혈전 형성을 차단하기 위해 사용될 수도 있다.

[0235] 미소순환 응고 (모세혈관 및 작은 혈관에서 점 혈전)는 패혈 쇼크와 같은 설정에서 발생한다. 패혈증의 MASP-2 (-/-) 마우스 모델의 보호된 표현형에 의해 입증된 바와 같이, 패혈 쇼크에서 렉틴 경로의 역할이 입증되며, 실시예 17 및 도 18 및 19에 설명된다. 게다가, 실시예 15 및 도 16a 및 16b에서 입증된 바와 같이, MASP-2 (-/-) 마우스는 과중성 혈관 내 응고 (DIC)의 국부화된 슈바르츠만 반응 모델, 미세혈관의 국부화된 응고의 모델에서 보호된다.

[0236] **페리화학적치료적 (Perichemotherapeutic) 투여 및 악성 종양의 치료**

[0237] 보체 시스템의 활성화는 또한 악성 종양의 발병에 연루될 수도 있다. 최근에, C5b-9 상보성 복합체, IgG, C3, C4, S-단백질/비트로넥틴, 피브로넥틴, 및 대식세포의 신생 항원은 다클론성 또는 단클론성 항체 및 스트렙타비딘-비오틴-퍼옥시다제 기술을 사용하여 유방암의 17개의 샘플 및 양성 유방 종양 (benign breast tumor)의 6개의 샘플에 국부화된다. 각각 TNM 단계의 암종에 걸린 조직 샘플 모두는 종양 세포의 막, 세포 잔부 (cell remnant)에서 얇은 과립에서 C5b-9 침착, 및 괴사 영역에서 분산 침착을 나타냈다 (Niculescu, F., et al., Am. J. Pathol. 140:1039-1043, 1992).

[0238] 또한, 보체 활성화는 화학요법 또는 방사선 요법의 결과일 수도 있고 따라서 보체 활성화의 억제제는 의료원성 염증을 감소시키기 위해 악성 종양의 치료시 부가물로서 유용할 것이다. 화학요법 및 방사선 요법이 수술에 선행할 때, C5b-9 침착은 더 강렬하고 확장되었다. C5b-9 침착은 악성 병변에 걸린 샘플 모두에 존재하지 않았다. S-단백질/비트로넥틴은 연결 조직 매트릭스에서 미소섬유 침착으로서 및 종양 세포 주위에 분산 침착으로서 존재하였으며, 피브로넥틴보다 덜 강렬하고 확장되었다. IgG, C3, 및 C4 침착은 암종 샘플에만 존재한다. C5b-9 침착의 존재는 보체 활성화 및 유방암에서 그것의 이후의 병원성 효과를 나타낸다 (Niculescu, F., et al., Am. J. Pathol. 140:1039-1043, 1992).

[0239] 파동 조절 가능 색소 레이저 (Pulsed tunable dye laser) (577 nm) (PTDL) 요법은 헤모그로빈 응고 및 조직 괴사를 유발하며, 이것은 주로 혈관에 제한된다. PTDL-조사된 정상 피부 연구에서, 주된 발견은 다음과 같았다: 1) C3 단편, C8, C9, 및 MAC은 관 벽에 침착되었고; 2) 이들 침착물은, 그것들이 적혈구 응고의 부위에서 트랜스페린의 즉각적인 침착과 반대로, 조사 후 7분 만에 분명해졌기 때문에, 단백질의 변성 때문이 아니었고; 3) C3 침착은 대체 경로에 의해 보체 활성화, 조직 괴사 자체가 이러한 증폭으로 이어지지 않기 때문에 특이적인 반응을 증폭하는 것으로 나타났고; 4) 이들 반응은 다형핵 백혈구의 국부적 축적에 선행하였다. 조직 괴사는 혈관종 (hemangioma)에서 더 뚜렷했다. 괴사의 중심에서 더 큰 혈관종의 혈관은 보체를 크게 고정하지 않았다. 대조적으로, 주변에 위치한 혈관에서 보체 침착은 하나를 제외하고 정상 피부에서 관찰된 것과 유사하였다: C8, C9, 및 MAC은 레이저 처리 직후 일부 혈관에서 검출되었고, 발견은 직접적으로 C5 컨버타제를 형성하지 않고 발생한 MAC의 조립체와 일치한다. 이들 결과는 보체가 PTDL-유발된 관 괴사에서 활성화되고, 뒤이은 염증성 반응의 원인이 될 수도 있다.

[0240] 종양의 광 에너지 요법 (Photodynamic therapy; PDT)은 강한 숙주 면역 반응을 유도하고, 그것의 징후 중 하나는 뚜렷한 호중구증가증 (neutrophilia)이다. PDT-유발된 보체 활성화의 결과로서 방출된 보체 단편 (직접적인 매개자) 이외에, 보체 활성화의 결과로서 모두 발생하는, 적어도 12개의 2차 매개자가 있다. 후자는 시토킨 IL-1베타, TNF-알파, IL-6, IL-10, G-CSF 및 KC, 트롬복산, 프로스타글란딘, 류코트리엔, 히스타민, 및 응고 인자를 유발한다 (Cecic, I., et al., Cancer Lett. 183:43-51, 2002).

[0241] 최종적으로, MASP-2-의존적 보체 활성화의 억제제의 사용은 암의 치료를 위해 표준 치료적 식이요법과 함께 생각될 수도 있다. 예를 들어, 리톡시맙, 키메라 항-CD20 단클론성 항체의 처리는, 특히 많은 순환 종양 세포를 가진 환자에서, 중간 내지 중증의 최초 투여 부작용과 관련될 수 있다. 리톡시맙의 최초 투입 동안의 최근 연구는 다섯 번 재발된 저등급 비-호지킨 림프종 (non-Hodgkin's lymphoma; NHL) 환자에서 보체 활성화 생성물 (C3b/c 및 C4b/c) 및 시토킨 (종양 괴사 인자 알파 (TNF-알파), 인터류킨 6 (IL-6) 및 IL-8)을 측정하였다. 리톡시맙의 투입은 TNF-알파, IL-6 및 IL-8의 방출에 선행하는, 신속한 보체 활성화를 유발하였다. 연구 그룹이 작았지만, 보체 활성화의 수준은 투입 전에 순환하는 B 세포의 수 ($r = 0.85$; $P = 0.07$), 및 부작용의 심각성과 연관되는 것으로 나타났다. 결과는 보체가 리톡시맙 처리의 부작용의 발병에서 중심 역할을 한다는 것을 나타냈다. 보체 활성화가 코르티코스테로이드에 의해 방지될 수 있기 때문에, 리톡시맙의 최초 투여 중에 보체 억제제의 가능한 역할을 연구하는 것이 적절할 수도 있다 (van der Kolk, L.E., et al., Br. J. Haematol. 115:807-811, 2001).

- [0242] 본 발명의 또 다른 양태에서, 암성 질병의 치료를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 화학 요법 및/또는 방사선 요법으로 치료되는 대상체의 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법이 제공된다. 이 방법은 페리화학적 치료적으로, 즉, 화학요법(들) 및/또는 방사선 요법의 투여 전에 및/또는 도중에 및/또는 후에 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 MASP-2 억제제 조성물의 투여는 비-표적화된, 건강한 조직에서 화학- 및/또는 방사선 요법의 부작용을 감소시키기 위해, 화학- 또는 방사선 요법의 투여 전에 또는 이와 동시에 시작되고, 치료의 과정을 통해 지속될 수도 있다. 또한, MASP-2 억제제 조성물은 화학- 및/또는 방사선 요법에 따라 투여될 수 있다. 화학- 및 방사선 요법 식이요법은 종종 반복된 치료를 수반하고, 그러므로, MASP-2 억제제 조성물의 투여는 또한 반복적이고 상대적으로 화학요법 및 방사선 치료와 일치한다는 것이 가능하다. 또한 악성 종양으로 고통받는 환자를 치료하기 위해, MASP-2 억제제가 단독으로 또는 다른 화학치료제 및/또는 방사선 요법과 조합하여 화학치료제로서 사용될 수도 있다는 것으로 생각된다. 경구 (비-펩티드성에 대해), 정맥 내, 근육 내 또는 다른 비경구 루트를 통해 적절하게 투여될 수도 있다.
- [0243] 또 다른 구체예에서, MASP-2 억제제는 이온화 방사선에 노출 (돌발성 또는 그 반대)의 부작용을 감소시키기 위해 급성 방사선 증후군 (방사능 병 또는 방사능 증독으로도 알려짐)에 걸린 대상체를 치료하는데 사용될 수도 있다. 급성 방사선 증후군과 관련된 증상은 구역질, 구토, 설사, 피부 손상, 탈모, 피로, 열, 발작 및 코마 (coma)를 포함한다. 급성 방사선 증후군의 치료를 위해, MASP-2 억제 조성물은 방사선 노출 직후 또는 예방을 위해 노출 전에, 도중에, 직후에, 또는 1일 내지 7일 이상, 예를 들어, 24시간 내지 72시간 내에, 후에 투여될 수도 있다. 일부 구체예에서, 방법은 급성 방사선 증후군을 유발하기 위해 충분한 이온화 방사선의 조사량 (즉, 적어도 1 Gy, 또는 적어도 2 Gy, 또는 적어도 3 Gy, 또는 적어도 4 Gy, 또는 적어도 5 Gy, 또는 적어도 6 Gy, 또는 적어도 7 Gy 이상의 이온화 방사선의 전신 조사량)에 노출 전에 또는 후에 대상체를 치료하기 위해 사용될 수도 있다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제 조성물은 빨리 작용하는 투약 형태로, 예를 들어, MASP-2 억제제 조성물을 함유하는 용액의 볼루스의 정맥 내 또는 동맥 내 전달에 의해 적절하게 투여될 수도 있다.
- [0244] **안과학 질병**
- [0245] 나이-관련 황반 변성 (AMD)은 성인 중 수백만을 괴롭히는, 눈을 멀게 하는 질환이고, AMD의 발달로 이어지는 생화학적, 세포적, 및/또는 분자적 사건의 후유증은 잘 이해되지 않는다. AMD는 흑점에 및 주위, 망막 뒤에 및 망막 색소 상피 (retina pigment epithelium; RPE) 및 맥락막 사이에 위치한 드루젠 (drusen)이라 불리는, 세포 외 침착의 형성과 관련된 흑점의 점진적인 파괴를 일으킨다. 최근 연구는 염증과 관련된 단백질 및 면역-매개된 과정이 드루젠-관련 성분 가운데 일반적이라는 것을 나타냈다. 많은 이들 분자를 암호화하는 전사물이 망막, RPE, 및 맥락막 세포에서 검출되었다. 이들 데이터는 또한 강한 항원-제공 세포인, 수지상세포가 드루젠 발달에 밀접하게 관련되고, 보체 활성화가 드루젠 내에 및 RPE-맥락막 계면을 따라 모두 활성인 주요 경로인 것을 입증한다 (Hageman, G.S., et al., Prog. Retin. Eye Res. 20:705-732, 2001).
- [0246] 여러 독립적인 연구가 AMD의 가능성이 위험 유전자에 대하여 동형 접합성인 개체에서 7.4의 인자에 의해 증가되는, 보체 인자 H (CFH)에 대한 유전자에서 AMD 및 유전적 다형 현상 사이의 강한 연관성을 나타냈다 (Klein, R.J. et al., Science 308:362-364, 2005; Haines et al., Science 308:362-364, 2005; Edwards et al., Science 308:263-264, 2005). CFH 유전자는 염색체는 여섯 개의 독립적인 연결 스캔 (scan)에 의해 AMD에 연루된, 염색체 1q31 영역에 매핑되었다 (예를 들어, Schultz, D.W., et al., Hum. Mol. Genet. 12:3315, 2003을 참고하면 된다). CFH는 보체 시스템의 주요 조절기인 것으로 알려져 있다. 세포에서 및 순환에서 CFH가 C3 내지 C3a 및 C3b의 활성화를 억제함으로써, 및 기존의 C3b를 불활성화함으로써 보체 활성을 조절한다는 것을 나타냈다. C5b-9의 침착은 AMD에 걸린 환자의 브러쉬 막 (Brusch's membrane), 모세혈관 사이 기둥 및 드루젠 내에서 관찰되었다 (Klein et al.). 면역 형광 실험은 AMD에서, CFH의 다형 현상이 맥락막 모세혈관 및 맥락막 혈관에 서 보체 침착을 초래할 수도 있다는 것을 제안한다 (Klein et al.).
- [0247] 막-관련 보체 억제제, 보체 수용체 1은 또한 드루젠에 위치하지만, 그것은 RPE 세포에서 면역조직화학적으로 검출되지 않는다. 반대로, 제 2 막-관련 보체 억제제, 막 보조인자 단백질은 드루젠-관련 RPE 세포, 뿐만 아니라, 드루젠 내에 작은 구형 하부구조 요소에 존재한다. 이들 이전에 미확인된 요소는 또한 보체 활성화의 부위에 특징적으로 침착된 보체 성분 C3의 단백질 가수분해 단편에 대하여 강한 면역반응성을 나타낸다. 이들 구조는 보체 공격의 표적인, 퇴화 RPE 세포의 나머지 파편들을 제공하는 것이 제안된다 (Johnson, L.V., et al., Exp. Eye Res. 73:887-896, 2001).
- [0248] 이들 다중 보체 조절기, 뿐만 아니라 보체 활성화 생성물 (C3a, C5a, C3b, C5b-9)의 확인 및 국부화는 조사자가

만성 보체 활성화가 드루젠 생물발생의 과정 및 AMD의 병인학에서 중요한 역할을 한다는 결론을 내리는 것으로 이어졌다 (Hageman et al., Progress Retinal Eye Res. 20:705-32, 2001). 드루젠에서 C3 및 C5 활성화 생성물의 확인은 본 발명에 따라 이해되는 바와 같이, C3 및 C5 둘 다가 고전적 경로, 렉틴 경로 또는 대체 증폭 루프 모두에 공통적이기 때문에, 보체가 고전적 경로, 렉틴 경로 또는 대체 증폭 루프를 통해 활성화되는지에 어떤 통찰력도 제공하지 않는다. 하지만, 두 개의 연구는 C1q, 고전적 경로의 활성화를 위한 필수 인식 성분에 특이적인 항체를 사용하여 드루젠 면역-표지를 찾았다 (Mullins et al., FASEB J. 14:835-846, 2000; Johnson et al., Exp. Eye Res. 70:441-449, 2000). 두 연구는 드루젠에서 C1q 면역-표지가 일반적으로 관찰되지 않았다고 결론을 내렸다. C1q의 이들 부정적인 결과는 드루젠에서 보체 활성화가 고전적 경로를 통해 일어나지 않는다는 것을 제안한다. 또한, 면역-복합체 성분 (IgG 경쇄, IgM)에 대한, 드루젠의 면역-표지는 Mullins et al., 2000 연구에서 변수에 약한 것으로 보고되며, 추가로 고전적 경로가 이 질환 과정에서 발생하는 보체 활성화에서 중요하지 않은 역할을 수행한다는 것을 나타낸다.

[0249] 두 개의 최근에 발표된 연구는 마우스, 사람 CNV의 모델에서 레이저-유발된 맥락막 신혈관 형성 (CNV)의 발달에서 보체의 역할을 평가하였다. 면역조직학적 방법을 사용하여, Bora 및 동료 (2005)들은 레이저 처리 후 신혈관 형성 복합체에서 보체 활성화 생성물 C3b 및 C5b-9 (MAC)의 큰 침착을 발견하였다 (Bora et al., J. Immunol. 174:491-7, 2005). 중요하게도, CNV는 C3에서 유전적으로 결핍된 마우스 (C3-/- 마우스)에서 발달하지 않았고, 필수 요소는 모든 보체 활성화 경로에서 필요했다. VEGF, TGF- β_2 , 및 β -FGF, CNV에 연루된 세 개의 혈관 형성 인자에 대한 RNA 메세지 수준이 레이저-유발된 CNV 후 마우스의 눈 조직에서 평가되었다. 중요하게도, 보체 결핍은 이들 혈관 형성 인자의 RNA 수준의 뚜렷한 감소를 일으켰다.

[0250] ELISA 방법을 사용하여, Nozaki 및 동료들은 강한 아나필라톡신 C3a 및 C5a가 레이저-유발된 CNV의 과정의 초기에 발생한다는 것을 입증하였다 (Nozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:2328-33, 2006). 게다가, C3 및 C5의 이들 두 개의 생물 활성 단편은 야생형 마우스에서 유리체 내 주사 후 VEGF 발현을 유발하였다. 이들 결과와 일치하게 Nozaki 및 동료들은 또한 C3a 및 C5a에 대한 수용체의 유전적 제거는 레이저 손상 후 VEGF 발현 및 CNV 형성을 감소시키고, C3a 또는 C5a의 항체-매개된 중화 및 그들의 수용체의 약학적 차단이 또한 CNV를 감소시킨다는 것을 나타냈다. 선행 연구는 백혈구, 및 특히 대식 세포의 집합이 레이저-유발된 CNV에서 중심 역할을 한다는 것을 입증하였다 (Sakurai et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44:3578-85, 2003; Espinosa-Heidmann, et al., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44:3586-92, 2003). 그들의 2006년 논문에서, Nozaki 및 동료들은 백혈구 집합이 레이저 손상 후 C3aR(-/-) 및 C5aR(-/-) 마우스에서 뚜렷하게 감소된다는 것을 보고한다.

[0251] 따라서 본 발명의 양태는 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 이러한 질병 또는 다른 보체-매개된 안과학 질병으로 고통받는 대상체에 투여함으로써, 나이-관련 황반 변성 또는 다른 보체 매개된 안과학 질병을 치료하기 위해 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제 조성물은 예를 들어, 세척 또는 겔, 연고 또는 방울의 형태의 조성물의 적용에 의해 국부적으로 눈에 투여될 수도 있다. 대안으로는, MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 비-펩티드성 약제에 대하여 잠재적으로 경구 투여에 의해 투여될 수도 있다. MASP-2 억제제 조성물은 하나 이상의 추가적 치료제, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2004-0072809-A1에 설명된 것들과 조합될 수도 있다. 투여는 질병이 해결되었거나 조절될 때까지 의사의 결정에 따라 반복될 수도 있다.

[0252] 또 다른 양태에서, 본 발명은 녹내장으로 고통받거나 결막 위험이 있는 대상체를 치료하기 위해 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 방법을 제공한다. 조절되지 않은 보체 활성화가 녹내장에서 망막 신경절 세포 (RGCs), 그것들의 시냅스 및 축삭돌기에 대한 퇴행성 손상의 진행에 기여한다는 것을 나타냈다. Tezel G. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 51:5071-5082 (2010)를 참고하면 된다. 예를 들어, 사람 조직의 조직병리학 연구 및 다른 동물 모델을 사용하는 생체 내 연구는 C1q 및 C3을 포함하는 보체 성분이 합성되고 말단 상보성 복합체가 녹내장성 망막에서 형성된다는 것을 입증하였다 (Stasi K. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 47:1024-1029 (2006), Kuehn M.H. et al., Exp Eye Res 83:620-628 (2006)을 참고하면 된다). Tezel G. et al.에 설명된 바와 같이, 고전적 경로 이외에, 렉틴 경로는 녹내장성 신경 퇴화 중에 보체 활성화에 수반될 가능성이 높고, 그로 인해 부수적인 세포 용해, 염증 및 자가면역에 의한 신경 퇴화 손상의 진행을 가능하게 한다. Tezel G. et al.에 설명된 바와 같이, 녹내장에 걸리거나 걸리지 않은 기증자로부터 얻은 사람 망막 샘플의 단백질체 분석은 여러 보체 성분의 발현 및 차등 조절을 검출하였다. 특히, 렉틴 경로로부터 보체 성분의 발현 수준은 대조군 외에 MASP-1 및 MASP-2, 및 C-타입 렉틴을 포함하는, 녹내장성 샘플에서 더 높거나, 이에서만 검출된다. Kuehn M.H. et al., Experimental Eye Research 87:89-95 (2008)에 추가로 설명된 바와 같이, 보체 합성 및 침

작은 망막 I/R에 의해 유발되고 보체 캐스케이드의 붕괴는 RGC 퇴화를 지연시킨다. 본 연구에서, 마우스는 보체 성분 C3의 표적화된 붕괴를 가지고 있는 마우스는 정상 동물과 비교할 때 일시적인 망막 I/R 후 지연된 RGC 퇴화를 나타내는 것으로 발견되었다.

[0253] 이들 연구의 발견은 녹내장성 스트레스 질병 하에 보체 활성화 및 고유의 조절 사이의 생리학적 균형의 변화가 신경 퇴화성 손상의 진행에 대한 중요한 영향을 가질 수도 있고, 보체 활성화의 억제, 예를 들어, 항-MASP-2 항체의 투여를 통해, 녹내장 환자에 대한 치료로서 사용될 수 있다.

[0254] 따라서 본 발명의 양태는 약학적 담체 중에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 녹내장으로 고통받는 대상체에 투여함으로써, 녹내장을 치료하기 위해 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 단계를 제공한다. MASP-2 억제 조성물은 예를 들어, 세척 또는 겔, 연고 또는 방울의 형태의 조성물의 적용에 의해 국부적으로 눈에 투여될 수도 있다. 대안으로는, MASP-2 억제제는 대상체에 전신에, 예를 들어, 동맥 내, 정맥 내, 근육 내, 흡입, 코, 피하 또는 다른 비경구 투여에 의해, 또는 비-펩티드성 약제에 대하여 잠재적으로 경구 투여에 의해 투여될 수도 있다. 투여는 질병이 해결되었거나 조절될 때까지 의사의 결정에 따라 반복될 수도 있다.

[0255] IV. MASP-2 억제제

[0256] 한 양태에서, 본 발명은 MASP-2-의존적 보체 활성화의 부작용을 억제하는 방법을 제공한다. MASP-2 억제제는 살아있는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는 유효량으로 투여된다. 본 발명의 이 양태의 실행에서, 대표적인 MASP-2 억제제 분자는 MASP-2의 생물학적 활성을 억제하는 분자 (예를 들어, 저 분자 억제제, 항-MASP-2 항체 또는 MASP-2와 상호작용하거나 단백질-단백질 상호작용을 방해하는 차단 펩티드), 및 MASP-2의 발현을 감소시키는 분자 (예를 들어, MASP-2 안티센스 핵산 분자, MASP-2 특이적 RNAi 분자 및 MASP-2 리보자임)를 포함하고, 그로 인해 렉틴 보체 경로의 활성화로부터 MASP-2를 방지한다. MASP-2 억제제는 다른 의학적 치료의 치료적 이익을 향상시키기 위해 주요 치료로서 단독으로 또는 보조 치료로서 다른 치료제와 조합으로 사용될 수 있다.

[0257] MASP-2-의존적 보체 활성화의 억제는 본 발명의 방법에 따르는 MASP-2 억제제의 투여의 결과로서 발생하는 보체 시스템의 성분의 다음 변화 중 적어도 하나를 특징으로 한다: MASP-2-의존적 보체 활성화 시스템 생성물 C4b, C3a, C5a 및/또는 C5b-9 (MAC)의 발생 또는 생성의 억제 (예를 들어, 실시예 2에 설명된 바와 같이 측정됨), 미감작된 (unsensitized) 토끼 또는 기니 피그 적혈구를 사용하는 용혈성 검정에서 평가된 보체 활성화의 감소 (예를 들어, 실시예 33에 설명된 바와 같이 측정됨), C4 절단 및 C4b 침착의 감소 (예를 들어, 실시예 2에 설명된 바와 같이 측정됨), C3 절단 및 C3b 침착의 감소 (예를 들어, 실시예 2에 설명된 바와 같이 측정됨).

[0258] 본 발명에 따라, MASP-2-의존적 보체 활성화 시스템을 억제하는데 있어서 효과적인 MASP-2 억제제가 이용된다. 본 발명의 이 양태의 실행에 유용한 MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체 및 이들의 단편, MASP-2 억제 펩티드, 저 분자, MASP-2 가용성 수용체 및 발현 억제제를 포함한다. MASP-2 억제제는 MASP-2의 생물학적 기능을 차단함으로써 MASP-2-의존적 보체 활성화 시스템을 억제할 수도 있다. 예를 들어, 억제제는 MASP-2 단백질-대-단백질 상호작용을 효과적으로 차단하거나, MASP-2 다이머화 또는 조립을 방해하거나, Ca^{2+} 결합을 차단하거나, MASP-2 세린 프로테아제 활성 부위를 방해하거나, MASP-2 단백질 발현을 감소시킬 수도 있다.

[0259] 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2 보체 활성화를 선택적으로 억제하며, C1q-의존적 보체 활성화 시스템을 기능적으로 온전하게 유지한다.

[0260] 한 구체예에서, 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 보체 시스템의 다른 항원보다 적어도 10배 더 큰 친화도를 갖는 SEQ ID NO: 6을 포함하는 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는 특이적 MASP-2 억제제이다. 또 다른 구체예에서, MASP-2 억제제는 보체 시스템의 다른 항원보다 적어도 100배 더 큰 결합 친화도를 갖는 SEQ ID NO: 6을 포함하는 폴리펩티드에 특이적으로 결합한다. MASP-2 억제제의 결합 친화도는 적합한 결합 검정을 사용하여 결정될 수 있다.

[0261] MASP-2 폴리펩티드는 MASP-1, MASP-3, 및 C1r 및 C1s, C1 보체 시스템의 프로테아지와 유사한 분자 구조를 나타낸다. SEQ ID NO: 4에 설명된 cDNA 분자는 MASP-2 (SEQ ID NO: 5에 설명된 아미노산 서열로 구성됨)의 대표적인 예를 암호화하고 분비 후 분열되는 선도 서열 (aa 1-15)을 갖는 사람 MASP-2 폴리펩티드를 제공하며, 성숙한 형태의 사람 MASP-2 (SEQ ID NO: 6)를 발생시킨다. 도 2에 나타난 바와 같이, 사람 MASP2 유전자는 12개의 엑손을 포함한다. 사람 MASP-2 cDNA는 엑손 B, C, D, F, G, H, I, J, K 및 L에 의해 암호화된다. 대안의 스플라이스는 MBL-관련 단백질 19 ("MAP19", "sMAP"로도 불림)로 불리는 20 kDa 단백질을 발생시키며, 도 2에 나타난 바와 같이 엑손 B, C, D 및 E로부터 발생한 (SEQ ID NO: 1)에 의해 암호화된다. SEQ ID NO: 50에 설명된 cDNA 분

자는 쥐 MASP-2 (SEQ ID NO: 51에 설명된 아미노산 서열로 구성됨)를 암호화하고 분비 후 분열되는 선도 서열을 갖는 쥐 MASP-2 폴리펩티드를 제공하며, 성숙한 형태의 쥐 MASP-2 (SEQ ID NO: 52)를 발생시킨다. SEQ ID NO: 53에 설명된 cDNA 분자는 래트 MASP-2 (SEQ ID NO: 54에 설명된 아미노산 서열로 구성됨)를 암호화하고 분비 후 분열되는 선도 서열을 갖는 래트 MASP-2 폴리펩티드를 제공하며, 성숙한 형태의 래트 MASP-2 (SEQ ID NO: 55)를 발생시킨다.

[0262] 당업자는 SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 및 SEQ ID NO: 53에 개시된 서열이 각각 사람, 쥐 및 래트 MASP-2의 단일 대립유전자를 나타내고, 대립유전자 변이 및 대안의 스플라이싱이 발생하는 것이 예측된다는 것을 인식한다. 침묵 돌연변이를 함유하는 것들 및 돌연변이가 아미노산 서열 변화를 일으키는 것들을 포함하는, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 50 및 SEQ ID NO: 53에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 대립유전자 변종은 본 발명의 범위 내에 있다. MASP-2 서열의 대립유전자 변종은 표준 과정에 따라 다른 개체의 cDNA 또는 게놈 라이브러리에 의해 클로닝될 수 있다.

[0263] 사람 MASP-2 단백질 (SEQ ID NO: 6)의 도메인은 도 1 및 2a에 나타나고 N-말단 C1r/C1s/성게 Vegf/뿔 형태형성 단백질 (CUBI) 도메인 (SEQ ID NO: 6의 aa 1-121), 상피 성장 인자-유사 도메인 (aa 122-166), 두 번째 CUBI 도메인 (aa 167-293), 뿐만 아니라 보체 대조군 단백질 도메인 및 세린 프로테아제 도메인의 탠덤을 포함한다. MASP-2 유전자의 대체 스플라이싱은 도 1에 나타난 MASP19를 발생시킨다. MASP19는 도 1에 나타난 바와 같이 엑손 E로부터 유도된 네 개의 추가적인 잔기 (EQSL)를 갖는 MASP-2의 N-말단 CUBI-EGF 영역을 함유하는 비효소성 단백질이다.

[0264] 여러 단백질이 단백질-대-단백질 상호작용을 통해 MASP-2에 결합하거나 이와 상호작용하는 것으로 나타났다. 예를 들어, MASP-2는 렉틴 단백질 MBL, H-피콜린 및 L-피콜린에 결합하고, 이들로 Ca^{2+} 의존적 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 각각의 MASP-2/렉틴 복합체는 단백질 C4 및 C2의 MASP-2-의존적 절단을 통해 보체를 활성화하는 것으로 나타났다 (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). 연구는 MASP-2의 CUBI-EGF 도메인이 MBL과 MASP-2의 상호작용에 필수적이라는 것을 나타냈다 (Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068, 2001). 또한, CUBIEGFCUBII 도메인이 MASP-2의 다이머화를 매개하며, 이것은 활성화 MBL 복합체의 활성화에 필요하다는 것이 나타났다 (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000). 그러므로, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존적 보체 활성화에 대해 중요한 것으로 알려진 MASP-2 표적 영역에 결합하거나 이를 방해하는 것이 확인될 수 있다.

[0265] 항-MASP-2 항체

[0266] 본 발명의 이 양태의 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존적 보체 활성화 시스템을 억제하는 항-MASP-2 항체를 포함한다. 본 발명의 이 양태에 유용한 항-MASP-2 항체는 어떤 항체를 생산하는 포유동물로부터 유도된 다클론성, 단클론성 또는 재조합 항체도 포함하고 다중특이적, 키메라, 사람화된, 항-이디오타입, 및 항체 단편일 수도 있다. 항체 단편은 여기에 추가로 설명된 바와 같이 Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, Fv 단편, scFv 단편 및 단일-사슬 항체를 포함한다.

[0267] 여러 항-MASP-2 항체는 문헌에서 설명되었으며, 이것들 중 일부는 하기 표 1에 나열된다. 이들 이전에 설명된 항-MASP-2 항체는 여기에 설명된 검정을 사용하여 MASP-2-의존적 보체 활성화 시스템을 억제하는 능력에 대하여 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, 항 래트 MASP-2 Fab2 항체는 여기에 실시예 10 및 11에 더 상세히 설명된 바와 같이 MASP-2 의존적 보체 활성화를 차단하는 것으로 확인되었다. 항-MASP-2 항체가 MASP-2 억제제로서 기능하는 것이 확인되는 경우, 그것은 하기 추가로 설명된 바와 같이 항-이디오타입 항체를 생산하기 위해 사용되고 다른 MASP-2 결합 분자를 확인하기 위해 사용될 수 있다.

[0268] 표 1: 문헌의 MASP-2 특이적 항체

항원	항체 타입	참고문헌
제조합 MASP-2	래트 다클론성	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
제조합 사람 CCP1/2-SP 단편 (MoAb 8B5)	래트 MoAb (하위 등급 IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
제조합 사람 MAP19 (MoAb 6G12) (MASP-2 와 교차반응)	래트 MoAb (하위 등급 IgG1)	Moller-Kristensen, M., et al., <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
hMASP-2	Mouse MoAb (S/P) Mouse MoAb (N-말단)	Peterson, S.V., et al., <i>Mol. Immunol.</i> 35:409, April 1998
hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP 도메인)	래트 MoAb: Nimoab101, 히브리도마 세포주 03050904 (ECACC)에 의해 생산됨	WO 2004/106384
hMASP-2 (전체 길이-his 태깅됨)	쥐 MoAbs: NimoAb104, 히브리도마 세포주 M0545YM035 (DSMZ)에 의해 생산됨 NimoAb108, 히브리도마 세포주 M0545YM029 (DSMZ)에 의해 생산됨 NimoAb109 히브리도마 세포주 M0545YM046 (DSMZ)에 의해 생산됨 NimoAb110 히브리도마 세포주 M0545YM048 (DSMZ)에 의해 생산됨	WO 2004/106384

[0269] [0270] 감소된 효과기 기능을 갖는 항-MASP-2 항체

[0271] 본 발명의 이 양태의 일부 구체예에서, 항-MASP-2 항체는 고전적 보체 경로의 활성화로부터 발생할 수도 있는 염증을 감소시키기 위해 감소된 효과기 기능을 갖는다. IgG 분자의 고전적 보체 경로를 촉발시키는 능력은 분자의 Fc 부분 내에 있는 것으로 나타났다 (Duncan, A.R., et al., *Nature* 332:738-740 1988). 효소에 의한 절단에 의해 분자의 Fc 부분이 제거된 IgG 분자는 이 효과기 기능이 없다 (Harlow, 항체: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988을 참고하면 된다). 따라서, 감소된 효과기 기능을 가진 항체는 효과기 기능을 최소화하는, 유전적으로 조작된 Fc 서열을 갖거나, 사람 IgG₂ 또는 IgG₄ 이소타입에 의한 분자의 Fc 부분의 결핍의 결과로서 발생할 수 있다.

[0272] 감소된 효과기 기능을 가진 항체는 여기에서 실시예 9에 설명되고 또한 Jolliffe et al., *Int'l Rev. Immunol.* 10:241-250, 1993, 및 Rodrigues et al., *J. Immunol.* 151:6954-6961, 1998에 설명된 바와 같이 IgG 중쇄의 Fc 부분의 평균 분자 생물학적 조작에 의해 생산된다. 감소된 효과기 기능을 가진 항체는 또한 보체를 활성화하고 및/또는 Fc 수용체와 상호작용하는, 감소된 능력을 갖는 사람 IgG₂ 및 IgG₄ 이소타입을 포함한다 (Ravetch, J.V., et al., *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Isaacs, J.D., et al., *J. Immunol.* 148:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G., et al., *Immunol. Today* 14:215-221, 1993). IgG₂ 또는 IgG₄ 이소타입으로 구성된 사람 MASP-2에 특이적인 사람화된 또는 완전히 사람 항체는 Vaughan, T.J., et al., *Nature Biotechnical* 16:535-539, 1998에 설명된 바와 같이, 당업자에게 알려진 여러 방법 중 하나에 의해 생성될 수 있다.

[0273] 항-MASP-2 항체의 생산

[0274] 항-MASP-2 항체는 MASP-2 폴리펩티드 (예를 들어, 전체 길이 MASP-2)를 사용하여 또는 항원성 MASP-2 에피토프-함유 펩티드 (예를 들어, MASP-2 폴리펩티드의 일부)를 사용하여 생성될 수 있다. 면역원성 펩티드는 다섯 개의 아미노산 잔기 만큼 작을 수도 있다. 예를 들어, SEQ ID NO: 6의 전체 아미노산 서열을 포함하는 MASP-2 폴리펩티드는 본 발명의 방법에 유용한 항-MASP-2 항체를 유발하기 위해 사용될 수도 있다. 단백질-단백질 상호작용에 수반되는 것으로 알려진 특정 MASP-2 도메인, 예를 들어, CUBI, 및 CUBIEGF 도메인, 뿐만 아니라 세린-프로테아제 활성 부위를 포함하는 영역은 실시예 3에 설명된 바와 같이 제조합 폴리펩티드로서 발현되고 항원으로서 사용될 수도 있다. 또한, MASP-2 폴리펩티드 (SEQ ID NO: 6)의 적어도 6개의 아미노산 중 일부를 포함하는 펩티드는 또한 MASP-2 항체를 유발하기 위해 사용된다. MASP-2 항체를 유발하기 위해 유용한 MASP-2 유도된 항원의 추가적인 예는 하기 표 2에 제공된다. 실시예 5-7에 추가로 설명된 바와 같이, 항체를 발생시키기 위해 사용된 MASP-2 펩티드 및 폴리펩티드는 천연 폴리펩티드, 또는 제조합 또는 합성 펩티드 및 촉매 반응에 의한 불활성 제조합 폴리펩티드, 예를 들어, MASP-2A로서 분리될 수도 있다. 본 발명의 이 양태의 일부 구체예에서, 항-

MASP-2 항체는 실시예 8 및 9에 설명되고 하기 추가로 설명된 바와 같이 형질전환 마우스 균주를 사용하여 얻어진다.

[0275] 항-MASP-2 항체를 생산하는데 유용한 항원은 또한 융합 폴리펩티드, 예를 들어, 면역글로불린 폴리펩티드 또는 말토스-결합 단백질과 MASP-2 또는 이들의 일부의 융합을 포함한다. 폴리펩티드 면역원은 전체 길이 분자 또는 이들의 일부일 수도 있다. 폴리펩티드 일부가 합텐-유사한 경우, 이러한 부분은 면역화를 위해 유리하게 거대분자 담체 (예를 들어, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 소 혈청 알부민 (BSA) 또는 테타누스 독소)와 연결되거나 이에 결합될 수도 있다.

[0276] 표 2: MASP-2 유도 항원

SEQ ID NO:	아미노산 서열
SEQ ID NO:6	사람 MASP-2 단백질
SEQ ID NO:51	쥐 MASP-2 단백질
SEQ ID NO:8	사람 MASP-2의 CUBI 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	사람 MASP-2의 CUBIEGF 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	사람 MASP-2의 CUBIEGFCUBII 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	사람 MASP-2의 EGF 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 122-166)
SEQ ID NO:12	세린-프로테아제 도메인 of 사람 MASP-2 (SEQ ID NO:6의 aa 429-671)
SEQ ID NO:13 GKDSRCRGDAGGALVFL	세린-프로테아제 불활성화된 돌연변이 형태 (돌연변이된 Ser 618을 갖는 SEQ ID NO:6의 aa 610-625)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	사람 CUBI 펩티드
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYD FVKLSSGAKVLATLCGQ	사람 CUBI 펩티드
SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	사람 CUBI 도메인의 MBL 결합 영역
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFDTGF	사람 CUBI 도메인의 MBL 결합 영역
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	EGF 펩티드

[0277]

[0278] 다클론성 항체

[0279] MASP-2에 대한 다클론성 항체는 당업자에게 잘 알려진 방법을 사용하여 MASP-2 폴리펩티드 또는 이들의 면역원성 부분으로 동물을 면역화함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, Green et al., "Production of 다클론성 Anti 혈청," in Immunochemical Protocols (Manson, ed.), page 105, 및 실시예 6에 추가로 설명된 것들을 참고하면 된다. MASP-2 폴리펩티드의 면역원성은 무기물 겔, 예를 들어, 알루미늄 히드록시드 또는 프로인트 보조제 (Freund's adjuvant) (완전 또는 불완전), 표면 활성 물질, 예를 들어, 리소테시틴, 플루론 폴리올, 다가음이온, 유성 에멀전, 키홀 림펫 헤모시아닌 및 디니트로페놀을 포함하는, 보조제의 사용을 통해 증가될 수 있다. 다클론성 항체는 전형적으로 말, 소, 개, 닭, 래트, 마우스, 토끼, 기니 피그, 염소, 또는 양과 같은 동물에서 발생된다. 대안으로는, 본 발명에서 유용한 항-MASP-2 항체는 또한 인간 이하의 영장류로부터 유도될 수도 있다. 비비에서 진단적으로 및 치료적으로 유용한 항체를 발생시키는 일반적인 기술이 예를 들어, Goldenberg et al., 국제 특허 공개 번호 WO 91/11465, 및 Losman, M.J., et al., Int. J. Cancer 46:310, 1990에서 발견될 수도 있다. 면역학적으로 활성인 항체를 함유하는 혈청은 업계에 잘 알려진 표준 과정을 사용하여 이러한 면역화된 동물의 혈액으로부터 생산된다.

[0280] 단클론성 항체

[0281] 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 단클론성 항체이다. 항-MASP-2 단클론성 항체는 매우 특이적이며, 단일 MASP-2 에피토프에 관련된다. 여기에 사용된 바와 같이, 수식어 "단클론성"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 얻어지는 것으로 항체의 특징으로 나타내고 어떤 특정 방법에 의해서도 항체의 생산을 필요로 하는 것으로 생각되어서는 안 된다. 단클론성 항체는 배양에서 지속적인 세포주에 의해, 예를 들어, Kohler, G., et al., Nature 256:495, 1975에 의해 설명된 히브리도마 방법에 의해 항체 분자의 생산을 위해 제공되는 어떤

기술을 사용해서도 얻어질 수 있거나, 그것들은 제조할 DNA 방법에 의해서 만들어질 수도 있다 (예를 들어, Cabilly에 대하여 미국 특허 번호 4,816,567을 참고하면 된다). 단클론성 항체는 또한 Clackson, T., et al., Nature 352:624-628, 1991, 및 Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991에 설명된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 분리될 수도 있다. 이러한 항체는 IgG, IgM, IgE, IgA, IgD 및 이들의 하위 등급을 포함하는 어떤 면역글로불린 등급일 수도 있다.

[0282] 예를 들어, 단클론성 항체는 MASP-2 폴리펩티드 또는 이들의 일부를 포함하는 조성물로 적합한 포유동물 (예를 들어, BALB/c 마우스)를 주사함으로써 얻어질 수 있다. 미리 결정된 기간 후에, 지라세포는 마우스로부터 제거되고 세포 배양 배지에 현탁된다. 지라세포는 불멸 세포주와 융합되어 히브리도마를 형성한다. 형성된 히브리도마는 세포 배양액에서 배양되고 MASP-2에 대한 단클론성 항체를 생성하는 그것들의 능력에 대하여 스크리닝된다. 항-MASP-2 단클론성 항체의 생산을 추가로 설명하는 예는 실시예 7에 제공된다 (또한 Current Protocols in Immunology, Vol. 1., John Wiley & Sons, page 2.5.1-2.6.7, 1991을 참고하면 된다).

[0283] 사람 단클론성 항체는 항원성 도전에 반응하는 특이적 사람 항체를 생산하기 위해 조작된 형질전환 마우스의 사용을 통해 얻어질 수도 있다. 이 기술에서, 사람 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 위치의 요소는 내인성 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 위치의 표적화된 붕괴를 함유하는 배아 줄기 세포주로부터 유도된 마우스의 균주로 도입된다. 형질전환 마우스는 사람 항원, 예를 들어, 여기에 설명된 MASP-2 항원에 대하여 특이적인 사람 항체를 합성할 수 있고, 마우스는 실시예 7에 추가로 설명된 통상적인 켈러-밀스타인 (Kohler-Milstein) 기술을 사용하여 이러한 동물의 B-세포를 적합한 골수종 세포주에 융합함으로써 사람 MASP-2 항체를 분리하는 히브리도마를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 사람 면역글로불린 게놈을 가진 형질전환 마우스는 상업적으로 이용 가능하다 (예를 들어, Abgenix, Inc., Fremont, CA, 및 Medarex, Inc., Annandale, N.J.). 예를 들어, Green, L.L., et al., Nature Genet. 7:13, 1994; Lonberg, N., et al., Nature 368:856, 1994; 및 Taylor, L.D., et al., Int. Immun. 6:579, 1994에 의해 형질전환 마우스로부터 사람 항체를 얻는 방법이 설명된다.

[0284] 단클론성 항체는 다양한 잘 확립된 기술에 의해 히브리도마 배양으로부터 분리되고 정제될 수 있다. 이러한 분리 기술은 단백질 A- 세파로스로 친화도 크로마토그래피, 크기-배제 크로마토그래피, 및 이온-교환 크로마토그래피를 포함한다 (예를 들어, page 2.7.1-2.7.12 및 page 2.9.1-2.9.3의 Coligan; Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in Methods in Molecular Biology, The Humana Press, Inc., Vol. 10, page 79-104, 1992를 참고하면 된다).

[0285] 생산되면, 다클론성, 단클론성 또는 파지-유도된 항체는 먼저 특이적 MASP-2 결합에 대하여 테스트된다. 당업자에게 알려진 다양한 검정은 MASP-2에 특이적으로 결합하는 항체를 검출하기 위해 이용될 수도 있다. 전형적인 검정은 웨스턴 블롯 또는 표준 방법에 의한 면역침강 분석법 (예를 들어, Ausubel et al.에 설명됨), 면역전기영동법, 효소-결합된 면역-흡착 검정, 점 블롯, 억제 또는 경쟁 검정 및 샌드위치 검정 (Harlow and Land에 설명됨, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)을 포함한다. 항체가 MASP-2에 특이적으로 결합하는 것이 확인되면, 항-MASP-2 항체는 여러 검정, 예를 들어, 렉틴-특이적 C4 절단 검정 (실시예 2에 설명됨), C3b 침착 검정 (실시예 2에 설명됨) 또는 C4b 침착 검정 (실시예 2에 설명됨) 중 하나에서 MASP-2 억제제로서 기능하는 능력에 대하여 테스트된다.

[0286] 항-MASP-2 단클론성 항체의 친화도는 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다 (예를 들어, Scatchard, A., NY Acad. Sci. 51:660-672, 1949를 참고하면 된다). 한 구제예에서, 본 발명의 방법에 유용한 항-MASP-2 단클론성 항체는 <100 nM, 바람직하게 <10 nM 및 가장 바람직하게 <2 nM의 결합 친화도로 MASP-2에 결합한다.

[0287] **키메라/사람화된 항체**

[0288] 본 발명의 방법에 유용한 단클론성 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가

[0289] 특정 종으로부터 유도되거나 특정 항체 등급 또는 하위 등급에 속하는 항체의 해당 서열과 동일하거나 이에 상동성인 한편, 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터 유도되거나 또 다른 항체 등급 또는 하위 등급에 속하는 항체, 뿐만 아니라 이러한 항체의 단편의 해당 서열과 동일하거나 이에 상동성이다 (Cailly에 대하여 미국 특허 번호 4,816,567; 및 Morrison, S.L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984).

[0290] 본 발명에 유용한 키메라 항체의 한 형태는 사람화된 단클론성 항-MASP-2 항체이다. 비-사람 (예를 들어, 쥐) 항체의 사람화된 형태는 키메라 항체이며, 이것은 비-사람 면역글로불린으로부터 유도된 최소 서열을 함유한다. 사람화된 단클론성 항체는 비-사람 (예를 들어, 마우스) 상보성 결정 영역 (CDR)을 마우스 면역글로불린의 가변 중쇄 및 가변 경쇄으로부터 사람 가변 도메인으로 이동시킴으로써 생산된다. 전형적으로, 사람 항체의 잔기는

비-사람 대응물의 프레임워크 영역에서 치환된다. 게다가, 사람화된 항체는 수령자 항체에서 또는 기증자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 개선하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 사람화된 항체는 적어도 하나, 및 전형적으로 두 개의 가변 도메인 중 실질적으로 모두를 포함하며, 초가변 루프 중 모두 또는 실질적으로 모두는 비-사람 면역글로불린의 것에 해당하고 Fv 프레임워크 영역의 모두 또는 실질적으로 모두는 사람 면역글로불린 서열의 그것이다. 사람화된 항체는 선택적으로 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 사람 면역글로불린의 그것을 포함할 것이다. 더 상세한 내용에 대하여, Jones, P.T., et al., Nature 321:522-525, 1986; Reichmann, L., et al., Nature 332:323-329, 1988; 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992를 참고하면 된다.

[0291] 본 발명에 유용한 사람화된 항체는 사람 단클론성 항체를 포함하며, 적어도 MASP-2 결합 CDR3 영역을 포함한다. 또한, Fc 부분은 IgA 또는 IgM, 뿐만 아니라 사람 IgG 항체를 생산하기 위해 대체될 수도 있다. 이러한 사람화된 항체는 그것들이 특이적으로 사람 MASP-2를 인식하지만 항체 자체에 대해서는 사람의 면역 반응을 일으키지 않기 때문에, 특정 임상적 유용성을 가질 것이다. 결론적으로, 그것들은 특히 반복 또는 장기간 투여가 필요할 때, 사람에서 생체 내 투여에 더 적합하다.

[0292] 쥐 항-MASP-2 단클론성 항체로부터 사람화된 항-MASP-2 항체의 발생의 예는 여기에서 실시예 6에 제공된다. 사람화된 단클론성 항체를 생산하는 기술은 또한, 예를 들어, Jones, P.T., et al., Nature 321:522, 1986; Carter, P., et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Smith, J.S., Crit. Rev. Biotech. 12:437, 1992; Singer, I.I., et al., J. Immun. 150:2844, 1993; Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols, 사람a Press, Inc., 1995; Kelley, "Engineering Therapeutic 항체," in 단백질 Engineering: Principles 및 Practice, Clei 및 et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., page 399-434, 1996; 및 Queen에 대하여 미국 특허 번호 5,693,762, to Queen, 1997에 의해 설명된다. 또한, 특이적 쥐 항체 영역으로부터 사람화된 항체를 합성하는 상업적 실체물, 예를 들어, 단백질 Design Labs (Mountain View, CA)가 있다.

[0293] 제조항 항체

[0294] 항-MASP-2 항체는 또한 제조항 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 예를 들어, 사람 항체는 사람 항체의 단편 (V_H , V_L , Fv, Fd, Fab 또는 $F(ab')_2$)을 생성하기 위해 사람 면역글로불린 발현 라이브러리 (예를 들어, Stratagene, Corp., La Jolla, CA에서 이용 가능)를 사용하여 만들어질 수 있다. 이들 단편은 키메라 항체를 생성하는 것과 유사한 기술을 사용하여 전체 사람 항체를 구성하기 위해 사용된다.

[0295] 항-이디오타입 항체

[0296] 항-MASP-2 항체가 원하는 억제 활성을 갖는 것으로 확인되면, 이들 항체는 업계에 잘 알려진 기술을 사용하여 MASP-2의 일부와 유사한 항-이디오타입 항체를 발생하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, Greenspan, N.S., et al., FASEB J. 7:437, 1993을 참고하면 된다. 예를 들어, MASP-2에 결합하고 보체 활성화에 필요한 MASP-2 단백질 상호작용을 완전히 억제하는 항체는 MASP-2 단백질 상의 MBL 결합 부위와 유사하고 그러므로 MASP-2의 리간드, 예를 들어, MBL과 결합하고 이를 중화하는 항-이디오타입 항체를 발생하기 위해 사용될 수 있다.

[0297] 면역글로불린 단편

[0298] 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제제는 온전한 면역글로불린 분자, 뿐만 아니라 Fab, Fab', $F(ab)_2$, $F(ab')_2$ 및 Fv 단편, scFv 단편, 이중체, 선형 항체, 단일-사슬 항체 분자 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하는, 잘 알려진 단편도 포함한다.

[0299] 항체 분자의 작은 부분인, 파라토프만이 항체의, 그것의 에피토프에 결합에 수반된다는 것은 업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, Clark, W.R., The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986을 참고하면 된다). 항체의 pFc' 및 Fc 영역은 고전적 보체 경로의 효과기이지만, 항원 결합에 수반되지 않는다. pFc' 영역이 효소에 의해 분열되거나, pFc' 영역 없이 생성된 항체는 $F(ab')_2$ 단편으로 지정되고 온전한 항체의 항원 결합 부위 둘 다를 유지한다. 분리된 $F(ab')_2$ 단편은 그것의 두 개의 항원 결합 부위 때문에 이가 단클론성 단편으로 나타난다. 유사하게, Fc 영역이 효소에 의해 분열되거나, Fc 영역 없이 생성된 항체는 Fab 단편으로 지정되고, 온전한 항체 분자의 항원 결합 부위를 유지한다.

[0300] 항체 단편은 단백질 가수분해에 의해, 예를 들어, 통상적인 방법에 의한 전체 항체의 펩신 또는 파파인 분해에 의해 얻어질 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 $F(ab')_2$ 로 표시된 5S 단편을 제공하기 위해 효소에 의한 펩신을

가진 항체의 절단에 의해 생성될 수 있다. 이 단편은 3.5S Fab' 1가 단편을 생산하기 위해 티올 환원제를 사용하여 추가로 분열될 수 있다. 선택적으로, 절단 반응은 이황화 결합의 절단으로부터 발생하는, 술폰화된 기에 대한 차단 기를 사용하여 수행될 수 있다. 대안으로서, 펩신을 사용하는 효소에 의한 절단은 두 개의 1가 Fab 단편 및 Fc 단편을 직접 생성한다. 이 방법은, 예를 들어, Goldenberg에 대한 미국 특허 번호 4,331,647; Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman, et al., in Methods in Enzymology 1:422, Academic Press, 1967; 및 page 2.8.1-2.8.10 및 2.10.-2.10.4.의 Coligan에 의해 설명된다.

[0301] 일부 구체예에서, Fc 영역이 없는 항체 단편의 사용이 Fc γ 수용체에 Fc의 결합시 개시되는 고전적 보체 경로의 활성화를 막기 위해 바람직하다. Fc γ 수용체 상호작용을 막는 MoAb를 생산할 수 있는, 여러 방법이 있다. 예를 들어, 단클론성 항체의 Fc 영역이 단백질 가수분해 효소에 의한 부분적인 분해 (예를 들어, 피신 분해)를 사용하여 화학적으로 제거되고, 그로 인해, 예를 들어, 항원-결합 항체 단편, 예를 들어, Fab 또는 F(ab)₂ 단편을 발생시킬 수 있다 (Mariani, M., et al., Mol. Immunol. 28:69-71, 1991). 대안으로는, Fc γ 수용체에 결합하지 않는, 사람 γ 4 IgG 이소타입은 여기에 설명된 바와 같이 사람화된 항체의 구성 중에 사용될 수 있다. 항체, 단일 사슬 항체 및 Fc 도메인이 없는 항원-결합 도메인은 또한 여기에 설명된 재조합 기술을 사용하여 조작될 수 있다.

[0302] **단일-사슬 항체 단편**

[0303] 대안으로는, 하나는 중쇄 및 경쇄 Fv 영역 이 연결되는, MASP-2에 특이적인 단일 펩티드 사슬 결합 분자를 생성할 수 있다. Fv 단편은 펩티드 결합자에 의해 연결되어 단일-사슬 항원 결합 단백질 (scFv)를 형성할 수도 있다. 이들 단일-사슬 항원 결합 단백질은 올리고뉴클레오타이드에 의해 연결된 V_H 및 V_L 도메인을 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 구조 유전자를 구성함으로써 제조된다. 구조 유전자는 발현 벡터에 삽입되며, 이것은 이후에 이. 콜리와 같은, 숙주 세포에 도입된다. 재조합 숙주 세포는 두 개의 V 도메인을 연결하는 결합자 펩티드와 단일 폴리펩티드 사슬을 합성한다. scFv를 생성하는 방법은 예를 들어, Whitlow, et al., "Methods: A Companion to Methods in Enzymology" 2:97, 1991; Bird, et al., Science 242:423, 1988; Ladner에 대하여 미국 특허 번호 4,946,778; Pack, P., et al., Bio/Technology 11:1271, 1993에 의해 설명된다.

[0304] 구체적인 예로서, MASP-2 특이적 scFv는 림프구를 시험관 내에서 MASP-2 폴리펩티드에 노출시키고 파지 또는 유사한 벡터의 항체 디스플레이 라이브러리를 선택함으로써 (예를 들어, 고정되거나 표지된 MASP-2 단백질 또는 펩티드의 사용을 통해) 얻어질 수 있다. 잠재적 MASP-2 폴리펩티드 결합 도메인을 가진, 폴리펩티드를 암호화하는 유전자는 파지 또는 이. 콜리와 같은 박테리아에 나타난 무작위의 펩티드 라이브러리를 스크리닝함으로써 얻어질 수 있다. 이들 무작위의 펩티드는 MASP-2와 상호작용하는 펩티드에 대한 스크리닝에 사용될 수 있다. 이러한 무작위의 펩티드 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하는 기술은 업계에 잘 알려져 있고 (Lardner에 대하여 미국 특허 번호 5,223,409; Lardner에 대하여 미국 특허 번호 4,946,778; Lardner에 대하여 미국 특허 번호 5,403,484; Lardner에 대하여 미국 특허 번호 5,571,698; 및 Kay et al., Phage Display of 펩티드s 및 단백질s Academic Press, Inc., 1996) 무작위의 펩티드 디스플레이 라이브러리 및 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 키트가 예를 들어, CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New Engl 및 Biolabs, Inc. (Beverly, Mass.), 및 Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.)에서 상업적으로 이용 가능하다.

[0305] 본 발명의 양태에 유용한 항-MASP-2 항체 단편의 또 다른 형태는 MASP-2 항원 상의 에피토프에 결합하는 단일 상보성 결정 영역에 대하여 암호화하는 펩티드이고 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제한다. CDR 펩티드 ("최소 인식 단위")는 원하는 항체의 CDR을 암호화하는 구조 유전자에 의해 얻어질 수 있다. 이러한 유전자는 예를 들어, 폴리머라제 중합 반응을 사용하여 항체 생산 세포의 RNA의 가변 영역을 합성함으로써 제조된다 (예를 들어, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, 1991; Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of 단클론성 항체," in 단클론성 항체: Production, Engineering 및 Clinical Application, Ritter et al. (eds.), page 166, Cambridge University Press, 1995; 및 Ward et al., "Genetic Manipulation 및 Expression of 항체," in 단클론성 항체: Principles 및 Applications, Birch et al. (eds.), page 137, Wiley-Liss, Inc., 1995를 참고하면 된다).

[0306] 여기에 설명된 MASP-2 항체는 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하기 위해 이것이 필요한 대상체에 투여된다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 높은 -친화도 사람 또는 사람화된 단클론성 항-MASP-2 감소된 효과기 기능을

가진 항체이다.

[0307] **펩티드 억제제**

[0308] 본 발명의 이 양태의 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 분리된 MASP-2 펩티드 억제제를 포함하며, MASP-2-의존적 보체 활성화 시스템을 억제하는, 분리된 천연 펩티드 억제제 및 합성 펩티드 억제제를 포함한다. 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "분리된 MASP-2 펩티드 억제제"는 그것들의 의도된 사용을 위해 실용적이고 적절한 정도로 자연에서 발견될 수도 있는 다른 물질로부터 실질적으로 순수하고 본질적으로 자유로운 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하기 위해 액틴 경로에서 또 다른 인식 분자 (예를 들어, MBL, H-피콜린, M-피콜린, 또는 L-피콜린)와 결합하고 이와 결합에 대하여 MASP-2와 경쟁하고, MASP-2와 직접적으로 상호작용함으로써 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하는 펩티드를 나타낸다.

[0309] 펩티드 억제제는 단백질-단백질 상호작용 및 촉매 반응 부위를 방해하기 위해 성공적으로 생체 내에서 사용되었다. 예를 들어, 구조적으로 LFA-1에 관련된 부착 분자에 대한 펩티드 억제제는 최근에 응고장애에서 임상적 사용에 대하여 승인되었다 (Ohman, E.M., et al., European Heart J. 16:50-55, 1995). 짧은 선형 펩티드 (<30개의 아미노산)는 인테그린-의존적 부착을 방지하거나 방해하는 것으로 설명되었다 (Murayama, O., et al., J. Biochem. 120:445-51, 1996). 25 내지 200개의 아미노산 잔기의 길이의 범위에 있는 더 긴 펩티드는 또한 인테그린-의존적 부착을 성공적으로 차단하기 위해 사용되었다 (Zhang, L., et al., J. Biol. Chem. 271(47):29953-57, 1996). 일반적으로, 더 긴 펩티드 억제제는 짧은 펩티드보다 더 높은 친화도 및/또는 더 느린 오프-레이트 (off-rate)를 갖고 그러므로 더 강한 억제제일 수도 있다. 고리형 펩티드 억제제는 또한 사람 염증성 질환의 치료를 위해 생체 내 인테그린의 유효한 억제제인 것으로 나타났다 (Jackson, D.Y., et al., J. Med. Chem. 40:3359-68, 1997). 고리형 펩티드를 생산하는 한 방법은 펩티드의 말단 아미노산이 시스테인인 펩티드의 합성을 수반하고, 펩티드가 말단 아미노산 사이의 이황화 결합에 의해 고리형으로 존재하는 것을 허용하며, 이것은 조혈 신생물의 치료를 위해 생체 내에서 친화도 및 반감기를 개선하는 것으로 나타났다 (예를 들어, Larson에 대하여 미국 특허 번호 6,649,592).

[0310] **합성 MASP-2 펩티드 억제제**

[0311] 본 발명의 이 양태의 방법에 유용한 MASP-2 억제 펩티드는 MASP-2 기능에 중요한 표적 영역을 모방하는 아미노산 서열에 의해 예시된다. 본 발명의 방법의 실행시 유용한 억제 펩티드는 크기가 약 5개의 아미노산 내지 약 300개의 아미노산의 범위에 있다. 표 3은 본 발명의 이 양태의 실행시 유용할 수도 있는, 전형적인 억제 펩티드의 목록을 제공한다. 후보 MASP-2 억제 펩티드는, 예를 들어, 액틴 특이적 C4 절단 검정 (실시예 2에 설명됨), 및 C3b 침착 검정 (실시예 2에 설명됨)을 포함하는, 여러 검정 중 하나에서 MASP-2 억제제로서 기능 하는 능력에 대하여 테스트 될 수도 있다.

[0312] 일부 구체예에서, MASP-2 억제 펩티드는 MASP-2 폴리펩티드로부터 유도되고 전체 길이 성숙한 MASP-2 단백질 (SEQ ID NO: 6), 또는 MASP-2 단백질의 특정 도메인, 예를 들어, CUBI 도메인 (SEQ ID NO: 8), CUBIEGF 도메인 (SEQ ID NO: 9), EGF 도메인 (SEQ ID NO: 11), 및 세린 프로테아제 도메인 (SEQ ID NO: 12)으로부터 선택된다. 이전에 설명된 바와 같이, CUBEGFCUBII 영역은 다이머화 및 MBL과 결합에 필요한 것으로 나타났다 (Thielens et al., 상기). 특히, MASP-2의 CUBI 도메인의 펩티드 서열 TFRSDYN (SEQ ID NO: 16)은 Asp105 내지 Gly105에서 동형 접합성 돌연변이를 갖고 있는 사람을 확인한 연구에서 MBL에 결합시 수반되며, MBL 복합체로부터 MASP-2의 손실을 일으키는 것으로 나타났다 (Stengaard-Pedersen, K., et al., New Engl J. Med. 349:554-560, 2003).

[0313] 일부 구체예에서, MASP-2 억제 펩티드는 MASP-2에 결합하고 액틴 보체 경로에 수반되는 액틴 단백질로부터 유도된다. 여러 다른 액틴은 이 경로에 수반되는 것으로 확인되며, 만난-결합 액틴 (MBL), L-피콜린, M-피콜린 및 H-피콜린을 포함한다 (Ikeda, K., et al., J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., et al., J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). 이들 액틴은 동형 삼량체 서브유닛의 올리고머로서 혈청에 존재하며, 각각은 탄수화물 인식 도메인을 갖는 N-말단 콜라겐-유사 섬유를 가진다. 이들 다른 액틴은 MASP-2에 결합하는 것으로 나타났고, 액틴/MASP-2 복합체는 단백질 C4 및 C2의 절단을 통해 보체를 활성화한다. H-피콜린은 24개의 아미노산의 아미노-말단 영역, 11번 Gly-Xaa-Yaa가 반복되는 콜라겐-유사 도메인, 12개의 아미노산의 넥 도메인 (neck domain), 및 207개의 아미노산의 피브리노겐-유사 도메인을 갖는다 (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 168:3502-3506, 2002). H-피콜린은 GlcNAc에 결합하고 에스. 티피뮤리움 (S. typhimurium), 에스. 미네소타 (S. minnesota) 및 이. 콜리로부터 유도된 LPS로 코팅된 사람 적혈구를 접합시킨다. H-피콜린은 MASP-2 및 MASP-19와 관련된 것으로 나타났고 액틴 경로를 활성화한다. 이와 같이, L-피콜린/P35는 또한 GlcNAc에 결합하고 사람 혈청에서 MASP-2 및 MASP-19와 관련된 것으로 나

타났고 이 복합체는 렉틴 경로를 활성화하는 것으로 나타났다 (Matsushita, M., et al., J. Immunol. 164:2281, 2000). 따라서, 본 발명에 유용한 MASP-2 억제 펩티드는 MBL 단백질 (SEQ ID NO: 21), H-피콜린 단백질 (Genbank 수납 번호 NM_173452), M-피콜린 단백질 (Genbank 수납 번호 000602) 및 L-피콜린 단백질 (Genbank 수납 번호 NM_015838)로부터 선택된 적어도 5개의 아미노산의 영역을 포함할 수도 있다.

