



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115335077 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 11

(21) 申请号 202080094868.6

(22) 申请日 2020.11.24

(30) 优先权数据

62/940720 2019.11.26 US

62/940735 2019.11.26 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.07.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/062082 2020.11.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/108447 EN 2021.06.03

(71) 申请人 奥默罗斯公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 G·A·德莫普洛斯 T·A·杜德勒

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

专利代理师 李志强 庞立志

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

权利要求书4页 说明书174页
序列表80页 附图75页

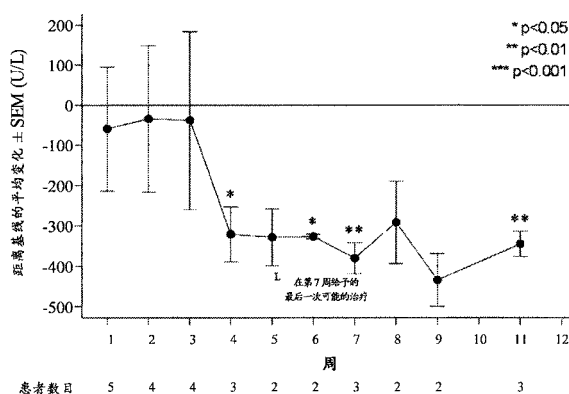
(54) 发明名称

用于治疗 and/或预防与造血干细胞移植相关的特发性肺炎综合征 (IPS) 和/或毛细血管渗漏综合征 (CLS) 和/或植入综合征 (ES) 和/或液体超负荷 (FO) 的方法

(57) 摘要

在一个方面,本发明提供了抑制人患者中的MASP-2依赖性补体激活的效应的方法,所述人患者患有或处于发展HSCT-IPS的风险中,和/或患有或处于发展HSCT-CLS的风险中,和/或患有或处于发展HSCT-FO的风险中,和/或患有或处于发展HSCT-ES的风险中。该方法包括向有此需要的受试者施用有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制剂的步骤。

随着时间过去距离基线的 LDH 变化



1. 一种治疗患有造血干细胞移植后的特发性肺炎综合征 (HSCT-IPS) 的人受试者的方法, 所述方法包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。

2. 权利要求1的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。

3. 权利要求1的方法, 其中所述抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

4. 权利要求1的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。

5. 权利要求1的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积。

6. 权利要求1的方法, 其中将所述MASP-2抑制性抗体全身递送至所述受试者。

7. 权利要求1的方法, 其中所述方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前, 鉴定患有造血干细胞移植后的特发性肺炎综合征 (HSCT-IPS) 的人受试者。

8. 权利要求1的方法, 其中所述受试者先前已经历同种异体造血干细胞移植。

9. 权利要求1的方法, 其中所述受试者先前已经历自体造血干细胞移植。

10. 权利要求1的方法, 其中所述受试者并未患有弥漫性肺泡出血 (DAH)。

11. 权利要求1的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

12. 权利要求1的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:67的重链可变区和包含SEQ ID NO:70的轻链可变区。

13. 权利要求1-12中任一项的方法, 其中所述方法包括向受试者施用包含具有约4mg/kg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物, 每周至少一次, 共至少4周的治疗期。

14. 权利要求13的方法, 其中所述方法包括向受试者施用包含具有约4mg/kg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物, 每周至少两次, 共至少4周的治疗期。

15. 权利要求1-12中任一项的方法, 其中所述方法包括向受试者施用包含具有约370mg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物, 每周至少一次, 共至少4周的治疗期。

16. 权利要求15的方法, 其中所述方法包括向受试者施用包含具有约370mg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物, 每周至少两次, 共至少4周的治疗期。

17. 一种治疗患有造血干细胞移植后的毛细血管渗漏综合征 (HSCT-CLS) 的人受试者的方法, 所述方法包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。

18. 权利要求17的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。

19. 权利要求17的方法, 其中所述抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

20. 权利要求17的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。

21. 权利要求17的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血

清中的C3b沉积。

22. 权利要求17的方法, 其中将所述MASP-2抑制性抗体全身递送至所述受试者。

23. 权利要求17的方法, 其中所述方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前, 鉴定患有造血干细胞移植后的毛细血管渗漏综合征 (HSCT-CLS) 的人受试者。

24. 权利要求17的方法, 其中所述受试者先前已经历同种异体造血干细胞移植。

25. 权利要求17的方法, 其中所述受试者先前已经历自体造血干细胞移植。

26. 权利要求17的方法, 其中所述受试者并未患有静脉阻塞性疾病 (VOD)。

27. 权利要求17的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 所述轻链可变区包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

28. 权利要求17的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:67的重链可变区和包含SEQ ID NO:70的轻链可变区。

29. 权利要求17-28中任一项的方法, 其中所述方法包括向受试者施用包含具有约4mg/kg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物, 每周至少一次, 共至少4周的治疗期。

30. 权利要求29的方法, 其中所述方法包括向受试者施用包含具有约4mg/kg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物, 每周至少两次, 共至少4周的治疗期。

31. 权利要求17-28中任一项的方法, 其中所述方法包括向受试者施用包含具有约370mg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物, 每周至少一次, 共至少4周的治疗期。

32. 权利要求31的方法, 其中所述方法包括向受试者施用包含具有约370mg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物, 每周至少两次, 共至少4周的治疗期。

33. 一种治疗患有造血干细胞移植后的液体超负荷 (HSCT-FO) 的人受试者的方法, 所述方法包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。

34. 权利要求33的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。

35. 权利要求33的方法, 其中所述抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

36. 权利要求33的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。

37. 权利要求33的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的IC₅₀抑制90%人血清中的C3b沉积。

38. 权利要求33的方法, 其中将所述MASP-2抑制性抗体全身递送至所述受试者。

39. 权利要求33的方法, 其中所述方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前, 鉴定患有造血干细胞移植后的液体超负荷 (HSCT-FO) 的人受试者。

40. 权利要求33的方法, 其中所述受试者先前已经历同种异体造血干细胞移植。

41. 权利要求33的方法, 其中所述受试者先前已经历自体造血干细胞移植。

42. 权利要求33的方法, 其中所述MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变

区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

43. 权利要求33的方法,其中所述MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:67的重链可变区和包含SEQ ID NO:70的轻链可变区。

44. 权利要求33-43中任一项的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含具有约4mg/kg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物,每周至少一次,共至少4周的治疗期。

45. 权利要求44的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含具有约4mg/kg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物,每周至少两次,共至少4周的治疗期。

46. 权利要求33-43中任一项的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含具有约370mg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物,每周至少一次,共至少4周的治疗期。

47. 权利要求46的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含具有约370mg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物,每周至少两次,共至少4周的治疗期。

48. 一种治疗患有造血干细胞移植后的植入综合征(HSCT-ES)的人受试者的方法,所述方法包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。

49. 权利要求48的方法,其中所述MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。

50. 权利要求48的方法,其中所述抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。

51. 权利要求48的方法,其中所述MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。

52. 权利要求48的方法,其中所述MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积。

53. 权利要求48的方法,其中将所述MASP-2抑制性抗体全身递送至所述受试者。

54. 权利要求48的方法,其中所述方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有造血干细胞移植后的植入综合征(HSCT-ES)的人受试者。

55. 权利要求48的方法,其中所述受试者先前已经历同种异体造血干细胞移植。

56. 权利要求48的方法,其中所述受试者先前已经历自体造血干细胞移植。

57. 权利要求48的方法,其中所述MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

58. 权利要求48的方法,其中所述MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含SEQ ID NO:67的重链可变区和包含SEQ ID NO:70的轻链可变区。

59. 权利要求48-58中任一项的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含具有约4mg/kg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物,每周至少一次,共至少4周的治疗期。

60. 权利要求59的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含具有约4mg/kg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物,每周至少两次,共至少4周的治疗期。

61. 权利要求48-58中任一项的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含具有约370mg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物,每周至少一次,共至少4周的治疗期。

62. 权利要求61的方法,其中所述方法包括向受试者施用包含具有约370mg剂量的所述MASP-2抑制性抗体的组合物,每周至少两次,共至少4周的治疗期。

用于治疗和/或预防与造血干细胞移植相关的特发性肺炎综合征(IPS)和/或毛细血管渗漏综合征(CLS)和/或植入综合征(ES)和/或液体超负荷(FO)的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年11月26日提交的美国临时申请号62/940,720、以及于2019年11月26日提交的美国临时申请号62/940,735的权益,所述美国临时申请在此通过引用以其整体并入。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关的序列表以文本形式代替纸质副本提供,并且在此通过引用并入本说明书内。含有序列表的文本文件的名称为 MP_1_0307_PCT_Sequence_Listing_20201120_ST25.txt;该文件为115KB;于 2020年11月20日创建;并且伴随说明书的提交经由EFS-Web进行提交。

背景技术

[0005] 补体系统在人及其它脊椎动物中提供了早期作用机制,以启动、放大且协调对微生物感染及其它急性损伤的免疫应答(M.K.Liszewski和J.P. Atkinson,1993,于Fundamental Immunology,第三版,由W.E.Paul编辑, Raven Press,Ltd.,New York)。虽然补体激活提供了针对潜在病原体的有价值的第一线防御,但促进保护性免疫应答的补体的活性也可以代表对宿主的潜在危及(K.R.Kalli等人, Springer Semin.Immunopathol.15:417-431,1994; B.P.Morgan,Eur.J.Clinical Investig.24:219-228,1994)。例如,C3和C5蛋白酶解产物募集且激活嗜中性粒细胞。虽然对于宿主防御必不可少,但激活的嗜中性粒细胞在其破坏性酶的释放中是不加区别的,并且可能引起器官损害。另外,补体激活可能引起裂解性补体组分在附近的宿主细胞以及微生物靶上的沉积,导致宿主细胞裂解。

[0006] 补体系统还已牵涉众多急性和慢性疾病状态的发病机制,所述疾病状态包括:心肌梗塞、中风、ARDS、再灌注损伤、败血性休克、在热烧伤之后的毛细血管渗漏、心肺转流术后炎症、移植排斥、类风湿性关节炎、多发性硬化、重症肌无力和阿尔茨海默氏病。在几乎所有这些状况下,补体不是原因,而是涉及发病机制的几种因素之一。然而,补体激活可能是主要的病理机制,并且代表了关于这些疾病状态中的许多的临床控制的有效点。补体介导的组织损伤在各种疾病状态中的重要性的增长的认识强调了关于有效的补体抑制药物的需求。迄今为止,针对C5的抗体依库珠单抗(**Solaris®**)是已批准用于人使用的唯一补体靶向药物。然而,C5是定位于补体系统“下游”的几种效应分子之一,并且C5的阻断并不抑制补体系统的激活。因此,补体激活的启动步骤的抑制剂将具有超过“下游”补体抑制剂的显著优点。

[0007] 目前,广泛公认的是补体系统可以通过三种不同的途径得到激活:经典途径、凝集素途径和旁路途径。经典途径通常由与外来颗粒(即抗原)结合的宿主抗体组成的复合物触发,并且因此需要对抗原的先前暴露,用于生成特异性抗体应答。由于经典途径的激活取决于通过宿主的先前适应性免疫应答,因此经典途径是获得性免疫系统的部分。相比之下,凝

集素途径和旁路途径两者均不依赖于适应性免疫,并且是先天免疫系统的部分。

[0008] 补体系统的激活导致丝氨酸蛋白酶酶原的序贯激活。经典途径激活的第一步是特异性识别分子C1q与抗原结合的IgG和IgM分子的结合。C1q与作为称为C1的复合物C1r和C1s丝氨酸蛋白酶前酶结合。在C1q与免疫复合物结合后,C1r的Arg-Ile位点的自蛋白酶解切割随后为C1r介导的C1s的切割和激活,其从而获得切割C4和C2的能力。C4被切割成指定为C4a和C4b的两个片段,并且类似地,C2被切割成C2a和C2b。C4b片段能够与相邻的羟基或氨基形成共价键,并且通过与激活的C2的C2a片段的非共价相互作用生成C3转化酶(C4b2a)。C3转化酶(C4b2a)通过蛋白酶解切割成C3a和C3b亚组分来激活C3,导致C5转化酶(C4b2a3b)的生成,所述C5转化酶通过切割C5导致膜攻击复合物(与C6、C7、C8和C-9组合的C5b,也称为“MAC”)的形成,所述膜攻击复合物可以破坏细胞膜,导致细胞裂解。激活形式的C3和C4(C3b和C4b)共价沉积在外来靶表面上,其被多种吞噬细胞上的补体受体识别。

[0009] 独立地,通过凝集素途径的补体系统激活的第一步也是特异性识别分子的结合,其随后为相关丝氨酸蛋白酶前酶的激活。然而,凝集素途径中的识别分子不是通过C1q结合免疫复合物,而是包含一组碳水化合物结合蛋白(甘露聚糖结合凝集素(MBL)、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白、L-纤维胶凝蛋白和C型凝集素CL-11),统称为凝集素。参见J.Lu等人,Biochim.Biophys. Acta 1572:387-400,(2002);Holmskov等人,Annu.Rev.Immunol.21:547-578(2003);Teh等人,Immunology 101:225-232(2000)。还参见J.Luet等人,Biochim Biophys Acta 1572:387-400(2002);Holmskov等人,Annu Rev Immunol 21:547-578(2003);Teh等人,Immunology 101:225-232(2000);Hansen等人,J.Immunol 185(10):6096-6104(2010)。

[0010] Ikeda等人首次证实了如同C1q,MBL可以以C4依赖性方式在与酵母甘露聚糖包被的红细胞结合后激活补体系统(Ikeda等人,J.Biol.Chem. 262:7451-7454,(1987))。MBL,胶原凝集素蛋白家族的成员,是一种钙依赖性凝集素,其使碳水化合物与在吡喃糖环的赤道平面中取向的3-和4-羟基结合。因此,关于MBL的占优势配体是D-甘露糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺,同时并不符合这种空间要求的碳水化合物对于MBL具有无法检测的亲和力(Weis等人,Nature 360:127-134,(1992))。MBL和单价糖之间的相互作用非常弱,其解离常数通常在个位数的毫摩尔范围内。MBL通过亲合力,即通过与彼此定位接近的多个单糖残基同时相互作用,来实现与聚糖配体的紧密特异性结合(Lee等人,Archiv.Biochem.Biophys.299:129-136,(1992))。MBL识别通常修饰微生物如细菌、酵母、寄生虫和某些病毒的碳水化合物模式。相比之下,MBL并不识别D半乳糖和唾液酸,存在于哺乳动物血浆和细胞表面糖蛋白上的通常修饰“成熟”复合糖缀合物的倒数第二位和最后的糖。这种结合特异性被认为促进“外来”表面的识别,并且帮助保护免于“自我激活”。然而,MBL的确以高亲和力结合在哺乳动物细胞的内质网和高尔基体中隔离的N联糖蛋白和糖脂上的高甘露糖“前体”聚糖簇(Maynard等人,J.Biol.Chem. 257:3788-3794,(1982))。因此,损害的细胞是经由MBL结合用于凝集素途径激活的潜在靶。

[0011] 纤维胶凝蛋白具有与MBL不同类型的凝集素结构域,称为纤维蛋白原样结构域。纤维胶凝蛋白以Ca⁺⁺不依赖性方式结合糖残基。在人中,已鉴定了三种纤维胶凝蛋白(L-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白)。两种血清纤维胶凝蛋白,L-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白,具有共同的对于N-乙酰-D-葡萄糖胺的特异性;然而,H-纤维胶凝蛋白也

结合N-乙酰-D-半乳糖胺。L-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白、CL-11和MBL的糖特异性方面的差异意味着不同的凝集素可能是互补的,并且靶向不同但重叠的糖缀合物。这一概念得到最近的报告支持,即在凝集素途径中的已知凝集素中,仅L-纤维胶凝蛋白与脂磷壁酸特异性结合,所述脂磷壁酸是在所有革兰氏阳性菌中发现的细胞壁糖缀合物(Lynch等人, *J. Immunol.* 172:1198-1202, (2004))。胶原凝集素(即MBL)和纤维胶凝蛋白在氨基酸序列方面没有显著相似性。然而,这两组蛋白质具有相似的结构域组构,并且如同C1q,组装成寡聚结构,其使多位点结合的可能性达到最大。

[0012] MBL的血清浓度在健康人群中是高度可变的,并且这在遗传上受MBL 基因的启动子区和编码区两者中的多态性/突变的控制。作为急性期蛋白,MBL的表达在炎症过程中进一步上调。L-纤维胶凝蛋白以与MBL相似的浓度存在于血清中。因此,凝集素途径的L-纤维胶凝蛋白分支在强度上潜在地与MBL臂可比较。MBL和纤维胶凝蛋白也可以充当调理素,其允许吞噬细胞靶向MBL和纤维胶凝蛋白修饰的表面(参见Jack等人, *J Leukoc Biol.*, 77 (3):328-36 (2004), Matsushita和Fujita, *Immunobiology*, 205 (4-5):490-7 (2002), Aoyagi等人, *J Immunol*, 174 (1):418-25 (2005)。这种调理作用需要这些蛋白质与吞噬细胞受体的相互作用(Kuhlman等人, *J. Exp. Med.* 169:1733, (1989); Matsushita等人, *J. Biol. Chem.* 271:2448-54, (1996)),所述吞噬细胞受体的身份尚未确定。

[0013] 人MBL通过其胶原样结构域与独特的C1r/C1s类丝氨酸蛋白酶(称为MBL 相关丝氨酸蛋白酶(MASP))形成特异性和高亲和力的相互作用。迄今为止,已描述了三种MASP。首先,单一酶“MASP”被鉴定并表征为负责启动补体级联的酶(即,切割C2和C4)(Matsushita等人, *J Exp Med* 176 (6):1497-1502 (1992); Ji等人, *J. Immunol.* 150:571-578, (1993))。随后确定了MASP活性事实上是两种蛋白酶的混合物:MASP-1和MASP-2(Thiel等人, *Nature* 386:506-510, (1997))。然而,证实了单独的MBL-MASP-2复合物足以用于补体激活(Vorup-Jensen等人, *J. Immunol.* 165:2093-2100, (2000))。此外,仅MASP-2 以高速率切割C2和C4(Ambrus等人, *J. Immunol.* 170:1374-1382, (2003))。因此,MASP-2是负责激活C4和C2以生成C3转化酶C4b2a的蛋白酶。这是与经典途径的C1复合物的显著差异,在所述经典途径中,两种特异性丝氨酸蛋白酶(C1r和C1s)的协调作用导致补体系统的激活。另外,已分离了第三种新型蛋白酶MASP-3(Dahl, M.R.等人, *Immunity* 15:127-35, 2001)。MASP-1 和MASP-3是同一基因的可变剪接产物。

[0014] MASP与C1r和C1s(C1复合物的酶促组分)共享相同的结构域组构(Sim等人, *Biochem. Soc. Trans.* 28:545, (2000))。这些结构域包括N末端C1r/C1s/海胆VEGF/骨形态发生蛋白(CUB)结构域、表皮生长因子样结构域、第二个CUB 结构域、串联的补体控制蛋白结构域和丝氨酸蛋白酶结构域。如C1蛋白酶中, MASP-2的激活通过与丝氨酸蛋白酶结构域相邻的Arg-Ile键的切割而发生,所述切割将酶拆分成二硫键连接的A链和B链,后者由丝氨酸蛋白酶结构域组成。

[0015] MBL还可以与MASP-2的可变剪接形式结合,所述形式称为19kDa的 MBL相关蛋白(MAp19)或小MBL相关蛋白(sMAP),其缺乏MASP2的催化活性。(Stover, *J. Immunol.* 162:3481-90, (1999); Takahashi等人, *Int. Immunol.* 11:859-863, (1999))。MAp19包含MASP-2的前两个结构域,随后为四个独特氨基酸的额外序列。Map19的功能尚不清楚(Degn等人, *J Immunol. Methods*, 2011)。MASP-1和MASP-2基因分别定位于人染色体3和1上(Schwaeble

等人, *Immunobiology* 205:455-466, (2002))。

[0016] 几条证据线提示了存在不同的MBL-MASP复合物,并且血清中的大部分 MASP不与MBL复合(Thiel等人, *J. Immunol.* 165:878-887, (2000))。H-纤维胶凝蛋白和L-纤维胶凝蛋白两者均与所有MASP结合并激活凝集素补体途径,MBL也是如此(Dahl等人, *Immunity* 15:127-35, (2001); Matsushita等人, *J. Immunol.* 168:3502-3506, (2002))。凝集素途径和经典途径两者均形成共同的C3转化酶(C4b2a),并且这两个途径在此步骤处会聚。

[0017] 凝集素途径被广泛认为在首次实验的宿主中针对感染的宿主防御中具有主要作用。关于MBL在宿主防御中的牵涉的有力证据来自具有功能性MBL 的血清水平降低的患者的分析(Kilpatrick, *Biochim. Biophys. Acta* 1572:401-413, (2002))。此类患者展示对复发性细菌和真菌感染的易感性。在随着母源抗体滴度减弱的明显的脆弱窗口期间,但在抗体应答的完全储库发展之前,这些症状在生命早期通常是显而易见的。这种综合征经常起因于在 MBL的胶原部分中的几个位点处的突变,其干扰MBL寡聚物的正常形成。然而,由于MBL可以充当不依赖于补体的调理素,因此尚不知道对感染的易感性增加在何种程度上是由于受损的补体激活。

[0018] 与经典途径和凝集素途径形成对比,并未发现旁路途径的引发剂实现C1q 和凝集素在其它两种途径中执行的识别功能。目前,广泛公认的是旁路途径自发地经历低水平的周转激活,其可以在外来或其它异常表面(细菌、酵母、受病毒感染的细胞或损害的组织)上容易地放大,所述表面缺乏控制自发补体激活的适当的分子元件。存在直接涉及旁路途径的激活的四种血浆蛋白:C3、因子B和D以及备解素。

[0019] 尽管存在暗示非传染性人疾病的发病机制中的经典补体途径和旁路补体途径两者的广泛证据,但凝集素途径的作用才刚刚开始进行评估。最近的研究提供了以下的证据:凝集素途径的激活可以负责缺血/再灌注损伤中的补体激活和有关炎症。Collard等人(2000)报道了,经受氧化性应激的培养的內皮细胞结合MBL,并且在暴露于人血清后显示C3的沉积(Collard等人, *Am. J. Pathol.* 156:1549-1556, (2000))。另外,用阻断性抗MBL单克隆抗体处理人血清抑制MBL结合和补体激活。这些发现扩展到心肌缺血再灌注的大鼠模型,其中与用对照抗体治疗的大鼠相比,用针对大鼠MBL的阻断性抗体治疗的大鼠显示了在冠状动脉阻塞后显著更少的心肌损害(Jordan等人, *Circulation* 104:1413-1418, (2001))。在氧化性应激后MBL与血管內皮结合的分子机制尚不清楚;最近的研究提示了,在氧化性应激后凝集素途径的激活可能由MBL 与血管內皮细胞角蛋白的结合,而不是与糖缀合物的结合来介导(Collard等人, *Am. J. Pathol.* 159:1045-1054, (2001))。其它研究已牵涉缺血/再灌注损伤的发病机制中的经典途径和旁路途径,并且凝集素途径在该疾病中的作用仍然存在争议(Riedermann, N.C. 等人, *Am. J. Pathol.* 162:363-367, 2003)。

[0020] 最近的研究已显示了,需要MASP-1 (以及可能的MASP-3),以将旁路途径激活酶因子D从其酶原形式转换成其酶促活性形式(参见Takahashi M. 等人, *J. Exp. Med.* 207(1):29-37 (2010))。这个过程的生理重要性通过在MASP-1/3 缺陷小鼠的血浆中的旁路途径功能活性缺乏得到强调。C3b由天然C3的蛋白酶解生成是旁路途径发挥功能所需的。由于旁路途径C3转化酶(C3bBb)含有 C3b作为必需亚基,因此关于首个C3b经由旁路途径的起源的问题已提出了令人费解的问题,并且已激发了大量研究。

[0021] C3属于蛋白质家族(连同C4和 α -2巨球蛋白一起),其含有称为硫酯键的罕见的翻

译后修饰。硫酯基由谷氨酰胺组成,所述谷氨酰胺的末端羰基与三个氨基酸外的半胱氨酸的巯基形成共价硫酯键合。该键是不稳定的,并且亲电子谷氨酰-硫酯可以与亲核部分如羟基或氨基反应,并且因此与其它分子形成共价键。当在完整C3的疏水袋内隔离时,硫酯键是相当稳定的。然而,C3至C3a和C3b的蛋白酶解切割导致C3b上的高反应性硫酯键的暴露,并且在通过包含羟基或氨基的相邻部分的亲核攻击之后,C3b变得与靶共价连接。除其在C3b与补体靶的共价附着中的充分记录的作用之外,C3硫酯还被认为在触发旁路途径中具有关键作用。根据广泛公认的“缓慢运行理论(tick-over theory)”,旁路途径由液相转化酶iC3Bb的生成来启动,所述液相转化酶由C3与水解硫酯(iC3;C3(H₂O))和因子B形成(Lachmann,P.J.等人,Springer Semin. Immunopathol.7:143-162,(1984))。C3b样C3(H₂O)通过蛋白质的内部硫酯的缓慢自发水解由天然C3生成(Pangburn,M.K.等人,J.Exp.Med.154:856-867,1981)。通过C3(H₂O)Bb转化酶的活性,C3b分子在靶表面上沉积,从而启动旁路途径。

[0022] 关于旁路途径激活的引发剂知之甚少。激活物被认为包括酵母细胞壁(酵母聚糖)、许多纯多糖、兔红细胞、某些免疫球蛋白、病毒、真菌、细菌、动物肿瘤细胞、寄生虫和损害的细胞。这些激活物共同的唯一特征在于碳水化合物的存在,但碳水化合物结构的复杂性和多样性已使得难以建立识别的共享分子决定簇。已广泛公认的是旁路途径激活通过该途径的抑制性调控组分(例如因子H、因子I、DAF和CR1)与备解素(其为旁路途径的唯一正调节蛋白)之间的精细平衡加以控制(参见Schwaebble W.J.和Reid K.B.,Immunol Today 20(1):17-21(1999))。

[0023] 除上述明显不受调控的激活机制之外,旁路途径还可以对于凝集素/经典途径C3转化酶(C4b2a)提供强大的放大环,因为生成的任何C3b都可以与因子B一起参与形成另外的旁路途径C3转化酶(C3bBb)。旁路途径C3转化酶通过备解素的结合得到稳定。备解素将旁路途径C3转化酶的半衰期延长了6至10倍。向旁路途径C3转化酶添加C3b导致旁路途径C5转化酶的形成。

[0024] 所有三种途径(即,经典途径、凝集素途径和旁路途径)都被认为在C5处会聚,所述C5被切割以形成具有多种促炎效应的产物。会聚途径已被称为终末补体途径。C5a是最有力的过敏毒素,诱导平滑肌和血管紧张度以及血管通透性的改变。它也是强大的趋化因子以及嗜中性粒细胞和单核细胞两者的激活物。C5a介导的细胞活化可以通过诱导多种另外的炎症介质(包括细胞因子、水解酶、花生四烯酸代谢物和活性氧)的释放来显著放大炎症应答。C5裂解导致也称为膜攻击复合物(MAC)的C5b-9的形成。目前存在以下的有力证据:除其作为裂解性孔形成复合物的作用之外,亚裂解性MAC沉积可能在炎症中起重要作用。