[0314] 더 특이적으로, 과학자는 MBL 상의 MASP-2 결합 부위가 MBP의 콜라겐-유사 도메인의 C-말단 부분에서 힌지 (hinge) 및 넥 사이에 놓여있는 12개의 Gly-X-Y 3염기 "GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS" (SEQ ID NO: 26) 내에 있는 것으로 확인하였다 (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004). 이 MASP-2 결합 부위 영역은 또한 사람 H-피콜린 및 사람 L-피콜린에서 잘 보존된다. 공통 결합 부위는 문자 "O"가 히드록시프롤린을 나타내고 문자 "X"가 소수성 잔기를 나타내는 경우 아미노산 서열 "OGK-X-GP" (SEQ ID NO: 22)을 포함하는 세 개의 렉틴 단백질 모두에 존재하는 것으로 설명되었다 (Wallis et al., 2004, 상기). 따라서, 일부 구체예에서, 본 발명의 양태에 유용한 MASP-2 억제 펩티드는 길이가 적어도 6 개의 아미노산이고 SEQ ID NO: 22를 포함한다. 아미노산 서열 "GLR GLQ GPO GKL GPO G" (SEQ ID NO: 24)를 포함하는 MBL로부터 유도된 펩티드는 시험관 내에서 MASP-2에 결합하는 것으로 나타났다 (Wallis, et al., 2004, 상기). MASP-2에 결합을 향상시키기 위해, 각 말단 ("GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O" SEQ ID NO: 25)에서 두 개의 GPO 3 염기에 의해 플랭킹된 (flanked) 펩티드가 합성되어 원래의 MBL 단백질에서 발견된 삼중 나선의 형성을 향상시킬 수 있다 (Wallis, R., et al., J. Biol. Chem. 279:14065, 2004에서 추가로 설명됨).

[0315] MASP-2 억제 펩티드는 또한 H-피콜린의 공통 MASP-2 결합 영역의 서열 "GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO" (SEQ ID NO: 27)을 포함하는 사람 H-피콜린으로부터 유도될 수도 있다. 또한 L-피콜린의 공통 MASP-2 결합 영역의 서열 "GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO" (SEQ ID NO: 28)를 포함하는 사람 L-피콜린으로부터 유도된 펩티드가 포함된다.

[0316] MASP-2 억제 펩티드는 또한 항트롬빈 III의 C-말단 부분에 결합된 C4 절단 부위인, "LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI" (SEQ ID NO: 29)와 같은 C4 절단 부위로부터 유도될 수도 있다 (Glover, G.I., et al., Mol. Immunol. 25:1261 (1988)).

[0317] 표 3: 전형적인 MASP-2 억제 펩티드

SEQ ID NO	공급원
SEQ ID NO:6	사람 MASP-2 단백질
SEQ ID NO:8	MASP-2의 CUBI 도메인 (aa 1-121 of SEQ ID NO:6)
SEQ ID NO:9	MASP-2의 CUBIEGF 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	MASP-2의 CUBIEGFCUBI 도메인 (SEQ ID NO:6의 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	MASP-2 (aa 122-166)의 EGF 도메인
SEQ ID NO:12	MASP-2 (aa 429-671)의 세린-프로테아제 도메인
SEQ ID NO:16	MASP-2의 MBL 결합 영역
SEQ ID NO:3	사람 Map19
SEQ ID NO:21	사람 MBL 단백질
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, "O" = 히드록시프로린 및 "X"는 소수성 아미노산 잔기인 경우	사람 MBL 및 사람 피콜린의 합성 펩티드 공동 결합 부위
SEQ ID NO:23 OGKLG	사람 MBL 코어 결합 부위
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKLG GPO G	MASP-2에 결합하는 것으로 입증된 사람 MBP 3 염기 6-10-
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGKLGPOG GPOGPO	상중 나선의 형성을 향상시키기 위해 추가된 사람 MBP 3 염기
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTGKEKGEPGQGLRGL QGPOGKLGPOGNOGPGSGSGPK GQKGDGOGKS	사람 MBP 3 염기 1-17
SEQ ID NO:27 GAOGSGOGEKGAOGPQGGPOGPO GKMGPKGEOGDO	사람 H-피콜린 (Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLGGAOGDKGEAGTNGKRG ERGPQGGPOGKAGPOGPNGAOGE O	사람 L-피콜린 P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI	사람 C4 절단 부위

[0318]

[0319] 주: 문자 "O"는 히드록시프로린을 나타낸다. 문자 "X"는 소수성 잔기이다.

[0320] C4 절단 부위로부터 유도된 펩티드, 뿐만 아니라 MASP-2 세린 프로테아제 부위를 억제하는 다른 펩티드는 그것들이 비가역적 프로테아제 억제제가 되도록 화학적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 적절한 변형은 C-말단의, 또는 기능적 측쇄에 첨부된 할로메틸 케톤 (Br, Cl, I, F), Asp 또는 Glu; 아미노 기 또는 다른 기능적 측쇄의 할로아세틸 (또는 다른 α-할로아세틸) 기; 아미노 또는 카르복시 말단 또는 기능적 측쇄의 에폭시드 또는 이민-함유 기; 또는 아미노 또는 카르복시 말단 또는 기능적 측쇄의 이미네이트 에스테르를 포함하지만, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 변형은 펩티드의 공유 부착에 의해 효소를 영구히 억제하는 이점을 제공할 것이다. 이것은 펩티드 억제제의 더 적은 유효량 및/또는 덜 빈번하게 투여할 필요를 발생시킨다.

[0321] 상기 설명된 억제 펩티드 이외에, 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제 펩티드는 여기에 설명된 바와 같이 얻어진 항-MASP-2 MoAb의 MASP-2-결합 CDR3 영역을 함유하는 펩티드를 포함한다. 펩티드를 합성하는데 사용되는 CDR 영역의 서열은 업계에 알려진 방법에 의해 결정될 수도 있다. 중쇄 가변 영역은 일반적으로 길이가 100 내지 150개의 아미노산의 범위인 펩티드이다. 경쇄 가변 영역은 길이가 일반적으로 80 내지 130개의 아미노산의 범위인 펩티드이다. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 내 CDR 서열은 당업자에 의해 쉽게 배열될 수도 있는, 대략 3-25개의 아미노산 서열만을 포함한다.

[0322] 당업자는 상기 설명된 MASP-2 억제 펩티드의 실질적으로 상동성 변종이 또한 MASP-2 억제 활성을 나타낸다는 것을 인식할 것이다. 전형적인 변종은 대상체 펩티드의 카르복시-말단 또는 아미노-말단 부분 및 이들의 혼합물에서 삽입, 삭제, 대체, 및/또는 추가적인 아미노산을 갖는 펩티드를 포함하지만, 반드시 이에 제한되지 않는다. 따라서, MASP-2 억제 활성을 갖는 그들 상동성 펩티드는 본 발명의 방법에 유용한 것으로 생각된다. 설명된 펩

티드는 또한 모티프 (motif) 중복 및 보존적 치환된 다른 변형을 포함할 수도 있다. 보존적 변종은 여기에 다른 곳에서 설명되고, 유사 전하, 크기 또는 소수성 등의 서로에 대한 아미노산의 교환을 포함한다.

[0323] MASP-2 억제 펩티드는 온전한 단백질의 세그먼트와 더 가깝게 유사하기 위해 가용성을 증가시키고 및/또는 양전하 또는 음전하를 극대화하도록 변형될 수도 있다. 유도체는 유도체가 기능적으로 MASP-2 억제의 원하는 성질을 유지하는 동안 여기에 개시된 펩티드의 정확한 1차 아미노산 구조를 가질 수도 있거나 갖지 않을 수도 있다. 변형은 보통 알려진 20개의 아미노산 중 하나 또는 또 다른 아미노산, 보조적으로 바람직한 성질, 예를 들어, 효소에 의한 변성에 대한 저항성을 갖는, 유도되거나 치환된 아미노산 또는 D-아미노산으로 아미노산 치환 또는 또 다른 분자 또는 화합물, 예를 들어, 탄수화물로 치환을 포함할 수 있으며, 이것은 자연 구조 및 아미노산, 아미노산 또는 펩티드의 기능; 아미노산 삭제; 보통 알려진 20개의 아미노산 중 하나 또는 또 다른 아미노산, 보조적으로 바람직한 성질, 예를 들어, 효소에 의한 변성에 대한 저항성을 갖는, 유도되거나 치환된 아미노산 또는 D-아미노산으로 아미노산 삽입 또는 또 다른 분자 또는 화합물, 예를 들어, 탄수화물로 치환을 모방하고, 이것은 자연 구조 및 아미노산, 아미노산 또는 펩티드의 기능; 또는 또 다른 분자 또는 화합물, 예를 들어, 탄수화물 또는 핵산 모노머로 치환을 모방하고, 이것은 자연 구조, 전하 분포 및 모체 펩티드의 기능을 모방한다. 펩티드는 또한 아세틸화 또는 아미드화에 의해 변형될 수도 있다.

[0324] 유도체 억제 펩티드의 합성은 알려진 펩티드 생합성, 탄수화물 생합성 등의 기술에 의존할 수 있다. 시작점으로서, 당업자는 적합한 컴퓨터 프로그램에 의존하여 원하는 펩티드의 구조를 결정할 수도 있다. 여기에 개시된 펩티드의 구조가 알려지면, 당업자는 모체 펩티드의 염기성 구조 및 전하 분포를 유지하지만 모체 펩티드에 존재하지 않거나 모체 펩티드에서 발견된 것들보다 향상된 성질을 소유할 수도 있는 유도체를 만들기 위해 어떤 종류의 치환이 하나 이상의 부위에서 만들어질 수 있는지 합리적인 설계 방식으로 결정할 수 있다. 후보 유도체 분자가 확인되면, 유도체는 여기에 설명된 검정을 사용하여 그것들이 MASP-2 억제체로서 기능 하는지 결정하기 위해 테스트 될 수 있다.

[0325] **MASP-2 억제 펩티드에 대한 스크리닝**

[0326] 또한 분자 모델링 및 합리적인 분자 설계를 이용하여 MASP-2의 주요 결합 영역의 분자 구조를 모방하고 MASP-2의 보체 활성을 억제하는 펩티드를 발생시키고 이에 대하여 스크리닝할 수도 있다. 모델링에 사용된 분자 구조는 항-MASP-2 단클론성 항체의 CDR 영역, 뿐만 아니라 다이머화에 필요한 영역, MBL에 결합에 수반된 영역, 및 이전에 설명된 세린 프로테아제 활성 부위를 포함하는, MASP-2 기능에 중요한 것으로 알려진 표적 영역을 포함한다. 특정 표적에 결합하는 펩티드를 확인하는 방법이 업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 분자 각인은 특정 분자에 결합하는 펩티드와 같은 거대분자 구조의 데 노보 (de novo) 구조에 사용될 수도 있다. 예를 들어, Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding 및 Catalytic Sites," TRIP 2(5) 1994를 참고하면 된다.

[0327] 구체적인 예로서, MASP-2 결합 펩티드의 모방체를 제조하는 한 방법은 다음과 같다. 알려진 MASP-2 결합 펩티드의 기능적 모노머 또는 MASP-2 억제를 나타내는 항-MASP-2 항체의 결합 영역 (주형)이 폴리머화된다. 주형과 유사한 하나 이상의 원하는 성질을 나타내는 새로운 분자를 제공하기 위해, 주형이 제거된 후 이어서, 주형에 의해 남겨진 보이드 (void)의 이류의 모노머가 폴리머화된다. 이 방식으로 펩티드를 제조하는 것 이외에, 다당류, 뉴클레오시드, 약물, 핵단백질, 지질단백질, 탄수화물, 당단백질, 스테로이드, 지질 및 다른 생물학적 활성 물질과 같은, 다른 MASP-2 결합 분자가 또한 제조될 수 있다.

[0328] 이 방식으로 펩티드를 제조하는 것 이외에, 다당류, 뉴클레오시드, 약물, 핵단백질, 지질단백질, 탄수화물, 당단백질, 스테로이드, 지질 및 다른 생물학적 활성 물질 생물학적 활성 물질과 같은, MASP-2 억제체인 다른 MASP-2 결합 분자가 또한 제조될 수 있다. 이 방법은 다양한 생물학적 모방체를 설계하는데 유용하며, 그것들이 전형적으로 기능 모노머의 유리기 폴리머화에 의해 제조되기 때문에 그것들의 자연적 대응물보다 더 안정하고, 비 생물 분해성 백본을 가진 화합물을 발생시킨다.

[0329] **펩티드 합성**

[0330] MASP-2 억제 펩티드는 업계에 잘 알려진 기술, 예를 들어, Merrifield, in J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963에 의해 처음에 설명된 고체상 합성 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 자동화된 합성은 예를 들어, 제조사에 의해 제공된 지시에 따라 Applied Biosystems 431A 펩티드 Synthesizer (Foster City, Calif.)를 사용하여 달성될 수도 있다. 다른 기술은 Bodanszky, M., et al., 펩티드 Synthesis, second edition, John Wiley & Sons, 1976, 뿐만 아니라 당업자에게 알려진 다른 참고서에서 발견될 수도 있다.

- [0331] 펩티드는 또한 당업자에게 알려진 표준 유전 공학 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 효소에 의해 펩티드를 암호화하는 핵산을 발현 벡터에 삽입하고, DNA를 발현하고, 필요한 아미노산의 존재시 DNA를 펩티드로 번역함으로써 생산될 수 있다. 펩티드는 크로마토그래피 또는 전기 영동 기술을 사용하여, 또는 펩티드 암호화 서열, 담체 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 단계에서, 발현 벡터에 삽입함으로써 펩티드에 융합되고, 이후에 이로부터 분열될 수 있는 담체 단백질의 방법에 의해 정제된다. 융합 단백질-펩티드는 크로마토그래피, 전기영동 또는 면역학적 기술 (예를 들어, 담체 단백질에 대한 항체를 통해 수지에 결합)을 사용하여 분리될 수도 있다. 펩티드는 화학적 방법론을 사용하거나 예를 들어, 가수분해 효소와 같은 효소에 의해 분열될 수 있다.
- [0332] 본 발명의 방법에 유용한 MASP-2 억제 펩티드는 또한 통상적인 기술에 따라 재조합 숙주 세포에서 생성될 수 있다. MASP-2 억제 펩티드 암호화 서열을 발현하기 위해, 펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 발현 벡터에서 전사 발현을 조절하는 조절 서열에 조작 가능하게 결합하고 숙주 세포에 도입되어야 한다. 프로모터 및 인핸서 (enhancer)와 같은 전사 조절 서열 이외에, 발현 벡터는 번역 조절 서열 및 마커 유전자를 포함할 수 있으며, 이것은 발현 벡터를 갖고 있는 세포의 선택에 적합하다.
- [0333] MASP-2 억제 펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 포스포라미디트 방법과 같은 프로토콜을 사용하여 "유전자 합성기 (gene machine)"로 합성될 수 있다. 화학적으로 합성된 이중-가닥 DNA가 유전자 또는 유전자 단편의 합성과 같은 적용에 필요하다면, 이러한 상보성 가닥이 별도로 만들어진다. 짧은 유전자 (60 내지 80개의 염기쌍)의 생성은 기술적으로 간단하고 상보성 가닥의 합성 및 그것들의 어닐링 (annealing)이 동반될 수 있다. 더 긴 유전자의 생산을 위해, 합성 유전자 (이중-가닥)는 길이가 20 내지 100개의 뉴클레오타이드인 단일-가닥 단편의 모듈 형태 (modular form)로 조립된다. 폴리뉴클레오타이드 합성에 대한 재검토를 위해, 예를 들어, Glick 및 Pasternak, "Molecular Biotechnology, Principles 및 Applications of Recombinant DNA", ASM Press, 1994; Itakura, K., et al., Annu. Rev. Biochem. 53:323, 1984; 및 Climie, S., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:633, 1990을 참고하면 된다.
- [0334] 저 분자 억제제
- [0335] 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 낮은 분자량을 갖는 천연 및 합성 물질, 예를 들어, 펩티드, 펩티도미메틱 및 비펩티드 억제제 (올리고뉴클레오타이드 및 유기 화합물 등)를 포함하는, 저 분자 억제제이다. MASP-2의 저 분자 억제제는 항-MASP-2 항체의 가변 영역의 분자 구조에 기초하여 발생할 수 있다.
- [0336] 저 분자 억제제는 또한 컴퓨터를 사용한 약물 설계를 사용하여 MASP-2 결정 구조에 기초하여 설계되고 발생할 수도 있다 (Kuntz I.D., et al., Science 257:1078, 1992). 래트 MASP-2의 결정 구조가 설명되었다 (Feinberg, H., et al., EMBO J. 22:2348-2359, 2003). Kuntz et al.에 의해 설명된 방법을 사용하여, MASP-2 결정 구조 좌표는 DOCK와 같은 컴퓨터 프로그램에 대한 입력으로서 사용되며, 이것은 MASP-2에 결합하는 것으로 예측된 저 분자 구조의 목록을 출력한다. 이러한 컴퓨터 프로그램의 사용은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, HIV-1 프로테아제 억제제의 결정 구조는 프로그램 DOCK를 사용하여 효소의 결합 부위에 대한 캠브리지 결정학 데이터 베이스 (Cambridge Crystallographic database)에서 발견된 화합물의 적합성을 평가함으로써 HIV-1 프로테아제 억제제인 독특한 비펩티드 리간드를 확인하기 위해 사용되었다 (Kuntz, I.D., et al., J. Mol. Biol. 161:269-288, 1982; DesJarlais, R.L., et al., PNAS 87:6644-6648, 1990).
- [0337] 잠재적 MASP-2 억제제로서, 컴퓨터를 사용하는 방법에 의해 확인된 저 분자 구조의 목록은 실시예 10에 설명된 바와 같은 MASP-2 결합 검정을 사용하여 스크리닝 된다. MASP-2에 결합한 것으로 발견된 저 분자는 그것들이 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제하는지 결정하기 위해 실시예 2에 설명된 바와 같이 기능적 검정으로 실험된다.
- [0338] **MASP-2 가용성 수용체**
- [0339] 다른 적합한 MASP-2 억제제는 MASP-2 가용성 수용체를 포함하는 것으로 생각되며, 이것은 당업자에게 알려진 기술을 사용하여 생산될 수도 있다.
- [0340] **MASP-2의 발현 억제제**
- [0341] 본 발명의 이 양태의 또 다른 구체예에서, MASP-2 억제제는 MASP-2-의존적 보체 활성화를 억제할 수 있는 MASP-2 발현 억제제이다. 본 발명의 이 양태의 실행시, 대표적인 MASP-2 발현 억제제는 MASP-2 안티센스 핵산 분자 (예를 들어, 안티센스 mRNA, 안티센스 DNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드), MASP-2 리보자임 및 MASP-2

RNAi 분자를 포함한다.

- [0342] 항-센스 RNA 및 DNA 분자는 MASP-2 mRNA에 잡중화하고 MASP-2 단백질의 번역을 방지함으로써 MASP-2 mRNA의 번역을 직접 차단하는 작용을 한다. 안티센스 핵산 분자는 제공된 많은 다른 방법으로 구성될 수도 있고, 그것은 MASP-2의 발현을 방해할 수 있다. 예를 들어, 안티센스 핵산 분자는 그것의 보체의 전사를 허용하기 위해 전사에 대한 그것의 정상적인 방향에 관하여 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO: 4)의 암호화 영역 (또는 이들의 일부)를 뒤집음으로써 구성될 수 있다.
- [0343] 안티센스 핵산 분자는 보통 표적 유전자 또는 유전자들의 적어도 일부와 실질적으로 동일하다. 하지만, 핵산은 발현을 억제하기 위해 완전히 동일할 필요는 없다. 일반적으로, 더 높은 상동성은 더 짧은 안티센스 핵산 분자의 사용을 보상하기 위해 사용될 수 있다. 최소의 퍼센트 동일성은 전형적으로 약 65%보다 더 높지만, 더 높은 퍼센트 동일성은 내인성 서열의 발현의 더 효과적인 억압을 행사할 수도 있다. 실질적으로 전형적으로 약 80%보다 더 큰 퍼센트 동일성이 바람직하지만, 약 95% 내지 완전 동일성이 전형적으로 가장 바람직하다.
- [0344] 안티센스 핵산 분자는 표적 유전자와 같은 인트론 또는 엑손 패턴을 가질 필요가 없고, 표적 유전자의 비-암호화 세그먼트는 표적 유전자 발현의 안티센스 억제를 달성하는데 있어서 암호화 세그먼트와 동일하게 효과적이다. 더 긴 서열이 바람직하지만, 약 8개 정도의 뉴클레오타이드의 DNA 서열은 안티센스 핵산 분자로서 사용될 수도 있다. 본 발명에서, MASP-2의 유용한 억제제의 대표적인 예는 SEQ ID NO: 4에 설명된 핵산 서열로 구성된 MASP-2 cDNA의 보체와 적어도 90퍼센트 동일한 안티센스 MASP-2 핵산 분자이다. SEQ ID NO: 4에 설명된 핵산 서열은 SEQ ID NO: 5에 설명된 아미노산 서열로 구성된 MASP-2 단백질을 암호화한다.
- [0345] MASP-2 mRNA와 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 표적화는 MASP-2 단백질 합성의 수준을 감소시키기 위해 사용될 수도 있는 또 다른 메카니즘이다. 예를 들어, 폴리갈락투로나제 및 무스카린 타입 2 아세틸콜린 수용체의 합성은 그것들의 각각의 mRNA 서열과 관련된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 억제된다 (Cheng에 대하여 미국 특허 번호 5,739,119, 및 Shewmaker에 대하여 미국 특허 번호 5,759,829). 게다가, 안티센스 억제의 예는 핵 단백질 시클린과 함께, 다중 약물 내성 유전자 (MDG1), ICAM-1, E-셀렉틴, STK-1, 선조체 GABA_A 수용체 및 사람 EGF로 입증되었다 (예를 들어, Baracchini에 대하여 미국 특허 번호 5,801,154; Baker에 대하여 미국 특허 번호 5,789,573; Considine에 대하여 미국 특허 번호 5,718,709; 및 Reubenstein에 대하여 미국 특허 번호 5,610,288을 참고하면 된다).
- [0346] 당업자가 어떤 올리고뉴클레오타이드가 본 발명에 유용한지, 어떤 것이 전사물 내 서열의 접근성에 대한 지표로서 Rnase H 절단을 사용하여 표적 mRNA의 적합한 부위를 찾는 것을 수반하는지 결정하는 것을 허용하는 시스템이 설명되었다. Scherr, M., et al., Nucleic Acid Res. 26:5079-5085, 1998; Lloyd, et al., Nucleic Acid Res. 29:3665-3673, 2001. MASP-2 전사물의 특정 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 혼합물이 MASP-2를 발현하는 세포 추출물, 예를 들어, 간세포에 추가되었고, RNaseH 취약 부위를 생성하기 위해 잡중화된다. 이 방법은 다이머, 헤어핀, 또는 숙주 세포에서 표적 mRNA에 특이적인 결합을 감소시키거나 금지하는 다른 2차 구조를 형성하는 그것들의 상대적인 능력에 기초하여 안티센스 조성물에 대한 최적의 서열 선택을 예측하는 컴퓨터-지원 서열 선택과 결합할 수 있다. 이들 2차 구조 분석 및 표적 부위 선택 고려사항은 OLIGO 프라이머 분석 소프트웨어 (Rychlik, I., 1997) 및 BLASTN 2.0.5 알고리즘 소프트웨어 (Altschul, S.F., et al., Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1997)를 사용하여 수행될 수도 있다. 표적 서열에 관련된 안티센스 화합물은 바람직하게 길이가 약 8개 내지 약 50개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 약 9 내지 약 35개 정도의 뉴클레오타이드를 포함하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 특히 바람직하다. 발명자는 9 내지 35개의 범위의 뉴클레오타이드 (길이가 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 또는 35개 정도의 염기인 것들)의 올리고뉴클레오타이드 조성물 모두가 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드-기반 방법의 실행에 매우 바람직하고 생각한다.
- [0347] MASP-2 mRNA의 매우 바람직한 표적 영역은 AUG 번역 개시 코돈에 또는 근처에 있는 것들이고, 예를 들어, MASP-2 유전자 뉴클레오타이드 서열 (SEQ ID NO: 4)의 -10 내지 +10 영역 사이의 mRNA의 5' 영역에 실질적으로 상보적인 그들 서열이다. 전형적인 MASP-2 발현 억제제는 표 4에 제공된다.

[0348] 표 4: MASP-2의 전형적인 발현 억제제

SEQ ID NO:30 (SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 22-680)	CUBIEGF를 암호화하는 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4)의 핵산 서열
SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCCTCCTGGGC3'	MASP-2 번역 시작 부위 (센스)를 포함하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 12-45
SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTTCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3'	MASP-2 MBL 결합 부위 (센스)를 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 361-396
SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCC AAA3'	CUBII 도메인을 포함하는 영역을 암호화하는 SEQ ID NO:4의 뉴클레오타이드 610-642

[0349]

[0350]

상기 언급된 바와 같이, 여기에 사용된 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머 또는 이들의 모방체를 나타낸다. 이 용어는 또한 자연 발생한 뉴클레오타이드, 당 및 뉴클레오타이드간 (백본) 공유결합, 뿐만 아니라 비-자연 발생한 변형을 갖는 올리고뉴클레오타이드로 구성된 올리고뉴클레오타이드를 커버한다. 이들 변형은 하나가 자연 발생한 올리고뉴클레오타이드를 통해 제공되지 않는 특정 바람직한 성질, 예를 들어, 감소된 유독성, 뉴클레아제 분해에 대하여 증가된 안정성 및 향상된 세포 흡수를 도입할 수 있게 한다. 구체적인 구체예에서, 본 발명의 안티센스 화합물은 원래의 DNA와 포스페이트 치환물이 포스포로티오에이트에 의해 대체되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 생활을 연장하는 포르포디에스테르 백본의 변형이 다르다. 유사하게, 올리고뉴클레오타이드의 하나 또는 양끝은 핵산의 가닥 내에 인접한 염기쌍 사이에 삽입된 하나 이상의 아크리딘 유도체에 의해 치환될 수도 있다.

[0351]

안티센스에 대한 또 다른 대안은 "RNA 간섭" (RNAi)의 사용이다. 이중-가닥 RNA (dsRNA)는 포유동물 생체 내에서 유전자 침묵 (gene silencing)을 유발할 수 있다. RNAi 및 동시-억제의 자연 기능은 숙주 세포에서 그것들이 활성이 될 때 변종 RNA 또는 dsRNA를 생산하는 레트로트랜스포손 및 바이러스와 같은 이동성 유전적 요소에 의한 침입에 대한 계능의 보호인 것으로 나타난다 (예를 들어, Jensen, J., et al., Nat. Genet. 21:209-12, 1999를 참고하면 된다). 이중-가닥 RNA 분자는 이중-가닥 RNA 분자를 형성할 수 있는 두 개의 RNA 가닥을 합성함으로써 제조될 수도 있으며, 각각 약 19 내지 25의 길이 (예를 들어, 19-23개의 뉴클레오타이드)를 갖는다. 예를 들어, 본 발명의 방법에 유용한 dsRNA 분자는 표 4에 나열된 서열 및 그것의 보체에 해당하는 RNA를 포함할 수도 있다. 바람직하게, 적어도 하나의 가닥의 RNA는 1-5개의 뉴클레오타이드로부터의 3' 돌출부를 갖는다. 합성된 RNA 가닥은 이중-가닥 분자를 형성하는 조건 하에 결합한다. RNA 서열은 25개 이하의 뉴클레오타이드의 전체 길이를 갖는 SEQ ID NO: 4 중 적어도 8개의 뉴클레오타이드 부분을 포함할 수도 있다. 특정 표적에 대한 siRNA의 설계는 업계의 선행 기술의 범위 내에 있다. siRNA 서열을 설계하고 적어도 70%의 발현을 보장하는 상업적인 서비스가 이용 가능하다 (Qiagen, Valencia, Calif).

[0352]

dsRNA는 약학적 조성물로서 투여될 수도 있고 알려진 방법에 의해 수행될 수도 있으며, 핵산은 원하는 표적 세포에 도입된다. 보통 사용되는 유전자 전송 방법은 칼슘 포스페이트, DEAE-덱스트린, 전기천공법, 미세주입법 및 바이러스 방법을 포함한다. 이러한 방법은 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993에서 교시된다.

[0353]

리보자임은 또한 MASP-2 mRNA를 표적화하는 리보자임과 같은, MASP-2의 양 및/또는 생물학적 활성을 감소시키기 위해 이용될 수 있다. 리보자임은 리보자임의 서열에 완전히 또는 부분적으로 상동성인 서열을 갖는 핵산 분자를 분열시킬 수 있는 촉매 RNA 분자이다. 표적 RNA와 특이적으로 짝을 이루고 특정 위치에서 포스포디에스테르 백본을 절단하고, 그로 인해 표적 RNA를 기능적으로 불활성화하는 RNA 리보자임을 암호화하는 리보자임 이식 유전자를 설계하는 것이 가능하다. 이 절단의 수행시, 리보자임은 스스로 변화되지 않고, 따라서 다른 분자를 재사용하고 분열시킬 수 있다. 안티센스 RNA 내에 리보자임 서열의 포함은 그것들에게 RNA-분열 활성을 제공하고, 그로 인해 안티센스 구조의 활성을 증가시킨다.

[0354]

본 발명의 실행에 유용한 리보자임은 전형적으로 약 9개의 뉴클레오타이드의 잡종화 영역을 포함하며, 이것은 뉴클레오타이드 서열에서 표적 MASP-2 mRNA의 적어도 일부, 및 표적 MASP-2 mRNA를 절단하는데 적합한 촉매 영역에 대해 상보성이다 (일반적으로, EPA No. 0 321 201; WO88/04300; Haseloff, J., et al., Nature 334:585-591, 1988; Fedor, M.J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1668-1672, 1990; Cech, T.R., et al., Ann. Rev. Biochem. 55:599-629, 1986을 참고하면 된다).

- [0355] 리보자임은 RNA 올리고뉴클레오타이드 결합 리보자임 서열의 형태로 세포에 직접 표적화되거나, 원하는 리보자임 RNA를 암호화하는 발현 벡터로서 세포에 도입될 수 있다. 리보자임은 안티센스 폴리뉴클레오타이드에 대하여 설명된 바와 거의 같은 방법으로 사용되고 적용될 수도 있다.
- [0356] 본 발명의 방법에 유용한 항-센스 RNA 및 DNA, 리보자임 및 RNAi 분자는 DNA 및 RNA 분자의 합성에 대하여 업계에 알려진 어떤 기술에 의해서도 제조될 수 있다. 이들은 업계에 잘 알려진 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 및 올리고리보뉴클레오타이드를 화학적으로 합성하는 기술, 예를 들어, 고체상 포스포라미디트 화학적 합성을 포함한다. 대안으로, RNA 분자는 안티센스 RNA 분자를 암호화하는 DNA 서열의 시험관 내 및 생체 내 전사에 의해 발생할 수도 있다. 이러한 DNA 서열은 T7 또는 SP6 폴리머라제 프로모터와 같은 적합한 RNA 폴리머라제 프로모터를 통합하는 다양한 벡터에 통합될 수도 있다. 대안으로, 사용된 프로모터에 의존적으로 안티센스 cDNA를 구조적으로 또는 유발 가능하게 합성하는 구조는 세포주에 안정적으로 도입될 수 있다.
- [0357] DNA 분자의 다양한 잘 알려진 변형은 안정성 및 반감기를 증가시키는 방법으로서 도입될 수도 있다. 유용한 변형은 분자의 5' 및/또는 3' 끝에 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시리보뉴클레오타이드의 플랭킹 서열의 추가 또는 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 백본 내 포스포디에스테라제 결합 대신에 포스포로티오에이트 또는 2' O-메틸의 사용을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0358] **V. 약학적 조성물 및 전달 방법**
- [0359] **투여**
- [0360] 또 다른 양태에서, 본 발명은 여기에 개시된 질환 또는 질병으로 고통받는 대상체에서 MASP-2-의존적 보체 활성화의 부작용을 억제하는 조성물을 제공하며, 대상체에 MASP-2 억제제의 치료적 유효량 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. MASP-2 억제제는 MASP-2-의존적 보체 활성화와 관련된 질병을 치료하거나 개선하기 위해 이것이 필요한 대상체에 치료적 유효량으로 투여될 수 있다. 치료적 유효량은 질환 또는 질병과 관련된 증상의 개선을 일으키기 위해 충분한 MASP-2 억제제의 양을 나타낸다.
- [0361] MASP-2 억제제의 독성 및 치료적 효능은 실험적 동물 모델, 예를 들어, 실시예 1에 설명된 사람 MASP-2 이식 유전자를 발현하는 쥐 MASP-2 $-/-$ 마우스 모델을 이용하는 표준 약학적 과정에 의해 결정될 수 있다. 이러한 동물 모델을 사용하여, NOAEL (부정적인 효과 수준이 관찰되지 않음) 및 MED (최소 유효량)는 표준 방법을 사용하여 결정될 수 있다. NOAEL 및 MED 효과 사이의 용량 비율은 치료 계수이며, 이것은 비율 NOAEL/MED로서 표현된다. 큰 치료 계수 또는 치료 지수를 나타내는 MASP-2 억제제가 가장 바람직하다. 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 사람에게 사용되는 투약량의 범위를 조절하는데 사용될 수 있다. MASP-2 억제제의 투약량은 바람직하게 거의 또는 전혀 독성이 없는 MED를 포함하는 순환 농도의 범위 내에 있다. 투약량은 활용된 투약 형태 및 이용된 투여의 루트에 의존적인 이 범위 내에서 다를 수도 있다.
- [0362] 어떤 화합물 제제에 대하여, 치료적 유효량은 동물 모델을 사용하여 추정될 수 있다. 예를 들어, 용량은 MED를 포함하는 순환하는 순환 혈장 농도 범위를 이루기 위해 동물 모델에서 조절될 수도 있다. 혈장에서 MASP-2 억제제의 양적인 수준은 또한, 예를 들어, 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수도 있다.
- [0363] 독성 연구 이외에, 유효량은 살아있는 대상체에 존재하는 MASP-2 단백질의 양 및 MASP-2 억제제의 결합 친화도에 기초하여 추정될 수도 있다. 정상 사람 대상체의 MASP-2 수준은 500 ng/ml의 범위에서 낮은 수준의 혈청에 존재하고, 특정 대상체의 MASP-2 수준은 Moller-Kristensen M., et al., J. Immunol. Methods 282:159-167, 2003에 설명된, MASP-2에 대한 정량 검정을 사용하여 결정될 수 있다는 것이 나타났다.
- [0364] 일반적으로, MASP-2 억제제를 포함하는, 투여된 조성물의 투약량은 대상체의 나이, 체중, 키, 성별, 일반적인 의학적 상태, 및 이전 병력과 같은 인자에 의존적으로 다르다. 설명과 같이, MASP-2 억제제, 예를 들어, 항-MASP-2 항체는 대상체 체중의 약 0.010 10.0 mg/kg, 바람직하게 0.010 내지 1.0 mg/kg, 더 바람직하게 0.010 내지 0.1 mg/kg의 투약 범위에서 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 조성물은 항-MASP-2 항체 및 MASP-2 억제 펩티드의 조합을 포함한다.
- [0365] 특정 대상체에서 MASP-2 억제 조성물 및 본 발명의 방법의 치료적 효능 및 적절한 투약은 당업자들에게 잘 알려진 보체 검정에 따라 결정될 수 있다. 보체는 많은 특이적 생성물을 발생시킨다. 지난 10년간, 민감성 및 특이적 검정이 개발되었고 작은 활성화 단편 C3a, C4a, 및 C5a 및 큰 활성화 단편 iC3b, C4d, Bb, 및 sC5b-9를 포함하는, 이들 활성화 생성물 중 대부분에 대하여 상업적으로 이용 가능하다. 이들 검정 중 대부분은 단편에 노출되지만, 그것들이 형성된 원래의 단백질에는 노출되지 않는 새로운 항원 (신생항원)과 반응하는 단클론성 항

체를 이용하며, 이 검정을 아주 간단하고 특이적으로 만든다. C3a 및 C5a에 대해서는 방사선 면역 검정이 여전히 가끔 사용되지만, 대부분 ELISA 기술에 의존한다. 이 후자 검정은 미가공 단편 및 그것들의 'desArg' 단편 둘 다를 측정하며, 이것은 순환에서 발견되는 주요 형태이다. 미가공 단편 및 C5a_{desArg}는 세포 표면 수용체에 결합함으로써 신속하게 제거되고 매우 낮은 농도로 존재하는 반면에, C3a_{desArg}는 세포에 결합하지 않고 혈장에 축적된다. C3a의 측정은 보체 활성화의 민감성, 경로-독립적 지표를 제공한다. 대체 경로 활성화는 Bb 단편을 측정함으로써 평가될 수 있다. 막 공격 경로 활성화의 유체상 생성물, sC5b-9의 검출은 보체가 완료될 때까지 활성화되고 있다는 증거를 제공한다. 렉틴 및 고전적 경로 둘 다는 같은 활성화 생성물, C4a 및 C4d를 발생시키고, 이들 두 개의 단편의 측정은 이들 두 개의 경로가 활성화 생성물을 발생시키는 것에 대한 어떤 정보도 제공하지 않는다.

[0366] MASP-2-의존적 보체 활성화의 억제제는 본 발명의 방법에 따라 MASP-2 억제제의 투여의 결과로서 발생하는 보체 시스템의 성분의 다음 변화 중 적어도 하나를 특징으로 한다: MASP-2-의존적 보체 활성화 시스템 생성물 C4b, C3a, C5a 및/또는 C5b-9 (MAC)의 발생 또는 생성의 억제 (예를 들어, 실시예 10에 설명된 바와 같이 측정됨), C4 절단 및 C4b 침착의 감소 (예를 들어, 실시예 10에 설명된 바와 같이 측정됨), 또는 C3 절단 및 C3b 침착의 감소 (예를 들어, 실시예 10에 설명된 바와 같이 측정됨).

[0367] 추가적 약제

[0368] MASP-2 억제제를 포함하는 조성물 및 방법은 선택적으로 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함할 수도 있으며, 이것은 MASP-2 억제제의 활성을 증가시킬 수도 있거나 첨가물 또는 시너지 효과의 방식으로 관련된 치료적 기능을 제공한다. 예를 들어, TTP로 고통받는 대상체의 치료의 맥락에서, 대상체는 ADAM-TS13의 억제제에 대하여 양성이고, 하나 이상의 MASP-2 억제제는 하나 이상의 면역억제제와 조합 (동시 투여 포함)으로 투여될 수도 있다. 적합한 면역억제제는 다음을 포함한다: 코르티코스테로이드, 리튬산, 시클로스포린, 등. HUS 또는 aHUS로 고통받거나, 이에 걸릴 위험이 있는 대상체의 치료의 맥락에서, 하나 이상의 MASP-2 억제제는 적합한 항생제와 조합 (동시 투여 포함)하여 투여될 수도 있다. aHUS로 고통받거나, 이에 걸릴 위험이 있는 대상체의 치료의 맥락에서, 하나 이상의 MASP-2 억제제는 에쿨리주맙 (Soliris), TT-30, 인자 B에 대한 항체, 또는 말단 보체 성분 또는 대체 경로 증폭을 억제하는 다른 약제와 같은 다른 보체 억제제와 조합 (동시 투여 포함)하여 투여될 수도 있다.

[0369] 추가적인 약제(들)의 포함 및 선택은 원하는 치료적 결과를 달성하기 위해 결정될 것이다. 일부 구체예에서, MASP-2 억제제는 하나 이상의 항-염증제 및/또는 진통제와 조합하여 투여될 수도 있다. 적합한 항-염증제 및/또는 진통제는 다음을 포함한다: 세로토닌 수용체 길항제; 세로토닌 수용체 작용제; 히스타민 수용체 길항제; 브래디키닌 수용체 길항제; 칼리크레인 억제제; 뉴로키닌₁ 및 뉴로키닌₂ 수용체 서브타입 길항제를 포함하는, 타키키닌 수용체 길항제; 칼시토닌 유전자-관련 펩티드 (CGRP) 수용체 길항제; 인터류킨 수용체 길항제; PLA₂ 동형 억제제 및 PLC_g 동형 억제제, 시클로옥시게나제 (COX) 억제제 (이것은 COX-1, COX-2, 또는 비선택적 COX-1 및 -2 억제제일 수도 있음), 리포옥시게나제 억제제를 포함하는, 포스포리파제 억제제를 포함하는, 아라키돈산 대사산물에 대한 합성 경로에서 활성인 효소의 억제제; 아이코사노이드 EP-1 및 EP-4 수용체 서브타입 길항제 및 트롬복산 수용체 서브타입 길항제를 포함하는 프로스타노이드 수용체 길항제; 류코트라이엔 B₄ 수용체 서브타입 길항제 및 류코트라이엔 D₄ 수용체 서브타입 길항제를 포함하는 류코트라이엔 수용체 길항제; m-오피오이드, d-오피오이드, 및 k-오피오이드 수용체 서브타입 작용제를 포함하는 오피오이드 수용체 작용제; P_{2X} 수용체 길항제 및 P_{2Y} 수용체 작용제를 포함하는 퓨리노셉터 작용제 및 길항제; 아데노신 트리포스페이트 (ATP)-민감성 칼륨 채널 오픈어 (opener); MAP 키나제 억제제; 니코틴 아세틸콜린 억제제; 및 알파 아드레날린 작용 수용체 작용제 (알파-1, 알파-2, 및 비선택적 알파-1 및 2 작용제).

[0370] 본 발명의 MASP-2 억제제는 또한 C5의 억제제와 같은, 하나 이상의 다른 보체 억제제와 조합하여 투여될 수도 있다. 지금까지, 에쿨리주맙 (Solaris®, C5에 대한 항체)는 사람 사용에 대하여 승인된 유일한 보체-표적화 약물이다. 하지만 일부 약리학제는 생체 내에서 보체를 차단하는 것으로 나타났다. K76C00H 및 나팜스타트 메실레이트 (nafamstat mesilate)는 이식의 동물 모델에서 일부 유효성을 나타낸 두 개의 약제이다 (Miyagawa, S., et al., Transplant Proc. 24:483-484, 1992). 저 분자량 헤파린은 또한 보체 활성을 조절하는데 있어서 효과적인 것으로 나타났다 (Edens, R.E., et al., 보체 Today, pp. 96-120, Basel: Karger, 1993). 이들 저 분자 억제제는 본 발명의 MASP-2 억제제와 조합하여 사용되는 약제로서 유용할 수도 있다.

- [0371] 다른 자연 발생한 보체 억제제가 본 발명의 MASP-2 억제제와 조합하여 유용할 수도 있다. 보체의 생물학적 억제제는 가용성 보체 인자 1 (sCR1)을 포함한다. 이것은 사람 세포의 외막에서 발견될 수 있는 자연 발생한 억제제이다. 다른 막 억제제는 DAF, MCP, 및 CD59를 포함한다. 제조형態는 그것들의 시험관 내 및 생체 내 항-보체 활성화에 대하여 테스트 되었다. sCR1은 이종 기관 이식에 효과적이며, 보체 시스템 (대체 및 고전 둘 다)은 새로 이식된 기관을 통해 혈관을 관류시키는 시간 내에 과 활성화 거부 증후군 (hyperactive rejection syndrome)에 대한 촉발을 제공한다 (Platt, J.L., et al., Immunol. Today 11:450-6, 1990; Marino, I.R., et al., Transplant Proc. 1071:6, 1990; Johnstone, P.S., et al., Transplantation 54:573-6, 1992). sCR1의 사용은 이식된 기관을 보호하고 이의 생존 시간을 연장하며, 기관 생존의 발병시 보체 경로에 연루된다 (Leventhal, J.R., et al., Transplantation 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K., et al., Transplantation 57:363-70, 1994).
- [0372] 본 발명의 조성물과 조합하여 사용되는 적합한 추가적 보체 억제제는 또한, 예의 방법으로, Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut에 의해 개발된 항-C5 항체 (예를 들어, 에콜리주맙), 및 항-프로퍼딘 MoAb와 같은 MoAb를 포함한다.
- [0373] **약학적 담체 및 전달 비히클 (vehicle)**
- [0374] 일반적으로, 본 발명의 MASP-2 억제제 조성물은, 어떤 다른 선택된 치료제와도 조합하여, 약학적으로 허용 가능한 담체에 적합하게 함유된다. 담체는 비-독성, 생체적합성이고 MASP-2 억제제 (및 그것과 조합된 어떤 다른 치료제)의 생물학적 활성화에 해로운 영향을 미치지 않기 위해 선택된다. 펩티드에 대하여 전형적인 약학적으로 허용 가능한 담체는 Yamada에 대하여 미국 특허 번호 5,211,657에 설명된다. 본 발명에 유용한 항-MASP-2 항체 및 억제 펩티드는 경구, 비경구 또는 수술 투여를 허용하는, 타블렛, 캡슐, 파우더, 과립, 연고, 용액, 디포지터리 (depository), 흡입제 및 주사제와 같은 고체, 반고체, 겔, 액체 또는 기체 형태의 조제물로 조제될 수도 있다. 본 발명은 또한 의료 기기 등을 코팅함으로써 조성물의 국부적 투여를 고려한다.
- [0375] 주사, 투입 또는 세척 (irrigation) 및 국부적 전달을 통한 비경구로 전달되는 적합한 담체는 증류수, 생리학적인 포스페이스트-완충된 식염수, 정상 또는 락테이티드 링거 용액 (lactated Ringer's solution), 텍스트로스 용액, 행크 용액 (Hank's solution), 또는 프로판디올을 포함한다. 또한, 멸균, 고정된 오일이 용매 또는 현탁 배지로서 이용될 수도 있다. 이 목적을 위해, 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하는, 어떤 생체적합한 오일도 이용될 수 있다. 또한, 올레산과 같은 지방산은 주사제의 제조시 사용을 발견한다. 담체 및 약제는 액체, 현탁액, 폴리머화 또는 비-폴리머화 겔, 페이스트 (paste) 또는 연고와 합성될 수도 있다.
- [0376] 담체는 또한 치료제(들)의 전달, 흡수, 안정성 또는 약물동력학을 향상시키는 약제(들)의 전달을 지속시키기 위해 (즉, 연장, 지연 또는 조절) 전달 비히클을 포함할 수도 있다. 이러한 전달 비히클은, 비-제한 예의 방법으로, 단백질, 리포솜, 탄수화물, 합성 유기 화합물, 무기 화합물, 폴리머 또는 코폴리머 히드로겔 및 폴리머 미셀 (micelle)로 구성된 미세입자, 미소구체, 나노구체 또는 나노입자를 포함할 수도 있다. 적합한 히드로겔 및 미셀 전달 시스템은 WO 2004/009664 A2에 개시된 PEO:PHB:PEO 코폴리머 및 코폴리머/시클로덱스트린 복합체 및 미국 특허 출원 공개 번호 2002/0019369 A1에 개시된 PEO 및 PEO/시클로덱스트린 복합체를 포함한다. 이러한 히드로겔은 지속적인 방출 디포 (depot)를 형성하기 위해 의도된 작용의 부위에, 또는 피하로 또는 근육 내로 국부적으로 주사될 수도 있다.
- [0377] 동맥 내 전달을 위해, MASP-2 억제제는 상기 설명된, 주사 가능한 액체 또는 겔 담체 또는 상기 설명된, 주사 가능하거나, 히알루론산 또는 히알루론산 유도체인 지속적인 방출 전달 비히클에서 운반될 수도 있다.
- [0378] 비-펩티드성 약제의 경구 투여를 위해, MASP-2 억제제는 수크로스, 콘스타치 (cornstarch), 또는 셀룰로스와 같은 불활성 충전제 (inert filler) 또는 희석액에서 운반될 수도 있다.
- [0379] 국부적 투여를 위해, MASP-2 억제제는 연고, 로션, 크림, 겔, 방울, 좌약, 스프레이, 액체 또는 분말에서, 또는 경피 패치를 통한 미소캡슐 전달 시스템에서 운반될 수도 있다.
- [0380] 에어로졸, 정량 흡입기, 건성 분말 흡입기, 및 분무기를 포함하는, 다양한 코 및 폐 전달 시스템이 개발되는 중이고 각각 에어로졸, 흡입제, 또는 분무된 전달 비히클로 본 발명의 전달에 적합하게 적용될 수도 있다.
- [0381] 척추 강 내 (IT) 또는 뇌실 내 (ICV) 전달을 위해, 적절하게 멸균된 전달 시스템 (예를 들어, 액체; 겔, 현탁액, 등)이 본 발명을 투여하기 위해 사용될 수 있다.
- [0382] 본 발명의 조성물은 또한 분산제 또는 습윤제, 현탁화제, 희석액, 완충액, 경피 흡수 촉진제, 에멀전화제, 결합제, 점증제, 향미제와 같은, 생체적합성 첨가제를 포함할 수도 있다 (경구 투여를 위해).

[0383] **항체 및 펩티드에 대한 약학적 담체**

[0384] 항-MASP-2 항체 및 억제 펩티드에 관하여 더 특이적으로, 전형적인 제제는 물, 오일, 식염수, 글리세롤 또는 에탄올과 같은 멸균 액체일 수 있는 약학적 담체를 가진 약학적으로 허용 가능한 희석액 중의 화합물의 용액 또는 현탁액의 주사 가능한 투약으로서 비경구로 투여될 수 있다.

[0385] 추가적으로, 습윤제 또는 에멀전화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등과 같은 보조 물질이 항-MASP-2 항체 및 억제 펩티드를 포함하는 조성물에 존재할 수 있다. 약학적 조성물의 추가적 성분은 석유 (예를 들어, 동물, 식물 또는 합성 기원의), 예를 들어, 대두 오일 및 미네랄 오일을 포함한다. 일반적으로, 프로필렌 글리콜 또는 폴리 에틸렌 글리콜과 같은 글리콜은 주사 가능한 용액에 대한 바람직한 액체 담체이다.

[0386] 항-MASP-2 항체 및 억제 펩티드는 또한 활성제의 지속적인 또는 박동성 방출을 허용하는 이러한 방법으로 조제될 수 있는 디포 주사 (depot injection) 또는 임플란트 조제물 (implant preparation)의 형태로 투여도리 수 있다.

[0387] **발현 억제제에 대한 약학적으로 허용 가능한 담체**

[0388] 본 발명의 방법에 유용한 발현 억제제에 관하여 더 특이적으로, 상기 설명된 발현 억제제 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석액을 포함하는 조성물이 제공된다. 조성물은 추가로 콜로이드 분산 시스템을 추가로 포함할 수도 있다.

[0389] 발현 억제제를 포함하는 약학적 조성물은 용액, 에멀전, 및 리포솜-함유 제제를 포함하지만, 이에 제한되지 않을 수도 있다. 이들 조성물은 미리 형성된 액체, 자가-에멀전화 고체 및 자가-에멀전화 반고체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는 다양한 성분으로부터 발생할 수도 있다. 이러한 조성물의 제조는 전형적으로 다음 중 하나 이상과 발현 억제제의 조합을 수반한다: 완충액, 항산화제, 저 분자량 폴리펩티드, 단백질, 아미노산, 글루코스, 수크로스 또는 텍스트린을 포함하는, 탄수화물, EDTA, 글루타티온 및 다른 안정화제와 같은 킬레이트 시약 및 첨가제. 중성 완충된 식염수 또는 비-특이적 혈청 알부민과 혼합된 식염수는 적합한 희석액의 예이다.

[0390] 일부 구체예에서, 조성물은 전형적으로 방울의 형태로 다른 것에서 분산된 한 액체의 이질적인 시스템인 에멀전으로서 제조되고 조제될 수도 있다 (Idson, in Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1, Rieger 및 Banker (eds.), Marcek Dekker, Inc., N.Y., 1988을 참고하면 된다). 에멀전 조제에 사용된 자연 발생한 에멀전화의 예는 아카시아, 비즈왁스, 라놀린, 레시틴 및 포스파티드를 포함한다.

[0391] 한 구체예에서, 핵산을 포함하는 조성물은 마이크로에멀전으로서 조제될 수 있다. 여기에 사용된 바와 같이, 마이크로에멀전은 물, 오일, 및 양친매성 물질의 시스템을 나타내며, 이것은 시각적으로 등방성이고 열역학적으로 안정한 단일 액체 용액이다 (Rosoff in Pharmaceutical Dosage Forms, Vol. 1을 참고하면 된다). 본 발명의 방법은 또한 원하는 부위에 안티센스 올리고뉴클레오티드의 전송 및 전달에 리포솜을 사용할 수도 있다.

[0392] 국부적 투여를 위한 약학적 조성물 및 발현 억제제의 제제는 경피성 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 방울, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말을 포함할 수도 있다.

[0393] **투여의 모델**

[0394] MASP-2 억제제를 포함하는 약학적 조성물은 국부적 또는 전신성 투여 방식이 치료되는 질병에 가장 적절한지예 의존적인 많은 방법으로 투여될 수도 있다. 추가적으로, 체외 재관류 과정에 관하여 여기에서 상기 설명된 바와 같이, MASP-2 억제제는 재순환 혈액 또는 혈장에 본 발명의 조성물의 도입을 통해 투여될 수 있다. 게다가, 본 발명의 조성물은 이식 가능한 의료 기기에 조성물을 코팅하거나 이식 가능한 의료 기기로 통합함으로써 전달될 수 있다.

[0395] **전신성 전달**

[0396] 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "전신성 전달" 및 "전신성 투여"는 근육 내 (IM), 피하에, 정맥 내 (IV), 동맥 내, 흡입, 혀 밑, 볼, 국부적, 경피성, 코, 직장, 질 및 투여의 의도된 치료 작용의 단일 부위 또는 다중 부위로 전달된 약제의 분산을 효과적으로 일으키는 다른 루트를 포함하는, 경구 및 비경구 루트를 포함하지만, 이에 제한되지 않기 위한 것이다. 본 조성물에 대한 전신성 전달의 바람직한 루트는 정맥 내, 근육 내, 피하에 및 흡입을 포함한다. 본 발명의 특정 조성물에 이용된 선택된 약제에 대한 정확한 전신성 투여 루트가 부분적으로는 투여의 특정 루트와 관련된 대사 형질전환 경로에 대한 약제의 민감성을 설명하기 위해 결정된다는 것이 인정될 것이다. 예를 들어, 펩티드성 약제는 경구 이외의 루트에 의해 가장 적합하게 투여될 수도 있다.

- [0397] MASP-2 억제 항체 및 폴리펩티드는 어떤 적합한 방법에 의해서도 이것이 필요한 대상체에 전달될 수 있다. MASP-2 항체 및 폴리펩티드의 전달의 방법은 경구, 폐, 비경구 (예를 들어, 근육 내, 복강 내, 정맥 내 (IV) 또는 피하 주사), 흡입 (예를 들어, 미세한 분발 제형을 통해), 경피성, 코, 질, 직장, 또는 혀 밑의 투여 루트에 의한 투여를 포함하고, 각각의 투여 루트에 적절한 투약 형태로 조제될 수 있다.
- [0398] 대표적인 예의 방법으로, MASP-2 억제 항체 및 펩티드는 폴리펩티드를 흡수할 수 있는 신체의 막, 예를 들어, 코, 위장 및 직장 막에 적용에 의해 살아있는 신체에 도입될 수 있다. 폴리펩티드는 전형적으로 침투 인헨서와 함께 흡수성 막에 적용된다 (예를 들어, Lee, V.H.L., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 5:69, 1988; Lee, V.H.L., J. Controlled Release 13:213, 1990; Lee, V.H.L., Ed., Peptide 및 Protein Drug delivery, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., et al., J. Controlled Release 13:241, 1990을 참고하면 된다). 예를 들어, STDHF는 푸시딘산의 합성 유도체, 담즙산 염과 구조가 유사한 스테로이드성 계면활성제이고, 코 전달을 위한 침투 인헨서로서 사용되었다 (Lee, W.A., Biopharm. 22, Nov./Dec. 1990.).
- [0399] MASP-2 억제 항체 및 폴리펩티드는 효소에 의한 분해로부터 폴리펩티드를 보호하기 위해, 액체와 같은 또 다른 분자와 함께 도입될 수도 있다. 예를 들어, 폴리머, 특히 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)의 공유 부착은 신체에서 효소에 의한 가수분해로부터 특정 단백질을 보호하기 위해 사용되었고 따라서 반감기를 연장한다 (Fuertges, F., et al., J. Controlled Release 11:139, 1990). 많은 폴리머 시스템이 단백질 전달에 대하여 보고되었다 (Bae, Y.H., et al., J. Controlled Release 9:271, 1989; Hori, R., et al., Pharm. Res. 6:813, 1989; Yamakawa, I., et al., J. Pharm. Sci. 79:505, 1990; Yoshihiro, I., et al., J. Controlled Release 10:195, 1989; Asano, M., et al., J. Controlled Release 9:111, 1989; Rosenblatt, J., et al., J. Controlled Release 9:195, 1989; Makino, K., J. Controlled Release 12:235, 1990; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:117, 1989; Takakura, Y., et al., J. Pharm. Sci. 78:219, 1989).
- [0400] 최근에, 개선된 혈청 안정성 및 순환 하프 타임 (half-time)을 가진 리포솜이 개발되었다 (예를 들어, Webb에 대하여 미국 특허 번호 5,741,516을 참고하면 된다). 게다가, 잠재적 약물 담체로서 리포솜 및 리포솜-유사 조제물의 다양한 방법이 재검토되었다 (예를 들어, Szoka에 대하여 미국 특허 번호 5,567,434; Yagi에 대하여 미국 특허 번호 5,552,157; Nakamori에 대하여 미국 특허 번호 5,565,213; Shinkarenko에 대하여 미국 특허 번호 5,738,868; 및 Gao에 대하여 미국 특허 번호 5,795,587을 참고하면 된다).
- [0401] 경피성 적용을 위하여, MASP-2 억제 항체 및 폴리펩티드는 담체 및/또는 보조제와 같은, 다른 적합한 성분과 결합할 수도 있다. 이러한 다른 성분의 성질에 대한 제한은 그것들의 의도된 투여를 위해 약학적으로 허용 가능해야 하고 조성물의 활성 성분의 활성을 분해할 수 없다는 점을 제외하고는 없다. 적합한 비히클의 예는 정제된 콜라겐이 들어있거나 그렇지 않은, 연고, 크림, 젤, 또는 현탁액을 포함한다. MASP-2 억제 항체 및 폴리펩티드는 또한 바람직하게 액체 또는 반-액체 형태로 경피성 패치, 플라스터 (plaster), 및 붕대에 주입될 수도 있다.
- [0402] 본 발명의 조성물은 원하는 수준의 치료적 효과를 유지하도록 결정된 주기적인 간격으로 전신에 투여될 수도 있다. 예를 들어, 조성물은 2 내지 4주마다 또는 덜 빈번한 간격으로, 예를 들어, 피하 주사에 의해 투여될 수도 있다. 투약 요법은 약제의 조합의 작용에 영향을 미칠 수도 있는 다양한 인자를 고려하는 의사에 의해 결정될 것이다. 이들 인자는 치료되는 질병의 진행의 정도, 환자의 나이, 성별 및 체중, 및 다른 임상 인자를 포함할 것이다. 각 개개의 약제에 대한 투약은 조성물에 포함되는 MASP-2 억제제의 기능, 뿐만 아니라 어떤 약물 전달 비히클 (예를 들어, 지속적인 방출 전달 비히클)의 존재 및 성질에 따라 달라질 것이다. 또한, 투약량은 전달된 약제(들)의 투여의 빈도 및 약물동력학적 작용의 변화를 설명하기 위해 조정될 수도 있다.
- [0403] **국부적 전달**
- [0404] 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "국부적"은 의도된 국부적인 작용의 부위에 또는 주위에 약물의 적용을 포함하고, 예를 들어, 피부 또는 다른 영향을 받는 조직에, 안과 전달, 척추 강 내 (IT), 뇌실 내 (ICV), 동맥 내, 공동 내, 두 개 내 또는 방광 내 투여, 배치 또는 세척에 국부 전달을 포함할 수도 있다. 국부적 투여는 전신성 부작용을 방지하기 위해, 및 국부적 전달의 부위에 활성제의 전달 시기 및 농도의 더 정확한 조절을 위해 저용량의 투여를 가능하게 하는 것이 바람직하다. 국부적 투여는 대사, 혈류, 등의 환자 간 가변성에 관계없이, 알려진 농도를 표적 부위에 제공한다. 개선된 투약 조절은 또한 직접적인 전달 방식에 의해 제공된다.
- [0405] MASP-2 억제제의 국부적 전달은 질환 또는 질병을 치료하는 수술 방법의 맥락에서, 예를 들어, 동맥 바이패스 수술, 중족 절제술, 레이저 수술, 초음파 수술, 기구 혈관 성형 (balloon angioplasty), 스텐트 (stent) 배치와 같은 수술 중에 달성될 수도 있다. 예를 들어, MASP-2 억제제는 기구 혈관 성형술과 함께 대상체에 투여될

수 있다. 기구 혈관 성형술은 수축된 풍선을 갖는 카테터를 동맥으로 삽입하는 단계를 수반한다. 수축된 풍선은 동맥경화 플라크 근처에 위치하고 플라크가 혈관 벽에 압축되도록 팽창된다. 결과로서, 풍선 표면은 혈관의 표면의 혈관 내피 세포의 층과 접촉된다. MASP-2 억제제는 동맥경화 플라크의 부위에 약제의 방출을 허용하는 방식으로 기구 혈관 성형 카테터에 부착될 수도 있다. 약제는 업계에 알려진 표준 과정에 따라 풍선 카테터에 부착될 수도 있다. 예를 들어, 약제는 풍선이 팽창될 때까지 풍선 카테터의 구획에 저장될 수도 있으며, 그것은 이 시점에 국부적 환경으로 방출된다. 대안으로, 약제는 풍선이 팽창된 동맥 벽의 세포에 접촉된, 풍선 표면에 침투될 수도 있다. 약제는 또한 Flugelman, M.Y., et al., Circulation 85:1110-1117, 1992에 개시된 것들과 같은 천공 풍선 카테터에서 전달될 수도 있다. 또한 기구 혈관 성형 카테터에 치료 단백질을 부착시키는 전형적인 수술에 대하여 공개된 PCT 출원 WO 95/23161을 참고하면 된다. 유사하게, MASP-2 억제제는 스텐트에 적용된 겔 또는 폴리머 코팅에 포함될 수도 있거나, 혈관 배치 후 MASP-2 억제제를 용출시키는 스텐트의 물질에 통합될 수도 있다.

[0406] 관절염 및 다른 근골격 장애의 치료에 사용된 MASP-2 억제 조성물은 동맥 내 주사에 의해 국부적으로 전달될 수도 있다. 이러한 조성물은 지속적인 방출 전달 비히클을 적합하게 포함할 수도 있다. 국부적 전달이 필요할 수도 있는 경우의 추가적 예로서, 비노생식기 질병의 치료에 사용된 MASP-2 억제 조성물은 수포 내 또는 또 다른 비노생식기 구조 내에 적합하게 주입될 수도 있다.

[0407] 의료 기기의 코팅

[0408] 항체 및 억제 펩티드와 같은 MASP-2 억제제는 이식형 또는 부착형 의료 기기의 표면상에 (또는 내에) 고정될 수도 있다. 변형된 표면은 전형적으로 동물체 내에 이식 후 살아있는 조직과 접촉될 것이다. "이식형 또는 부착형 의료 기기"는 장치 (예를 들어, 스텐트 및 이식형 약물 전달 장치)의 정상 작동 중에, 동물체의 조직에 이식되거나 부착되는 어떤 장치일 수도 있다. 이러한 이식형 또는 부착형 의료 기기는, 예를 들어, 니트로셀룰로스, 디아조셀룰로스, 유리, 폴리스티렌, 폴리비닐클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리에틸렌, 텍스트란, 세파로스, 한천, 녹말, 나일론, 스테인레스 강, 티타늄 및 생분해성 및/또는 생체적합성 폴리머로 만들어질 수 있다. 장치에 단백질의 결합은 결합된 단백질의 생물학적 활성을 파괴하지 않는 어떤 기술에 의해서, 예를 들어, 장치에 단백질 중 N- C-말단 잔기 중 하나 또는 둘 다를 부착시킴으로써 동반될 수 있다. 부착은 또한 단백질의 하나 이상의 내부 부위에서 이루어질 수도 있다. 다수의 부착 (단백질의 내부 및 끝 둘 다에)이 또한 사용될 수도 있다. 이식형 또는 부착형 의료 기기의 표면은 그것에 단백질 고정을 위해 작용기 (예를 들어, 카르복실, 아미드, 아미노, 에테르, 히드록실, 시아노, 니트리도, 술폰아미드, 아세틸렌, 에폭시드, 실란, 무수, 숙신산, 아지도)를 포함하도록 변형될 수 있다. 커플링 화학 반응은 에스테르, 에테르, 아미드, 아지도 및 술폰아미드 유도체의 형성, 시안산염 및 MASP-2 항체 또는 억제 펩티드에서 이용 가능한 작용기에 다른 결합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. MASP-2 항체 또는 억제 단편은 또한 GST (D.B. Smith and K.S. Johnson, Gene 67:31, 1988), 폴리히스티딘 (E. Hochuli et al., J. Chromatog. 411:77, 1987), 또는 비오틴과 같은 단백질에 친화도 태그 서열의 추가에 의해 비-공유결합에 의해 부착될 수 있다. 이러한 친화도 태그는 장치에 단백질의 가역적인 부착에 사용될 수도 있다.

[0409] 단백질은 또한 장치 본체의 표면에 공유결합에 의해, 예를 들어, 의료 기기의 표면의 공유결합에 의한 활성화에 의해 부착될 수 있다. 대표적인 예의 방법에 의해, 모세포 단백질(들)은 반응기의 다음 쌍 (장치 본체의 표면에 존재하는 쌍의 한 멤버, 및 모세포 단백질(들)에 존재하는 쌍의 다른 멤버) 중 어느 하나에 의해서도 장치 본체에 부착될 수 있다: 에스테르 결합을 수득하는 히드록실/카르복실산; 에스테르 결합을 수득하는 히드록실/무수물; 우레탄 결합을 수득하는 히드록실/이소시아네이트. 유용한 반응기를 소유하지 않는 장치 본체의 표면은 모세포 단백질(들)의 침착을 허용하는 반응기를 발생시키기 위해 에칭하는 (etching) 고주파 방전 혈장 (RFGD)이 처리될 수 있다 (예를 들어, 산소-함유 기를 도입하기 위해 산소 혈장을 처리; 아민 기를 도입하기 위해 프로필아미노 혈장을 처리).

[0410] 안티센스, RNAi- 또는 DNA- 암호화 펩티드 억제제와 같은 핵산 분자를 포함하는 MASP-2 억제제는 장치 본체에 부착된 다공성 매트릭스 (다공성 매트릭스)에 임베딩될 (embedded) 수 있다. 표면층을 만드는데 유용한 대표적인 다공성 매트릭스는 다양한 상업적 공급원 (예를 들어, Sigma 및 Collagen Corporation)으로부터 얻을 수도 있는 힘줄 또는 피부 콜라겐으로부터 제조된 것들, 또는 4,394,370, 및 Koezuka에 대하여 4,975,527에 설명된 바와 같이 제조된 콜라겐 매트릭스이다. 한 콜라겐성 물질은 UltraFiber™으로 불리고 Norian Corp. (Mountain View, California)에서 얻을 수 있다.

[0411] 특정 폴리머 매트릭스가 또한, 원하면, 이용될 수도 있고 예를 들어, Urist에 대한 미국 특허 번호 4,526,909

및 4,563,489에 개시된 바와 같이, 아크릴 에스테르 폴리머 및 젯산 폴리머를 포함한다. 유용한 폴리머의 특정 예는 오르토에스테르, 무수물, 프로필렌-코푸마레이트의 것들, 또는 하나 이상의 α -히드록시 카르복실산 모노머 (예를 들어, α -히드록시 아세트산 (글리콜산) 및/또는 α -히드록시 프로피온산 (젯산))의 폴리머이다.

[0412] **치료 식이 요법**

[0413] 예방적 적용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상에 걸릴 위험을 제거하거나 감소시키기 위해 충분한 양으로 MASP-2-의존적 보체 활성화와 관련된 질병에 민감하거나, 그렇지 않으면 이에 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 적용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 완화하거나 적어도 부분적으로 감소시키기 위해 충분한 치료적 유효량으로 MASP-2-의존적 보체 활성화와 관련된 질병으로 의심되거나, 이미 고통받고 있는 대상체에 투여된다. 예방적 및 치료적 식이 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 충분한 치료적 결과가 대상체에서 달성될 때까지 다 회수 투약량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 급성 질병, 예를 들어, 재관류 손상 또는 다른 외상적 손상을 치료하기 위해 조성물의 일 회 투여, 또는 투여의 제한된 순서에 의해 수행될 수도 있다. 대안으로, 조성물은 만성 질병, 예를 들어, 관절염 또는 건선 (psoriasis)을 치료하는 연장된 기간 동안 주기적인 간격으로 투여될 수도 있다.

[0414] 본 발명의 방법 및 조성물은 염증 및 전형적으로 진단적 및 치료적 의료 방법 및 수술 과정으로부터 발생하는 관련 절차를 억제하기 위해 사용될 수도 있다. 이러한 절차를 억제하기 위해, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 절차적으로 적용될 수도 있다. 여기에 사용된 바와 같이 "절차적으로"는 절차 전에 및/또는 절차 중에 및/또는 절차 후에, 즉, 절차 전에, 절차 전 및 중에, 절차 전 및 후에, 절차 전, 중 및 후에, 절차 중에, 절차 전 및 후에, 또는 절차 후에 억제 조성물의 투여를 나타낸다.

[0415] 절차 전후 적용은 수술 부위 또는 절차 부위에 조성물의 국부적 투여에 의해, 예를 들어, 주사 또는 부위의 지속적인 또는 간헐적 세척에 의해 또는 전신성 투여에 의해 수행될 수도 있다. MASP-2 억제제 용액의 국부적 수술 전후 전달에 적합한 방법은 Demopulos에 대하여 미국 특허 번호 6,420,432 및 Demopulos에 대하여 6,645,168에 개시된다. MASP-2 억제제(들)를 포함하는 연골보호 조성물의 국부적 전달에 적합한 방법 및 조성물은 국제 PCT 특허 출원 WO 01/07067 A2에 개시된다. MASP-2 억제제(들)를 포함하는 연골보호 조성물의 표적화된 전신성 전달에 적합한 방법 및 조성물은 국제 PCT 특허 출원 WO 03/063799 A2에 개시된다.

[0416] 본 발명의 한 양태에서, 약학적 조성물은 질병의 증상에 걸릴 위험을 제거하거나 감소시키기 위해 충분한 양으로 PNH에 민감하거나, 그렇지 않으면 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 적용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 완화하거나, 적어도 부분적으로 감소시키기 위해 충분한 치료적 유효량으로 PNH로 의심되거나, 이미 고통받고 있는 대상체에 투여된다.

[0417] 구체예에서, 대상체의 적혈구는 조성물의 부재시 C3의 단편에 의해 옅소닌화되고, 대상체에 MASP-2 억제제를 포함하는 조성물의 투여는 대상체에서 적혈구의 생존을 증가시킨다. 한 구체예에서, 대상체는 (i) 정상 수준 이하의 헤모글로빈, (ii) 정상 수준 이하의 혈소판; (iii) 정상 수준 이상의 망상적혈구, 및 (iv) 정상 수준 이상의 빌리루빈으로 구성된 그룹으로부터 선택된 조성물의 부재시 하나 이상의 증상을 나타내고, 대상체에 조성물의 투여는 (i) 증가된, 정상, 또는 거의 정상 수준의 헤모글로빈 (ii) 증가된, 정상, 또는 거의 정상 수준의 혈소판, (iii) 감소된, 정상, 또는 거의 정상 수준의 망상적혈구, 및/또는 (iv) 감소된, 정상, 또는 거의 정상 수준의 빌리루빈을 발생시키는 증상 중 적어도 하나를 개선한다.

[0418] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료적 결과가 달성될 때까지 다 회수 투약량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하며, 이것은 0.1 mg 내지 10,000 mg, 더 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 더 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투약량으로 성인 환자 (예를 들어, 70 kg의 평균 성인 체중)에게 적합하게 투여될 수도 있다. 소아 환자에 대하여, 투약량은 환자의 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 PNH의 치료를 위해 조성물의 일 회 투여, 또는 투여의 제한된 순서에 의해 수행될 수도 있다. 대안으로, 조성물은 PNH를 치료하는 연장된 기간 동안 주기적인 간격으로, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다 투여될 수도 있다.

[0419] 일부 구체예에서, PNH로 고통받는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로 치료를 이전에 경험했거나, 현재 경험하고 있다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 포함하는 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하는 단계 및 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 대상체에 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 사람화된 항-C5 항체 또는 항원-결합 이들의 단편이다.

일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에컬리주맙이다.

- [0420] 본 발명의 한 양태에서, 약학적 조성물은 질병의 증상에 걸릴 위험을 제거하거나 감소시키기 위해 충분한 양으로 aHUS에 민감하거나, 그렇지 않으면 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 적용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 완화하거나, 적어도 부분적으로 감소시키기 위해 충분한 치료적 유효량으로 aHUS로 의심되거나, 이미 고통받고 있는 대상체에 투여된다. 본 발명의 한 양태에서, 투여 전에, 대상체는 대상체가 (i) 빈혈증, (ii) 혈소판감소증 (iii) 신부전 및 (iv) 크레아티닌의 증가를 포함하는, aHUS의 하나 이상의 증상을 나타내는 지 결정하기 위해 시험 될 수도 있고 본 발명의 조성물은 이들 증상(들)을 개선하기 위한 유효량으로 및 충분한 기간 동안 투여된다.
- [0421] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 aHUS에 걸릴 증가된 위험이 있는 대상체를 예방적으로 치료하기 위해 사용되고 그로 인해 대상체가 aHUS를 전달할 가능성을 감소시킬 수도 있다. aHUS와 관련된 것으로 알려진 대상체의 유전적 마커의 존재는 대상체로부터 얻은 샘플에서 유전적 스크리닝 테스트를 수행하고 aHUS, 보체 인자 H (CFH), 인자 I (CFI), 인자 B (CFB), 막 보조인자 CD46, C3, 보체 인자 H-관련 단백질 (CFHR1), 항 응고 단백질 트롬보스플린 (THBD), 보체 인자 H-관련 단백질 3 (CFHR3) 또는 보체 인자 H-관련 단백질 4 (CFHR4)와 관련된 적어도 하나의 유전적 마커의 존재를 확인함으로써 처음 결정된다. 대상체는 빈혈증, 혈소판감소증, 신부전 및 크레아티닌의 증가와 같은, aHUS의 적어도 하나의 증상의 존재 또는 부재를 결정하기 위해 주기적으로 관찰된다 (예를 들어, 매달, 분기별로, 1년에 두 번 또는 1년에 한 번). 이들 증상 중 적어도 하나의 존재의 결정시, 대상체는 상기 하나 이상의 증상을 개선하기 위한 유효량으로 및 충분한 기간 동안 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하는 MASP-2 억제제의 유효량이 투여될 수 있다. 본 발명의 추가적 양태에서, aHUS와 관련된 유전적 마커 중 하나를 갖는 것으로 스크리닝 되고 결정됨으로 인해 aHUS에 걸릴 증가된 위험이 있는 대상체는 약물 노출, 감염 (예를 들어, 박테리아 감염), 악성 종양, 손상, 기관 또는 조직 이식 및 임신을 포함하는, aHUS를 촉발하는 임상적 증상과 관련된 사건의 발생에 대하여 관찰될 수도 있다.
- [0422] 본 발명의 추가적 양태에서, MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하는 MASP-2 억제제의 유효량을 포함하는 조성물은 감염에 2차적인 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS)으로 고통받거나 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여될 수 있다. 예를 들어, 에스. 뉴모니아 감염에 관련된 비-장의 aHUS로 고통받거나 걸릴 위험이 있는 환자는 본 발명의 조성물로 치료될 수도 있다.
- [0423] 본 발명의 추가적 양태에서, aHUS로 고통받는 대상체는 초기에 1시간, 12시간, 1일, 2일 또는 3일과 같은 1차 기간 동안, 카테터 라인, 예를 들어, 정맥 내 카테터 라인 또는 피하에 카테터 라인을 통해 투여되는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있다. 대상체는 2차 기간 동안 규칙적인 피하 주사, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다, 주사를 통해 투여된 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있다.
- [0424] 본 발명의 추가적 양태에서, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 혈장 기증자, 또는 혈장반출법에 불리한 대상체, 또는 혈장반출법을 이용할 수 없는 설정에서 출혈, 감염, 및 내재하는 장애 및/또는 알레르기에 노출을 포함하는, 혈장반출법의 잠재적 합병증을 막기 위해 혈장반출법의 부제시 aHUS로 고통받는 대상체 (즉, aHUS 증상이 혈장반출법으로 치료되지 않았고 MASP-2 억제 조성물로 치료 기간에 혈장반출법으로 치료되지 않은 대상체)에 투여될 수도 있다.
- [0425] 본 발명의 추가적 양태에서, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 aHUS로 고통받는 대상체에 투여될 수도 있으며, 혈장반출법으로 환자의 치료와 일치한다. 예를 들어, 혈장반출법 치료를 받은 대상체는 혈장 교환 후에 또는 교대로 MASP-2 억제 조성물이 투여될 수 있다.
- [0426] 본 발명의 추가적 양태에서, aHUS로 고통받거나 걸릴 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 주기적으로, 예를 들어, 12시간 마다 또는 매일 하나의 보체 인자의 수준을 결정함으로써 관찰될 수 있으며, 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 조성물로 지속적인 치료가 필요하다는 것을 나타낸다.
- [0427] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료적 결과가 달성될 때까지 다회수 투약량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하며, 이것은 0.1 mg 내지 10,000 mg, 더 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 더 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투약량으로 성인 환자 (예를 들어, 70 kg의 평균 성인 체중)에게 적합하게 투여될 수도 있다. 소아 환자에 대하여, 투약량은 환자의 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 aHUS의 치료를 위해, 조성물의 일 회

투여, 또는 투여의 제한된 순서에 의해 수행될 수도 있다. 대안으로, 조성물은 sHUS를 치료하는 연장된 기간 동안, 주기적인 간격으로, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다 투여될 수도 있다.

[0428] 일부 구체예에서, aHUS로 고통받는 대상체는 이전에 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로 치료를 이전에 경험했거나, 현재 경험하고 있다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 포함하는 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하고 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 대상체에 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 사람화된 항-C5 항체 또는 항원-결합 이들의 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에쿨리주맙이다.

[0429] 본 발명의 한 양태에서, 약학적 조성물은 질병의 증상에 걸릴 위험을 제거하거나 감소시키기 위해 충분한 양으로 HUS에 민감하거나, 그렇지 않으면 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 적용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 완화하거나, 적어도 부분적으로 감소시키기 위해 충분한 치료적 유효량으로 HUS로 의심되거나, 이미 고통받고 있는 대상체에 투여된다.

[0430] 본 발명의 또 다른 양태에서, HUS에 걸릴 위험이 있는 대상체에서 손상된 신기능에 걸릴 가능성은 MASP-2 의존적 보체 활성화를 억제하기 위한 유효량으로 본 발명의 MASP-2 억제 조성물을 대상체에 투여함으로써 감소될 수 있다. 예를 들어, HUS에 걸릴 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 설사, 혈관 내 적혈구 파괴의 스미어 증거의 30%보다 더 낮은 헤마토크리트 수준, 혈소판감소증 및 크레아티닌의 증가 수준을 포함하는, HUS와 관련된 하나 이상의 증상을 나타낼 수도 있다. 추가의 예로서, HUS에 걸릴 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 이. 콜리, 시겔라 또는 살모넬라로 감염될 수도 있다. 이. 콜리, 시겔라 또는 살모넬라로 감염된 이러한 대상체는 항생제 치료와 동시에 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있거나, 대안으로 특히 항생제 치료가 사용 금지된 장내 이. 콜리에 대해서는, 항생제로도 동시 치료하지 않고 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있다.

[0431] 항생제로 치료된 장내 이. 콜리로 감염된 대상체는 HUS에 걸릴 증가된 위험이 있을 수도 있고, 그 위험을 감소시키기 위해 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 적합하게 치료될 수도 있다. 장내 이. 콜리로 감염된 대상체는 1차 기간 동안 항생제의 부재시 본 발명의 MASP-2 억제 조성물 및 2차 기간 동안 본 발명의 MASP-2 억제 조성물 및 항생제로 치료될 수도 있다.

[0432] 본 발명의 추가적 양태에서, HUS로 고통받는 대상체는 1차 기간, 예를 들어, 1시간, 12시간, 1일, 2일 또는 3일 동안, 카테터 라인, 예를 들어, 정맥 내 카테터 라인 또는 피하에 카테터 라인을 통해 투여되는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 초기에 치료될 수도 있다. 대상체는 2차 기간 동안 규칙적인 피하에 주사, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다, 주사를 통해 투여되는 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있다.

[0433] 본 발명의 추가적 양태에서, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 혈장 기증자, 또는 혈장반출법에 불리한 대상체, 또는 혈장반출법을 이용할 수 없는 설정에서 출혈, 감염, 및 내재하는 장애 및/또는 알레르기에 노출을 포함하는, 혈장반출법의 잠재적 합병증을 막기 위해 혈장반출법의 부재시 HUS로 고통받는 대상체 (즉, aHUS 증상이 혈장반출법으로 치료되지 않았고 MASP-2 억제 조성물로 치료 기간에 혈장반출법으로 치료되지 않은 대상체)에 투여될 수도 있다.

[0434] 본 발명의 추가적 양태에서, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 혈장반출법으로 환자를 치료하는 동시에 HUS로 고통받는 대상체에 투여될 수도 있다. 예를 들어, 혈장반출법 치료를 받는 대상체는 혈장 교환 후에 또는 교대로 MASP-2 억제 조성물이 투여될 수 있다.

[0435] 본 발명의 추가적 양태에서, HUS로 고통받는 대상체 또는 걸릴 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 주기적으로, 예를 들어, 12시간 마다 또는 매일, 적어도 하나의 보체 인자의 수준을 결정함으로써 관찰될 수 있으며, 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 조성물로 지속적인 치료가 필요하다는 것을 나타낸다.

[0436] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료적 결과가 달성될 때까지 다회수 투약량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하며, 이것은 0.1 mg 내지 10,000 mg, 더 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 더 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투약량으로 성인 환자 (예를 들어, 70 kg의 평균 성인 체중)에 적합하게 투여될 수도 있다. 소아 환자에 대하여, 투약량은 환자의 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 HUS의 치료를 위해 조성물의 일 회 투

여, 또는 투여의 제한된 순서에 의해 수행될 수도 있다. 대안으로, 조성물은 HUS를 치료하는 연장된 기간 동안, 주기적인 간격으로, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다 투여될 수도 있다.

- [0437] 일부 구체예에서, HUS로 고통받는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로 치료를 이전에 경험했거나, 현재 경험하고 있다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 포함하는 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하고 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 사람화된 항-C5 항체 또는 항원-결합 이들의 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에콜리주맙이다.
- [0438] 본 발명의 한 양태에서, 약학적 조성물은 질병의 증상에 걸릴 위험을 제거하거나 감소시키기 위해 충분한 양으로 TTP에 민감하거나, 그렇지 않으면 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 적용에서, 약학적 조성물은 TTP로 의심되거나, 이미 고통받고 있는 대상체에 질병의 증상을 완화하거나, 적어도 부분적으로 감소시키기 위해 충분한 치료적 유효량으로 투여된다.
- [0439] 본 발명의 또 다른 양태에서, 중추 신경계 관여, 혈소판감소증, 중증 심장의 관여, 중증 폐 침범, 위장 경색 및 괴저를 포함하는, TTP의 증상 중 하나 이상을 나타내는 대상체는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있다. 본 발명의 또 다른 양태에서, ADAMTS13의 낮아진 수준을 갖는 것으로 결정되고 또한 (즉, 항체) ADAMTS13의 억제제의 존재에 대하여 양성으로 테스트된 대상체는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있다. 본 발명의 추가적 양태에서, ADAMTS13의 억제제의 존재에 대하여 양성으로 테스트된 대상체는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료와 동시에 면역억제제 (예를 들어, 코르티코스테로이드, 리툭산, 또는 시클로스포린)로 치료될 수도 있다. 본 발명의 추가적 양태에서, ADAMTS13의 감소된 수준을 갖는 것으로 결정되고 ADAMTS13의 억제제의 존재에 대하여 양성으로 테스트된 대상체는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료와 동시에 ADAMTS13으로 치료될 수도 있다.
- [0440] 본 발명의 추가적 양태에서, TTP로 고통받는 대상체는 1차 기간, 예를 들어, 1시간, 12시간, 1일, 2일 또는 3일 동안 카테터 라인, 예를 들어, 정맥 내 카테터 라인 또는 피하에 카테터 라인을 통해 투여되는 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 초기에 치료될 수도 있다. 대상체는 2차 기간 동안 규칙적인 피하에 주사, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다, 주사를 통해 투여되는 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있다.
- [0441] 본 발명의 추가적 양태에서, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 혈장 기증자, 또는 혈장반출법에 불리한 대상체, 또는 혈장반출법을 이용할 수 없는 설정에서 출혈, 감염, 및 내재하는 장애 및/또는 알레르기에 노출을 포함하는, 혈장반출법의 잠재적 합병증을 막기 위해 혈장반출법의 부재시 HUS로 고통받는 대상체 (즉, TTP 증상이 혈장반출법으로 치료되지 않았고 MASP-2 억제 조성물로 치료 기간에 혈장반출법으로 치료되지 않은 대상체)에 투여될 수도 있다.
- [0442] 본 발명의 추가적 양태에서, 본 발명의 MASP-2 억제 조성물은 혈장반출법으로 환자를 치료하는 동시에 TTP로 고통받는 대상체에 투여될 수도 있다. 예를 들어, 혈장반출법 치료를 받는 대상체는 혈장 교환 후에 또는 교대로 MASP-2 억제 조성물이 투여될 수 있다.
- [0443] 본 발명의 추가적 양태에서, 난치성 TTP, 즉, 혈장반출법과 같은 다른 치료에 충분히 반응하지 않는 TTP의 증상으로 고통받는 대상체는 추가적인 혈장반출법과 함께 또는 없이 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있다.
- [0444] 본 발명의 추가적 양태에서, TTP로 고통받거나 걸릴 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 주기적으로, 예를 들어, 12시간 마다 또는 매일, 적어도 하나의 보체 인자의 수준을 결정함으로써 관찰될 수 있으며, 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 적어도 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 조성물로 지속적인 치료가 필요하다는 것을 나타낸다.
- [0445] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료적 결과가 달성될 때까지 억제제 다회수 투약량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하며, 성인 환자 (예를 들어, 70 kg의 평균 성인 체중)에 0.1 mg 내지 10,000 mg, 더 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 더 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투약량으로 적합하게 투여될 수도 있다. 소아 환자에 대하여, 투약량은 환자의 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 TTP의 치료를 위해 조성물의 일 회 투여, 또는 투여의 제한된 순서에 의해 수행될 수도 있다. 대안으로, 조성물은 TTP를 치료하는 연장된 기간 동안 주기적인 간격으로, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다 투여될 수도 있다.

- [0446] 일부 구체예에서, TTP로 고통받는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로 치료를 이전에 경험했거나, 현재 경험하고 있다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 포함하는 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하고 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 사람화된 항-C5 항체 또는 항원-결합 이들의 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에콜리주맙이다.
- [0447] 본 발명의 한 양태에서, 약학적 조성물은 질병의 증상에 걸릴 위험을 제거하거나 감소시키기 위해 충분한 양으로 한랭 응집소병 또는 한랭글로불린혈증에 민감하거나, 그렇지 않으면 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 적용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 완화하거나, 적어도 부분적으로 감소시키기 위해 충분한 치료적 유효량으로 한랭 응집소병 또는 한랭글로불린혈증으로 의심되거나, 이미 고통받고 있는 대상체에 투여된다.
- [0448] 본 발명의 추가적 양태에서, 한랭 응집소병 또는 한랭글로불린혈증으로 고통받거나 걸릴 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 주기적으로, 예를 들어, 12시간 마다 또는 매일, 적어도 하나의 보체 인자의 수준을 결정함으로써 관찰될 수 있으며, 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 조성물로 지속적인 치료가 필요하다는 것을 나타낸다.
- [0449] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료적 결과가 달성될 때까지 억제제 다회수 투약량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하며, 이것은 0.1 mg 내지 10,000 mg, 더 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 더 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투약량으로 성인 환자 (예를 들어, 70 kg의 평균 성인 체중)에 적합하게 투여될 수도 있다. 소아 환자에 대하여, 투약량은 환자의 체중에 비례하여 조정될 수 있다.
- [0450] 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 한랭 응집소병 또는 한랭글로불린혈증의 치료를 위해 조성물의 일 회 투여, 또는 투여의 제한된 순서에 의해 수행될 수도 있다. 대안으로, 조성물은 한랭 응집소병 또는 한랭글로불린혈증을 치료하는 연장된 기간 동안 주기적인 간격으로, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다 투여될 수도 있다.
- [0451] 일부 구체예에서, 한랭 응집소병 또는 한랭글로불린혈증으로 고통받는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로 치료를 이전에 경험했거나, 현재 경험하고 있다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 포함하는 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하고 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 사람화된 항-C5 항체 또는 항원-결합 이들의 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에콜리주맙이다.
- [0452] 본 발명의 한 양태에서, 약학적 조성물은 질병의 증상에 걸릴 위험을 제거하거나 감소시키기 위해 충분한 양으로 녹내장에 민감하거나, 그렇지 않으면 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 적용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 완화하거나, 적어도 부분적으로 감소시키기 위해 충분한 치료적 유효량으로 녹내장으로 의심되거나, 이미 고통받고 있는 대상체에 투여된다.
- [0453] 본 발명의 추가적 양태에서, 녹내장으로 고통받거나 걸릴 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 주기적으로, 예를 들어, 12시간 마다 또는 매일, 적어도 하나의 보체 인자의 수준을 결정함으로써 관찰될 수 있으며, 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 조성물로 지속적인 치료가 필요하다는 것을 나타낸다.
- [0454] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료적 결과가 달성될 때까지 억제제 다회수 투약량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하며, 이것은 0.1 mg 내지 10,000 mg, 더 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 더 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투약량으로 성인 환자 (예를 들어, 70 kg의 평균 성인 체중)에 적합하게 투여될 수도 있다. 소아 환자에 대하여, 투약량은 환자의 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 녹내장의 치료를 위해 조성물의 일 회 투여, 또는 투여의 제한된 순서에 의해 수행될 수도 있다. 대안으로, 조성물은 녹내장을 치료하는 연장된 기간 동안 주기적인 간격으로, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다 투여될 수도 있다.
- [0455] 일부 구체예에서, 녹내장으로 고통받는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로 치료를 이전에 경험했거나, 현재 경험하고 있다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 포함하는 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하고 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 추가로 투여하는 단계를

포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 사람화된 항-C5 항체 또는 항원-결합 이들의 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에쿨리주맵이다.

[0456] 본 발명의 한 양태에서, 약학적 조성물은 질병의 증상에 걸릴 위험을 제거하거나 감소시키기 위해 충분한 양으로 급성 방사선 증후군으로 고통받거나 걸릴 위험이 있는 대상체에 투여된다. 치료적 적용에서, 약학적 조성물은 질병의 증상을 완화하거나, 적어도 부분적으로 감소시키기 위해 충분한 치료적 유효량으로 급성 방사선 증후군으로 의심되거나, 이미 고통받고 있는 대상체에 투여된다. 대상체는 방사선에 노출, 예를 들어, 암성 질병의 치료를 위한 방사선 노출 전에 또는 후에 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료될 수도 있는 한편, 에너지 생성 식물 또는 연구실에서 방사성 물질을 가지고 일할 때, 또는 핵 사고, 테러 활동 또는 전쟁으로부터 발생하는 방사선 노출로 인해 방사선으로 오염된 부위를 정화한다. 본 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제 조성물은 방사선 조사 후 24 내지 48시간 내에 투여된다.

[0457] 본 발명의 추가적 양태에서, 급성 방사선 증후군으로 고통받거나 걸릴 위험이 있고 본 발명의 MASP-2 억제 조성물로 치료되는 대상체는 주기적으로, 예를 들어, 12시간 마다 또는 매일, 적어도 하나의 보체 인자의 수준을 결정함으로써 관찰될 수 있으며, 하나의 보체 인자의 감소된 수준의 결정은 표준 값 또는 건강한 대상체와 비교하여 조성물로 지속적인 치료가 필요하다는 것을 나타낸다.

[0458] 예방적 및 치료적 요법 둘 다에서, MASP-2 억제제를 포함하는 조성물은 대상체에서 충분한 치료적 결과가 달성될 때까지 억제제 다회수 투약량으로 투여될 수도 있다. 본 발명의 한 구체예에서, MASP-2 억제제는 항-MASP-2 항체를 포함하며, 이것은 0.1 mg 내지 10,000 mg, 더 적합하게 1.0 mg 내지 5,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 2,000 mg, 더 적합하게 10.0 mg 내지 1,000 mg 및 더 적합하게 50.0 mg 내지 500 mg의 투약량으로 성인 환자 (예를 들어, 70 kg의 평균 성인 체중)에 적합하게 투여될 수도 있다. 소아 환자에 대하여, 투약량은 환자의 체중에 비례하여 조정될 수 있다. 본 발명의 MASP-2 억제 조성물의 적용은 급성 방사선 증후군의 치료를 위해 조성물의 일 회 투여, 또는 투여의 제한된 순서에 의해 수행될 수도 있다. 대안으로, 조성물은 급성 방사선 증후군을 치료하는 연장된 기간 동안 주기적인 간격으로, 예를 들어, 매일, 2주마다, 매주, 격주로, 매달 또는 2달마다 투여될 수도 있다.

[0459] 일부 구체예에서, 급성 방사선 증후군으로 고통받는 대상체는 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제로 치료를 이전에 경험했거나, 현재 경험하고 있다. 일부 구체예에서, 방법은 MASP-2 억제제를 포함하는 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하고 보체 단백질 C5의 절단을 억제하는 말단 보체 억제제를 추가로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 사람화된 항-C5 항체 또는 항원-결합 이들의 단편이다. 일부 구체예에서, 말단 보체 억제제는 에쿨리주맵이다.

[0460] VI. 실시예

[0461] 다음 실시예는 단지 본 발명의 실행을 위해 현재 고려된 최고의 방식을 설명하지만, 본 발명을 제한하는 것으로 생각되어서는 안 된다. 여기에서 모든 문헌 인용은 분명히 참고로 포함된다.

[0462] 실시예 1

[0463] 이 실시예는 MASP-2가 결핍되지만 (MASP-2^{-/-}) M_{Ap}19 (M_{Ap}19^{+/+})가 충분한 마우스 균주의 발생을 설명한다.

[0464] **재료 및 방법:** 표적화 벡터 pKO-NTKV 1901을 도 3에 나타난 바와 같이, 세린 프로테아제 도메인을 암호화하는 엑손을 포함하는, 쥐 MASP-2의 C-말단 끝을 암호화하는 세 개의 엑손을 절단하도록 설계하였다. 쥐 ES 세포주 E14.1a (SV129 Ola)를 트랜스펙션 (transfection)하기 위해 PKO-NTKV 1901을 사용하였다. 네오마이신-저항성 및 티미딘 키나제-민감성 클론을 선택하였다. 600 ES 클론을 스크리닝하였고, 이들 중에, 네 개의 다른 클론을 확인하였고 도 3에 나타난 바와 같이, 예측된 선택적 표적화 및 재조합 사건을 함유하는지 서던 블롯 (southern blot)에 의해 입증하였다. 키메라를 배이식 (embryo transfer)에 의해 네 개의 양성 클론으로부터 발생시켰다. 키메라를 유전적 배경 C57/BL6에서 역교배하여 유전자 도입 수컷을 생성하였다. 유전자 도입 수컷을 암컷과 교배시켜 붕괴된 MASP-2 유전자에 대하여 이형 접합성을 나타내는 자손의 50%인 F1을 생성하였다. 이형 접합성 마우스를 이중 교배하여 동형 접합성 MASP-2 결핍 자손을 발생시키며, 각각 1:2:1의 비율로 이형 접합성 및 야생형 마우스를 발생시켰다.

[0465] **결과 및 표현형:** 결과의 동형 접합성 동형 접합성 MASP-2^{-/-} 결핍 마우스는 생존 가능하고 번식 가능한 것으로 발견되었고 올바른 표적화 사건을 확인하기 위해 서던 블롯에 의해, MASP-2 mRNA의 부재를 확인하기 위해 노던 블롯 (Northern blot)에 의해, MASP-2 단백질의 부재를 확인하기 위해 웨스턴 블롯에 의해 (데이터 미도시) MASP-2가 결핍된 것으로 입증되었다. M_{Ap}19 mRNA의 존재 및 MASP-2 mRNA의 부재는 LightCycler 기계에서 시간-

분해 RT-PCR을 사용하여 추가로 확인하였다. MASP-2^{-/-} 마우스는 예상된 바와 같이 Map19, MASP-1, 및 MASP-3 mRNA 및 단백질을 계속해서 발현한다 (데이터 미도시). 프로퍼딘, 인자 B, 인자 D, C4, C2, 및 C3에 대하여 MASP-2^{-/-} 마우스에서 mRNA의 존재 및 부재를 LightCycler 분석에 의해 평가하였고 야생형 한배 새끼 대조군의 그것과 동일한 것으로 발견되었다 (데이터 미도시). 동형 접합성 MASP-2^{-/-} 마우스의 혈장은 실시예 2에 추가로 설명된 바와 같이 렉틴-경로-매개된 보체 활성화는 완전히 결핍된다.

[0466] 순수한 C57bL6 배경에서 MASP-2^{-/-} 균주의 발생: MASP-2^{-/-} 마우스를 실험 동물 모델로서 MASP-2^{-/-} 균주의 사용 전 9 세대 동안 순수한 C57bL6 라인과 역교배하였다.

[0467] 쥐 MASP-2^{-/-}, Map19^{+/+} 및 사람 MASP-2 이식 유전자를 발현하는 형질전환 마우스 균주 (쥐 MASP-2 녹아웃 (knock-out) 및 사람 MASP-2 녹인 (knock-in))는 또한 다음과 같이 발생하였다:

[0468] **재료 및 방법:** 사람 MASP-2 유전자의 프로모터 영역을 포함하는, "미니 hMASP-2"로 불리는, 사람 MASP-2를 암호화하는 코마우전자 (SEQ ID NO: 49)를 도 4에 나타난 바와 같이 구성하였으며, 처음 3개의 엑손 (엑손 1 내지 엑손 3)에 이어 다음 8개의 엑손의 암호화 서열을 나타내는 cDNA 서열을 포함하고, 그로 인해 내인성 프로모터에 의해 구동되는 전체 길이 MASP-2 단백질을 암호화한다. 미니 hMASP-2 구조를 결핍된 쥐 MASP-2 유전자를 이식에 의해 발현된 사람 MASP-2로 대체하기 위해 MASP-2^{-/-}의 수정란에 주입하였다.

[0469] **실시예 2**

[0470] 이 실시예는 MASP-2가 렉틴 경로를 통한 보체 활성화에 필요하다는 것을 입증한다.

[0471] **방법 및 재료:**

[0472] **렉틴 경로 특이적 C4 절단 검정:** C4 절단 검정은 Petersen, et al., J. Immunol. Methods 257:107 (2001)에 의해, L-피콜린에 결합하는, 에스. 아우레우스의 리포테이코산 (LTA)으로부터 발생하는 렉틴 경로 활성화를 측정하는 것으로 설명되었다. Petersen et al., (2001)에 의해 설명된 검정을 하기 설명된 바와 같이 MASP-2^{-/-} 마우스의 혈청을 추가하기 전 플레이트를 LPS 및 만난 또는 치모산으로 코팅함으로써 MBL을 통한 렉틴 경로 활성화를 측정하기 위해 적용하였다. 검정을 또한 고전적 경로로 인해 C4 절단의 가능성을 제거하도록 변형하였다. 이것을 1 M NaCl을 함유하는 샘플 희석 완충액을 사용함으로써 달성하였으며, 이것은 렉틴 경로 인식 성분의, 그것들의 리간드에 높은 친화도 결합을 허용하지만 내인성 C4의 활성화를 방지하고, 그로 인해 C1 복합체를 분리함으로써 고전적 경로의 참여를 제외한다. 간략히 설명하면, 변형된 검정에서, 혈청 샘플 (고염 (1 M NaCl) 완충액에 희석됨)이 리간드-코팅된 플레이트에 추가된 후, 이어서 생리학적 농도의 염이 들어있는 완충액 중에 정제된 C4의 일정한 양이 추가된다. MASP-2를 함유하는 결합된 인식 복합체는 C4를 절단하며, C4b 침착을 일으킨다.

[0473] 검정 방법:

[0474] 1) Nunc Maxisorb 미세역가 플레이트 (Maxisorb, Nunc, 제품 번호 442404, Fisher Scientific)를 1 µg/ml 만난 (M7504 Sigma) 또는 코팅 완충액 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)에 희석된 어떤 다른 리간드 (예를 들어, 예를 들어, 하기 나열된 것들)로도 코팅하였다.

[0475] 다음 약제를 검정에 사용하였다:

[0476] a. 만난 (100 µl 코팅 완충액 중의 1 µg/웰 만난 (M7504 Sigma));

[0477] b. 치모산 (100 µl 코팅 완충액 중의 1 µg/웰 치모산 (Sigma));

[0478] c. LTA (100 µl 코팅 완충액 중의 1 µg/웰 또는 20 µl 메탄올 중 2 µg/웰);

[0479] d. 코팅 완충액 중의 1 µg의 H-피콜린 특이적 Mab 4H5;

[0480] e. 에로코쿠스 비리단스 (Aerococcus viridans)의 PSA (100 µl 코팅 완충액 중 2 µg/웰);

[0481] f. 코팅 완충액 중의 100 µl/웰의 포르말린-고정된 에스. 아우레우스 DSM20233 (OD₅₅₀=0.5).

[0482] 2) 플레이트를 4 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다.

[0483] 3) 하룻밤 동안 배양 후, 잔여 단백질 결합 부위는 1-3시간 동안 플레이트를 0.1% HSA-TBS 차단 완충액 (10 mM Tris-CL, 140 mM NaCl, 1.5 mM NaN₃ 중에 0.1 부피% HSA, pH 7.5)과 함께 배양함으로써 포화되었고, 플레이트를

TBS/tween/Ca²⁺ (0.05% Tween 20 및 5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂가 들어있는 TBS, pH 7.4)으로 세 번 세척하였다.

[0484] 4) 테스트 되는 혈청 샘플을 MBL-결합 완충액 (1 M NaCl)에 희석하였고 희석된 샘플은 플레이트에 추가되어 4 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 완충액 만을 받은 웰을 음성 대조군으로 사용하였다.

[0485] 5) 4 °C에서 하룻밤 동안 배양 후, 플레이트를 TBS/tween/Ca²⁺로 세 번 세척하였다. 사람 C4 (BBS (4 mM 바비탈, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4)에 희석된 1 µg/ml 중 100 µl/웰)를 플레이트에 추가하였고 37 °C에서 90분 동안 배양하였다. 플레이트를 다시 TBS/tween/Ca²⁺로 세 번 세척하였다.

[0486] 6) C4b 침착을 알칼린 포스파타제-콘주게이트된 (conjugated) 닭 항-사람 C4c (TBS/tween/Ca²⁺에 1:1000 희석됨)로 검출하였으며, 이것을 플레이트에 추가하였고 상온에서 90분 동안 배양하였다. 플레이트를 다시 TBS/tween/Ca²⁺로 세 번 세척하였다.

[0487] 7) p-니트로페닐 포스페이트 기질 용액의 100 µl를 추가함으로써 알칼린 포스파타제를 검출하였으며, 상온에서 20분 동안 배양하고, 미세역가 플레이트 리더에서 OD₄₀₅를 측정하였다.

[0488] **결과:** 도 5a-b는 MASP-2+/+ (x 표), MASP-2+/- (폐쇄형 원) 및 MASP-2/- (폐쇄형 삼각형)의 혈청 희석 중 만난 (도 5a) 및 치모산 (도 5b)에 대한 C4b 침착의 양을 나타낸다. 도 5c는 야생형 혈청으로 정상화된 C4b 침착의 양의 측정에 기초하여 야생형 마우스 (n=5)에 비해 MASP-2-/+ 마우스 (n=5) 및 MASP-2/- 마우스 (n=4)의 치모산 (흰색 막대) 또는 만난 (회색 막대)으로 코팅된 플레이트의 상대적 C4 콘버타제 활성을 나타낸다. 에러 바 (error bar)는 표준 편차를 나타낸다. 도 5a-c에 나타난 바와 같이, MASP-2/- 마우스의 혈장은 만난 및 치모산 코팅된 플레이트에서 렉틴-경로-매개된 보체 활성화가 완전히 부족하다. 이들 결과는 MASP-2가 렉틴 경로의 효과기 성분이라는 것을 분명하게 입증한다.

[0489] **제조합 MASP-2는 MASP-2/- 마우스의 혈청에서 렉틴 경로-의존적 C4 활성화를 재구성한다**

[0490] MASP-2의 부재가 MASP-2/- 마우스의 렉틴 경로-의존적 C4 활성화의 손실의 직접적인 원인이었다는 것을 입증하기 위해, 혈청 샘플에 제조합 MASP-2 단백질의 추가의 효과를 상기 설명된 C4 절단 검정으로 조사하였다. 기능적 활성 쥐 MASP-2 및 촉매 불활성 쥐 MASP-2A (이것에서 세린 프로테아제 도메인의 활성-부위 세린 잔기를 알려진 잔기로 치환하였다) 제조합 단백질을 하기 실시예 3에 설명된 바와 같이 생산하였고 정제하였다. 4개의 MASP-2 -/- 마우스의 모집된 혈청을 재배양하였다. 증가한 농도의 제조합 쥐 MASP-2 또는 불활성 제조합 쥐 MASP-2A와 함께 배양하였고 C4 콘버타제 활성을 상기 설명된 바와 같이 검정하였다.

[0491] **결과:** 도 6에 나타난 바와 같이, MASP-2 -/- 마우스로부터 얻은 혈청에 기능적 활성 쥐 제조합 MASP-2 단백질의 추가는 단백질 농도 의존적 방식으로 렉틴 경로-의존적 C4 활성화를 회복시켰던 반면에, 효소 불활성 쥐 MASP-2A 단백질 (별표로 나타남)은 C4 활성화를 회복시키지 않았다. 도 6에 나타난 결과를 모집된 야생형 마우스 혈청과 함께 관찰된 C4 활성화로 표준화한다 (점선으로 나타남).

[0492] **실시예 3**

[0493] 이 실시예는 제조합 전체 길이 사람, 래트 및 쥐 MASP-2, MASP-2 유도된 폴리펩티드, 및 MASP-2의 효소 불활성 돌연변이 형태의 제조합 발현 및 단백질 생산을 설명한다.

[0494] **전체 길이 사람, 쥐 및 래트 MASP-2의 발현:**

[0495] 사람 MASP-2 (SEQ ID NO: 4)의 전체 길이 cDNA 서열을 또한 포유동물 발현 벡터 pCI-Neo (Promega)에 서브클로닝 (subcloning)하였으며, 이것은 CMV 인핸서/프로모터 영역의 조절 하에 진핵세포 발현을 구동한다 (Kaufman R.J. et al., Nucleic Acids Research 19:4485-90, 1991; Kaufman, Methods in Enzymology, 185:537-66 (1991)에 설명됨). 전체 길이 마우스 cDNA (SEQ ID NO: 50) 및 래트 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO: 53)를 각각 pED 발현 벡터에 서브클로닝하였다. MASP-2 발현 벡터를 Maniatis et al., 1989에 설명된 표준 갈습 포스페이트 트랜스펙션 과정을 사용하여 부작성 중국 햄스터 난소 세포주 DXB1에 트랜스펙션하였다. 이들 구조로 트랜스펙션된 세포는 매우 느리게 성장했고, 암호화된 프로테아제가 세포 독성이라는 것을 나타낸다.

[0496] 또 다른 접근에서, 그것의 내인성 프로모터에 의해 구동되는 MASP-2의 사람 cDNA를 함유하는 꼬마유전자 구조 (SEQ ID NO: 49)는 중국 햄스터 난소 세포 (CHO)에 일시적으로 트랜스펙션된다. 사람 MASP-2 단백질은 하기 설

명된 바와 같이 배양 배지로 분리되고 분리된다.

[0497] **전체 길이 촉매 불활성 MASP-2의 발현:**

[0498] **근거:** MASP-2는 인식 하위 성분 MBL 또는 피콜린 (L-피콜린, H-피콜린 또는 M-피콜린)이 그것들의 각각의 탄수화물 패턴에 결합한 후 자가 촉매 절단에 의해 활성화된다. MASP-2의 활성화를 일으키는 자가 촉매 절단은 혈청의 MASP-2의 분리 과정 중에, 또는 재조합 발현에 이은 정제 중에 종종 발생한다. 항원으로 사용되는 더 안정한 단백질 조제물을 얻기 위해, MASP-2A로 지정된, MASP-2의 촉매 불활성 형태를 프로테아제 도메인의 촉매 트라이어드 (triad)에 존재하는 세린 잔기를 래트 (SEQ ID NO: 55 Ser617을 Ala617로); 마우스 (SEQ ID NO: 52 Ser617을 Ala617로); 또는 사람 (SEQ ID NO: 3 Ser618에서 Ala618로)의 알라닌 잔기로 대체함으로써 생성하였다.

[0499] 촉매 불활성 사람 및 쥐 MASP-2A 단백질을 발생시키기 위해, 부위-관련 돌연변이 생성을 표 5에 나타난 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수행하였다. 표 5의 올리고뉴클레오티드를 효소 활성 세린을 암호화하는 사람 및 쥐 cDNA의 영역을 어닐링하도록 설계하였고 올리고뉴클레오티드는 알라닌 코돈으로 세린 코돈을 변화시키기 위한 미스매치 (mismatch)를 함유한다. 예를 들어, PCR 올리고뉴클레오티드 SEQ ID NOS: 56-59를 Ser618을 함유하는 돌연변이된 MASP-2A에서 Ala618 돌연변이의 완벽한 오픈 리딩을 발생시키는 시작 코돈에서 효소 활성 세린 및 세린에서 종결 코돈의 영역을 증폭하기 위해 사람 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO: 4)와 조합하여 사용하였다. PCR 생성물을 아가로스 겔 전기영동 및 밴드 제조 후 정제하였고 표준 테일링 (tailing) 과정을 사용하여 단일 아데노신 중점을 발생시켰다. 아데노신 테일링된 MASP-2A를 pGEM-T 이지 벡터 (easy vector)에 클로닝하였고, 이. 콜리에 형질전환하였다.

[0500] 촉매 불활성 래트 MASP-2A 단백질을 등몰량으로 SEQ ID NO: 64 및 SEQ ID NO: 65를 결합시키고, 100 °C에서 2 분 동안 가열하고 서서히 상온으로 냉각함으로써 이들 두 개의 올리고뉴클레오티드를 키나징 (kinasing)하고 어닐링하였다. 결과의 어닐링된 단편은 호환 가능한 끝을 갖고 래트 MASP-2A를 발생시키기 위해 야생형 래트 MASP-2 cDNA (SEQ ID NO: 53)의 Pst1-Xba1 단편의 위치에 삽입하였다.

[0501] 5' GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3' (SEQ ID NO: 64)

[0502] 5' CTAGAAACACTAATGCCCTCTCGCTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO: 65)

[0503] 하기 설명된 바와 같이 사람, 쥐 및 래트 MASP-2를 각각 추가로 포유동물 발현 벡터 pED 또는 pCI-Neo 중 하나에 서브클로닝하였고 중국 햄스터 난소 세포주 DXB1에 트랜스펙션하였다.

[0504] 또 다른 접근에서, MASP-2의 촉매 불활성 형태를 Chen et al., J. Biol. Chem., 276(28):25894-25902, 2001에 설명된 방법을 사용하여 구성한다. 간략히 말해서, 전체 길이 사람 MASP-2 cDNA를 함유하는 플라스미드 (Thiel et al., Nature 386:506, 1997에 설명됨)를 Xho1 및 EcoR1로 분해하였고 MASP-2 cDNA (여기에 SEQ ID NO: 4로 설명됨)를 pFastBaCl 바콜로바이러스 (baculovirus) 전송 벡터 (Life Technologies, NY)의 해당 인식 부위에 클로닝한다. Ser618의 MASP-2 세린 프로테아제 활성 부위는 불활성 프로테아제 도메인을 가진 MASP-2 전체 길이 폴리펩티드를 생성하기 위해 펩티드 영역 아미노산 610-625 (SEQ ID NO: 13)를 암호화하는 이중-가닥 올리고뉴클레오티드를 원래의 영역 아미노산 610 내지 625로 치환시킴으로써 Ala618로 변화된다.

[0505] **사람 MASP-2로부터 유도된 폴리펩티드 영역을 함유하는 발현 플라스미드의 구조.**

[0506] MASP-2의 다양한 도메인을 분리하기 위해 MASP-2 신호 펩티드 (SEQ ID NO: 5)의 잔기 1-15)를 사용하여 다음 구조가 생성된다. 사람 MASP-2 CUBI 도메인 (SEQ ID NO: 8)을 발현하는 구조는 MASP-2 (SEQ ID NO: 6)의 잔기 1-121을 암호화하는 영역 (N-말단 CUBI 도메인에 해당함)을 증폭하는 PCR에 의해 만들어진다. 사람 MASP-2 CUBIEGF 도메인 (SEQ ID NO: 9)을 발현하는 구조는 MASP-2 (SEQ ID NO: 6)의 잔기 1-166을 암호화하는 영역 (N-말단 CUBIEGF 도메인에 해당함)을 증폭하는 PCR에 의해 만들어진다. 사람 MASP-2 CUBIEGFCUBII 도메인 (SEQ ID NO: 10)을 발현하는 구조는 MASP-2 (SEQ ID NO: 6)의 잔기 1-293을 암호화하는 영역을 증폭하는 PCR에 의해 만들어진다. 상기 언급된 도메인은 확립된 PCR 방법에 따라, Vent_R 폴리머라제 및 주형으로서 pBS-MASP-2를 사용하는 PCR에 의해 증폭된다. 센스 프라이머의 5' 프라이머 서열 (5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCTC-3' SEQ ID NO: 34)은 PCR 생성물의 5' 말단에서 BamHI 제한 부위 (밀줄)를 도입한다. 하기 표 5에 나타난, MASP-2 도메인 각각에 대한 안티센스 프라이머를 각 PCR 생성물의 끝에서 종결 코돈 (볼드체)을 도입한 후 이어서 EcoRI 부위 (밀줄)를 도입하도록 설계한다. 증폭되면, DNA 단편은 BamHI 및 EcoRI로 분해되고 pFastBaCl 벡터의 해당 부위에 클로닝된다. 결과의 구조는 제한 매핑을 특징으로 하고 dsDNA 시퀀싱에 의해 확인된다.

[0507] 표 5: MASP-2 PCR 프라이머

MASP-2 도메인	5' PCR 프라이머	3' PCR 프라이머
SEQ ID NO:8 CUBI (SEQ ID NO:6 의 aa 1-121)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (SEQ ID NO:6 의 aa 1-166)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGCT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (SEQ ID NO:6 의 aa 1-293)	5'CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGAT 3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 사람 MASP-2	5'ATGAGGCTGCTGACCTCCTGGGCCTTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_정방향	5'TTAAATCACTAATTATGTTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_역방향
SEQ ID NO:4 사람 MASP-2 cDNA	5'CAGAGGTGACGCAGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_정방향	5'GTGCCCTCCTGCGTCACCTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_역방향
SEQ ID NO:50 쥐 MASP-2 cDNA	5'ATGAGGCTACTCATCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_정방향	5'TTAGAAATTACTTATTATGTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_역방향
SEQ ID NO:50 쥐 MASP-2 cDNA	5'CCCCCCTGCGTCACCTGTCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_정방향	5'CTGCAGAGGTGACGCAGGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_역방향

[0508]

[0509]

MASP-2의 재조합 진핵세포 발현 및 효소 불활성 마우스, 래트, 및 사람 MASP-2A의 단백질 생산

[0510]

상기 설명된 MASP-2 및 MASP-2A 발현 구조를 표준 갈습 포스포에이트 트랜스펙션 과정을 사용하여 DXB1 세포에 트랜스펙션하였다 (Maniatis et al., 1989). MASP-2A를 조제물이 다른 혈청 단백질로 오염되지 않았다는 것을 보장하기 위해 혈청이 없는 배지에서 생산하였다. 배지를 용합 세포로부터 2일마다 수확하였다 (총 4회). 재조합 MASP-2A의 수준은 세 가지 중 각각에 대하여 대략 1.5 mg/리터의 배양 배지를 평균으로 하였다.

[0511]

MASP-2A 단백질 정제: MASP-2A (상기 설명된 Ser-Ala 돌연변이)를 MBP-A-아가로스 컬럼에서 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 이 계획은 외인성 태그의 사용 없이 신속한 정제를 가능하게 하였다. MASP-2A (같은 부피의 로딩 완충액 (150 mM NaCl 및 25 mM CaCl₂를 함유하는, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5)로 희석된 100-200 ml의 배지)를 10 ml 로딩 완충액으로 미리 평형화된 MBP-A-아가로스 친화도 컬럼에 로딩하였다 (4 ml). 추가 10 ml의 로딩 완충액으로 세척 후, 단백질을 1.25 M NaCl 및 10 mM EDTA를 함유하는, 50 mM Tris-Cl, pH 7.5의 1 ml 분획에서 용출하였다. MASP-2A를 함유하는 분획을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 확인하였다. 필요한 경우, MASP-2A를 MonoQ 컬럼 (HR 5/5)에서 이온 교환 크로마토그래피에 의해 추가로 정제하였다. 단백질을 50 mM NaCl을 함유하는, 50 mM Tris-Cl pH 7.5로 투석하였고 같은 완충액에서 평형화된 컬럼에 로딩하였다. 세척 후, 결합된 MASP-2A를 10 ml이 넘는 0.05-1 M NaCl 구배로 용출하였다.

[0512]

결과: MASP-2A 단백질의 0.25-0.5 mg의 수득율을 배지 200 ml로부터 얻었다. MALDI-MS에 의해 얻어진 77.5 kDa의 분자 질량은 글리코실화로 인해 변형되지 않은 폴리펩티드 (73.5 kDa)의 계산 값보다 더 크다. 각 N-글리코실화 부위에서 글리칸의 부착은 관찰된 질량을 설명한다. MASP-2A는 SDS-폴리아크릴아미드 겔 상의 단일 밴드로서 이동하며, 그것이 생합성 중에 단백질 가수분해에 의해 진행된다는 것을 입증한다. 평형 초 원심력에 의해 결정된 중량-평균 분자 질량은 글리코실화된 폴리펩티드의 호모다이머에 대한 계산 값과 일치한다.

[0513]

재조합 사람 MASP-2 폴리펩티드의 생산

[0514]

재조합 MASP-2 및 MASP2A 유도된 폴리펩티드를 생산하는 또 다른 방법은 Thielens, N.M., et al., J. Immunol. 166:5068-5077, 2001에 설명된다. 간략히 말해서, 스포돔테라 르푸기페르다 (Spodoptera frugiperda) 곤충 세포 (Novagen, Madison, WI에서 얻은 레디-플라크 (Ready-Plaque) Sf9 세포)는 50 IU/ml 페니실린 및 50 mg/ml 스트렙토마이신 (Life Technologies)으로 보충된 Sf900II 혈청이 없는 배지 (Life Technologies)에서 자라고 유지된다. 트리코플루시아 니 (Trichoplusia ni) (하이 파이프) 곤충 세포 (Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France에 의해 제공됨)는 50 IU/ml 페니실린 및 50 mg/ml 스트렙토마이신으로

로 보충된 10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France)를 함유하는 TC100 배지 (Life Technologies)에서 유지된다. 재조합 바쿨로바이러스는 백-투-백 (Bac-to-Bac) 시스템을 사용하여 발생한다. 바크미드 (bacmid) DNA는 Qiagen 미니프랩 정제 시스템 (Qiagen)을 사용하여 정제되고 제조사의 프로토콜에 설명된 바와 같이 Sf900 II SFM 배지 (Life Technologies) 중의 셀펙틴을 사용하여 Sf9 곤충 세포를 트랜스펙션하기 위해 사용된다. 재조합 바이러스 입자는 4일 후 수거되고, 바이러스 플라크 검정에 의해 적정 되고, King 및 Possee, in The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman 및 Hall Ltd., London, pp. 111-114, 1992에 의해 설명된 바와 같이 증폭된다.

[0515] 하이 파이버 세포 (1.75×10^7 세포/175- cm^2 조직 배양 플라스크)는 28 °C에서 96시간 동안 Sf900 II SFM 배지에서 2의 감염 다중도로 MASP-2 폴리펩티드를 함유하는 재조합 바이러스로 감염된다. 상층액을 원심분리에 의해 수거하고 디이소프로필 포스포로플루오리데이트를 1 mM의 최종 농도로 추가한다.

[0516] MASP-2 폴리펩티드는 배양 배지에 배출된다. 배양물 상층액을 50 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 50 mM 트리에탄올아민 히드로클로라이드, pH 8.1에 대하여 투석하였고, 같은 완충액으로 평형화된 Q-Sepharose Fast Flow 컬럼 (Amersham Pharmacia Biotech) (2.8 x 12 cm)에 1.5 ml/분으로 로딩 된다. 용출을 같은 완충액에서 350 mM NaCl로 1.2 리터 선형 구배를 적용함으로써 실행한다. 재조합 MASP-2 폴리펩티드를 함유하는 분획은 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인되고, 60 부피%로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 추가에 의해 침전되고, 4 °C에서 하룻밤 동안 두었다. 펠렛은 145 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 , 50 mM 트리에탄올아민 히드로클로라이드, pH 7.4에 재현탁되고, 같은 완충액에서 평형화된 TSK G3000 SWG 컬럼 (7.5 x 600 mm) (Tosohas, Montgomeryville, PA)에 적용된다. 정제된 폴리펩티드를 Microsep 소집신기 (microconcentrator) 상에서 한외 여과에 의해 0.3 mg/ml로 농축하였다 (분자량 컷-오프 (cut-off) = 10,000) (Filtron, Karlstein, Germany).

[0517] 실시예 4

[0518] 이 실시예는 MASP-2 폴리펩티드에 대하여 다클론성 항체를 생산하는 방법을 설명한다.

[0519] 재료 및 방법:

[0520] **MASP-2 항원:** 다클론성 항-사람 MASP-2 항혈청을 다음 분리된 MASP-2 폴리펩티드로 토끼를 면역화시킴으로써 생산한다: 혈청으로부터 분리된 사람 MASP-2-2 (SEQ ID NO: 6); 실시예 3에 설명된 바와 같이, 재조합 사람 MASP-2-2 (SEQ ID NO: 6), 불활성 프로테아제 도메인 (SEQ ID NO: 13)을 함유하는 MASP-2A; 및 상기 실시예 3에 설명된 바와 같이 발현된 재조합 CUBI (SEQ ID NO: 8), CUBEGFI (SEQ ID NO: 9), 및 CUBEGFCUBII (SEQ ID NO: 10).

[0521] **다클론성 항체:** 6주령 토끼는 멸균 식염수 용액 중 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 MASP-2 폴리펩티드 중 100 μg 을 주사함으로써 면역화된다. 주사를 4주 마다 실행하고, 실시예 5에 설명된 바와 같이 항체 역가를 ELISA 검정에 의해 관찰한다. 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의한 항체 정제를 위해 배양물 상층액을 수거한다.

[0522] 실시예 5

[0523] 이 실시예는 래트 또는 사람 MASP-2-2 폴리펩티드에 대한 쥐 다클론성 항체를 생산하는 방법을 설명한다.

[0524] 재료 및 방법:

[0525] 8-12주령의 수컷 A/J 마우스 (Harlan, Houston, Tex.)를 200 μl of 포스페이트 완충된 식염수 (PBS) pH 7.4의 200 μl 의 완전 프로인트 보조제 (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) 중 100 μg 사람 또는 래트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩티드 (실시예 3에 설명된 바와 같이 만들어짐)로 피하에 주사한다. 2주 간격으로, 마우스를 불완전 프로인트 보조제 중 사람 또는 래트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩티드의 50 μg 으로 피하에 두 번 주사한다. 넷째 주에, 마우스를 PBS 중 사람 또는 래트 rMASP-2 또는 rMASP-2A 폴리펩티드의 50 μg 으로 주사하였고 4일 후 융합하였다.

[0526] 각 융합에 대하여, 단일 세포 현탁액을 면역화된 마우스의 비장으로부터 제조하고 Sp2/0 골수종 세포와 융합에 사용한다. Sp2/0의 5×10^8 개 및 5×10^8 개의 비장 세포를 50% 폴리에틸렌 글리콜 (분자량 1450) (Kodak, Rochester, N.Y.) 및 5% 디메틸설폭사이드 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)를 함유하는 배지에서 융합한다. 세포를 Iscove 배지 (Gibco, Gr및 Isl및, N.Y.)의 현탁액의 200 μl 당 1.5×10^5 개의 비장 세포의 농도로 조정하고, 10% 태아 소 혈청, 페니실린 100 유닛/ml, 스트렙토마이신 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0.1 mM 히포산틴, 0.4

μ M 아미노프테린 및 16 μ M 티미딘으로 보충한다. 세포 현탁액의 200 마이크로리터를 약 20개의 96웰 마이크로배양 플레이트의 각 웰에 추가한다. 약 10일 후, 상층액을 ELISA 검정에서 정제된 인자 MASP-2와의 반응성에 대하여 스크리닝하기 위해 회수한다.

[0527] **ELISA 검정:**

[0528] 이뮤놀론 2 (Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.) 마이크로테스트 (microtest) 플레이트의 웰을 50 ng/ml 또는 래트 rMASP-2 (또는 rMASP-2A)에서 정제된 hMASP-2의 50 μ l을 추가함으로써 하룻밤 동안 상온에서 코팅하였다. 코팅용 저농도 MASP-2는 높은 친화도 항체의 선택을 가능하게 한다. 플레이트를 털어서 코팅 용액을 제거하고, PBS 중의 BLOTTO (탈지 분유)의 200 μ l을 비-특이적 부위를 차단하기 위해 1시간 동안 각 웰에 추가한다. 1시간 후, 웰을 완충액 PBST (0.05% Tween 20을 함유하는 PBS)로 세척한다. 각 용합 웰의 배양물 상층액의 50 마이크로리터를 수거하고 마이크로테스트 플레이트의 개개의 웰에 추가한다. 1시간의 배양 후, 웰을 PBST로 세척한다. 결합된 쥐 항체를 홀스래디쉬 (horseradish) 퍼옥시다제 (HRP) 콘주게이트된 염소 항-마우스 IgG (Fc 특이적) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.)와의 반응에 의해 검출하고 BLOTTO에서 1:2,000으로 희석한다. 0.1% 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 (Sigma, St. Louis, Mo.) 및 0.0003% 히드로젠 퍼옥사이드 (Sigma)를 함유하는 퍼옥시다제 기질 용액을 30분 동안 색 발달을 위해 웰에 추가한다. 웰 당 2 M H_2SO_4 의 50 μ l의 추가에 의해 반응을 종결한다. 반응 혼합물의 450 nm에서 최적의 밀도를 BioTek ELISA Reader (BioTek Instruments, Winooski, Vt.)로 측정한다.

[0529] **MASP-2 결합 검정:**

[0530] 상기 설명된 MASP-2 ELISA 검정에서 양성으로 테스트된 배양물 상층액은 결합 친화도를 결정하기 위해 결합 검정에서 테스트 될 수 있고, MASP-2 억제제는 MASP-2를 소모한다. 유사한 검정은 또한 억제제가 보체 시스템에서 다른 항원에 결합하는지 결정하기 위해 사용될 수 있다.

[0531] 폴리스티렌 미세역가 플레이트 웰 (96-웰 배지 결합 플레이트, Corning Costar, Cambridge, MA)을 4 °C에서 하룻밤 동안 포스페이트-완충된 식염수 (PBS) pH 7.4 중의 MASP-2 (20 ng/100 μ l/웰, Advanced Research Technology, San Diego, CA)로 코팅한다. MASP-2 용액을 흡입한 후, 웰을 상온에서 2시간 동안 1% 소 혈청 알부민 (BSA; Sigma Chemical)을 함유하는 PBS로 차단한다. MASP-2 코팅되지 않은 웰은 배경 대조군의 역할을 한다. 히브리도마 상층액 또는 정제된 항-MASP-2 MoAb의 엘리퀴트를, 차단 용액에서 다양한 농도로, 웰에 추가한다. 상온에서 2시간 배양 후, 웰을 널리 PBS로 행겼다. MASP-2-결합된 항-MASP-2 MoAb를 차단 용액 중의 퍼옥시다제-콘주게이트된 염소 항-마우스 IgG (Sigma Chemical)의 추가에 의해 검출하며, 이것은 상온에서 1시간 동안 배양되게 한다. 플레이트를 다시 PBS로 완전히 행겼고, 3,3',5,5'-테트라메틸 벤지딘 (TMB) 기질 (Kirkegaard 및 Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)의 100 μ l를 추가한다. TMB의 반응을 1 M 인산의 100 μ l의 추가에 의해 퀀치 (quench)하고 플레이트를 마이크로플레이트 리더 (SPECTRA MAX 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 450 nm에서 측정한다.