[0025] 除其在免疫防御中的必需作用之外,补体系统还促成许多临床条件下的组织损害。因此,迫切需要开发治疗有效的补体抑制剂来预防这些不良作用。

发明内容

[0026] 提供该概述以简化形式介绍概念的选择,所述概念在下文具体实施方式中进一步描述。该概述并不预期鉴定所请求保护主题的关键特征,也不预期用作确定所请求保护主题的范围的帮助。

[0027] 在一个方面,本发明提供了治疗患有造血干细胞移植后的特发性肺炎综合征

(IPS) (HSCT-IPS) 的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活,并且从而改善HSCT-IPS的至少一种症状的量的 MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历同种异体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历自体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有特发性肺炎综合征 (IPS) 的人受试者。在一个实施方案中,患有特发性肺炎综合征 (IPS) 的受试者被确定为未患有DAH。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积。在一个实施方案中,将MASP-2抑制性抗体全身递送至受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向患有HSCT-IPS的受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其剂量为1mg/kg至10mg/kg (即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),每周至少一次 (例如每周至少两次或每周至少3次),共至少2周、或至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的时期。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约4mg/kg (即,3.6mg/kg至4.4mg/kg)。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约300mg至约450mg (即,约300mg至约400mg、或约350mg至约400mg),例如约300mg、约305mg、约310mg、约315mg、约320mg、约325mg、约330mg、约335mg、约340mg、约345mg、约350mg、约355mg、约360mg、约365mg、约370mg、约375mg、约380mg、约385mg、约390mg、约395mg、约400mg、约405mg、约410mg、约415mg、约420mg、约425mg、约430mg、约435mg、约440mg、约445mg或约450mg的固定剂量。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约370mg ($\pm 10\%$) 的固定剂量。在一个实施方案中,该方法包括向患有HSCT-IPS每周两次静脉内施用以约370mg ($\pm 10\%$) 的MASP-2抑制性抗体的固定剂量,共至少8周的治疗期。

[0028] 在另一个方面,本发明提供了治疗患有造血干细胞移植后的毛细血管渗漏综合征 (CLS) (HSCT-CLS) 的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活,并且从而改善HSCT-CLS的至少一种症状的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历同种异体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历自体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之

前,鉴定患有毛细血管渗漏综合征 (CLS) 的人受试者。在一个实施方案中,患有毛细血管渗漏综合征 (CLS) 的受试者被确定为未患有 VOD。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积。在一个实施方案中,将MASP-2抑制性抗体全身递送至受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向患有HSCT-CLS的受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其剂量为1mg/kg至10mg/kg (即,1mg/kg、2mg/kg、3 mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),每周至少一次 (例如每周至少两次或每周至少3次),共至少2周、或至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的时期。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约4mg/kg (即,3.6mg/kg至4.4mg/kg)。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约300mg至约450mg (即,约300 mg至约400mg、或约350mg至约400mg),例如约300mg、约305mg、约310mg、约315mg、约320mg、约325mg、约330mg、约335mg、约340mg、约345mg、约350mg、约355mg、约360mg、约365mg、约370mg、约375mg、约380mg、约385mg、约390mg、约395mg、约400mg、约405mg、约410mg、约415mg、约420mg、约425mg、约430mg、约435mg、约440mg、约445mg或约450mg的固定剂量。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约370mg ($\pm 10\%$) 的固定剂量。在一个实施方案中,该方法包括向患有HSCT-CLS的受试者每周两次静脉内施用以约370mg ($\pm 10\%$) 的MASP-2抑制性抗体的固定剂量,共至少8周的治疗期。

[0029] 在另一个方面,本发明提供了治疗患有造血干细胞移植后的液体超负荷 (F0) (HSCT-F0) 的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活,并且从而改善HSCT-F0的至少一种症状的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历同种异体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历自体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有液体超负荷 (F0) 的人受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积。在一个实施方案中,将MASP-2抑制性抗体全身递送至受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链

可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和 CDR-H3,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的 CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向患有HSCT-F0的受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其剂量为1mg/kg至10mg/kg(即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),每周至少一次(例如每周至少两次或每周至少3次),共至少2周、或至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的时期。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约4mg/kg(即,3.6mg/kg至4.4mg/kg)。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约300mg至约450mg(即,约300mg至约400mg、或约350mg至约400mg),例如约300mg、约305mg、约310mg、约315mg、约320mg、约325mg、约330mg、约335mg、约340mg、约345mg、约350mg、约355mg、约360mg、约365mg、约370mg、约375mg、约380mg、约385mg、约390mg、约395mg、约400mg、约405mg、约410mg、约415mg、约420mg、约425mg、约430mg、约435mg、约440mg、约445mg或约450mg的固定剂量。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约370mg($\pm 10\%$)的固定剂量。在一个实施方案中,该方法包括向患有HSCT-F0的受试者每周两次静脉内施用以约370mg($\pm 10\%$)的MASP-2抑制性抗体的固定剂量,共至少8周的治疗期。

[0030] 在另一个方面,本发明提供了治疗患有造血干细胞移植后的植入综合征(ES)(HSCT-ES)的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活,并且从而改善HSCT-ES的至少一种症状的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历同种异体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历自体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有移植后植入综合征(HSCT-ES)的人受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积。在一个实施方案中,将MASP-2抑制性抗体全身递送至受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向患有HSCT-ES的受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其

剂量为1mg/kg至10mg/kg (即, 1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg), 每周至少一次 (例如每周至少两次或每周至少3次), 共至少2周、或至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的时期。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约4mg/kg (即, 3.6mg/kg至4.4mg/kg)。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约300mg至约450mg (即, 约300mg至约400mg、或约350mg至约400mg), 例如约300mg、约305mg、约310mg、约315mg、约320mg、约325mg、约330mg、约335mg、约340mg、约345mg、约350mg、约355mg、约360mg、约365mg、约370mg、约375mg、约380mg、约385mg、约390mg、约395mg、约400mg、约405mg、约410mg、约415mg、约420mg、约425mg、约430mg、约435mg、约440mg、约445mg或约450mg的固定剂量。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约370mg ($\pm 10\%$) 的固定剂量。在一个实施方案中, 该方法包括向患有HSCT-ES的受试者每周两次静脉内施用以约370mg ($\pm 10\%$) 的MASP-2抑制性抗体的固定剂量, 共至少8周的治疗期。

[0031] 本发明的方法、组合物和药物可用于抑制哺乳动物受试者体内的MASP-2 依赖性补体激活的不良作用, 所述哺乳动物受试者包括患有或处于发展 HSCT-IPS (即, 干细胞移植后IPS) 的风险中的人, 和/或患有或处于发展 HSCT-CLS (即, 干细胞移植后CLS) 的风险中受试者, 和/或患有或处于发展 HSCT-FO (即, 干细胞移植后FO) 的风险中的受试者, 和或患有或处于发展 HSCT-ES (即, 干细胞移植后ES) 的风险中的受试者, 如本文进一步描述的。在另一个方面, 本发明提供了用于抑制MASP-2依赖性补体激活的不良作用的组合物, 其包含治疗有效量的MASP-2抑制剂, 例如MASP-2抑制性抗体和药学上可接受的载体。还提供了用于制造用于抑制有此需要的活受试者中的MASP-2依赖性补体激活的不良作用的药物的方法, 所述药物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂。还提供了用于制造用于抑制MASP-2 依赖性补体激活的药物的方法, 所述药物用于治疗本文下文所述的每种状况、疾病和病症。

附图说明

[0032] 本发明的前述方面和许多伴随的优点将变得更容易了解, 因为它们通过参考与附图结合获取的下述详细描述得到更好的理解, 在所述附图中:

[0033] 图1是说明人MASP-2的基因组结构的图解;

[0034] 图2A是说明人MASP-2蛋白的结构域结构的示意性图解;

[0035] 图2B是说明人MAp19蛋白的结构域结构的示意性图解;

[0036] 图3是说明鼠MASP-2敲除策略的图解;

[0037] 图4是说明人MASP-2小基因构建体的图解;

[0038] 图5A呈现的结果证实了, MASP-2缺陷导致凝集素途径介导的C4激活的丧失, 如通过甘露聚糖上的C4b沉积缺乏所测量的, 如实施例2中所述;

[0039] 图5B呈现的结果证实了, MASP-2缺陷导致凝集素途径介导的C4激活的丧失, 如通过酵母聚糖上的C4b沉积缺乏所测量的, 如实施例2中所述;

[0040] 图5C呈现的结果证实了, 从MASP-2+/-; MASP-2-/- 和野生型菌株获得的血清样品的相对C4激活水平; 如通过甘露聚糖和酵母聚糖上的C4b沉积所测量的, 如实施例2中所述;

[0041] 图6呈现的结果证实了, 向MASP-2-/- 血清样品中添加鼠重组MASP-2 以蛋白质浓

度依赖性方式恢复凝集素途径介导的C4激活,如通过甘露聚糖上的C4b沉积所测量的,如实施例2中所述;

[0042] 图7呈现的结果证实了,经典途径在MASP-2^{-/-}菌株中是有功能的,如实施例8中所述;

[0043] 图8A呈现的结果证实了,抗MASP-2 Fab2抗体#11抑制C3转化酶形成,如实施例10中所述;

[0044] 图8B呈现的结果证实了,抗MASP-2 Fab2抗体#11结合天然大鼠MASP-2,如实施例10中所述;

[0045] 图8C呈现的结果证实了,抗MASP-2 Fab2抗体#41抑制C4切割,如实施例10中所述;

[0046] 图9呈现的结果证实了,还发现抑制C3转化酶形成的测试的所有抗MASP-2 Fab2抗体抑制C4切割,如实施例10中所述;

[0047] 图10是说明衍生自大鼠MASP-2的重组多肽的图解,所述重组多肽用于抗MASP-2阻断性Fab2抗体的表位作图,如实施例11中所述;

[0048] 图11呈现的结果证实了,抗MASP-2 Fab2#40和#60与大鼠MASP-2多肽的结合,如实施例11中所述;

[0049] 图12呈现的结果证实了,在肾缺血/再灌注损伤模型中,在再灌注后的24和48小时,关于野生型(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠的血尿素氮清除率,如实施例12中所述;

[0050] 图13A呈现的结果显示了,从野生型(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠中分离的RPE-脉络膜复合体中的基线VEGF蛋白水平,如实施例13中所述;

[0051] 图13B呈现的结果显示了,在黄斑变性模型中的激光诱导的损伤之后,在野生型(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠中,在第3天的RPE-脉络膜复合体中的VEGF蛋白水平,如实施例13中所述;

[0052] 图14呈现的结果显示了,在野生型(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠中,在激光诱导的损伤之后,在第7天的平均脉络膜新生血管(CNV)体积,如实施例13中所述;

[0053] 图15A和15B呈现了在正常大鼠血清中施用MASP-2 Fab2抗体之后,关于C4b沉积的抑制(图15A)和凝血酶活化的抑制(图15B)的剂量应答曲线,如实施例14中所述;

[0054] 图16A和16B呈现了在弥散性血管内凝血的局限性施瓦茨曼反应模型中,与未治疗的野生型小鼠和其中补体途径被耗竭剂(depletory agent)眼镜蛇毒因子(CVF)和终末途径抑制剂(C5aR拮抗剂)抑制的野生型小鼠(图16A)中的血小板聚集相比,在MASP-2(-/-)小鼠(图16B)中测量的血小板聚集(表示为聚集面积),如实施例15中所述;

[0055] 图17以图形方式说明了,在WT(+/+) (B6)或WT(+/+)供体肾的MASP-2(-/-)移植受体小鼠中测量的血尿素氮(BUN)水平,如实施例16中所述;

[0056] 图18以图形方式说明了,根据盲肠结扎和穿刺(CLP)模型中的微生物感染后天数,WT(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠的百分比存活,如实施例17中所述;

[0057] 图19以图形方式说明了,在盲肠结扎和穿刺(CLP)模型中的微生物感染后,在WT(+/+)和MASP-2(-/-)中测量的细菌数目,如实施例17中所述;

[0058] 图20是Kaplan-Mayer图,其说明在用铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的鼻内施用攻击六天后,WT(+/+)、MASP-2(-/-)和C3(-/-)小鼠的百分比存活,如实施例18中所述;

[0059] 图21以图形方式说明了,在WT小鼠中,在0.3mg/kg或1.0mg/kg小鼠抗MASP-2单克隆抗体的皮下给药后的不同时间点获取的样品中,作为对照%测量的C4b沉积水平,如实施例19中所述;

[0060] 图22以图形方式说明了,在WT小鼠中,在0.6mg/kg小鼠抗MASP-2 单克隆抗体的ip给药后的不同时间点获取的样品中,作为对照%测量的C4b 沉积水平,如实施例19中所述;

[0061] 图23以图形方式说明了,在用0.3mg/kg或1.0mg/kg小鼠抗MASP-2单克隆抗体的单次ip注射预治疗的WT(+/+)小鼠中,在激光诱导的损伤之后,在第7天的平均脉络膜新生血管(CNV)体积;如实施例20中所述;

[0062] 图24A以图形方式说明了,在由 5×10^8 /100 μ l cfu脑膜炎奈瑟球菌(*N. meningitidis*)感染后,MASP-2(-/-)和WT(+/+)小鼠的百分比存活,如实施例21中所述;

[0063] 图24B以图形方式说明了,在从由 5×10^8 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟球菌感染的MASP-2 KO(-/-)和WT(+/+)小鼠获取的血液样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌的log cfu/ml,如实施例21中所述;

[0064] 图25A以图形方式说明了,在由 2×10^8 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟球菌感染后, MASP-2 KO(-/-)和WT(+/+)小鼠的百分比存活,如实施例21中所述;

[0065] 图25B以图形方式说明了,在从由 2×10^8 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟球菌感染的WT(+/+)小鼠获取的血液样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌的log cfu/ml,如实施例21中所述;

[0066] 图25C以图形方式说明了,在从由 2×10^8 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟球菌感染的MASP-2(-/-)小鼠获取的血液样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌的log cfu/ml,如实施例21中所述;

[0067] 图26A以图形方式说明了,证实了MASP-2(-/-)小鼠保留功能性经典途径的C3b沉积测定的结果,如实施例22中所述;

[0068] 图26B以图形方式说明了,证实了MASP-2(-/-)小鼠保留功能性旁路途径、在酵母聚糖包被的板上的C3b沉积测定的结果,如实施例22中所述;

[0069] 图27A以图形方式说明了,在C4(-/-)小鼠(n=6)和匹配的WT同窝仔畜对照(n=7)中,在冠状动脉左前降支(LAD)的结扎和再灌注之后,心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)诱导的组织损失,显示了危险区域(AAR)和梗塞面积(INF),如实施例22中所述;

[0070] 图27B以图形方式说明了,在如图42A中所述治疗的C4(-/-)和WT小鼠中,根据危险区域(AAR)的梗塞面积(INF),证实了C4(-/-)小鼠与WT对照(虚线)一样对MIRI敏感,如实施例22中所述;

[0071] 图28A以图形方式说明了,使用来自WT小鼠、C4(-/-)小鼠的血清、以及与甘露聚糖预温育的来自C4(-/-)小鼠的血清的C3b沉积测定的结果,如实施例22中所述;

[0072] 图28B以图形方式说明了,关于与各种浓度的抗鼠MASP-2 mAb (mAbM11)混合的血清的C3b沉积测定的结果,所述血清来自WT、C4(-/-)和 MASP-2(-/-)小鼠,如实施例22中所述;

[0073] 图28C以图形方式说明了,关于来自WT(C4充足的)的人血清和C4缺陷血清、以及与甘露聚糖预温育的来自C4缺陷受试者的血清的C3b沉积测定的结果,如实施例22中所述;

[0074] 图28D以图形方式说明了,关于与抗人MASP-2 mAb (mAbH3)混合的、来自WT(C4充足

的)和C4缺陷受试者的人血清的C3b沉积测定的结果,如实施例22中所述;

[0075] 图29A以图形方式说明了,来自各种补体缺陷小鼠品系的血浆中的C3 转化酶活性的比较分析,所述血浆在凝集素激活途径特异性测定条件下、或在经典激活途径特异性测定条件下进行测试,如实施例22中所述;

[0076] 图29B以图形方式说明了,来自各种补体缺陷小鼠品系的血浆中的C3 转化酶活性的时间分辨动力学,所述血浆在凝集素激活途径特异性条件下进行测试,如实施例22中所述;

[0077] 图30说明了蛋白质印迹分析的结果,其显示了通过凝血酶底物FXIa和 FXa的人C3 激活,其通过a'链的存在显示,如实施例23中所述;

[0078] 图31显示了关于从WT、MASP-2 (-/-)、F11 (-/-)、F11 (-/-)/C4 (-/-)和C4 (-/-) 获得的血清样品的C3沉积测定结果,如实施例23中所述;

[0079] 图32A是Kplain-Meier存活图,其显示了在对照小鼠、以及用抗鼠MASP-2 抗体(mAbM11)或抗人MASP-2抗体(mAbH6)治疗的小鼠中,在暴露于7.0Gy 辐射后,随着时间过去的百分比存活,如实施例29中所述;

[0080] 图32B是Kplain-Meier存活图,其显示了在对照小鼠、以及用抗鼠MASP-2 抗体(mAbM11)或抗人MASP-2抗体(mAbH6)治疗的小鼠中,在暴露于6.5Gy 辐射后,随着时间过去的百分比存活,如实施例29中所述;

[0081] 图33是Kaplan-Meyer图,其以图形方式说明了,在施用 2.6×10^7 cfu脑膜炎奈瑟球菌血清群A Z2491的感染剂量后,MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活,证实了MASP-2缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌诱导的死亡率,如实施例30中所述;

[0082] 图34是Kaplan-Meyer图,其以图形方式说明了,在施用 6×10^6 cfu脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的感染剂量后,MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活,证实了MASP-2缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58诱导的死亡率,如实施例30中所述;

[0083] 图35以图形方式说明了,在由 6×10^6 cfu脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株 MC58的i.p.感染后,在从MASP-2 KO和WT小鼠获取的血液样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的log cfu/ml (对于两组小鼠在不同时间点n=3,结果表示为平均值±SEM),证实了尽管MASP-2 KO 小鼠用与WT小鼠相同剂量的脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58进行感染,MASP-2 KO小鼠仍具有与WT相比增强的菌血症清除率,如实施例30中所述;

[0084] 图36以图形方式说明了,在由 6×10^6 cfu/100μl脑膜炎奈瑟球菌血清群B 菌株MC58感染后的3、6、12和24小时,MASP-2和WT小鼠的平均疾病评分,证实了MASP-2缺陷小鼠显示对感染的高抗性,具有在6小时低得多的疾病评分,如实施例30中所述;

[0085] 图37是Kaplan-Meyer图,其以图形方式说明了,在施用 4×10^6 /100μl cfu 脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的感染剂量,随后为感染后3小时施用抑制性抗MASP-2抗体(1mg/kg)或对照同种型抗体之后小鼠的百分比存活,其证实了抗MASP-2抗体有效治疗由脑膜炎奈瑟球菌感染的受试者且改善所述受试者的存活,如实施例31中所述;

[0086] 图38以图形方式说明了,在以下的存在下温育后0、30、60和90分钟,在由 6.5×10^6 cfu/100μl脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的i.p.感染后,在 20%人血清浓度下,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌血清群B-MC58的活菌计数的log cfu/ml: (A) 正常人血清(NHS)加上人抗MASP-2抗体; (B) 正常人血清(NHS)加上同种型对照抗体; (C) MBL-/-

人血清；(D) 正常人血清 (NHS) 和 (E) 热灭活的正常人血清 (NHS)，其显示了通过添加人抗 MASP-2 抗体显著增强了人血清中的脑膜炎奈瑟球菌的补体依赖性杀死，如实施例 32 中所述；

[0087] 图 39 以图形方式说明了，在小鼠血清样品中，在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌血清群 B-MC58 的活菌计数的 $\log$ cfu/ml，其证实了与 WT 小鼠血清相比，MASP-2^{-/-} 小鼠血清对于脑膜炎奈瑟球菌具有更高水平的杀菌活性，如实施例 32 中所述；

[0088] 图 40 以图形方式说明了，在一系列的血清浓度下，甘露聚糖包被的鼠红细胞通过人血清的溶血 (如通过光度测定法测量的，通过裂解的小鼠红细胞 (Crry/C3^{-/-}) 释放到上清液内的血红蛋白测量的)。测试的血清包括热灭活的 (HI) NHS、MBL^{-/-}、NHS+抗 MASP-2 抗体和 NHS 对照，如实施例 33 中所述；

[0089] 图 41 以图形方式说明了，在一系列的血清浓度下，未包被的鼠红细胞通过人血清的溶血 (如通过光度测定法测量的，通过裂解的 WT 小鼠红细胞释放到上清液内的血红蛋白测量的)。测试的血清包括热灭活的 (HI) NHS、MBL^{-/-}、NHS+抗 MASP-2 抗体和 NHS 对照，其证实了抑制 MASP-2 抑制了补体介导的未致敏 WT 小鼠红细胞的裂解，如实施例 33 中所述；

[0090] 图 42 以图形方式说明了，在一系列的血清浓度下，未包被的鼠红细胞通过人血清的溶血 (如通过光度测定法测量的，通过裂解的小鼠红细胞 (CD55/59^{-/-}) 释放到上清液内的血红蛋白测量的)。测试的血清包括热灭活的 (HI) NHS、MBL^{-/-}、NHS+抗 MASP-2 抗体和 NHS 对照，如实施例 33 中所述；

[0091] 图 43 以图形方式说明了，在对照小鼠和用抗人 MASP-2 抗体 (mAbH6) 治疗的小鼠中，在暴露于 8.0Gy 辐射后，随着时间过去 (天) 的百分比存活，如实施例 34 中所述；

[0092] 图 44 以图形方式说明了，在 MASP-2^{-/-} 和 WT 小鼠中，在 LPS 注射之后微血管阻塞开始的时间，其显示了在 60 分钟内测量的具有血栓形成的小鼠百分比，证实了在 WT 小鼠中在 15 分钟后检测到血栓形成，其中高达 80% 的 WT 小鼠证实了在 60 分钟的血栓形成；相比之下，MASP-2^{-/-} 小鼠无一显示了在 60 分钟期间的任何血栓形成 (时序: $p=0.0005$)，如实施例 35 中所述；

[0093] 图 45 以图形方式说明了，随着时间过去 (小时)，在 STX/LPS 诱导的 HUS 模型中，盐水治疗的对照小鼠 ($n=5$) 和抗 MASP-2 抗体治疗的小鼠 ($n=5$) 的百分比存活，其证实了所有对照小鼠到 42 小时都死亡，而相比之下，100% 的抗 MASP-2 抗体治疗的小鼠在实验的时间过程自始至终都存活，如实施例 36 中所述；

[0094] 图 46 以图形方式说明了，根据损伤诱导后的时间，在用 FITC/葡聚糖注射前 16 小时和 1 小时给药的同种型对照或人 MASP-2 抗体 mAbH6 (10mg/kg) 治疗后，在 FITC/葡聚糖 UV 模型中具有微血管阻塞的小鼠百分比，如实施例 37 中所述；

[0095] 图 47 以图形方式说明了，对于用人 MASP-2 抗体 (mAbH6) 和同种型对照抗体治疗的小鼠，按分钟计的阻塞时间，其中数据报告为具有平均值 (水平条) 和标准误差 (垂直条) 的散点。用于分析的统计检验是非配对 t 检验；其中符号 “*” 指示了 $p=0.0129$ ，如实施例 37 中所述；和

[0096] 图 48 以图形方式说明了，对于野生型小鼠、MASP-2 KO 小鼠、以及用人 MASP-2 抗体 (mAbH6) 预治疗的野生型小鼠 (所述抗体在用低光强度 (800-1500) 的 FITC-葡聚糖/光诱导的血栓形成的内皮细胞损伤模型中的血栓形成诱导前 16 小时、以及再次在诱导前 1 小时以

10mg/kg i.p.施用),按分钟计直至阻塞的时间。如实施例37中所述;

[0097] 图49是Kaplan-Meier图,其显示了在用渐增剂量的人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)或同种型对照抗体治疗的小鼠中,在FITC-葡聚糖诱导的血栓性微血管病中,根据时间具有血栓的小鼠的百分比,如实施例39中所述;

[0098] 图50以图形方式说明了,根据mAbH6剂量的血栓形成开始的中值时间(分钟)(与对照相比 $*p < 0.01$),如实施例39中所述;

[0099] 图51是Kaplan-Meier图,其显示了在用渐增剂量的人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)或同种型对照抗体治疗的小鼠中,在FITC-葡聚糖诱导的血栓性微血管病中,根据时间具有微血管阻塞的小鼠的百分比,如实施例39中所述;

[0100] 图52以图形方式说明了,根据mAbH6剂量的微血管阻塞的中值时间(与对照相比 $*p < 0.05$),如实施例39中所述;

[0101] 图53A以图形方式说明了,在凝集素途径特异性测定条件下,在人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉积水平,其证实了OMS646以大约1nM的 IC_{50} 值抑制凝集素介导的MAC沉积,如实施例40中所述;

[0102] 图53B以图形方式说明了,在经典途径特异性测定条件下,在人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉积水平,其证实了OMS646并不抑制经典途径介导的MAC沉积,如实施例40中所述;

[0103] 图53C以图形方式说明了,在旁路途径特异性测定条件下,在人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的存在或不存在下的MAC沉积水平,其证实了OMS646并不抑制旁路途径介导的MAC沉积,如实施例40中所述;

[0104] 图54以图形方式说明了,人MASP-2单克隆抗体(OMS646)在小鼠中的药代动力学(PK)曲线,其显示了在以指示剂量的施用后,根据时间的OMS646浓度($n=3$ 只动物/组的平均值),如实施例40中所述;

[0105] 图55A以图形方式说明了,人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的药效学(PD)应答,其测量为在静脉内施用之后小鼠中的全身凝集素途径活性的下降,如实施例40所述;

[0106] 图55B以图形方式说明了,人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的药效学(PD)应答,其测量为在皮下施用之后小鼠中的全身凝集素途径活性的下降,如实施例40所述;

[0107] 图56以图形方式说明了,与sCR1相比,MASP-2抗体(OMS646)对aHUS血清诱导的在ADP活化的HMEC-1细胞上的C5b-9沉积的抑制作用,如实施例41中所述;

[0108] 图57以图形方式说明了,与sCR1相比,MASP-2抗体(OMS646)对aHUS血清诱导的在ADP活化的HMEC-1细胞上的血栓形成的抑制作用,如实施例42中所述;

[0109] 图58以图形方式说明了,在用MASP-2抑制性抗体(OMS646)治疗后,在患有持续性造血干细胞移植相关血栓性微血管病(HSCT-TMA)的受试者中,随着时间过去(周),血小板计数距离基线的平均变化,如实施例46中所述;

[0110] 图59以图形方式说明了,在用MASP-2抑制性抗体(OMS646)治疗后,在患有持续性(HSCT-TMA)的受试者中,随着时间过去(周),LDH距离基线的平均变化,如实施例46中所述;

[0111] 图60以图形方式说明了,在用MASP-2抑制性抗体(OMS646)治疗后,在患有持续性(HSCT-TMA)的受试者中,随着时间过去(周),结合珠蛋白距离基线的平均变化,如实施例46中所述;

[0112] 图61显示了造血干细胞移植 (HSCT) 后发展HSCT-TMA和移植物抗宿主病 (GVHD) 的患者的临床过程,其证实了在用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗后,HSCT-TMA、GVHD的改善和神经系统症状的改善,如实施例47中所述;

[0113] 图62A以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的肌酐水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始,如实施例48中所述;

[0114] 图62B以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的结合珠蛋白水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始,如实施例48中所述;