[0532] 양성 웰의 배양물 상층액을 실시예 2에 설명된 바와 같이 C4 절단 검정과 같은 기능적 검정에서 보체 활성화를 억제하는 능력에 대하여 테스트한다. 양성 웰의 세포를 희석을 제한함으로써 클로닝한다. 상기 설명된 바와 같이 MoAb를 ELISA 검정에서 hMASP-2와의 반응성에 대하여 다시 테스트한다. 선택된 히브리도마는 스피너 플라스크 (spinner flask)에서 성장하고 소모된 배양물 상층액을 단백질 A 친화도 크로마토그래피에 의한 항체 정제를 위해 수거한다.

[0533] **실시예 6**

[0534] 이 실시예는 사람화된 쥐-항-MASP 2 항체 및 항체 단편의 발생 및 생산을 설명한다.

[0535] 쥐 항-MASP-2 단클론성 항체는 실시예 5에 설명된 바와 같이 수컷 A/J 마우스에서 발생한다. 쥐 항체는 하기 설명된 바와 같이 키메라 IgG 및 항체의 Fab 단편을 발생시키기 위해 쥐 불변 영역을 그것들의 사람 대응물로 대체함으로써 그것의 면역원성을 감소시키기 위해 사람화되며, 이것은 본 발명에 따라 사람 대상체의 MASP-2-의존적 보체 활성화의 부작용을 억제하는데 유용하다.

[0536] **1. 쥐 히브리도마 세포의 항-MASP-2 가변 영역 유전자의 클로닝.**

[0537] 전체 RNA를 제조사의 프로토콜에 따라 RNazol을 사용하여 항-MASP-2 MoAb (실시예 7에 설명된 바와 같이 얻어짐)를 분비하는 히브리도마 세포로부터 분리한다. 첫 번째 가닥 cDNA는 프라이머로서 올리고 dT를 사용하여 전체 RNA로부터 합성된다. PCR은 면역글로불린 불변 C 영역-유도된 3' 프라이머를 사용하여 수행되고 5' 프라이

머로서 V_H 또는 V_K 유전자의 선도 펩티드 또는 첫 번째 프레임워크 영역으로부터 유도된 프라이머 세트를 변형시킨다. Chen 및 Platsucas (Chen, P.F., Scit. J. Immunol. 35:539-549, 1992)에 의해 설명된 바와 같이 고정된 PCR을 수행한다. V_K 유전자의 클로닝을 위해, 이중-가닥 cDNA는 Not1-MAK1 프라이머 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGCTTT-3' SEQ ID NO: 38)를 사용하여 제조된다. 어닐링된 어댑터 AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO: 39) 및 AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO: 40)는 이중-가닥 cDNA의 5' 및 3' 말단 둘 다에 결합된다. 3' 끝에서 어댑터는 Not1 분해에 의해 제거된다. 분해된 생성물은 5' 프라이머로서 AD1 올리고뉴클레오타이드 및 3' 프라이머로서 MAK2 (5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO: 41)과 함께 PCR의 주형으로서 사용된다. 대략 500 bp의 DNA 단편은 pUC19에 클로닝된다. 클로닝된 서열이 예측된 쥐 면역글로불린 불변 영역을 포함한다는 것을 확인하는 서열 분석을 위해 여러 클론이 선택된다. Not1-MAK1 및 MAK2 올리고뉴클레오타이드는 V_K 영역으로부터 유도되고 각각 182 및 84 bp이며, C 카와 유전자의 첫 번째 염기쌍으로부터 다운스트림이다. 완전한 V_E 및 선도 펩티드를 포함하는 클론이 선택된다.

[0538] V_H 유전자의 클로닝을 위해, 이중-가닥 cDNA는 Not1 MAG1 프라이머 (5'-CGCGGCCGACGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO: 42)를 사용하여 제조된다. 어닐링된 어댑터 AD1 및 AD2는 이중-가닥 cDNA의 5' 및 3' 말단 둘 다에 결합된다. 3' 끝에서 어댑터는 Not1 분해에 의해 제거된다. 분해된 생성물은 프라이머로서 AD1 올리고뉴클레오타이드 및 MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCTACTGGCTCAGGAAATA-3' SEQ ID NO: 43)와 함께 PCR의 주형으로 사용된다. 길이가 500 내지 600 bp의 DNA 단편은 pUC19에 클로닝된다. Not1-MAG1 및 MAG2 올리고뉴클레오타이드는 쥐 Cg.7.1 영역으로부터 유도되고, 각각 180 및 93 bp이며, 쥐 Cg.7.1 유전자의 첫 번째 bp로부터 다운스트림이다. 완전한 V_H 및 선도 펩티드를 포함하는 클론이 선택된다.

[0539] 2. 키메라 MASP-2 IgG 및 Fab에 대한 발현 벡터의 구조.

[0540] 상기 설명된 클로닝된 V_H 및 V_K 유전자를 PCR 반응의 주형으로서 사용하여 Kozak 공통 서열을 뉴클레오타이드 서열의 5' 끝에 및 스플라이스 기증자를 뉴클레오타이드 서열의 3' 끝에 추가한다. 서열을 분석하여 PCR 오차가 없음을 확인한 후, V_H 및 V_K 유전자는, pSV2neo V_H -huCg1 및 pSV2neo V_K -huCg1를 제공하기 위해, 각각 사람 C.g1 및 C. 카와를 함유하는 발현 벡터 카세트에 삽입된다. 중쇄 및 경쇄 벡터의 CsCl1 구배-정제된 플라스미드 DNA를 전기천공에 의해 COS 세포를 트랜스펙션하기 위해 사용한다. 48시간 후, 배양물 상층액을 키메라 IgG의 대략 200 ng/ml의 존재를 확인하기 위해 ELISA에 의해 테스트한다. 세포를 수확하고 전체 RNA를 제조한다. 첫 번째 가닥 cDNA는 프라이머로서 올리고 dT를 사용하여 전체 RNA로부터 합성된다. 이 cDNA는 Fd 및 카와 DNA 단편을 발생시키기 위해 PCR의 주형으로서 사용된다. Fd 유전자에 대하여, 5' 프라이머로서 5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SEQ ID NO: 44) 및 CH1-유도된 3' 프라이머 (5'-CGGGATCCTCAAACCTTTCTGTCCACCTTG-3' SEQ ID NO: 45)를 사용하여 PCR을 수행한다. DNA 서열은 사람 IgG1의 완전한 V_H 및 CH1 도메인을 함유하는 것으로 확인된다. 적절한 효소로 분해 후, Fd DNA 단편을 pSV2dhfrFd를 제공하는 발현 벡터 카세트 pSV2dhfr-TUS의 HindIII 및 BamHI 제한 부위에 삽입하였다. pSV2 플라스미드는 상업적으로 이용 가능하고 다양한 공급원의 DNA 세그먼트로 구성된다: pBR322 DNA (얇은 선)는 DNA 복제의 pBR322 기원 (pBR ori) 및 락타마제 암피실린 저항 유전자 (Amp)를 함유한다; 더 넓은 해칭에 의해 나타나고 표시된, SV40 DNA는 SV40 DNA 복제의 기원 (SV40 ori), 초기 프로모터 (5'에서 dhfr 및 neo 유전자로), 및 폴리아데닐화 신호 (3'에서 dhfr 및 neo 유전자로)를 함유한다. SV40-유도된 폴리아데닐화 신호 (pA)는 또한 Fd 유전자의 3' 끝에 위치한다.

[0541] 카와 유전자에 대하여, 5' 프라이머로서 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 46) 및 C_K -유도된 3' 프라이머 (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACTCT-3' SEQ ID NO: 47)를 사용하여 PCR을 수행한다. DNA 서열은 완전한 V_K 및 사람 C_K 영역을 함유하는 것으로 확인된다. 적절한 제한 효소로 분해 후, 카와 DNA 단편은 pSV2neoKmf 제공하기 위해 발현 벡터 카세트 pSV2neo-TUS의 HindIII 및 BamHI 제한 부위에 삽입된다. Fd 및 카와 유전자 둘 다의 발현은 HCMV-유도된 인핸서 및 프로모터 요소에 의해 구동된다. Fd 유전자가 사슬 간 이황화 결합에 수반된 시스테인 아미노산 잔기를 포함하지 않기 때문에, 이 재조합 키메라 Fab는 비-공유결합으로 연결된 중쇄 및 경쇄를 함유한다. 이 키메라 Fab는 cFab로 지정된다.

[0542] 중쇄 및 경쇄 간 이황화 결합을 가진 재조합 Fab를 얻기 위해, 상기 Fd 유전자는 사람 IgG1의 힌지 영역의 추가적인 9개의 아미노산 (EPKSCDKTH SEQ ID NO: 48)에 대한 암호화 서열을 포함하도록 연장될 수도 있다. Fd 유전자의 3' 끝에서 30개의 아미노산을 암호화하는 BstEII-BamHI DNA 세그먼트는 연장된 Fd를 암호화하는 DNA 세그

먼트로 대체되며, pSV2dhfrFd/9aa를 발생시킬 수도 있다.

[0543] **3. 키메라 항-MASP-2 IgG의 발현 및 정제**

[0544] 키메라 항-MASP-2 IgG를 분비하는 세포주를 발생시키기 위해, NSO 세포를 전기천공에 의해 pSV2neoV_H-huC.g1 및 pSV2neoV-huC 카파의 정제된 플라스미드 DNA로 트랜스펙션한다. 트랜스펙션된 세포는 0.7 mg/ml G418의 존재시 선택된다. 세포를 혈청-함유 배지를 사용하여 250 ml 스피너 플라스크에서 키운다.

[0545] 100 ml 스피너 배양의 배양물 상층액을 10-ml PROSEP-A 컬럼 (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.)에 로딩한다. 컬럼을 10배의 충전 부피의 PBS로 세척한다. 결합된 항체를 50 mM 시트레이트 완충액, pH 3.0으로 용출한다. 같은 양의 1 M Hepes, pH 8.0을 pH를 7.0으로 조정하기 위해 정제된 항체를 함유하는 분획에 추가한다. 남은 염을 Millipore 막 한의 여과 (분자량 컷-오프: 3,000)에 의한 PBS로의 완충액 교환에 의해 제거한다. 정제된 항체의 단백질 농도를 BCA 방법 (Pierce)에 의해 결정한다.

[0546] **4. 키메라 항-MASP-2 Fab의 발현 및 정제**

[0547] 키메라 항-MASP-2 Fab를 분비하는 세포주를 발생시키기 위해, CHO 세포를 전기천공에 의해 pSV2dhfrFd (또는 pSV2dhfrFd/9aa) 및 pSV2neo카파의 정제된 플라스미드 DNA로 트랜스펙션한다. 트랜스펙션된 세포는 G418 및 메토타렉세이트의 존재시 선택된다. 선택된 세포주를 증가된 농도의 메토타렉세이트에서 증폭시킨다. 세포는 희석을 제한함으로써 서브클로닝된 단일 세포이다. 고생산 단일 세포 서브클로닝된 세포주를 혈청이 없는 배지를 사용하여 100 ml 스피너 배양에서 키운다.

[0548] 키메라 항-MASP-2 Fab를 MASP-2 MoAb에 대한 마우스 항-이디오타입 MoAb을 사용하는 친화도 크로마토그래피에 의해 정제한다. 항-이디오타입 MASP-2 MoAb는 마우스를 키홀 림펫 해모시아닌 (KLH)과 콘주게이트된 쥐 항-MASP-2 MoAb로 면역화하고 사람 MASP-2-2와 경쟁할 수 있는 특이적 MoAb 결합에 대하여 스크리닝함으로써 만들어질 수 있다. 정제를 위해, cFab 또는 cFab/9aa를 생산하는 CHO 세포의 스피너 배양물의 상층액 중 100 ml을 항-이디오타입 MASP-2 MoAb와 커플링 된 친화도 컬럼에 로딩한다. 결합된 Fab가 50 mM 디에틸아민, pH 11.5로 용출되기 전에 컬럼을 PBS로 완전히 세척한다. 남은 염을 상기 설명된 완충액 교환에 의해 제거한다. 정제된 항체의 단백질 농도를 BCA 방법 (Pierce)에 의해 결정한다.

[0549] 키메라 MASP-2 IgG, cFab, 및 cFab/9aa의 MASP-2-의존적 보체 경로를 억제하는 능력은 실시예 2 또는 실시예 7에 설명된 억제 검정을 사용함으로써 결정될 수도 있다.

[0550] 실시예 7

[0551] 이 실시예는 L-피콜린/P35, H-피콜린, M-피콜린 또는 만난을 통해 MASP-2-의존적 보체 활성화를 차단할 수 있는 MASP-2 억제제를 확인하기 위한 기능적 스크리닝으로써 사용된 시험관 내 C4 절단 검정을 설명한다.

[0552] **C4 절단 검정:** C4 절단 검정은 Petersen, S.V., et al., J. Immunol. Methods 257:107, 2001에 의해 설명되며, 이것은 L-피콜린과 결합하는 에스. 아우레우스의 리포테이코산 (LTA)으로부터 발생하는 렉틴 경로 활성화를 측정한다.

[0553] **시약:** 포르말린-고정된 에스. 아우레우스 (DSM20233)를 다음과 같이 제조한다: 박테리아를 트립신 쿡 혈액 배지에서 37 °C에서 하룻밤 동안 키우고, PBS로 세 번 세척하고, PBS/0.5% 포르말린에서 1시간 동안 상온에서 고정하고, 코팅 완충액 (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6)에 재현탁 되기 전에, PBS로 추가 세 번 세척한다.

[0554] **검정:** Nunc MaxiSorb 미세역가 플레이트 (Nalgene Nunc International, Rochester, NY)의 웰을 다음으로 코팅한다: 코팅 완충액 중 1 µg의 L-피콜린을 가진 코팅 완충액 중 포르말린-고정된 에스. 아우레우스 DSM20233 (OD₅₅₀ = 0.5)의 100 µl. 하룻밤 동안 배양 후, 웰을 TBS (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, pH 7.4) 중의 0.1% 사람 혈청 알부민 (HSA)으로 차단하였고, 0.05% Tween 20 및 5 mM CaCl₂를 함유하는 TBS (세척 완충액)로 세척한다. 사람 혈청 샘플을 20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% Triton X-100, 0.1% HSA, pH 7.4에 희석하고, 이것은 내인성 C4의 활성화를 방지하고 C1 복합체 (C1q, C1r 및 C1s로 구성됨)를 분리시킨다. 항-MASP-2 MoAb 및 억제 펩티드를 포함하는, MASP-2 억제제를 다양한 농도로 혈청 샘플에 추가한다. 희석된 샘플을 플레이트에 추가하고 4 °C에서 하룻밤 동안 키운다. 24시간 후, 플레이트를 세척 완충액으로 완전히 세척하고, 4 mM 바비탈, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4의 100 µl 중에 정제된 사람 C4 (Dodds, A.W., Methods Enzymol. 223:46, 1993에 설명된 바와 같이 얻어짐)의 0.1 µg이 각 웰에 추가된다. 37 °C에서 1.5시간 후, 플

레이트를 다시 세척하고 알칼린 포스파타제-콘주게이트된 닭 항-사람 C4c (Immunsystem, Uppsala, Sweden에서 얻어짐)를 사용하여 C4b 침착을 검출하고 비색 기질-니트로페닐 포스페이트를 사용하여 측정한다.

[0555] **만난에서 C4 검정:** 상기 설명된 검정을 다양한 MASP-2 억제제와 혼합된 혈청을 추가하기 전에 LSP 및 만난으로 플레이트를 코팅함으로써 MBL을 통한 렉틴 경로 활성화를 측정하기 위해 적용한다.

[0556] **H-피콜린에서 C4 검정 (Hakata Ag):** 상기 설명된 검정을 다양한 MASP-2 억제제와 혼합된 혈청을 추가하기 전에 LPS 및 H-피콜린으로 플레이트를 코팅함으로써 H-피콜린을 통한 렉틴 경로 활성화를 측정하기 위해 적용한다.

[0557] 실시예 8

[0558] 다음 검정은 야생형 및 MASP-2-/- 마우스에서 고전적 경로 활성화의 존재를 입증한다.

[0559] **방법:** 미세역가 플레이트 (Maxisorb, Nunc, 제품 번호 442404, Fisher Scientific)를 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7.4 중 0.1% 사람 혈청 알부민으로 코팅한 후 이어서 TBS/tween/Ca²⁺에서 1:1000으로 희석된 양 항 전체 혈청 항혈청 (Scottish Antibody Production Unit, Carlisle, Scotl)과 함께 4 °C에서 하룻밤 동안 배양함으로써 제자리에서 면역 복합체를 생성하였다. 혈청 샘플을 야생형 및 MASP-2-/- 마우스로부터 얻었고 코팅된 플레이트에 추가하였다. 야생형 및 MASP-2-/- 혈청 샘플로부터 C1q가 결합된 대조군 샘플을 제조하였다. C1q-결합 마우스 혈청을 공급자의 지시에 따라 토끼 항-사람 C1q IgG (Dako, Glostrup, Denmark)로 코팅된 단백질-A-커핑된 Dynabeads (Dyna Biotech, Oslo, Norway)를 사용하여 제조하였다. 플레이트를 37 °C에서 90분 동안 배양하였다. 결합된 C3b를 TBS/tw/ Ca⁺⁺에서 1:1000으로 희석된 다클론성 항-사람-C3c 항체 (Dako A 062)로 검출하였다. 2차 항체는 염소 항-토끼 IgG이다.

[0560] **결과:** 도 7은 야생형 혈청, MASP-2-/- 혈청, C1q-결합 야생형 및 C1q-결합된 MASP-2-/- 혈청 중의 IgG로 코팅된 플레이트에서 상대적인 C3b 침착 수준을 나타낸다. 이들 결과는 고전적 경로가 MASP-2-/- 마우스 균주에서 온전하다는 것을 입증한다.

[0561] 실시예 9

[0562] 다음 검정은 고전적 경로가 면역 복합체에 의해 개시되는 조건 하에 MASP-2 억제제의 효과를 분석함으로써 MASP-2 억제제가 고전적 경로를 차단하는지 테스트하기 위해 사용된다.

[0563] **방법:** 고전적 경로가 면역 복합체에 의해 개시되는 경우 보체 활성화의 조건에서 MASP-2 억제제의 효과를 테스트하기 위해, 90% NHS를 함유하는 3배수 50 μ l 샘플을 10 μ g/ml 면역 복합체 (IC) 또는 PBS의 존재시 37 °C에서 배양하고, 37 °C 배양 중에 200 nM 항-프로퍼딘 다클론성 항체를 함유하는, 유사한 3배수 샘플 (+/-IC)이 포함된다. 37 °C에서 2시간 배양 후, 추가의 보체 활성화를 중단하기 위해 13 mM EDTA를 모든 샘플에 추가하고 샘플을 즉시 5 °C로 냉각한다. 샘플을 제조사의 지시에 따라 ELISA 키트 (Quidel, 제품 번호. A015 및 A009)를 사용하여 보체 활성화 생성물 (C3a 및 sC5b-9)에 대하여 검사되기 전에 -70 °C에 저장한다.

[0564] 실시예 10

[0565] 이 실시예는 MASP-2 활성을 차단하는 고 친화도 항-MASP-2 Fab2 항체 단편의 확인을 설명한다.

[0566] **배경 및 근거:** MASP-2는 많은 별도의 기능적 도메인을 갖는 복합 단백질이다.

[0567] MBL 및 피콜린에 대한 결합 부위(들), 세린 프로테아제 촉매 부위, 단백질 가수분해 기질 C2에 대한 결합 부위, 단백질 가수분해 기질 C4에 대한 결합 부위, MASP-2 치모겐의 자가 활성화에 대한 MASP-2 절단 부위, 및 두 개의 Ca⁺⁺ 결합 부위. 고 친화도로 MASP-2에 결합하는 Fab2 항체 단편을 확인하였고, 확인된 Fab2 단편을 그것들이 MASP-2 기능적 활성을 차단할 수 있는지 결정하기 위해 기능적 검정으로 테스트하였다.

[0568] MASP-2 기능적 활성을 차단하기 위해, 항체 또는 Fab2 항체 단편은 MASP-2 기능적 활성화에 필요한, MASP-2 상의 구조적 에피토프에 결합하고 방해해야 한다. 그러므로, 많은 또는 모든 고 친화도 결합 항-MASP-2 Fab2는 그것들이 MASP-2 기능적 활성화에 직접적으로 수반되는 MASP-2 상의 구조적 에피토프에 결합하지 않으면 MASP-2 기능적 활성을 억제하지 않을 수도 있다.

[0569] 렉틴 경로 C3 콘버타제 형성의 억제를 측정하는 기능적 검정을 항-MASP-2 Fab2의 "차단 활성"을 평가하기 위해 사용하였다. 렉틴 경로에서 MASP-2의 주요한 생리학적 역할은 렉틴-매개된 보체 경로, 즉, 렉틴 경로 C3 콘버타제의 다음 기능적 성분을 발생시킨다는 것이 알려져 있다. 렉틴 경로 C3 콘버타제는 단백질 가수분해에 의해 C3

를 C3a 및 C3b로 절단하는 중요한 효소 복합체 (C4bC2a)이다. MASP-2는 렉틴 경로 C3 컨버타제 (C4bC2a)의 구조적 성분이 아니다; 하지만, MASP-2 기능적 활성은 렉틴 경로 C3 컨버타제를 포함하는 두 개의 단백질 성분 (C4b, C2a)를 발생시키기 위해 필요하다. 게다가, 상기 나열된 MASP-2의 별도의 기능적 활성 모두는 MASP-2가 렉틴 경로 C3 컨버타제를 발생시키기 위해 필요한 것으로 나타난다. 이들 이유에 대하여, 항-MASP-2 Fab2의 "차단 활성"을 평가하기 위해 사용되는 바람직한 검정은 렉틴 경로 C3 컨버타제 형성의 억제를 측정하는 기능적 검정인 것으로 생각된다.

[0570] **고 친화도 Fab2의 발생:**

[0571] 사람 경쇄 및 중쇄 항체 서열의 파지 디스플레이 라이브러리 (phage display library) 및 원하는 선택된 리간드와 반응하는 Fab2를 확인하는 자동화된 항체 선택 기술을 래트 MASP-2 단백질 (SEQ ID NO: 55)에 대한 고 친화도 Fab2를 생성하기 위해 사용하였다. 알려진 양의 래트 MASP-2 (~1 mg, >85% 순수) 단백질을 항체 스크리닝에 이용하였다. 세 라운드의 증폭을 최고의 친화도를 갖는 항체의 선택에 이용하였다. 항체 단편을 발현하는, 대략 250개의 다른 히트 (hit)를 ELISA 스크리닝을 위해 골랐다. 고 친화도 히트를 다른 항체의 독특성을 결정하기 위해 이후에 시퀀싱 하였다.

[0572] 50개의 독특한 항-MASP-2 항체를 정제하였고 각 정제된 Fab2 항체의 250 µg을, 하기 더 상세히 설명된 바와 같이, MASP-2 결합 친화도의 특성화 및 보체 경로 기능적 테스트에 사용하였다.

[0573] **항-MASP-2 Fab2의 억제 (차단) 활성을 평가하기 위해 사용된 검정**

[0574] **1. 렉틴 경로 C3 컨버타제의 형성의 억제를 측정하는 검정:**

[0575] **배경:** 렉틴 경로 C3 컨버타제는 단백질 가수분해에 의해 C3를 두 개의 강한 전염증성 단편, 아나필라톡신 C3a 및 옵소닌 C3b로 절단하는 효소 복합체 (C4bC2a)이다. C3 컨버타제의 형성은 염증의 매개의 측면에서 렉틴 경로의 주요 단계에 나타난다. MASP-2는 렉틴 경로 C3 컨버타제 (C4bC2a)의 구조 성분이 아니다; 그러므로 항-MASP-2 항체 (또는 Fab2)는 기존의 C3 컨버타제의 활성을 직접적으로 억제하지 않을 것이다. 하지만, MASP-2 세린 프로테아제 활성은 렉틴 경로 C3 컨버타제를 포함하는, 두 개의 단백질 성분 (C4b, C2a)를 발생시키기 위해 필요하다. 그러므로, MASP-2 기능적 활성을 억제하는 (즉, 항-MASP-2 Fab2 차단) 항-MASP-2 Fab2는 렉틴 경로 C3 컨버타제의 데 노보 형성을 억제할 것이다. C3는 그것의 구조의 일부로서 특이하고 매우 반응성인 티오에스테르기를 함유한다. 이 검정에서 C3 컨버타제에 의한 C3의 절단시, C3b상의 티오에스테르기는 에스테르 또는 아미드 결합을 통해 플라스틱 웰의 바닥에 고정된 거대분자의 히드록실 또는 아미노기와 공유결합을 형성할 수 있고, 따라서 ELISA 검정에서 C3b의 검출이 가능하다.

[0576] 효모 만남은 렉틴 경로의 알려진 활성제이다. C3 컨버타제의 형성을 측정하는 다음 방법에서, 만남으로 코팅된 플라스틱 웰을 렉틴 경로를 활성화하기 위해 희석된 래트 혈청과 함께 37 °C에서 30분 동안 배양하였다. 웰을 세척하였고 표준 ELISA 방법을 사용하여 웰에 고정된 C3b에 대하여 검정하였다. 이 검정에서 발생한 C3b의 양은 렉틴 경로 C3 컨버타제의 데 노보 형성의 직접적인 반영이다. 선택된 농도의 항-MASP-2 Fab2를 C3 컨버타제 형성 및 결과적인 C3b 발생을 억제하는 그것들의 능력에 대하여 이 검정에서 테스트하였다.

[0577] **방법:**

[0578] 96-웰 Costar Medium Binding 플레이트를 1 µg/50 Tl/웰에서 50 mM 카르보네이트 완충액에 희석된 만남과 함께 5 °C에서 하룻밤 동안 배양하였고, 각 웰을 200 Tl PBS로 세 번 세척하였다. 웰을 PBS 중의 1% 소 혈청 알부민의 100 Tl/웰로 차단하였고 부드럽게 혼합하면서 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 각 웰을 PBS의 200 Tl로 세 번 세척하였다. GVB 완충액 (4.0 mM 바비탈, 141 mM NaCl, 1.0 mM MgCl₂, 2.0 mM CaCl₂, 0.1% 젤라틴, pH 7.4)을 함유하는, 항-MASP-2 Fab2 샘플을 5 °C에서 Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺의 선택된 농도로 희석하였다. 0.5% 래트 혈청을 5 °C에서 상기 샘플에 추가하였고 100 Tl을 각 웰로 옮겼다. 플레이트를 덮고 보체 활성화를 허용하기 위해 37 °C 항온조에서 30분 동안 배양하였다. 플레이트를 37 °C 항온조에서 얼음-물 혼합물을 함유한 용기에 옮김으로써 반응을 중단하였다. 각 웰을 PBS-Tween 20 (PBS 중에 0.05% Tween 20) 200 Tl로 다섯 번 세척하였고, 200 Tl PBS로 두 번 세척하였다. 1:10,000 희석된 1차 항체 (토끼 항-사람 C3c, DAKO A0062)의 100 Tl/웰을 2.0 mg/ml 소 혈청 알부민을 함유하는 PBS에 추가하였고 부드럽게 혼합하면서 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 1:10,000 희석된 2차 항체 (퍼옥시다제-콘쥬게이트된 염소 항-토끼 IgG, American Qualex A102PU)의 100 Tl/웰을 2.0 mg/ml 소 혈청 알부민을 함유하는 PBS에 추가하였고 셰이커에서 부드럽게 혼합하면서 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 각 웰을 PBS의 200 Tl로 다섯 번 세척하였다. 100 Tl/웰의 퍼옥시다제 기질 TMB (Kirkegaard &

Perry Laboratories)를 추가하였고 상온에서 10분 동안 배양하였다. 100 Tl/웰의 1.0 M H₃PO₄를 추가함으로써 퍼옥시다제 반응을 중단하였고 OD₄₅₀을 측정하였다.

[0579] **2. MASP-2-의존적 C4 절단의 억제를 측정하는 검정**

[0580] **배경:** MASP-2의 세린 프로테아제 활성은 매우 특이적이고 MASP-2에 대한 두 개의 단백질 기질만이 확인되었다: C2 및 C4. C4의 절단은 C4a 및 C4b를 발생시킨다. 항-MASP-2 Fab2는 C4 절단에 직접적으로 수반된 MASP-2 상의 구조적 에피토프 (예를 들어, C4에 대한 MASP-2 결합 부위; MASP-2 세린 프로테아제 촉매 부위)에 결합할 수도 있고 그로 인해 MASP-2의 C4 절단 기능적 활성을 억제한다. 만반으로 코팅된 플라스틱 웰을 액틴 경로를 활성화 하기 위해 희석된 래트 혈청과 함께 37 °C에서 30분 동안 배양하였다. 이 ELISA 검정에 사용된 1차 항체가 사람 C4만을 인식하기 때문에, 희석된 래트 혈청은 또한 사람 C4 (1.0 Tg/ml)를 보충하였다. 웰을 세척하였고 표준 ELISA 방법을 사용하여 웰에 고정된 C4b에 대하여 검정하였다. 이 검정에서 발생한 C4b의 양은 MASP-2 의존적 C4 절단 활성의 측정값이다. 선택된 농도의 항-MASP-2 Fab2를 C4 절단을 억제하는 그것들의 능력에 대하여 이 검정에서 테스트하였다.

[0581] **방법:** 96-웰 Costar Medium Binding 플레이트를 1.0 Tg/50 Tl/웰에서 50 mM 카르보네이트 완충액에 희석된 만 난과 함께 5 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 세 번 세척하였다. 웰을 PBS 중의 1% 소 혈 청 알부민의 100 Tl/웰로 차단하였고 부드럽게 혼합하면서 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 각 웰을 PBS의 200 Tl로 세 번 세척하였다. GVB 완충액 (4.0 mM 바비탈, 141 mM NaCl, 1.0 mM MgCl₂, 2.0 mM CaCl₂, 0.1% 젤라틴, pH 7.4)을 함유하는, 항-MASP-2 Fab2 샘플을 5 °C에서 Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺의 선택된 농도로 희석하였다. 1.0 Tg/ml 사 람 C4 (Quidel)가 또한 이들 샘플에 포함되었다. 0.5% 래트 혈청을 5 °C에서 상기 샘플에 추가하였고 100 Tl을 각 웰로 옮겼다. 플레이트를 덮고 보체 활성화를 허용하기 위해 37 °C 항온조에서 30분 동안 배양하였다. 플레 이트를 37 °C 항온조에서 얼음-물 혼합물을 함유한 용기에 옮김으로써 반응을 중단하였다. 각 웰을 PBS-Tween 20 (PBS 중에 0.05% Tween 20) 200 Tl로 다섯 번 세척하였고, 200 Tl PBS로 두 번 세척하였다. 1:700 희석된 비오틴-콘주게이트된 닭 항-사람 C4c (Immunosystem AB, Uppsala, Sweden)의 100 Tl/웰을 2.0 mg/ml 소 혈청 알 부민을 함유하는 PBS에 추가하였고 부드럽게 혼합하면서 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 각 웰을 200 Tl PBS 로 다섯 번 세척하였다. 0.1 Tg/ml의 퍼옥시다제-콘주게이트된 스트렙타비딘 (Pierce Chemical #21126)의 100 Tl/웰을 2.0 mg/ml BSA를 함유하는 PBS에 추가하였고 셰이커에서 부드럽게 혼합하면서 상온에서 1시간 동안 배 양하였다. 각 웰을 PBS의 200 Tl로 다섯 번 세척하였다. 100 Tl/웰의 퍼옥시다제 기질 TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)를 추가하였고 상온에서 16분 동안 배양하였다. 100 Tl/웰의 1.0 M H₃PO₄를 추가함으로써 퍼옥시다제 반응을 중단하였고 OD₄₅₀을 측정하였다.

[0582] **3. '원래의' 래트 MASP-2에 대한 항-래트 MASP-2 Fab2의 결합 검정**

[0583] **배경:** MASP-2는 보통 또한 특이적 액틴 분자 (만노스-결합 단백질 (MBL) 및 피콜린)를 포함하는 MASP-2 다이머 복합체로서 혈장에 존재한다. 그러므로, MASP-2의 생리학적으로 적절한 형태에 항-MASP-2 Fab2의 결합을 연구하 는데 흥미가 있으면, 정제된 재조합 MASP-2 대신에, 혈장에서 Fab2 및 '원래의' MASP-2 사이의 상호작용이 사용 되는 결합 검정을 개발하는 것이 중요하다. 이 결합 검정에서, 10% 래트 혈청의 '원래의' MASP-2-MBL 복합체를 먼저 만반-코팅된 웰에 고정하였다. 고정된 '원래의' MASP-2에 대한 다양한 항-MASP-2 Fab2의 결합 친화도를 표 준 ELISA 방법론을 사용하여 연구하였다.

[0584] **방법:** 96-웰 Costar Medium Binding 플레이트를 1.0 Tg/50 Tl/웰에서 50 mM 카르보네이트 완충액에 희석된 만 난과 함께 5 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 세 번 세척하였다. 웰을 PBS 중의 0.5% 탈 지 분유의 100 Tl/웰로 차단하였고 부드럽게 혼합하면서 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 각 웰을 TBS/Tween/Ca⁺⁺ 세척 완충액 (5.0 mM CaCl₂를 함유하는, Tris-완충된 식염수, 0.05% Tween 20, pH 7.4)의 200 Tl로 세 번 세척하였다. 고염 결합 완충액 (20 mM Tris, 1.0 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% Triton-X100, 0.1 부 피% 소 혈청 알부민, pH 7.4) 중의 10% 래트 혈청을 얼음 위에서 제조하였다. 100 Tl/웰을 추가하였고 5 °C에서 하룻밤 동안 배양하였다. 웰을 TBS/Tween/Ca⁺⁺ 세척 완충액의 200 Tl로 세 번 세척하였다. 웰을 200 Tl PBS로 두 번 세척하였다. GVB 완충액 (4.0 mM 바비탈, 141 mM NaCl, 1.0 mM MgCl₂, 2.0 mM CaCl₂, 0.1% 젤라틴, pH 7.4)을 함유하는, Ca⁺⁺ 및 Mg⁺⁺에서 희석된 항-MASP-2 Fab2의 선택된 농도의 100 Tl/웰을 추가하였고 부드럽게 혼합하면서 1시간 동안 상온에서 배양하였다. 각 웰을 200 Tl PBS로 다섯 번 세척하였다. PBS 중의 2.0 mg/ml

소 혈청 알부민에서 1:5000으로 희석된 HRP-콘주게이트된 염소 항-Fab2 (Biogenesis 제품 번호 0500-0099)의 100 T1/웰을 추가하였고 부드럽게 혼합하면서 1시간 동안 상온에서 배양하였다. 각 웰을 200 T1 PBS로 다섯 번 세척하였다. 100 T1/웰의 퍼옥시다제 기질 TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories)를 추가하였고 상온에서 70 분 동안 배양하였다. 100 T1/웰의 1.0 M H₃PO₄를 추가함으로써 퍼옥시다제 반응을 중단하였고 OD₄₅₀을 측정하였다.

결과:

래트 MASP-2 단백질에 고 친화도로 반응한, 대략 250개의 다른 Fab2를 ELISA 스크리닝을 위해 골랐다. 이들 고 친화도 Fab2를 다른 항체의 독특성을 결정하기 위해 시퀀싱 하였고, 50개의 독특한 항-MASP-2 항체를 추가의 분석을 위해 정제하였다. 각 정제된 Fab2 항체의 250 µg을 MASP-2 결합 친화도의 특성화 및 보체 경로 기능적 테스트에 사용하였다. 이 분석의 결과는 하기 표 6에 나타난다.

표 6: 렉틴 경로 보체 활성화를 차단하는 항-MASP-2 FAB2

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

상기 표 6에 나타난 바와 같이, 테스트된 50개의 항-MASP-2 Fab2 중에, 17개의 Fab2를 10 nM Fab2 이하의 IC₅₀으로 C3 콘버타제 형성을 강하게 억제하는 (34% 양성 적중률), MASP-2를 차단하는 Fab2로 확인하였다. 확인된 17개의 Fab2 중 8개는 나노 몰 이하의 범위의 IC₅₀을 가진다. 게다가, 표 6에 나타난, MASP-2를 차단하는 Fab2 17개 모두는 렉틴 경로 C3 콘버타제 검정에서 C3 콘버타제 형성의 본질적으로 완벽한 억제를 제공하였다. 도 8a는 Fab2 항체 #11에 대한 C3 콘버타제 형성 검정의 결과를 그래프로 설명하며, 이것은 테스트된 다른 Fab2 항체를 나타내고, 이것의 결과는 표 6에 나타난다. 이것은 각 MASP-2 분자가 Fab2에 의해 결합할 때도 Fab2를 "차단"하는 것이 MASP-2 기능을 부분적으로만 억제할 수도 있다는 것이 이론상 가능하기 때문에 중요한 사항이다.

만난은 렉틴 경로의 알려진 활성화제이지만, 래트 혈청의 항-만난 항체의 존재가 또한 고전적 경로를 활성화하고 고전적 경로 C3 콘버타제를 통해 C3b를 발생시킬 수 있다는 것은 이론상 가능하다. 하지만, 이 실시예에 나열된 17개의 차단 항-MASP-2 Fab2 각각은 C3b 발생을 강하게 억제하고 (>95 %), 따라서, 렉틴 경로 C3 콘버타제에 대한 이 검정의 특이성을 입증한다.

결합 검정을 또한 각각에 대하여 분명한 K_d를 계산하기 위해 17개의 차단 Fab2 모두를 가지고 수행하였다. 차단 Fab2 중 6개에 대하여, 원래의 래트 MASP-2에 항-래트 MASP-2 Fab2의 결합 검정의 결과는 또한 표 6에 나타난다. 도 8b는 Fab2 항체 #11로 결합 검정의 결과를 그래프로 설명한다. 유사한 결합 검정을 다른 Fab2에 대하여 수행하였으며, 이것들의 결과는 표 6에 나타난다. 일반적으로, '원래의' MASP-2에 6개의 Fab2 각각의 결합에 대하여 얻은 분명한 K_d는 C3 콘버타제 기능적 검정에서 Fab2에 대한 IC₅₀에 합리적으로 잘 대응한다. MASP-2가 그것의 프로테아제 활성의 활성화시 '불활성'에서 '활성' 형태로의 구조적 변화를 경험한다는 증거가 있다 (Feinberg et al., EMBO J 22:2348-59 (2003); Gal et al., J. Biol. Chem. 280:33435-44 (2005)). C3 콘버타제 형성 검정에 사용된 정상 래트 혈장에서, MASP-2는 주로 '불활성' 치모겐 구조에 존재한다. 반대로, 결합 검

정에서, MASP-2는 고정된 만난에 결합된 MBL과 함께 복합체의 일부로서 존재한다; 그러므로, MASP-2는 '활성' 구조에 있을 것이다 (Petersen et al., J. Immunol Methods 257:107-16, 2001). 결론적으로, 각 검정에서 Fab2가 MASP-2의 다른 구조적 형태와 결합하기 때문에, 이들 두 개의 기능적 검정에서 테스트된, 17개의 차단 Fab2 각각에 대하여 반드시 IC₅₀ 및 K_d 사이의 정확한 대응을 기대하지는 않는다. 그럼에도 불구하고, Fab2 #88을 제외하고, 두 개의 검정에서 테스트된, 다른 16개의 Fab2 각각에 대하여 IC₅₀ 및 분명한 K_d 사이의 상당히 근접한 대응인 것으로 나타난다 (표 6을 참고하면 된다).

[0592] 차단 Fab2 중 여러 개를 C4의 MASP-2 매개된 절단의 억제에 대하여 평가하였다. 도 8c는 C4 절단 검정의 결과는 Fab2 #41로 억제를 나타내며, IC₅₀=0.81 nM인 것을 그래프로 설명한다 (표 6을 참고하면 된다). 도 9에 나타난 바와 같이, 테스트된 Fab2 모두는 C3 콘버타제 검정에서 얻은 것들과 유사한 IC₅₀으로 C4 절단을 억제하는 것으로 발견되었다 (표 6을 참고하면 된다).

[0593] 만난은 렉틴 경로의 알려진 활성화제이지만, 래트 혈청에서 항-만난 항체의 존재가 또한 고전적 경로를 활성화하고 C4의 C1s-매개된 절단에 의해 C4b를 발생시킬 수도 있다는 것은 이론상 가능하다. 하지만, 여러 항-MASP-2 Fab2는 C4b 발생을 강하게 억제하는 것으로 확인되었고, 따라서, MASP-2 매개된 C4 절단에 대한 이 검정의 특이성을 입증한다. C3과 유사하게, C4는 그것의 구조의 일부로서 특이하고 매우 반응성인 티오에스테르 기를 함유한다. 이 검정에서 MASP-2에 의한 C4의 절단시, C4b상의 티오에스테르 기는 에스테르 또는 아마이드 결합을 통해 플라스틱 웰의 바닥에 고정된 거대분자에서 히드록실 또는 아마노 기와 공유결합을 형성할 수 있고, 따라서 ELISA 검정으로 C4b의 검출이 가능하다.

[0594] 이들 연구는 C4 및 C3 콘버타제 활성 모두를 기능적으로 차단하고, 그로 인해 렉틴 경로 활성화를 억제하는 래트 MASP-2 단백질에 대한 고 친화도 Fab2의 생성을 명백하게 입증한다.

[0595] 실시예 11

[0596] 이 실시예는 실시예 10에 설명된 바와 같이 발생한 차단 항-래트 MASP-2 Fab2 항체 중 여러 개에 대한 에피토프 매핑을 설명한다.

[0597] 방법: 도 10에 나타난 바와 같이, 모두 N-말단 6X His 태그를 가진, 다음 단백질이 pED4 벡터를 사용하는 CHO 세포에서 발현된다:

[0598] 래트 MASP-2A, 활성 중심의 세린을 알라닌 (S613A)으로 변화시킴으로써 불활성화된, 전체 길이 MASP-2 단백질;

[0599] 래트 MASP-2K, 자가 활성화를 감소시키기 위해 변형된 (R424K) 전체 길이 MASP-2 단백질;

[0600] CUBI-II, CUBI, EGF-유사 및 CUBI 도메인만을 함유하는 래트 MASP-2의 N-말단 단편; 및

[0601] CUBI/EGF-유사, CUBI 및 EGF-유사 도메인만을 함유하는 래트 MASP-2의 N-말단 단편.

[0602] 이전에 설명된 바와 같이, 이들 단백질을 니켈-친화도 크로마토그래피에 의해 배양물 상층액으로부터 정제하였다 (Chen et al., J. Biol. Chem. 276:25894-02 (2001)).

[0603] 래트 MASP-2의 CCPII 및 세린 프로테아제 도메인을 함유하는, C-말단 폴리펩티드 (CCPII-SP)는 pTrxFus (Invitrogen)를 사용하는 티오레독신 융합 단백질로서 이. 콜리에서 발현되었다. 단백질을 Thiobond 친화도 수지를 사용하여 세포 용해물로부터 정제하였다. 티오레독신 융합 파트너는 음성 대조군으로서 빈 pTrxFus로부터 발현되었다.

[0604] 모든 재조합 단백질을 TBS 완충액에 투석하였고 그것들의 농도는 280 nm에서 OD를 측정함으로써 결정된다.

[0605] 점 블롯 분석:

[0606] 상기 설명되고 도 10에 나타난 다섯 개의 재조합 MASP-2 폴리펩티드 (및 CCPII-세린 프로테아제 폴리펩티드에 대한 음성 대조군으로서 티오레독신 폴리펩티드)의 단계적 희석액을 니트로셀룰로스 막에 스폿팅하였다 (spotted). 스폿팅된 단백질의 양은, 5배 단계에서 100 ng 내지 6.4 pg의 범위에 있었다. 이후의 실험에서, 단백질의 양은, 다시 5배 단계에서, 50 ng 내지 15 pg의 범위에 있었다. 막을 TBS 중의 5% 탈지유 분말 (차단 완충액)로 차단하였고 차단 완충액 (5.0 mM Ca²⁺ 함유) 중의 1.0 µg/ml 항-MASP-2 Fab2와 함께 배양하였다. 결합된 Fab2를 HRP-콘쥬게이트된 항-사람 Fab (AbD/Serotec; 1/10,000 희석됨) 및 ECL 검출 키트 (Amersham)를 사용하여 검출하였다. 하나의 막을 양성 대조군으로서 다클론성 토끼-항 사람 MASP-2-2 Ab와 함께 배양하였다

(Stover et al., J Immunol 163:6848-59 (1999)에 설명됨). 이 경우에, 결합된 Ab를 HRP-콘쥬게이트된 염소 항-토끼 IgG (Dako; 1/2,000 희석됨)를 사용하여 검출하였다.

[0607] MASP-2 결합 검정

[0608] ELISA 플레이트를 4 °C에서 하룻밤 동안 카르보네이트 완충액 (pH 9.0) 중의 재조합 MASP-2A 또는 CUBI-II 폴리펩티드 1.0 µg/웰로 코팅하였다. 웰을 TBS 중의 1% BSA로 차단하였고, 항-MASP-2 Fab2의 단계 희석액을 5.0 mM Ca²⁺를 함유하는 TBS에 추가하였다. 플레이트를 상온에서 1시간 동안 배양하였다. TBS/tween/Ca²⁺로 세 번 세척 후, TBS/ Ca²⁺에 1/10,000 희석된, HRP-콘쥬게이트된 항-사람 Fab (AbD/Serotec)를 추가하였고 플레이트를 상온에서 추가로 1시간 동안 배양하였다. 결합된 항체를 TMB 퍼옥시다제 기질 키트 (Biorad)를 사용하여 검출하였다.

[0609] 결과:

[0610] 다양한 MASP-2 폴리펩티드와 Fab2의 반응성을 입증하는 점 블롯 분석의 결과는 하기 표 7에 제공된다. 표 7에 제공된 많은 값은 대략 반-최고 신호 강도를 제공하기 위해 필요한, 스폿팅된 단백질의 양을 나타낸다. 나타난 바와 같이, 폴리펩티드 모두 (티오레독신 융합 파트너 단백을 제외하고)는 양성 대조군 Ab (다클론성 항-사람 MASP-2-2 혈청, 토끼에서 높아짐)에 의해 인식되었다.

[0611] 표 7: 점 블롯에서 다양한 재조합 래트 MASP-2 폴리펩티드와의 반응성

Fab2 항체 #	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-유사	CCPII-SP	티오레독신
40	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
41	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
11	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
49	0.16 ng	NR	NR	>20 ng	NR
52	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
57	0.032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
60	0.4 ng	0.4 ng	NR	NR	NR
63	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
66	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
67	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
71	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
81	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
86	0.4 ng	NR	NR	10 ng	NR
87	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
양성 대조군	<0.032 ng	0.16 ng	0.16 ng	<0.032 ng	NR

[0612] NR = 반응 없음. 양성 대조군 항체는 토끼에서 높아진, 다클론성 항-사람 MASP-2-2 혈청이다.

[0613] Fab2의 모두는 MASP-2A, 뿐만 아니라 MASP-2K와 반응하였다 (데이터 미도시). Fab2 중 대부분은 CCPII-SP 폴리펩티드를 인식하였지만, N-말단 단편은 아니다. 두 개의 예외는 Fab2 #60 및 Fab2 #57. Fab2 #60은 MASP-2A 및 CUBI-II 단편을 인식하지만, CUBI/EGF-유사 폴리펩티드 또는 CCPII-SP 폴리펩티드는 아니며, 그것은 CUBI의 에피토프에 결합하는 것으로 제안되거나, CUBI 및 EGF-유사 도메인에 걸쳐 있다. Fab2 # 57은 MASP-2A를 인식하지만 테스트된 MASP-2 단편 중 어떤 것은 아니며, 이 Fab2가 CCP1의 에피토프를 인식한다는 것을 나타낸다. Fab2 #40 및 #49는 완벽한 MASP-2A에만 결합하였다. 도 11에 나타난 ELISA 결합 검정에서, Fab2 #60은 또한 약간 더 낮은 분명한 친화도이지만, CUBI-II 폴리펩티드에 결합하였다.

[0614] 이들 발견은 MASP-2 단백질의 다수의 영역에 대한 독특한 차단 Fab2의 확인을 입증한다.

[0615] 실시예 12

[0616] 이 실시예는 쥐 신장 국부성 빈혈/재관류 모델에서 MASP-2-/- 마우스의 분석을 설명한다.

[0617] **배경/근거:** 체온에서 신장의 국부성 빈혈-재관류 (I/R) 손상은 저 혈량성 쇼크, 신장 동맥 폐색 및 교배-클램핑 (clamping) 과정을 포함하는, 많은 임상적 질병에 관련성을 갖는다. 신장 국부성 빈혈-재관류 (I/R)는 급성 신부전의 중요한 원인이며, 최대 50%의 치사율과 관련된다 (Levy et al., JAMA 275:1489-94, 1996; Thadhani et

al., N. Engl. J. Med. 334:1448-60, 1996). 이식 후 신부전은 신장 이식 후 일반적이고 위협적인 합병증이다 (Nicholson et al., Kidney Int. 58:2585-91, 2000). 신장 I/R 손상에 대한 효과적인 치료는 현재 이용 가능하지 않고 혈액 투석은 이용 가능한 유일한 치료이다. 신장 I/R 손상의 병리생리학은 복잡하다. 최근 연구는 보체의 렉틴 경로 활성화가 신장 I/R 손상의 발병에 중요한 역할을 가질 수도 있다 (deVries et al., Am. J. Path. 165:1677-88, 2004).

방법:

MASP-2(-/-) 마우스를 실시예 1에 설명된 바와 같이 발생시켰고 적어도 10 세대 동안 C57b1/6과 역교배하였다. 체중이 22-25 g인, 6마리의 수컷 MASP-2(-/-) 및 여섯 마리의 야생형 (+/+) 마우스에 Hypnovel (6.64 mg/kg; Roche products Ltd, Welwyn Garden City, UK)을 복강 내 주사로 투여하였고, 이후에 이소플루란 (Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK)의 흡입에 의해 마취시켰다. 이소플루란을 선택하였는데 그것이 최소의 간 독성을 가진 가벼운 흡입 마취제이기 때문이다; 농도가 정확하게 생성되고 동물은 장기간 마취 후에도, 신속하게 회복한다. Hypnovel을 그것이 동물에서 신경 이완성 진통 상태 (neuroleptanalgesia)의 질병을 생성하고 더 적은 이소플루란이 투여될 필요가 있다는 것을 의미하기 때문에 투여하였다. 따뜻한 패드를 일정한 체온을 유지하기 위해 동물 아래에 배치하였다. 그 다음, 정중선 복부 절개를 수행하였고 체강을 한 쌍의 리트랙터 (retractor)를 사용하여 열어두었다. 연결 조직을 신장 정맥 위로 및 아래로 제거하였고 오른쪽 및 왼쪽 신장 둘 다의 동맥, 및 신장 페디클 (pedicle)을 55분의 기간 동안 미소동맥류 클램프의 적용을 통해 클램핑하였다. 국부성 빈혈의 이 기간은 처음에 본 연구실에서 수행된 이전 연구에 기초하였다 (Zhou et al., J. Clin. Invest. 105:1363-71 (2000)). 또한, 55분의 표준 허혈 시간을 허혈성 적정에 따라 선택하였고 55분이 5%보다 낮은 저 치사율로 가역적인 일정한 손상을 제공한다는 것을 발견하였다. 폐색 후, 따뜻한 식염수 (37 °C)의 0.4 ml을 복강에 배치하였고 국부성 빈혈의 기간 동안 복부를 폐쇄하였다. 미소동맥류 클램프의 제거 후, 신장으로 혈액 역류의 지표인, 색깔이 변할 때까지 신장을 관찰하였다. 따뜻한 식염수의 추가 0.4 ml을 복강에 배치하였고 개구 (opening)를 봉합하였고, 그래서 동물은 그것들의 케이지로 돌아갔다. 꼬리 혈액 샘플을 클램프를 제거한 후 24시간에 채취하였고 48시간에 마우스를 희생시켰고 추가적인 혈액 샘플을 수거하였다.

신장 손상의 평가: 신기능을 6마리의 수컷 MASP-2(-/-) 및 6마리의 WT (+/+) 마우스에서 재관류 후 24 및 48시간에 평가하였다. 혈액 크레아티닌 측정값을 질량 분석법에 의해 결정하였으며, 이것은 신기능의 재생 가능한 지수 (민감도 < 1.0 $\mu\text{mol/L}$)를 제공한다. **도 12**는 재관류 후 24시간 및 48시간에 야생형 C57b1/6 대조군 및 MASP-2 (-/-)에 대한 혈액 요소 질소 제거를 그래프로 설명한다. **도 12**에 나타난 바와 같이, MASP-2(-/-) 마우스는 야생형 대조군 마우스와 비교하여 24 및 48시간에 혈액 요소의 양의 많은 감소를 나타냈으며, 국부성 빈혈 재관류 손상 모델에서 신장 손상의 보호 기능 효과를 나타낸다.

전체적으로, 증가된 혈액 요소는 수술 절차 및 허혈성 손상 후 24 및 48시간에 WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스 둘 다에서 나타났다. 비-허혈성 WT (+/+) 수술 동물의 혈액 요소의 수준을 별도로 5.8 mmol/L인 것으로 결정하였다. **도 12**에 나타난 데이터 이외에, 하나의 MASP-2 (-/-) 동물은 허혈성 손상으로부터 거의 완벽한 보호를 나타냈고, 24 및 48시간에 각각 6.8 및 9.6 mmol/L의 값을 갖는다. 이 동물을 잠재적 이상치로서 그룹 분석으로부터 제외하였으며, 허혈성 손상이 제공되지 않을 수도 있다. 그러므로, **도 12**에 나타난 최종 분석은 5마리의 MASP-2(-/-) 마우스 및 6마리의 WT (+/+)마우스를 포함하였고 MASP-2 (-/-) 마우스에서 24 및 48시간에 통계적으로 유의한, 혈액 요소의 감소가 나타났다 (스튜던트 t-테스트 (Student t-test) $p < 0.05$). 이들 발견은 MASP-2 활성의 억제이 허혈성 손상으로 인한 신장 손상으로부터 보호적 또는 치료적 효과를 가질 것으로 예상된다는 것을 나타낸다.

실시예 13

이 실시예는 쥐 황반 변성 모델에서 MASP-2-/-의 결과를 설명한다.

배경/근거: 산업화된 세계에서 나이-관련 황반 변성 (AMD)은 55살 이후 맹목의 가장 중요한 원인이다. AMD는 두 개의 주요 형태로 발생한다: 혈관 신생 (습식) 및 위축성 (건식) AMD. 혈관 신생 (습식) 형태는 AMD와 관련된 중증 시각 손실 중 90%를 설명하지만, AMD에 걸린 개체 중 ~20%만이 습식 형태로 발달한다. AMD의 임상적 홀마크는 다수의 다루젠, 지리학상 위축, 및 맥락막 신혈관 형성 (CNV)을 포함한다. 2004년 12월에, FDA는 Macugen (페가프타닙), 습식 (혈관 신생) 형태의 AMD의 치료를 위해, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)의 효과를 특이적으로 표적화하고 차단하는, 새로운 등급의 안과 약물을 승인하였다 (Ng et al., Nat Rev. Drug Discov 5:123-32 (2006)). Macugen은 AMD 환자의 하위 그룹에 대한 유망한 새로운 치료적 옵션을 제공하지만, 이 복잡성 질환에 대한 추가적 치료를 개발할 긴급한 필요가 있다. 조사의 다수의, 독립적인 라인은 AMD의 발병시 보체 활성화에

대한 중심 역할에 연루된다. AMD의 가장 심각한 형태인 맥락막 신혈관 형성 (CNV)의 발병은 보체 경로의 활성화를 수반할 수도 있다.

[0626] 25년 이상 전에, Ryan은 동물에서 CNV의 레이저-유발된 손상 모델을 설명한다 (Ryan, S.J., Tr. Am. Opth. Soc. LXXVII:707-745, 1979). 처음에 붉은털원숭이를 사용하여 모델을 개발하였지만, 이후 마우스를 포함하는, 다양한 연구 동물의 CNV의 유사 모델을 개발하기 위해 같은 기술을 사용하였다 (Tobe et al., Am. J. Pathol. 153:1641-46, 1998). 이 모델에서, 레이저 광응고는 부르흐의 막 (Bruch's membrane)을 파괴하기 위해 사용되며, 이 작용은 CNV-유사 막의 형성을 일으킨다. 레이저-유발된 모델은 사람 질병의 중요한 특징 중 많은 것을 캡처한다 (최근 리뷰를 위해, Ambati et al., Survey Ophthalmology 48:257-293, 2003을 참고하면 된다). 레이저-유발된 마우스 모델이 잘 확립되어 있고, 많은, 증가하는 수의 연구 프로젝트에서 실험적 근거로서 사용된다. 레이저-유발된 모델은 이 모델을 사용하는 발병 및 약물 억제의 전임상적 연구가 사람의 CNV에 적절하다는 점에서 사람의 CNV와 충분한 생물학적 유사성을 공유하는 것으로 일반적으로 인정된다.

[0627] **방법:**

[0628] 실시예 1에 설명된 바와 같이 MASP-2^{-/-} 마우스를 발생시켰고 C57b1/6와 10 세대 동안 역교배하였다. 레이저-유발된 CNV의 경로에서 MASP-2^(-/-) 및 MASP-2^(+/+) 수컷 마우스를 평가할 때의 결과와 비교된 현재의 연구를 레이저-유발된 CNV의 경로, 조직 손상의 측정 및 VEGF, 레이저 손상 후 CNV에서, 망막 색소 상피 (RPE)/맥락막에서 연루된 강한 혈관 형성 인자의 수준의 결정으로서 레이저 공초점 현미경을 스캐닝함으로써 레이저-유발된 CNV의 양에 초점을 맞춘 혈관 신생 AMD의 가속화된 모델에서 평가하였다.

[0629] **맥락막 신혈관 형성 (CNV)의 유발:** 레이저 광응고 (532 nm, 200 mW, 100 ms, 75 μ m; Oculight GL, Iridex, Mountain View, CA)를 약물 그룹 할당에 마스킹된 (masked) 단일 대체에 의해 0 단계에 각 동물의 두 눈에 수행하였다.

[0630] 레이저 스폿을 시신경 주위에 표준화된 방식으로 적용하였고, 세극등 전달 시스템 및 콘택트 렌즈로서 커버슬립을 사용하였다. 레이저 손상의 형태상 종점은 공동화 기포 (cavitation bubble), 부르흐 막의 붕괴와 관련된 것으로 생각되는 징후의 등장이었다. 상세히 설명된 방법 및 평가되는 종점은 다음과 같다.

[0631] **플루오레세인 혈관 조영법 (Fluorescein Angiography):** 플루오레세인 혈관 조영법을 레이저 광응고 후 1주일에 카메라 및 이미징 시스템 (TRC 50 1A 카메라; ImageNet 2.01 시스템; Topcon, Paramus, NJ)을 가지고 수행하였다. 사진을 0.1 ml의 2.5% 플루오레세인 나트륨의 복강 내 주사 후 안저카메라 렌즈와 접촉된 20-D 렌즈로 캡처하였다. 레이저 광응고 또는 혈관 조영법에 수반되지 않는 망막 전문가가 앉은 자리에서 마스킹된 방식으로 플루오레세인 혈관 조영도를 평가하였다.

[0632] **맥락막 신혈관 형성 (CNV)의 부피:** 레이저 손상 일주일 후, 눈을 적출하였고 4 °C에서 30분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정하였다. 전방 세그먼트를 제거함으로써 아이 컵 (eye cup)을 얻었고 PBS로 세 번 세척한 후, 이어서 메탄올 계열을 통해 탈수 및 재수화하였다. 완충액 (1% 소 혈청알부민 및 0.5% Triton X-100을 함유하는 PBS)으로 상온에서 30분 동안 두 번 차단한 후, 아이 컵을 4 °C에서 하룻밤 동안 0.2% BSA 및 0.1% Triton X-100을 함유하는 PBS로 희석된, 0.5% FITC-이소렉틴 B4 (Vector laboratories, Burlingame, CA)와 함께 배양하였으며, 이것은 내피 세포의 표면상의 말단 β -D-갈락토스 잔기에 결합하고 선택적으로 쥐 맥관 구조를 표지한다. 0.1% Triton X-100을 함유하는 PBS로 두 번 세척 후, 감각 신경 망막을 부드럽게 떼어냈고 시신경으로부터 절단하였다. 네 개의 편안한 방사형 절개를 만들었고 남아있는 RPE-맥락막-공막 복합체를 항페이드 (antifade) 배지 (Immu-Mount Vectashield Mounting Medium; Vector Laboratories)에 플랫폼마운트하였고 (flatmounted) 커버슬립을 덮었다.

[0633] 플랫폼마운트를 스캐닝 레이저 콘포칼 현미경 (TCS SP; Leica, Heidelberg, Germany)으로 검사하였다. 혈관을 푸른색 아르곤 파장 (488 nm)으로 들뜨게 하고 515 및 545 nm 사이의 방출을 캡처함으로써 시각화하였다. 모든 이미징 연구에 40X 오일-침침 대물렌즈를 사용하였다. 수평 광학 절편 (1 μ m 단계)을 RPE-맥락막-공막 복합체의 표면으로부터 얻었다. 병변에 연결된, 주위 맥락막 혈관 네트워크가 확인될 수 있는 가장 깊은 초점면이 병변의 바닥인 것으로 판단되었다. 레이저-표적화된 면적의 및 이 기준면에 표면적인 어떤 혈관도 CNV로 판단되었다. 각 절편의 이미지를 디지털 방식으로 저장하였다. CNV-관련 형광 발광의 면적을 현미경 소프트웨어 (TCS SP; Leica)를 가지고 컴퓨터화된 이미지 분석에 의해 측정하였다. 각 수평 절편에서 전체 형광 발광 면적의 합계를 CNV의 부피에 대한 지수로서 사용하였다. 치료 그룹 할당에 마스킹된 조작자에 의해 이미징을 수행하였다.

[0634] 각 레이저 병변이 CNV에 걸릴 가능성이 그것이 속한 그룹 (마우스, 눈, 및 레이저 스폿)에 의해 영향을 받기 때

문에, 평균 병변 부피를 분할 플롯 반복 측정 설계 (split plot repeated-measures design)와 혼합된 선형 모델을 사용하여 비교하였다. 전체 플롯 인자는 동물이 속한 유전 그룹인 반면에, 분할 플롯 인자는 눈이었다. 통계적 유의성을 0.05 수준에서 결정하였다. 평균의 사후 비교 (Post hoc comparison)는 다중 비교를 위한 본페로니 조정 (Bonferroni adjustment)으로 구성되었다.

[0635] **VEGF ELISA.** 12개의 레이저 스폿에 의한 손상 후 3일에, RPE-맥락막 복합체를 용해 완충액 (프로테아제 억제제가 들어있는, 20 mM 이미다졸 HCl, 10 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10 mM NaF, 1 mM Na 몰리브데이트, 및 1 mM EDTA)에서 15분 동안 얼음 위에서 소니케이션하였다 (sonicated). 상층액의 VEGF 단백질 수준을 모든 스플라이스 변종을 인식하는 ELISA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN)에 의해 450 내지 570 nm (Emax; Molecular Devices, Sunnyvale, CA)에서 결정하였고, 총 단백질에 대하여 표준화하였다. 2배수 측정을 광응고, 이미징, 또는 혈관 조영법에 수반되지 않은 조작자에 의해 마스킹된 방식으로 수행하였다. VEGF 수를 적어도 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SEM으로 나타냈고 만-휘트니 U 테스트 (Mann-Whitney U test)를 사용하여 비교하였다. 귀무 가설은 $P < 0.05$ 에서 거부되었다.

[0636] **결과:**

[0637] **VEGF 수준의 평가:**

[0638] **도 13a**는 0 단계에서 C57b16 야생형 및 MASP-2(-/-) 마우스로부터 분리된 RPE-맥락막 복합체의 VEGF 단백질 수준을 그래프로 설명한다. **도 13a**에 나타난 바와 같이, VEGF 수준의 평가는 C57b1 야생형 대조군 마우스에 비해 MASP-2 (-/-) 마우스의 VEGF에 대한 베이스라인 수준의 감소를 나타낸다. **도 13b**는 레이저 유발된 손상 후 3일에 측정된 VEGF 단백질 수준을 그래프로 설명한다. **도 13b**는 레이저 유발된 손상 후 3일에 야생형 (+/+) 마우스에서 VEGF 수준이 크게 증가했다는 것을 그래프로 설명하고, 발표된 연구 (Nozaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:2328-33 (2006))와 일치한다. 하지만, 놀랍게도 매우 낮은 수준의 VEGF가 MASP-2 (-/-) 마우스에서 나타났다.

[0639] **맥락막 신혈관 형성 (CNV)의 평가:**

[0640] 레이저 유발된 황반 변성 후 VEGF 수준의 감소 이외에, CNV 면적을 레이저 손상 전 및 후에 결정하였다. **도 14**는 레이저 유발된 손상 후 7일에 C57b1 야생형 마우스 및 MASP-2(-/-) 마우스에서 측정된 CNV 부피를 그래프로 설명한다. **도 14**에 나타난 바와 같이, MASP-2 (-/-) 마우스는 야생형 대조군 마우스와 비교하여 레이저 유발된 손상 후 7일에 CNV 면적의 약 30% 감소를 나타냈다.

[0641] 이들 발견은 야생형 (+/+) 대조군에 비해 MASP (-/-) 마우스에 나타난 바와 같이 VEGF 및 CNV의 감소를 나타내고 억제제로 MASP-2의 상기 차단은 황반 변성의 치료에서 예방적 또는 치료적 효과를 가질 것이다.

[0642] **실시예 14**

[0643] 이 실시예는 트롬빈 활성화가 생리학적 조건 하에 렉틴 경로 활성화 후 발생할 수 있다는 것을 입증하고, MASP-2 수반의 정도를 입증한다. 정상 래트 혈청에서, 렉틴 경로의 활성화는 보체 활성화 (C4 침착으로서 평가됨)와 동시에 트롬빈 활성화 (트롬빈 침착으로서 평가됨)로 이어진다. **도 15a** 및 **도 15b**에 나타날 수 있는 바와 같이, 이 시스템에서 트롬빈 활성화는 MASP-2 차단 항체 (Fab2 포맷)에 의해 억제되며, 보체 활성화에 대한 것 (**도 15a**)과 유사한 억제 농도-반응 곡선 (**도 15b**)를 나타낸다. 이들 데이터는 렉틴 경로의 활성화가 그것이 외상시 발생하기 때문에 MASP-2에 전적으로 의존적인 과정에서 보체 및 응고 시스템 둘 다의 활성화로 이어질 것이라는 것을 제안한다. 참고로, MASP2 차단 항체는 과도한 전신성 응고, 예를 들어, 주요 외상 경우에서 사망으로 이어지는 홀마크 중 하나인, 파종성 혈관 내 응고의 경우를 완화하는데 있어서 효과적이라는 것을 입증할 수도 있다.

[0644] **실시예 15**

[0645] 이 실시예는 MASP-2 +/- 결핍 및 MASP-2 +/- 충분한 마우스에서 파종성 혈관 내 응고 ("DIC")의 국부화된 슈바르츠만 반응 모델을 사용하여 발생한 결과를 제공하여 DIC에서 렉틴 경로의 역할을 평가한다.

[0646] **배경/근거:**

[0647] 상기 설명된 바와 같이, MASP-2의 차단은 렉틴 경로 활성화를 억제하고 아나필라톡신 C3a 및 C5a 둘 다의 발생을 감소시킨다. C3a 아나필라톡신은 시험관 내에서 강한 혈소판 응집자인 것으로 나타날 수 있지만, 그것들의 생체 내 수반은 덜 잘 정의되고 상처 회복시 혈소판 물질 및 플라즈민의 방출은 2차적으로만 보체 C3을 수반할

수도 있다. 이 실시예에서, C3 활성화의 장기간 증가가 과중성 혈관 내 응고를 발생시키기 위해 필수적인지를 나타내기 위해 렉틴 경로의 역할을 MASP-2 (-/-) 및 WT (+/+) 마우스에서 분석하였다.

[0648] 방법:

[0649] 본 연구에 사용된 MASP-2 (-/-) 마우스를 실시예 1에 설명된 바와 같이 발생시켰고 C57b1/6와 적어도 10 세대 동안 역교배시켰다.

[0650] 국부화된 슈바르츠만 반응 모델을 이 실험에 사용하였다. 국부화된 슈바르츠만 반응 (LSR)은 선천적 면역 시스템의 세포 및 체액 요소의 잘 특성화된 기여와의 지질다당류 (LPS)-유발된 반응이다. 보체에 대한 LSR의 의존성은 잘 확립되어 있다 (Polak, L., et al., Nature 223:738-739 (1969); Fong J.S. et al., J Exp Med 134:642-655 (1971)). LSR 모델에서, TNF 알파 (500 ng, 음낭 내)를 가진 마우스가 4시간 동안 준비되었고, 마우스를 마취하였고 거고근의 생존 중 현미경 관찰을 준비하였다. 좋은 혈류 (1-4 mm/s)를 가진 후모세관 소정맥 (15-60 μ m 지름)의 네트워크를 관찰을 위해 선택하였다. 동물에 형광 발광 항체를 처리하여 호중구, 또는 혈소판을 선택적으로 표지하였다. 혈관의 네트워크를 연속적으로 스캔하였고 모든 혈관의 이미지를 이후 분석에 관하여 디지털 방식으로 기록하였다. 미소 순환의 기초 상태를 기록한 후, 마우스는 LPS (100 μ g)의 단일 정맥 내 주사를, 단독으로 또는 하기 나열된 약제와 함께, 받았다. 같은 네트워크의 혈관을 1시간 동안 10분 마다 스캔하였다. 배경 형광 발광을 뺀으로써 형광단의 특이적 누적을 확인하였고 이미지를 경계화함으로써 향상시켰다. 반응의 규모를 기록된 이미지로부터 측정하였다. 슈바르츠만 반응의 주요 측정은 집계 데이터였다.

[0651] 본 연구는 MASP-2 +/+ 충분, 또는 야생형, 알려진 보체 경로 고갈제, 코브라 독 인자 (CVF), 또는 말단 경로 억제제 (C5aR 길항제)에 노출된 마우스를 비교하였다. 결과 (**도 16a**)는 CVF, 뿐만 아니라 C5aR 길항제 둘 다는 맥관구조에서 응집체의 등장을 방지한다는 것을 입증한다. 또한, MASP-2 -/- 결핍 마우스 (**도 16b**)는 또한 국부화된 슈바르츠만 반응의 완벽한 억제를 입증하였으며, 렉틴 경로 수반을 지지한다. 이들 결과는 DIC 발생시 MASP-2의 역할을 명백하게 입증하고 DIC의 치료 및 방지에 MASP-2 억제제의 사용을 지지한다.

[0652] 실시예 16

[0653] 이 실시예는 쥐 망막 이식 모델에서 MASP-2 (-/-) 마우스의 분석을 설명한다.

[0654] 배경/근거:

[0655] 신장 이식의 기능적 결과에서 MASP-2의 역할은 마우스 모델을 사용하여 평가하였다.

[0656] 방법:

[0657] 신장 이식의 기능적 결과를 6마리의 WT (+/+) 이식 수령자 (B6), 및 6마리의 MASP-2 (-/-) 이식 수령자와 함께, 하나의 신장이 적출된 수령자 마우스에 단일 신장 동계이식을 사용하여 평가하였다. 이식된 신장의 기능을 평가하기 위해, 이식 5일 후 남은 원래의 신장을 수령자로부터 제거하였고, 신기능을 혈액 요소 질소 (BUN) 수준의 측정에 의해 24시간 후 평가하였다.

[0658] 결과:

[0659] **도 17**은 WT (+/+) 수령자 및 MASP-2 (-/-) 수령자에서 신장 이식 후 6일에 신장의 혈액 요소 질소 (BUN) 수준을 그래프로 설명한다. **도 17**에 설명된 바와 같이, 크게 증가된 BUN 수준을 WT (+/+) (B6) 이식 수령자 (마우스의 정상 BUN 수준은 < 5 mM이다)에서 관찰하였으며, 신부전을 나타낸다. 반대로, MASP-2 (-/-) 동계이식 수령자 마우스는 실질적으로 더 낮은 BUN 수준을 나타냈으며, 개선된 신기능을 제안한다. 그것은 이들 결과를 WT (+/+) 신장 기증자로부터 이식을 사용하여 얻었다는 것을 나타내며, 이식 수령자 단독에서 기능적 렉틴 경로의 부재가 치료적 이점을 달성하기 위해 충분하다는 것을 제안한다. 종합해보면, 이들 결과는 MASP-2 억제를 통한 렉틴 경로의 일시적인 억제는 신장 이식에서 발병률 및 지연된 이식 기능을 감소시키는 방법을 제공하고, 이 접근법은 다른 이식 설정에 유용할 가능성이 높다는 것을 나타낸다.

[0660] 실시예 17

[0661] 이 실시예는 쥐 다균성 패혈성 복막염 모델에서 MASP-2 (-/-) 마우스가 패혈 쇼크에 저항성이라는 것을 입증한다.

[0662] 배경/근거:

[0663] 감염시 MASP-2 (-/-)의 잠재적 효과를 평가하기 위해, 맹장 결찰 및 천자 (CLP) 모델, 다균성 패혈성 복막염의

모델을 평가하였다. 이 모델은 사람 패혈성 복막염의 경로를 가장 정확하게 모방하는 것으로 생각된다. 맹장 결찰 및 천자 (CLP) 모델은 맹장이 결찰되고 바늘에 의해 천자되어, 림프 배출을 통해 혈액에 도달하고 모든 복부 기관에 분포하여, 다기관 기능 부전 및 패혈 쇼크로 이어지는 박테리아의, 복강으로 지속적인 누출로 이어지는 모델이다 (Eskandari et al., J Immunol 148(9):2724-2730 (1992)). CLP 모델은 환자에서 관찰된 패혈증의 경로를 모방하고 초기 초-염증성 반응에 이어 뚜렷한 저-염증성 단계를 유발한다. 이 단계 동안, 동물은 박테리아 도전에 매우 민감하다 (Wichterman et al., J. Surg. Res. 29(2):189-201 (1980)).

방법:

맹장 결찰 및 천자 (CLP) 모델을 사용하여 다균성 감염의 치사율을 WT (+/+) (n=18) 및 MASP-2 (-/-) (n=16) 마우스에서 측정하였다. 간략히 설명하면, MASP-2 결핍 마우스 및 그것들의 야생형 한배 새끼를 마취하였고 맹장을 몸 밖으로 꺼내고 말단부 위로 30%를 결찰하였다. 그 후, 맹장을 0.4 mm 지름의 바늘로 한 번 천자하였다. 맹장을 복강에 놓고 피부를 클램프로 폐쇄한다. CLP를 받은 마우스의 생존을 CLP 후 14일의 기간 동안 관찰하였다. 복막 세척액을 박테리아 로드 (load)를 측정하기 위해 CLP 16시간 후 마우스에서 수거하였다. 단계 희석된 복막 세척액을 PBS로 제조하였고 물리 힌튼 플레이트 (Mueller Hinton plate)에 접종하였으며, 이후에 박테리아 로드가 결정된 후 24시간 동안 혐기성 조건 하에 37 °C에서 배양하였다.

폐 및 비장의 CLP 16시간 후 WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에서 박테리아 감염에 대한 TNF-알파 시토킨 반응을 또한 정량적 실시간 폴리머라제 연쇄 반응 (qRT-PCR)을 통해 측정하였다. WT (+/+) 및 MASP-2 (-/-) 마우스에서 CLP 16시간 후 TNF-알파의 혈청 수준을 또한 샌드위치 ELISA에 의해 정량하였다.

결과:

도 18은 CLP 과정 후 날짜의 함수로서 CLP 처리된 동물의 퍼센트 생존율을 그래프로 설명한다. **도 18**에 나타난 바와 같이, MASP-2 (-/-) 마우스에 결핍된 렉틴 경로는 WT (+/+) 마우스와 비교된 바와 같이 맹장 결찰 및 천자 모델을 사용하는 다균성 감염 후 마우스의 치사율을 증가시키지 않는다. 하지만, **도 19**에 나타난 바와 같이, MASP-2 (-/-) 마우스는 그것들의 WT (+/+) 한배 새끼와 비교할 때 CLP 후 복막 세척액에서 상당히 더 높은 박테리아 로드 (대략 박테리아 수의 1000배 증가)를 나타냈다. 이들 결과는 MASP-2 (-/-) 결핍 마우스가 패혈 쇼크에 저항성이라는 것을 나타낸다. 이 모델의 MASP-2 결핍 마우스에서 감소된 박테리아 제거는 C3 침착이 MASP-2 의존적이라는 것이 입증되었기 때문에, 손상된 C3b 매개된 식균작용으로 인한 것일 수도 있다.

박테리아 감염에 대한 TNF-알파 시토킨 반응은 WT (+/+) 대조군 (데이터 미도시)에 비교된 바와 같이 MASP-2 (-/-) 마우스에서 증가하지 않았다는 것이 입증되었다. 또한 TNF-알파의 혈청 수준이 거의 변하지 않은 채로 유지되는 경우, CLP 16시간 후 MASP-2 (-/-) 마우스와 달리 WT (+/+) 마우스에서 TNF-알파의 혈청 농도가 상당히 더 높다는 것이 결정되었다. 이들 결과는 패혈성 질병에 대한 극심한 염증성 반응이 MASP-2 (-/-) 마우스에서 조절되었고 더 높은 박테리아 수의 존재시 동물이 생존할 수 있게 한다는 것을 제안한다.

종합해보면, 이들 결과는 패혈증의 경우에 렉틴 경로 보체 활성화의 잠재적 부작용 및 극도의 패혈증에 걸린 환자의 증가된 치사율을 입증한다. 이들 결과는 패혈증 동안 MASP-2 결핍이 염증성 면역 반응을 조절하고 염증 매개자의 발현 수준을 감소시킨다는 것을 추가로 입증한다. MASP-2에 대한 억제 단클론성 항체의 투여에 의한 MASP-2 (-/-)의 억제는 패혈 쇼크로 고통받는 대상체의 염증성 반응을 감소시키기 위해 효과적인 것으로 생각된다.

실시예 18

이 실시예는 쥐 비강 내 감염 모델에서 MASP-2 (-/-) 마우스의 분석을 설명한다.

배경/근거:

슈도모나스 애틀기노사는, 특히 면역-취약한 개체의 넓은 범위의 감염을 유발하는 그람 음성 기회 감염성 사람 박테리아 병원체이다. 그것은 후천적 병원 내 감염, 특히 병원-획득 폐렴의 주요 공급원이다. 그것은 또한 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis; CF) 환자의 큰 발병률 및 치사율의 원인이 된다. 피. 애틀기노사 폐 감염은 대규모 조직 손상을 일으키는 강한 호중구 집합 및 유효한 폐 염증을 특징으로 한다 (Palanki M.S. et al., J. Med. Chem 51:1546-1559 (2008)).

이 실시예에서, MASP-2 (-/-) 마우스에서 렉틴 경로의 제거가 박테리아 감염에 대한 마우스의 민감성을 증가시키는 지 결정하기 위해 연구에 착수하였다.

- [0676] **방법:**
- [0677] 22마리의 WT (+/+) 마우스, 22마리의 MASP-2 (-/-) 마우스, 및 11마리의 C3 (-/-) 마우스에 피. 애틀기노사 박테리아 균주의 비강 내 투여를 시도하였다. 마우스를 감염 후 6일 동안 관찰하였고 퍼센트 생존율을 나타내는 카플란-마이어 플롯을 구성하였다.
- [0678] **결과:**
- [0679] 도 20은 감염 6일 후 WT (+/+), MASP-2 (-/-) 또는 C3 (-/-) 마우스의 퍼센트 생존율의 카플란-마이어 플롯이다. 도 20에 나타난 바와 같이, WT (+/+) 마우스에 비해 MASP-2 (-/-) 마우스에서 차이가 관찰되지 않았다. 하지만, C3 (-/-) 마우스에서 고전적 (C1q) 경로의 제거는 박테리아 감염에 대하여 중증 민감성을 일으켰다. 이들 결과는 MASP-2 억제제가 박테리아 감염에 대한 민감성을 증가시키지 않는다는 것을 입증하며, 고전적 보체 경로를 사용하여 감염과 싸우는 환자의 능력을 취약하게 하지 않으면서 MASP-2를 억제함으로써 외상 환자의 원하지 않는 염증성 합병증을 감소시키는 것이 가능하다는 것을 나타낸다.
- [0680] **실시예 19**
- [0681] 이 실시예는 실시예 10에 설명된 바와 같이 확인된 대표적인 고 친화도 항-MASP-2 Fab2 항체의 약물동력학적 분석을 설명한다.
- [0682] **배경/근거:**
- [0683] 실시예 10에 설명된 바와 같이, 래트 렉틴 경로를 차단하는 고-친화도 항체를 확인하기 위해, 래트 MASP-2 단백질질을 이용하여 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝 (pan)한다. 면역학적 다양성을 제공하기 위해 이 라이브러리를 설계하였고 전체 사람 면역글로빈 유전자 서열을 사용하여 구성되었다. 실시예 10에 설명된 바와 같이, 높은 친화도로 래트 MASP-2 단백질에 결합된 대략 250개의 개개의 파지 클론을 ELISA 스크리닝에 의해 확인하였다. 이들 클론의 시퀀싱은 50개의 독특한 MASP-2 항체를 암호화하는 파지를 확인하였다. Fab2 단백질은 이들 클론으로부터 발현되고, 정제되고 MASP-2 결합 친화도 및 렉틴 보체 경로 기능적 억제에 대하여 분석되었다.
- [0684] 실시예 10의 표 6에 나타난 바와 같이, 기능적 차단 활성을 가진 17개의 항-MASP-2 Fab2를 이 분석의 결과로서 확인하였다 (차단 항체에 대하여 34% 적중률). Fab2에 의한 렉틴 보체 경로의 기능적 억제는 C4 침착의 수준에서 분명하며, 이것은 MASP-2에 의한 C4 절단의 직접적인 측정값이다. 중요하게는, 억제는 C3 콘버타제 활성이 평가될 때 똑같이 명백했으며, 렉틴 보체 경로의 기능적 차단을 입증한다. 실시예 10에 설명된 바와 같이 확인된 17개의 MASP-2를 차단하는 Fab2는 10 nM 이하의 IC₅₀ 값으로 C3 콘버타제 형성을 강하게 억제한다. 확인된 17개의 Fab2 중 8개는 나노몰 이하의 범위의 IC₅₀ 값을 갖는다. 그러므로, MASP-2를 차단하는 Fab2 중 17개 모두는 도 8a-c에 나타난 바와 같이 반드시 렉틴 경로 C3 콘버타제 검정에서 C3 콘버타제 형성의 완벽한 억제를 제공하였고 실시예 10의 표 6에 요약되었다. 게다가, 표 6에 나타난 17개의 차단 항-MASP-2 Fab2 각각은 C3b 발생을 강하게 억제하고 (>95%), 따라서 렉틴 경로 C3 콘버타제에 대한 이 검정의 특이성을 입증한다.
- [0685] 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 전체 길이 항체 이소타입 변종은 Fab2 #11로부터 유도되었다. 이 실시예는 약물동력학적 파라미터에 대하여 이들 이소타입의 생체 내 특성화를 설명한다.
- [0686] **방법:**
- [0687] 실시예 10에 설명된 바와 같이, 래트 MASP-2 단백질질을 이용하여 Fab 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하였으며, 이것으로부터 Fab2#11을 확인하였다. 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 전체 길이 항체 이소타입 변종은 Fab2 #11로부터 유도되었다. 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 전체 길이 항체 이소타입 둘 다를 다음과 같이 약물동력학적 파라미터에 대하여 생체 내에서 특성화하였다.
- [0688] **마우스에서 생체 내 연구:**
- [0689] 생체 내 혈장 렉틴 경로 활성에 대한 항-MASP-2 항체 투여의 효과를 조사하기 위해 마우스에서 약물동력학적 연구를 수행하였다. 본 연구에서, C4 침착을 마우스 항-MASP-2 MoAb (Fab2#11로부터 유도된 마우스 IgG2a 전체 길이 항체 이소타입)의 0.3 mg/kg 또는 1.0 mg/kg의 피하 (sc) 및 복강 내 (ip) 투여 후 다양한 시점에서 렉틴 경로 거정에서 생체 외 측정하였다.
- [0690] 도 21은 항-MASP-2 MoAb의 0.3 mg/kg 또는 1.0 mg/kg의 피하 투여 후 다양한 시점에서 마우스 (n=3 마우스/그룹)로부터 채취된 희석되지 않은 혈청 샘플에서 생체 외 측정된 렉틴 경로 특이적 C4b 침착을 그래프로 설명한

다. 항체 투여 전에 수거된 마우스의 혈청 샘플은 음성 대조군의 역할을 하는 한편 (100% 활성), 같은 차단 항-MASP-2 항체의 100 nM로 시험관 내 보충된 혈청을 양성 대조군으로서 사용하였다 (0% 활성).

[0691] **도 21**에 나타난 결과는 마우스 항-MASP-2 MoAb의 1.0 mg/kg 용량의 피하 투여 후 C4b 침착의 신속하고 완벽한 억제에 입증한다. 마우스 항-MASP-2 MoAb의 0.3 mg/kg 용량의 피하 투여 후 C4b 침착의 부분적 억제가 나타났다.

[0692] 마우스에서 0.6 mg/kg으로 마우스 항-MASP-2 MoAb의 일 회 ip 투여 후 렉틴 경로 복구의 시간 경로는 3주 동안 선행되었다. **도 22**에 나타난 바와 같이, 렉틴 경로 활성의 급격한 하락이 항체 투여 후 발생한 후 이어서, 완벽한 렉틴 경로 억제가 ip 투여 후 약 7일 동안 지속된다. 렉틴 경로 활성의 느린 회복을 두 번째 및 세 번째 주 동안 관찰하였으며, 항-MASP-2 MoAb 투여 후 17일까지 마우스에서 렉틴 경로는 완벽하게 회복된다.

[0693] 이들 결과는 Fab2#11로부터 유도된 마우스 항-MASP-2 Moab는 전신에 전달될 때 투여량-반응성 방식으로 마우스의 렉틴 경로를 억제한다는 것을 입증한다.

[0694] **실시예 20**

[0695] 이 실시예는 나이-관련 황반 변성에 대한 마우스 모델에서 효능에 대한 Fab2 #11로부터 유도된 마우스 항-MASP-2 Moab의 분석을 설명한다.

[0696] **배경/근거:**

[0697] **실시예 10**에 설명된 바와 같이, 래트 MASP-2 단백질을 이용하여 Fab 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하였으며, 이것으로부터 Fab2#11은 기능적 활성 항체로서 확인되었다. 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 이소타입의 전체 길이 항체는 Fab2#11로부터 발생하였다. 마우스 IgG2a 이소타입의 전체 길이 항-MASP-2 항체는 **실시예 19**에 설명된 바와 같이 약물동력학적 파라미터에 대하여 특성화되었다. 이 실시예에서, Fab2 #11로부터 유도된 마우스 항-MASP-2 전체 길이 항체를 나이-관련 황반 변성 (AMD)의 마우스 모델에서 분석하였으며, Bora P.S. et al, J Immunol 174:491-497 (2005)에 의해 설명된다.

[0698] **방법:**

[0699] **실시예 19**에 설명된 바와 같이 Fab2 #11로부터 유도된 마우스 IgG2a 전체 길이 항-MASP-2 항체 이소타입을 다음 변형을 가지고 실시예 13에 설명된 바와 같이 나이-관련 황반 변성 (AMD)의 마우스 모델에서 테스트하였다.

[0700] **마우스-항-MASP-2 MoAb의 투여**

[0701] 이소타입 대조군 MoAb 처리와 함께 두 개의 다른 용량 (0.3 mg/kg 및 1.0 mg/kg)의 마우스 항-MASP-2 MoAb를 CNV 유발 16시간 전에 WT (+/+) 마우스 (n= 그룹 당 8마리의 마우스)에 복강 내 주사하였다.

[0702] **맥락막 신혈관 형성 (CNV)의 유발**

[0703] 맥락막 신혈관 형성 (CNV)의 유발 및 CNV의 부피의 측정을 실시예 13에 설명된 바와 같이 레이저 광응고를 사용하여 수행하였다.

[0704] **결과:**

[0705] **도 23**은 이소타입 대조군 MoAb, 또는 마우스 항-MASP-2 MoAb (0.3 mg/kg 및 1.0 mg/kg)가 처리된 마우스에서 레이저 손상 후 7일에 측정된 CNV 면적을 그래프로 설명한다. **도 23**에 나타난 바와 같이, 1.0 mg/kg 항-MASP-2 MoAb가 미리 처리된 마우스에서, 레이저 처리 7일 후 통계적으로 유의한 ($p < 0.01$) 대략 50%의 CNV 감소를 관찰하였다. **도 23**에 추가로 나타난 바와 같이, 0.3 mg/kg 용량의 항-MASP-2 MoAb는 CNV를 감소시키는데 있어서 효과적이지 않다는 것을 관찰하였다. 항-MASP-2 MoAb의 0.3 mg/kg 용량은 **실시예 19**에 설명되고 **도 21**에 나타난 바와 같이, 피하에 투여 후 C4b 침착의 부분적 및 일시적 억제를 갖는 것으로 나타났다는 것이 지적된다.

[0706] 이 실시예에 설명된 결과는 황반 변성의 치료시 억제제, 예를 들어, 항-MASP-2 MoAb로 MASP-2의 차단이 예방적 및/또는 치료적 효과를 갖는다는 것을 입증한다. 이들 결과는 MASP-2 (-/-) 마우스에서 수행된 연구에서 관찰된 결과와 일치한다는 것이 지적되고, **실시예 13**에 설명되며, 이것에서 레이저 처리 7일 후 야생형 대조군 마우스와 비교하여 MASP-2 (-/-) 마우스에서 CNV의 30% 감소를 관찰하였다. 게다가, 이 실시예의 결과는 전신에 전달된 항-MASP-2 항체가 눈에서 국부적 치료적 이점을 제공하고, 그로 인해 AMD 환자를 치료하기 위한 투여의 전신성 루트에 대한 가능성을 강조한다는 것을 추가로 입증한다. 요약하면, 이들 결과는 AMD의 치료시 MASP-2 MoAb의 사용을 지지하는 증거를 제공한다.

[0707] 실시예 21

[0708] 이 실시예는 MASP-2 결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스로 감염 후 네이세리아 메닝기티디스 유발된 치사율로부터 보호되고 야생형 대조군 마우스와 비교된 바와 같이 균혈증의 제거를 향상시켰다는 것을 입증한다.

[0709] 근거: 네이세리아 메닝기티디스는 수막염 (meningitis) 및 수막염균혈증 (meningococcemia)과 같은 뇌척수막염 균 질환의 다른 형태에서 그것의 역할에 대하여 알려진 종속 영양성 그람-음성 쌍구균 박테리아이다. 엔. 메닝기티디스는 어린 시절 동안 발병률 및 치사율의 주요 원인이다. 중증 합병증은 패혈증, 워터하우스-프리데리크센 증후군 (Waterhouse-Friderichsen syndrome), 부신 질환 및 과중성 혈관 내 응고 (DIC)를 포함한다. 예를 들어, Rintala E. et al., Critical Care Medicine 28(7):2373-2378 (2000)을 참고하면 된다. 이 실시예에서, MASP-2 결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 유발된 치사율에 민감성인지 나타내기 위해 MASP-2 (-/-) 및 WT (+/+) 마우스에서 렉틴 경로의 역할을 분석하였다.

[0710] 방법:

[0711] 실시예 1에 설명된 바와 같이 MASP-2 녹아웃 마우스를 발생시켰고 C57b1/6와 적어도 10 세대 동안 역교배시켰다. 10주령 MASP-2 KO 마우스 (n=10) 및 야생형 C57/B6 마우스 (n=10)를 400 mg/kg 철 텍스트란에서 네이세리아 메닝기티디스 혈청균 A Z2491의 5×10^8 cfu/100 μ l, 2×10^8 cfu/100 μ l 또는 3×10^7 cfu/100 μ l의 투약량으로 정맥 내 주사에 의해 접종하였다. 감염 후 마우스의 생존율을 72시간 동안 관찰하였다. 혈액 샘플을 감염 후 시간 간격으로 마우스로부터 채취하였고 감염을 확인하기 위해 엔. 메닝기티디스의 혈청 수준 (로그 cfu/ml)을 결정하고 혈청으로부터 박테리아의 제거율을 결정하기 위해 분석하였다.

[0712] 결과:

[0713] 도 24a는 5×10^8 /100 μ l cfu 엔. 메닝기티디스의 감염성 용량의 투여 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 퍼센트 생존율을 그래프로 설명한다. 도 24a에 나타난 바와 같이, 5×10^8 /100 μ l cfu 엔. 메닝기티디스의 가장 높은 투여량으로 감염 후, MASP-2 KO 마우스의 100%가 감염 후 72시간 동안 생존하였다. 반대로, WT 마우스 중 20%만이 감염 24시간 후에 살아있었다. 이들 결과는 MASP-2 결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 유발된 치사율로부터 보호된다는 것을 입증한다.

[0714] 도 24b는 5×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스로 감염된 MASP-2 KO 및 WT 마우스로부터 채취된 혈액 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스의 로그 cfu/ml을 그래프로 설명한다. 도 24b에 나타난 바와 같이, WT 마우스에서, 혈액에서 엔. 메닝기티디스의 수준은 감염 후 24시간에 약 6.5 로그 cfu/ml의 피크에 도달했고 감염 48시간 후에 0으로 떨어졌다. 반대로, MASP-2 KO 마우스에서, 엔. 메닝기티디스의 수준은 감염 후 6시간에 약 3.5 로그 cfu/ml의 피크에 도달하였고 감염 36시간에 0으로 떨어졌다.

[0715] 도 25a는 2×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스로 감염 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 퍼센트 생존율을 그래프로 설명한다. 도 25a에 나타난 바와 같이, 2×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스의 용량으로 감염 후, MASP-2 KO 마우스의 100%가 감염 후 72시간 동안 생존하였다. 반대로, WT 마우스 중 80%만이 감염 24시간 후 살아있었다. 도 24a에 나타난 결과와 일치하게, 이들 결과는 MASP-2 결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 유발된 치사율로부터 보호된다는 것을 추가로 입증한다.

[0716] 도 25b는 2×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스로 감염된 WT 마우스로부터 채취한 혈액 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스의 로그 cfu/ml을 그래프로 설명한다. 도 25b에 나타난 바와 같이, 2×10^8 cfu로 감염된 WT 마우스의 혈액에서 엔. 메닝기티디스의 수준은 감염 후 12시간에 약 4 로그 cfu/ml의 피크에 도달했고 감염 24시간 후에 0으로 떨어졌다. 도 25c는 2×10^8 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스로 감염된 MASP-2 KO 마우스로부터 채취된 혈액 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스의 로그 cfu/ml을 그래프로 설명한다. 도 25c에 나타난 바와 같이, 2×10^8 cfu로 감염된 MASP-2 KO 마우스의 혈액에서 엔. 메닝기티디스의 수준은 감염 후 2시간에 약 3.5 로그 cfu/ml의 피크 수준에 도달했고 감염 후 3시간에 0으로 떨어졌다. 도 24b에 나타난 결과와 일치하게, 이들 결과는 MASP-2 KO 마우스가 WT 마우스와 같은 용량의 엔. 메닝기티디스로 감염되지만, MASP-2 KO 마우스는 WT와 비교하여 균혈증의 제거를 향상시켰다는 것을 입증한다.

- [0717] 3×10^7 cfu/100 μ l 엔. 메닝기티디스의 최저 용량으로 감염 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 퍼센트 생존율은 72시간에 100%였다 (데이터 미도시).
- [0718] **논의**
- [0719] 이들 결과는 MASP-2 결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 유발된 치사율로부터 보호되고 WT 마우스와 비교된 바와 같이 균혈증의 제거를 향상시켰다는 것을 나타낸다. 그러므로, 이들 결과의 관점에서, MASP-2 억제제, 예를 들어, MASP-2 MoAb의 치료적 적용이 엔. 메닝기티디스 박테리아로 감염 (즉, 패혈증 및 DIC)의 효과를 치료하거나, 예방하거나 완화하는데 효과적인 것으로 예측되는 것으로 기대된다. 게다가, 이들 결과는 MASP-2 억제제, 예를 들어, MASP-2 MoAb의 치료적 적용이 대상체를 엔. 메닝기티디스 감염에 접촉하는 증가된 위험에 취약하게 한다는 것을 나타낸다.
- [0720] **실시예 22**
- [0721] 이 실시예는 보체 C3의 새로운 렉틴 경로 매개된 및 MASP-2 의존적 C4-바이패스 활성화의 발견을 설명한다.
- [0722] **근거:**
- [0723] 심근 국부성 빈혈/재관류 손상 (MIRI)을 제한하기 위해 보체 활성화의 억제제를 활용하는 것의 주요 치료적 이점은 20년 전 심근 경색의 실험적 래트 모델에서 설득력 있게 입증되었다: 재조합 sCR1, 세포 표면 보체 수용체 타입-1 (CR1)의 가용성 절단된 유도체를 정맥 내로 제공하였고 그것의 효과를 MIRI의 래트 생체 내 모델에서 평가하였다. sCR1로 치료는 경색 부피를 40% 이상 감소시켰다 (Weisman, H.F., et al., Science 249:146-151 (1990)). 이 재조합 억제제의 치료적 가능성은 MI에 걸린 환자에 sCR1의 투여가 허혈 후 심장에서 수축 장애를 예방했다는 것을 나타내는 임상 실험에서 이후에 입증되었다 (Shandelya, S., et al., Circulation 87:536-546 (1993)). 하지만, 허혈성 조직에서 보체의 활성화로 이어지는 주요 메카니즘은 궁극적으로 정의되지 않았고, 주로, 적절한 실험 모델의 부족, 산소-고갈된 세포의 보체 활성화로 이어지는 분자적 과정, 및 다른 보체 활성화 경로 사이의 혼선 및 상승작용의 제한된 이해로 인한 것이었다.
- [0724] 면역 반응의 근본적인 성분으로서, 보체 시스템은 항체-의존적 및 -독립적 메카니즘 둘 다를 통해 침입 미생물에 대한 보호를 제공한다. 그것은 주화성, 식균 작용, 세포 부착, 및 B-세포 분화를 포함하는, 면역 반응 내 많은 세포 및 체액 상호작용을 조율한다. 세 개의 다른 경로는 보체 캐스케이드를 시작한다: 고전적 경로, 대체 경로, 및 렉틴 경로. 고전적 경로 인식 하위 성분 C1q는 관련된 세린 프로테아제, C1r 및 C1s의 단계적 활성화를 시작하기 위해 다양한 표적 - 가장 현저한 면역 복합체 - 에 결합하고, 적응 면역 시스템에 의한 참여 후 병원체 및 면역 복합체 제거를 위한 주요 메카니즘을 제공한다. 면역 복합체에 C1q의 결합은 C1r 치모겐 다이머를 그것의 활성 형태로 전환시켜서 절단하고 그로 인해 C1s를 활성화한다. C1s는 두 개의 절단 단계에서 C1q 결합을 보체 활성화로 번역한다: 그것은 먼저 C4를 C4a 및 C4b로 전환하고 C4b-결합된 C2를 절단해서 C3 컨버타제 C4b2a를 형성한다. 이 복합체는 풍부한 혈장 성분 C3를 C3a 및 C3b로 전환시킨다. C4b2a 복합체의 아주 가까운 곳에 C3bdm 1sn적은 C3에 대한 기질 특이성을 C5에 대한 것으로 옮겨서 C5 컨버타제 C4b2a(C3b)_n을 형성하였다. 고전적 경로 활성화를 통해 발생한 C3 및 C5 컨버타제 복합체는 렉틴 경로 활성화 루트를 통해 발생한 것들과 동일하다. 대체 경로에서, 성분 C3의 자발적 낮은 수준의 가수분해는 세포 표면에 단백질 단편의 침착을 일으키며, 외부 세포에서 보체 활성화를 촉발하는 한편, 숙주 조직에서 세포-관련 조절 단백질은 활성화를 방지하고, 따라서 자가 손상을 예방한다. 대체 경로와 유사하게, 렉틴 경로는 면역 복합체의 부재시 활성화될 수도 있다. 활성화는 다분자 렉틴 경로 활성화 복합체의, 병원체-관련 분자 패턴 (병원체-Associated Molecular Patterns; PAMPs), 주로, 박테리아, 균류 또는 바이러스 병원체에 존재하는 탄수화물 구조 또는 아포토시스성, 괴사성, 악성 또는 산소-고갈된 세포에서 변종 글리코실화 패턴에 결합에 의해 시작된다 (Collard, C.D., et al., Am. J. Pathol. 156:1549-1556 (2000); Walport, M.J., N. Engl. J. Med. 344:1058-1066 (2001); Schwaebler, W., et al., Immunobiology 205:455-466 (2002); 및 Fujita, T., Nat. Rev. Immunol. 2:346-353 (2002)).
- [0725] 만난-결합 렉틴 (MBL)은 MBL-관련 세린 프로테아제 (MASP)로 불리고 그것들의 발견 순서에 따라 번호 매겨진 (즉, MASP-1, MASP-2 및 MASP-3), 새로운 세린 프로테아제의 기와 함께 복합체를 형성하는 것으로 나타난 첫 번째 탄수화물 인식 하위 성분이다. 사람에서, 렉틴 경로 활성화 복합체는 다른 탄수화물 결합 특이성, 즉, MBL 2를 갖는 네 개의 대체 탄수화물 인식 하위 성분 및 피콜린 패밀리 중 세 개의 다른 멤버, 즉, L-피콜린, H-피콜린 및 M-피콜린 및 MASP으로 형성될 수 있다. MBL의 두 개의 형태, MBL A 및 MBL C, 및 피콜린-A는 마우스 및 래트 혈장의 MASP를 갖는 렉틴 활성화 경로 복합체를 형성한다. 우리는 이전에 사람, 마우스 및 래트에서 MASP-2 및 MAP19 또는 sMAP로 불리는, 19 kDa인 추가적 절단된 MASP-2 유전자 생성물을 클로닝하였고 특성화하였다

(Thiel, S., et al., Nature 386:506-510 (1997); Stover, C.M., et al., J. Immunol. 162:3481-3490 (1999); Takahashi, M., et al., Int. Immunol. 11:859-863 (1999); 및 Stover, C.M., et al., J. Immunol. 163:6848-6859 (1999)). MAP19/sMAP는 프로테아제 활성이 전혀 없지만, 탄수화물 인식 복합체에 MASP의 결합에 대하여 경쟁함으로써 렉틴 경로 활성화를 조절할 수도 있다 (Iwaki, D. et al., J. Immunol. 177:8626-8632 (2006)).

[0726] 세 개의 MASP 중에, MASP-2만이 보체 활성화에 렉틴 경로 인식 복합체의 결합을 번역하는데 필요하다는 것을 제안하는 증거가 있다 (Thiel, S., et al. (1997); Vorup-Jensen, T., et al., J. Immunol. 165:2093-2100 (2000); Thiel, S., et al., J. Immunol. 165:878-887 (2000); Rossi, V., et al., J. Biol. Chem. 276:40880-40887 (2001)). 이 결론은 최근에 설명된, MASP-1 및 MASP-3 결핍된 마우스 군주의 표현형에 의해 강조된다. 시험관 내 렉틴 경로 매개된 보체 활성화의 시작의 지연을 제외하고, MASP-1/3 결핍 마우스는 렉틴 경로 기능적 활성을 유지한다. 재조합 MASP-1과 MASP-1 및 MASP-3 결핍 혈청의 재구성은 MASP-1이 MASP-2 활성화를 가능하게 할 수도 있다는 것을 나타내는 렉틴 경로 활성화에서 이 지연을 극복한다 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-6138 (2008)). 최신 연구는 MASP-1 (및 아마도 또한 MASP-3)이 치모겐 형태의 대체 경로 활성화 효소 인자 D를 그것의 효소 활성 형태로 전환하기 위해 필요하다는 것을 나타냈다 (Takahashi, M., et al., J. Exp. Med. 207:29-37 (2010)). 이 과정의 생리학적 중요성은 MASP-1/3 결핍 마우스의 혈장에서 대체 경로 기능적 활성의 부재에 의해 강조된다.

[0727] 렉틴 경로 탄수화물 인식 하위 성분 MBL A 및 MBL C의 결합 표적 결핍을 갖는, 최근 발생한 마우스 군주는 잔여 렉틴 경로 인식 하위 성분 피콜린 A를 통해 렉틴 경로 활성화를 시작할 수도 있다 (Takahashi, K., et al., Microbes Infect. 4:773-784 (2002)). MASP-2 결핍 마우스에서 어떤 잔여 렉틴 경로 기능적 활성의 부재는 건강한 및 병든 사람에서 선천적 체액 면역력의 이 효과기 팔을 연구하는 확실한 모델을 전달한다.

[0728] C4의 이용 가능성 및 MASP-2 결핍 마우스 군주는 C3 보체의 새로운 렉틴 경로 특이적, 하지만 MASP-2 의존적인 C4-바이패스 활성화 루트를 정의할 수 있게 했다. 허혈 후 조직 손실에 이 새로운 렉틴 경로 매개된 C4-바이패스 활성화 루트의 필수적 기여는 MIRI에서 MASP-2 결핍의 중요한 보호적 표현형에 의해 강조되는 한편, 같은 모델에서 테스트된 C4-결핍 마우스는 보호를 나타내지 않는다.

[0729] 이 실시예에서, 우리는 보체 C3의 새로운 렉틴 경로 매개된 및 MASP-2 의존적 C4-바이패스 활성화를 설명한다. 이 새로운 활성화 루트의 생리학적 적합성은 C4 결핍 동물이 보호되지 않는 경우, 심근 국부성 빈혈/재관류 손상 (MIRI)의 실험 모델에서 MASP-2 결핍의 보호적 표현형에 의해 확립되어 있다.

[0730] **방법:**

[0731] **MASP-2 결핍 마우스는 심한 비정상을 나타내지 않는다.** MASP-2 결핍 마우스를 실시예 1에 설명된 바와 같이 발생시켰다. 이형 접합성 ($^{+/-}$) 및 동형 접합성 ($^{-/-}$) MASP-2 결핍 마우스 둘 다는 건강하고 번식 가능하며, 심한 비정상을 나타내지 않는다. 그것들의 기대 수명은 그것들의 WT 한배 새끼 (>18개월)의 그것과 유사하다. 질환의 실험 모델에서 이들 마우스의 표현형을 연구하기 전에, 우리의 MASP-2 $^{-/-}$ 라인을 C57BL/6 배경에서 11 세대 동안 역교배하였다. MASP-2 mRNA의 총 부재를 폴리 A+ 선택된 간 RNA 조제물의 노던 블롯팅에 의해 확인하는 한편, MAP19 또는 sMAP를 암호화하는 1.2kb mRNA (MASP-2 유전자의 절단된 대체 스플라이싱 생성물)를 충분히 발현시켰다.

[0732] MASP-2의 세린 프로테아제 도메인 (B 사슬)에 대한 암호화 서열 또는 A-사슬에 대한 암호화 서열의 나머지에 특이적인 프라이머 쌍을 사용하는 qRT-PCR 분석은 B 사슬을 암호화하는 mRNA가 MASP-2 $^{-/-}$ 마우스에서 검출 불가능한 한편, 붕괴된 A 사슬 mRNA 전사물의 풍부함은 크게 증가하였다. 유사하게는, MAP19/sMAP 암호화 mRNA의 풍부함은 MASP-2 $^{+/-}$ 및 MASP-2 $^{-/-}$ 마우스에서 증가하였다. 혈장 MASP-2 수준은 각 유전자형의 5마리의 동물에 대하여 ELISA에 의해 결정되었고, WT 대조군에 대하여 300ng/ml (범위 260-330ng/ml), 이형 접합성 마우스에 대하여 360ng/ml (범위 330-395ng/ml)이었고 MASP-2 $^{-/-}$ 마우스에서 검출 불가능했다. qRT-PCR을 사용하여, MASP-2 $^{-/-}$ 마우스가 그것들의 MASP-2 충분한 한배 새끼의 그것과 유사한 풍부함으로 MBL A, MBL C, 피콜린 A, MASP-1, MASP-3, C1q, C1rA, C1sA, 인자 B, 인자 D, C4, 및 C3 mRNA를 발현한다는 것을 입증하는, mRNA 발현 프로파일을 확립하였다 (데이터 미도시).

[0733] MASP-2 $^{-/-}$ (n=8) 및 MASP-2 $^{+/+}$ (n=7) 한배 새끼의 혈장 C3 수준을 상업적으로 이용 가능한 마우스 C3 ELISA 키트

(Kamiya, Biomedical, Seattle, WA)를 사용하여 측정하였다. MASP-2 결핍 마우스의 C3 수준 (평균 0.84 mg/ml, +/- 0.34)은 WT 대조군의 그것 (평균 0.92, +/- 0.37)과 유사하였다.

[0734] **결과:**

[0735] **MASP-2는 렉틴 경로 기능적 활성화에 필수적이다.**

[0736] **실시예 2**에 설명되고 **도 5**에 나타난 바와 같이, MASP-2^{-/-} 혈장의 시험관 내 분석은 C4의 활성화를 위한 만난-및 치모산-코팅된 표면의 활성화시 렉틴 경로 기능적 활성화의 전체적인 부재를 나타냈다. 유사하게, 렉틴 경로-의존적 C4 및 C3 절단은 N-아세틸 글루코사민으로 코팅된 표면상의 MASP-2^{-/-} 혈장에서 검출되지 않았으며, 이것은 MBL A, MBL C 및 피콜린 A와 결합하고 이를 통해 활성화를 촉발한다 (데이터 미도시).

[0737] MASP-2^{-/-}마우스의 혈청 및 혈장의 분석은 MASP-2가 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화하는데 반드시 필요하다는 것을 분명하게 입증하였다. 하지만, 렉틴 경로 기능적 활성화의 전체적인 결핍은 다른 보체 활성화 경로를 온전하게 유지한다: MASP-2^{-/-}혈장은 고전적 (**도 26a**) 및 대체 경로 (**도 26b**)를 통해 보체를 활성화할 수 있다. **도 26a** 및 **26b**에서, 부호 "*"는 WT (MASP-2 (+/+))의 혈청을 나타내고; 부호 "●"는 WT (C1q 고갈)의 혈청을 나타내고; 부호 "□"는 MASP-2 (-/-)의 혈청을 나타내고; 부호 "△"는 MASP-2 (-/-) (C1q 고갈)의 혈청을 나타낸다.

[0738] **도 26a** MASP-2^{-/-} 마우스가 기능적인 고전적 경로를 유지한다는 것을 그래프로 설명한다: C3b 침착을 면역 복합체 (BSA로 코팅한 후 염소 항-BSA IgG를 추가함으로써 체자리에서 (in situ) 발생)로 코팅된 미세역가 플레이트에서 검정하였다. **도 26b**는 MASP-2 결핍 마우스가 기능적인 대체 경로를 유지한다는 것을 그래프로 설명한다: C3b 침착을 대체 경로 활성화만을 허용하는 조건 (Mg²⁺ 및 EGTA를 함유하는 완충액) 하에 치모산 코팅된 미세역가 플레이트에서 검정하였다. **도 26a** 및 **도 26b**에 나타난 결과는 2배수의 평균이고 세 개의 독립적인 실험이 전형적이다. 전체에서 혈장 공급원에 대하여 같은 부호를 사용하였다. 이들 결과는 대체 경로를 직접적으로 촉발하도록 설계된 실험 조건 하에 **도 26b**에 나타난 결과에서 증명된 바와 같이, 기능적 대체 경로가 MASP-2 결핍 마우스에 존재하는 한편, 고전적 경로 및 렉틴 경로 둘 다를 불활성화한다는 것을 나타낸다.

[0739] **보체의 렉틴 경로 활성화는 심근 국부성 빈혈/재관류 손상 (MIRI)에서 염증성 조직 손실에 결정적으로 기여한다.**

[0740] MIRI에 대한 렉틴 경로 기능적 활성화의 기여를 연구하기 위해, 우리는 관상 동맥의 좌 전하행지 분지 (LAD)의 일시적 결찰 및 재관류에 따르는 MIRI의 모델에서 MASP-2^{-/-} 마우스 및 WT 한배 새끼 대조군을 비교하였다. 보체 C4의 존재 또는 부재는 MIRI에서 허혈성 조직 손실의 정도에 대한 영향을 갖지 않는다. 우리는 실험적 MIRI 후 경색 범위에 대한 C4의 결핍의 영향을 평가하였다. **도 27a** 및 **도 27b**에 나타난 바와 같이, C4-결핍 마우스 및 그것들의 WT 한배 새끼 둘 다에서 동일한 경색 범위가 관찰되었다. **도 27a**는 C4^{-/-} 마우스 (n=6) 및 해당하는 WT 한배 새끼 대조군 (n=7)에서 LAD 결찰 및 재관류 후 MIRI-유발된 조직 손실을 그래프로 설명한다. **도 27b**는 C4^{-/-} 마우스가 그것들의 WT 대조군 (점선)으로서 MIRI에 민감하다는 것을 분명하게 입증하는, AAR의 함수로서 INF를 그래프로 설명한다.

[0741] 이들 결과는 C4 결핍 마우스가 MIRI로부터 보호되지 않는다는 것을 입증한다. 이 결과를 예상치 못했는데, 그것이 주요 C4 활성화 단편, C4b가 고전적 및 렉틴 경로 C3 CONVERTASE C4b2a의 필수성분이라는 널리 승인된 관점과 충돌하기 때문이다. 그러므로 우리는 보체 C3의 잔여 렉틴 경로 특이적 활성화가 C4-결핍 마우스 및 사람 혈장에서 검출될 수 있는지 평가하였다.

[0742] **렉틴 경로는 C4의 부재시 새로운 MASP-2 의존적 C4-바이패스 활성화 루트를 통해 보체 C3을 활성화할 수 있다.**

[0743] C4-결핍 기니 피그 혈청에서 C4-바이패스 활성화 루트의 존재를 나타내는 선행 보고서 (May, J.E., 및 M. Frank, J. Immunol. 111:1671-1677 (1973))에 힘입어, 우리는 C4-결핍 마우스가 잔여 고전적 또는 렉틴 경로 기능적 활성을 가질 수도 있는지 분석하였고 대체 경로의 기여를 제외한 경로-특이적 검정 조건하에 C3의 활성화를 관찰하였다.

[0744] 대체 경로 활성화에 대한 혈장 농도 (1.25% 이하)에 대하여 엄청나게 높은 혈장 농도에서 재석회화된 혈장을 사용하여 만난-코팅된 미세역가 플레이트 상에서 C3b 침착을 검정하였다. C3의 절단이 고전적 경로 활성화에 대하여 테스트된 C4-결핍 혈청에서 검출 불가능한 한편 (데이터 미도시), 렉틴 경로를 통해 보체 활성화를 시작할 때 강한 잔여 C3 절단 활성이 C4-결핍 마우스 혈장에서 관찰되었다. 렉틴 경로 의존성은 가용성 만난과 함께

C4-결핍 혈장 회석의 사전 배양 후 C3 절단의 경쟁적 억제에 의해 입증된다 (도 28a를 참고하면 된다). 도 28a-d에 나타난 바와 같이, C4의 부재시 C3의 MASP-2 의존적 활성화를 관찰하였다. 도 28a는 C4+/+ (x 표) 및 C4-/- (개방형 원) 마우스 혈장에 의한 C3b 침착을 그래프로 설명한다. 검정 전에 과도한 (1 µg/ml) 유체상 만난과 함께 C4-/- 혈장을 사전 배양하는 것은 C3 침착 (폐쇄형 원)을 완전히 억제한다. 결과는 3번의 독립적인 실험이 전형적이다. 도 28b는 야생형, MASP-2 결핍 (개방형 사각형) 및 C4-/-마우스 혈장 (1%)을 다양한 농도의 항-랫 MASP-2 mAbM11 (가로축)과 혼합되고 C3b 침착이 만난-코팅된 플레이트에서 검정된 실험의 결과를 그래프로 설명한다. 결과는 4번의 검정 (각 타입의 혈장 중 2개의 2배수)의 평균 (± SD)이다. 도 28c는 사람 혈장이 NHS (x 표), C4-/- 혈장 (개방형 원) 및 1 µg/ml 만난 (폐쇄형 원)과 함께 사전 배양된 C4-/- 혈장을 모집한 실험의 결과를 그래프로 설명한다. 결과는 세 번의 독립적인 실험을 나타낸다. 도 28d는 C4 충분 및 C4 결핍 사람 혈장 (1%)에서 항-사람 MASP-2-2 mAbH3에 의한 C3b 침착의 억제를 그래프로 설명한다 (평균 = 3배수의 SD). 도 28b에 나타난 바와 같이, 렉틴 경로-의존적 C3 활성화는 유사하게 검정된 MASP-2-/- 혈장에서 검출되지 않았고, C3의 이 C4-바이패스 활성화 루트가 MASP-2 의존적이라는 것을 나타낸다.

[0745] 이들 발견을 추가로 입증하기 위해, 우리는 재조합 사람 및 랫 MASP-2A에 대한 친화도 스크리닝에 의해 파지 디스플레이 항체 라이브러리로부터 분리된 일련의 재조합 억제 mAb를 확립하였다 (항원의 자가 분해를 방지하기 위해 활성 프로테아제 도메인의 세린 잔기가 부위-관련 돌연변이 생성에 의해 알려진 잔기로 대체된 경우). MASP-2에 대한 재조합 항체 (AbH3 및 AbM11)는 항원으로서 재조합 사람 및 랫 MASP-2A를 사용하여 (Chen, C.B. 및 Wallis, J. Biol. Chem. 276:25894-25902 (2001)) 결합의 항체 라이브러리로부터 분리되었다 (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. 296:57-86 (2000)). 마우스 혈장 (IC₅₀ ~ 1 nM)에서 C4 및 C3의 렉틴 경로-매개된 활성화를 강하게 억제하는 항-랫 fAB2 단편을 전체 길이 IgG2a 항체로 전환하였다. 다클론성 항-쥐 MASP-2A 항혈청은 랫에서 높아졌다. 이들 도구는 하기 추가로 설명된 바와 같이, 우리가 C3의 이 새로운 렉틴 경로 특이적 C4-바이패스 활성화 루트의 MASP-2 의존성을 확인할 수 있게 한다.

[0746] 28b에 나타난 바와 같이, M211, 마우스 및 랫 MASP-2에 선택적으로 결합하는 억제 단클론성 항체는 C4-결핍 마우스에서 C3의 C4-바이패스 활성화, 뿐만 아니라 유사한 IC₅₀ 값을 갖는 농도 의존적 방식으로 렉틴 경로를 통한 WT 마우스 혈장의 C3 활성화를 억제하였다. 모든 검정을 대체 경로 활성화 루트를 기능 장애로 만드는 높은 혈장 회석에서 (1.25%의 가장 높은 혈장 농도로) 수행하였다.

[0747] 사람에서 C3의 유사한 렉틴 경로 특이적 C4-바이패스 활성화의 존재를 조사하기 위해, 우리는 사람 C4 유전자 둘 다 (즉, C4a 및 C4b)가 유전적으로 결핍된 기증자의 혈장을 분석하였으며, C4의 전체적인 부재를 일으킨다 (Yang, Y., et al., J. Immunol. 173:2803-2814 (2004)). 도 28c는 이 환자의 혈장이 높은 혈장 회석 (대체의 활성화 경로를 기능 장애로 만든다)에서 C3를 효과적으로 활성화한다는 것을 나타낸다. 만난-코팅된 플레이트에서 C3 활성화의 렉틴 경로 특이적 방식은 과도한 농도의 유체상 만남을 추가함으로써 쥐 C4-결핍 혈장 (도 28a) 및 사람 C4 결핍 혈장 (도 28c)에서 입증된다. 사람 C4-결핍 혈장에서 C3의 이 활성화 메커니즘의 MASP-2 의존성을 AbH3, 사람 MASP-2-2에 특이적으로 결합하고 MASP-2 기능적 활성을 제거하는 단클론성 항체를 사용하여 평가하였다. 도 28d에 나타난 바와 같이, AbH3은 C4-충분 및 C4-결핍 사람 혈장 둘 다에서 비슷한 힘으로 C3b (및 C3dg)의 침착을 억제하였다.

[0748] C3의 C4-바이패스 활성화에서 다른 보체 성분의 가능한 역할을 평가하기 위해, 우리는 렉틴 경로 특이적 및 고전적 경로 특이적 검정 조건 하에 MASP-2-/-, C4-/- 및 C1q-/- 혈장 (대조군으로서)과 함께 MASP-1/3-/- 및 Bf/C2-/-마우스의 혈장을 테스트하였다. C3 절단의 상대적인 양을 WT 혈장을 사용할 때 침착된 C3의 양에 대하여 플로팅하였다.

[0749] 도 29a는 렉틴 활성화 경로 또는 고전적 활성화 경로 특이적 검정 조건 하에 테스트된 다양한 보체 결핍 마우스 균주의 혈장에서 C3 컨버타제 활성의 비교 분석을 그래프로 설명한다. WT 마우스 (n=6), MASP-2-/-마우스 (n=4), MASP-1/3-/- 마우스 (n=2), C4-/- 마우스 (n=8), C4/MASP-1/3-/- 마우스 (n=8), Bf/C2-/- (n=2) 및 C1q-/- 마우스 (n=2)의 회석된 혈장 샘플 (1%)을 유사하게 테스트하였다. 2.5 µg/ml 재조합 랫 C2 (Bf/C2-/-+C2)와 Bf/C2-/- 혈장의 재구성은 C3b 침착을 회복하였다. 결과는 평균 (±SD)이다. **p<0.01 (WT 혈장과 비교). 도 29a에 나타난 바와 같이, 실질적인 렉틴 경로 특이적 검정 조건 하에 C3 침착은 테스트된 C4-/- 혈장에서 나타났지만, 고전적 경로 특이적 조건 하에서는 아니다. 다시 말하면, C3 침착이 렉틴 경로 활성화 루트를 통해 MASP-2 결핍 혈장에서 나타나지 않은 한편, 같은 혈장은 고전적 경로를 통해 C3를 침착시켰다. MASP-1/3-/- 혈장에서, C3 침착은 렉틴 및 고전적 경로 특이적 검정 조건 둘 다에서 발생하였다. C3 침착은 렉틴 경로 또는 고전적 경로 특이적 조건을 사용하는, C4 및 MASP-1/3이 함께 결핍된 혈장에서 나타나지 않았다. C3 침착은

C2/Bf-/- 혈장에서 렉틴 경로를 통해, 또는 고전적 경로를 통해 검출 가능하다. 하지만, 재조합 C2와 C2/Bf-/- 마우스 혈장의 재구성은 렉틴 경로 및 고전적 경로-매개된 C3 절단을 회복하였다. 검정 조건을 C1q-/- 혈장을 사용하여 입증하였다.

[0750] **도 29b**는 렉틴 활성화 경로 특이적 검정 조건 (1% 혈장, 결과는 세 번의 독립적인 실험이 전형적이다) 하에 테스트된, 다양한 보체 결핍 마우스 군주 WT, fB-/-, C4-/-, MASP-1/3-/-, 및 MASP-2-/- 혈장의 C3 콘버타제 활성의 시간-분해 동역학을 그래프로 설명한다. **도 29b**에 나타난 바와 같이, C3 절단이 MASP-2-/- 혈장에서 나타나지 않은 한편, fB-/- 혈장은 WT 혈장과 유사한 동역학으로 C3를 절단했다. C3의, C3b (및 C3dg)로 렉틴 경로-의존적 전환의 상당한 지연이 C4-/-, 뿐만 아니라 MASP-1/3 결핍 혈장에서 나타났다. MASP-1/3-/- 혈장에서 C3 활성화의 이 지연은 현재 MASP-3 대신에, MASP-1 의존적인 것으로 나타났다 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-6138 (2008)).

[0751] **논의:**

[0752] 이 실시예에 설명된 결과는 MASP-2 기능적 활성이 C4의 존재 및 부재 둘 다에서 렉틴 경로를 통한 C3의 활성화에 필수적이라는 것을 강하게 제한한다. 게다가, C2 및 MASP-2은 C3의 이 새로운 렉틴 경로 특이적 C4-바이패스 활성화 루트가 작용하는데 필요하다. MASP-2-/-, 뿐만 아니라 C4-/- 혈장에서 렉틴 경로 기능적 활성의 비교 분석은 보체 C3의 이전에 인식되지 않은 C4-독립적이지만, MASP-2-의존적 활성화 루트의 존재를 나타냈고 C3가 C4의 전체적인 부재시 렉틴 경로-의존적 방식으로 활성화될 수 있다는 것을 나타냈다. 이 새로운 MASP-2 의존적 C3 콘버타제의 활성화 사건의 상세히 설명된 분자적 조성물 및 순서가 해명된 것으로 남아있는 한편, 우리의 결과는 이 C4-바이패스 활성화 루트가 보체 C2, 뿐만 아니라 MASP-2의 존재를 추가적으로 필요로 한다는 것을 나타낸다. 결합된 C4 및 MASP-1/3이 결핍된 마우스의 혈장에서 렉틴 경로-매개된 C3 절단 활성의 손실은 MASP-2의 직접적인 절단 및 활성화를 통해 MASP-2 의존적 보체 활성화를 향상시키는, MASP-1의 최근에 설명된 역할에 의해 설명될 수도 있다 (Takahashi, M., et al., J. Immunol. 180:6132-6138 (2008)). 유사하게는, MASP-1가 C2를 절단하는 그것의 능력을 통해 MASP-2 기능적 활성을 지원할 수도 있다 (Moller-Kristensen, et al., Int. Immunol. 19:141-149 (2007)). 두 가지 활성은 MASP-1/3 결핍 혈장이 렉틴 활성화 경로를 통해 C3를 절단하는 감소된 속도 및 왜 MASP-1이 C4-바이패스 활성화 루트를 통해 C3 전환을 유지하는데 필요할 수도 있는지를 설명할 수도 있다.

[0753] C2/fB-/- 혈장에 재조합 래트 C2의 추가가 만난-코팅된 플레이트에서 C3을 활성화하는 재구성된 혈장의 능력을 회복하기 때문에 렉틴 경로를 통해 C3를 활성화시킬 수 없는 C2/fB-/- 혈장의 능력은 C2-의존적인 것으로 나타났다.

[0754] C4 결핍이 고전적 보체 활성화 경로를 특이적으로 붕괴하는 한편, 렉틴 경로는 MASP-2 의존적 C4-바이패스 활성화 루트를 통해 C3 콘버타제 활성의 생리학적으로 중요한 수준을 유지하고, 실험적 에스. 뉴모니아 감염 (Brown, J. S., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:16969-16974 (2002); 실험적 알레르기성 뇌척수염 (Allergic Encephalomyelitis) (Boos, L.A., et al., Glia 49:158-160 (2005); 및 C3 의존적 쥐 간 재생의 모델 (Clark, A., et al., Mol. Immunol. 45:3125-3132 (2008))을 포함하는, 다양한 질환 모델에서 렉틴 경로의 역할의 재평가를 요청한다. 인자 B 기능적 활성의 항체-매개된 고갈에 의한 대체 경로의 생체 내 억제자가 C4-/- 마우스에서 C3 절단-의존적 간 재생에 영향을 미치지 않았기 때문에 후자는 C4-결핍 마우스가 대체 경로 독립적 방식으로 C3를 활성화할 수 있다는 것을 입증하였다 (Clark, A., et al. (2008)). 이 C3의 렉틴 경로 매개된 C4-바이패스 활성화 루트는 또한 MIRI의 우리 모델에서, 뿐만 아니라 신장 동종 이식 거부의 이전에 설명된 모델에서 C4 결핍의 보호적 표현형의 부족을 설명할 수도 있다 (Lin, T., et al., Am. J. Pathol. 168:1241-1248 (2006)). 반대로, 우리의 최근 결과는 신장 이식의 모델에서 MASP-2-/-마우스의 중요한 보호적 표현형을 독립적으로 입증하였다 (Farrar, C.A., et al., Mol. Immunol. 46:2832 (2009)).