[0115] 图62C以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的血红蛋白水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始,如实施例48中所述;

[0116] 图62D以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的LDH 水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始,如实施例48中所述;

[0117] 图62E以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的血小板水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始,如实施例48中所述;

[0118] 序列表的描述

[0119] SEQ ID NO:1人MAp19 cDNA

[0120] SEQ ID NO:2人MAp19蛋白 (具有前导区)

[0121] SEQ ID NO:3人MAp19蛋白 (成熟的)

[0122] SEQ ID NO:4人MASP-2 cDNA

[0123] SEQ ID NO:5人MASP-2蛋白 (具有前导区)

[0124] SEQ ID NO:6人MASP-2蛋白 (成熟的)

[0125] SEQ ID NO:7人MASP-2 gDNA (外显子1-6)

[0126] 抗原: (参考MASP-2成熟蛋白)

[0127] SEQ ID NO:8 CUBI序列 (aa 1-121)

[0128] SEQ ID NO:9 CUBEGF序列 (aa 1-166)

[0129] SEQ ID NO:10 CUBEGFCUBII (aa 1-293)

[0130] SEQ ID NO:11 EGF区 (aa 122-166)

[0131] SEQ ID NO:12丝氨酸蛋白酶结构域 (aa 429-671)

[0132] SEQ ID NO:13无活性的丝氨酸蛋白酶结构域 (具有Ser618至Ala突变的 aa 610-625)

[0133] SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL (CUB1肽)

[0134] SEQ ID NO:15 TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (CUBI肽)

[0135] SEQ ID NO:16 TFRSDYSN (MBL结合区核心)

[0136] SEQ ID NO:17 FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL结合区)

[0137] SEQ ID NO:18 IDECQVAPG (EGF肽)

[0138] SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALV (丝氨酸蛋白酶结合核心)

[0139] 肽抑制剂:

[0140] SEQ ID NO:20 MBL全长cDNA

[0141] SEQ ID NO:21 MBL全长蛋白

[0142] SEQ ID NO:22 OGK-X-GP (共有结合)

- [0143] SEQ ID NO:23 OGKLG
- [0144] SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPQ GKL GPQ G
- [0145] SEQ ID NO:25 GPQ GPQ GLR GLQ GPQ GKL GPQ GPQ GPQ
- [0146] SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPPGQGLRGLQGPGKLGPGQ
- [0147] SEQ ID NO:27 GAOGSOGKGAOGPPGPGPGKMGPKGEODD (人 h-纤维胶凝蛋白)
- [0148] SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPGPGKAGPGPNGAOGEO (人纤维胶凝蛋白35)
- [0149] SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (C4切割位点)
- [0150] 表达抑制剂:
- [0151] SEQ ID NO:30 CUBI-EGF结构域 (SEQ ID NO:4的核苷酸22-680) 的cDNA
- [0152] SEQ ID NO:31
- [0153] 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCCTCCTGGGC 3' SEQ ID NO:4 的核苷酸12-45, 包括MASP-2翻译起始位点 (有义)
- [0154] SEQ ID NO:32
- [0155] 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' SEQ ID NO:4的核苷酸361-396, 编码包含MASP-2 MBL结合位点的区域 (有义)
- [0156] SEQ ID NO:33
- [0157] 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3' SEQ ID NO:4的核苷酸610-642, 编码包含CUBII结构域的区域
- [0158] 克隆引物:
- [0159] SEQ ID NO:34 CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (用于CUB的5' PCR)
- [0160] SEQ ID NO:35 GGAATTCCTAGGCTGCATA (用于CUB的3' PCR)
- [0161] SEQ ID NO:36 GGAATTCCTACAGGGCGCT (用于CUBIEGF的3' PCR)
- [0162] SEQ ID NO:37 GGAATTCCTAGTAGTGGAT (用于CUBIEGFCUBII的3' PCR)
- [0163] SEQ ID NO:38-47是用于人源化抗体的克隆引物
- [0164] SEQ ID NO:48是9aa肽键
- [0165] 表达载体:
- [0166] SEQ ID NO:49是MASP-2小基因插入物
- [0167] SEQ ID NO:50是鼠MASP-2 cDNA
- [0168] SEQ ID NO:51是鼠MASP-2蛋白 (w/前导区)
- [0169] SEQ ID NO:52是成熟的鼠MASP-2蛋白
- [0170] SEQ ID NO:53大鼠MASP-2 cDNA
- [0171] SEQ ID NO:54是大鼠MASP-2蛋白 (w/前导区)
- [0172] SEQ ID NO:55是成熟的大鼠MASP-2蛋白
- [0173] SEQ ID NO:56-59是用于生成人MASP-2A的人MASP-2的定点诱变的寡核苷酸
- [0174] SEQ ID NO:60-63是用于生成鼠MASP-2A的鼠MASP-2的定点诱变的寡核苷酸
- [0175] SEQ ID NO:64-65是用于生成大鼠MASP-2A的大鼠MASP-2的定点诱变的寡核苷酸
- [0176] SEQ ID NO:66编码17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 重链可变区 (VH) (不含信号肽) 的DNA

- [0177] SEQ ID NO:67 17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 重链可变区 (VH) 多肽
[0178] SEQ ID NO:68 17N16mc重链可变区 (VH) 多肽
[0179] SEQ ID NO:69:编码17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 轻链可变区 (VL) 的DNA
[0180] SEQ ID NO:70:17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 轻链可变区 (VL) 多肽
[0181] SEQ ID NO:71:17N16_dc17N9轻链可变区 (YL) 多肽

具体实施方式

[0182] 本发明基于通过本发明人的以下惊人发现:抑制凝集素介导的MASP-2 途径,同时使经典途径保持完整是可能的。本发明还描述了使用MASP-2作为治疗靶用于抑制与凝集素介导的补体途径激活相关的细胞损伤,同时保持免疫系统的经典 (C1q依赖性) 途径组分完整。

[0183] I. 定义

[0184] 除非本文具体定义,否则本文使用的所有术语都具有与由本发明领域的普通技术人员理解相同的含义。提供下述定义以便提供关于在说明书和权利要求中用于描述本发明的术语的清晰性。

[0185] 如本文使用的,术语“MASP-2依赖性补体激活”包含凝集素途径的 MASP-2依赖性激活,其在导致凝集素途径C3转化酶C4b2a形成的生理条件下(即,在Ca⁺⁺的存在下),以及在C3切割产物C3b随后累积到C5转化酶 C4b2a (C3b) n后发生,所述C5转化酶已确定为主要引起调理作用。

[0186] 如本文使用的,术语“旁路途径”指例如由以下触发的补体激活:来自真菌和酵母细胞壁的酵母聚糖、来自革兰氏阴性外膜的脂多糖 (LPS) 和兔红细胞,以及许多纯多糖、兔红细胞、病毒、细菌、动物肿瘤细胞、寄生虫和损害的细胞,并且其在传统上已被认为起于C3b由补体因子C3的自发蛋白酶解生成。

[0187] 如本文使用的,术语“凝集素途径”指经由血清和非血清碳水化合物结合蛋白的特异性结合而发生的补体激活,所述蛋白包括甘露聚糖结合凝集素 (MBL)、CL-11和纤维胶凝蛋白 (H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白或L-纤维胶凝蛋白)。

[0188] 如本文使用的,术语“经典途径”指由与外来颗粒结合的抗体触发并且需要识别分子C1q的结合的补体激活。

[0189] 如本文使用的,术语“MASP-2抑制剂”指与MASP-2结合或直接相互作用并有效抑制MASP-2依赖性补体激活的任何药剂,包括抗MASP-2抗体及其 MASP-2结合片段、天然和合成肽、小分子、可溶性MASP-2受体、表达抑制剂和分离的天然抑制剂,并且还包含与MASP-2竞争结合凝集素途径中的另一种识别分子(例如MBL、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白或L-纤维胶凝蛋白)的肽,但并不包含与此类其它识别分子结合的抗体。可用于本发明的方法中的MASP-2抑制剂可以将MASP-2依赖性补体激活减少大于20%,例如大于50%,例如大于90%。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂将MASP-2 依赖性补体激活减少大于90%(即,导致仅10%或更少的MASP-2补体激活)。

[0190] 如本文使用的,术语“抗体”包含衍生自任何产生抗体的哺乳动物(例如,小鼠、大鼠、兔和灵长类动物包括人),或者衍生自杂交瘤、噬菌体选择、重组表达或转基因动物(或者产生抗体或抗体片段的其它方法”)的抗体及其抗体片段,其与靶多肽例如MASP-2多肽或

其一部分特异性结合。并不预期术语“抗体”关于抗体的来源或它以其进行制备的方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物、肽合成等)进行限制。示例性抗体包括多克隆、单克隆和重组抗体;泛特异性、多特异性抗体(例如,双特异性抗体、三特异性抗体);人源化抗体;鼠抗体;嵌合、小鼠-人、小鼠-灵长类动物、灵长类动物-人单克隆抗体;和抗独特型抗体,并且可以是任何完整抗体或其片段。如本文使用的,术语“抗体”不仅包含完整的多克隆或单克隆抗体,还包含其片段(例如dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其合成变体、天然存在的变体、包含具有所需特异性的抗原结合片段的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体、嵌合抗体、以及包含具有所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型。

[0191] “单克隆抗体”指同质性抗体群体,其中所述单克隆抗体由涉及表位的选择性结合的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)构成。单克隆抗体对于靶抗原是高度特异性的。术语“单克隆抗体”不仅包含完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,还包含其片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其变体、包含抗原结合部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体、以及包含具有所需特异性的抗原结合片段(表位识别位点)的免疫球蛋白分子的任何其它修饰构型。并不预期关于抗体的来源或它以其进行制备的方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)进行限制。该术语包括完整的免疫球蛋白以及上文在“抗体”的定义下描述的片段等。

[0192] 如本文使用的,术语“抗体片段”指衍生自或涉及全长抗体例如抗MASP-2 抗体的一部分,一般包括其抗原结合区或可变区。抗体片段的说明性实例包括Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂和Fv片段,scFv片段,双抗体,线性抗体,单链抗体分子以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0193] 如本文使用的,“单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。一般地,Fv多肽进一步包含在V_H和V_L结构域之间的多肽接头,其致使scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。

[0194] 如本文使用的,“嵌合抗体”是这样的重组蛋白,其含有衍生自非人物种(例如啮齿类动物)抗体的可变结构域和互补决定区,而抗体分子的剩余部分衍生自人抗体。

[0195] 如本文使用的,“人源化抗体”是包含最小序列的嵌合抗体,所述最小序列符合衍生自非人免疫球蛋白的特异性互补决定区,所述互补决定区移植到人抗体构架内。人源化抗体通常为其中仅抗体互补决定区具有非人起源的重组蛋白。

[0196] 如本文使用的,术语“甘露聚糖结合凝集素”(“MBL”)等价于甘露聚糖结合蛋白(“MBP”)。

[0197] 如本文使用的,“膜攻击复合物”(“MAC”)指终末五种补体组分(与C6、C7、C8和C9组合的C5b)的复合物(也称为C5b)9),所述复合物插入膜内并破坏膜。

[0198] 如本文使用的,“受试者”包括所有哺乳动物,包括但不限于人、非人灵长类动物、犬、猫、马、绵羊、山羊、牛、兔、猪和啮齿类动物。

[0199] 如本文使用的,氨基酸残基如下进行缩写:丙氨酸(Ala;A)、天冬酰胺(Asn;N)、天冬氨酸(Asp;D)、精氨酸(Arg;R)、半胱氨酸(Cys;C)、谷氨酸(Glu;E)、谷氨酰胺(Gln;Q)、甘氨酸(Gly;G)、组氨酸(His;H)、异亮氨酸(Ile;I)、亮氨酸(Leu;L)、赖氨酸(Lys;K)、甲硫氨酸(Met;M)、苯丙氨酸(Phe;F)、脯氨酸(Pro;P)、丝氨酸(Ser;S)、苏氨酸(Thr;T)、色氨酸

(Trp;W)、酪氨酸(Tyr;Y)和缬氨酸(Val;V)。

[0200] 在最广泛的意义上,天然存在的氨基酸可以基于分别氨基酸的侧链的化学特性进行分组。“疏水”氨基酸意指Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val、Ala、Cys或Pro。“亲水”氨基酸意指Gly、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、Arg或His。这个氨基酸分组可以如下进一步细分。“非荷电的亲水”氨基酸意指Ser、Thr、Asn或Gln。“酸性”氨基酸意指Glu或Asp。“碱性”氨基酸意指Lys、Arg或His。

[0201] 如本文使用的,术语“保守氨基酸取代”通过下述组各自内的氨基酸中的取代进行说明:(1)甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,(2)苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸,(3)丝氨酸和苏氨酸,(4)天冬氨酸和谷氨酸,(5)谷氨酰胺和天冬酰胺,以及(6)赖氨酸、精氨酸和组氨酸。

[0202] 如本文使用的,术语“寡核苷酸”指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)或其模拟物的寡聚物或聚合物。该术语还涵盖由天然存在的核苷酸、糖和共价核苷间(主链)键合构成的那些寡核碱基(oligonucleobase),以及具有非天然存在的修饰的寡核苷酸。

[0203] 如本文使用的,“表位”指蛋白质(例如,人MASP-2蛋白质)上由抗体结合的位点。“重叠表位”包括至少一个(例如,两个、三个、四个、五个或六个)共同氨基酸残基,包括线性表位和非线性表位。

[0204] 如本文使用的,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,并且意指任何肽连接的氨基酸链,不管长度或翻译后修饰如何。本文所述的MASP-2蛋白可以含有或可以是野生型蛋白,或者可以是具有不多于50个(例如,不多于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40或50个)保守氨基酸取代的变体。保守取代通常包括在下述组内的取代:甘氨酸和丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸;天冬氨酸和谷氨酸;天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸;赖氨酸、组氨酸和精氨酸;以及苯丙氨酸和酪氨酸。

[0205] 在一些实施方案中,人MASP-2蛋白可以具有这样的氨基酸序列,其与具有SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列的人MASP-2蛋白具有其或大于70(例如,71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100)%的同一性。

[0206] 在一些实施方案中,肽片段的长度可以是至少6个(例如,至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500或600个或更多个)氨基酸残基(例如,SEQ ID NO:5的至少6个邻接氨基酸残基)。在一些实施方案中,人MASP-2蛋白的抗原性肽片段的长度少于500个(例如,少于450、400、350、325、300、275、250、225、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7或6个)氨基酸残基(例如,在SEQ ID NO:5的任何一个中少于500个邻接氨基酸残基)。

[0207] 百分比(%)氨基酸序列同一性定义为在比对序列并在必要时引入空位以实现最大百分比序列同一性后,候选序列中与参考序列中的氨基酸相同的氨基酸的百分比。用于确定百分比序列同一性的目的的比对可以以在本领域技术内的各种方式来实现,例如,使

用可公开获得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR) 软件。可以通过已知方法确定用于测量比对的适当参数,包括在待比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0208] II. 发明概述

[0209] 凝集素 (MBL、M-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白、L-纤维胶凝蛋白和 CL-11) 是触发先天补体系统的特异性识别分子,并且该系统包括凝集素起始途径和相关的终末途径放大环,其放大凝集素启动的终末补体效应分子激活。C1q是触发获得性补体系统的特异性识别分子,并且该系统包括经典起始途径和相关的终末途径放大环,其放大C1q启动的终末补体效应分子激活。我们将这两种主要的补体激活系统分别称为凝集素依赖性补体系统和C1q依赖性补体系统。

[0210] 除其在免疫防御中的重要作用之外,补体系统还在许多临床条件下促成组织损害。因此,迫切需要开发治疗上有效的补体抑制剂,以预防这些不良作用。伴随可能抑制凝集素介导的MASP-2途径,同时使经典途径保持完整的认识,意识到仅特异性抑制引起特定病理状况的补体激活系统,而不完全关闭补体的免疫防御能力将是高度期望的。例如,在其中补体激活占优势地由凝集素依赖性补体系统介导的疾病状态中,仅特异性抑制该系统将是有利的。这使C1q依赖性补体激活系统保持完整,以处理免疫复合物加工并帮助针对感染的宿主防御。

[0211] 在特异性抑制凝集素依赖性补体系统的治疗剂的开发中靶向的优选蛋白质组分是MASP-2。在凝集素依赖性补体系统的所有已知蛋白质组分 (MBL、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白、L-纤维胶凝蛋白、MASP-2、C2-C9、因子B、因子D和备解素) 中,仅MASP-2既是凝集素依赖性补体系统所独有的,也是该系统发挥功能所需的。凝集素 (MBL、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白、L-纤维胶凝蛋白和CL-11) 也是凝集素依赖性补体系统中的独特组分。然而,由于凝集素冗余,任何一种凝集素组分的丧失不一定抑制系统的激活。有必要抑制所有五种凝集素,以便保证凝集素依赖性补体激活系统的抑制。此外,由于MBL和纤维胶凝蛋白还已知具有补体不依赖性调理活性,因此凝集素功能的抑制将导致针对感染的这种有益的宿主防御机制的丧失。相比之下,如果MASP-2是抑制靶,则这种补体不依赖性凝集素调理活性将保持完整。MASP-2作为抑制凝集素依赖性补体激活系统的治疗靶的附加益处在于MASP-2的血浆浓度是任何补体蛋白中最低的 ($\approx 500\text{ng/ml}$); 因此, MASP-2 的高亲和力抑制剂的相应低浓度可能足以获得完全抑制 (Moller-Kristensen, M. 等人, J. Immunol Methods 282:159-167, 2003)。

[0212] III. MASP-2在血栓性微血管病中的作用和使用MASP-2抑制剂的治疗方法

[0213] 概述

[0214] 血栓性微血管病 (TMA) 是特征在于小血管中的血块的病理状况 (Benz, K.; 等人, Curr Opin Nephrol Hypertens 19(3):242-7 (2010))。对潜在血管内皮的应激或损伤被视为主要驱动因素。TMA的临床和实验室发现包括血小板减少症、贫血、紫癜和肾衰竭。经典的TMA是溶血性尿毒症综合征 (HUS) 和血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)。TMA的特征性潜在病理特征在于血小板活化以及小动脉和小静脉中的微血栓形成。补体激活至少部分由对微血管内皮的损伤或应激启动,也牵涉其它TMA包括灾难性抗磷脂综合征 (CAPS), 全身性德戈斯病, 以及继发于癌症、癌症化学疗法和移植的TMA。

[0215] 通过具有特异性补体组分的遗传缺陷的患者的研究提供了关于补体在许多肾炎中的病理作用的直接证据。许多报道已记录了肾损伤与补体调节因子H 的缺陷的相关 (Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M. 等人, *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C. 等人, *Nat. Genet.* 31:424-8, 2002)。由于这些组分的激活相关消耗, 因子H 缺陷导致因子B和C3的低血浆水平。C5b-9的循环水平在这些患者的血清中也是升高的, 暗示补体激活。膜增生性肾小球肾炎 (MPGN) 和特发性溶血性尿毒症综合征 (HUS) 均与因子H 缺陷或因子H的突变相关。因子H缺陷猪 (Jansen, J.H. 等人, *Kidney Int.* 53:331-49, 1998) 和因子H敲除小鼠 (Pickering, M.C., 2002) 展示MPGN样症状, 确认了因子H在补体调控中的重要性。其它补体组分的缺陷与继发于系统性红斑狼疮 (SLE) 发展的肾病相关 (Walport, M.J., Davies 等人, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997)。经由与免疫复合物和细胞凋亡材料的缺陷清除有关的机制, 关于C1q、C4和C2的缺陷强烈倾向于SLE的发展。在这些SLE患者的许多中发生狼疮性肾炎, 其特征在于免疫复合物在肾小球各处的沉积。

[0216] aHUS

[0217] 非典型溶血性尿毒症综合征 (aHUS) 是称为“血栓性微血管病”的一组状况的部分。在非典型形式的HUS (aHUS) 中, 该疾病与缺陷性补体调控相关, 并且可以是散发性或家族性的。aHUS的家族性病例与编码补体激活或补体调节蛋白的基因中的突变相关, 所述蛋白包括补体因子H、因子I、因子B、膜辅因子CD46以及补体因子H相关蛋白1 (CFHR1) 和补体因子H相关蛋白3 (CFHR3)。(Zipfel, P.F. 等人, *PloS Genetics* 3(3):e41 (2007))。与aHUS相关的遗传突变的这种多样性阵列的统一特征在于对细胞或组织表面上的补体激活增强的倾向。因此, 本发明的一个方面包括通过施用有效量的MASP-2抑制剂, 来治疗患有与因子H缺陷相关的aHUS的患者。本发明的另一个方面包括通过施用有效量的MASP-2抑制剂, 来治疗患有与因子I、因子B、膜辅因子CD46、CFHR1或CFHR3缺陷相关的HUS的患者。

[0218] 最近针对aHUS中的补体激活增强潜在的分子病理生理学的理解已取得重大进展, 所述aHUS由突变型补体因子的多样化集合引起。这种机制对于因子H突变得到最佳理解。因子H是包含20个短共有重复 (SCR) 结构域的丰富的血清蛋白质, 其在溶液中以及在宿主细胞表面上均充当补体激活的负调节剂。它靶向C3的活化形式, 并且连同因子I及其它辅助因子一起促进其失活, 预先阻止进一步的补体激活。为了有效控制宿主细胞表面上的补体激活, 因子H需要与宿主细胞相互作用, 这由SCR结构域16-20介导。迄今为止描述的与aHUS相关的所有因子H突变都在包含 (SCR) 结构域16-20的C末端区域中聚簇。这些突变型因子H蛋白在控制溶液中的C3激活方面具有完全功能, 但不能与宿主细胞表面相互作用, 并且因而不能控制细胞表面上的C3激活 (*Exp Med* 204(6):1249-56 (2007))。因此, 因子H的某些突变与aHUS相关, 因为突变型因子H蛋白未能与宿主细胞表面相互作用, 并且因此不能有效地下调宿主细胞表面包括微血管内皮上的补体激活。结果, 一旦已发生初始C3 激活, 微血管内皮表面上的后续补体激活在具有因子H突变的患者中就有增无减。这种不受控制的补体激活最终导致对血管内皮的进行性损伤、后续血小板聚集和微血管凝血, 以及由RBC通过部分阻塞的微血管的巨大压力引起的溶血。因此, aHUS疾病表现以及临床和实验室发现与微血管内皮的表面上的补体负调控缺陷直接相联系。

[0219] 与因子H突变类似, 负补体调节因子I和膜辅因子蛋白 (CD46) 的功能丧失突变也与aHUS相联系。对于C3蛋白的因子B观察到相反情况, 因为发现 aHUS与这些蛋白中的功能获

得突变相关 (Pediatr Nephrol 25 (12):2431-42 (2010))。因此,大量汇聚数据暗示aHUS发病机制中的补体激活。这一观点最令人信服地得到依库珠单抗的治疗功效的支持,所述依库珠单抗是在aHUS 的治疗中阻断终末补体蛋白C5的单克隆抗体。

[0220] 虽然补体作为aHUS中的效应机制的核心作用是广泛公认的,但启动补体激活的触发剂和所涉及的分子途径尚未解决。并非所有携带上述突变的个体都发展aHUS。事实上,家族研究已提示了aHUS的外显率仅为~50% (Ann Hum Genet 74 (1):17-26 (2010))。该疾病的自然史提示了,aHUS最经常在初始事件例如感染发作或受伤后发展。众所周知的是传染因子激活补体系统。在预先存在的适应性免疫的不存在下,通过传染因子的补体激活可能主要经由凝集素途径启动。因此,由感染触发的凝集素途径激活可能代表在aHUS易感个体中的补体激活的后续病理性放大的初始触发剂,这可能最终导致疾病进展。相应地,本发明的另一个方面包括通过施用有效量的MASP-2抑制剂,来治疗患有继发于感染的aHUS的患者。

[0221] 对宿主组织的其它形式的损伤,特别是对血管内皮的损伤,将经由凝集素途径激活补体。经受氧化性应激的人血管内皮细胞例如通过表达结合凝集素且激活补体凝集素途径的表面部分来响应 (Am J Pathol 156 (6):1549-56 (2000))。在缺血/再灌注之后的血管损伤还经由体内的凝集素途径来激活补体 (Scand J Immunol 61 (5):426-34 (2005))。在这个背景下的凝集素途径激活对于宿主具有病理结果,并且通过阻断MASP-2的凝集素途径抑制阻止进一步的宿主组织损伤和不良结果 (Schwaebble PNAS 2011)。

[0222] 因此,促成aHUS的其它过程也已知激活补体的凝集素途径。因此,很可能凝集素途径可以代表初始的补体激活机制,其在遗传上倾向于aHUS的个体中以失调的方式不适当地放大,因此启动aHUS发病机制。通过推断,经由凝集素途径阻断补体激活的药剂,包括抗MASP-2抗体,预计预防aHUS 易感个体中的疾病进展或减少恶化。

[0223] 为了进一步支持这一概念,最近的研究已将肺炎链球菌 (*S.pneumonia*) 鉴定为aHUS的儿科病例中的重要致病因子。(Nephrology (Carlton), 17:48-52 (2012); Pediatr Infect Dis J. 30 (9):736-9 (2011))。这种特定病因学似乎具有不利的预后,具有显著的死亡率和长期发病率。值得注意的是,这些病例涉及导致微血管病、尿毒症和溶血表现的非肠道感染,而没有已知倾向于aHUS 的补体基因中的并发突变的证据。值得注意的是,肺炎链球菌在激活补体方面特别有效,并且占优势地通过凝集素途径来实现这点。因此,在与肺炎链球菌感染相关的非肠道HUS的情况下,微血管病、尿毒症和溶血的表现预计占优势地由凝集素途径的激活驱动,并且阻断凝集素途径的药剂包括抗MASP-2 抗体,预计预防这些患者中的aHUS进展或减少疾病严重性。相应地,本发明的另一个方面包括通过施用有效量的MASP-2抑制剂,来治疗患有与肺炎链球菌感染相关的非肠道aHUS的患者。

[0224] 按照前文,在一些实施方案中,在受试者处于发展与aHUS相关的肾衰竭的风险的背景下,提供了用于降低发展aHUS或发展与aHUS相关的肾衰竭的可能性的方法,其包括以有效改善或预防受试者的肾衰竭的量和时间段施用MASP-2抑制剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与aHUS相关的任何症状发作之前,确定受试者是否处于发展aHUS的风险中的步骤。在其它实施方案中,该方法包括在指示aHUS的至少一种或多种症状 (例如,贫血、血小板减少症和/或肾功能不全的存在) 的发作、和/或从受试者获得的活组织检查中的血栓性微血管病的存在后,确定受试者是否处于发展aHUS的风险中。受试者是否处于发展

aHUS的风险中的确定包括确定受试者是否具有发展aHUS的遗传倾向,这可以通过以下来进行:评价遗传信息(例如来自含有受试者的基因型的数据库),或对受试者执行至少一项遗传筛查测试,以经由基因组测序或基因特异性分析(例如PCR分析),确定与aHUS相关的遗传标记物的存在或不存在(即,确定编码补体因子H(CFH)、因子I(CFI)、因子B(CFB)、膜辅因子CD46、C3、补体因子H相关蛋白1(CFHR1)、或THBD(编码抗凝蛋白血栓调节蛋白(thrombomodulin))、或补体因子H相关蛋白3(CFHR3)、或补体因子H相关蛋白4(CFHR4)的基因中,与aHUS相关的遗传突变的存在或不存在),和/或确定受试者是否具有aHUS的家族史。关于与aHUS相关的遗传突变的存在或不存在的遗传筛查的方法是充分确立的,例如参见Noris M等人“*Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome*”,2007年11月16日[2011年3月10日更新]。于:Pagon RA,Bird TD,Dolan CR等人,编辑 GeneReviews™,Seattle(WA):University of Washington,Seattle。

[0225] 例如,总体而言,具有补体因子H(CFH)的突变的患者中的疾病外显率为48%,并且关于CD46中的突变的外显率为53%,关于CFI中的突变的外显率为50%,关于C3中的突变的外显率为56%,并且关于THBD中的突变的外显率为64%(Caprioli J.等人,Blood,108:1267-79(2006);Noris等人,Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59(2010))。如Caprioli等人,(2006),同上中所述,具有补体因子H(CFH)中的突变的大量个体从未发展aHUS,并且假定这些个体中的亚最佳CFH活性足以保护宿主免于生理条件下的补体激活的效应,然而,当暴露于激活补体的药剂产生高于正常量的C3b时,亚最佳的CFH活性不足以阻止C3b在血管内皮细胞上沉积。

[0226] 相应地,在一个实施方案中,提供了用于抑制受试者中的MASP-2依赖性补体激活的方法,所述受试者患有或处于发展非因子H依赖性非典型溶血性尿毒症综合征的风险中,所述方法包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制剂的组合物。在另一个实施方案中,提供了用于抑制受试者中的MASP-2依赖性补体激活的方法,所述受试者处于发展因子H依赖性非典型溶血性尿毒症综合征的风险中,所述方法包括定期监测受试者,以确定贫血、血小板减少症或肌酐升高的存在或不存在,并且在确定贫血、血小板减少症或肌酐升高的存在后,用MASP-2抑制剂进行治疗。在另一个实施方案中,提供了用于减少处于发展因子H依赖性aHUS的风险中的受试者经受与aHUS相关的临床症状的可能性的方法,其包括在已知与触发aHUS临床症状相关的事件之前、期间或之后施用MASP-2抑制剂,所述事件例如药物暴露(例如,化学疗法)、感染(例如,细菌感染)、恶性肿瘤、损伤、器官或组织移植或妊娠。

[0227] 在一个实施方案中,提供了用于减少处于发展aHUS的风险中的受试者经受与aHUS相关的临床症状的可能性的方法,其包括定期监测受试者,以确定贫血、血小板减少症或肌酐升高的存在或不存在,并且在确定贫血、血小板减少症或肌酐升高的存在后,用MASP-2抑制剂进行治疗。

[0228] 在另一个实施方案中,提供了用于减少处于发展aHUS的风险中的受试者经受与aHUS相关的临床症状的可能性的方法,其包括在已知与触发aHUS临床症状相关的事件之前、期间或之后施用MASP-2抑制剂,所述事件例如药物暴露(例如,化学疗法)、感染(例如,细菌感染)、恶性肿瘤、损伤、器官或组织移植或妊娠。

[0229] 在一些实施方案中,在与触发aHUS临床症状相关的事件之前、期间或之后,将

MASP-2抑制剂施用至少1、2、3、4天或更长的时间段,并且可以如由医生确定的进行重复,直到状况已消退或得到控制。在aHUS前的背景下,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、皮下或其它肠胃外施用,可以将MASP-2抑制剂全身施用于受试者。

[0230] 在一些实施方案中,在aHUS的初步诊断的背景下、或者在显示出与aHUS 诊断一致的一种或多种症状(例如,贫血、血小板减少症和/或肾功能不全的存在)的受试者中,受试者用有效量的MASP-2抑制剂(例如抗MASP-2抗体)作为在血浆置换术的不存在下的一线治疗或与血浆置换术组合进行治疗。作为一线疗法,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、皮下或其它肠胃外施用,可以将MASP-2抑制剂全身施用于受试者。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂作为在血浆置换术的不存在下的一线疗法施用于受试者,以避免血浆置换术的潜在并发症,包括出血、感染和暴露于血浆供体中固有的病症和/或过敏,或在其它方面反对血浆置换术的受试者中、或在其中血浆置换术不可用的背景下进行施用。

[0231] 在一些实施方案中,该方法包括经由导管(例如,静脉内)将MASP-2抑制剂施用于患有aHUS的受试者第一时间段(例如,至少一天至一周或两周),随后将MASP-2抑制剂皮下施用于受试者第二时间段(例如,至少两周或更长时间的慢性期)。在一些实施方案中,在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆置换术的不存在下发生。在一些实施方案中,该方法进一步包括在治疗之前以及任选地在治疗期间,确定受试者中的至少一种补体因子(例如,C3、C5)的水平,其中与标准值或健康对照受试者相比,至少一种补体因子的减少水平的确定指示了关于用MASP-2抑制剂的继续治疗的需要。

[0232] 在一些实施方案中,该方法包括向患有或处于发展aHUS的风险中的受试者静脉内、肌内或优选地皮下施用MASP-2抑制剂,例如抗MASP-2抗体。治疗可以是慢性的,并且每天至每月施用一次,但优选每两周一次。抗MASP-2 抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[0233] HUS

[0234] 如同非典型HUS,HUS的典型形式展示TMA的所有临床和实验室发现。然而,典型HUS经常是儿科疾病,并且通常没有家族组分或与补体基因中的突变的直接相关。典型HUS的病因学与由某些肠道病原体的感染密切相联系。患者通常呈现急性肾衰竭、血红蛋白尿症和血小板减少症,其通常在血性腹泻的发作之后。该状况通过由痢疾志贺氏菌(*Shigella* *dysenteriae*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、或产志贺毒素样肠出血性大肠杆菌菌株如大肠杆菌0157:H7的肠道感染引起。病原体从受污染的食物或水供应中获得。HUS是医疗紧急情况,并且携带5-10%的死亡率。显著部分的存活者发展慢性肾疾病(Corrigan 和Boineau, *Pediatr Rev* 22(11):365-9(2011)),并且可能需要肾移植。

[0235] 典型HUS中的微血管凝血占优势地(尽管并非排他地)在肾微血管系统中发生。潜在的病理生理学由志贺毒素(STX)介导。由肠病性微生物排泄到肠腔内的STX穿过肠屏障,进入血流,并且经由blobotriaosyl神经酰胺受体CD77 (Boyd和Lingwood *Nephron* 51:207(1989))与血管内皮细胞结合,所述受体优先在肾小球内皮上表达并介导STX的毒性效应。一旦与内皮结合,STX就诱导损害血管内皮、激活白细胞并引起vWF依赖性血栓形成的一系列事件(Forsyth等人,*Lancet* 2:411-414(1989);Zoja等人,*Kidney Int.*62:846-856(2002);Zanchi等人,*J. Immunol.*181:1460-1469(2008);Morigi等人,*Blood* 98: 1828-1835(2001);Guessou等人,*Infect. Immun.*,73:8306-8316(2005))。这些微血栓堵塞或阻塞

肾及其它器官的小动脉和毛细血管。小动脉和毛细血管中的血流通过微血栓的堵塞增加了当RBC挤过狭窄的血管时施加于其的剪切力。这可以导致通过剪切力的RBC破坏以及称为裂红细胞的红细胞碎片的形成。裂红细胞的存在是HUS中的特征性发现。这种机制被称为微血管病性溶血。另外,血流的堵塞导致缺血,启动补体介导的炎症应答,其引起对受累器官的另外损害。

[0236] 补体的凝集素途径通过两种原理机制促成HUS的发病机制:1) 通过内皮损伤引起的MASP-2介导的凝血级联的直接激活,和2) 通过缺血诱导的凝集素介导的后续补体激活,所述缺血起因于微血管血流的初始阻塞。

[0237] STX损伤微血管内皮细胞,并且已知受损的内皮细胞激活补体系统。如上文详述的,在内皮细胞损伤之后的补体激活占优势地由凝集素途径驱动。经受氧化性应激的人血管内皮细胞通过表达结合凝集素且激活补体凝集素途径的表面部分来响应(Collard等人, *Am J Pathol*. 156 (5):1549-56 (2000))。在缺血再灌注之后的血管损伤还经由体内的凝集素途径来激活补体(*Scand J Immunol* 61 (5):426-34 (2005))。在这个背景下的凝集素途径激活对于宿主具有病理结果,并且通过MASP-2阻断的凝集素途径抑制阻止进一步的宿主组织损伤和不良结果(Schwaebler等人, *PNAS* (2011))。除补体激活之外, MASP-2 的凝集素依赖性激活还已显示导致凝血酶原的切割,以形成凝血酶并促进凝血。因此,通过受损的内皮细胞激活补体的凝集素途径可以直接激活凝血系统。因此,借助于MASP-2介导的凝血酶原活化,补体的凝集素途径很可能是将通过STX的初始内皮损伤与HUS中发生的凝血和微血管血栓形成相联系的主导分子途径。因此,预计凝集素途径抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将预防或减轻患有HUS的患者中的微血管凝血、血栓形成和溶血。实际上,抗MASP-2抗体的施用显著保护典型HUS模型中的小鼠。如实施例36中所述和图45中所示,暴露于STX和LPS的所有对照小鼠都发展严重的HUS,并且在48小时内变得垂死或死亡。另一方面,如图45中进一步所示,用抗MASP-2抗体治疗然后暴露于STX和LPS的所有小鼠都存活(费希尔氏精确 $p < 0.01$; $N = 5$)。因此,抗MASP-2疗法显著保护该HUS模型中的小鼠。预计MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体的施用将有效治疗HUS患者,并且提供免于通过由肠病性大肠杆菌或其它产生STX的病原体的感染引起的微血管凝血、血栓形成和溶血的保护。

[0238] 虽然此处对于由STX引起的HUS显示,但预计抗MASP-2疗法也将有益于由于通过其它毒性药剂引起的内皮损伤的HUS样综合征。这包括药剂例如丝裂霉素、噻氯匹定、环铂、奎宁、环孢菌素、博来霉素以及其它化学治疗药物和免疫抑制药物。因此,预计抗MASP-2抗体疗法或抑制MASP-2活性的其它模式将有效预防或限制凝血、血栓形成和RBC破坏,并且预防HUS 及其它TMA相关疾病(即, aHUS和TTP)中的肾衰竭。

[0239] 患有HUS的患者经常呈现腹泻和呕吐,并且他们的血小板计数通常是减少的(血小板减少症),并且RBC是减少的(贫血)。HUS前腹泻阶段通常持续约四天,在此期间处于发展HUS的风险中的受试者通常显示出除严重腹泻之外的下述症状中的一种或多种:血细胞比容水平低于30%伴随血管内红细胞破坏的涂片证据、血小板减少症(血小板计数 $< 150 \times 10^3/\text{mm}^3$)、和/或肾功能受损(血清肌酐浓度大于关于年龄的参考范围的上限)的存在。少尿(尿量 $\leq 0.5 \text{ mL/kg/h}$ 共 > 1 天)的存在可以用作朝向发展HUS的进展的量度(参见C.Hickey等人, *Arch Pediatr Adolesc Med* 165 (10):884-889 (2011))。通常进行关于由大肠杆菌细菌(大肠杆菌0157:H7)、或志贺氏菌属(*Shigella*)或沙门氏菌属物种的感染的存在的测试。

在对于由肠源性大肠杆菌(例如,大肠杆菌0157:H7)的感染测试呈阳性的受试者中,抗生素的使用是禁忌的,因为抗生素的使用可能通过增加的STX产生而增加发展HUS的风险(参见Wong C.等人,N Engl J. Med 342:1930-1936(2000)。对于志贺氏菌属或沙门氏菌属测试呈阳性的受试者,通常施用抗生素以清除感染。其它充分确立的用于HUS的一线疗法包括容积扩张、透析和血浆置换术。

[0240] 按照前文,在一些实施方案中,在患有与HUS前阶段相关的一种或多种症状并且处于发展HUS的风险中的受试者的背景下(即,受试者显示出下述中的一种或多种:腹泻、红细胞比容水平小于30%伴随血管内红细胞破坏的涂片证据、血小板减少症(血小板计数小于 $150 \times 10^3/\text{mm}^3$)、和/或肾功能受损(血清肌酐浓度大于关于年龄的参考范围的上限)的存在),提供了用于降低受试者中发展HUS的风险或降低肾衰竭的可能性的方法,其包括以有效改善或预防肾功能受损的量和时间段施用MASP-2抑制剂。在一些实施方案中,将MASP-2抑制剂施用至少1、2、3、4天或更长的时间段,并且可以如由医生确定的进行重复,直到状况已消退或得到控制。在HUS前的背景下,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、经口、皮下或其它肠胃外施用,可以将MASP-2抑制剂全身施用于受试者。

[0241] 用杀菌抗生素,特别是 β -内酰胺治疗大肠杆菌0157:H7感染已与发展HUS 的风险增加相关(Smith等人,Pediatr Infect Dis J 31(1):37-41(2012)。在一些实施方案中,在受试者患有与HUS前阶段相关的症状的背景下,其中已知受试者患有由肠源性大肠杆菌的感染,对于所述肠源性大肠杆菌,抗生素的使用是禁忌的(例如,大肠杆菌0157:H7),提供了用于降低受试者中发展HUS的风险或降低肾衰竭的可能性的方法,其包括以有效抑制或预防受试者中的少尿存在的量和第一时间段(例如,至少1、2、3或4天)施用MASP-2抑制剂,其中在抗生素的不存在下发生在第一时间段期间的MASP-2抑制剂施用。在一些实施方案中,该方法进一步包括将与抗生素组合的MASP-2抑制剂施用于受试者第二时间段(例如至少一至两周)。

[0242] 在其它实施方案中,在受试者患有与HUS前阶段相关的症状的背景下,其中已知受试者患有由志贺氏菌属或沙门氏菌属的感染,提供了用于降低受试者中发展HUS的风险或降低肾衰竭的可能性的方法,其包括以有效抑制或预防受试者中的少尿存在的量和时间段施用MASP-2抑制剂,其中所述MASP-2抑制剂的施用是在合适抗生素的存在或不存在下。

[0243] 在一些实施方案中,在HUS的初步诊断的背景下、或者在显示出与HUS 诊断一致的一种或多种症状(例如,肾衰竭、或在低纤维蛋白原的不存在下的微血管病性溶血性贫血、或血小板减少症的存在)的受试者中,受试者用有效量的MASP-2抑制剂(例如抗MASP-2抗体)作为在血浆置换术的不存在下的一线治疗或与血浆置换术组合进行治疗。作为一线疗法,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、皮下或其它肠胃外施用,可以将MASP-2抑制剂全身施用于受试者。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂作为在血浆置换术的不存在下的一线疗法施用于受试者,以避免血浆置换术的并发症,例如出血、感染和暴露于血浆供体中固有的病症和/或过敏,或在其它方面反对血浆置换术的受试者中、或在其中血浆置换术不可用的背景下进行施用。

[0244] 在一些实施方案中,该方法包括经由导管(例如,静脉内)将MASP-2抑制剂施用于患有HUS的受试者第一时间段(例如,持续至少一天至一周或两周的急性期),随后将MASP-2抑制剂皮下施用于受试者第二时间段(例如,至少两周或更长时间的慢性期)。在一些实施

方案中,在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆置换术的不存在下发生。在一些实施方案中,该方法进一步包括在治疗之前以及任选地在治疗期间,确定受试者中的至少一种补体因子(例如,C3、C5)的水平,其中与标准值或健康对照受试者相比,至少一种补体因子的减少水平的确定指示了关于治疗的需要,并且其中正常水平的确定指示了改善。

[0245] 在一些实施方案中,该方法包括向患有或处于发展HUS的风险中的受试者皮下或静脉内施用MASP-2抑制剂,例如抗MASP-2抗体。治疗优选每天一次,但可以像每周一次或每月一次一样不频繁。治疗将持续至少一周且长达3个月。抗MASP-2抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[0246] TTP:

[0247] 血栓性血小板减少性紫癜(TTP)是一种危及生命的凝血系统病症,由激活凝血级联或补体系统的自身免疫或遗传性功能障碍引起(George, JN, *N Engl J Med*; 354:1927-35 (2006))。这导致遍及全身的小血管中的众多微观凝块或血栓形成(thromboses)。红血细胞经受损害其细胞膜的剪切应力,导致血管内溶血。所得到的血流量减少和内皮损伤导致器官损害,包括脑、心脏和肾。TTP 的临床特征在于血小板减少症、微血管病性溶血性贫血、神经系统改变、肾衰竭和发热。在血浆置换前的时代,致死率在急性发作期间为90%。即使具有血浆置换,在六个月的存活为约80%。

[0248] TTP可能起于酶ADAMTS-13的遗传性或获得性抑制,所述ADAMTS-13 是负责将血管性血友病因子(vWF)的大的多聚体切割成更小单元的金属蛋白酶。ADAMTS-13抑制或缺陷最终导致凝血增加(Tsai, H.J *Am Soc Nephrol* 14: 1072-1081, (2003))。ADAMTS-13调控vWF的活性;在其不存在下,vWF 形成大的多聚体,其更有可能结合血小板,并且使患者倾向于微血管系统中的血小板聚集和血栓形成。

[0249] 厄舒尔曼综合征(Upshaw-Schulman syndrome) (USS,也描述为先天性TTP) 是由于ADAMTS13基因突变的ADAMTS13活性的先天性缺陷(Schulman等人,*Blood*, 16 (1) :943-57, 1960;Upshaw等人,*New Engl. J. Med*, 298 (24) :1350-2, 1978)。ADAMTS13中的众多突变已在患有先天性TTP的个体中得到鉴定(Kinoshita等人,*International Journal of Hematology*, 74:101-108 (2001);Levy等人,*Nature*, 413 (6855) :488-494 (2001);Kokame等人,*PNAS* 99 (18) :11902-11907 (2002);Savasan等人,*Blood*, 101:4449-4451 (2003);Matsumoto等人,*Blood*, 103:1305-1310 (2004),以及Fujimura等人,*Brit. J. Haemat* 144: 742-754 (2008))。患有USS的受试者通常具有5-10%的正常 ADAMTS13活性(Kokame等人,*PNAS* 99 (18) :11902-11907, 2002)。虽然获得性TTP和USS具有一些相似性,但USS具有在临床特征方面的一些重要差异。USS通常在婴儿期或儿童期呈现,并且特征在于出生后不久具有阴性库姆斯测试的严重高胆红素血症、响应新鲜血浆输注和频繁复发(Savasan等人,*Blood*, 101:4449-4451, 2003)。在一些情况下,患有这种遗传性ADAMTS13 缺陷的患者在出生时具有轻度表型,并且仅在具有血管性血友病因子水平增加的临床情形例如感染或妊娠下发展与TTP相关的症状。例如,Fujimura等人报道了来自具有遗传上确认的USS的6个家庭的9个日本女性,所述女性在其第一次妊娠时诊断有该病症。在她们的15次妊娠的每一次中,血小板减少症在妊娠中期至妊娠晚期过程中发生,经常随后为TTP。发现所有这些女性在ADAMTS13活性方面都是严重缺陷的(Fujimura等人,*Brit. J. Haemat* 144:742-754, 2008)。

[0250] 按照前文,在一些实施方案中,在患有厄舒尔曼综合征(USS)的受试者的背景下(即,受试者已知在ADAMTS13活性方面缺陷和/或受试者已知具有一种或多种ADAMTS13基因突变),提供了用于降低发展与先天性TTP相关的临床症状(例如,血小板减少症、贫血、发热和/或肾衰竭)的可能性的方法,其包括以有效改善或预防与TTP相关的一种或多种临床症状的量和时间段施用MASP-2抑制剂(例如,MASP-2抗体)。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与TTP相关的任何症状发作之前、或在指示TTP的至少一种或多种症状(例如,贫血、血小板减少症和/或肾功能不全的存在)的发作之后,确定受试者是否处于发展与先天性TTP相关的症状的风险中的步骤。受试者是否处于发展与先天性TTP相关的症状的风险中(即,受试者患有USS)的确定,包括确定受试者是否具有在编码ADAMTS13的基因中的突变,和/或确定受试者是否缺乏ADAMTS13活性,和/或确定受试者是否具有USS的家族史。关于与USS相关的遗传突变的存在或不存在的遗传筛查的方法是充分确立的,例如参见Kinoshita等人,International Journal of Hematology,74:101-108 (2001);Levy等人,Nature,413(6855):488-494(2001);Kokame等人,PNAS 99(18):11902-11907(2002);Savasan等人,Blood,101:4449-4451(2003);Matsumoto等人,Blood,103:1305-1310(2004),以及Fujimura等人,Brit.J. Haemat 144:742-754(2008)。

[0251] 在一个实施方案中,提供了用于减少诊断有USS的受试者经受与TTP相关的临床症状的可能性的方法,其包括定期监测受试者,以确定贫血、血小板减少症或肌酐升高的存在或不存在,并且在确定贫血、血小板减少症或肌酐升高的存在后,或者在已知与触发TTP临床症状相关的事件的存在后,用MASP-2抑制剂(例如MASP-2抗体)进行治疗,所述事件例如药物暴露(例如,化学疗法)、感染(例如,细菌感染)、恶性肿瘤、损伤、移植或妊娠。

[0252] 在另一个实施方案中,提供了用于治疗患有USS并经受与TTP相关的临床症状的受试者的方法,其包括以有效改善或预防与TTP相关的一种或多种临床症状的量和时间段施用MASP-2抑制剂(例如,MASP-2抗体)。

[0253] TTP也可以由于针对ADAMTS-13的自身抗体而发展。另外,TTP可以在乳腺癌、胃肠道癌或前列腺癌(George JN.,Oncology(Williston Park). 25:908-14(2011)),妊娠(妊娠中期或产后),George JN.,Curr Opin Hematol 10:339-344(2003))期间发展,或与疾病例如HIV或自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮相关(Hamasaki K等人,Clin Rheumatol.22:355-8(2003))。TTP也可以由某些药物治疗引起,所述药物治疗包括肝素、奎宁、免疫介导成分、癌症化学治疗药剂(博来霉素、顺铂、阿糖胞苷、道诺霉素、吉西他滨、丝裂霉素C和他莫昔芬)、环孢菌素A、口服避孕药、青霉素、利福平和抗血小板药物包括噻氯匹定和氯吡格雷(Azarm,T.等人,J Res Med Sci.,16:353-357 (2011))。与TTP相关的其它因素或状况是毒素例如蜂毒、败血症、脾隔离症、移植、血管炎、血管手术、以及感染如链球菌性肺炎和巨细胞病毒(Moake JL.,N Engl J Med.,347:589-600(2002))。由于瞬时功能性ADAMTS-13缺陷的TTP 可以作为与肺炎链球菌感染相关的内皮细胞损伤的结果而发生(Pediatr Nephrol.,26:631-5(2011))。

[0254] 血浆置换是用于TTP的标准治疗(Rock GA等人,N Engl J Med 325:393-397(1991))。血浆置换替换具有遗传缺陷的患者中的ADAMTS-13活性,并且去除患有获得性自身免疫性TTP的那些患者中的ADAMTS-13自身抗体(Tsai,H-M,Hematol Oncol Clin North Am.,21(4):609-v(2007))。另外的药剂如免疫抑制药物常规地加入疗法中(George,JN,N

Engl J Med, 354:1927-35 (2006))。然而,血浆置换对于约20%的患者是不成功的,复发在多于三分之一的患者中发生,并且血浆置换术是昂贵且技术要求高的。此外,许多患者无法耐受血浆置换。因而,仍然存在关于TTP的另外和更好治疗的紧迫需要。

[0255] 因为TTP是一种凝血级联的病症,所以用补体系统的拮抗剂的治疗可能有助于稳定且纠正该疾病。虽然旁路补体途径的病理激活与aHUS相联系,但补体激活在TTP中的作用不太清楚。ADAMTS13的功能缺陷对于TTP的易感性是重要的,然而,它不足以引起急性发作。环境因素和/或其它遗传变异可能促成TTP的表现。例如,编码涉及凝血级联、vWF、血小板功能、内皮血管表面的组分或补体系统调控的蛋白质的基因可能牵涉急性血栓性微血管病的发展(Galbusera, M.等人, Haematologica, 94:166-170 (2009))。特别地,补体激活已显示了起关键作用;来自与ADAMTS-13缺陷相关的血栓性微血管病的血清已显示引起C3和MAC沉积以及后续嗜中性粒细胞活化,其可以通过补体灭活得到消除(Ruiz-Torres MP等人, Thromb Haemost, 93:443-52 (2005))。另外,最近已显示在TTP的急性发作期间,存在增加水平的C4d、C3bBbP和C3a (M. Réti等人, J Thromb Haemost. Feb 28. (2012) doi: 10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x. [提前出版的电子版]), 与经典/凝集素和旁路途径的激活一致。急性发作中的增加量的补体激活可能启动终末途径激活并负责TTP的进一步恶化。

[0256] ADAMTS-13和vWF在TTP中的作用明确地负责血小板的活化和聚集,以及其在微血管病中的剪切应力和沉积中的后续作用。活化的血小板与补体的经典途径和旁路途径两者相互作用并触发其。血小板介导的补体激活增加炎症介质C3a和C5a (Peerschke E等人, Mol Immunol, 47:2170-5 (2010))。因此,血小板可以充当遗传性或自身免疫性TTP中的经典补体激活的靶。

[0257] 如上所述,由于MASP-2介导的凝血酶原活化,补体的凝集素途径是将内皮损伤与HUS中发生的凝血和微血管血栓形成相联系的主导分子途径。类似地,补体凝集素途径的激活可能直接驱动TTP中的凝血系统。凝集素途径激活可能响应由TTP中的ADAMTS-13缺陷引起的初始内皮损伤而启动。因此,预计凝集素途径抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将减轻与患有TTP的患者中的微血管凝血、血栓形成和溶血相关的微血管病。

[0258] 患有TTP的患者通常在急诊室中呈现下述中的一种或多种:紫癜、肾衰竭、低血小板、贫血和/或血栓形成,包括中风。目前用于TTP的护理标准包括替换血浆置换术的导管内递送(例如,静脉内或其它形式的导管),共两周或更长的时期,通常为每周3次,但最多每天一次。如果受试者对于ADAMTS13的抑制剂(即,针对ADAMTS13的内源性抗体)的存在测试呈阳性,则血浆置换术可以与免疫抑制疗法(例如皮质类固醇、利妥昔单抗或环孢菌素)组合进行。患有难治性TTP的受试者(大约20%的TTP患者)并不响应至少两周的血浆置换术疗法。

[0259] 按照前文,在一个实施方案中,在TTP的初步诊断的背景下、或者在显示出与TTP诊断一致的一种或多种症状(例如,中枢神经系统受累、重度血小板减少症(如果停用阿司匹林,则小于或等于5000/ μ L的血小板计数,如果服用阿司匹林,则小于或等于20,000/ μ L的血小板计数)、严重的心脏受累、严重的肺部受累、胃肠梗塞或坏疽)的受试者中,提供了用于治疗受试者的方法,其使用有效量的MASP-2抑制剂(例如抗MASP-2抗体)作为在血浆置换术的不存在下的一线治疗或与血浆置换术组合。作为一线疗法,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其它肠胃外施用,可以将MASP-2抑制剂全身施用于受试者。在一些实

施方案中,MASP-2抑制剂作为在血浆置换术的不存在下的一线疗法施用于受试者,以避免血浆置换术的潜在并发症,例如出血、感染和暴露于血浆供体中固有的病症和/或过敏,或在其它方面反对血浆置换术的受试者中、或在其中血浆置换术不可用的背景下进行施用。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂与免疫抑制剂(例如皮质类固醇、利妥昔单抗或环孢菌素)组合(包括共施用)和/或与浓缩的ADAMTS-13组合施用于患有 TTP的受试者。