[0755] 요약하면, 이 실시예의 결과는 C3의 MASP-2 의존적 C4-바이패스 활성화는 C4의 이용 가능성이 C3 활성화를 제한하는 조건 하에 중요할 수도 있는 생리학적으로 적절한 메카니즘이라는 관점을 지지한다.

[0756] **실시예 23**

[0757] 이 실시예는 WT (+/+), MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11/C4 (-/-) 및 C4 (-/-) 마우스에서 트롬빈 기질에 의한 C3의 활성화 및 만난에 C3 침착을 설명한다.

[0758] **근거:**

[0759] **실시예 14**에 설명된 바와 같이, 트롬빈 활성화가 생리학적 조건 하에 렉틴 경로 활성화 후 발생할 수 있다는 것

으로 결정되었고, MASP-2 수반의 정도를 입증한다. C3은 보체 시스템의 활성화에서 중심 역할을 한다. C3 활성화는 고전적 및 대체 보체 활성화 경로 둘 다에 필요하다. C3가 트롬빈 기질에 의해 활성화되는지 결정하기 위해 실험을 수행하였다.

[0760] **방법:**

[0761] **트롬빈 기질에 의한 C3 활성화**

[0762] C3의 활성화를 트롬빈 기질의 다음 활성화된 형태의 존재시 측정하였다; 사람 FCXIa, 사람 FVIIa, 소 FXa, 사람 FXa, 사람 활성화된 단백질 C, 및 사람 트롬빈. C3를 다양한 트롬빈 기질과 함께 배양하였고, 10% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 환원 조건 하에 분리하였다. 셀룰로스 막을 사용하여 전기영동 전송 후, 막을 단클론성 비오틴-커플링된 래트 항-마우스 C3과 함께 배양하였고, 스트렙타비딘-HRP 키트로 검출하였고 ECL 시약을 사용하여 현상하였다.

[0763] **결과:**

[0764] C3의 활성화는 절단된 a' 사슬 및 가용성 C3a로 온전한 a-사슬의 절단을 수반한다 (도 30에 미도시). 도 30은 트롬빈 기질에 의한 사람 C3의 활성화에 대한 웨스턴 블롯 분석의 결과를 나타내고, 여기에서 절단되지 않은 C3 알파 사슬, 및 활성화 생성물 a' 사슬이 화살표로 나타난다. 도 30에 나타난 바와 같이, 사람 응고 인자 XI 및 인자 X의 활성화된 형태, 뿐만 아니라 활성화된 소 응고 인자 X를 갖는 C3의 배양은 어떤 보체 프로테아제의 부재시에도 시험관 내에서 C3를 절단할 수 있다.

[0765] **만난에 C3 침착**

[0766] WT, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4(-/-) 및 C4(-/-)로부터 얻은 혈청 샘플에서 C3 침착 검정을 수행하였다. F11은 응고 인자 XI을 암호화하는 유전자이다. C3 활성화를 측정하기 위해, 미세역가 플레이트를 만난 (1 µg/웰)으로 코팅하였고, TBS/tween/Ca²⁺ 중의 양 항-HSA 혈청 (2 µg/ml)을 추가하였다. 플레이트를 TBS 중의 0.1% HSA로 차단하였고 상기와 같이 세척하였다. 혈장 샘플을 4 mM 바비탈, 145 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.4에 희석하였고, 플레이트에 추가되고 37 °C에서 1.5시간 동안 배양하였다. 세척 후, 결합된 C3b를 토끼 항-사람 C3c (Dako)를 이용하여 검출한 후, 이어서, 알칼린 포스파타제-콘쥬게이트된 염소 항-토끼 IgG 및 pNPP로 검출하였다.

[0767] **결과:**

[0768] 도 31은 WT, MASP-2 (-/-), F11(-/-), F11(-/-)/C4 (-/-) 및 C4 (-/-)로부터 얻은 혈청 샘플에 대한 C3 침착 검정의 결과를 나타낸다. 도 31에 나타난 바와 같이, C4의 완전한 부재시에도 기능적 렉틴 경로가 있다. 도 31에 추가로 나타난 바와 같이, 이 새로운 렉틴 경로 의존적 보체 활성화는 응고 인자 XI가 필요하다.

[0769] **논의:**

[0770] 이 실험에서 얻은 결과 이전에는, 보체의 렉틴 경로는 활성화에 C4가 필요한 것으로 당업자들에 의해 생각되었다. 이런 이유로, C4 녹아웃 마우스 (및 C4 결핍 사람)의 데이터를 이러한 유기체는 렉틴 경로 결핍 (고전적 경로 결핍 이외에)이라는 추정으로 생각하였다. 현재의 결과는 이 개념이 거짓이라는 것을 입증한다. 따라서, 렉틴 경로가 C4 결핍 동물의 표현형에 기초하는 특정 질환 설정에 중요하지 않다는 것을 제안하는 선행 연구의 결론은 거짓일 수도 있다. 이 실시예에 설명된 데이터는 또한 전체 혈청의 생리학적 맥락에서 렉틴 경로가 응고-1 캐스케이드의 성분을 활성화할 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 보체 및 응고를 수반하는 MASP-2 사이의 혼선이 있다는 것이 입증된다.

[0771] **실시예 24**

[0772] 이 실시예는 발작성야간혈색소뇨증 (PNH) 환자로부터 얻은 혈액 샘플의 적혈구의 용해에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 평가하는 방법을 설명한다.

[0773] **배경/근거:**

[0774] 마르키아파바-미첼리 증후군으로도 나타나는, 발작성야간혈색소뇨증 (PNH)은 후천적, 잠재적으로 생명을 위협하는 혈액의 질환이며, 보체-유발된 혈관 내 용혈성 빈혈증을 특징으로 한다. PNH의 홀마크는 보체의 대체 경로의 조절되지 않은 활성화의 결과인 만성 혈관 내 용혈이다. Lindorfer, M.A., et al., Blood 115(11) (2010). PNH에서 빈혈증은 혈류에서 적혈구의 파괴로 인한 것이다. PNH의 증상은 요중 헤모글로빈의 등장으로 인한 적뇨

(red urine), 및 혈전증을 포함한다. PNH는 그것 자체에서 발달할 수도 있으며, "1차 PNH"로 불리거나 무형성 빈혈증과 같은 다른 골수 장애의 맥락에서 발달할 수도 있으며, "2차 PNH"로 불린다. PNH의 치료는 빈혈증에 대하여 수혈, 혈전증에 대하여 항응고 및 단클론성 항체 에컬리주맙 (Soliris)의 사용을 포함하며, 이것은 보체 시스템을 억제함으로써 면역 파괴에 대하여 혈액 세포를 보호한다 (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-9 (2004)). 하지만, 에컬리주맙으로 치료된 PNH 환자의 상당수는 항체가 보체의 대체 경로의 활성화를 차단하지 않기 때문에 임상적으로 중요한 면역-매개된 용혈성 빈혈증을 가진 채로 있다.

[0775] 이 실시예는 ABO-일치하는 산성화된 정상 사람 혈청과 함께 배양된, PNH 환자 (Soliris가 처리되지 않음)로부터 얻은 혈액 샘플의 적혈구의 용해에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 평가하는 방법을 설명한다.

[0776] **방법:**

[0777] **시약:**

[0778] 정상 기증자 및 PNH로 고통받는 환자 (Soliris가 처리되지 않음)의 적혈구를 정맥 천자 (venipuncture)에 의해 얻었고, Wilcox, L.A., et al., Blood 78:820-829 (1991)에 설명된 바와 같이 제조되며, 본원에 참고로 포함된다. 선택 경로의 기능적 차단 활성을 갖는 항-MASP-2 항체는 실시예 10에 설명된 바와 같이 발생할 수도 있다.

[0779] **용혈 분석:**

[0780] PNH 환자의 적혈구의 용혈을 차단하는 능력에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 결정하는 방법이 Lindorfer, M.A., et al., Blood 15(11):2283-91 (2010) 및 Wilcox, L.A., et al., Blood 78:820-829 (1991)에 설명된 방법을 사용하여 수행되고, 참고문헌 둘 다는 본원에 참고로 포함된다. Lindorfer et al.에 설명된 바와 같이, 각 실험 전에 PNH 환자 샘플의 적혈구를 원심분리하고, 버피 코트 (buffy coat)를 흡입하고 세포를 젤라틴 베로날 완충액 (gelatin veronal buffer; GVB)으로 세척한다. 적혈구를 다음과 같이 APC-매개된 용해에 대한 민감성에 대하여 테스트한다. ABO-일치하는 정상 사람 혈청을 0.15 mM CaCl₂ 및 0.5 mM MgCl₂를 함유하는 GVB (GVB⁴²)로 희석하고 pH 6.4로 산성화하고 (산성화된 NHS, aNHS) 50% aNHS 중의 1.6%의 헤마토크리트로 적혈구를 재구성하기 위해 사용한다. 혼합물을 37 °C에서 배양하고, 1시간 후, 적혈구를 원심분리에 의해 펠렛화한다. 회수된 상층액의 엘리퀴트의 흡광도를 405 nm에서 측정하고 퍼센트 용해를 계산하기 위해 사용한다. 산성화된 혈청-EDTA에 재구성된 샘플을 유사하게 가공하고 배경 비보체-매개된 용해 (전형적으로 3% 미만)를 정의하기 위해 사용한다. 완벽한 용해 (100%)는 증류수에서 적혈구를 배양한 후 결정된다.

[0781] PNH 적혈구의 용혈에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 결정하기 위해, PNH 환자의 적혈구를 증가하는 농도의 항-MASP-2 항체의 존재시 aNHS에서 배양하고, 용혈의 존재/양을 이후에 정량한다.

[0782] 항-MASP-2 항체가 대체 보체 경로의 이후의 활성화를 차단하는 것으로 나타난다는 사실의 관점에서, 항-MASP-2 항체는 PNH 적혈구의 대체 경로-매개된 용혈을 차단하는데 있어서 효과적일 것이고, PNH로 고통받는 환자를 치료하는 치료제로서 유용할 것으로 기대된다.

[0783] **실시예 25**

[0784] 이 실시예는 한랭글로불린혈증으로 고통받는 환자로부터 얻은 혈액 샘플에서 한랭글로불린에 의한 보체 활성화에 대한 항-MASP-2 차단 항체의 효과를 평가하는 방법을 설명한다.

[0785] **배경/근거:**

[0786] 한랭글로불린혈증은 혈청에 한랭글로불린의 존재를 특징으로 한다. 한랭글로불린은 저온에서 가역적 응집을 경험하는 단일 또는 혼합된 면역글로불린 (전형적으로 IgM 항체)이다. 응집은 고전적 경로 보체 활성화 및 혈관상 (vascular bed), 특히 주변의 염증으로 이어진다. 한랭글로불린혈증의 임상적 표현은 맥관염 및 사구체 신염을 포함한다.

[0787] 한랭글로불린혈증은 한랭글로불린 구성에 기초하여 다음과 같이 분류될 수도 있다: 타입 I 한랭글로불린혈증, 또는 단순 한랭글로불린혈증은 단클론성 면역글로불린, 보통 면역글로불린 M (IgM)의 결과이고; 타입 II 및 III 한랭글로불린혈증 (혼합된 한랭글로불린혈증)은 류머티스성 인자 (RFs)를 함유하며, 이것은 보통 다클론성 IgG의 Fc 부분을 가진 복합체의 IgM이다.

[0788] 한랭글로불린혈증과 관련된 질병은 C형 간염 감염, 림프증식성 장애 및 다른 자가 면역 질환을 포함한다. 한랭글로불린-함유 면역 복합체는 아마 보체를 활성화하는 그것들의 능력으로 인한, 전신성 염증의 임상적 증후군을

일으킨다. IgG 면역 복합체가 정상적으로 보체의 고전적 경로를 활성화하는 한편, IgM 함유 복합체는 또한 렉틴 경로를 통해 보체를 활성화할 수 있다 (Zhang, M., et al., Mol Immunol 44(1-3):103-110 (2007) and Zhang, M., et al., J. Immunol. 177(7):4727-34 (2006)).

[0789] 면역조직화학적 연구는 한랭글로불린 면역 복합체가 렉틴 경로의 성분을 함유하고, 냉각 글로불린 사구체 신염에 걸린 환자의 생체 조직이 제자리에서 렉틴 경로 활성화의 면역조직화학적 증거를 나타낸다는 것을 추가로 입증하였다 (Ohsawa, I., et al., Clin Immunol 101(1):59-66 (2001)). 이들 결과는 렉틴 경로가 한랭글로불린 질환에서 염증 및 부정적인 결과에 기여할 수도 있다는 것을 제안한다.

[0790] **방법:**

[0791] 한랭글로불린혈증의 부작용을 차단하는 능력에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 결정하는 방법을 Ng Y.C. et al., Arthritis and Rheumatism 31(1):99-107 (1988)에 설명된 바와 같이 유체상 C3 전환에 대한 검정을 사용하여 수행하며, 본원에 참고로 포함된다. Ng et al.에 설명된 바와 같이, 특발성 혼합 한랭글로불린혈증 (EMC)에서, 단클론성 류머티스성 인자 (mRF), 보통 IgM은 다클론성 IgG와 복합체를 형성하여 특유의 한랭침전 면역 복합체 (IC) (타입 II 한랭글로불린)를 형성한다. 면역글로불린 및 C3를 피부, 신경 및 신장과 같이 영향을 받은 조직의 관 벽에서 입증하였다. Ng et al.에 설명된 바와 같이, ¹²⁵I-표지된 mRF를 혈청 (정상 사람 혈청 및 한랭글로불린혈증으로 고통받는 환자로부터 얻은 혈청)에 추가하였고, 37 °C에서 배양하였고, 적혈구에 결합을 측정한다.

[0792] 유체상 C3 전환을 다음 IC의 존재 또는 부재시 혈청 (정상 사람 혈청 및 한랭글로불린혈증으로 고통받는 환자로부터 얻은 혈청)에서 결정한다: 항-MASP-2 항체의 존재 또는 부재시 BSA-항 BSA, mRF, mRF 플러스 IgG, 또는 한랭글로불린. IC에 대한 C3 및 C4의 고정을 F(ab')₂ 항-C3 및 F(ab')₂ 항-C4와 공동 침전 검정을 사용하여 측정한다.

[0793] 항-MASP-2 항체가 렉틴 경로의 활성화를 차단하는 것으로 나타난다는 사실의 관점에서, 항-MASP-2 항체는 한랭글로불린혈증과 관련된 보체 매개된 부작용을 차단하는데 있어서 효과적일 것이고, 한랭글로불린혈증으로 고통받는 환자를 치료하는 치료제로서 유용할 것으로 기대된다.

[0794] **실시예 26**

[0795] 이 실시예는 빈혈증으로 나타나는, 한랭응집소병에 걸린 환자로부터 얻은 혈액 샘플에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 평가하는 방법을 설명한다.

[0796] **배경/근거:**

[0797] 한랭응집소병 (CAD)은 자가면역 용혈성 빈혈증의 타입이다. 한랭응집소 항체 (보통 IgM)는 냉온에 의해 활성화되고 응집 적혈구에 결합한다. 한랭응집소 항체는 보체와 결합하고 적혈구의 표면상의 항원을 공격한다. 이것은 적혈구의 용소닌화 (용혈)로 이어지며 이것은 세망내피계 시스템에 의해 그것들의 제거를 촉발한다. 응집이 일어나는 온도는 환자에 따라 다르다.

[0798] CAD는 빈혈증으로 나타난다. 적혈구 세포 파괴의 파괴 속도가 충분한 수의 산소-운반 세포를 생산하는 골수의 수용력을 초과할 때, 빈혈증이 발생한다. CAD는

[0799] "2차 CAD"로 불리는, 기저 질환 또는 장애, 예를 들어, 감염성 질환 (미코플라스마 폐렴, 볼거리, 단핵증), 림프증식성 질환 (림프종, 만성 림프성 백혈병), 또는 연결 조직 장애에 의해 유발될 수 있다. 1차 CAD 환자는 저급 림프증식성 골수 장애에 걸린 것으로 생각된다. 1차 및 2차 CAD 둘 다는 후천적 질병이다.

[0800] **방법:**

[0801] **시약:**

[0802] 정상 기증자 및 CAD로 고통받는 환자의 적혈구는 정맥 천자에 의해 얻어진다. 렉틴 경로의 기능적 차단 활성을 갖는 항-MASP-2 항체는 실시예 10에 설명된 바와 같이 발생할 수도 있다.

[0803] 렉틴 경로의 한랭응집소-매개된 활성화를 차단하는 항-MASP-2 항체의 효과는 다음과 같이 결정될 수도 있다. 혈액 그룹 I 양성 환자의 적혈구는 항-MASP-2 항체의 존재 또는 부재시 한랭응집소 (즉, IgM 항체)에 민감하다. 적혈구를 C3 결합을 측정함으로써 렉틴 경로를 활성화하는 능력에 대하여 테스트한다.

[0804] 항-MASP-2 항체가 렉틴 경로의 활성화를 차단하는 것으로 나타난다는 사실의 관점에서, 항-MASP-2 항체는 한랭

응집소병과 관련된 보체 매개된 부작용을 차단하는데 있어서 효과적일 것이고, 한랭응집소병으로 고통받는 환자를 치료하는 치료제로서 유용할 것으로 기대된다.

[0805] 실시예 27

[0806] 이 실시예는 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS)에 걸린 마우스로부터 얻은 혈액 샘플에서 적혈구의 용해에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 평가하는 방법을 설명한다.

[0807] 배경/근거:

[0808] 부정형 용혈성 요독성 증후군 (aHUS)은 신장 및 다른 기관의 미소 순환에서 혈소판 혈전에 의해 유발된 용혈성 빈혈증, 혈소판감소증, 및 신부전을 특징으로 한다. aHUS는 결함 보체 조절과 관련되고 산발적이거나 가족성일 수 있다. aHUS는 보체 인자 H, 막 보조인자 B 및 인자 I, 뿐만 아니라 보체 인자 H-관련 1 (CFHR1) 및 보체 인자 H-관련 3 (CFHR3)을 포함하는, 보체 활성화를 위해 암호화된 유전자의 돌연변이와 관련된다. Zipfel, P.F., et al., PloS Genetics 3(3):e41 (2007). 이 실시예는 aHUS 마우스로부터 얻은 혈액 샘플의 적혈구의 용해에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 평가하는 방법을 설명한다.

[0809] 방법:

[0810] aHUS를 치료하는 항-MASP-2 항체의 효과는 내인성 마우스 fH 유전자가 aHUS 환자에서 종종 발견되는 fH의 돌연변이 형태를 암호화하는 사람 상동체와 대체되는 이 질환의 마우스 모델에서 결정될 수도 있다. Pickering M.C. et al., J. Exp. Med. 204(6):1249-1256 (2007)를 참고하면 되고, 본원에 참고로 포함된다. Pickering et al.에 설명된 바와 같이, 이러한 마우스는 aHUS 유사 병상을 발달시킨다. aHUS의 치료를 위한 항-MASP-2 항체의 효과를 평가하기 위해, 항-MASP-2 항체를 돌연변이 aHUS 마우스에 투여하고 항-MASP-2 ab 처리된 및 처리되지 않은 대조군으로부터 얻은 적혈구의 용해를 비교한다. 항-MASP-2 항체가 력틴 경로의 활성화를 차단하는 것으로 나타난다는 사실의 관점에서, 항-MASP-2 항체가 항-MASP-2 항체가 력틴 경로의 활성화를 차단하는 것으로 나타난다는 사실의 관점에서, 항-MASP-2 항체는 aHUS로 고통받는 포유동물 대상체의 적혈구의 용해를 차단하는데 있어서 효과적일 것으로 기대된다.

[0811] 실시예 28

[0812] 이 실시예는 녹내장의 치료를 위한 항-MASP-2 항체의 효과를 평가하는 방법을 설명한다.

[0813] 근거/배경:

[0814] 조절되지 않은 보체 활성화는 녹내장에서 망막 신경절 세포 (RGCs), 그것들의 시냅스 및 축색돌기에 대한 퇴행성 손상의 진행에 기여한다는 것으로 나타났다. Tezel G. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 51:5071-5082 (2010)를 참고하면 된다. 예를 들어, 사람 조직의 조직병리학적 연구 및 다른 동물 모델을 사용하는 생체 내 연구는 C1q 및 C3을 포함하는 보체 성분이 합성되고 말단 상보성 복합체가 녹내장성 망막에서 형성된다는 것을 입증하였다 (Stasi K. et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 47:1024-1029 (2006), Kuehn M.H. et al., Exp Eye Res 83:620-628 (2006)을 참고하면 된다). Kuehn M.H. et al., Experimental Eye Research 87:89-95 (2008)에 추가로 설명된 바와 같이, 보체 합성 및 침착은 망막 I/R에 의해 유발되고 보체 캐스케이드의 붕괴는 RGC 변성을 지연시킨다. 본 연구에서, 보체 성분 C3의 표적화된 붕괴를 가지고 있는 마우스는 정상 동물과 비교할 때 일시적인 망막 I/R 후 지연된 RGC 변성을 나타내는 것으로 발견되었다.

[0815] 방법:

[0816] RGC 변성에 대한 항-MASP-2 항체의 효과를 결정하는 방법은 Kuehn M.H. et al., Experimental Eye Research 87:89-95 (2008)에 설명된 바와 같이 망막 I/R의 동물 모델에서 수행되고, 본원에 참고로 포함된다. Kuehn et al.에 설명된 바와 같이, 망막 국부성 빈혈이 동물을 마취시킴으로써 유발되고, 각막을 통해 포스포에이트 완충된 식염수를 함유한 레저버에 연결된 30-게이지 바늘을 눈의 전안방 (anterior chamber of the eye)에 삽입하였다. 망막의 맥관구조를 통한 순환을 완벽히 방지하기 위해 충분한, 104 mmHg의 안압을 수득하기 위해 식염수 레저버를 올렸다. 증가된 안 내 국부성 빈혈은 홍채 및 망막의 블랜칭 (blanching)에 의해 확인되었고 국부성 빈혈은 왼쪽 눈에서만 45분 동안 유지되었다; 오른쪽 눈은 대조군의 역할을 하고 캐눌레이션 (cannulation)을 받지 않는다. 마우스를 허혈성 손상 1 또는 3주 후 안락사시킨다. 허혈성 손상 전에 투여된 항-MASP 항체의 효과를 평가하기 위해 항-MASP-2 항체를 눈에 국부적으로 또는 전신에 마우스에 투여한다.

[0817] 보체 침착을 검출하기 위해 눈의 면역조직화학법을 C1q 및 C3에 대한 항체를 사용하여 수행한다. 표준 전자현미

경 방법을 사용하여 시신경 손상을 또한 평가할 수 있다. 살아있는 망막 RGC의 정량을 감마 시누클레인 표지를 사용하여 수행한다.

[0818] **결과:**

[0819] Kuehn et al.에 설명된 바와 같이, 정상 대조군 마우스에서, 일시적인 망막 국부성 빈혈은 시신경의 퇴행성 변화 및 면역조직화학법에 의해 검출 가능한 C1q 및 C3의 망막 침착을 일으킨다. 반대로, C3 결핍 마우스는 축색 돌기 변성의 현저한 감소를 나타내고, 유발 1주 후 작은 수준의 시신경 손상을 나타낸다. 이들 결과에 기초하여, 이 검정이 MASP-2 녹아웃 마우스에서 수행될 때, 및 항-MASP-2 항체가 허혈성 손상 전에 정상 마우스에 투여될 때 유사한 결과가 관찰될 것으로 기대된다.

[0820] **실시예 29**

[0821] 이 실시예는 MASP-2 억제제, 예를 들어, 항-MASP-2 항체가 방사선 노출의 치료 및/또는 급성 방사선 증후군의 치료, 완화 또는 예방에 효과적이라는 것을 입증한다.

[0822] **근거:**

[0823] 고선량의 이온화 방사선에 노출은 두 개의 주요 메커니즘에 의해 사망을 유발한다: 골수에 독성 및 위장 증후군. 골수 독성은 모든 혈액 세포의 하락을 일으키며, 유기체를 감염 및 출혈에 취약하게 한다. 위장 증후군이 더 중증이고 소화관 표층의 붕괴 및 장 내분비 기능의 손실로 인한 장막 기능의 손실에 의해 구동된다. 이것은 패혈증 및 죽음을 일으킬 수 있는 관련 전신성 염증성 반응 증후군으로 이어진다.

[0824] 보체의 렉틴 경로는 조직 손상 및 외부 표면 (즉, 박테리아)에 노출에 반응하여 염증을 시작하는 선천적 면역 메커니즘이다. 허혈성 장 조직 손상 또는 패혈 쇼크의 마우스 모델에서 이 경로의 차단은 더 좋은 결과로 이어진다. 렉틴 경로는 방사선-유발된 조직 손상에 반응하여 과도한 및 해로운 염증을 촉발할 수도 있다고 가정된다. 따라서 렉틴 경로의 차단은 급성 방사선 노출에 따른 2차적인 손상을 감소시킬 수도 있고 생존율을 증가시킬 수도 있다.

[0825] 이 실시예에 설명된 바와 같이 수행된 연구의 목적은 방사선 손상의 마우스 모델에서 항-쥐 MASP-2 항체를 투여함으로써 생존율에 대한 렉틴 경로 차단의 효과를 평가하는 것이었다.

[0826] **방법 및 재료:**

[0827] **재료.** 본 연구에 사용된 테스트 물품은 트랜스펙션된 포유동물 세포에서 생산되는 렉틴 보체 경로의 MASP-2 단백질 성분을 차단하는 (i) 고 친화도 항-쥐 MASP-2 항체 (mAbM11) 및 (ii) 고 친화도 항-사람 MASP-2 항체 (mAbH6)였다. 투여 농도는 항-쥐 MASP-2 항체 (mAbM11) 1 mg/kg, 항-사람 MASP-2 항체 (mAbH6) 5mg/kg, 또는 멸균 식염수였다. 각각의 투여 섹션에 대하여, 충분한 부피의 신선한 투여 용액을 제조하였다.

[0828] **동물.** 젊은 성체 수컷 Swiss-Webster 마우스를 Harlan Laboratories (Houston, TX)로부터 얻었다. 동물을 Alpha-Dri 베딩이 깔려있는 고체-바닥 케이지에서 사육하였고 보증된 PMI 5002 Rodent Diet (Animal Specialties, Inc., Hubbard OR) 및 물을 임의로 제공하였다. 온도를 관찰하였고 동물 사육실을 12시간 빛/12시간 어둠 광주기로 조작하였다.

[0829] **조사.** 시설에서 2주 순응 후, 마우스를 320-kV 높은 안정성 X-선 발생기, 금속 세라믹 X-선 튜브, 가변 x-선 빔 (beam) 분광기 및 필터 (Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT)가 장착된 Therapax X-RAD 320 시스템을 사용하여 0.78 Gy/분의 조사율로 10마리의 그룹에 전신 노출에 의해 6.5 및 7.0 Gy로 조사하였다. 조사 수준을 마우스의 같은 군주로 수행된 선행 연구에 기초하여 선택하였고 LD_{50/30}은 6.5 및 7.0 Gy 사이인 것을 나타낸다 (데이터 미도시).

[0830] **약물 조제 및 투여.** 적절한 부피의 농축된 모액을 아주 찬 식염수로 희석하여 프로토콜에 따라 0.2 mg/ml 항-쥐 MASP-2 항체 (mAbM11) 또는 0.5 mg/ml 항-사람 MASP-2 항체 (mAbH6)의 투여 용액을 제조하였다. 항-MASP-2 항체 mAbM11 및 mAbH6의 투여는 1 mg/kg mAbM11, 5mg/kg mAbH6, 또는 식염수 비히클을 전달하기 위해 동물 체중에 기초한 25-게이지 바늘을 사용하는 IP 주사를 통한 것이었다.

[0831] **연구 설계.** 마우스를 표 8에 설명된 그룹으로 무작위로 할당하였다. 체중 및 온도를 매일 측정하고 기록하였다. 그룹 7, 11 및 13의 마우스를 조사 후 7일에 희생시켰고 혈액을 깊은 마취 하에 심장 천자에 의해 수거하였다. 조사 후 30일에 생존한 동물을 같은 방식으로 희생시켰고 혈액을 수거하였다. 혈장을 프로토콜에 따라 수거된

혈액 샘플로부터 제조하였고 분석을 위해 스폰서에 반환하였다.

표 8: 연구 그룹

Fab2 항체 #	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-유사	CCPII-SP	티오레독신
40	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
41	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
11	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
49	0.16 ng	NR	NR	>20 ng	NR
52	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
57	0.032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
60	0.4 ng	0.4 ng	NR	NR	NR
63	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
66	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
67	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
71	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
81	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
86	0.4 ng	NR	NR	10 ng	NR
87	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
양성 대조군	<0.032 ng	0.16 ng	0.16 ng	<0.032 ng	NR

통계 분석. 카플란-마이어 생존 곡선을 만들어냈고 로그-랭크 및 윌콕슨 방법 (log-Rank and Wilcoxon method) 을 사용하여 치료 그룹 사이의 평균 생존 시간을 비교하기 위해 사용하였다. 표준 편차의 평균, 또는 평균의 표준 오차의 평균을 보고하였다. 대조군 조사된 동물 및 개개의 처리 그룹 사이에서 양측-꼬리 짝이 없는 t-테스트 (two-tailed unpaired t-test)를 사용하여 통계적으로 비교하였다.

결과

7.0 및 6.5 Gy 노출 그룹에 대한 카플란-마이어 생존 플롯은 각각 도 32a 및 32b에 제공되고, 하기 표 9에 요약된다. 전체적으로, 조사 전 항-귀 MASP-2 ab (mAbM11)의 처리는 6.5 (20% 증가) 및 7.0 Gy (30% 증가) 노출 수준 둘 다에서 비히클 처리된 조사된 대조군 동물에 비해 조사된 마우스의 생존을 증가시켰다. 6.5 Gy 노출 수준에서, 조사 후 항-귀 MASP-2 ab의 처리는 비히클 대조군 조사된 동물에 비해 생존율의 완전한 증가 (15%)를 일으켰다. 이에 비해, 7.0 Gy 노출 수준에서 처리된 동물 모두는 비히클 처리된 조사된 대조군 동물에 비해 생존율의 증가를 나타냈다. mAbH6을 받은 동물에서 생존율의 가장 큰 변화가 발생하였는데, 대조군 동물과 비교하여 45% 증가하였다. 게다가, 7.0 Gy 노출 수준에서, 비히클 처리된 조사된 대조군 동물의 조사 후 8일과 비교하여 mAbH6 처리된 그룹의 사망은 조사 후 15일에 처음 발생하였고, 대조군 동물보다 7일 증가하였다. 7.0 Gy 노출 수준에서 mAbH6을 받은 마우스에 대한 사망까지의 평균 시간 (27.3 ± 1.3 일)은 대조군 동물 (20.7 ± 2.0 일)에 비해 크게 증가하였다 ($p = 0.0087$).

조사 전 날 (-1일)과 비교하여 체중의 퍼센트 변화를 연구 내내 기록하였다. 대조군에 비해 mAbM11 또는 mAbH6 처리로 인한 차등적 변화의 증거 없이, 모든 조사된 동물에서 일시적인 체중 손실이 발생하였다. 연구 종료시, 모든 생존한 동물은 시작 (-1일) 체중으로부터 체중의 증가를 나타냈다.

표 9: 방사선에 노출된 테스트 동물의 생존율

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

- [0840] *같은 조사 노출 수준에서 대조군 조사된 동물 및 처리 그룹 사이에서 양측-꼬리 짝이 없는 t-테스트에 의해 $p = 0.0087$.
- [0841] **논의**
- [0842] 급성 방사선 증후군은 세 개의 한정된 하위 증후군 (subsyndrome)으로 구성된다: 조혈, 위장, 및 뇌혈관. 관찰된 증후군은 방사선 선량에 의존적이며, 조혈 효과를 1 Gy를 초과하는, 중요한 부분적 또는 전신 방사선 노출된 사람에서 관찰하였다. 조혈 증후군은 면역 시스템에 대한 손상에 수반되어 발생하는 혈구 수치, 적혈구 및 백혈구 세포, 및 혈소판이 변화하는 범혈구감소증 (pancytopenia)으로 이어지는, 골수 기능의 중증 우울증을 특징으로 한다. 최저점이 발생할 때, 말초 혈액에 존재하는 소수의 호중구 및 혈소판, 호중구감소증 (neutropenia)과 함께, 열, 패혈증의 합병증 및 통제 불가능한 출혈은 죽음으로 이어진다.
- [0843] 본 연구에서, 7.0 Gy에서 조사된 Swiss-Webster 수컷 마우스에서 mAbH6의 투여는 전신 x-선 조사의 생존 가능성을 증가시키는 것으로 발견되었다. 특히, 7.0 Gy 노출 수준에서, mAbH6을 받은 동물의 80%는 비히클 처리된 대조군 조사된 동물의 35%와 비교하여 30일까지 생존하였다. 중요하게도, 이 처리된 그룹의 죽음의 첫 날은 조사 후 15일까지 발생하지 않았고, 비히클 처리된 대조군 조사된 동물에서 관찰된 것보다 7일 증가하였다. 이상하게도, 더 낮은 X-선 노출 (6.5 Gy)에서, mAbH6의 투여는 비히클 처리된 대조군 조사된 동물과 비교하여 생존 가능성에 영향을 미치거나 사망을 지연시키는 것으로 나타나지 않았다.
- [0844] 노출 수준 사이의 반응의 이 차이에 대해서는 다수의 이유가 있을 수 있지만, 어떤 가정의 확인도 미생물학적 배양 및 혈액학적 파라미터를 위한 중간 샘플 수거를 포함하는, 추가적인 연구를 필요로 할 수도 있다. 한 이유는 단순히 그룹에 할당된 동물의 수가 어떤 미미한 처리-관련 차이를 찾는 것을 불가능하게 할 수도 있다는 것일 수도 있다. 예를 들어, $n=20$ 의 그룹에서, 65% (6.5 Gy 노출에서 mAbH6) 및 80% (7.0 Gy 노출에서 mAbH6) 사이의 생존의 차이는 3마리의 동물이다. 반면에, 35% (7.0 Gy 노출에서 비히클 대조군) 및 80% (7.0 Gy 노출에서 mAbH6) 사이의 차이는 9마리의 동물이고, 처리-관련 차이의 타당한 증거를 제공한다.
- [0845] 이들 결과는 항-MASP-2 항체가 급성 방사선 증후군의 부작용에 걸릴 위험이 있거나, 이로 고통받는 포유동물 대상체를 치료하는데 있어서 효과적이라는 것을 입증한다.
- [0846] **실시예 30**
- [0847] 이 실시예는 MASP-2 결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 혈청균 A 또는 네이세리아 메닝기티디스 혈청균 B로 감염 후 네이세리아 메닝기티디스 유발된 치사로부터 보호된다는 것을 입증한다.
- [0848] **방법:**
- [0849] MASP-2 녹아웃 마우스 (MASP-2 KO 마우스)를 실시예 1에 설명된 바와 같이 생성하였다. 10주령 MASP-2 KO 마우스 ($n=10$) 및 야생형 (WT) C57/BL6 마우스 ($n=10$)를 복강 내 (복강 내) 주사에 의해 100 μ l의 용량의, 네이세리아 메닝기티디스 혈청균 A Z2491의 2.6×10^7 CFU의 투약량을 접종하였다. 감염성 용량을 철 텍스트란과 함께 400 mg/kg의 최종 농도로 마우스에 투여하였다. 감염 후 마우스의 생존을 72시간의 기간 동안 관찰하였다.
- [0850] 별도의 실험에서, 10주령 MASP-2 KO 마우스 ($n=10$) 및 야생형 C57/BL6 마우스 ($n=10$)를 복강 내 주사에 의해 100 μ l의 용량의, 네이세리아 메닝기티디스 혈청균 B 균주 MC58의 6×10^6 CFU의 투약량을 접종하였다. 감염성 용량을 철 텍스트란과 함께 400 mg/kg의 최종 투여량으로 마우스에 투여하였다. 감염 후 마우스의 생존을 72시간의 기간 동안 관찰하였다. 감염 후 72시간의 기간 동안 WT 및 MASP-2 KO 마우스에 대한 질병 점수를 또한 결정하였고, 하기 표 10에 설명된 질병 점수 파라미터에 기초하며, 이것은 약간 수정된 Fransen et al. (2010)의 계획을 기반으로 한다.

[0851] 표 10: 감염된 마우스에서 임상적 징후와 관련된 질병 점수

징후	점수
정상	0
약간 주름진 모피	1
주름진 모피, 느리고 끈적거리는 눈	2
주름진 모피, 혼수상태 및 눈 감김	3
자극후 매우 아프고 이동 없음	4
사망	5

[0852]

[0853] 감염을 확인하고 혈청으로부터 박테리아의 제거 속도를 결정하기 위해 혈액 샘플을 감염 후 시간 간격으로 마우스에서 채취하였고 엔. 메닝기티디스의 혈청 수준 (로그 cfu/mL)을 결정하기 위해 분석하였다.

[0854] **결과:**

[0855] 도 33은 엔. 메닝기티디스 혈청균 A Z2491의 2.6×10^7 cfu의 감염성 용량의 투여 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 퍼센트 생존율을 그래프로 설명하는 카플란-마이어 플롯이다. 도 33에 나타난 바와 같이, MASP-2 KO 마우스의 100%가 감염 후 72시간의 기간 동안 생존하였다. 반대로, WT 마우스 중 80% ($p=0.012$) 만이 감염 24시간 후 살아있었고, WT 마우스 중 50%만이 감염 후 72시간에 살아있었다. 이들 결과는 MASP-2-결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 혈청균 A Z2491-유발된 치사로부터 보호된다는 것을 입증한다.

[0856] 도 34는 엔. 메닝기티디스 혈청균 B 균주 MC58의 6×10^6 cfu의 감염성 용량의 투여 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 퍼센트 생존율을 그래프로 설명하는 카플란-마이어 플롯이다. 도 34에 나타난 바와 같이, MASP-2 KO 마우스의 90%가 감염 후 72시간의 기간 동안 생존하였다. 반대로, WT 마우스 중 20% ($p=0.0022$) 만이 감염 24시간 후 살아있었다. 이들 결과는 MASP-2-결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 혈청균 B 균주 MC58-유발된 치사로부터 보호된다는 것을 입증한다.

[0857] 도 35는 엔. 메닝기티디스 혈청균 B 균주 MC58의 6×10^6 cfu로 복강 내 감염 후 MASP-2 KO 및 WT 마우스로부터 채취된 혈액 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스 혈청균 B 균주 MC58의 로그 cfu/mL을 그래프로 설명한다 (다른 시점에 마우스의 두 그룹에 대하여 $n=3$ 다른 시점에). 결과를 평균 $\pm$ SEM으로 나타낸다. 도 35에 나타난 바와 같이, WT 마우스에서 혈액 중 엔. 메닝기티디스의 수준은 감염 후 24시간에 약 6.0 로그 cfu/mL의 피크에 도달하였고 감염 후 36시간에 약 4.0 로그 cfu/mL로 떨어진다. 반대로, MASP-2 KO 마우스에서, 엔. 메닝기티디스의 수준은 감염 후 12시간에 약 4.0 로그 cfu/mL의 피크에 도달하였고 감염 후 36시간에 약 1.0 로그 cfu/mL로 떨어졌다 (부호 "*"는 $p<0.05$ 를 나타낸다; 부호 "***"는 $p=0.0043$ 을 나타낸다). 이들 결과는 MASP-2 KO 마우스가 WT 마우스와 같은 용량의 엔. 메닝기티디스 혈청균 B 균주 MC58로 감염되었지만, MASP-2 KO 마우스는 WT와 비교된 바와 같이 균혈증의 제거를 향상시켰다는 것을 입증한다.

[0858] 도 36은 엔. 메닝기티디스 혈청균 B 균주 MC58의 6×10^6 cfu로 감염 후 3, 6, 12 및 24시간에 MASP-2 KO 및 WT 마우스의 평균 질병 점수를 그래프로 설명한다. 도 36에 나타난 바와 같이, MASP-2-결핍 마우스는 감염에 높은 저항성을 나타냈고, WT 마우스와 비교된 바와 같이, 감염 후 6시간 (부호 "*"는 $p=0.0411$ 을 나타낸다), 12시간 (부호 "***"는 $p=0.0049$ 를 나타낸다) 및 24시간 (부호 "***"는 $p=0.0049$ 를 나타낸다)에 훨씬 낮은 질병 점수를 갖는다. 도 36의 결과는 평균 $\pm$ SEM으로 나타낸다.

[0859] 요약하면, 이 실시예의 결과는 MASP-2-결핍 마우스가 엔. 메닝기티디스 혈청균 A 또는 엔. 메닝기티디스 혈청균 B로 감염 후 네이세리아 메닝기티디스-유발된 치사율로부터 보호된다는 것을 입증한다.

[0860] **실시예 31**

[0861] 이 실시예는 엔. 메닝기티디스로 감염 후 항-MASP-2 항체의 투여는 엔. 메닝기티디스로 감염된 마우스의 생존을 증가시킨다는 것을 입증한다.

[0862] **배경/근거:**

[0863] 실시예 10에 설명된 바와 같이, 래트 MASP-2 단백질을 이용하여 Fab 파지 디스플레이 라이브러리를 패닝하였으며, 이것으로부터 Fab2#11은 기능적 활성 항체로서 확인되었다. 래트 IgG2c 및 마우스 IgG2a 이소타입의 전체

길이 항체는 Fab2#11로부터 발생하였다. 마우스 IgG2a 이소타입의 전체 길이 항-MASP-2 항체는 약물동력학적 파라미터에 대하여 특성화되었다 (실시예 19에 설명된 바와 같이).

[0864] 이 실시예에서, Fab2 #11로부터 유도된 마우스 항-MASP-2 전체 길이 항체를 엔. 메닝기티디스 감염의 마우스 모델에서 분석하였다.

[0865] **방법:**

[0866] 상기 설명된 바와 같이 발생한, Fab2#11로부터 유도된 마우스 IgG2a 전체 길이 항-MASP-2 항체 이소타입을 다음과 같이 엔. 메닝기티디스 감염의 마우스 모델에서 테스트하였다.

[0867] **감염 후 마우스-항-MASP-2 단클론성 항체 (MoAb)의 투여**

[0868] 9주령 C57/BL6 Charles River 마우스에 고용량 (4×10^6 cfu)의 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58의 복강 내 주사 후 3시간에 억제 마우스 항-MASP-2 항체 (1.0 mg/kg) (n=12) 또는 대조군 이소타입 항체 (n=10)를 투여하였다.

[0869] **결과:**

[0870] 도 37는 엔. 메닝기티디스 혈청군 B 균주 MC58의 4×10^6 cfu의 감염성 용량의 투여 후, 이어서 억제 항-MASP-2 항체 (1.0 mg/kg) 또는 대조군 이소타입 항체의 감염 후 3시간에 투여 후 마우스의 퍼센트 생존율을 그래프로 설명하는 카플란-마이어 플롯이다. 도 37에 나타난 바와 같이, 항-MASP-2 항체가 처리된 마우스 중 90%는 감염 후 72시간의 기간 동안 생존하였다. 반대로, 이소타입 대조군 항체가 처리된 마우스 중 50%만이 감염 후 72시간의 기간 동안 생존하였다. 두 개의 생존 곡선의 비교에 의해 결정된 바와 같이, 부호 "*"는 $p=0.0301$ 을 나타낸다.

[0871] 이들 결과는 항-MASP-2 항체의 투여가 엔. 메닝기티디스로 감염된 대상체를 치료하고 이의 생존을 개선하는데 효과적이라는 것을 입증한다.

[0872] 여기에 입증된 바와 같이, 엔. 메닝기티디스로 감염된 대상체의 치료시 항-MASP-2 항체의 사용은 감염 후 3시간 내에 투여될 때 효과적이고, 감염 후 24시간 내지 48시간 내에 효과적일 것으로 기대된다. 뇌척수막염균 질환 (수막염균혈증 또는 수막염)은 응급 상황이고, 치료는 전형적으로 뇌척수막염균 질환이 의심되는 즉시 (즉, 엔. 메닝기티디스가 유병기생충으로서 양성으로 확인되기 전에) 시작될 것이다.

[0873] 실시예 30에서 입증된 MASP-2 KO 마우스의 결과의 관점에서, 엔. 메닝기티디스로 감염 전에 항-MASP-2 항체의 투여가 또한 감염의 심각도를 예방하거나 개선하는데 효과적일 것으로 생각된다.

[0874] **실시예 32**

[0875] 이 실시예는 항-MASP-2 항체의 투여가 사람 혈청에서 엔. 메닝기티디스 감염을 치료하는데 효과적이라는 것을 입증한다.

[0876] **근거:**

[0877] 기능적 MBL의 감소된 혈청 수준을 가진 환자는 재발성 박테리아 및 균류 감염에 대한 증가된 민감성을 나타낸다 (Kilpatrick et al., Biochim Biophys Acta 1572:401-413 (2002)). 엔. 메닝기티디스가 MBL에 의해 인식되는 것으로 알려져 있고, MBL-결핍 혈청은 네이세리아를 용해하지 않는 것으로 나타났다.

[0878] 실시예 30 및 31에 설명된 결과의 관점에서, 보체-결핍 및 대조군 사람 혈청에서 엔. 메닝기티디스 감염을 치료하는 항-MASP-2 항체의 투여의 효능을 결정하기 위해 일련의 실험을 수행하였다. 보체 경로를 보존하기 위해 고 농도의 혈청 (20%)으로 실험을 수행하였다.

[0879] **방법:**

[0880] 1. 다양한 보체-결핍 사람 혈청 및 사람 항-MASP-2 항체가 처리된 사람 혈청에서 혈청 살균 작용

[0881] 다음 보체-결핍 사람 혈청 및 대조군 사람 혈청을 이 실험에 사용하였다:

[0882] 표 11: 테스트된 사람 혈청 샘플 (도 38에 나타난 바와 같이)

샘플	혈청 타입
A	정상 사람 혈청 (NHS) + 사람 항-MASP-2 Ab
B	NHS + 이소타입 대조군 Ab
C	MBL -/- 사람 혈청
D	NHS
E	열-불활성화된 (HI) NHS

[0883]

[0884] 사람 MASP-2에 대한 재조합 항체를 항원으로서 재조합 사람 MASP-2-2A를 사용하여, Combinatorial Antibody Library (Knappik, A., et al., J. Mol. Biol. 296:57-86 (2000))로부터 분리하였다 (Chen, C.B. and Wallis, J. Biol. Chem. 276:25894-25902 (2001)). 사람 혈장 (IC₅₀ ~ 20 nM)에서 C4 및 C3의 렉틴 경로-매개된 활성화를 강하게 억제하는 항-사람 scFv 단편을 확인하였고 전체 길이 사람 IgG4 항체로 전환시켰다.

[0885] 엔. 메닝기티디스 혈청군 B-MC58을 표 11에 나타난 다른 혈청과 함께, 각각 20%의 혈청 농도로, 37 °C에서 흔들면서 배양하였으며, 억제 사람 항-MASP-2 항체 (100 µl 총량 중에 3 µg)를 추가하거나 추가하지 않았다.

[0886] 샘플을 다음 시점에 채취하였고: 0-, 30-, 60- 및 90-분 간격, 밖으로 빼내서 생균 수를 결정하였다. 열 불활성화된 사람 혈청을 음성 대조군으로 사용하였다.

[0887] 결과:

[0888] 도 38은 표 11에 나타난 사람 혈청 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스 혈청군 B-MC58의 생균 수의 로그 cfu/mL을 그래프로 설명한다. 표 12는 도 38에 대한 스튜던트 t-테스트 결과를 제공한다.

[0889] 표 12: 도 38에 대한 스튜던트 t-테스트 결과 (시점 60분)

	평균 차이 (로그)	유의함? P<0.05?	P 값 요약
A 대 B	-0.3678	그렇다	*** (0.0002)
A 대 C	-1.1053	그렇다	*** (p<0.0001)
A 대 D	-0.2111	그렇다	** (0.0012)
C 대 D	1.9	그렇다	*** (p<0.0001)

[0890]

[0891] 도 38 및 TABLE 12에 나타난 바와 같이, 사람 20% 혈청에서 엔. 메닝기티디스의 보체-의존적 살해는 사람 항-MASP-2 억제 항체의 추가에 의해 크게 향상되었다.

[0892] 2. MASP-2의 20 부피% 마우스 혈청 결핍시 엔. 메닝기티디스의 보체-의존적 살해

[0893] 다음 보체-결핍 마우스 혈청 및 대조군 마우스 혈청을 본 실험에 사용하였다:

[0894] 표 13: 테스트된 마우스 혈청 샘플 (도 39에 나타난 바와 같이)

샘플	혈청 타입
A	WT
B	MASP-2 -/-
C	MBL A/C -/-
D	WT 열-불활성화된 (HIS)

[0895]

[0896] 엔. 메닝기티디스 혈청군 B-MC58을 다른 보체-결핍 마우스 혈청과 함께, 각각 20%의 혈청 농도로, 37 °C에서 흔들면서 배양하였다. 샘플을 다음 시점에 채취하였고: 0-, 15-, 30-, 60-, 90- 및 120-분 간격, 밖으로 빼내서 생균 수를 결정하였다. 열 불활성화된 사람 혈청을 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0897] 결과:

[0898] 도 39는 표 13에 나타난 마우스 혈청 샘플에서 다른 시점에 회수된 엔. 메닝기티디스 혈청군 B-MC58의 생균 수의 로그 chu/mL을 그래프로 설명한다. 도 39에 나타난 바와 같이, MASP-2 -/- 마우스 혈청은 WT 마우스 혈정보

다 엔. 메닝기티디스에 대하여 더 높은 수준의 살균 작용을 갖는다. 부호 "*"는 $p=0.0058$ 을 나타내고, 부호 "****"는 $p=0.001$ 을 나타낸다. 표 14는 도 39에 대한 스튜던트 t-테스트 결과를 제공한다.

[0899] 표 14: 도 39에 대한 스튜던트 t-테스트 결과

비교	시점	평균 차이 (로그)	유의함? ($p<0.05$)?	P 값 요약
A 대 B	60 분	0.39	그렇다	** (0.0058)
A 대 B	90 분	0.6741	그렇다	*** (0.001)

[0900]

[0901] 요약하면, 이 실시예의 결과는 MASP-2 -/- 혈청이 WT 혈청보다 엔. 메닝기티디스에 대하여 더 높은 수준의 살균 작용을 갖는다는 것을 입증한다.

[0902] 실시예 33

[0903] 이 실시예는 발작성야간혈색소뇨증 (PNH)의 마우스 모델로부터 얻은 혈액 샘플의 적혈구의 용해에 대한 MASP-2 결핍의 억제 효과를 입증한다.

[0904] 배경/근거:

[0905] 마르키아파바-미첼리 증후군으로도 불리는, 발작성야간혈색소뇨증 (PNH)은 후천적, 잠재적으로 생명을 위협하는 혈액 질환이며, 보체-유발된 혈관 내 용혈성 빈혈증을 특징으로 한다. PNH의 홀마크는 이후의 헤모글로빈 요증 및 빈혈증을 갖는, PNH 적혈구에서 보체 조절기 CD55 및 CD59의 부재로 인한 보체의 대체 경로의 조절되지 않은 활성화의 결과인 만성 보체-매개된 혈관 내 용혈이다. Lindorfer, M.A., et al., Blood 115(11) (2010), Risitano, A.M, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11:528-535 (2011). PNH에서 빈혈증은 혈류에서 적혈구의 파괴로 인한 것이다. PNH의 증상은 요증 헤모글로빈의 등장으로 인한 적뇨, 요통, 피로, 숨가쁨 및 혈전증을 포함한다. PNH는 그 자체에서 발달할 수도 있으며, "1차 PNH"로 불리거나 무형성 빈혈증과 같은 다른 골수 장애의 맥락에서 발달할 수도 있으며, "2차 PNH"로 불린다. PNH의 치료는 빈혈증에 대하여 혈액 투입, 혈전증에 대하여 항응고 및 단클론성 항체 에쿨리주맙 (Soliris®)의 사용을 포함하며, 이것은 보체 시스템을 억제함으로써 면역 파괴에 대하여 혈액 세포를 보호한다 (Hillmen P. et al., N. Engl. J. Med. 350(6):552-9 (2004)). 에쿨리주맙 (Soliris®)은 보체 성분 C5를 표적화하는 사람화된 단클론성 항체이며, C5 콘버타제에 의한 그것의 절단을 차단하고, 그로 인해 C5a의 생산 및 MAC의 조립을 방지한다. 에쿨리주맙으로 PNH 환자의 치료는, 락테이트 데히드로게나제 (LDH)에 의해 측정된 바와 같이, 혈관 내 용혈의 감소를 일으켰고, 환자 중 약 절반에서 헤모글로빈 안정화 및 수혈 독립성으로 이어진다 (Hillmen P, et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, vol 11(6) (2011)). 에쿨리주맙으로 치료를 경험하는 거의 모든 환자는 정상 또는 거의 정상 LDH 수준을 달성하는 한편 (혈관 내 용혈의 조절로 인해), 환자 중 약 3분의 1은 11 gr/dL보다 높은 헤모글로빈 값에 도달하고, 거의 같은 비율로, 에쿨리주맙에 대하여 남은 환자는 중간 내지 중증 (즉, 수혈-의존적) 빈혈증을 계속해서 나타낸다 (Risitano A.M. et al., Blood 113:4094-100 (2009)). Risitano et al., Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11:528-535 (2011)에 설명된 바와 같이, 에쿨리주맙에 대한 PNH 환자는 그것들의 PNH 적혈구의 실질적인 부분에 결합된 C3 단편을 함유한다는 것을 입증하였으며 (치료되지 않은 환자는 아니다), 막-결합한 C3 단편이 PNH 적혈구에 대하여 옹소닌으로서 작용하고, 특이적 C3 수용체를 통해 세망내피계 세포에서 그것들의 포집 및 이후의 혈관 외 용혈을 일으킨다는 결론으로 이어진다. 그러므로, 에쿨리주맙의 사용 이외에 치료 계획이 C3 단편-매개된 혈관 외 용혈에 걸린 환자에게 필요한데 그들이 적혈구 수혈을 계속해서 필요로 하기 때문이다.

[0906] 이 실시예는 PNH의 마우스 모델로부터 얻은 혈액 샘플의 적혈구의 용해에 대한 MASP-2 결핍 혈청 및 MASP-2 억제제가 처리된 혈청의 효과를 평가하는 방법을 설명하고 PNH로 고통받는 대상체를 치료하기 위해 MASP-2 억제의 효능을 입증하고, 또한 에쿨리주맙과 같은 C5 억제제로의 치료를 경험한 PNH 대상체에서 C3 단편-매개된 혈관 외 용혈의 효과를 개선하기 위해 MASP-2의 억제제의 사용을 지지한다.

[0907] 방법:

[0908] PNH 동물 모델:

[0909] 혈액 샘플을 Crry 및 C3이 결핍된 (Crry/C3-/-) 유전자-표적화된 마우스 및 CD55/CD59-결핍 마우스로부터 얻었다. 이들 마우스는 각각의 표면 보체 조절기가 없어졌고, 그러므로, 그것들의 적혈구는 PNH 사람 혈액 세포와 같이 자발적인 보체 자가 용해에 민감성이다.

- [0910] 이들 적혈구를 더 민감하게 만들기 위해, 이들 세포를 만نان으로 코팅하거나 코팅하지 않고 사용하였고 WT C56/BL6 혈장, MBL 널 (null) 혈장, MASP-2 $-/-$ 혈장, 사람 NHS, 사람 MBL $-/-$ 혈장, 및 사람 항-MASP-2 항체가 처리된 NHS에서 용혈에 대하여 테스트하였다.
- [0911] **1. MASP-2-결핍/고갈된 혈청 및 대조군에서 Crry/C3 및 CD55/CD59 이중-결핍 쥐 적혈구의 용혈 검정**
- [0912] **제 1일.** 쥐 RBC의 제조 ($\pm$ 만난 코팅)
- [0913] 포함된 재료: 신선한 마우스 혈액, BBS/ Mg^{2+}/Ca^{2+} (4.4 mM 바비투르산, 1.8 mM 나트륨 바비톤, 145 mM NaCl, pH7.4, 5mM Mg^{2+} , 5mM Ca^{2+}), 크롬 클로라이드, $CrCl_3 \cdot 6H_2O$ (BBS/ Mg^{2+}/Ca^{2+} 중 0.5 mg/mL) 및 만난, BBS/ Mg^{2+}/Ca^{2+} 중 100 μ g/mL.
- [0914] 전체 혈액 (2 mL)을 4 $^{\circ}$ C의 냉장 원심분리기에서 2000 x g로 1-2분 동안 스핀 다운하였다. 혈장 및 버피 코트를 흡입하였다. 2 mL 아주 찬 BBS/젤라틴/ Mg^{2+}/Ca^{2+} 에서 RBC 펠렛을 재현탁함으로써 샘플을 세 번 세척하였고 원심 분리 단계를 반복하였다. 세 번째 세척 후, 펠렛을 4 mL BBS/ Mg^{2+}/Ca^{2+} 에 재현탁하였다. RBC의 2 mL 엘리퀀트를 코팅되지 않은 대조군으로서 확보하였다. 남은 2 mL에 대하여, 2 mL $CrCl_3$ 및 2 mL 만난을 추가하였고 샘플을 상오에서 부드럽게 혼합하면서 5분 동안 배양하였다. BBS/젤라틴/ Mg^{2+}/Ca^{2+} 을 추가함으로써 반응을 종결하였다. 샘플을 상기와 같이 스핀 다운하였고, 2 mL BBS/젤라틴/ Mg^{2+}/Ca^{2+} 에 재현탁하였고 상기와 같이 추가로 두 번 더 세척한 다음, 4 $^{\circ}$ C에 저장하였다.
- [0915] **제 2일.** 용혈 검정
- [0916] 재료는 BBS/젤라틴/ Mg^{2+}/Ca^{2+} (상기와 같음), 테스트 혈청, 96-웰 등근 바닥 및 평평한 바닥 플레이트 및 410-414 nm에서 96-웰 플레이트를 판독하는 분광 광도계를 포함하였다.
- [0917] RBC의 농도를 먼저 결정하였고 세포를 10^9 /mL로 조정하였고, 이 농도로 저장하였다. 사용 전에, 검정 완충액을 10^8 /mL로 희석한 다음, 웰 당 100 μ l을 사용하였다. 용혈을 410-414 nm에서 측정하였다 (541 nm보다 더 큰 민감도를 허용함). 테스트 혈청의 희석액을 아주 찬 BBS/젤라틴/ Mg^{2+}/Ca^{2+} 로 제조하였다. 각 혈청 희석액 중 100 μ l를 등근 바닥 플레이트에 피펫팅하였다 (pipetted) (플레이트 레이아웃 (layout)을 참고하면 된다). 적절하게 희석된 RBC 조제물 중 100 μ l를 추가하였고 (즉, 10^8 /mL) (플레이트 레이아웃을 참고하면 된다), 37 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 동안 배양하였고, 용해에 대하여 관찰하였다 (플레이트를 이 시점에 사진 찍을 수도 있다). 플레이트를 최대 속도로 5분 동안 스핀 다운하였다. 유체상 중 100 μ l을 흡입하였고, 평평한 바닥 플레이트로 옮겼고, 410-414 nm에서 OD를 기록하였다. RBC 펠렛을 유지하였다 (이것은 반대의 결과를 얻기 위해 이후에 물에 용해될 수 있다).
- [0918] **실험 #1:**
- [0919] 신선한 혈액을 CD55/CD59 이중-결핍 마우스로부터 얻었고 Crry/C3 이중-결핍 마우스의 혈액 및 적혈구를 상기 프로토콜에 상세히 설명된 바와 같이 제조하였다. 세포를 절단했고 세포 중 절반은 만نان으로 코팅하였고 다른 절반은 처리하지 않은 채로 두었고, mL 당 1×10^8 로 최종 농도를 조정하였으며, 이것 중 100 μ l를 용혈 검정에 사용하였고, 이것을 상기 설명된 바와 같이 수행하였다.
- [0920] **실험 #1의 결과: PNH 동물 모델에서 력틴 경로는 적혈구 용해에 수반된다**
- [0921] 처음 실험에서, 비-코팅된 WT 마우스 적혈구는 어떤 마우스 혈청에서도 용해되지 않는다는 것을 결정하였다. 만난-코팅된 Crry $-/-$ 마우스 적혈구는 WT 마우스 혈청에서 천천히 용해되지만 (37도에서 3시간 이상), 그것들은 MBL 널 혈청에서 용해되지 않는다는 것을 추가로 결정하였다 (데이터 미도시).
- [0922] 만난-코팅된 Crry $-/-$ 마우스 적혈구는 사람 혈청에서 신속하게 용해되지만 열 불활성화된 NHS에서는 아닌 것을 결정하였다. 중요하게는, 만난-코팅된 Crry $-/-$ 마우스 적혈구는 1/640까지 희석된 NHS에서 용해되었다 (즉, 모두 용해된 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 및 1/640 희석) (데이터 미도시). 이 희석에서, 대체 경로는 작용하지 않는다 (AP 기능적 활성은 8% 혈청 농도 밑으로 크게 감소한다).
- [0923] **실험 #1의 결론**
- [0924] 만난-코팅된 Crry $-/-$ 마우스 적혈구는 MBL로 매우 희석된 사람 혈청에 매우 잘 용해되지만 MBL이 없는 경우는

그렇지 않다. 테스트된 모든 혈청 농도에서 효과적인 용해는 대체 경로가 이 용해에 수반되지 않거나 필요하지 않다는 것을 나타낸다. 만난-코팅된 Crry-/- 마우스 적혈구를 용해하지 못하는, MBL-결핍 마우스 혈청 및 사람 혈청의 능력은 고전적 경로가 또한 관찰된 용해와 아무 상관이 없다는 것을 나타낸다. 력틴 경로 인식 분자가 필요하기 때문에 (즉, MBL), 이 용해는 력틴 경로에 의해 매개된다.

실험 #2:

신선한 혈액을 Crry/C3 및 CD55/CD59 이중-결핍 마우스로부터 얻었고 만난-코팅된 Crry-/- 마우스 적혈구를 다음 사람 혈청의 존재시 상기 설명된 바와 같이 용혈 검정에서 분석하였다: MBL -/-; WT; 사람 항-MASP-2 항체가 미리 처리된 NHS; 및 대조군으로서 열 불활성화된 NHS.

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

만난-코팅된 Crry-/- 마우스 적혈구를 가지고, NHS, 사람 MBL-/- 혈청, 항-MASP-2 mAb가 미리 처리된 NHS, 및 대조군으로서 열 불활성화된 NHS가 1/640까지 희석된 희석액에서 배양되었다 (즉, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 및 1/640).

ELISA 미세역가 플레이트를 스핀 다운하였고 비-용해된 적혈구를 둥근 바닥-웰 플레이트에 수거하였다. 각 웰의 상층액을 수거하였고 용해된 적혈구로부터 방출된 헤모글로빈의 양을 ELISA 리더에서 OD415 nm을 관독함으로써 측정하였다.

대조군 열 불활성화된 NHS (음성 대조군)에서, 예측된 바와 같이, 용해가 발견되지 않았다. MBL-/- 사람 혈청은 1/8 및 1/16 희석에서 만난-코팅된 마우스 적혈구를 용해하였다. 항-MASP-2-항체가 미리 처리된 NHS는 1/8 및 1/16 희석에서 만난-코팅된 마우스 적혈구를 용해하는 한편, WT 사람 혈청은 1/32의 희석까지 만난-코팅된 마우스 적혈구를 용해하였다.

도 40은 열 불활성화된 (HI) NHS, MBL-/-, 항-MASP-2 항체가 미리 처리된 NHS, 및 NHS 대조군의 혈청에서 혈청 농도의 범위를 넘는 사람 혈청에 의한 만난-코팅된 쥐 적혈구의 용혈을 그래프로 설명한다 (광도 측정에 의해 측정된 상층액으로 용해된 마우스 적혈구 (Crry/C3-/-)의 헤모글로빈 방출에 의해 측정된 바와 같다).

도 40에 나타난 결과로부터, 항-MASP-2 항체로 MASP-2 억제는 CH₅₀를 크게 옮겼고 자가 보체 활성화로부터 보호가 결핍된 민감성 적혈구의 보체-매개된 용해를 억제하였다는 것이 입증된다.