[0260] 在一些实施方案中,该方法包括经由导管(例如,静脉内)将MASP-2抑制剂施用于患有TTP的受试者第一时间段(例如,持续至少一天至一周或两周的急性期),随后将MASP-2抑制剂皮下施用于受试者第二时间段(例如,至少两周或更长时间的慢性期)。在一些实施方案中,在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆置换术的不存在下发生。在一些实施方案中,该方法用于维持受试者,以阻止受试者经受与TTP相关的一种或多种症状。

[0261] 在另一个实施方案中,提供了通过施用有效减少TTP的一种或多种症状的量的MASP-2抑制剂,用于治疗患有难治性TTP的受试者(即,未响应至少两周的血浆置换术疗法的受试者)的方法。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂(例如,抗MASP-2抗体)经由皮下或其它肠胃外施用,在至少两周或更长的时间段内,在慢性的基础上施用于患有难治性TTP的受试者。施用可以如由医生确定的进行重复,直到状况已消退或得到控制。

[0262] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在治疗之前以及任选地在治疗期间,确定受试者中的至少一种补体因子(例如,C3、C5)的水平,其中与标准值或健康对照受试者相比,至少一种补体因子的减少水平的确定指示了关于用MASP-2抑制剂的继续治疗的需要。

[0263] 在一些实施方案中,该方法包括向患有或处于TTP的风险中的受试者皮下或静脉内施用MASP-2抑制剂,例如抗MASP-2抗体。治疗优选每天一次,但可以像每两周一次一样不频繁。治疗持续直到受试者的血小板计数大于 150,000/ml至少连续两天。抗MASP-2抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[0264] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P突变,和/或其中所述抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制旁路途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径或旁路途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径和旁路补体途径保持完整)。

[0265] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自患有TTP的受试者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。在一些实施方案中,与对血清中的C5b-9沉积的抑制作用相比,MASP-2抑制性抗体以至少20%或更高(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制来自患有TTP的受试者的血清中的血栓形成。

[0266] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自 TTP患者的

血清中的血栓形成抑制至少30%，例如至少40%，例如至少50%，例如至少60%，例如至少70%，例如至少80%，例如至少85%，例如至少90%，例如至少95%直到99%。

[0267] 在一个实施方案中，MASP-2抑制性抗体经由静脉内导管或其它导管递送方法施用于受试者。

[0268] 在一个实施方案中，本发明提供了抑制患有TTP的受试者中的血栓形成的方法，其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物，所述抗体或其抗原结合片段包含(I) (a) 包含以下的重链可变区：i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1；和ii) 包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2；和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3，以及b) 包含以下的轻链可变区：i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1；和ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2；和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3，或(II) 其包含以下的变体：与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，与SEQ ID NO:67 具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70 具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[0269] 在一些实施方案中，该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物，所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中，该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物，所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0270] 在一些实施方案中，该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物，所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分，所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[0271] 德戈斯病

[0272] 德戈斯病，也称为恶性萎缩性丘疹病，是影响皮肤、胃肠道和CNS的小血管内皮的非常罕见的TMA。这种血管病变引起小静脉和小动脉的阻塞，导致皮肤病损、肠缺血和CNS病症包括中风、癫痫和认知障碍。在皮肤中，结缔组织坏死是由于小动脉的血栓性阻塞。然而，德戈斯病的原因尚不清楚。已牵涉血管炎、凝血病或内皮细胞的原发性功能障碍。德戈斯病具有仅两到三年的50%存活。尽管抗血小板药物、抗凝剂和免疫抑制剂用于减轻症状，但不存在用于德戈斯病的有效治疗。

[0273] 虽然德戈斯病的机制尚不清楚，但已牵涉补体途径。Margo等人在患有德戈斯病的四个晚期患者的皮肤、胃肠道和脑血管中鉴定了显著的C5b-9沉积(Margo等人, Am J Clin Pathol 135(4):599-610, 2011)。用依库珠单抗的实验性治疗最初有效治疗皮肤和肠道病损，但并未阻止全身性疾病的进展(参见Garrett-Bakelman F.等人, “C5b-9 is a potential effector in the pathophysiology of Degos disease; a case report of treatment with eculizumab”(Abstract), Jerusalem: International Society of Hematology; 2010, Poster#156; 以及Polito J.等人, “Early detection of systemic

Degos disease (DD) or malignant atrophic papulosis (MAP) may increase survival” (Abstract), San Antonio, TX: American College of Gastroenterology; 2010, Poster# 1205)。

[0274] 患有德戈斯病的许多患者具有凝血缺陷。皮肤中的小动脉的血栓性阻塞是该疾病的特性。因为在该疾病中牵涉补体途径,如本文对于其它TMA所述的,预计凝集素途径抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将有益于治疗患有德戈斯病的患者。

[0275] 相应地,在另一个实施方案中,本发明提供了通过将组合物施用于患有德戈斯病或起因于德戈斯病的状况的受试者,用于治疗德戈斯病的方法,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂,例如MASP-2 抗体。例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它肠胃外施用,或者对于非肽能药剂潜在地通过经口施用,将MASP-2抑制剂全身施用于患有德戈斯病或起因于德戈斯病的状况的受试者。抗MASP-2抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[0276] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2 的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P 突变,和/或其中所述抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制旁路途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径或旁路途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径和旁路补体途径保持完整)。

[0277] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自患有德戈斯病的受试者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。在一些实施方案中,与对血清中的 C5b-9沉积的抑制作用相比,MASP-2抑制性抗体以至少20%或更高(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制来自患有德戈斯病的受试者的血清中的血栓形成。

[0278] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自德戈斯病患者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。

[0279] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体经由静脉内导管或其它导管递送方法施用于受试者。

[0280] 在一个实施方案中,本发明提供了抑制患有德戈斯病的受试者中的血栓形成的方法,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含(I) (a) 包含以下的重链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b) 包含以下的轻链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链 CDR-L1;和

ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70 具有至少90%同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[0281] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0282] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[0283] 灾难性抗磷脂综合征 (CAPS)

[0284] 灾难性抗磷脂综合征 (CAPS) 是抗磷脂抗体 (APLA) 综合征的极端变体。CAPS的特征在于由于致病性抗体的静脉和动脉血栓形成。CAPS是具有多器官血栓形成、缺血和器官衰竭的TMA。如同其它TMA,各种器官中的小血管阻塞是特征性的。存在约50%的CAPS的高死亡率,并且它经常与感染或创伤相关。患者具有抗磷脂抗体,一般是IgG。

[0285] 临床上,CAPS涉及具有小血管阻塞的组织病理学证据的至少三个器官或组织。外周血栓形成可能涉及CNS、心血管、肾或肺系统中的静脉和动脉。患者用抗生素、抗凝剂、皮质类固醇、血浆置换和静脉内免疫球蛋白进行治疗。然而,死亡可能起因于多器官衰竭。

[0286] CAPS中已牵涉补体途径。例如,动物模型中的研究指示了,补体抑制可能是预防与CAPS相关的血栓形成的有效手段(Shapira L.等人,Arthritis Rheum 64(8):2719-23, 2012)。此外,如由Shapira等人进一步报道的,以阻断补体途径的剂量向患有CAPS的受试者施用依库珠单抗中止急性进行性血栓形成事件并逆转血小板减少症(还参见Lim W.,Curr Opin Hematol 18(5):361-5, 2011)。因此,如本文对于其它TMA所述的,预计凝集素途径抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将有益于治疗患有CAPS的患者。

[0287] 相应地,在另一个实施方案中,本发明提供了通过将组合物施用于患有 CAPS或起因于CAPS的状况的受试者,用于治疗CAPS的方法,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂,例如MASP-2抗体。例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它肠胃外施用,或者对于非肽能药剂潜在地通过经口施用,将MASP-2抑制剂全身施用于患有CAPS或起因于CAPS的状况的受试者。抗MASP-2抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[0288] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2 的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F

(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P 突变,和/或其中所述抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制旁路途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径或旁路途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径和旁路补体途径保持完整)。

[0289] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自患有CAPS的受试者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。在一些实施方案中,与对血清中的C5b-9沉积的抑制作用相比,MASP-2抑制性抗体以至少20%或更高(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制来自患有CAPS的受试者的血清中的血栓形成。

[0290] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自CAPS患者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。

[0291] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体经由静脉内导管或其它导管递送方法施用于受试者。

[0292] 在一个实施方案中,本发明提供了抑制患有CAPS的受试者中的血栓形成的方法,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含(I) (a) 包含以下的重链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和 ii) 包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b) 包含以下的轻链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链 CDR-L1;和ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70 具有至少90%同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[0293] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0294] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[0295] 继发于癌症的TMA

[0296] 任何类型的全身性恶性肿瘤可以导致TMA的临床和病理表现(参见例如, Batts和Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719, 2007)。癌症相关的TMA经常在肺中发现, 并且似乎与肿瘤栓子相关(Francis KK等人, Commun Oncol 2:339-43, 2005)。肿瘤栓子可以减少血流, 并且因此导致受累的小动脉和小静脉中的低灌注状态。所得到的组织应力和损伤预计以局限性方式激活补体的凝集素途径。激活的凝集素途径依次又可以经由MASP-2依赖性的凝血酶原切割为凝血酶来激活凝血级联, 导致TMA特征性的血栓前状态。在这个背景下的MASP-2抑制预计减少凝血酶的局限性活化, 并且从而减轻血栓前状态。

[0297] 因此, 如本文对于其它TMA所述的, 预计凝集素途径抑制剂, 包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体, 将有益于治疗患有继发于癌症的TMA的患者。

[0298] 相应地, 在另一个实施方案中, 本发明提供了通过将组合物施用于患有或处于发展继发于癌症的TMA的风险中的受试者, 用于治疗或预防继发于癌症的TMA的方法, 所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂, 例如MASP-2抗体。例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它肠胃外施用, 或者对于非肽能药剂潜在地通过经口施用, 将MASP-2抑制剂全身施用于患有或处于发展继发于癌症的TMA的风险中的受试者。抗MASP-2抗体可以单独施用, 或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[0299] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种: 所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2, 所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位, 所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积, 所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积, 其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段, 其中所述抗体是单链分子, 其中所述抗体是IgG2分子, 其中所述抗体是IgG1分子, 其中所述抗体是IgG4分子, 其中所述IgG4分子包含S228P突变, 和/或其中所述抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中, 抗体与MASP-2结合, 并且选择性地抑制凝集素途径, 并且基本上不抑制旁路途径。在一个实施方案中, 抗体与MASP-2结合, 并且选择性地抑制凝集素途径, 并且基本上不抑制经典途径或旁路途径(即, 抑制凝集素途径, 同时使经典补体途径和旁路补体途径保持完整)。

[0300] 在一个实施方案中, 与未处理的血清相比, MASP-2抑制性抗体将来自患有继发于癌症的TMA的受试者的血清中的血栓形成抑制至少30%, 例如至少40%, 例如至少50%, 例如至少60%, 例如至少70%, 例如至少80%, 例如至少85%, 例如至少90%, 例如至少95%直到99%。

[0301] 在一个实施方案中, 与未处理的血清相比, MASP-2抑制性抗体将来自患有继发于癌症的TMA的患者的血清中的血栓形成抑制至少30%, 例如至少40%, 例如至少50%, 例如至少60%, 例如至少70%, 例如至少80%, 例如至少85%, 例如至少90%, 例如至少95%直到99%。

[0302] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体经由静脉内导管或其它导管递送方法施用于受试者。

[0303] 在一个实施方案中, 本发明提供了抑制患有继发于癌症的TMA的受试者中的血栓形成的方法, 其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物, 所述抗体或其抗原结合片段包含(i) (a) 包含以下的重链可变区: i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1; 和ii) 包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基

酸序列重链CDR-H2;和iii)包含来自SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及 b)包含以下的轻链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链 CDR-L2;和iii)包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链 CDR-L3,或(II)其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及 与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[0304] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0305] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[0306] 继发于癌症化学疗法的TMA

[0307] 化学疗法相关的TMA是涉及血小板减少症、微血管病性溶血性贫血和肾功能障碍的状况,其在2-10%的具有恶性赘生物史的患者中发展,所述患者用化学治疗剂例如吉西他滨、丝裂霉素、奥沙利铂及其它进行治疗。化学疗法相关的TMA与高死亡率、不佳临床结果相关(参见例如,Blake-Haskins等人,Clin Cancer Res 17(18):5858-5866,2011)。

[0308] 化学疗法相关的TMA的病因学被认为包含对微血管内皮的非特异性毒性损伤。在丝裂霉素诱导的TMA的动物模型中已显示了对内皮细胞的直接损伤(Dlott J.等人,Ther Apher Dial 8:102-11,2004)。通过各种机制的内皮细胞损伤已显示了激活补体的凝集素途径。例如,Stahl等人已显示了暴露于氧化性应激的内皮细胞在体外和体内均激活补体的凝集素途径(Collard等人,Am J Pathol.156(5):1549-56,2000;La Bonte等人,J Immunol.15;188(2):885-91,2012)。在体内,该过程导致血栓形成,并且凝集素途径的抑制已显示预防血栓形成(La Bonte等人J Immunol.15;188(2):885-91,2012)。此外,如本文的实施例37-39中证实的,在TMA的小鼠模型中,其中FITC-Dex的局限性光激发用于诱导对微血管系统的局限性损伤,伴随TMA应答的后续发展,本发明人已显示了MASP的抑制-2可以预防TMA。因此,通过化学治疗剂的微血管内皮损伤可能激活补体的凝集素途径,其然后产生局限性血栓前状态并促进TMA应答。由于凝集素途径的激活和血栓前状态的产生是MASP-2依赖性的,预计MASP-2抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将减轻 TMA应答并减少癌症化学疗法相关TMA的风险。

[0309] 相应地,在另一个实施方案中,本发明提供了通过将组合物施用于患有或处于发展继发于化学疗法的TMA的风险中的受试者,用于治疗或预防继发于化学疗法的TMA的方法,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的 MASP-2抑制剂,例如MASP-2抗体。例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它肠胃外施用,或者对于非肽能药剂潜在地通过

经口施用,将 MASP-2抑制剂全身施用于已经历、正在经历或将经历化学疗法的受试者。抗MASP-2抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[0310] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2 的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P 突变,和/或其中所述抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制旁路途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径或旁路途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径和旁路补体途径保持完整)。

[0311] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自患有继发于癌症化学疗法的TMA的受试者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。

[0312] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自患有继发于癌症化学疗法的TMA的患者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。

[0313] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体经由静脉内导管或其它导管递送方法施用于受试者。

[0314] 在一个实施方案中,本发明提供了抑制患有继发于癌症化学疗法的TMA 的受试者中的血栓形成的方法,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2 抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含(I) (a) 包含以下的重链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链 CDR-H2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链 CDR-H3,以及b) 包含以下的轻链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34 的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少 94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如,至少91%、至少 92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[0315] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0316] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[0317] 继发于移植的TMA

[0318] 移植相关TMA (TA-TMA) 是可能在移植患者中发生的破坏性综合征,所述移植患者例如同种异体造血干细胞移植受体(参见例如,Batts和Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719,2007)。这种状况的发病机制知之甚少,但很可能涉及最终达到内皮细胞损伤的应答汇合(Laskin B.L.等人,Blood 118(6):1452-62,2011)。如上文讨论的,内皮细胞损伤是用于凝集素途径激活和血栓前环境生成的原型刺激。

[0319] 最近的数据进一步支持了经由凝集素途径的补体激活在TA-TMA发病机制中的作用。Laskin等人已证实了,与对照(8%)相比,肾小动脉C4d沉积在具有组织学TA-TMA的受试者(75%)中常见得多(Laskin B.L.等人, Transplantation,27;96(2):217-23,2013)。因此,C4d可能是TA-TMA的病理标记物,暗示了经由凝集素途径或经典途径的局限性补体结合。

[0320] 由于凝集素途径的激活和血栓前状态的产生是MASP-2依赖性的,预计 MASP-2抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将减轻TMA应答并减少移植相关TMA (TA-TMA) 的风险。

[0321] 相应地,在另一个实施方案中,本发明提供了通过将组合物施用于患有或处于发展继发于移植的TMA的风险中的受试者,用于治疗或预防继发于移植的TMA的方法,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂,例如MASP-2抗体。例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它肠胃外施用,或者对于非肽能药剂潜在地通过经口施用,将MASP-2抑制剂全身施用于已经历、正在经历或将经历移植程序的受试者。抗MASP-2 抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防继发于同种异体干细胞移植的TMA的方法,其包括在经历同种异体干细胞移植之前、期间或之后,向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制剂例如MASP-2抑制性抗体的组合物。

[0322] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2 的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P 突变,和/或其中所述抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制旁路途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径或旁路途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径和旁路补体途径保持完整)。

[0323] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自患有继发于移植的TMA的受试者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少 40%,例如至少50%,例

如至少60%，例如至少70%，例如至少80%，例如至少85%，例如至少90%，例如至少95%直到99%。

[0324] 在一个实施方案中，与未处理的血清相比，MASP-2抑制性抗体将来自患有继发于移植的TMA的患者的血清中的血栓形成抑制至少30%，例如至少40%，例如至少50%，例如至少60%，例如至少70%，例如至少80%，例如至少85%，例如至少90%，例如至少95%直到99%。

[0325] 在一个实施方案中，MASP-2抑制性抗体经由静脉内导管或其它导管递送方法施用于受试者。

[0326] 在一个实施方案中，本发明提供了抑制患有继发于移植的TMA的受试者中的血栓形成的方法，其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合，所述抗体或其抗原结合片段包含(I) (a) 包含以下的重链可变区：i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链 CDR-H1；和ii) 包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2；和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3，以及 b) 包含以下的轻链可变区：i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链 CDR-L1；和ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链 CDR-L2；和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链 CDR-L3，或(II) 其包含以下的变体：与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如，与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如，至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[0327] 在一些实施方案中，该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合，所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中，该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合，所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0328] 在一些实施方案中，该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合，所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分，所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[0329] IV. MASP-2在其它疾病和状况中的作用以及使用MASP-2抑制剂的治疗方法

[0330] 肾状况

[0331] 补体系统的激活已牵涉广泛多种肾病的发病机制；所述肾病包括系膜增生性肾小球肾炎(IgA肾病，伯杰氏病)(Endo, M.等人, Clin. Nephrology 55:185-191, 2001)、膜性肾小球肾炎(Kerjashki, D., Arch B Cell Pathol. 58:253-71, 1990; Brenchley, P.E.等人, Kidney Int., 41:933-7, 1992; Salant, D.J.等人, Kidney Int. 35:976-84, 1989)、膜增生性肾小球肾炎(系膜毛细管性肾小球肾炎)(Bartlow, B.G.等人, Kidney Int. 15:294-300, 1979; Meri, S.等人, J. Exp. Med. 175:939-50, 1992)、急性感染后肾小球肾炎(链球菌感染后肾小球肾炎)、冷球蛋白血症性肾小球肾炎(Ohsawa, I.等人, Clin Immunol. 101:59-66, 2001)、狼疮性肾炎(Gatenby, P.A., Autoimmunity 11:61-6, 1991)和过敏性紫癜性肾炎

(Endo, M. 等人, *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000)。几十年来,补体在肾病中的牵涉一直受到重视,但关于其在肾病的发作、发展和消退阶段的确切作用仍然存在重大讨论。在正常条件下,补体的贡献对宿主是有益的,但补体的不适当激活和沉积可能促成组织损害。

[0332] 存在以下的大量证据:肾小球肾炎,肾小球的炎症,经常由免疫复合物在肾小球或肾小管结构上的沉积启动,所述沉积然后触发补体激活、炎症和组织损害。Kahn和Sinniah在从患有各种形式的肾小球肾炎的患者获取的活组织检查中,证实了C5b-9在肾小管基底膜中的沉积增加(Kahn, T.N. 等人, *Histopath.* 26:351-6, 1995)。在患有IgA肾病的患者的研究中(Alexopoulos, A. 等人, *Nephrol. Dial. Transplant* 10:1166-1172, 1995),在肾小管上皮/基底膜结构中的C5b-9沉积与血浆肌酐水平相关联。膜性肾病的另一项研究证实了临床结果与尿sC5b-9水平之间的关系(Kon, S.P. 等人, *Kidney Int.* 48:1953-58, 1995)。sC5b-9水平升高与预后不良正相关。Lehto等人测量了CD59的升高水平、以及来自患有膜性肾小球肾炎的患者的尿中的C5b-9,所述CD59是抑制质膜中的膜攻击复合物的补体调节因子(Lehto, T. 等人, *Kidney Int.* 47:1403-11, 1995)。从这些相同患者获取的活组织检查样品的组织病理学分析证实了肾小球中的C3和C9蛋白沉积,而与正常肾组织相比,这些组织中的CD59表达是缩减的。这些各种研究提示了,进行中的补体介导的肾小球肾炎导致补体蛋白的尿排泄,所述补体蛋白与组织损害程度和疾病预后相关联。

[0333] 在肾小球肾炎的各种动物模型中的补体激活抑制也已证实了补体激活在疾病病因学中的重要性。在膜增生性肾小球肾炎(MPGN)模型中,在C6缺陷大鼠(其不能形成C5b-9)中的抗Thy1抗血清输注导致少90%的肾小球细胞增殖、血小板和巨噬细胞浸润的80%减少、缩减的IV型胶原合成(系膜基质扩张的标记物)、以及比C6+正常大鼠少50%的蛋白尿(Brandt, J. 等人, *Kidney Int.* 49:335-343, 1996)。这些结果暗示C5b-9作为这种大鼠抗胸腺细胞血清模型中通过补体的组织损害的主要介质。在另一种肾小球肾炎模型中,分级剂量的兔抗大鼠肾小球基底膜的输注产生剂量依赖性的多形核白细胞(PMN)流入,其通过用眼镜蛇毒因子的先前治疗(以消耗补体)得到减弱(Scandrett, A.L. 等人, *Am. J. Physiol.* 268:F256-F265, 1995)。与对照大鼠相比,眼镜蛇毒因子治疗的大鼠还显示了缩减的组织病理学、降低的长期蛋白尿和更低的肌酐水平。采用在大鼠中的三种GN模型(抗胸腺细胞血清、Con A抗Con A和被动型海曼肾炎),Couser等人证实了通过使用重组sCR1蛋白抑制补体的方法的潜在治疗功效(Couser, W.G. 等人, *J. Am. Soc. Nephrol.* 5:1888-94, 1995)。相对于对照大鼠,用sCR1治疗的大鼠显示了显著缩减的PMN、血小板和巨噬细胞流入,降低的系膜裂解和蛋白尿。通过在NZB/W F1小鼠模型中使用抗C5 MoAb已提供了补体激活在肾小球肾炎中的重要性的进一步证据。抗C5 MoAb抑制C5的切割,因此阻断C5a和C5b-9的生成。用抗C5 MoAb连续治疗6个月导致肾小球肾炎病程的显著改善。阻止人补体组分C5切割成其促炎组分的人源化抗C5 MoAb单克隆抗体(5G1.1),作为用于肾小球肾炎的潜在治疗,处于通过Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut的开发中。

[0334] 通过具有特异性补体组分的遗传缺陷的患者的研究提供了关于补体在肾损伤中的病理作用的直接证据。许多报道已记录了肾病与补体调节因子H的缺陷的相关(Ault, B.H., *Nephrol.* 14:1045-1053, 2000; Levy, M. 等人, *Kidney Int.* 30:949-56, 1986; Pickering, M.C. 等人, *Nat. Genet.* 31:424-8, 2002)。因子H缺陷导致因子B和C3的低血浆水平以及C5b-9的消耗。非典型膜增生性肾小球肾炎(MPGN)和特发性溶血性尿毒症综合征

(HUS) 均与因子 H 缺陷相关。因子 H 缺陷猪 (Jansen, J.H. 等人, *Kidney Int.* 53:331-49, 1998) 和因子 H 敲除小鼠 (Pickering, M.C., 2002) 展示 MPGN 样症状, 确认了因子 H 在补体调控中的重要性。其它补体组分的缺陷与继发于系统性红斑狼疮 (SLE) 发展的肾病相关 (Walport, M.J., Davies 等人, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 815:267-81, 1997)。经由与免疫复合物和细胞凋亡材料的缺陷清除有关的机制, 关于 C1q、C4 和 C2 的缺陷强烈倾向于 SLE 的发展。在这些 SLE 患者的许多中发生狼疮性肾炎, 其特征在于免疫复合物在肾小球各处的沉积。

[0335] 通过在患者中鉴定针对补体组分的自身抗体已提供了将补体激活与肾病相联系的进一步证据, 所述自身抗体中的一些已与肾病直接相关 (Trouw, L.A. 等人, *Mol. Immunol.* 38:199-206, 2001)。这些自身抗体中的许多显示了与肾病的此类高度关联性, 使得引入了术语肾炎因子 (NeF) 来指示这种活性。在临床研究中, 约 50% 的对于肾炎因子呈阳性的患者发展 MPGN (Spitzer, R.E. 等人, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 64:177-83, 1992)。C3NeF 是针对旁路途径 C3 转化酶 (C3bBb) 的自身抗体, 并且它使这种转化酶稳定, 从而促进旁路途径激活 (Daha, M.R. 等人, *J. Immunol.* 116:1-7, 1976)。同样地, 对于经典途径 C3 转化酶 (C4b2a) 具有特异性的自身抗体, 称为 C4NeF, 使这种转化酶稳定, 并且从而促进经典途径激活 (Daha, M.R. 等人, *J. Immunol.* 125:2051-2054, 1980; Halbwachs, L. 等人, *J. Clin. Invest.* 65:1249-56, 1980)。抗 C1q 自身抗体已描述为与 SLE 患者中的肾炎有关 (Hovath, L. 等人, *Clin. Exp. Rheumatol.* 19:667-72, 2001; Siegert, C. 等人, *J. Rheumatol.* 18:230-34, 1991; Siegert, C. 等人, *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:19-23, 1992), 并且报道了这些抗 C1q 自身抗体的滴度升高预测肾炎的爆发 (Coremans, I.E. 等人, *Am. J. Kidney Dis.* 26:595-601, 1995)。从 SLE 患者的死后肾中洗脱的免疫沉积揭示了这些抗 C1q 自身抗体的累积 (Mannick, M. 等人, *Arthritis Rheumatol.* 40:1504-11, 1997)。所有这些事实都指出了这些自身抗体的病理作用。然而, 并非所有具有抗 C1q 自身抗体的患者都发展肾病, 并且一些健康个体也具有低滴度的抗 C1q 自身抗体 (Siegert, C.E. 等人, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 67:204-9, 1993)。

[0336] 除补体激活的旁路途径和经典途径之外, 凝集素途径也可能在肾病中具有重要的病理作用。通过关于从诊断有几种不同肾病的患者中获得的肾活组织检查材料的免疫组织化学技术, 已检测到 MBL、MBL 相关丝氨酸蛋白酶和补体激活产物的水平升高, 所述肾病包括过敏性紫癜性肾炎 (Endo, M. 等人, *Am. J. Kidney Dis.* 35:401-407, 2000)、冷球蛋白血症性肾小球肾炎 (Ohsawa, I. 等人, *Clin. Immunol.* 101:59-66, 2001) 和 IgA 神经病 (Endo, M. 等人, *Clin. Nephrology* 55:185-191, 2001)。因此, 尽管几十年来, 补体与肾病之间的相关已是已知的事实, 但关于补体如何确切地影响这些肾病的数据还远未完成。