실험 #3

비-코팅된 Crry-/- 마우스 적혈구에서 Crry/C3 및 CD55/CD59 이중-결핍 마우스로부터 얻은 신선한 혈액을 다음 혈청의 존재시 상기 설명된 바와 같이 용혈 검정에서 분석하였다: MBL -/-; WT 혈청; 사람 항-MASP-2 항체가 미리 처리된 NHS 및 대조군으로서 열 불활성화된 NHS.

결과:

도 41은 열 불활성화된 (HI) NHS, MBL-/-, 항-MASP-2 항체가 미리 처리된 NHS, 및 NHS 대조군의 혈청에서 혈청 농도의 범위를 넘는 사람 혈청에 의한 비-코팅된 쥐 적혈구의 용혈을 그래프로 설명한다 (광도 측정에 의해 측정된 상층액으로 용해된 WT 마우스 적혈구의 헤모글로빈 방출에 의해 측정된 바와 같음). 도 41에 나타난 바와 같이, MASP-2를 억제하는 것은 비-민감성 WT 마우스 적혈구의 보체-매개된 용해를 억제한다는 것이 입증된다.

도 42는 열 불활성화된 (HI) NHS, MBL-/-, 항-MASP-2 항체가 미리 처리된 NHS, 및 NHS 대조군의 혈청의 혈청 농도의 범위를 넘는 사람 혈청에 의한 비-코팅된 쥐 적혈구의 용혈을 그래프로 설명한다 (광도 측정에 의해 측정된 상층액으로 용해된 마우스 적혈구 (CD55/59 -/-)의 헤모글로빈 방출에 의해 측정된 바와 같음).

표 15: 혈청 농도로서 표현된 CH₅₀ 값

혈청	WT	CD55/59 -/-
열-불활성화된 NHS	용해되지 않음	용해되지 않음
MBL AO/XX 기증자 (MBL 결핍)	7.2%	2.1%
NHS + 항-MASP-2 항체	5.4%	1.5%
NHS	3.1%	0.73%

주: "CH₅₀"은 보체 매개된 용혈이 50%에 도달하는 지점이다.

요약하면, 이 실시예의 결과는 MASP-2를 억제하는 것은 자가 보체 활성화로부터 보호가 결핍된 민감성 및 비-민감성 적혈구의 보체 매개된 용해를 억제한다. 그러므로, MASP-2 억제제는 PNH로 고통받는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수도 있고, 또한 에쿨리주맙 (Soliris®)과 같은 C5 억제제로 치료를 경험한 PNH 환자에서 혈관 외 용혈을 개선하기 위해 (즉, 혈관 외 용혈의 심각도를 억제하고, 예방하거나 감소시키기 위해) 사용될 수도 있다.

실시예 34

이 실시예는 상기 실시예 29에 설명된 연구에 대한 후속 연구를 설명하고, MASP-2 억제제, 예를 들어, MASP-2 항체가 방사선 노출의 치료 및/또는 급성 방사선 증후군의 치료, 개선 또는 예방에 효과적이라는 것을 확인하는 추가의 증거를 제공한다.

근거:

실시예 29에 설명된 초기 연구에서, 마우스에서 항-MASP-2 항체로 조사 전 처리는 6.5 Gy 및 7.0 Gy 노출 수준 둘 다에서 비히클 처리된 조사된 대조군 동물에 비교하여 조사된 마우스의 생존을 증가시킨다는 것이 입증되었다. 6.5 Gy 노출 수준에서, 항-MASP-2 항체로 조사 후 처리는 비히클 대조군 조사된 동물과 비교하여 생존의 미미한 증가를 일으켰다는 것이 실시예 29에서 추가로 입증되었다. 이 실시예는 1차 연구의 결과를 확인하기 위해 수행된 2차 조사 연구를 설명한다.

방법:

연구 A의 설계:

Swiss Webster 마우스 (n=50)를 이온화 방사선 (8.0 Gy)에 노출시켰다. 방사선 노출 전 18시간 및 후 2시간, 및 그 후 매주 투여된, 치사에 대한 항-MASP-2 항체 치료 (mAbH6 5mg/kg)의 효과를 평가하였다.

연구 A의 결과:

도 43에 나타난 바와 같이, 항-MASP-2 항체 mAbH6의 투여가 8.0 Gy에 노출된 마우스의 생존을 증가시키며, 조정된 중간 생존율은 비히클 대조군을 받은 마우스와 비교하여 4일에서 6일로 증가하였고, 치사율은 비히클 대조군을 받은 마우스와 비교하여 12%까지 감소한다는 것이 결정되었다 (로그-랭크 테스트, p=0.040).

연구 B의 설계:

Swiss Webster 마우스 (n=50)는 다음 그룹 (I: 비히클) 식염수 대조군; (II: 낮음) 조사 18시간 전에 및 조사 2시간 후에 투여된 항-MASP-2 항체 mAbH6 (5 mg/kg); (III: 높음) 조사 18시간 전에 및 조사 2시간 후에 투여된 mAbH6 (10 mg/kg); 및 (IV: 높음 이후) 조사 후 2시간에만 투여된 mAbH6 (10mg/kg)에 이온화 방사선 (8.0 Gy)이 노출되었다.

연구 B의 결과:

조사 전 및 후에 항-MASP-2 항체의 투여는 평균 생존을 비히클 대조군을 받은 동물과 비교하여 4일에서 5일로 조정하였다. 항-MASP-2 항체-처리된 마우스의 치사율은 비히클 대조군 마우스와 비교하여 6-12%까지 감소되었다. 큰 해로운 처리 효과가 관찰되지 않았다는 것을 추가로 지적하였다 (데이터 미도시).

요약하면, 이 실시예에 나타난 결과는 실시예 29에 나타난 결과와 일치하고 항-MASP-2 항체는 급성 방사선 증후군의 부작용에 걸릴 위험이 있거나, 이로 고통받는 포유동물 대상체를 치료하는데 있어서 효과적이라는 것을 추

가로 입증한다.

[0956] 실시예 35

[0957] 이 연구는 LPS (지질다당류)-유발된 혈전증의 마우스 모델에서 MASP-2-결핍의 효과를 조사한다.

[0958] 근거:

[0959] 시가 독소를 생산하는 이. 콜리 감염에 의해 유발된, 용혈성 요독성 증후군 (HUS)은 아이의 급성 신부전의 주요 원인이다. 이 실시예에서, LPS-유발된 혈전증 (미세혈관 응고)의 슈바르츠만 모델을 MASP-2 억제제 혈관 내 트롬빈의 형성을 억제하거나 예방하는데 효과적인지 결정하기 위해 MASP-2-/- (KO) 마우스에서 수행하였다.

[0960] 방법:

[0961] MASP-2-/- (n=9) 및 WT (n=10) 마우스를 LPS-유발된 혈전증 (미세혈관 응고)의 슈바르츠만 모델에서 분석하였다. 마우스에 Serratia LPS를 투여하였고 혈전 형성을 시간이 흐름에 따라 관찰하였다. 미스트롬빈 및 LPS-유발된 미세혈관 응고의 발생율의 비교를 수행하였다.

[0962] 결과:

[0963] 특히, 테스트된 MASP-2 -/- 마우스 모두 (9/9)는 Serratia LPS 투여 후 혈관 내 혈전을 형성하지 않았다. 반대로, 유사하게 테스트된 WT 마우스의 10마리 중 7마리에서 미세혈전이 검출되지 않았다 (p=0.0031, 피셔의 정확 검정). 도 44에 나타난 바와 같이, LPS 감염 후 미세혈관 폐색이 시작하는 시간을 MASP-2-/- 및 WT 마우스에서 측정하였으며, 혈전 형성을 가진 WT 마우스의 퍼센트를 60분 동안 측정하였고, 혈전형성은 이른 시간인 약 15분에 검출되었다. WT 마우스 중 최대 80%는 60분에 혈전 형성을 입증하였다. 반대로, 도 44에 나타난 바와 같이, MASP-2 -/- 중 아무것도 60분에 혈전 형성이 생기지 않았다. (로그 랭크: p=0.0005).

[0964] 이들 결과는 HUS 모델에서 MASP-2 억제제 혈관 내 혈전의 발달에 대하여 보호한다는 것을 입증한다.

[0965] 실시예 36

[0966] 이 실시예는 HUS의 마우스 모델에서 정제된 시가 독소 2 (STX2) 플러스 LPS의 복강 내 동시 투여를 사용하여 항-MASP-2 항체의 효과를 설명한다.

[0967] 배경:

[0968] HUS의 마우스 모델을 정제된 시가 독소 2 (STX2) 플러스 LPS의 복강 내 동시 투여를 사용하여 개발하였다. 마우스 신장의 생화학적 및 마이크로레이 분석은 TX2 플러스 LPS 시도를 다른 약제 단독의 효과와는 다른 것으로 나타났다. 이들 마우스의 혈액 및 혈청 분석은 호중구증가증, 혈소판감소증, 적혈구 용혈, 및 증가된 혈청 크레아티닌 및 혈액 요소 질소를 나타냈다. 또한, 마우스 신장의 조직학적 분석 및 전자 현미경은 사구체 피브린 침착, 적혈구 충혈, 미세혈전 형성, 및 사구체 초미세구조 변화를 입증하였다. HUS의 이 모델은 C57bL/6 마우스에서 사람 질환을 한정하는 혈소판감소증, 용혈성 빈혈증, 및 신부전을 포함하는, 사람 HUS 병리학의 모든 임상적 증상을 유발하는 것이 확립되었다 (J. Immunol 187(1):172-80 (2011)).

[0969] 방법:

[0970] 18 내지 20 g 중량의 C57bL/6 암컷 마우스를 Charles River Laboratories로부터 구입하였고 2개의 그룹으로 나누었다 (각 그룹 당 5마리의 마우스). 한 그룹의 마우스는 150 μ l의 총량으로 희석된 재조합 항-MASP-2 항체 mAbM11 (마우스 당 100 μ g; 5 mg/kg 체중의 최종 농도에 해당함)의 복강 내 (복강 내) 주사로 사전 처리되었다. 대조군 그룹은 어떤 항체도 없이 식염수를 받았다. 항-MASP-2 항체 mAbM11의 복강 내 주사 6시간 후, 모든 마우스는 150 μ l의 총 부피에서 세라티아 마르세센스 (Serratia marcescens)의 LPS (L6136; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)의 반치사 용량 (3 μ g/동물; 150 μ g/kg 체중에 해당함) 및 STX2 (LD50 용량의 두 배)의 4.5 ng/동물 (225 ng/kg에 해당함)의 용량의 결합된 복강 내 주사를 받았다. 식염수 주사를 대조군에 사용하였다.

[0971] 마우스의 생존을 투여 후 6시간 마다 관찰하였다. 마우스는 그것들이 HUS 병리학의 혼수 단계에 도달할 때까지 도태되었다. 36시간 후, 모든 마우스가 도태되었고 두 개의 신장을 면역조직화학법을 위해 제거하였고 스캐닝 전자 현미경을 스캔하였다. 혈액 샘플을 심장 천자에 의해 실험의 끝에 채취하였다. 혈청을 분리하였고 치료된 및 대조군 그룹 둘 다의 BUN 및 혈청 크레아티닌 수준을 측정하기 위해 -80 °C에 얼려두었다.

[0972] **면역조직화학법**

[0973] 각 마우스 신장의 3분의 1을 4% 파라포름알데히드에서 24시간 동안 고정하였고, 가공하였고, 파라핀에 임베딩하였다. 3 마이크론 두께의 절편을 잘랐고 H & E 염색으로 이후의 염색을 위해 전하를 띤 슬라이드에 배치하였다.

[0974] **전자현미경**

[0975] 신장의 중간 절편을 대략 1 내지 2 mm³의 블록으로 잘랐고, 4 °C에서 하룻밤 동안 1x PBS 중 2.5% 글루타르알데히드에서 고정하였다. 고정된 조직을 이후에 University of Leicester Electron Microscopy Facility에 의해 가공하였다.

[0976] **동결 절편**

[0977] 신장의 다른 3분의 1을 대략 1 내지 2 mm³의 블록으로 잘랐고 스냅 (snap)을 액체 질소에서 동결하였고 동결 절편 및 mRNA 분석을 위해 -80 °C에서 유지하였다.

[0978] **결과:**

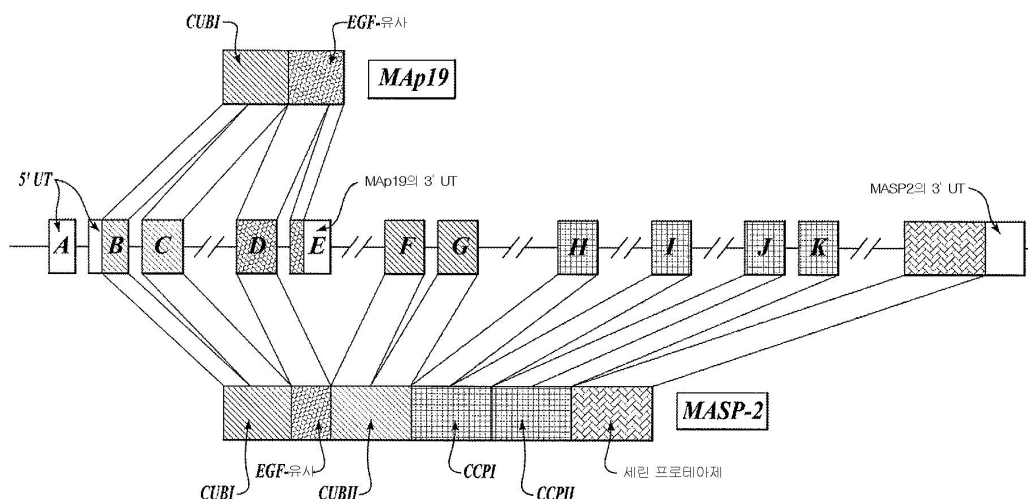
[0979] 도 45는 STX/LPS-유발된 모델에서 시간 (시간)의 흐름에 따라 식염수-처리된 대조군 마우스 (n=5) 및 항-MASP-2 항체-처리된 마우스 (n=5)의 퍼센트 생존율을 그래프로 설명한다. 특히, 도 45에 나타난 바와 같이, 대조군 마우스 모두는 42시간 내에 죽었다. 현저히 다르게, 항-MASP-2 항체-처리된 마우스의 100%는 실험의 시간 과정 동안 생존하였다. 3h 45에 나타난 결과와 일치하게, 죽거나 중증 질환의 징후로 도태된, 모든 처리되지 않은 마우스는 상당한 사구체 손상을 갖는 한편, 모든 항-MASP-2-처리된 마우스의 사구체는 정상적인 것으로 보이는 것으로 관찰되었다 (데이터 미도시). 이들 결과는 MASP-2 억제제, 예를 들어, 항-MASP-2 항체는 혈전성 미소혈관종 (TMA), 예를 들어, 용혈성 요독성 증후군 (HUS), 부정형 HUS (aHUS), 또는 혈전성 혈소판감소성 자반병 (TTP)으로 고통받거나 이에 걸릴 위험이 있는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수도 있다.

[0980] 도식적인 구체예가 도시되고 설명되는 한편, 다양한 변화는 본 발명의 사상 및 범위에서 벗어나지 않은 범위 내에서 이루어질 수 있다는 것으로 인정될 것이다.

부호의 설명

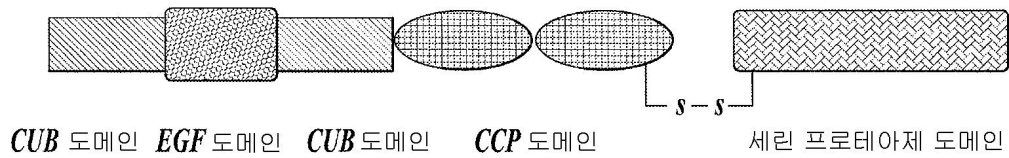
도면

도면1



도면2a

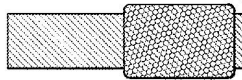
Clr/Cl_s/MASP-1/MASP-2/MASP-3



도면2b

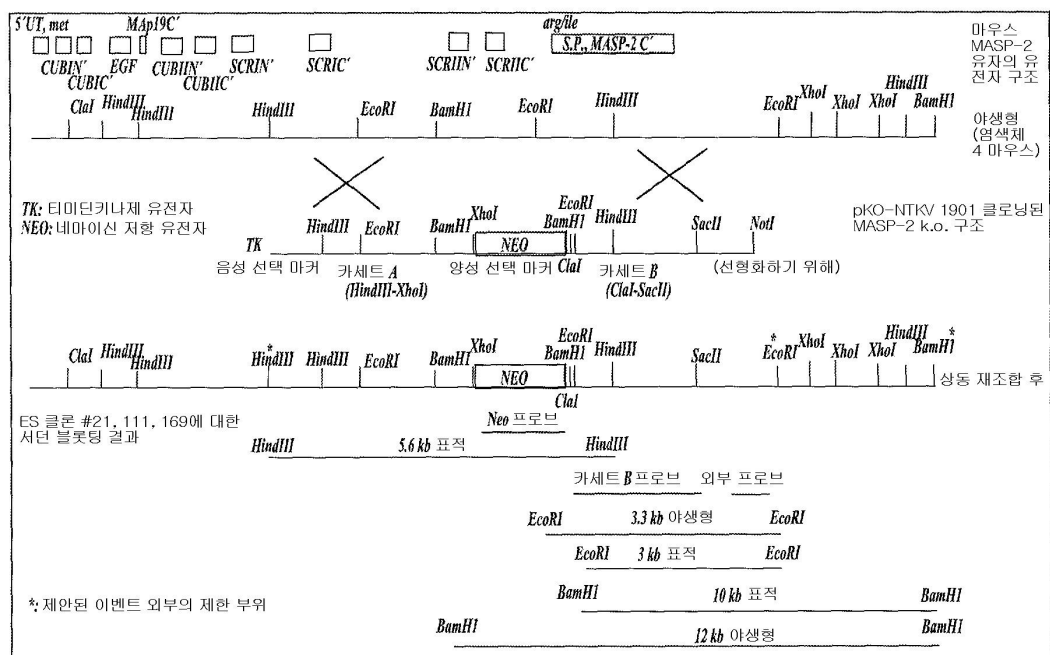
MAp19

EQSL

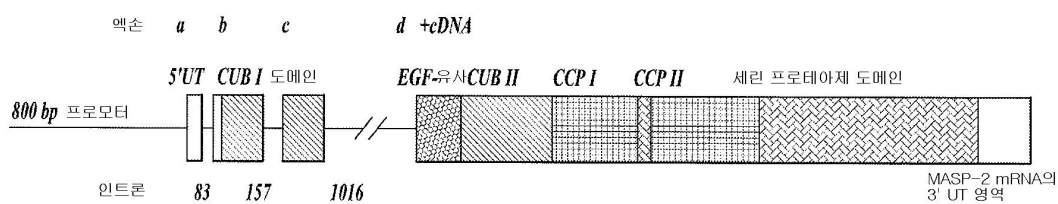


CUB 도메인 *EGF* 도메인

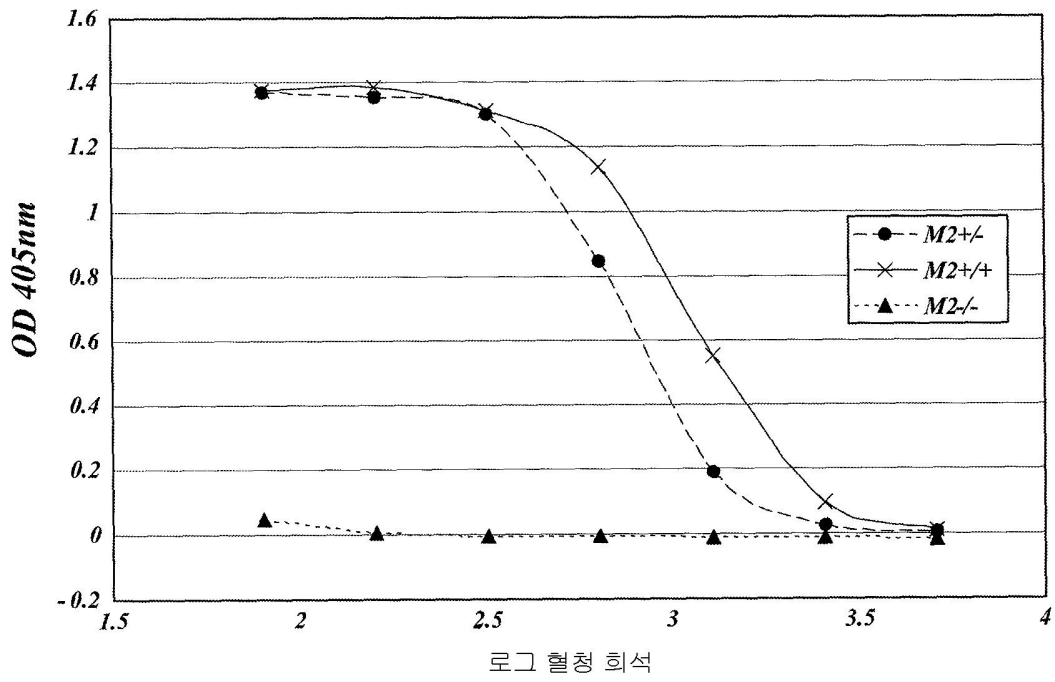
도면3



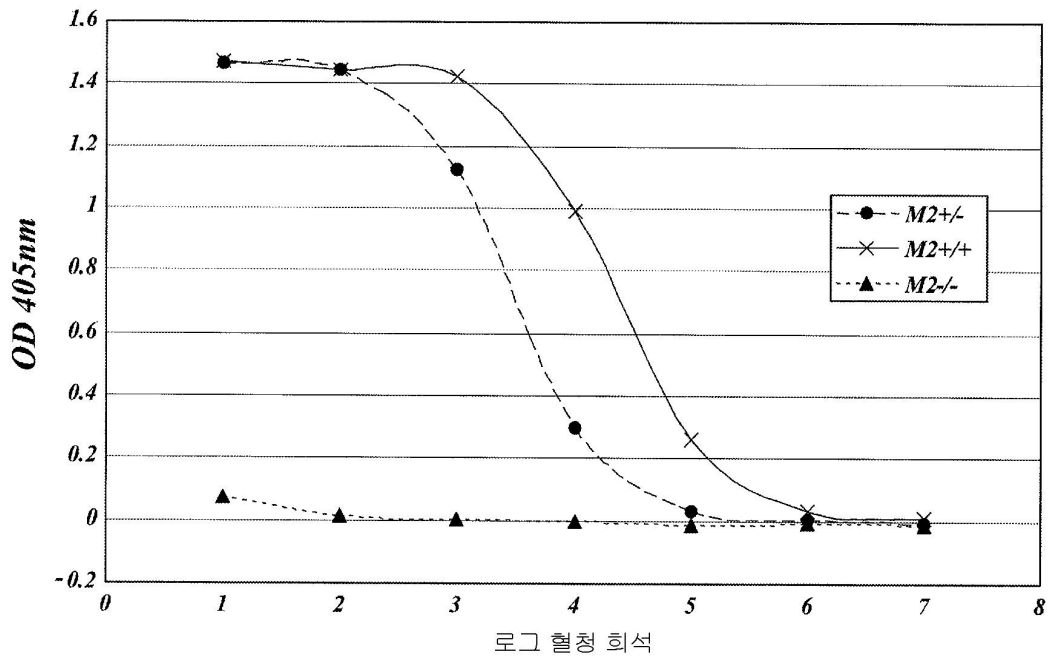
도면4



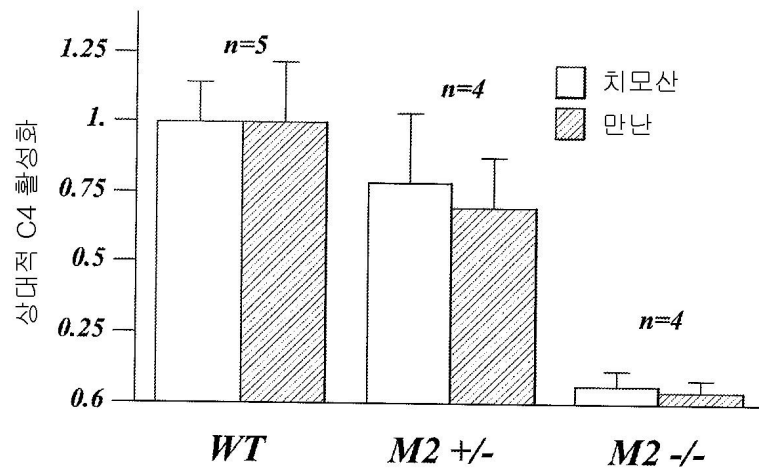
도면5a



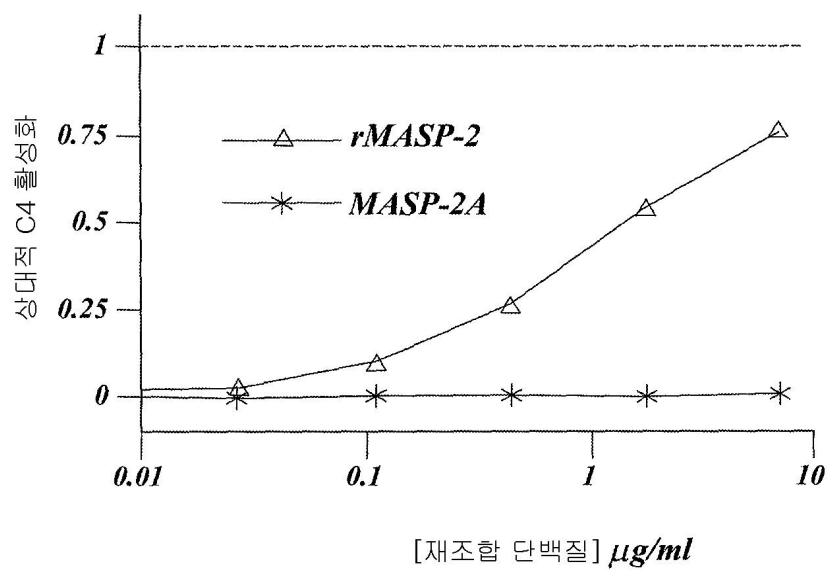
도면5b



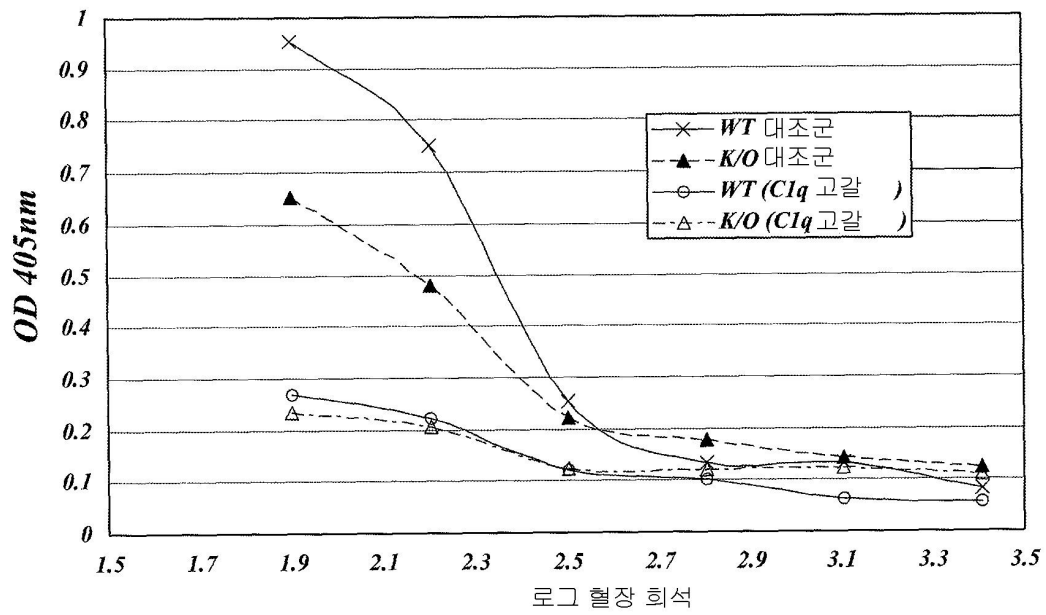
도면5c



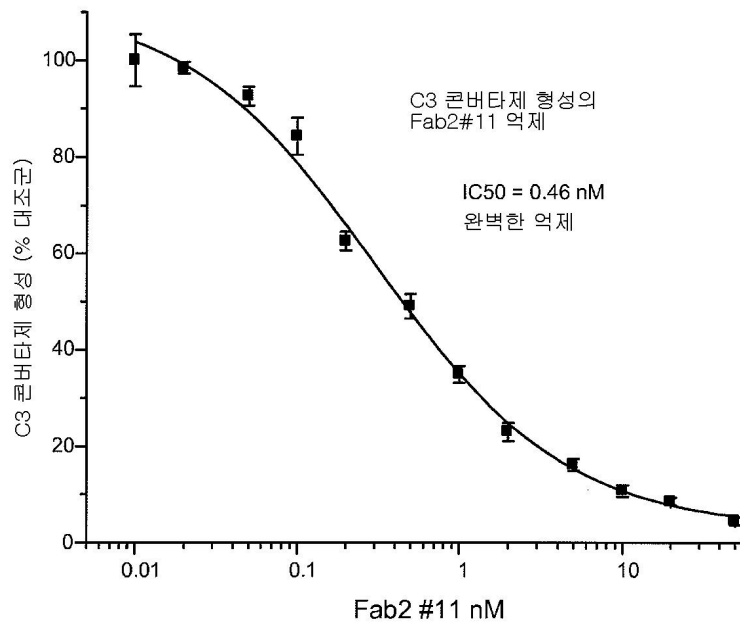
도면6



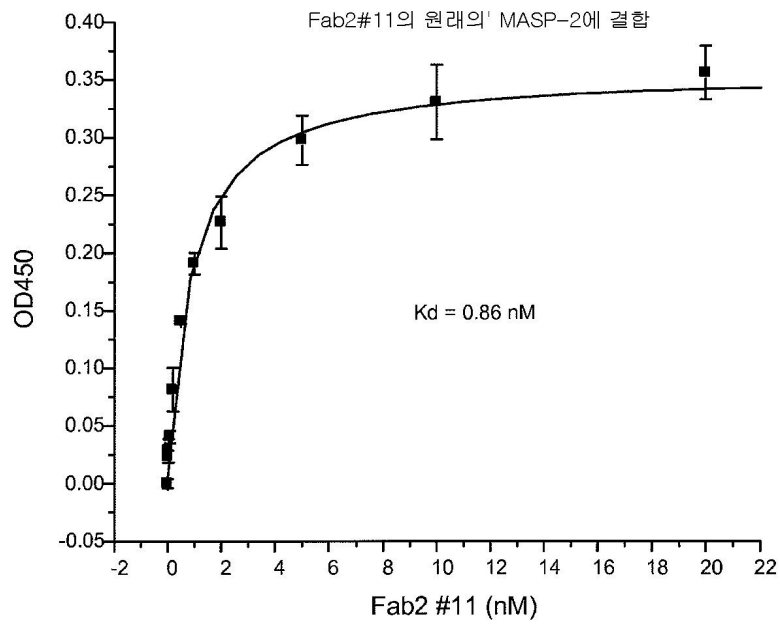
도면7



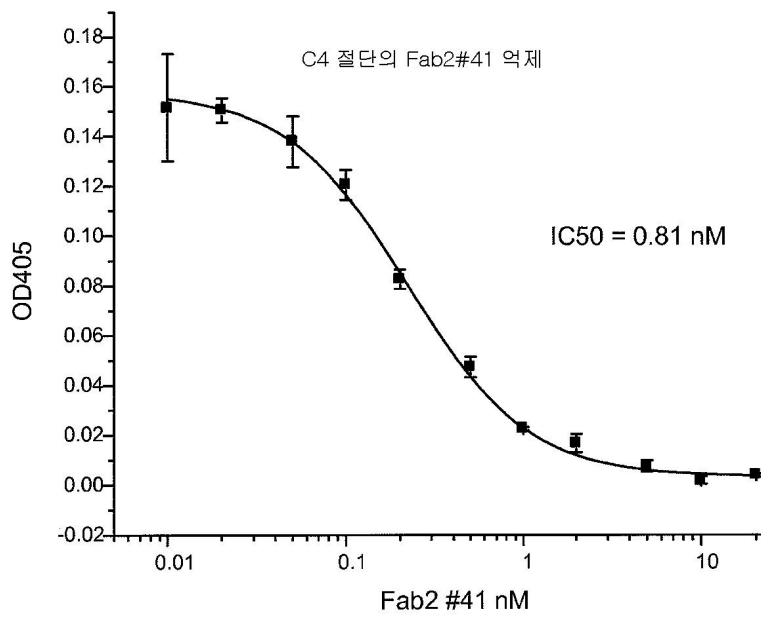
도면8a



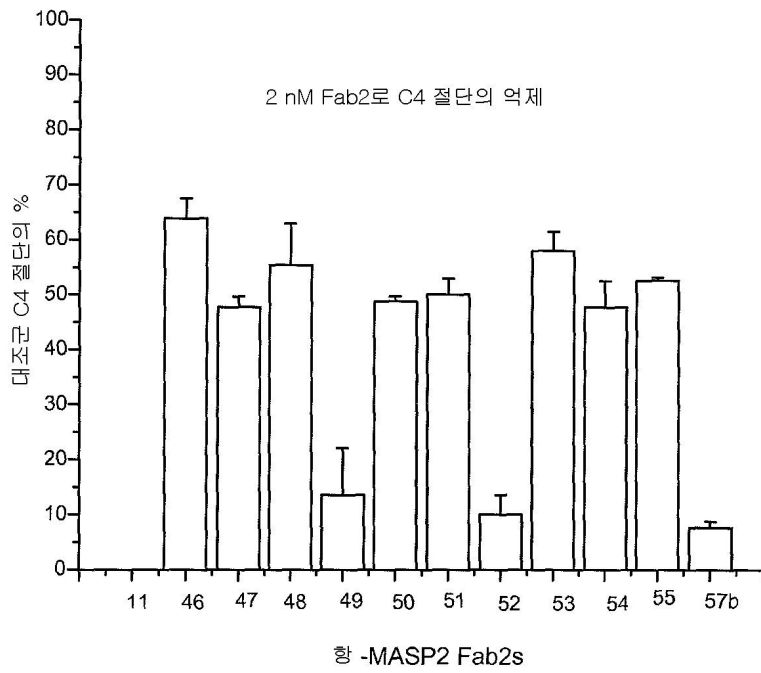
도면8b



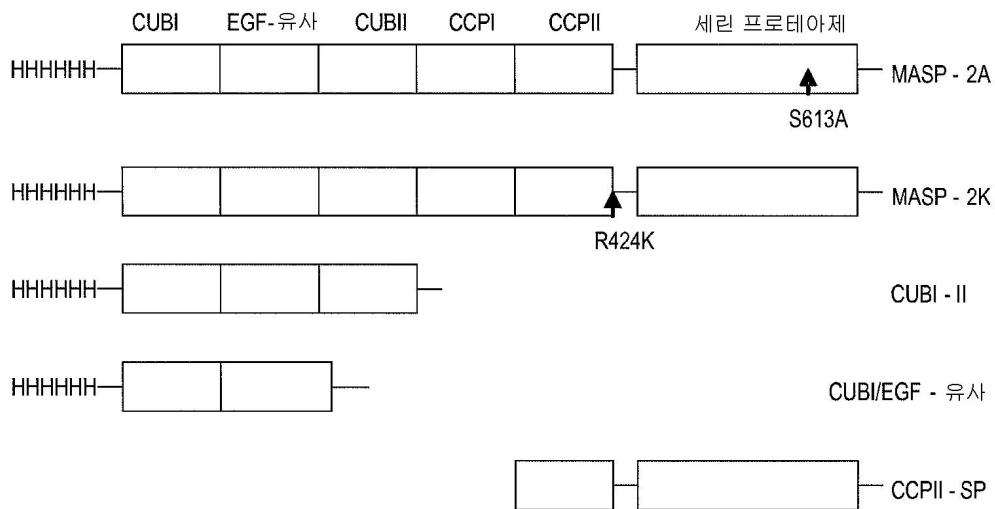
도면8c



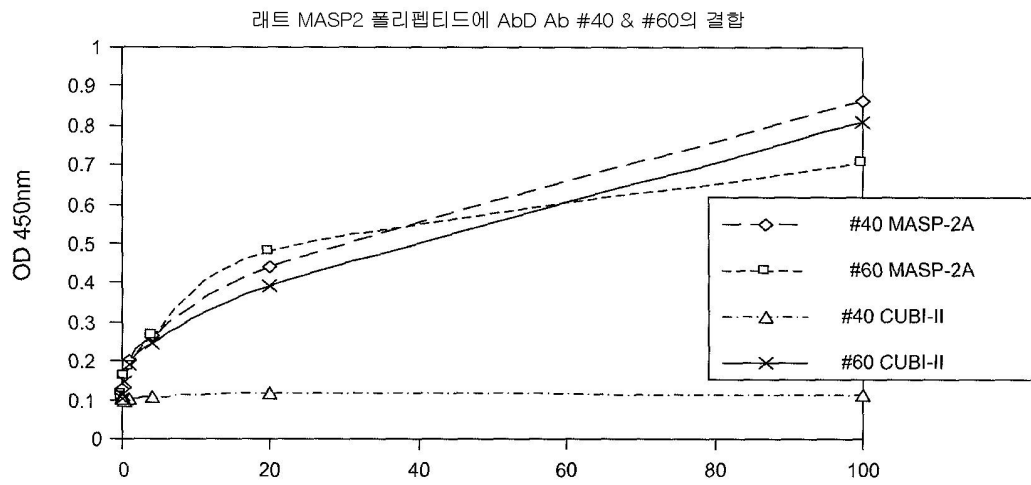
도면9



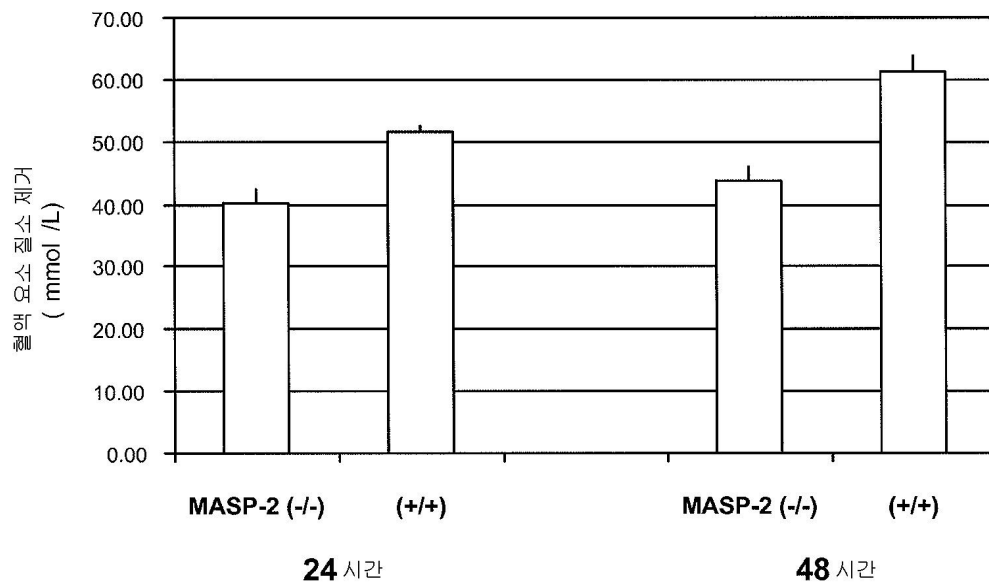
도면10



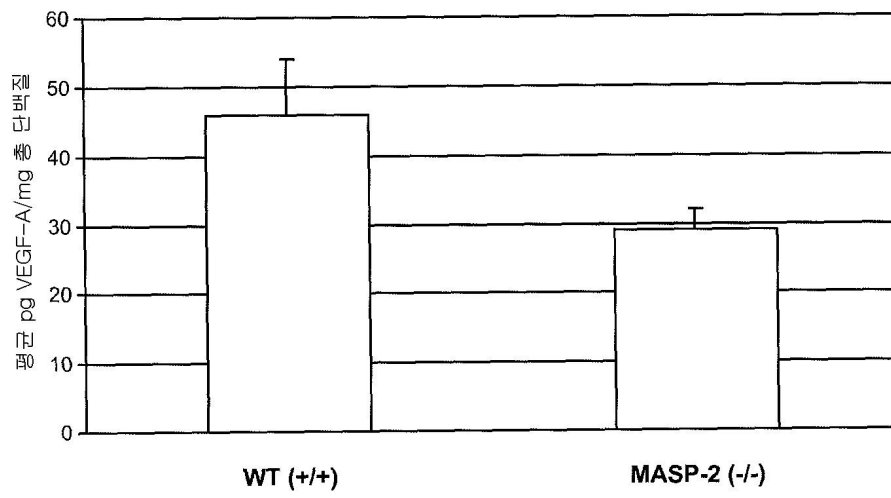
도면11



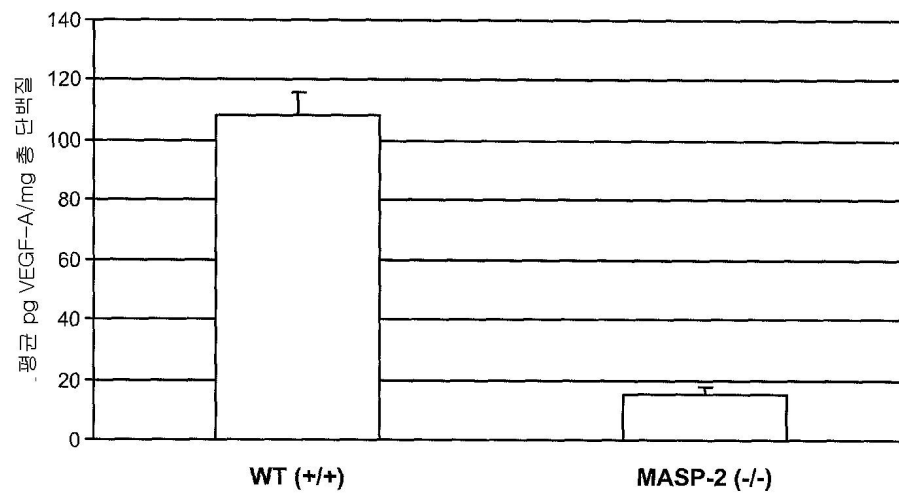
도면12



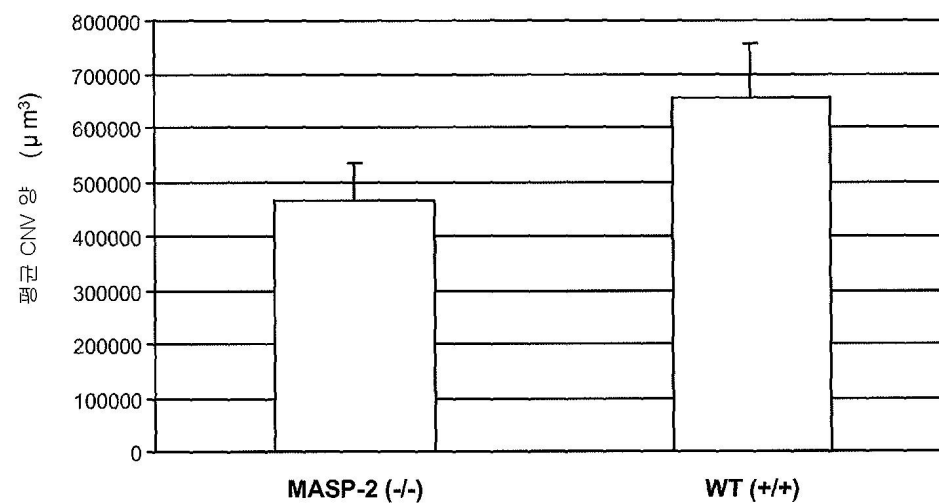
도면13a



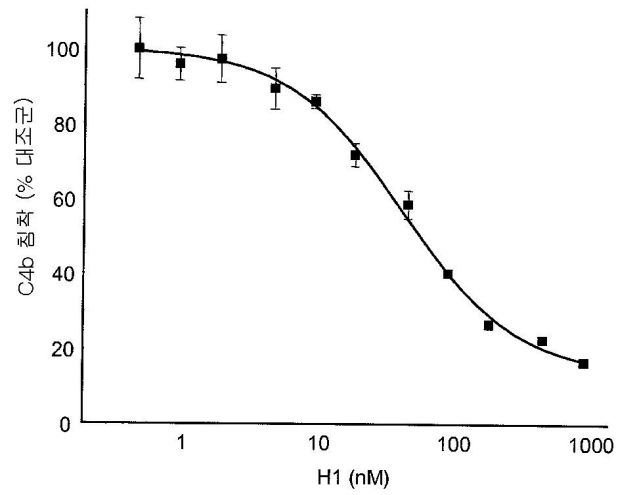
도면13b



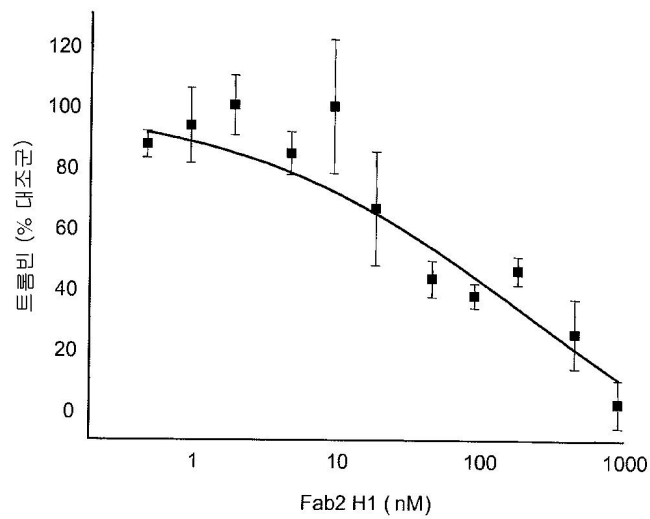
도면14



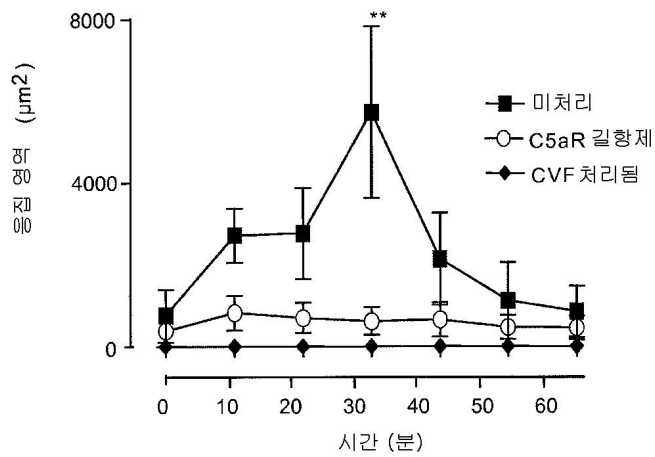
도면15a



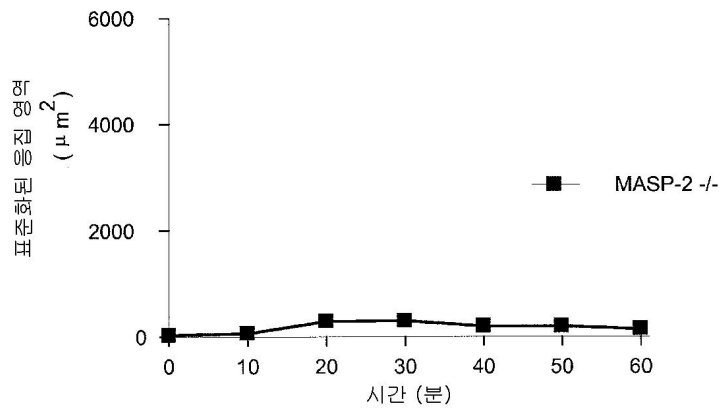
도면15b



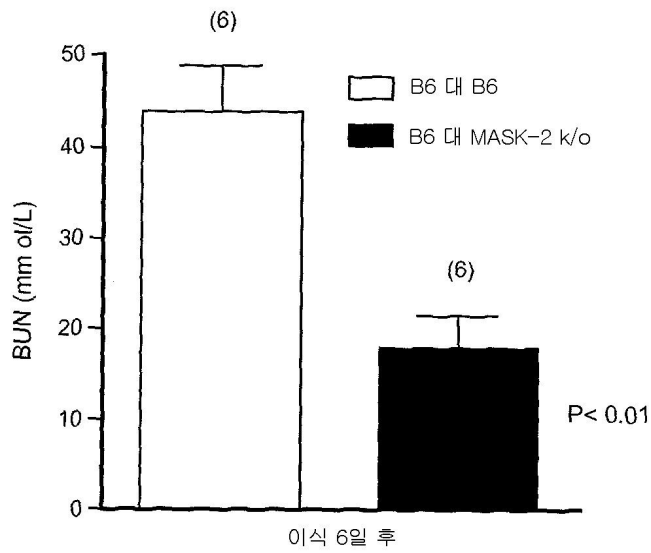
도면16a



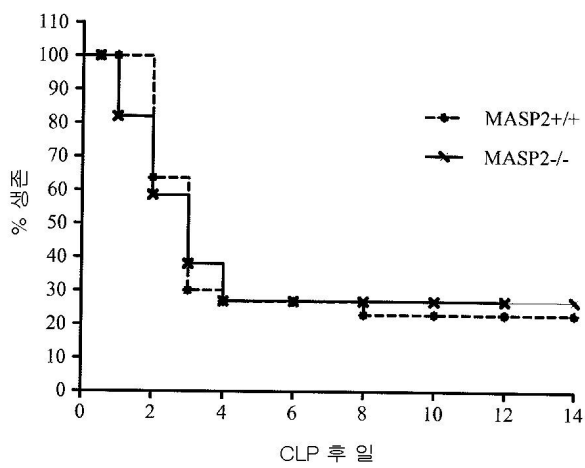
도면16b



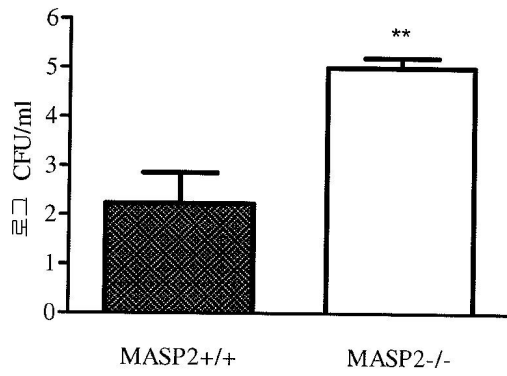
도면17



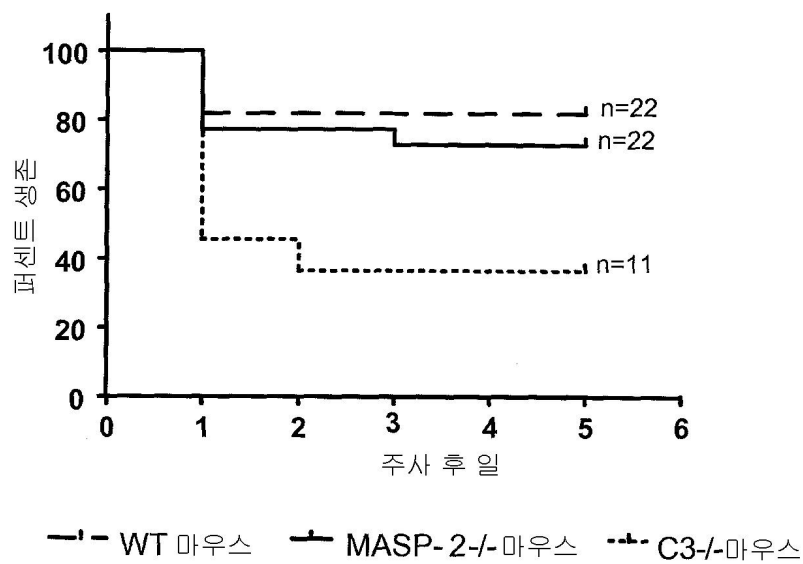
도면18



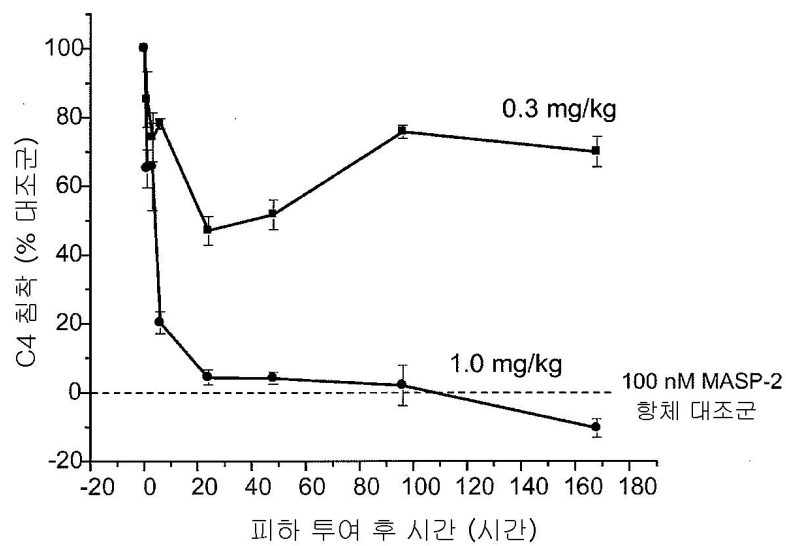
도면19



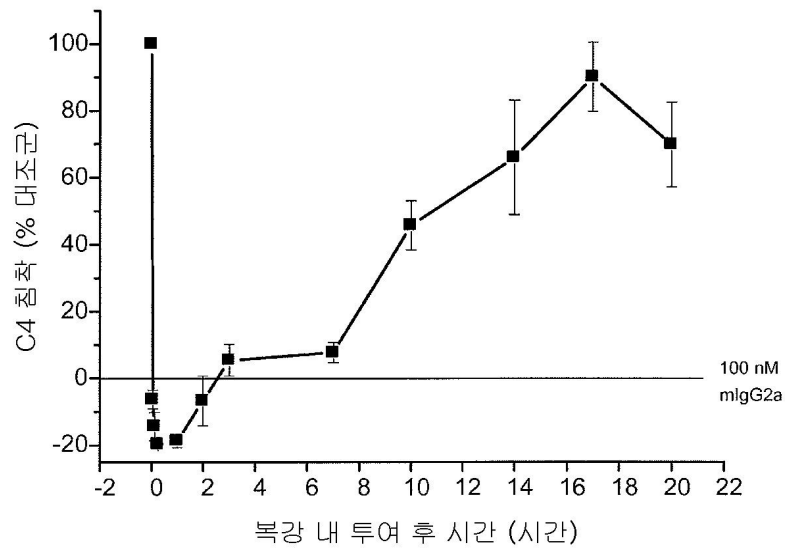
도면20



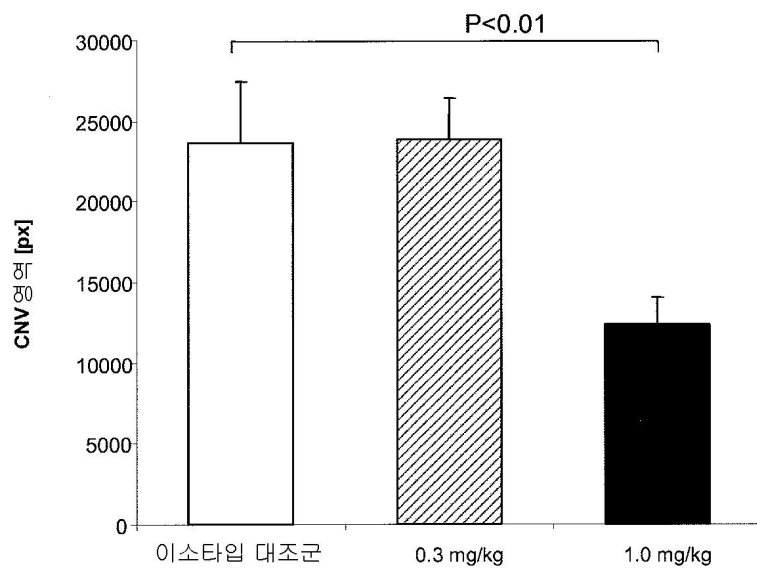
도면21



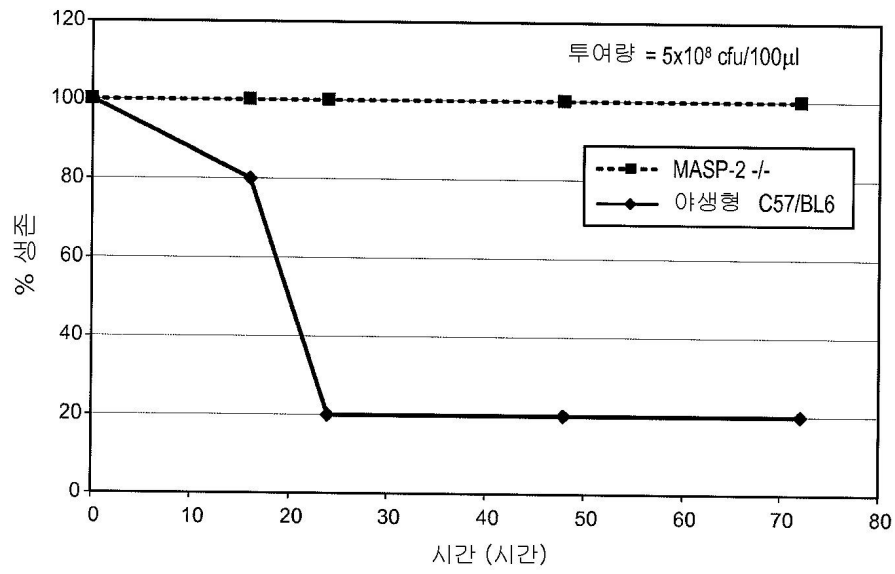
도면22



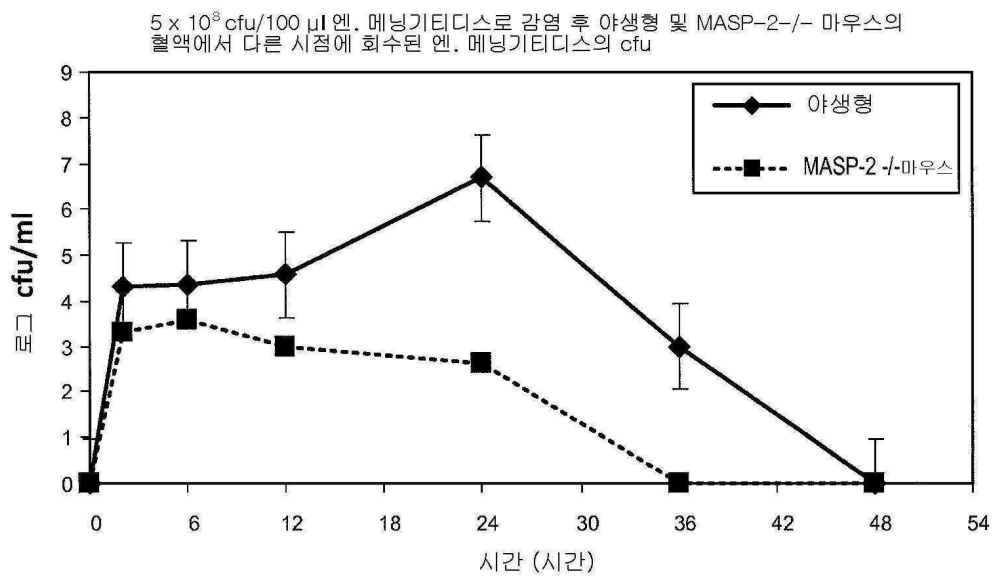
도면23



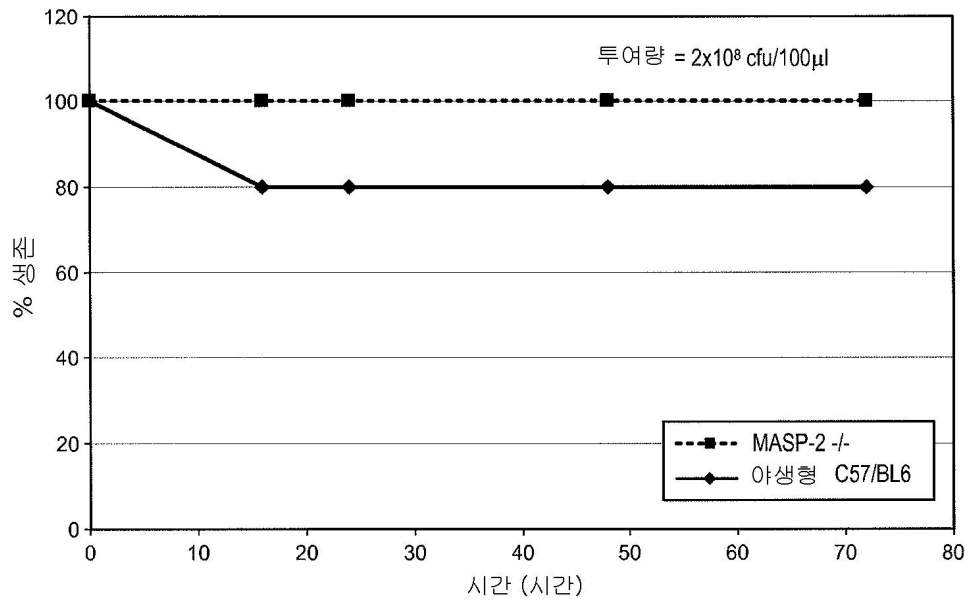
도면24a



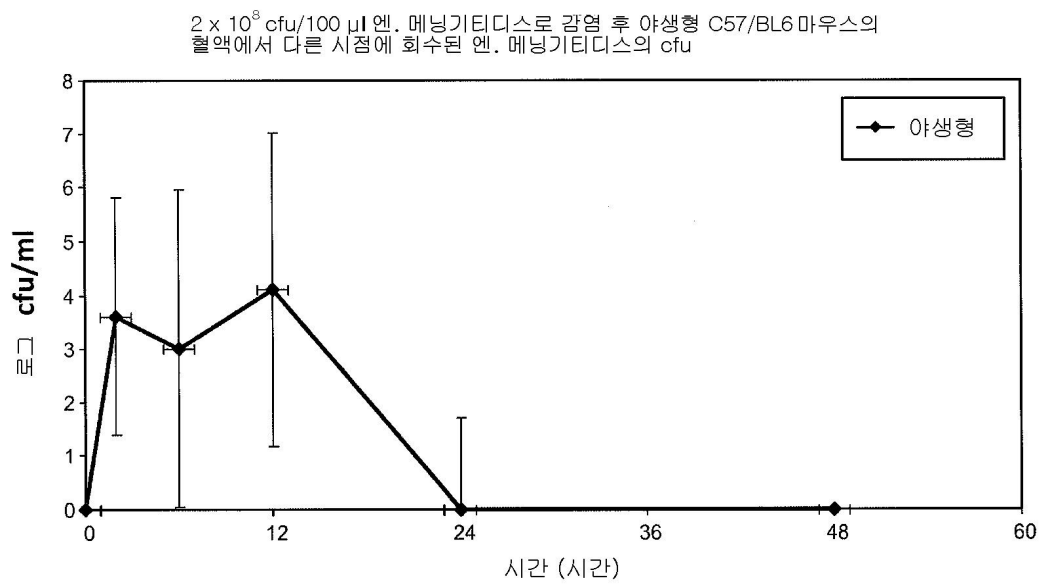
도면24b



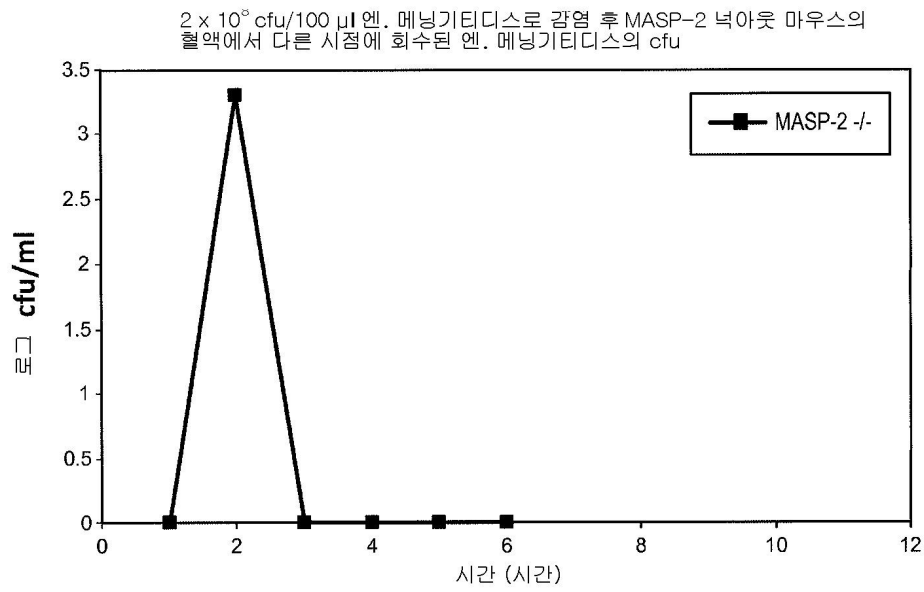
도면25a



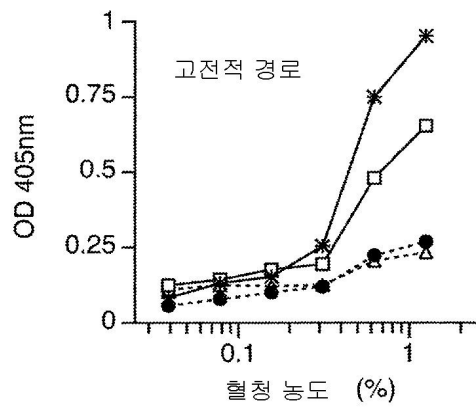
도면25b



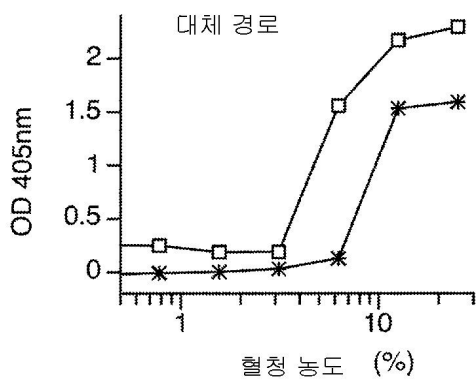
도면25c



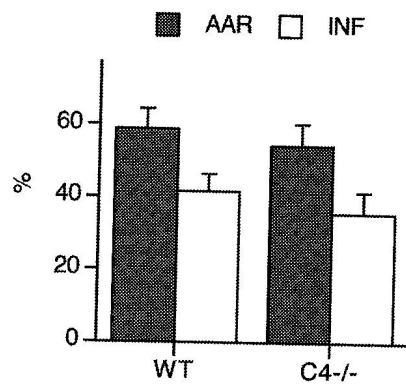
도면26a



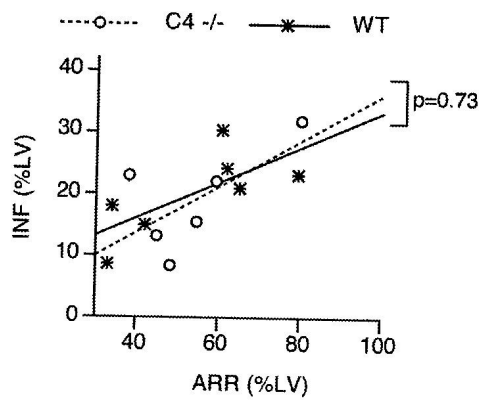
도면26b



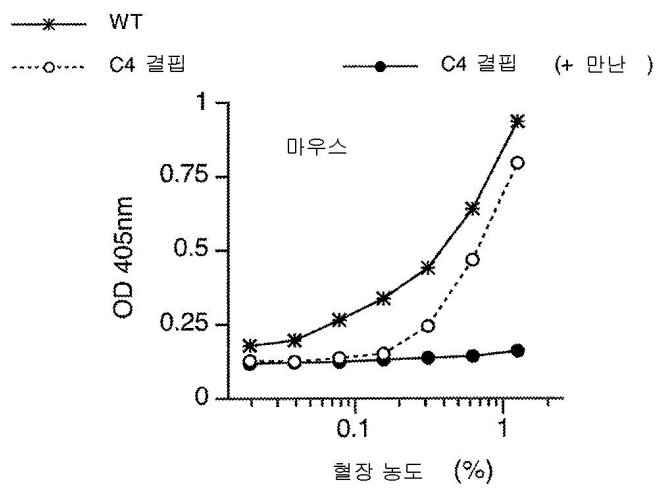
도면27a



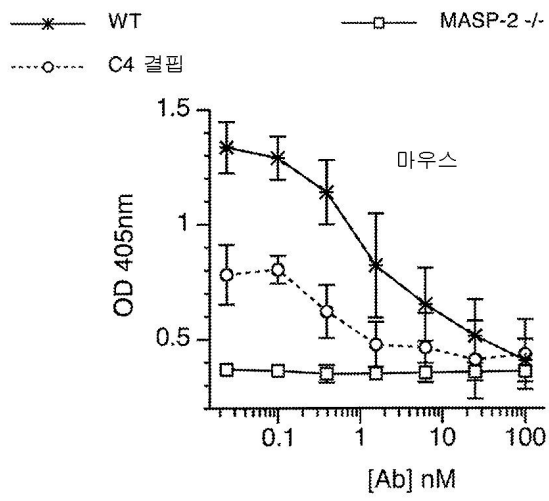
도면27b



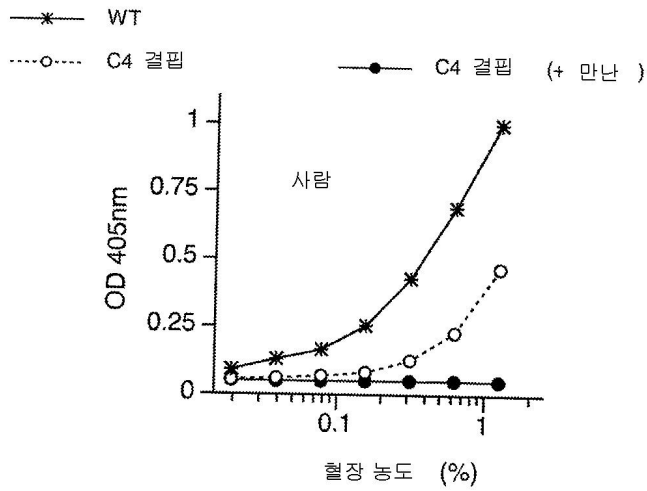
도면28a



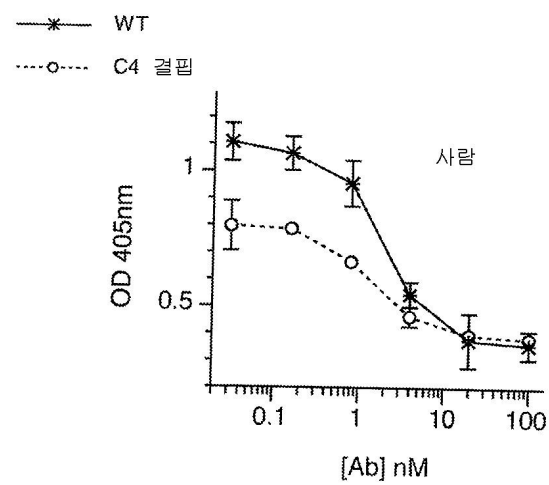
도면28b



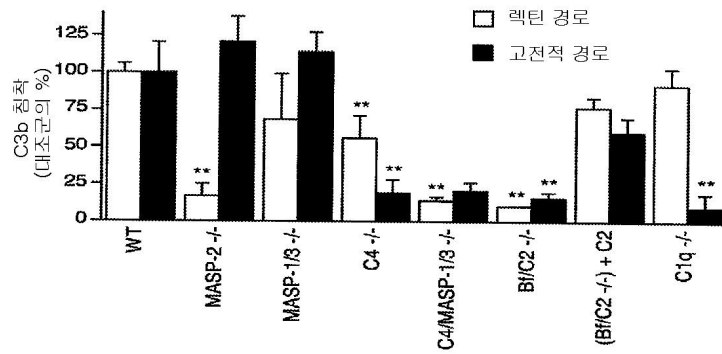
도면28c



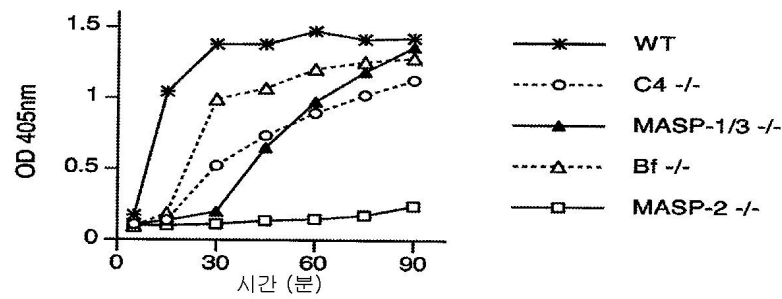
도면28d



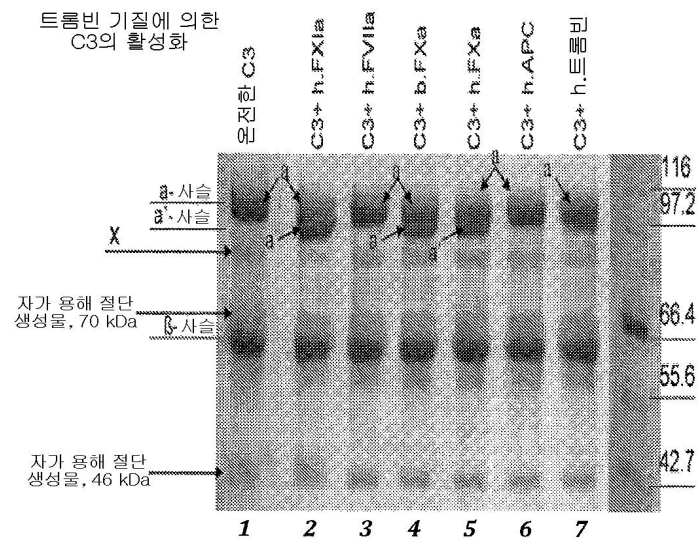
도면29a



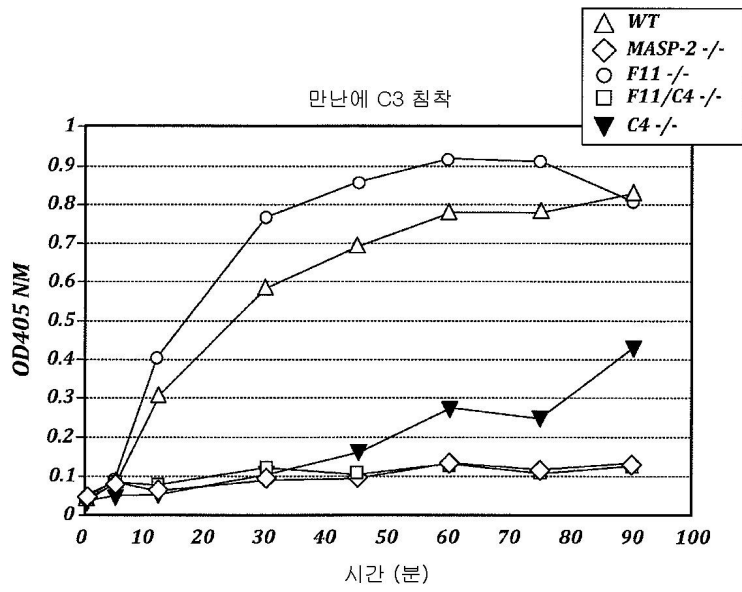
도면29b



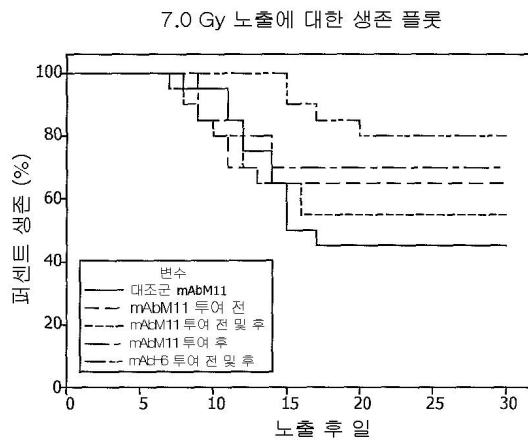
도면30



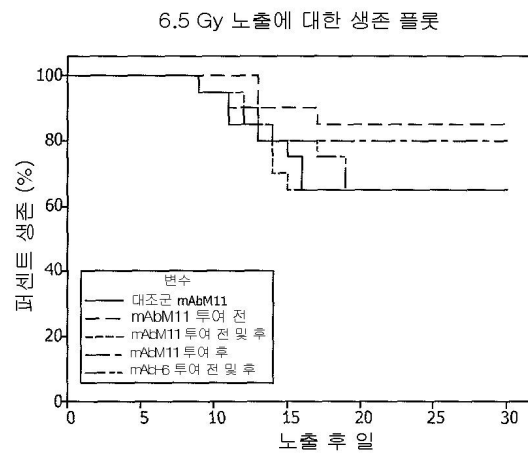
도면31



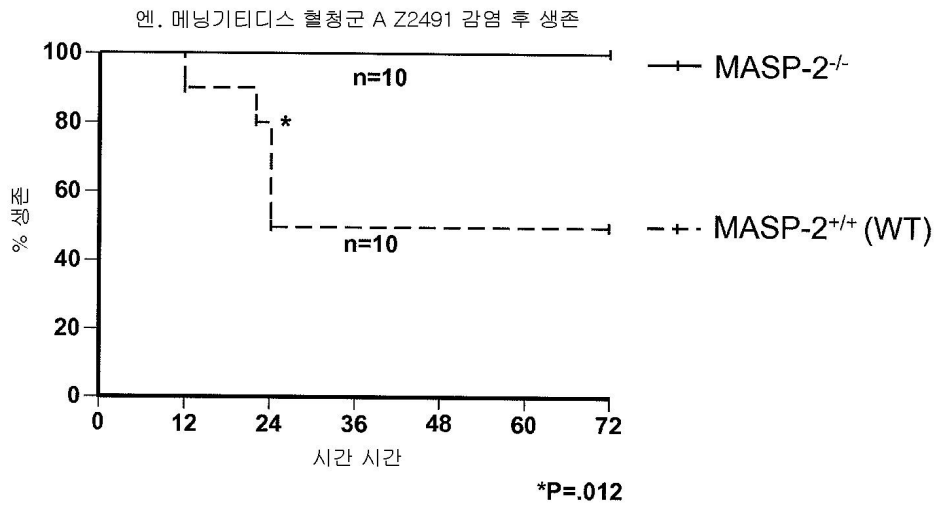
도면32a



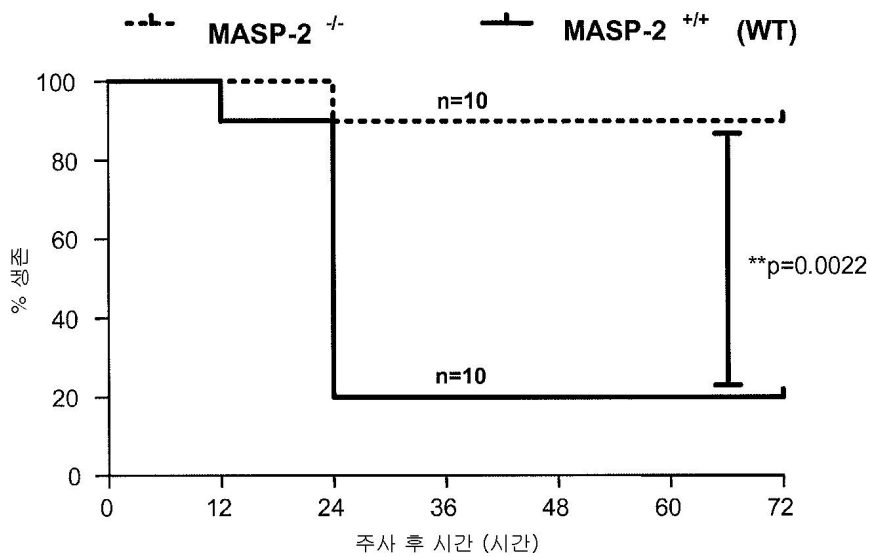
도면32b



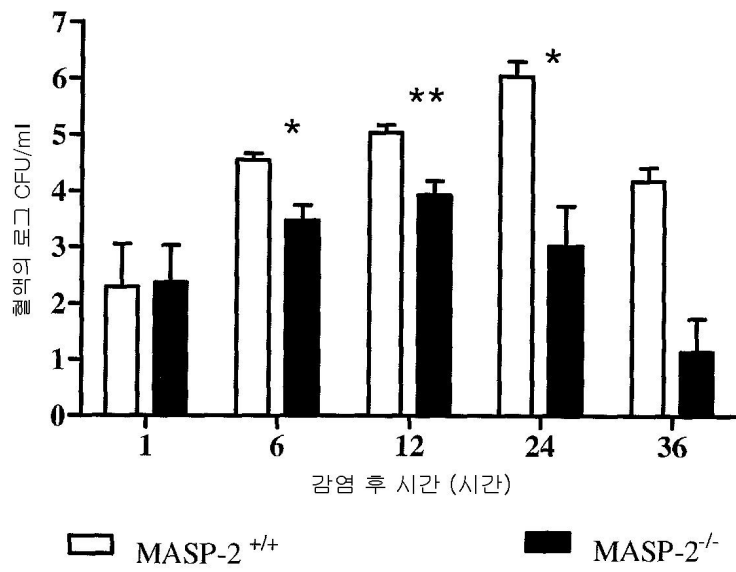
도면33



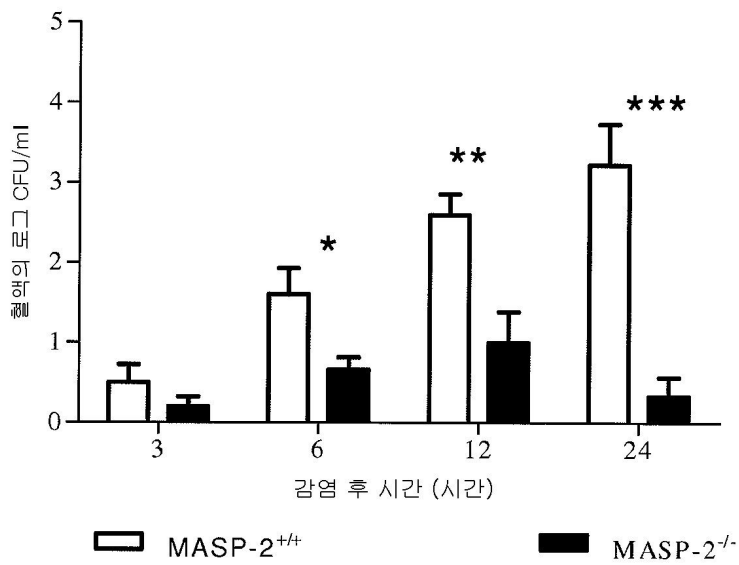
도면34



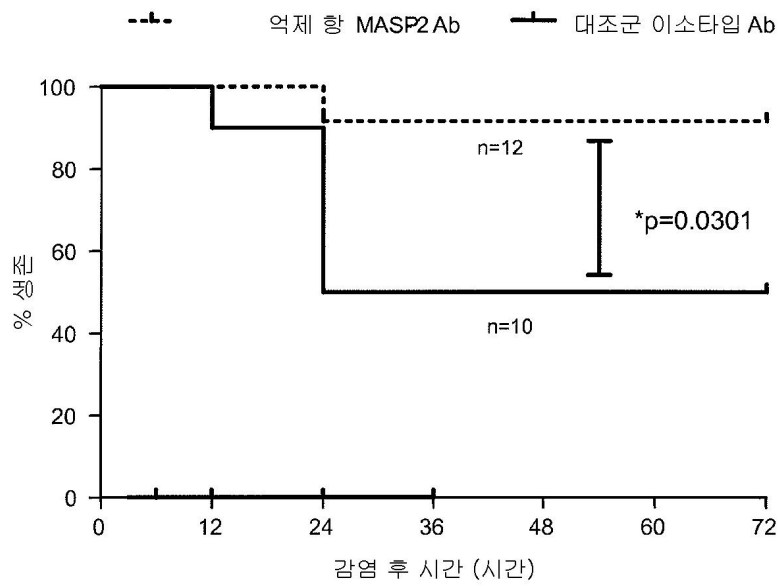
도면35



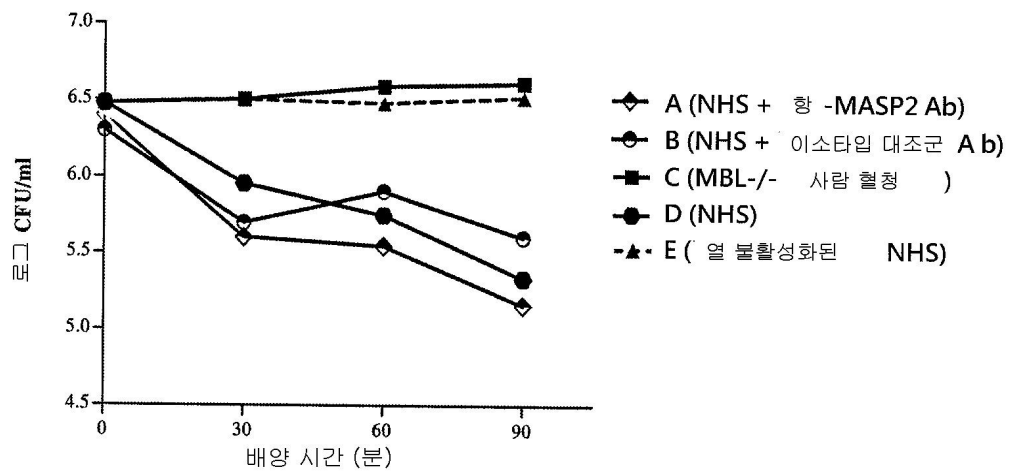
도면36



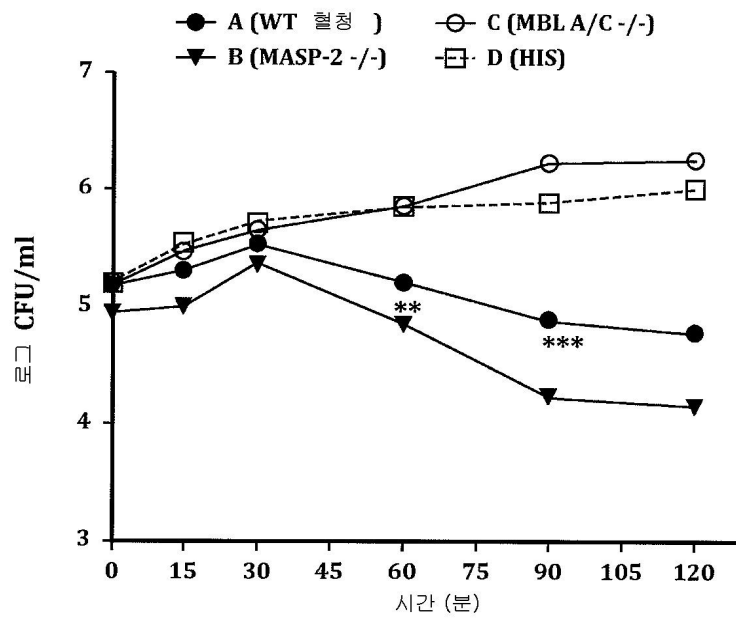
도면37



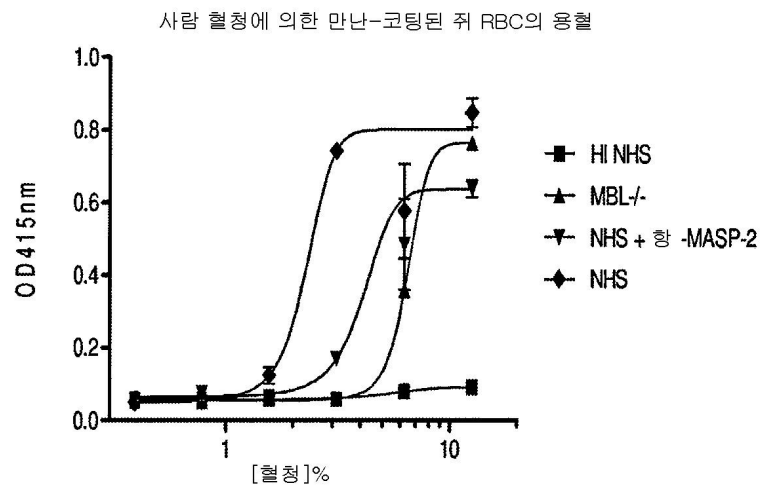
도면38



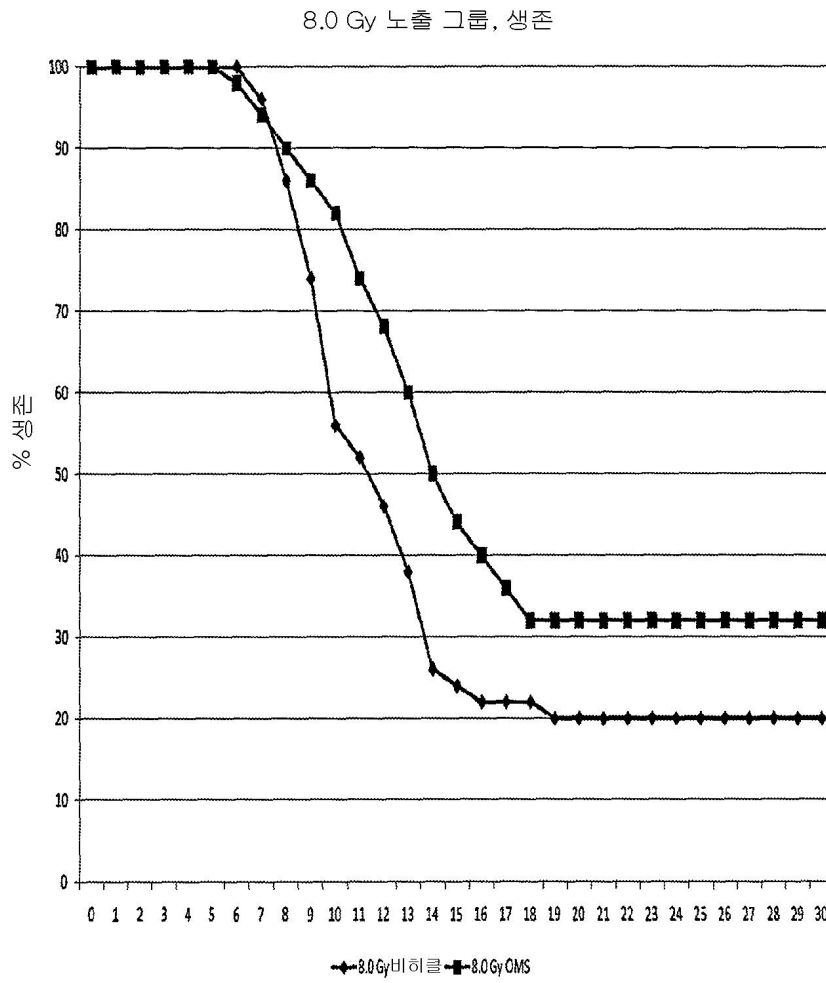
도면39



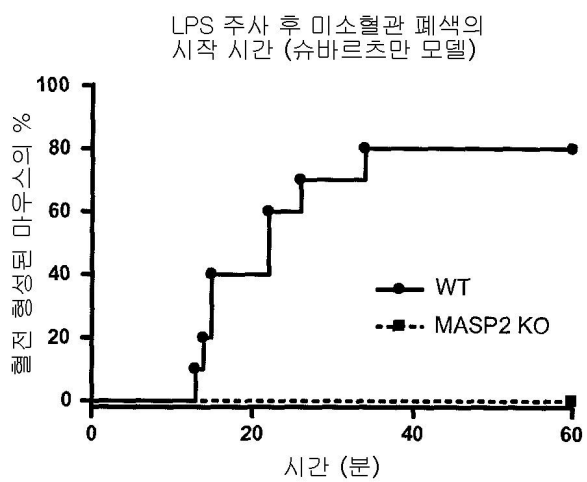
도면40



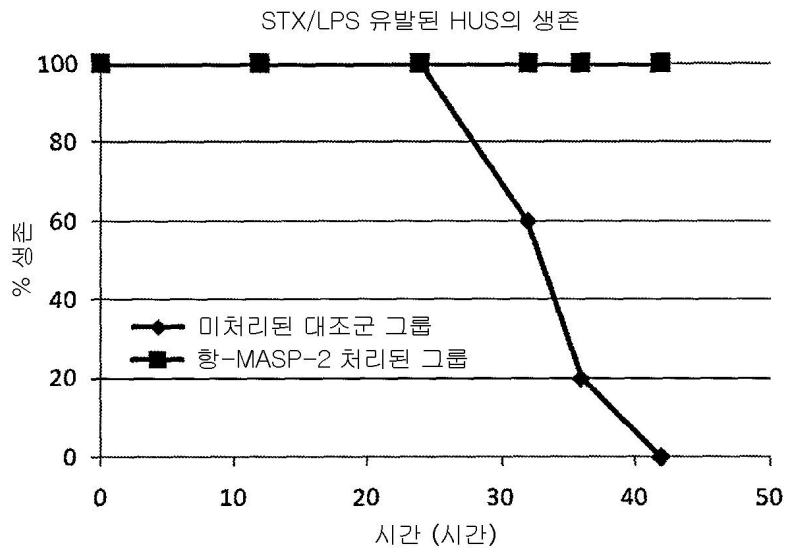
도면43



도면44



도면45



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Demopoulos, G.A.
 Dudler, T.
 Schwaebble, H.-W.
- <120> METHODS FOR TREATING CONDITIONS ASSOCIATED WITH MASP-2 DEPENDENT
 COMPLEMENT ACTIVATION
- <130> MP.1.0126.PCT
- <140> PCT/US2012/032650
- <141> 2012-04-06
- <150> US 61/473,698
- <151> 2011-04-08
- <160> 65
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 725
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <220><221> CDS
- <222> (27)..(584)
- <400> 1

ggccaggcca gctggacggg cacacc atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt 53

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu

1 5

ctg tgt ggc tgc gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct 101

Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro

10 15 20 25

gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat 149

Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn

30 35 40

gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg 197

Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu

45 50 55

cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag 245

Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu

60 65 70

tac gac ttc gtc aag ctg agc tgc ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg 293

Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu

75 80 85

tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act 341

Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr

90 95 100 105

ttc tac tgc ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac 389

Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr

110 115 120

tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag 437

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu

125 130 135

gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac 485

Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp

140 145 150

cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca 533
His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala
155 160 165

ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc ctc 581
Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
170 175 180 185

tag cctccctg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc 634
tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggtgtgcc ccaactccca ttcacccacc 694
atggacccaa taataaacct ggccccaccc c 725

<210> 2
<211> 185
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
1 5 10 15
Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
20 25 30

Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
35 40 45
Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
50 55 60
Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
65 70 75 80
Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
85 90 95

Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
100 105 110
Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
130 135 140

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

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

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
180 185

<210> 3

<211> 170

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu

165

170

<210> 4

<211> 2460

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (22)..(2082)

<400> 4

ggccagctgg acgggcacac c atg agg ctg ctg acc ctc ctg ggc ctt ctg 51

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu

1 5 10

tgt ggc tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct gtg 99

Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val

15

20

25

ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat gac 147

Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp

30

35

40

cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg cgc 195

Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg

45

50

55

ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag tac 243

Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr

60

65

70

gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc 291

Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys

75

80

85

90

ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc 339

Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe

95

100

105

tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc 387

Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser

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

270	275	280	
tca gga gac cac aca ggc tgg aag atc cac tac acg agc aca gcg cag			915
Ser Gly Asp His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln			
285	290	295	
cct tgc cct tat ccg atg gcg cca cct aat ggc cac gtt tca cct gtg			963
Pro Cys Pro Tyr Pro Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val			
300	305	310	
caa gcc aaa tac atc ctg aaa gac agc ttc tcc atc ttt tgc gag act			1011
Gln Ala Lys Tyr Ile Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr			
315	320	325	330
ggc tat gag ctt ctg caa ggt cac ttg ccc ctg aaa tcc ttt act gca			1059
Gly Tyr Glu Leu Leu Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala			
335	340	345	
gtt tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg cca atg ccc gcg tgc agc			1107
Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser			
350	355	360	
att gtt gac tgt ggc cct cct gat gat cta ccc agt ggc cga gtg gag			1155
Ile Val Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu			
365	370	375	
tac atc aca ggt cct gga gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac			1203
Tyr Ile Thr Gly Pro Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr			
380	385	390	
agc tgt gaa gag acc ttc tac aca atg aaa gtg aat gat ggt aaa tat			1251
Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr			
395	400	405	410
gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tca			1299
Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser			
415	420	425	
ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga			1347

Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly
 430 435 440
 ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg 1395
 Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp
 445 450 455
 caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat 1443
 Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr
 460 465 470
 gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat 1491
 Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His
 475 480 485 490
 gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca 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 ctg cgt gtc tgc agt caag gatt ctt cat ttt tag aat			2122
Ile Ser Asp Phe			
685			
gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg			2182
gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccagtgag gctgctgtca tttctccact			2242
tgccagttta attccagcct taccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca			2302
gtcatctttg cccaccagc gtaatgtcac tgc tcaaat acatttcatt accttaaaaa			2362
gccagtctct tttcactatg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg			2422
tttttaaaact tgttcttatt gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa			2460
<210> 5			
<211> 686			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 5			
Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr			

1 5 10 15
 Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
 20 25 30
 Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
 35 40 45
 Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe

 50 55 60
 Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
 85 90 95
 Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
 100 105 110
 Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr

 115 120 125
 Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
 130 135 140
 Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
 145 150 155 160
 Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
 165 170 175
 Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg

 180 185 190
 Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu
 195 200 205
 Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile
 210 215 220
 Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu
 225 230 235 240
 Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly

 245 250 255

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

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

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro Met
290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile Leu

305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu Gln
325 330 335

Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly Pro
355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro Gly

370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
385 390 395 400

Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly
405 410 415

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

Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly Gly

435 440 445

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

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

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

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

500 505 510
 Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala Gly
 515 520 525
 Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val Ile
 530 535 540
 Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu Ser
 545 550 555 560
 Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu Thr

565 570 575
 Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro Ile
 580 585 590
 Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro
 595 600 605
 Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly
 610 615 620
 Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu

625 630 635 640
 Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
 645 650 655
 Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
 660 665 670
 Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
 675 680 685

<210> 6

<211> 671

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

6

Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala
 1 5 10 15
 Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp
 20 25 30

Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His
 35 40 45
 Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60

 Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser
 85 90 95
 Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
 100 105 110
 Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln
 115 120 125

 Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His
 130 135 140
 Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg
 145 150 155 160
 Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln
 165 170 175
 Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys
 180 185 190

 Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val
 195 200 205
 Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr
 210 215 220
 Leu Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His
 225 230 235 240
 Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser
 245 250 255

 Asn Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr
 260 265 270
 Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Tyr Pro

275	280	285	
Met Ala Pro Pro Asn Gly His Val Ser Pro Val Gln Ala Lys Tyr Ile			
290	295	300	
Leu Lys Asp Ser Phe Ser Ile Phe Cys Glu Thr Gly Tyr Glu Leu Leu			
305	310	315	320
Gln Gly His Leu Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp			
325	330	335	
Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Ala Cys Ser Ile Val Asp Cys Gly			
340	345	350	
Pro Pro Asp Asp Leu Pro Ser Gly Arg Val Glu Tyr Ile Thr Gly Pro			
355	360	365	
Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr			
370	375	380	
Phe Tyr Thr Met Lys Val Asn Asp Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp			
385	390	395	400
Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Glu			
405	410	415	
Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly Gly Arg Ile Tyr Gly			
420	425	430	
Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Ile Leu			
435	440	445	
Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn Trp Val Leu			
450	455	460	
Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala Ser Ala Leu			
465	470	475	480
Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln			
485	490	495	
Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Asp Ala			
500	505	510	
Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn Lys Val Val			
515	520	525	

Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Glu
 530 535 540
 Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly Trp Gly Leu
 545 550 555 560
 Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val Asp Ile Pro
 565 570 575

Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr
 580 585 590
 Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser
 595 600 605
 Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe
 610 615 620
 Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp
 625 630 635 640

Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
 645 650 655
 Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe
 660 665 670

<210> 7

<211> 4900

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcat tcccagaatc	60
ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga	120
ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacacatg aggtaggtgg	180
gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggt gggagcacag gcctgggcct caccgccct	240
gccctgcccc taggctgctg accctcctgg gccttctgtg tggtcgggtg gccacccct	300
taggcccga gttggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atccccggc tttccagggg	360
agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga cctgactgc accccccggc taccgcctgc	420
gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct ctgcgagtac gacttcgtca	480
aggtgccgtc agacgggagg gctgggggtt ctcagggtcg gggggtcctc aaggagtagc	540

cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggaggag atcaggcctg 600

ggtcttgctt tcactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaaggtgc 660

tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg ggcccttggc aaggacactt 720

tctactcgct gggctccagc ctggacatta ccttccgctc cgactactcc aacgagaagc 780

cgttcacggg gttcaggacc ttctatgcag ccgaggggtga gccaaagagg gtcttgaac 840

atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct 900

tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggctgacat catccacaat 960

gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtccaac tctgagccag 1020

ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtgc gcagggactg gccgggcgcg gcagctcacg 1080

cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt 1140

caaggccagc cagggcaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct 1200

gggcgtgggt gtgcgcacct ggaatcccag ctactaggga ggctgaggca ggagaattgc 1260

ttgaacctgc gagggtggagg ctgcagtga cagagattgc accactacac tccacctggg 1320

cgacagacta gactccgtct caaaaaacaa aaaacaaaaa ccacgcaggc ccgagggccc 1380

atttacaagc tgacaaagtg ggccctgcc a gcgggagcgc tgcaggatgt ttgattttca 1440

gateccagtc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc 1500

tccttagaag ctgctgcaag gggtcagcgc tgtagcccg cccctgggt ttgattgact 1560

cccctcatta gctgggtgac ctgcgccgga cactgaaact cccactggtt taacagaggt 1620

gatgtttgca tcttttccc agcgtctgtg ggagcttgca gcgacctag gcctgtaagg 1680

tgattggccc ggcaccagtc ccgcacctta gacaggacct aggcctctctc tgaggctcac 1740

tctgaggtea tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga 1800

cggcctgcct ggccctgcct ctccccaga cattgacgag tgccaggtgg ccccgaggaga 1860

ggcgcaccacc tgcgaccacc actgccacaa ccacctgggc ggtttctact gtcctgccg 1920

cgcaggttac gtctgcacc gtaacaagcg cacctgtca ggtgaggag gctgcctggg 1980

ccccaacgca cctctcctg ggatacccg ggctcctcag ggccattgct gctctgcca 2040

ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgttcta ggccctgctg cctccagctc 2100

cccttctcag cctgtctcc cctctcagca gccaggctca tcagtccac cctgccttag 2160

cactgagact aattctaaca tccactgtg tacctggttc cacctgggct ctgggaaccc 2220

ctcatgtagc cacgggagag tcggggtatc taccctcgtt ccttgactg ggttcctgtt 2280

ccctgcactg ggggacgggc cagtgtctctg gggcgtgggc agccccaccc tgtggcgctg 2340
accctgtcc cccgactcgg tttctcctct cggggtctct ccttgctct ctgatctctc 2400
ttccagagca gagcctctag cctcccttgg agctccggct gcccagcagg tcagaagcca 2460
gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactccatt 2520
caccacat ggacccaata ataaacctgg cccacccca cctgtgcgc cgtgtctctg 2580
gggtgggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gctcctctct gcctaccctc ctcacagcct 2640
catgaacccc aggtctgtgg gagcctctc catggggcca cacggtcctt ggcctcacc 2700

ccgtttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgctc gaggccagg 2760
ccccagaggc tgagcccaga gtaatcttga accacccca ttcagggtct ggcctggagg 2820
agcctgacc acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtcccc 2880
gcaaattccag ggtgatcc cactcccca taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca 2940
atgttggggc tctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgccccca ctgcagctgg 3000
gggtgggggtg gtggtatggg atggggacca agccttcctt gaaggataga gcccagccca 3060
acaccccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc 3120

agtcatgac acgtttgct tgaacttcca agaacagccc cagggaagg gtcaaacag 3180
gggaaagggg gtgatgagag atccttcttc cggatgttc tccaggaacc agggggctgg 3240
ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg 3300
tggctgtaag ggaatttagg ggagctcga aggggccctt aggcctcagg agatgtcct 3360
ctcttttccc gaattccag ggaccagga gagtgtccct tcttctctt cctgtgtgtc 3420
catccacccc cgccccgc cctggcagag ctggtggaac tcagtgtct agccctacc 3480
ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgtccc tgggggtgtg agtgagggcc 3540

tgtgcgtcc atccgagtg ctgctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc 3600
ctctctaagc ggccctcag ccatcgggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggcctcaggg 3660
gctggccacc tgcagggcc agcccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg 3720
tcccagtct ctgtcccca aggcattcc cctgtgttg gtgcgagggc tgatagaggg 3780
cacgccaagt cactccctg ccttccctc ctccagccc tgtgtccgg ccaggcttc 3840
accagagggt ctggggagct cagcagcct gaataccac ggccgtatcc caaactctc 3900
agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgggag 3960

tccttcgatg tggagacaca cctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggcttg 4020
ctctgggcc cctcatcttg tccagatcc tccccctca gccagctgc acccctact 4080
tctgcagca tggccccac cacgttcccg tcacctcgg tgacccacc tcttcaggtg 4140

ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg 4200
caccccaatc catggcctgg gttggcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg 4260
gttacttccc tccgccagg ccagaccag gcagctgtct cccagcttct atgagcttct 4320
ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggcccatc tgtgggaaga cattgcccc 4380

caggattgaa aaaaaagca acacgtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga 4440
ccacacaggc tggaagatcc actacacgag cacagtgage aagtgggctc agatccttgg 4500
tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgtg gggctcttct 4560
gggcaggact aggaaggac accaggttta gtggtgtga ggtctgagc agcagcttct 4620
aagggaagc acccgtgcc tcctcagcag caccagcat cttcaccact cattcttcaa 4680
ccaccattc accatcact catcttttac ccaccaccc ttgcccactc atccttctgt 4740
ccctcactc tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaacat 4800

ccaccattc ttctacctac ccactctac catccactc tctatcagca tccttctacc 4860
accatcctt cgttcggta tccatcatca tccatccatc 4900

<210> 8

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110
 Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
 115 120 125
 Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
 130 135
 <210> 9
 <211> 181
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr
 1 5 10 15
 Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser
 20 25 30
 Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr
 35 40 45
 Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe
 50 55 60
 Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser
 65 70 75 80
 Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp
 85 90 95
 Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser
 100 105 110
 Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
 115 120 125
 Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val
 130 135 140
 Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu
 145 150 155 160
 Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn
 165 170 175

Lys Arg Thr Cys Ser

180

<210> 10

<211> 293

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Arg Leu Leu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr

1 5 10 15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val

130

135

140

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu

145

150

155

160

Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn

165

170

175

Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gln Arg

180

185

190

Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Arg Pro Tyr Pro Lys Leu

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

210 215 220
Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu
225 230 235 240
Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly
245 250 255
Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn
260 265 270
Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly

275 280 285
Trp Lys Ile His Tyr

290
<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 11

Glu Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys
1 5 10 15
Asp His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg
20 25 30
Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys
35 40

<210> 12
<211> 242
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

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

20 25 30
 Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His Asp Ala
 35 40 45
 Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser Pro His

 50 55 60
 Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr
 65 70 75 80
 His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Asn Asn
 85 90 95
 Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys
 100 105 110
 Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala Ser Gly

 115 120 125
 Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Tyr Val
 130 135 140
 Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys
 145 150 155 160
 Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly
 165 170 175
 Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala

 180 185 190
 Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile
 195 200 205
 Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val
 210 215 220
 Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser
 225 230 235 240
 Asp Phe

<210> 13

<211> 16

<212>

```

> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 13
Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ala Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
1          5          10          15
<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 14
Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu
1          5          10          15
<210> 15
<211> 43
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic

<400> 15
Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp
1          5          10          15
Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser
          20          25          30
Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln
          35          40
<210> 16
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 16
Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn

```

1 5

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr

1 5 10 15

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe

20 25

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly

1 5

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys

1 5 10 15

Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val

20 25

<210> 20

<211> 960

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (51)..(797)

<400> 20

attaactgag attaaccttc cctgagtttt ctcacaccaa ggtgaggacc atg tcc 56

Met Ser

1

ctg ttt cca tca ctc cct ctc ctt ctc ctg agt atg gtg gca gcg tct 104

Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu 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 aggtcatat cactcaggcc ctcttgtct 827
Val Cys Glu Phe Pro Ile
245

ttttactgca acccacaggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc 887
atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca 947
aagcaataat agt 960

<210> 21
<211> 248
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 21

Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala
1 5 10 15
Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys
20 25 30
Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly
35 40 45
Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln
50 55 60
Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly
65 70 75 80
Asn Pro Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp
85 90 95
Pro Gly Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg
100 105 110
Lys Ala Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe
115 120 125
Ser Leu Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu
130 135 140
Ile Met Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala
145 150 155 160
Ser Val Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn
165 170 175
Leu Ile Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu
180 185 190
Gly Gln Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp
195 200 205
Asn Glu Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu
210 215 220
Leu Leu Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His
225 230 235 240
Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile

245

<210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Wherein X at position 1 represents hydroxyproline
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Wherein X at position 4 represents hydrophobic residue
 <400> 22

Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro

1 5
 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Wherein X represents hydroxyproline
 <400> 23

Xaa Gly Lys Leu Gly

1 5
 <210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <220><221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(15)
 <223> Wherein X at positions 9 and 15 represents hydroxyproline

<400> 24

Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa Gly

1 5 10 15

<210> 25

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(27)

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

<400> 25

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly

1 5 10 15

Lys Leu Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa

20 25

<210> 26

<211> 53

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (50)..(50)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 26

Gly Lys Asp Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly

1 5 10 15

Gln Gly Leu Arg Gly Leu Gln Gly Pro Xaa Gly Lys Leu Gly Pro Xaa

20 25 30

Gly Asn Xaa Gly Pro Ser Gly Ser Xaa Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly

35 40 45

Asp Xaa Gly Lys Ser

50

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(33)

<223> Wherein X at positions 3, 6, 12, 18, 21, 30, 33 represents
hydroxyproline

<400> 27

Gly Ala Xaa Gly Ser Xaa Gly Glu Lys Gly Ala Xaa Gly Pro Gln Gly

1 5 10 15

Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys Met Gly Pro Lys Gly Glu Xaa Gly Asp

20 25 30

Xaa

<210> 28

<211> 45

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(45)

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

<400> 28

Gly Cys Xaa Gly Leu Xaa Gly Ala Xaa Gly Asp Lys Gly Glu Ala Gly

1 5 10 15

Thr Asn Gly Lys Arg Gly Glu Arg Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa Gly Lys

20 25 30

Ala Gly Pro Xaa Gly Pro Asn Gly Ala Xaa Gly Glu Xaa

35 40 45

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

Leu Gln Arg Ala Leu Glu Ile Leu Pro Asn Arg Val Thr Ile Lys Ala

1 5 10 15

Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile

20

<210> 30

<211> 559

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

atgaggctgc tgacctctct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggcccc 60

aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc 120

aatgaccagg agcggcgtcg gacctgact gcaccccccg gctaccgcct gcgcctctac 180

ttcaccact tcgacctgga gctctccac ctctgcgagt acgacttcgt caagctgagc 240

tcgggggcca agtgctggc cacgtgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc 300

cctggcaagg acactttcta ctgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac 360

tactccaacg agaagccgtt cacgggggtt gaggccttct atgcagccga ggacattgac 420

gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg 480

ggcggtttct actgctcctg ccgcgaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc 540

tcagccctgt gtcctggcc 559

<210> 31

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

cgggcacacc atgaggctgc tgacctcct gggc 34

<210> 32

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

gacattacct tccgtccga ctccaacgag aag 33

<210> 33

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

agcagccctg aataccacg gccgtatccc aaa 33

<210> 34

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

cgggatccat gaggtgctg accctc 26

<210> 35
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 35
 ggaattccta ggctgcata 19
 <210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic
 <400> 36
 ggaattccta caggcgct 19
 <210> 37
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 37
 ggaattccta gtagtgat 19
 <210> 38
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic
 <400> 38
 tgcggccgct gtagtgctg tcttt 25
 <210> 39
 <211> 23
 <212> DNA
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic

<400> 39	
ggaattcact cgttattctc gga	23
<210> 40	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 40	
tccgagaata acgagtg	17
<210> 41	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 41	
cattgaaagc ttggggtag aagttgttc	29
<210> 42	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 42	
cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga	27
<210> 43	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic	
<400> 43	
cggtaagctt cactggctca gggaaata	28
<210> 44	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Synthetic

<400> 44

aagaagcttg ccgccaccat ggattggctg tggaact 37

<210> 45

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g 31

<210> 46

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct 36

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

cgggatcctt ctccctctaa cactct 26

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His

1 5

<210> 49

<211> 4960

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 49

ccggacgtgg tggcgcatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt	60
gctcgaaacc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttcgag	120
gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacaggga	180
gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac	240
aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga	300
agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt	360
tttttttttt tttaggtgg agtctcactc tgcgtccag gctggagtgc agtgggtcga	420
tctcggatca ctgcaacctc cgcctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc	480
gagtagctgg gattataagt gcgcgtgcc acacctggat gatitttgta ttttagtag	540
agatgggatt tcacatgtt ggtcaggctg gtctcaaact cccaacctcg tgatccacc	600
accttggcct cccaaagtgc tgggattaca ggtataagcc accgagccca gccaaaagcg	660
acttctaagc ctgcaaggga atcggaatt ggtggcacca ggtccttctg acagggttta	720
agaaattagc cagcctgagg ctgggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttgg	780
gaggctaagg caggtggatc acctgagggc aggagttaa gaccagcctg accaacatgg	840
agaaacccca tcctaccaa aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgcctgtaa	900
tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgcttga acacaggaag tagaggctgc	960
agtgagctat gattgcagca ctgactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaaa	1020
agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gtttcaggc tgttgttacc taggtccgac	1080
tcctggctcc cagagcagcc tgtctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcag	1140
gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggtcggggg caggggcagg tctactggaca	1200
aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc	1260
acaccatgag gtaggtgggc gccacagcc tcctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg	1320
cctgggccct caccgccct gccctgccca taggtctctg acctcctgg gccttctgtg	1380
tggtcgggtg gccacccct tgggcccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc	1440
atcccccggc ttccagggg agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga ccctgactgc	1500
acccccggc taccgctgc gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct	1560
ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctggggtt tctcagggtc	1620

ggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg 1680
 ccaggaggga gatcaggcct gggctttgcc ttacttcct gtgacctg accccacagc 1740
 tgagctcggg ggccaaggtg ctggccacgc tgtgctggca ggagagcaca gacacggagc 1800
 ggcccccctg caaggacact ttctactcgc tgggtccag cctggacatt accttccgt 1860
 ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggtg 1920

 agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc 1980
 ttaggccagg cagccctgcc tttagtttcc ccacctttcc cagggcaggg gagaggcctc 2040
 tggcctgaca tcatccaca tgcaaagacc aaaacacccg tgacctccat tcacatgggc 2100
 tgagtccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact 2160
 ggccggggcg agcagctcac gcctgtaatt ccagcacttt gggaggccga ggctggctga 2220
 tcatttgagg tcaggagttc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact 2280
 aaaactacaa aaattagctg ggcgtgggtg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag 2340

 gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca 2400
 ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa 2460
 acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag 2520
 cgctgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct 2580
 ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgctgtagc 2640
 cccgccccct gggtttgatt gactccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg 2700
 aaactccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatctt ctcccagcgc tgctgggagc 2760

 ttgcagcgac ctiaggcctg taagtgatt ggcccggcac cagtcgccca ccctagacag 2820
 gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcatggatc tcctgggagg agtccaggct 2880
 ggatccgcc tcttccctc ctgacggcct gcctggcct gcctctcccc cagacattga 2940
 cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccact 3000
 gggcggtttc tactgtcct gccgcgagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg 3060
 ctgagccctg tgctcggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga 3120
 ataccacagg ccgtatccca aactctccag ttgcattac agcatcagcc tggaggaggg 3180

 gttcagtgtc attctggact ttgtggagt cttcgatgtg gagacacacc ctgaaacct 3240
 gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgtgg 3300
 gaagacattg cccacagga ttgaacaaa aagcaacacg gtgacatca cttttgtcac 3360
 agatgaatca ggagaccaca caggtggaa gatccactac acgagcacag cgcacgttg 3420
 cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct 3480

gaaagacagc ttctccatct ttgtcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc 3540
cctgaaatcc ttactgcag ttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc 3600

gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc agtggccgag tggagtacat 3660
cacaggtcct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt 3720
ctacacaatg aaagtgaatg atggtaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag 3780
ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctgtt tgtggactat cagcccgcac 3840
aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaacct ggtgattttc cttggcaagt 3900
cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac 3960
agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc gccctggaca ttcgaatggg 4020

cacctgaaa agactatcac ctattatac 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
tcttctaga aatctaagt atgtcgacat accgattgtt gaccatcaa aatgtactgc 4320
tgcataatgaa aagccacct atccaagggg aagtgtact gctaacatgc tttgtctgg 4380
cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tgggttttct 4440

agatagttaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagt tccctggggtt ccatgaattg 4500
tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga 4560
gaacataatt agtgattttt aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc attttagaa 4620
atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca 4680
tggcagttgt tgcctcacc aaaaaaacag actccaggtg aggtctgtgt cttttctcca 4740
cttgccagtt taattccagc cttaccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga 4800
cagtcacttt tgcccccca gtgtaatgtc actgtcaaaa ttacatttca ttacctaaa 4860

aagccagtct cttttcatac tggctgttgg cttttctgta aactgcctgt ccatgctctt 4920
tgtttttaaa ctgtttctta ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa 4960

<210> 50
<211> 2090
<212> DNA
<213> Murine
<220><221> CDS
<222> (33)..(2090)

<400> 50

ggcgctggac tgcagagcta tggtaggcaca 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> Murine

<400> 51

Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser

100	105	110	
Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr			
115	120	125	
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Val			
130	135	140	
Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu			
145	150	155	160
Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn			
165	170	175	
Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg			
180	185	190	
Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu			
195	200	205	
Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile			
210	215	220	
Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln			
225	230	235	240
Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly			
245	250	255	
Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His			
260	265	270	
Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly			
275	280	285	
Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr			
290	295	300	
Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu			
305	310	315	320
Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln			
325	330	335	
Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly			
340	345	350	

Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro

355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln

370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe

385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe

405 410 415

Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val

420 425 430

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln

435 440 445

Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln

450 455 460

Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr

465 470 475 480

Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn

485 490 495

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

500 505 510

Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly

515 520 525

Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile

530 535 540

Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser

545 550 555 560

Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr

565 570 575

Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile

580 585 590

Ala Asp His Gln Lys Cys Thr Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly

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

610 615 620
Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp
625 630 635 640
Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser
645 650 655
Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile
660 665 670
Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe

675 680 685

<210> 52

<211> 670

<212> PRT

<213> Murine

<400> 52

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

1 5 10 15

Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro

85 90 95

Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe

100 105 110

Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg

115	120	125	
Val Ser Leu Gly Asp Ser	Val Pro Cys Asp His Tyr	Cys His Asn Tyr	
130	135	140	
Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser	Cys Arg Ala Gly Tyr Ile Leu His Gln		
145	150	155	160
Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser	Gly Gln Val Phe Thr Gly		
165	170	175	
Arg Ser Gly Tyr Leu Ser Ser Pro Glu Tyr	Pro Gln Pro Tyr Pro Lys		
180	185	190	
Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val			
195	200	205	
Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala			
210	215	220	
Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His			
225	230	235	240
Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser			
245	250	255	
His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr			
260	265	270	
Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro			
275	280	285	
Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val			
290	295	300	
Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu			
305	310	315	320
Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp			
325	330	335	
Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly			
340	345	350	
Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro			
355	360	365	

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

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

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

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly
420 425 430

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

Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu
450 455 460

Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu
465 470 475 480

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

Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala
500 505 510

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

Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala
530 535 540

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

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

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

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

Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu

610	615	620	
Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly			
625	630	635	640
Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val			
	645	650	655
Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu Asn Ile Ile Ser Asn Phe			
	660	665	670
<210> 53			
<211> 2091			
<212> DNA			
<213> Rat			
<220><221> CDS			
<222> (10)..(2067)			
<400> 53			
tggcacaca atg agg cta ctg atc gtc ctg ggt ctg ctt tgg agt ttg gtg			51
Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val			
1	5	10	
gcc aca ctt ttg ggc tcc aag tgg cct gag cct gta ttc ggg cgc ctg			99
Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu			
15	20	25	30
gtg tcc ctg gcc ttc cca gag aag tat ggc aac cat cag gat cga tcc			147
Val Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser			
	35	40	45
tgg acg ctg act gca ccc cct ggc ttc cgc ctg cgc ctc tac ttc acc			195
Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr			
50	55	60	
cac ttc aac ctg gaa ctc tct tac cgc tgc gag tat gac ttt gtc aag			243
His Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys			
65	70	75	
ttg acc tca ggg acc aag gtg cta gcc acg ctg tgt ggg cag gag agt			291
Leu Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser			

80	85	90	
aca gat act gag cgg gca cct ggc aat gac acc ttc tac tca ctg ggt			339
Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly			
95	100	105	110
ccc agc cta aag gtc acc ttc cac tcc gac tac tcc aat gag aag cca			387
Pro Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro			
115	120	125	
ttc aca gga ttt gag gcc ttc tat gca gcg gag gat gtg gat gaa tgc			435
Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys			
130	135	140	
aga aca tcc ctg gga gac tca gtc cct tgt gac cat tat tgc cac aac			483
Arg Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn			
145	150	155	
tac ctg ggc ggc tac tac tgc tcc tgc cga gtg ggc tac att ctg cac			531
Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His			
160	165	170	
cag aac aag cat acc tgc tca gcc ctt tgt tca ggc cag gtg ttc act			579
Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr			
175	180	185	190
ggg agg tct ggc ttt ctc agt agc cct gag tac cca cag cca tac ccc			627
Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro			
195	200	205	
aaa ctc tcc agc tgc gcc tac aac atc cgc ctg gag gaa ggc ttc agt			675
Lys Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser			
210	215	220	
atc acc ctg gac ttc gtg gag tcc ttt gat gtg gag atg cac cct gaa			723
Ile Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu			
225	230	235	
gcc cag tgc ccc tac gac tcc ctc aag att caa aca gac aag agg gaa			771
Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu			
240	245	250	

tac ggc ccg ttt tgt ggg aag acg ctg ccc ccc agg att gaa act gac	819
Tyr Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp	
255 260 265 270	
agc aac aag gtg acc att acc ttt acc acc gac gag tca ggg aac cac	867
Ser Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His	
275 280 285	
aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc aca gca cag ccc tgc cct gat	915
Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp	
290 295 300	
cca acg gcg cca cct aat ggt cac att tca cct gtg caa gcc acg tat	963
Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr	
305 310 315	
gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt	1011
Val Leu Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu	
320 325 330	
ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aag tca ttc act gct gtc tgt cag aaa	1059
Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys	
335 340 345 350	
gat gga tct tgg gac cgg ccg ata cca gag tgc agc att att gac tgt	1107
Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys	
355 360 365	
ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc cac gtg gac tat atc aca ggc	1155
Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly	
370 375 380	
cct gaa gtg acc acc tac aaa gct gtg att cag tac agc tgt gaa gag	1203
Pro Glu Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu	
385 390 395	
act ttc tac aca atg agc agc aat ggt aaa tat gtg tgt gag gct gat	1251
Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp	

400	405	410	
gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa aaa tcc ctc ccg gtt tgc aag			1299
Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser Leu Pro Val Cys Lys			
415	420	425	430
cct gtc tgt gga ctg tcc aca cac act tca gga ggc cgt ata att gga			1347
Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly			
	435	440	445
gga cag cct gca aag cct ggt gac ttt cct tgg caa gtc ttg tta ctg			1395
Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu			
	450	455	460
ggt gaa act aca gca gca ggt gct ctt ata cat gac gac tgg gtc cta			1443
Gly Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu			
	465	470	475
aca gcg gct cat gct gta tat ggg aaa aca gag gcg atg tcc tcc ctg			1491
Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu			
480	485	490	
gac atc cgc atg ggc atc ctc aaa agg ctc tcc ctc att tac act caa			1539
Asp Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln			
495	500	505	510
gcc tgg cca gag gct gtc ttt atc cat gaa ggc tac act cac gga gct			1587
Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala			
	515	520	525
ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca			1635
Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr			
	530	535	540
atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca			1683
Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala			
	545	550	555
tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta			1731

Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu
560 565 570
acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca 1779
Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro
575 580 585 590
att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac 1827
Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr
595 600 605
cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc 1875
Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg
610 615 620
ggg 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
ggg tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa 2019
Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys
655 660 665 670
gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa 2067
Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
675 680 685
tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2091
<210> 54
<211> 685
<212> PRT
<213> Rat
<400> 54
Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr
1 5 10 15
Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser

20	25	30
Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr		
35	40	45
Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe		
50	55	60
Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr		
65	70	75
Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp		
85	90	95
Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro Ser		
100	105	110
Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr		
115	120	125
Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr		
130	135	140
Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu		
145	150	155
Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn		
165	170	175
Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg		
180	185	190
Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu		
195	200	205
Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr		
210	215	220
Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln		
225	230	235
Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly		
245	250	255
Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser Asn		
260	265	270

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

Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr
 290 295 300

Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu
 305 310 315 320

Lys Asp Ser Phe Ser Val Phe Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln
 325 330 335

Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly
 340 345 350

Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro
 355 360 365

Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Glu
 370 375 380

Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe
 385 390 395 400

Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe
 405 410 415

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

Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly Gln
 435 440 445

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

Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr Ala
 465 470 475 480

Ala His Ala Val Tyr Gly Lys Thr Glu Ala Met Ser Ser Leu Asp Ile
 485 490 495

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

Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe

515 520 525
 Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn
 530 535 540

Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu
 545 550 555 560
 Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln
 565 570 575
 Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Val
 580 585 590
 Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro Gly
 595 600 605

Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly
 610 615 620
 Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp
 625 630 635 640
 Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser
 645 650 655
 Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr
 660 665 670

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

<210> 55
 <211> 670
 <212> PRT
 <213> Rat
 <400> 55

Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val
 1 5 10 15
 Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp
 20 25 30
 Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His

35 40 45
 Phe Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu
 50 55 60
 Thr Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr
 65 70 75 80
 Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Asn Asp Thr Phe Tyr Ser Leu Gly Pro
 85 90 95
 Ser Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe
 100 105 110

 Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg
 115 120 125
 Thr Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr
 130 135 140
 Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln
 145 150 155 160
 Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly
 165 170 175

 Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys
 180 185 190
 Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile
 195 200 205
 Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala
 210 215 220
 Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr
 225 230 235 240

 Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser
 245 250 255
 Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr
 260 265 270
 Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro
 275 280 285

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

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

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

Gly Ser Trp Asp Arg Pro Ile Pro Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly
340 345 350

Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro
355 360 365

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

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

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

Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr Ser Gly Gly Arg Ile Ile Gly Gly
420 425 430

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

Glu Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Ile His Asp Asp Trp Val Leu Thr
450 455 460

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

Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys Arg Leu Ser Leu Ile Tyr Thr Gln Ala
485 490 495

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

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

Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser

530 535 540
 Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr
 545 550 555 560
 Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile
 565 570 575
 Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro
 580 585 590
 Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly
 595 600 605
 Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu
 610 615 620

Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly
 625 630 635 640
 Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val
 645 650 655
 Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
 660 665 670

<210> 56

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo Sapiens

<400> 56

atgaggctgc tgaccctcct gggccttc 28

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Homo Sapiens

<400> 57

gtgccctcc tgcgtcacct ctg 23

<210> 58

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Homo Sapiens
 <400> 58
 cagaggtgac gcaggagggg cac 23
 <210> 59
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Homo Sapiens
 <400> 59
 ttaaaatcac taattatggt ctcgatc 27

 <210> 60
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Murine
 <400> 60
 atgaggctac tcattcttcct gg 22
 <210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Murine
 <400> 61
 ctgcagaggt gacgcagggg ggg 23
 <210> 62
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Murine
 <400> 62

ccccccctgc gtcacctctg cag 23

<210> 63

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Murine

<400> 63

ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc 29

<210> 64

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rat

<400> 64

gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt 29

<210> 65

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rat

<400> 65

ctagaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca 37