[0337] 血液病症

[0338] 败血症由患者对入侵微生物的压倒性反应引起。补体系统的主要功能是协调对入侵细菌及其它病原体的炎症应答。与这种生理作用一致, 补体激活已在众多研究中显示了在败血症的发病机制中具有重要作用 (Bone, R.C., *Annals. Internal. Med.* 115:457-469, 1991)。败血症的临床表现的定义不断发展。败血症通常定义为对感染的全身性宿主应答。然而, 在许多情况下, 在具有败血症症状的患者中并未发现感染的临床证据 (例如, 阳性细菌血培养物)。这种不一致首次 1992 年的共识会议上加以考虑, 当时确立了术语“全身炎症反应综合征” (SIRS), 并且对于其不需要细菌感染的明确存在 (Bone, R.C. 等人,

Crit.Care Med.20:724-726,1992)。目前一般认为败血症和SIRS伴随着调控炎症应答的无能。为了该简要综述的目的,我们将考虑败血症的临床定义还包括严重败血症、败血性休克和SIRS。

[0339] 在二十世纪八十年代后期之前,败血症患者中的占优势感染源是革兰氏阴性菌。当注射到动物内时,革兰氏阴性菌细胞壁的主要组分脂多糖(LPS)已知刺激炎症介质从各种细胞类型中的释放,并且当注射到动物内时诱导急性感染症状(Haeney,M.R.等人, *Antimicrobial Chemotherapy* 41(Suppl.A):41-6, 1998)。有趣的是,由于目前尚不清楚的原因,负责微生物的谱似乎已从二十世纪七十年代后期和二十世纪八十年代占优势的革兰氏阴性菌转变为目标占优势的革兰氏阳性菌(Martin,G.S.等人, *N.Eng.J.Med.* 348:1546-54,2003)。

[0340] 许多研究已显示了补体激活在介导炎症且促成休克特征中的重要性,所述休克特别是败血性休克和出血性休克。革兰氏阴性生物和革兰氏阳性生物两者通常均促成败血性休克。LPS是占优势地经由旁路途径的有力补体激活物,尽管也发生由抗体介导的经典途径激活(Fearon,D.T.等人, *N.Engl.J.Med.* 292:937-400,1975)。革兰氏阳性细胞壁的主要组分是肽聚糖和脂磷壁酸,并且两种组分均是旁路补体途径的有力激活物,尽管在特异性抗体的存在下,它们也可以激活经典补体途径(Joiner,K.A.等人, *Ann.Rev.Immunol.* 2:461-2, 1984)。

[0341] 当研究者注意到过敏毒素C3a和C5a介导在败血症期间也可能发生的各种炎症反应时,补体系统最初牵涉败血症的发病机制。这些过敏毒素诱发血管舒张和微血管通透性的增加,在败血性休克中起关键作用的事件(Schumacher,W.A.等人, *Agents Actions* 34:345-349,1991)。另外,过敏毒素诱导支气管痉挛、来自肥大细胞的组胺释放和血小板的聚集。此外,它们对粒细胞发挥众多作用,例如趋化性、聚集、粘附、溶酶体酶的释放、毒性超氧阴离子的生成和白三烯的形成(Shin,H.S.等人, *Science* 162:361-363,1968; Vogt,W., *Complement* 3:177-86,1986)。这些生物学效应被认为在败血症并发症如休克或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发展中起作用(Hammerschmidt, D.E.等人, *Lancet* 1:947-949,1980; Slotman,G.T.等人, *Surgery* 99:744-50, 1986)。此外,过敏毒素C3a的水平升高与败血症的致命结果相关(Hack,C.E. 等人, *Am.J.Med.* 86:20-26,1989)。在一些休克动物模型中,某些补体缺陷菌株(例如,C5缺陷菌株)对LPS输注的效应更具抗性(Hseuh,W.等人, *Immunol.* 70:309-14,1990)。

[0342] 在啮齿类动物中的败血症发作期间用抗体阻断C5a生成已显示极大地改善存活(Czermak,B.J.等人, *Nat.Med.* 5:788-792,1999)。当用抗体或小分子抑制剂阻断C5a受体(C5aR)时,得到了类似的发现(Huber-Lang,M.S.等人, *FASEB J.* 16:1567-74,2002; Riedemann,N.C.等人, *J.Clin.Invest.* 110:101-8, 2002)。猴中的较早期实验研究已提示了,C5a的抗体阻断减弱了大肠杆菌诱导的败血性休克和成人呼吸窘迫综合征(Hangen, D.H.等人, *J.Surg.Res.* 46:195-9,1989;Stevens,J.H.等人, *J.Clin.Invest.* 77:1812-16, 1986)。在患有败血症的人中,当与不太严重的败血症患者和存活者相比较时,C5a是升高的并且与显著减少的存活率连同多器官衰竭相关(Nakae, H. 等人, *Res. Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.* 84:189-95,1994;Nakae等人, *Surg. Today* 26:225-29, 1996;Bengtson,A.等人, *Arch.Surg.* 123:645-649,1988)。C5a通过其在败血症期间发挥其

有害效应的机制尚有待更详细地调查,但最近的数据提示了,在败血症期间的C5a生成显著损害了血液嗜中性粒细胞的先天免疫功能 (Huber-Lang, M.S. 等人, *J. Immunol.* 169:3223-31, 2002)、它们表达呼吸爆发的能力、以及它们生成细胞因子的能力 (Riedemann, N.C. 等人, *Immunity* 19:193-202, 2003)。另外,在败血症期间的C5a生成似乎具有促凝血效应 (Laudes, I.J. 等人, *Am. J. Pathol.* 160:1867-75, 2002)。补体调节蛋白 CI INH在败血症和ARDS的动物模型中也已显示了功效 (Dickneite, G., *Behring Ins. Mitt.* 93:299-305, 1993)。

[0343] 凝集素途径也可能在败血症的发病机制中具有作用。MBL已显示与一系列临床上重要的微生物包括革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌两者结合,并且激活凝集素途径 (Neth, O. 等人, *Infect. Immun.* 68:688, 2000)。脂磷壁酸 (LTA) 越来越多地被视为LPS的革兰氏阳性对应物。它是有力的免疫刺激剂,其诱导来自单核吞噬细胞和全血的细胞因子释放 (Morath, S. 等人, *J. Exp. Med.* 195:1635, 2002; Morath, S. 等人, *Infect. Immun.* 70:938, 2002)。最近,证实了L-纤维胶凝蛋白特异性结合从众多革兰氏阳性菌物种 (包括金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)) 中分离的LTA,并且激活凝集素途径 (Lynch, N.J. 等人, *J. Immunol.* 172:1198-02, 2004)。MBL也已显示结合来自肠球菌属物种 (*Enterococcus* spp) 的LTA,其中聚甘油磷酸酯链由糖基基团取代,但不结合来自其它九个物种包括金黄色葡萄球菌的LTA (Polotsky, V.Y. 等人, *Infect. Immun.* 64:380, 1996)。

[0344] 因此,本发明的一个方面提供了通过将组合物施用于患有败血症或起因于败血症的状况的受试者,用于治疗败血症或起因于败血症的状况的方法,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂,所述状况包括但不限于严重败血症、败血性休克、起因于败血症的急性呼吸窘迫综合征和全身炎症反应综合征。提供了通过将组合物施用于患有此类状况的受试者,用于治疗其它血液病症的有关方法,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂,所述血液病症包括出血性休克、溶血性贫血、自身免疫性血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、溶血性尿毒症综合征 (HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征 (aHUS) 或其它骨髓/血液破坏性状况。例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入 (特别是在ARDS的情况下)、皮下或其它肠胃外施用,或者对于非肽能药剂潜在地通过经口施用,将MASP-2抑制剂全身施用于受试者。MASP-2抑制剂组合物可以与一种或多种另外的治疗剂组合,以对抗败血症和/或休克的后遗症。对于晚期败血症或休克或起因于此的痛苦状况,例如通过静脉内或动脉内递送含有MASP-2抑制剂组合物的溶液的推注, MASP-2 抑制组合物可以以速效剂型适当地施用。可以如由医生确定的进行重复施用,直到状况已消退。

[0345] 凝血病

[0346] 已发展了关于补体系统在弥散性血管内凝血 ("DIC"), 例如继发于重大身体创伤的DIC中的作用的证据。

[0347] 以前的研究已显示了, C4^{-/-}小鼠不受保护免于肾再灌注损伤。(Zhou, W. 等人, "Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury," *J Clin Invest* 105:1363-1371 (2000)) 为了调查C4^{-/-}小鼠是否仍能够经由经典途径或凝集素途径激活补体,在对于经典途径或凝集素途径激活路线特异性的测定中测量C4^{-/-}血浆中的C3周转。虽然当经由经典触发激活时并未观察到C3切割,但观察到C4缺陷血清中C3的高效凝集素途径依赖性激活 (图30)。可以看出,即使在实验条件下,在甘露聚糖和酵母聚糖上的

C3b沉积在MASP-2-/-小鼠中也是严重受损的,根据许多先前公开的关于旁路途径激活的论文,这对于所有三种途径都应该是允许的。当在用免疫球蛋白复合物而不是甘露聚糖或酵母聚糖包被的孔中使用相同的血清时,在MASP-2+/+小鼠血清和MASP-2-/-血清中可见C3b沉积和因子B切割,但在C1q耗尽的血清中不可见。这指示了当经由经典活性提供初始C3b时,在MASP-2-/-血清中促进了旁路途径激活。图30C描绘了以下令人惊讶的发现:C3可以在C4缺陷的血浆中以凝集素途径依赖性方式有效地激活。

[0348] 通过血浆与可溶性甘露聚糖或甘露糖的预温育抑制凝集素途径激活,消除了这种“C4旁路”。

[0349] 补体系统的异常、非免疫激活对人是潜在危险的,并且还可能在血液途径激活中起重要作用,特别是在其中炎症和血液途径两者均激活的严重创伤情形下。在正常健康情况下,C3转换率为总血浆C3蛋白的<5%。在无法控制的感染包括败血症和免疫复合物疾病中,由于增加的利用和池分布的变化,C3转换以约30%重新建立本身,具有频繁地低于正常的补体水平。大于30%的立即C3途径激活一般产生血管舒张和组织体液流失的明显临床证据。高于30%的C3转换,初始机制是占优势地非免疫的,并且所得到的临床表现对患者是有害的。健康和受控疾病中的补体C5水平似乎比C3稳定得多。C5水平的显著降低和或转换与患者对异常多发伤(例如道路交通事故)的应答以及休克肺综合征的可能发展相关。因此,超过30%血管池的补体C3激活或任何C5牵涉或两者的任何证据,可能被视为很可能是患者中的有害病理变化的预兆。

[0350] C3和C5两者均释放过敏毒素(C3a和C5a),其作用于释放血管舒张化学制品的肥大细胞和嗜碱性粒细胞。它们设置趋化梯度,以将多形核细胞(PMN)引导到免疫紊乱的中心(有益的应答),但在此处它们不同,因为C5a对这些吞噬细胞具有特异性凝集(聚集)作用,阻止它们随机移动远离反应部位。在感染的正常控制中,C3激活C5。然而,在多发伤中,C5似乎被广泛激活,全身性地生成C5a过敏毒素。这种不受控制的活性促使多晶型物在血管系统内凝块,然后这些凝块被扫入肺的毛细血管内,它们阻塞所述毛细血管并且由于超氧化物释放而生成局部损害效应。虽然不希望受到理论的限制,但该机制很可能在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发病机制中是重要的,尽管这一观点最近已受到挑战。C3a过敏毒素在体外可以显示为有力的血小板聚集剂,但其在体内的牵涉较不明确,并且伤口修复中的血小板物质和纤溶酶的释放可能仅次要地涉及补体C3。可能需要C3激活的延长升高以生成DIC。

[0351] 除上文概述的可以解释创伤和DIC之间的联系的激活补体组分的细胞效应和血管效应之外,新出现的科学发现已鉴定了补体系统和凝血系统之间的直接分子联系和功能串扰。从C3缺陷小鼠中的研究已获得了支持数据。由于C3是每个补体途径的共享组分,因此预测C3缺陷小鼠缺乏所有补体功能。然而,令人惊讶的是,C3缺陷小鼠完全能够激活终末补体组分。(Huber-Lang, M.等人,“Generation of C5a in the absence of C3:a new complement activation pathway,”*Nat.Med* 12:682-687 (2006))在深入研究中,揭示了终末补体组分的C3不依赖性激活由凝血级联的限速酶凝血酶介导。(Huber等人,2006)在初始补体激活之后介导凝血酶激活的分子组分仍然难以捉摸。

[0352] 本发明人已阐明了何者被认为是补体和凝血级联之间的串扰的分子基础,并且将MASP-2鉴定为将两个系统相连接的中心控制点。除众所周知的C2和C4补体蛋白之外,对MASP-2的底物特异性的生物化学研究已将凝血酶原鉴定为可能的底物。MASP-2在功能相关

位点处特异性切割凝血酶原,生成凝血级联反应的限速酶凝血酶。(Krarup,A.等人,"Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2,"PLoS. ONE.2:e623 (2007))MASP-2生成的凝血酶能够在限定的重构体外系统中促进纤维蛋白沉积,证实了MASP-2切割的功能相关性。(Krarup等人,2007)如本文下文实施例中讨论的,本发明人已通过证明在凝集素途径激活之后的正常啮齿类动物血清中的凝血酶激活,进一步确证了这一发现的生理学意义,并且证实了该过程通过中和性MASP-2单克隆抗体得到阻断。

[0353] MASP-2可能代表凝集素途径的中心分支点,能够促进补体系统和凝血系统两者的激活。因为凝集素途径激活是对多种类型的创伤性损伤的生理应答,所以本发明人认为并发的全身炎症(由补体组分介导)和弥散性凝血(经由凝血途径介导)可以通过MASP-2激活两个途径的能力来解释。这些发现明确地提示了MASP-2在DIC生成中的作用以及MASP-2抑制在治疗或预防DIC中的治疗益处。MASP-2可以提供补体系统和凝血系统之间的分子联系,并且当它在创伤的背景下发生时,凝集素途径的激活可以经由MASP-2-凝血酶轴直接启动凝血系统的激活,提供了创伤和DIC之间的机制联系。按照本发明的一个方面,MASP-2的抑制将抑制凝集素途径激活,并且减少过敏毒素C3a和 C5a两者的生成。认为C3激活的延长升高是生成DIC所必要的。

[0354] 微循环凝血(毛细血管和小血管中的血块)在背景如败血性休克下发生。确定了凝集素途径在败血性休克中的作用,如实施例17以及图18和19中描述的通过败血症的MASP-2(-/-)小鼠模型的受保护表型所证明的。此外,如实施例15以及图16A和16B中证实的,MASP-2(-/-)小鼠在弥散性血管内凝血(DIC)的局限性施瓦茨曼反应模型(微血管中的局限性凝血模型)中受到保护。

[0355] V.MASP-2抑制剂

[0356] 在一个方面,本发明提供了抑制受试者中的MASP-2依赖性补体激活的方法,所述受试者患有或处于发展血栓性微血管病的风险中。MASP-2抑制剂以有效抑制活受试者中的MASP-2依赖性补体激活的量施用。在本发明的这个方面的实践中,代表性的MASP-2抑制剂包括:抑制MASP-2的生物活性的分子(例如与MASP-2相互作用或干扰蛋白质-蛋白质相互作用的小分子抑制剂、抗MASP-2抗体或阻断肽)、以及降低MASP-2表达分子(例如MASP-2反义核酸分子、MASP-2特异性RNAi分子和MASP-2核酶),从而阻止MASP-2激活凝集素补体途径。MASP-2抑制剂可以单独用作主要疗法或与其它疗法组合用作辅助疗法,以增强其它医学治疗的治疗益处。

[0357] MASP-2依赖性补体激活的抑制的特征在于补体系统的组分中的至少一种下述变化,所述变化作为按照本发明的方法施用MASP-2抑制剂的结果而发生:MASP-2依赖性补体激活系统产物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9(MAC)的生成或产生的抑制(例如,如实施例2中所述测量的),在使用未致敏的兔或豚鼠红血细胞的溶血测定中评价的补体激活的减少(例如,如实施例33中所述测量的),C4切割和C4b沉积的减少(例如,如实施例2中所述测量的),或C3切割和C3b沉积的减少(例如,如实施例2中所述测量的)。

[0358] 根据本发明,利用有效抑制MASP-2依赖性补体激活系统的MASP-2抑制剂。可用于本发明的这个方面的实践中的MASP-2抑制剂包括例如抗MASP-2抗体及其片段、MASP-2抑制肽、小分子、MASP-2可溶性受体和表达抑制剂。MASP-2抑制剂可以通过阻断MASP-2的生物

学功能来抑制 MASP-2 依赖性补体激活系统。例如,抑制剂可以有效阻断MASP-2 蛋白质与蛋白质的相互作用,干扰MASP-2 二聚化或组装,阻断 Ca^{2+} 结合,干扰MASP-2 丝氨酸蛋白酶活性位点,或可能减少MASP-2 蛋白表达。

[0359] 在一些实施方案中,MASP-2 抑制剂选择性地抑制MASP-2 补体激活,使 C1q 依赖性补体激活系统保持功能完整。

[0360] 在一个实施方案中,可用于本发明的方法中的MASP-2 抑制剂是特异性结合包含 SEQ ID NO:6 的多肽的特异性MASP-2 抑制剂,其亲和力是补体系统中的其它抗原至少10 倍。在另一个实施方案中,MASP-2 抑制剂特异性结合包含SEQ ID NO:6 的多肽,其结合亲和力是补体系统中的其它抗原至少100 倍。MASP-2 抑制剂的结合亲和力可以使用合适的结合测定来确定。

[0361] MASP-2 多肽显示出与MASP-1、MASP-3 以及C1r 和C1s (C1 补体系统的蛋白酶) 相似的分子结构。SEQ ID NO:4 中所示的cDNA 分子编码MASP-2 的代表性实例(由SEQ ID NO:5 中所示的氨基酸序列组成),并且提供了具有前导序列(aa 1-15) 的人MASP-2 多肽,所述前导序列在分泌后被切割,导致成熟形式的人MASP-2 (SEQ ID NO:6)。如图2 中所示,人MASP 2 基因包含12 个外显子。人MASP-2 cDNA 由外显子B、C、D、F、G、H、I、J、K 和L 编码。可变剪接导致由起于外显子B、C、D 和E 的 (SEQ ID NO:1) 编码,称为 MBL 相关蛋白19 ("MAp19", 也称为"sMAP") (SEQ ID NO:2) 的20kDa 蛋白,如图2 中所示。SEQ ID NO:50 中所示的cDNA 分子编码鼠MASP-2 (由SEQ ID NO:51 中所示的氨基酸序列组成),并且提供了具有前导序列的鼠MASP-2 多肽,所述前导序列在分泌后被切割,导致成熟形式的鼠MASP-2 (SEQ ID NO:52)。SEQ ID NO:53 中所示的cDNA 分子编码大鼠MASP-2 (由SEQ ID NO:54 中所示的氨基酸序列组成),并且提供了具有前导序列的大鼠MASP-2 多肽,所述前导序列在分泌后被切割,导致成熟形式的大鼠MASP-2 (SEQ ID NO:55)。

[0362] 本领域技术人员将认识到,SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50 和SEQ ID NO:53 中公开的序列分别代表人、鼠和大鼠MASP-2 的单个等位基因,并且预计发生等位基因变异和可变剪接。SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50 和SEQ ID NO:53 中所示的核苷酸序列的等位基因变体,包括含有沉默突变的那些变体以及其中突变导致氨基酸序列变化的那些变体,都在本发明的范围内。MASP-2 序列的等位基因变体可以通过根据标准程序探测来自不同个体的cDNA 或基因组文库进行克隆。

[0363] 人MASP-2 蛋白 (SEQ ID NO:6) 的结构域显示于图1 和2A 中,并且包括 N 末端C1r/C1s/海胆Vegf/骨形态发生蛋白 (CUB1) 结构域 (SEQ ID NO:6 的aa 1-121)、表皮生长因子样结构域 (aa 122-166)、第二个CUB1 结构域 (aa 167-293)、以及串联的补体控制蛋白结构域和丝氨酸蛋白酶结构域。MASP 2 基因的可变剪接导致图1 中所示的MAp19。MAp19 是含有MASP-2 的N 末端CUB1-EGF 区域的非酶促蛋白质,具有衍生自外显子E 的四个另外残基 (EQSL),如图1 中所示。

[0364] 几种蛋白质已显示了通过蛋白质与蛋白质的相互作用与MASP-2 结合或相互作用。例如,已知MASP-2 与凝集素蛋白MBL、H- 纤维胶凝蛋白和L- 纤维胶凝蛋白结合,并且形成 Ca^{2+} 依赖性复合物。每种MASP-2/-凝集素复合物已显示通过MASP-2 依赖性的蛋白质C4 和C2 切割来激活补体 (Ikeda, K. 等人, J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M. 等人, J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M. 等人, J. Immunol. 168:3502-3506,

2002)。研究已显示了,MASP-2的CUB1-EGF结构域对于 MASP-2与MBL的结合是必需的(Thielens,N.M.等人,J.Immunol.166:5068, 2001)。还已显示了CUB1EGFCUBII结构域介导MASP-2的二聚化,其是活性MBL复合物形成所需的(Wallis,R.等人,J.Biol.Chem.275:30962-30969, 2000)。因此,可以鉴定结合或干扰已知对于MASP-2依赖性补体激活重要的MASP-2靶区域的MASP-2抑制剂。

[0365] 抗MASP-2抗体

[0366] 在本发明的这个方面的一些实施方案中,MASP-2抑制剂包含抑制 MASP-2依赖性补体激活系统的抗MASP-2抗体。可用于本发明的这个方面的抗MASP-2抗体包括衍生自任何产生抗体的哺乳动物的多克隆抗体、单克隆抗体或重组抗体,并且可以是多特异性的、嵌合的、人源化的、抗独特型的和抗体片段。抗体片段包括如本文进一步描述的Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂、Fv片段、scFv片段和单链抗体。

[0367] 几种抗MASP-2抗体已在文献中进行描述,其中一些在下表1中列出。可以使用本文描述的测定来筛选这些先前描述的抗MASP-2抗体抑制 MASP-2依赖性补体激活系统的能力。例如,已鉴定了阻断MASP-2依赖性补体激活的抗大鼠MASP-2 Fab2抗体,如本文的实施例10和11中更详细地描述的。一旦鉴定了充当MASP-2抑制剂的抗MASP-2抗体,它就可以用于产生抗独特型抗体并用于鉴定其它MASP-2结合分子,如下文进一步描述的。

[0368] 表1:来自文献的MASP-2特异性抗体

[0369]

抗原	抗体类型	参考文献
重组 MASP-2	大鼠多克隆	Peterson, S.V. 等人, <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
重组人 CCP1/2-SP 片段 (MoAb 8B5)	大鼠 MoAb (亚类 IgG1)	Moller-Kristensen, M. 等人, <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
重组人 MAp19 (MoAb 6G12) (与 MASP-2 交叉反应)	大鼠 MoAb (亚类 IgG1)	Moller-Kristensen, M. 等人, <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
hMASP-2	小鼠 MoAb (S/P) 小鼠 MoAb (N 末端)	Peterson, S.V. 等人, <i>Mol. Immunol.</i> 35:409, 1998 年 4 月
hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP 结构域)	大鼠 MoAb: 由杂交瘤细胞系 03050904 (ECACC) 产生的 Nimoab101	WO 2004/106384
hMASP-2 (全长加上 his 标签的)	鼠 MoAb: 由杂交瘤细胞系 M0545YM035 (DSMZ) 产生的 NimoAb104 由杂交瘤细胞系 M0545YM029 (DSMZ) 产生的 NimoAb108 由杂交瘤细胞系 M0545YM046 (DSMZ) 产生的 NimoAb109 由杂交瘤细胞系 M0545YM048 (DSMZ) 产生的 NimoAb110	WO 2004/106384

[0370] 具有减少的效应子功能的抗MASP-2抗体

[0371] 在本发明的这个方面的一些实施方案中,抗MASP-2抗体具有减少的效应子功能,以便减少可能起于经典补体途径的激活的炎症。IgG分子触发经典补体途径的能力已显示位于分子的Fc部分内 (Duncan, A.R. 等人, *Nature* 332:738-740 (1988))。其中分子的Fc部分已通过酶促切割去除的IgG分子缺乏这种效应子功能 (参见Harlow, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988)。相应地,由于通过具有使效应子功能降到最低的遗传改造的Fc序列而缺乏分子的Fc部分、或者具有人IgG₂或IgG₄同种型,可以生成具有减少的效应子功能的抗体。

[0372] 如本文的实施例9中所述,以及Jolliffe等人, *Int'l Rev. Immunol.* 10:241-250, 1993和Rodrigues等人, *J. Immunol.* 151:6954-6961, 1998中所述,通过IgG重链的Fc部分的标准分子生物学操纵可以产生具有减少的效应子功能的抗体。具有减少的效应子功能的抗体还包括人IgG₂和IgG₄同种型,其具有激活补体和/或与Fc受体相互作用的减少能力 (Ravetch, J.V. 等人, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991; Isaacs, J.D. 等人, *J. Immunol.* 148:3062-3071, 1992; van de Winkel, J.G. 等人, *Immunol. Today* 14:215-221, 1993)。如

Vaughan, T.J. 等人, Nature Biotechnical 16:535-539, 1998 中所述, 可以通过本领域普通技术人员已知的几种方法之一, 来产生对由 IgG2 或 IgG4 同种型组成的人 MASP-2 特异性的人源化抗体或全人抗体。

[0373] 抗 MASP-2 抗体的生产

[0374] 可以使用 MASP-2 多肽 (例如, 全长 MASP-2) 或使用带有抗原性 MASP-2 表位的肽 (例如, MASP-2 多肽的一部分) 来产生抗 MASP-2 抗体。免疫原性肽可能小至五个氨基酸残基。例如, 包括 SEQ ID NO:6 的完整氨基酸序列的 MASP-2 多肽可以用于诱导可用于本发明的方法中的抗 MASP-2 抗体。已知涉及蛋白质-蛋白质相互作用的特定 MASP-2 结构域, 例如 CUBI 和 CUBIEGF 结构域, 以及包含丝氨酸蛋白酶活性位点的区域, 可以如实施例 3 中所述的作为重组多肽表达并用作抗原。另外, 包含 MASP-2 多肽 (SEQ ID NO:6) 的至少 6 个氨基酸的一部分的肽也可用于诱导 MASP-2 抗体。可用于诱导 MASP-2 抗体的 MASP-2 衍生抗原的另外实例在下表 2 中提供。用于产生抗体的 MASP-2 肽和多肽可以作为天然多肽、或重组或合成肽和无催化活性的重组多肽例如 MASP-2A 进行分离, 如实施例 5-7 中进一步描述的。在本发明的这个方面的一些实施方案中, 抗 MASP-2 抗体使用如实施例 8 和 9 中所述并且在下文进一步描述的转基因小鼠品系获得。

[0375] 可用于产生抗 MASP-2 抗体的抗原还包括融合多肽, 例如 MASP-2 或其一部分与免疫球蛋白多肽或麦芽糖结合蛋白的融合物。多肽免疫原可以是全长分子或其一部分。如果多肽部分是半抗原样的, 则此类部分可以有利地联接或连接至大分子载体 (例如钥孔血蓝蛋白 (KLH)、牛血清白蛋白 (BSA) 或破伤风类毒素) 用于免疫。

[0376] 表 2: MASP-2 衍生的抗原

[0377]

SEQ ID NO:	氨基酸序列
SEQ ID NO:6	人 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:51	鼠 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:8	人 MASP-2 的 CUBI 结构域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	人 MASP-2 的 CUBIEGF 结构域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	人 MASP-2 的 CUBIEGFCUBII 结构域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	人 MASP-2 的 EGF 结构域(SEQ ID NO:6 的 aa 122-166)
SEQ ID NO:12	人 MASP-2 的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:6 的 aa 429-671)
SEQ ID NO:13 GKDSCRGDAGGALVFL	丝氨酸蛋白酶失活突变体形式(具有突变的 Ser 618 的 SEQ ID NO:6 的 aa 610-625)
SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	人 CUBI 肽
SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHL CEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ	人 CUBI 肽
SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	人 CUBI 结构域中的 MBL 结合区
SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFT GF	人 CUBI 结构域中的 MBL 结合区
SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	EGF 肽
SEQ ID NO:19 ANMLCAGLESGGKDSCRGDS GGALV	来自丝氨酸蛋白酶活性位点的肽

[0378] 多克隆抗体

[0379] 可以通过使用本领域普通技术人员众所周知的方法,用MASP-2多肽或其免疫原性部分免疫动物,来制备针对MASP-2的多克隆抗体。参见例如, Green等人, "Production of Polyclonal Antisera," in Immunochemical Protocols (Manson编辑), 第105页, 并且如实施例6中进一步描述的。MASP-2多肽的免疫原性可以通过使用佐剂得到增加, 所述佐剂包括矿物凝胶例如氢氧化铝或弗氏佐剂(完全或不完全), 表面活性物质例如溶血卵磷脂、普朗尼克多元醇、聚阴离子、油乳剂、钥孔血蓝蛋白和二硝基苯酚。多克隆抗体通常在动物例如马、牛、犬、鸡、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、山羊或绵羊中产生。可替代地, 可用于本发明中的抗MASP-2抗体也可以衍生自亚人灵长类动物。用于在狒狒中产生诊断和治疗上可用的抗体的一般技术可以例如在Goldenberg 等人, 国际专利公开号W0 91/11465以及Losman, M.J. 等人, Int. J. Cancer 46:310, 1990中发现。然后使用本领域众所周知的标准程序, 从此类免疫动物的血液产生含有免疫活性抗体的血清。

[0380] 单克隆抗体

[0381] 在一些实施方案中, MASP-2抑制剂是抗MASP-2单克隆抗体。抗MASP-2 单克隆抗体

针对单个MASP-2表位是高度特异性的。如本文使用的,修饰语“单克隆的”指示抗体的特点为得自基本上同质的抗体群体,并且不应解释为需要通过任何特定方法的抗体产生。可以使用通过培养中的连续细胞系提供抗体分子的产生的任何技术,例如通过Kohler,G.等人,Nature 256:495,1975描述的杂交瘤方法,来获得单克隆抗体,或者它们可以通过重组DNA方法进行制备(参见例如,授予Cabilly的美国专利号4,816,567)。也可以使用Clackson,T.等人,Nature 352:624-628,1991和Marks,J.D.等人,J.Mol.Biol.222:581-597,1991中描述的技术,从噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体。此类抗体可以具有任何免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及其任何亚类。

[0382] 例如,单克隆抗体可以通过用包含MASP-2多肽或其一部分的组合物注射合适的哺乳动物(例如,BALB/c小鼠)来获得。在预定的时间段后,从小鼠中取出脾细胞并悬浮于细胞培养基中。然后使脾细胞与永生细胞系融合,以形成杂交瘤。所形成的杂交瘤在细胞培养中生长,并筛选其产生针对MASP-2的单克隆抗体的能力。实施例7中提供了进一步描述抗MASP-2单克隆抗体产生的实例。(还参见Current Protocols in Immunology,第1卷,John Wiley& Sons,第2.5.1-2.6.7页,1991。)

[0383] 人单克隆抗体可以通过使用转基因小鼠获得,所述转基因小鼠已进行改造,以响应抗原攻击产生特异性人抗体。在这种技术中,将人免疫球蛋白重链和轻链基因座的元件引入衍生自胚胎干细胞系的小鼠品系内,所述胚胎干细胞系含有内源性免疫球蛋白重链和轻链基因座的靶向破坏。转基因小鼠可以合成对于人抗原如本文描述的MASP-2抗原特异性的人抗体,并且通过使用如实施例7中进一步描述的常规Kohler-Milstein技术,使来自此类动物的B细胞与合适的骨髓瘤细胞系融合,小鼠可以用于产生分泌人MASP-2抗体的杂交瘤。具有人免疫球蛋白基因组的转基因小鼠是商购可得的(例如,来自 Abgenix,Inc., Fremont,CA和Medarex,Inc.,Annandale,N.J.)。用于从转基因小鼠获得人抗体的方法例如通过L.L.等人,Nature Genet.7:13,1994; Lonberg,N.等人,Nature 368:856,1994;以及Taylor,L.D.等人,Int.Immun. 6:579,1994进行描述。

[0384] 可以通过各种充分确立的技术,从杂交瘤培养物中分离且纯化单克隆抗体。此类分离技术包括使用蛋白A Sepharose的亲和层析、尺寸排阻层析和离子交换层析(参见例如,Coligan在第2.7.1-2.7.12页和第2.9.1-2.9.3页;Baines 等人,"Purification of Immunoglobulin G(IgG)",于Methods in Molecular Biology,The Humana Press,Inc.,第10卷,第79-104页,1992)。

[0385] 一旦产生,多克隆抗体、单克隆抗体或噬菌体衍生抗体首先就特异性 MASP-2结合进行测试。本领域技术人员已知的各种测定可以用于检测与 MASP-2特异性结合的抗体。示例性测定包括通过标准方法(例如,如Ausubel 等人中所述)的蛋白质印迹或免疫沉淀分析、免疫电泳、酶联免疫吸附测定、斑点印迹、抑制测定或竞争测定和夹心测定(如Harlow和Land,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988中所述)。一旦鉴定了与MASP-2特异性结合的抗体,就在几种测定之一中测试抗MASP-2抗体充当MASP-2抑制剂的能力,所述测定例如凝集素特异性C4切割测定(在实施例2中描述)、C3b沉积测定(在实施例2中描述)或C4b沉积测定(在实施例2中描述)。

[0386] 抗MASP-2单克隆抗体的亲和力可以通过本领域普通技术人员容易地确定(参见例如,Scatchard,A.,NY Acad.Sci.51:660-672,1949)。在一个实施方案中,可用于本发明的

方法的抗MASP-2单克隆抗体以<100nM,优选<10 nM且最优选<2nM的结合亲和力结合MASP-2。在一些实施方案中,可用于本发明的方法中的MASP-2抑制性单克隆抗体是MASP-2抑制性单克隆抗体或其抗原结合片段,其包含(I) (a) 包含以下的重链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含来自SEQ ID NO:67 的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-102 的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b) 包含以下的轻链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含来自SEQ ID NO:70 的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97 的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如,至少 91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[0387] 嵌合抗体/人源化抗体

[0388] 可用于本发明的方法中的单克隆抗体包括嵌合抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或者属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一个物种或者属于另一个抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及此类抗体的片段(授予Cabilly 的美国专利号4,816,567;以及Morrison, S.L.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 81:6851-6855,1984)。

[0389] 可用于本发明中的嵌合抗体的一种形式是人源化单克隆抗MASP-2抗体。非人(例如鼠)抗体的人源化形式是嵌合抗体,其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。通过将非人(例如小鼠)互补决定区(CDR)从小鼠免疫球蛋白的重链和轻链可变链转移到人可变结构域内,来产生人源化单克隆抗体。通常,人抗体的残基随后在非人对应物的构架区中被取代。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。制备这些修饰,以进一步改善抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一个且通常为两个可变结构域的基本上全部,其中高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白的那些,并且Fv构架区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白的恒定区。关于进一步的细节,参见Jones, P.T.等人,Nature 321:522-525,1986; Reichmann,L.等人,Nature 332:323-329,1988;以及Presta,Curr.Op.Struct. Biol.2:593-596,1992。

[0390] 可用于本发明中的人源化抗体包括至少包括MASP-2结合CDR3区的人单克隆抗体。另外,可以替换Fc部分,以便产生IgA或IgM以及人IgG抗体。此类人源化抗体具有特定的临床效用,因为它们特异性识别人MASP-2,但并不在人中诱发针对抗体本身的免疫应答。因而,它们更适合于人中的体内施用,尤其是当重复或长期施用是必要的时。

[0391] 在本文的实施例6中提供了从鼠抗MASP-2单克隆抗体生成人源化抗MASP-2抗体的实例。用于产生人源化单克隆抗体的技术也例如通过以下进行描述:Jones,P.T.等人,Nature 321:522,1986;Carter,P.等人,Proc.Nat'l.Acad. Sci.USA 89:4285,1992; Sandhu,J.S.,Crit.Rev.Biotech.12:437,1992; Singer,I.I.等人,J.Immun.150:2844,1993;Sudhir(编辑),Antibody Engineering Protocols,Humana Press,Inc.,1995; Kelley,"Engineering Therapeutic Antibodies,"in Protein Engineering:Principles

and Practice, Cleland等人(编辑), John Wiley&Sons, Inc., 第399-434页, 1996; 以及1997年授予Queen的美国专利号5,693,762。另外, 还存在从特异性鼠抗体区域合成人源化抗体的一些商业实体, 例如Protein Design Labs (Mountain View, CA)。

[0392] 重组抗体

[0393] 还可以使用重组方法来制备抗MASP-2抗体。例如, 可以使用人免疫球蛋白表达文库(例如, 可得自Stratagene, Corp., LaJolla, CA) 制备人抗体, 以产生人抗体的片段(V_H 、 V_L 、Fv、Fd、Fab或 $F(ab')_2$)。然后使用与用于产生嵌合抗体相似的技术, 将这些片段用于构建完整的人抗体。

[0394] 抗独特型抗体

[0395] 一旦鉴定了具有所需抑制活性的抗MASP-2抗体, 使用本领域众所周知的技术, 这些抗体就可以用于生成类似MASP-2的一部分的抗独特型抗体。参见例如, Greenspan, N.S. 等人, FASEB J. 7:437, 1993。例如, 与MASP-2 结合并竞争性抑制补体激活所需的MASP-2蛋白相互作用的抗体可以用于生成抗独特型, 其类似MASP-2蛋白上的MBL结合位点, 并且因此结合并中和 MASP-2的结合配体, 例如MBL。

[0396] 免疫球蛋白片段

[0397] 可用于本发明的方法中的MASP-2抑制剂不仅包含完整的免疫球蛋白分子, 还包含众所周知的片段, 包括Fab、Fab'、 $F(ab)_2$ 、 $F(ab')_2$ 和Fv片段, scFv 片段, 双抗体, 线性抗体, 单链抗体分子以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0398] 本领域众所周知的是, 仅抗体分子的一小部分, 互补位, 涉及抗体与其表位的结合(参见例如, Clark, W.R., The Experimental Foundations of Modern Immunology, Wiley&Sons, Inc., NY, 1986)。抗体的pfc'和Fc区是经典补体途径的效应物, 但不涉及抗原结合。pfc'区已从其中酶促切割或已不含pfc'区而产生的抗体被指定为 $F(ab')_2$ 片段, 并且保留完整抗体的两个抗原结合位点。分离的 $F(ab')_2$ 片段由于其两个抗原结合位点而被称为二价单克隆片段。类似地, Fc区已从其中酶促切割或已不含Fc区而产生的抗体被指定为Fab片段, 并且保留完整抗体分子的抗原结合位点之一。

[0399] 例如通过整个抗体经由常规方法的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化, 可以通过蛋白酶解来获得抗体片段。例如, 可以通过抗体用胃蛋白酶的酶促切割来产生抗体片段, 以提供指示为 $F(ab')_2$ 的5S片段。该片段可以使用硫醇还原剂进一步切割, 以产生3.5S Fab'单价片段。任选地, 可以使用用于巯基的封闭基团来执行切割反应, 所述巯基起因于二硫键合的切割。作为替代方案, 使用胃蛋白酶的酶促切割直接产生两个单价Fab片段和一个Fc片段。这些方法例如在以下中进行描述: 授予Goldenberg的美国专利号4,331,647; Nisonoff, A. 等人, Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, R.R., Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman等人, 于Methods in Enzymology 1:422, Academic Press, 196; 以及通过Coligan在第2.8.1-2.8.10和2.10.-2.10.4页。

[0400] 在一些实施方案中, 优选使用缺乏Fc区的抗体片段, 以避免经典补体途径的激活, 所述经典补体途径在Fc与Fc γ 受体结合后启动。存在通过其可以产生避免Fc γ 受体相互作用的MoAb的几种方法。例如, 可以使用通过蛋白酶解酶的部分消化(例如无花果蛋白酶消化)以化学方法去除单克隆抗体的Fc 区, 从而生成例如抗原结合抗体片段, 例如Fab或 $F(ab)_2$ 片段(Mariani, M. 等人, Mol. Immunol. 28:69-71, 1991)。可替代地, 在如本文所述的

人源化抗体构建期间,可以使用不结合Fc γ 受体的人 γ 4 IgG同种型。也可以使用本文所述的重组技术,来改造缺乏Fc结构域的抗体、单链抗体和抗原结合结构域。

[0401] 单链抗体片段

[0402] 可替代地,可以产生对于MASP-2特异性的单肽链结合分子,其中重链和轻链Fv区是相连的。Fv片段可以通过肽接头相连,以形成单链抗原结合蛋白(scFv)。这些单链抗原结合蛋白通过构建包含DNA序列的结构基因来制备,所述DNA序列编码通过寡核苷酸相连的V_H和V_L结构域。将结构基因插入表达载体内,随后将所述表达载体引入宿主细胞例如大肠杆菌内。重组宿主细胞合成具有桥接两个V结构域的接头肽的单条多肽链。用于产生scFv的方法例如通过以下进行描述:Whiflow等人,"Methods:A Companion to Methods in Enzymology"2:97,1991;Bird等人,Science 242:423,1988;授予Ladner 的美国专利号4,946,778;Pack,P.等人,Bio/Technology 11:1271,1993。

[0403] 作为说明性实例,可以通过在体外将淋巴细胞暴露于MASP-2多肽,并且选择噬菌体或类似载体中的抗体展示文库(例如,通过使用固定化或标记的 MASP-2蛋白质或肽),来获得MASP-2特异性scFv。可以通过筛选在噬菌体或细菌如大肠杆菌上展示的随机肽文库,来获得编码具有潜在MASP-2多肽结合结构域的多肽的基因。这些随机肽展示文库可以用于筛选与MASP-2相互作用的肽。用于产生且筛选此类随机肽展示文库的技术是本领域众所周知的(授予Lardner的美国专利号5,223,409;授予Ladner的美国专利号4,946,778;授予Lardner的美国专利号5,403,484;授予Lardner的美国专利号5,571,698;以及Kay等人,Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press,Inc., 1996),并且随机肽展示文库和用于筛选此类文库的试剂盒例如从CLONTECH Laboratories,Inc.(Palo Alto, Calif.),Invitrogen Inc.(San Diego,Calif.),New England Biolabs,Inc.(Beverly, Mass.),以及Pharmacia LKB Biotechnology Inc.(Piscataway,N.J.)商购可得。

[0404] 可用于本发明的这个方面的抗MASP-2抗体片段的另一种形式是编码单个互补决定区(CDR)的肽,所述单个互补决定区与MASP-2抗原上的表位结合并抑制MASP-2依赖性补体激活。CDR肽("最小识别单位")可以通过构建编码目的抗体的CDR的基因来获得。例如,通过使用聚合酶链反应以从产生抗体的细胞的RNA合成可变区,来制备此类基因(参见例如,Larrick等人,Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106,1991;Courtenay-Luck,"Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies",于Monoclonal Antibodies: Production,Engineering and Clinical Application,Ritter等人(编辑),第166页,Cambridge University Press,1995;以及Ward等人,"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies",于Monoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch等人(编辑),第137页,Wiley-Liss,Inc.,1995)。

[0405] 将本文所述的MASP-2抗体施用于有此需要的受试者,以抑制MASP-2 依赖性补体激活。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂是具有减少的效应子功能的高亲和力人或人源化单克隆抗MASP-2抗体。

[0406] 肽抑制剂

[0407] 在本发明的这个方面的一些实施方案中,MASP-2抑制剂包含分离的 MASP-2肽抑制剂,包括抑制MASP-2依赖性补体激活系统的分离的天然肽抑制剂和合成肽抑制剂。如本文使用的,术语"分离的MASP-2肽抑制剂"指通过以下抑制MASP-2依赖性补体激活的肽:与

MASP-2结合,与MASP-2竞争结合凝集素途径中的另一种识别分子(例如MBL、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白或L-纤维胶凝蛋白),和/或与MASP-2直接相互作用以抑制MASP-2依赖性补体激活,所述肽是基本上纯的并且基本上不含它们可以在自然界中与其一起发现的其它物质,其程度对于其预期用途是实际且适当的。

[0408] 肽抑制剂已成功地在体内用于干扰蛋白质-蛋白质相互作用和催化位点。例如,针对与LFA-1在结构上有关的粘附分子的肽抑制剂最近已批准用于凝血病的临床使用(Ohman,E.M.等人,European Heart J.16:50-55,1995)。已描述了阻止或干扰整联蛋白依赖性粘附的短线性肽(<30个氨基酸)(Murayama,O.等人,J.Biochem.120:445-51,1996)。长度范围为25至200个氨基酸残基的较长肽也已成功地用于阻断整联蛋白依赖性粘附(Zhang,L.等人,J.Biol.Chem.271(47):29953-57,1996)。一般而言,较长的肽抑制剂具有比短肽更高的亲和力和/或更慢的离开速率,并且因此可能是更有力的抑制剂。环肽抑制剂也已显示为体内整联蛋白的有效抑制剂,用于治疗炎症性疾病(Jackson,D.Y.等人,J.Med.Chem.40:3359-68,1997)。生产环肽的一种方法涉及肽的合成,其中肽的末端氨基酸是半胱氨酸,从而允许肽通过末端氨基酸之间的二硫键合以环状形式存在,其已显示改善体内亲和力和半衰期用于造血系统赘生物的治疗(例如,授予Larson的美国专利号6,649,592)。

[0409] 合成MASP-2肽抑制剂

[0410] 可用于本发明的这个方面的方法中的MASP-2抑制肽通过模拟对于MASP-2功能重要的靶区域的氨基酸序列进行例示。可用于本发明的方法的实践中的抑制肽的大小范围为约5个氨基酸至约300个氨基酸。表3提供了可以用于本发明的这个方面的实践中的示例性抑制肽的列表。可以在几种测定之一中测试候选MASP-2抑制肽充当MASP-2抑制剂的能力,所述测定包括例如凝集素特异性C4切割测定(在实施例2中描述)和C3b沉积测定(在实施例2中描述)。

[0411] 在一些实施方案中,MASP-2抑制肽衍生自MASP-2多肽,并且选自全长成熟MASP-2蛋白(SEQ ID NO:6),或MASP-2蛋白的特定结构域,例如CUBI结构域(SEQ ID NO:8)、CUBIEGF结构域(SEQ ID NO:9)、EGF结构域(SEQ ID NO:11)和丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:12)。如先前所述,CUBIEGFCUBII区域已显示为二聚化以及与MBL结合所需的(Thielens等人,同上)。特别地,MASP-2的CUBI结构域中的肽序列TFRSDYN(SEQ ID NO:16)已在研究中显示了涉及与MBL的结合,所述研究鉴定了携带在Asp105处至Gly105的纯合突变的人,导致MASP-2从MBL复合物中的丧失(Stengaard-Pedersen,K.等人,New England J.Med.349:554-560,2003)。

[0412] 在一些实施方案中,MASP-2抑制肽衍生自与MASP-2结合并涉及凝集素补体途径的凝集素蛋白。已鉴定了涉及该途径的几种不同凝集素,包括甘露聚糖结合凝集素(MBL)、L-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白。(Ikeda,K.等人,J.Biol.Chem.262:7451-7454,1987;Matsushita,M.等人,J.Exp.Med.176:1497-2284,2000;Matsushita,M.等人,J.Immunol.168:3502-3506,2002)。这些凝集素作为同源三聚体亚基的寡聚物存在于血清中,所述亚基各自具有含有碳水化合物识别结构域的N末端胶原样纤维。这些不同的凝集素已显示与MASP-2结合,并且凝集素/MASP-2复合物通过蛋白质C4和C2的切割来激活补体。H-纤维胶凝蛋白具有24个氨基酸的氨基末端区域、具有11个Gly-Xaa-Yaa重复的胶原样

结构域、12个氨基酸的颈部结构域和207个氨基酸的纤维蛋白原样结构域 (Matsushita, M. 等人, J. Immunol. 168:3502-3506, 2002)。H-纤维胶凝蛋白与GlcNAc结合, 并且使由LPS包被的人红细胞凝集, 所述LPS衍生自鼠伤寒沙门氏菌 (*S. typhimurium*)、明尼苏达沙门氏菌 (*S. minnesota*) 和大肠杆菌。H-纤维胶凝蛋白已显示与MASP-2和 MAp19相关, 并激活凝集素途径。同上。L-纤维胶凝蛋白/P35也与GlcNAc 结合, 并且已显示与人血清中的MASP-2和 MAp19相关, 并且该复合物已显示激活凝集素途径 (Matsushita, M. 等人, J. Immunol. 164: 2281, 2000)。相应地, 可用于本发明中的MASP-2抑制肽可以包含选自以下的至少5个氨基酸的区域: MBL蛋白 (SEQ ID NO: 21)、H-纤维胶凝蛋白 (Genbank登录号 NM_173452)、M-纤维胶凝蛋白 (Genbank登录号 000602) 和L-纤维胶凝蛋白 (Genbank登录号 NM_015838)。

[0413] 更具体而言, 科学家已鉴定了MBL上的MASP-2结合位点在12个 Gly-X-Y三联体“GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POG NOG PSG SOG PKG QKG DOG KS” (SEQ ID NO: 26) 内, 所述12个Gly-X-Y 三联体位于MBP的胶原样结构域的C末端部分中的铰链和颈部之间 (Wallis, R. 等人, J. Biol. Chem. 279:14065, 2004)。该MASP-2结合位点区域在人H-纤维胶凝蛋白和人L-纤维胶凝蛋白中也是高度保守的。共有结合位点已得到描述, 其存在于包含氨基酸序列“OGK-X-GP” (SEQ ID NO: 22) 的所有三种凝集素蛋白中, 其中字母“O”代表羟脯氨酸, 并且字母“X”是疏水残基 (Wallis等人, 2004, 同上)。相应地, 在一些实施方案中, 可用于本发明的这个方面的MASP-2 抑制肽的长度为至少6个氨基酸, 并且包含SEQ ID NO: 22。包括氨基酸序列“GLR GLQ GPO GKL GPO G” (SEQ ID NO: 24) 的衍生自MBL的肽已显示在体外结合MASP-2 (Wallis等人, 2004, 同上)。为了增强与MASP-2的结合, 可以合成在每个端部处由两个GPO三联体侧接的肽 (“GPO GPO GLR GLQ GPO GKL GPO GGP OGP O” SEQ ID NO: 25), 以增强如天然MBL蛋白中发现的三螺旋的形成 (如Wallis, R. 等人, J. Biol. Chem. 279:14065, 2004中进一步描述的)。

[0414] MASP-2抑制肽也可以衍生自人H-纤维胶凝蛋白, 其包括来自H-纤维胶凝蛋白中的共有MASP-2结合区的序列“GAO GSO GEK GAO GPQ GPO GPO GKM GPK GEO GDO” (SEQ ID NO: 27)。还包括的是衍生自人L-纤维胶凝蛋白的肽, 其包括来自L-纤维胶凝蛋白中的共有MASP-2结合区的序列“GCO GLO GAO GDK GEA GTN GKR GER GPO GPO GKA GPO GPN GAO GEO” (SEQ ID NO: 28)。

[0415] MASP-2抑制肽还可以衍生自C4切割位点, 例如“LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI” (SEQ ID NO: 29), 其是与抗凝血酶III的C 末端部分相连接的C4切割位点 (Glover, G.I. 等人, Mol. Immunol. 25:1261 (1988))。

[0416] 表3: 示例性MASP-2抑制肽

[0417]

SEQ ID NO	来源
SEQ ID NO:6	人 MASP-2 蛋白
SEQ ID NO:8	MASP-2 的 CUBI 结构域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-121)
SEQ ID NO:9	MASP-2 的 CUBIEGF 结构域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-166)
SEQ ID NO:10	MASP-2 的 CUBIEGFCUBII 结构域(SEQ ID NO:6 的 aa 1-293)
SEQ ID NO:11	MASP-2 的 EGF 结构域(aa 122-166)
SEQ ID NO:12	MASP-2 的丝氨酸蛋白酶结构域(aa 429-671)
SEQ ID NO:16	MASP-2 中的 MBL 结合区
SEQ ID NO:3	人 MAp19
SEQ ID NO:21	人 MBL 蛋白

[0418]

SEQ ID NO	来源
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, 其中"O" = 羟脯氨酸且"X"是疏水性氨基酸残基	来自人 MBL 和人纤维胶凝蛋白的合成肽共有结合位点
SEQ ID NO:23 OGKLG	人 MBL 核心结合位点
SEQ ID NO:24 GLR GLQ GPO GKL GPO G	人 MBP 三联体 6-10-证实了与 MASP-2 的结合
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPOGK LGPOGGPOGPO	具有添加的 GPO 以增强三螺旋形成的人 MBP 三联体
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEPGQ GLRGLQGPOGKLGPOGN OGPSGSOGPKGQKGD OG KS	人 MBP 三联体 1-17
SEQ ID NO:27 GAOGSOGKGAOGPQGP OGPOGKMGPKGEOGDO	人 H-纤维胶凝蛋白(Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGEAGT NGKRGERGPOGPOGKAG POGPNGAOGEO	人 L-纤维胶凝蛋白 P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKANRP FLVFI	人 C4 切割位点

[0419] 注:字母“O”代表羟脯氨酸。字母“X”是疏水性残基。

[0420] 衍生自C4切割位点的肽以及抑制MASP-2丝氨酸蛋白酶位点的其它肽可以进行化学修饰,使得它们是不可逆的蛋白酶抑制剂。例如,适当的修饰可以包括但不限于在C末端、Asp或Glu处或附加到功能性侧链的卤代甲基酮(Br、Cl、I、F);在氨基或其它功能性侧

链上的卤代乙酰基(或其它 α -卤代乙酰基);在氨基或羧基末端上或者在功能性侧链上的含环氧化物或亚胺基团;或者在氨基或羧基末端上或者在功能性侧链上的亚氨酸酯。此类修饰通过肽的共价附着提供永久性抑制酶的优点。这可以导致较低的有效剂量和/或关于肽抑制剂的较不频繁施用的需要。

[0421] 除上述抑制肽之外,可用于本发明的方法中的MASP-2抑制肽包括如本文所述获得的含有抗MASP-2 MoAb的MASP-2结合CDR3区的肽。用于合成肽中的CDR区的序列可以通过本领域已知的方法进行确定。重链可变区是长度范围一般为100至150个氨基酸的肽。轻链可变区是长度范围一般为80至130个氨基酸的肽。在重链可变区和轻链可变区内的CDR序列仅包括大约3-25个氨基酸的序列,其可以通过本领域普通技术人员容易地进行测序。

[0422] 本领域技术人员将认识到,上述MASP-2抑制肽的基本上同源的变异也将显示出MASP-2抑制活性。示例性变体包括但不限于在主题肽的羧基末端或氨基末端部分上具有插入、缺失、替换和/或另外氨基酸的肽及其混合物。相应地,具有MASP-2抑制活性的那些同源肽考虑可用于本发明的方法中。所述的肽还可以包括复制基序和具有保守取代的其它修饰。保守变体在本文其它地方进行描述,并且包括氨基酸交换为具有相似电荷、大小或疏水性等等的另一个氨基酸。

[0423] MASP-2抑制肽可以进行修饰,以增加溶解度和/或使正电荷或负电荷达到最大,以便更紧密地类似完整蛋白质中的区段。衍生物可以具有或不具有本文公开的肽的确切一级氨基酸结构,只要该衍生物在功能上保留MASP-2抑制的所需性质。修饰可以包括用通常已知的二十种氨基酸之一或另一种氨基酸、具有辅助期望特性(例如对酶促降解的抗性)的衍生或取代的氨基酸、或D氨基酸的氨基酸取代,或者用模拟氨基酸、多种氨基酸或肽的天然构象和功能的另一种分子或化合物例如碳水化合物的取代;氨基酸缺失;用通常已知的二十种氨基酸之一或另一种氨基酸、具有辅助期望特性(例如对酶促降解的抗性)的衍生或取代的氨基酸、或D氨基酸的氨基酸插入,或者用模拟氨基酸、多种氨基酸或肽的天然构象和功能的另一种分子或化合物例如碳水化合物的取代;或者用模拟亲本肽的天然构象、电荷分布和功能的另一种分子或化合物例如碳水化合物或核酸单体的取代。肽也可以通过乙酰化或酰胺化进行修饰。

[0424] 衍生抑制肽的合成可以依赖肽生物合成、碳水化合物生物合成等等的已知技术。作为起点,技术人员可以依赖合适的计算机程序,以确定目的肽的构象。一旦已知本文公开的肽的构象,则技术人员就可以以合理的设计方式确定可以在一个或多个位点制备何种取代,以形成保留亲本肽的基本构象和电荷分布,但可能具有在亲本肽中不存在或增强的特性的衍生物。一旦鉴定了候选衍生物分子,就可以使用本文所述的测定来测试衍生物,以确定它们是否充当MASP-2抑制剂。

[0425] 关于MASP-2抑制肽的筛选

[0426] 也可以使用分子建模和合理的分子设计,以生成且筛选模拟MASP-2的关键结合区的分子结构,并且抑制MASP-2的补体活性的肽。用于建模的分子结构包括抗MASP-2单克隆抗体的CDR区域,以及已知对于MASP-2功能重要的靶区域,包括二聚化所需的区域、涉及与MBL结合的区域、以及如先前所述的丝氨酸蛋白酶活性位点。用于鉴定与特定靶结合的肽的方法是本领域众所周知的。例如,分子印记可以用于从头构建大分子结构,例如与特定分子结合的肽。参见例如,Shea, K.J., "Molecular Imprinting of Synthetic Network

Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites,"TRIP 2(5) 1994。

[0427] 作为说明性实例,制备MASP-2结合肽的模拟物的一种方法如下。已知 MASP-2结合肽或显示出MASP-2抑制的抗MASP-2抗体的结合区的功能单体(模板)进行聚合。然后去除模板,随后为在由模板留下的空隙中的第二类单体的聚合,以提供显示出与模板相似的一种或多种所需性质的新分子。除以这种方式制备肽之外,还可以制备其为MASP-2抑制剂的其它MASP-2结合分子,例如多糖、核苷、药物、核蛋白、脂蛋白、碳水化合物、糖蛋白、类固醇、脂质及其它生物活性材料。该方法可用于设计比其天然对应物更稳定的广泛多样的生物模拟物,因为它们通常通过功能单体的自由基聚合进行制备,导致具有不可生物降解的主链的化合物。

[0428] 肽合成

[0429] MASP-2抑制肽可以使用本领域众所周知的技术来制备,所述技术例如最初由 Merrifield在J.Amer.Chem.Soc.85:2149-2154,1963中描述的固相合成技术。例如,按照由制造商提供的说明书,使用Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer(Foster City,Calif.),可以实现自动化合成。其它技术可以例如在Bodanszky,M.等人,Peptide Synthesis,第二版,John Wiley&Sons, 1976,以及本领域技术人员已知的其它参考著作中找到。

[0430] 也可以使用本领域技术人员已知的标准遗传改造技术来制备肽。例如,可以通过将编码肽的核酸插入表达载体内,表达DNA,并且在所需氨基酸的存在下将DNA翻译成肽,来酶促生产肽。然后使用层析或电泳技术、或者借助于载体蛋白来纯化肽,通过将编码载体蛋白的核酸序列与肽编码序列同相插入表达载体内,所述载体蛋白可以与肽融合并随后从肽中切割。可以使用层析、电泳或免疫学技术(例如经由针对载体蛋白的抗体与树脂结合)来分离融合蛋白-肽。肽可以使用化学方法或例如通过水解酶酶促进行切割。

[0431] 可用于本发明的方法中的MASP-2抑制肽也可以遵循常规技术在重组宿主细胞中产生。为了表达MASP-2抑制肽编码序列,编码该肽的核酸分子必须可操作地连接到调控序列,然后引入宿主细胞内,所述调控序列控制表达载体中的转录表达。除转录调控序列例如启动子和增强子之外,表达载体还可以包括翻译调控序列和标记物基因,其适合于选择携带表达载体的细胞。

[0432] 编码MASP-2抑制肽的核酸分子可以使用方案如亚磷酸胺法用“基因机器”进行合成。如果化学合成的双链DNA是应用例如基因或基因片段的合成所需的,则每条互补链分开进行制备。短基因(60至80个碱基对)的生产是技术上简单的,并且可以通过合成互补链然后使其退火来完成。对于更长基因的生产,合成基因(双链的)由长度为20至100个核苷酸的单链片段以模块化形式进行组装。关于多核苷酸合成的综述,参见例如,Glick和Pasternak,"Molecular Biotechnology,Principles and Applications of Recombinant DNA", ASM Press,1994;Itakura,K.等人,Annu.Rev.Biochem.53:323,1984;以及 Climie,S.等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 87:633,1990。

[0433] 小分子抑制剂

[0434] 在一些实施方案中,MASP-2抑制剂是小分子抑制剂,包括具有低分子量的天然和合成物质,例如肽、肽模拟物和非肽抑制剂(包括寡核苷酸和有机化合物)。MASP-2的小分子

抑制剂可以基于抗MASP-2抗体的可变区的分子结构来生成。

[0435] 还可以使用计算药物设计 (Kuntz I.D.等人, Science 257:1078,1992), 基于MASP-2晶体结构来设计且生成小分子抑制剂。大鼠MASP-2的晶体结构已得到描述 (Feinberg,H.等人, EMBO J.22:2348-2359,2003)。使用由Kuntz 等人描述的方法, MASP-2晶体结构坐标用作计算机程序如DOCK的输入, 所述程序输出预计与MASP-2结合的小分子结构列表。此类计算机程序的使用是本领域技术人员众所周知的。例如, 通过使用程序DOCK (Kuntz,I.D. 等人, J.Mol.Biol.161:269-288,1982;DesJarlais,R.L.等人, PNAS 87:6644-6648,1990), 来评估Cambridge Crystallographic数据库中发现的化合物与酶的结合位点的拟合度, 使用HIV1蛋白酶抑制剂的晶体结构, 以鉴定其为HIV-1蛋白酶抑制剂的独特非肽配体。

[0436] 使用如实施例10中所述的MASP-2结合测定, 来筛选通过计算方法鉴定为潜在MASP-2抑制剂的小分子结构列表。发现与MASP-2结合的小分子然后在例如实施例2中所述的功能测定中进行测定, 以确定它们是否抑制 MASP-2依赖性补体激活。

[0437] MASP-2可溶性受体

[0438] 其它合适的MASP-2抑制剂被认为包括MASP-2可溶性受体, 其可以使用本领域普通技术人员已知的技术进行生产。

[0439] MASP-2的表达抑制剂

[0440] 在本发明的这个方面的另一个实施方案中, MASP-2抑制剂是能够抑制 MASP-2依赖性补体激活的MASP-2表达抑制剂。在本发明的这个方面的实践中, 代表性的MASP-2表达抑制剂包括MASP-2反义核酸分子 (例如反义 mRNA、反义DNA或反义寡核苷酸)、MASP-2核酶和MASP-2 RNAi分子。

[0441] 通过与MASP-2 mRNA杂交并阻止MASP-2蛋白的翻译, 反义RNA和 DNA分子作用于直接阻断MASP-2 mRNA的翻译。反义核酸分子可以以多种不同方式进行构建, 条件是它能够干扰MASP-2的表达。例如, 可以通过相对于其正常转录取向反转MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4) 的编码区 (或其一部分), 以允许其互补体的转录, 来构建反义核酸分子。

[0442] 反义核酸分子通常与一种或多种靶基因的至少一部分基本上相同。然而, 核酸无需是完全相同的以抑制表达。一般地, 更高的同源性可以用于补偿更短的反义核酸分子的使用。最小百分比同一性通常大于约65%, 但更高的百分比同一性可能对内源序列的表达发挥更有效的阻遏。多于约80%的显著更大的百分比同一性通常为优选的, 尽管约95%至绝对同一性通常是最优选的。

[0443] 反义核酸分子无需具有与靶基因相同的内含子或外显子模式, 并且靶基因的非编码区段在实现靶基因表达的反义压制方面可能与编码区段同样有效。至少约8个左右的核苷酸的DNA序列可以用作反义核酸分子, 尽管更长的序列是优选的。在本发明中, 有用的MASP-2抑制剂的代表性实例是反义 MASP-2核酸分子, 其与由SEQ ID NO:4中所示的核酸序列组成的MASP-2 cDNA的互补体具有至少百分之九十的同一性。SEQ ID NO:4中所示的核酸序列编码由SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列组成的MASP-2蛋白。

[0444] 结合MASP-2 mRNA的反义寡核苷酸的靶向是可以用于减少MASP-2蛋白质合成水平的另一种机制。例如, 多聚半乳糖醛酸酶和毒蕈碱2型乙酰胆碱受体的合成受到针对其分别mRNA序列的反义寡核苷酸的抑制 (授予Cheng 的美国专利号5,739,119以及授予Shewmaker

的美国专利号5,759,829)。此外,反义抑制的实例已用以下得到证实:核蛋白细胞周期蛋白、多药抗性基因(MDG1)、ICAM-1、E选择素、STK-1、纹状体GABAA受体和人EGF(参见例如,授予Baracchini的美国专利号5,801,154;授予Baker的美国专利号5,789,573;授予Considine的美国专利号5,718,709;以及授予Reubenstein的美国专利号5,610,288)。

[0445] 允许普通技术人员确定哪些寡核苷酸可用于本发明中的系统已得到描述,所述系统涉及使用RNA酶H切割作为转录物内的序列可及性的指示剂来探测靶mRNA中的合适位点。Scherr,M.等人,Nucleic Acids Res.26:5079-5085, 1998;Lloyd等人,Nucleic Acids Res.29:3665-3673,2001。将与MASP-2转录物的某些区域互补的反义寡核苷酸的混合物加入表达MASP-2的细胞提取物例如肝细胞中,并且进行杂交以便产生易受RNA酶H影响的位点。该方法可以与计算机辅助序列选择相组合,所述计算机辅助序列选择可以基于其形成二聚体、发夹或其它二级结构的相对能力来预测用于反义组合物的最佳序列选择,所述二级结构将减少或阻止与宿主细胞中的靶mRNA的特异性结合。可以使用OLIGO引物分析软件(Rychlik,I.,1997)和BLASTN 2.0.5算法软件(Altschul,S.F.等人,Nucl.Acids Res.25:3389-3402,1997),来执行这些二级结构分析和靶位点选择考虑。针对靶序列的反义化合物优选包含长度约8至约50个核苷酸。包含约9至约35个左右的核苷酸的反义寡核苷酸是特别优选的。本发明人考虑了在9至35个核苷酸的范围内的所有寡核苷酸组合物(即,长度为9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35个左右的碱基的组合物),对于本发明的基于反义寡核苷酸的方法的实践是高度优选的。MASP-2 mRNA 的高度优选的靶区域是位于或接近AUG翻译起始密码子的那些区域,以及与mRNA的5'区域基本上互补,例如,在MASP-2基因核苷酸序列(SEQ ID NO:4)的一10和+10区域之间的那些序列。示例性MASP-2表达抑制剂在表4中提供。

[0446] 表4:MASP-2的示例性表达抑制剂

	SEQ ID NO:30 (SEQ ID NO:4 的核苷酸 22-680)	编码CUBIEGF的MASP-2 cDNA (SEQ ID NO:4) 的核酸序列
	SEQ ID NO:31 5'CGGGCACACCATGAGGCTGCTGACCC TCCTGGGC3	包括MASP-2 翻译起始位点的SEQ ID NO:4 的核苷酸 12-45 (有义)
[0447]	SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAAC GAGAAG3'	编码包含MASP-2 MBL 结合位点的区域的SEQ ID NO:4 的核苷酸 361-396 (有义)
	SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTA TCCCAA3'	编码包含CUBII 结构域的区域 SEQ ID NO:4 的核苷酸 610-642

[0448] 如上文注意到的,如本文使用的,术语“寡核苷酸”指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)或其模拟物的寡聚物或聚合物。该术语还涵盖由天然存在的核苷酸、糖和共价核苷间(主链)键合构成的那些寡核碱基,以及具有非天然存在的修饰的寡核苷酸。这些修饰允许引入通过天然存在的寡核苷酸无法提供的某些期望性质,例如减少的毒性性质、针对核酸酶降解增加的稳定性和增强的细胞摄取。在说明性实施方案中,本发明的反义化合物与天然DNA的区别在于磷酸二酯主链的修饰,以延长其中磷酸酯取代基由硫代磷酸酯替换的反义寡核苷酸的寿命。同样地,寡核苷酸的一端或两端可以由一种或多种吡啶衍生物取代,

所述吡啶衍生物嵌入核酸链内的相邻碱基对之间。

[0449] 反义的另一种替代方案是“RNA干扰”(RNAi)的使用。双链RNA(dsRNA)可以在哺乳动物体内引发基因沉默。RNAi和共压制的天然功能似乎是保护基因组免受通过移动遗传元件例如反转录转座子和病毒的入侵,当所述移动遗传元件变得活跃时,它们在宿主细胞中产生异常RNA或dsRNA(参见例如, Jensen, J. 等人, Nat. Genet. 21:209-12, 1999)。双链RNA分子可以通过合成能够形成双链RNA分子的两条RNA链进行制备,所述RNA链各自具有约19至25个(例如, 19-23个核苷酸)的长度。例如,可用于本发明的方法中的 dsRNA分子可以包含对应于表4中列出的序列及其互补体的RNA。优选地,至少一条RNA链具有1-5个核苷酸的3'突出端。合成的RNA链在形成双链分子的条件组合。RNA序列可以包含SEQ ID NO:4的至少8核苷酸部分,其总长度为25个核苷酸或更少。关于给定靶的siRNA序列的设计在本领域的普通技术内。设计siRNA序列并保证表达的至少70%敲减的商业服务是可获得的(Qiagen, Valencia, Calif)。

[0450] dsRNA可以作为药物组合物进行施用并且通过已知方法进行,其中将核酸引入所需的靶细胞内。常用的基因转移方法包括磷酸钙、DEAE-葡聚糖、电穿孔、显微注射和病毒方法。此类方法在Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1993中得到教导。

[0451] 核酶也可以用于降低MASP-2的量和/或生物活性,例如靶向MASP-2 mRNA的核酶。核酶是催化性RNA分子,其可以切割具有与核酶的序列完全或部分同源的序列的核酸分子。设计编码RNA核酶的核酶转基因是可能的,所述RNA核酶与靶RNA特异性配对并且在特异性位置处切割磷酸二酯主链,从而使靶RNA在功能上失活。在进行这种切割时,核酶本身没有改变,并且因此能够再循环且切割其它分子。在反义RNA内包括核酶序列赋予其RNA切割活性,从而增加反义构建体的活性。

[0452] 可用于本发明的实践中的核酶通常包含至少约九个核苷酸的杂交区,其在核苷酸序列上与靶MASP-2 mRNA的至少部分互补,以及适于切割靶MASP-2 mRNA的催化区(一般参见, EPA编号0 321 201; W088/04300; Haseloff, J. 等人, Nature 334:585-591, 1988; Fedor, M. J. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1668-1672, 1990; Cech, T. R. 等人, Ann. Rev. Biochem. 55:599-629, 1986)。

[0453] 核酶可以以掺入核酶序列的RNA寡核苷酸的形式直接靶向细胞,或者作为编码所需核酶RNA的表达载体引入细胞内。核酶可以以与对于反义多核苷酸所述的非常相似的方式进行使用且应用。

[0454] 可用于本发明的方法中的反义RNA和DNA、核酶和RNAi分子可以通过本领域已知的用于合成DNA和RNA分子的任何方法来制备。这些包括本领域众所周知的用于化学合成寡脱氧核糖核苷酸和寡核糖核苷酸的技术,例如固相亚磷酰胺化学合成。可替代地, RNA分子可以通过编码反义RNA分子的DNA序列的体外和体内转录来生成。此类DNA序列可以掺入广泛多样的载体内,所述载体掺入合适的RNA聚合酶启动子,例如T7或SP6聚合酶启动子。可替代地,取决于使用的启动子,组成性或诱导性合成反义RNA的反义cDNA构建体可以稳定地引入细胞系内。

[0455] 各种众所周知的DNA分子的修饰可以作为增加稳定性和半衰期的手段引入。有用的修饰包括但不限于对分子的5'和/或3'端添加核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的侧翼序

列,或者在寡脱氧核糖核苷酸主链内使用硫代磷酸酯或 2'-O-甲基而不是磷酸二酯酶键合。

[0456] VI. 药物组合物和递送方法

[0457] 给药

[0458] 在另一个方面,本发明提供了用于抑制受试者中的MASP-2依赖性补体激活的不良作用的组合物,所述受试者患有如本文公开的疾病或状况,所述方法包括向受试者施用包含治疗有效量的MASP-2抑制剂和药学上可接受的载体的组合物。MASP-2抑制剂可以以治疗有效剂量施用于有此需要的受试者,以治疗或改善与MASP-2依赖性补体激活相关的状况。治疗有效剂量指足以导致与疾病或状况相关的症状改善的MASP-2抑制剂的量。

[0459] MASP-2抑制剂的毒性和治疗功效可以通过采用实验动物模型的标准药理学程序来确定,所述实验动物模型例如实施例1中描述的表达人MASP-2转基因的鼠MASP-2^{-/-}小鼠模型。使用此类动物模型,NOAEL (未观察到不良作用水平) 和MED (最小有效剂量) 可以使用标准方法进行确定。NOAEL和MED效应之间的剂量比是治疗比,其表示为比率NOAEL/MED。显示出大治疗比或指数的MASP-2抑制剂是最优选的。从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可以用于制定用于人中的一系列剂量。MASP-2抑制剂的剂量优选地位于循环浓度的范围内,其包括具有很少毒性或没有毒性的MED。取决于所采用的剂型和所利用的施用途径,剂量可以在此范围内变化。

[0460] 对于任何化合物制剂,可以使用动物模型来估计治疗有效剂量。例如,可以在动物模型中制定剂量,以实现包括MED的循环血浆浓度范围。血浆中的MASP-2抑制剂的定量水平也可以例如通过高效液相层析进行测量。

[0461] 除毒性研究之外,还可以基于活受试者中存在的MASP-2蛋白的量和MASP-2抑制剂的结合亲和力来估计有效剂量。已显示了正常人受试者中的MASP-2水平在血清中以在500ng/ml的范围内的低水平存在,并且可以使用Møller-Kristensen M.等人,J.Immunol.Methods 282:159-167,2003中描述的用于MASP-2的定量测定,来确定特定受试者中的MASP-2水平。

[0462] 一般地,包含MASP-2抑制剂的所施周组合物的剂量取决于此类因素如受试者的年龄、重量、身高、性别、一般医学状况和既往病史而变。作为说明,MASP-2抑制剂,例如抗MASP-2抗体,可以以约0.010至10.0mg/kg,优选0.010至1.0mg/kg,更优选0.010至0.1mg/kg受试者体重的剂量范围进行施用。在一些实施方案中,组合物包含抗MASP-2抗体和MASP-2抑制肽的组合。

[0463] 本发明的MASP-2抑制组合物和方法在给定受试者中的治疗功效以及适当的剂量,可以按照本领域技术人员众所周知的补体测定来确定。补体生成了众多特异性产物。在过去的十年期间,对于这些激活产物中的大多数,包括小激活片段C3a、C4a和C5a,以及大激活片段iC3b、C4d、Bb和sC5b-9,灵敏和特异性的测定已得到开发并且是商购可得的。这些测定中的大多数利用单克隆抗体,其与在片段而不是它们由其形成的天然蛋白质上暴露的新抗原(新生抗原)反应,使得这些测定非常简单且特异性。大多数依赖ELISA技术,尽管放射免疫测定有时仍用于C3a和C5a。后一种测定测量未加工的片段及其'desArg'片段两者,其是循环中发现的主要形式。未加工的片段和C5a_{desArg}通过与细胞表面受体的结合被快速清除,并且因此以非常低的浓度存在,而C3a_{desArg}并不与细胞结合并在血浆中累积。C3a的测量提供了灵敏的、途径不依赖性补体激活指示剂。可以通过测量Bb片段来评价旁路途径激活。

膜攻击途径激活的液相产物sC5b-9的检测提供了补体被激活完成的证据。因为凝集素途径和经典途径两者均生成相同的激活产物C4a和C4d,所以这两种片段的测量不能提供关于这两个途径中的哪一个已生成激活产物的任何信息。

[0464] MASP-2依赖性补体激活的抑制的特征在于补体系统的组分中的至少一种下述变化,所述变化作为按照本发明的方法施用MASP-2抑制剂的结果而发生:MASP-2依赖性补体激活系统产物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9 (MAC) 的生成或产生的抑制(例如,如实施例2中所述测量的),C4切割和C4b沉积的减少(例如,如实施例10中所述测量的),或C3切割和C3b沉积的减少(例如,如实施例10中所述测量的)。

[0465] 另外的药剂

[0466] 包含MASP-2抑制剂的组合物和方法可以任选地包含一种或多种另外的治疗剂,其可以加强MASP-2抑制剂的活性、或者以累加或协同的方式提供有关的治疗功能。例如,在治疗患有TTP的受试者的背景下,其中受试者对于ADAM-TS13的抑制剂呈阳性,一种或多种MASP-2抑制剂可以与一种或多种免疫抑制剂组合进行施用(包括共施用)。合适的免疫抑制剂包括:皮质类固醇、利妥昔单抗、环孢菌素等等。在治疗患有或者处于发展HUS或aHUS 的风险中的受试者的背景下,一种或多种MASP-2抑制剂可以与合适的抗生素组合进行施用(包括共施用)。在治疗患有或处于发展aHUS的风险中的受试者的背景下,一种或多种MASP-2抑制剂可以与其它补体抑制剂组合进行施用(包括共施用),所述其它补体抑制剂例如依库珠单抗(Soliris)、TT-30、针对因子B的抗体、或抑制终末补体组分或旁路途径放大的其它药剂。

[0467] 确定另外药剂的包括和选择,以实现所需的治疗结果。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂可以与一种或多种抗炎剂和/或镇痛剂组合进行施用。合适的抗炎剂和/或镇痛剂包括:5-羟色胺受体拮抗剂;血清素受体激动剂;组胺受体拮抗剂;缓激肽受体拮抗剂;激肽释放酶抑制剂;速激肽受体拮抗剂,包括神经激肽₁和神经激肽₂受体亚型拮抗剂;降钙素基因相关肽(CGRP)受体拮抗剂;白细胞介素受体拮抗剂;在花生四烯酸代谢物的合成途径中具有活性的酶的抑制剂,包括磷脂酶抑制剂,包括PLA₂同种型抑制剂和PLC γ 同种型抑制剂、环氧合酶(COX)抑制剂(其可能是COX-1、COX-2或非选择性COX-1 和-2抑制剂)、脂氧合酶抑制剂;前列腺素类受体拮抗剂,包括类花生酸EP-1 和EP-4受体亚型拮抗剂,以及血栓素受体亚型拮抗剂;白三烯受体拮抗剂,包括白三烯B₄受体亚型拮抗剂和白三烯D₄受体亚型拮抗剂;阿片样受体激动剂,包括 μ -阿片样、 δ -阿片样和 κ -阿片样受体亚型激动剂;嘌呤受体激动剂和拮抗剂,包括P2X受体拮抗剂和P2Y受体激动剂;三磷酸腺苷(ATP)敏感性钾通道开放剂;MAP激酶抑制剂;烟碱型乙酰胆碱抑制剂;和 α 肾上腺素能受体激动剂(包括 α -1、 α -2以及非选择性 α -1和2激动剂)。

[0468] 本发明的MASP-2抑制剂也可以与一种或多种其它补体抑制剂如C5的抑制剂组合进行施用。迄今为止,针对C5的抗体依库珠单抗(**Solaris®**)是已批准用于人使用的唯一补体靶向药物。然而,一些药理学试剂已显示在体内阻断补体。K76C00H和甲磺酸奈莫司他(nafamstat mesilate)是已在动物移植模型中显示一些有效性的两种药剂(Miyagawa, S. 等人, Transplant Proc. 24:483-484, 1992)。低分子量肝素也已显示有效调控补体活性(Edens, R.E. 等人, Complement Today, 第96-120页, Basel: Karger, 1993)。认为这些小分子抑制剂可以用作与本发明的MASP-2抑制剂组合使用的药剂。

[0469] 其它天然存在的补体抑制剂可以与本发明的MASP-2抑制剂组合使用。补体的生物抑制剂包括可溶性补体因子1 (sCR1)。这是天然存在的抑制剂,其可以在人细胞的外膜上找到。其它膜抑制剂包括DAF、MCP和CD59。重组形式已关于其在体外和体内的抗补体活性进行测试。sCR1已显示在异种移植中是有效的,其中补体系统(旁路和经典两者)在血液灌注通过新近移植的器官的几分钟内提供了过度活跃排斥综合征的触发剂(PNtt, J.L.等人, Immunol. Today 11:450-6, 1990; Marino, I.R.等人, Transplant Proc. 1071:6, 1990; Johnstone, P.S.等人, Transplantation 54:573-6, 1992)。sCR1的使用保护且延长移植器官的存活时间,在器官存活的发病机制中牵涉补体途径(Leventhal, J.R.等人, Transplantation 55:857-66, 1993; Pruitt, S.K.等人, Transplantation 57:363-70, 1994)。

[0470] 用于与本发明的组合物组合使用的合适的另外的补体抑制剂还包括例如 MoAb, 如由Alexion Pharmaceuticals, Inc., New Haven, Connecticut开发的抗C5抗体(例如, 依库珠单抗), 以及抗备解素MoAb。

[0471] 药物载体和递送媒介物

[0472] 一般而言,与任何其它选择的治疗剂组合的本发明的MASP-2抑制剂组合物,适当地包含在药学上可接受的载体中。载体是无毒的、生物相容的并且这样加以选择,以便并不有害地影响MASP-2抑制剂(以及与其组合的任何其它治疗剂)的生物活性。用于肽的示例性药学上可接受的载体在授予Yamada 的美国专利号5,211,657中进行描述。可用于本发明中的抗MASP-2抗体和抑制肽可以配制成以固体、半固体、凝胶、液体或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊、粉末、颗粒、软膏、溶液、贮库、吸入剂和注射剂,允许经口、肠胃外或手术施用。本发明还考虑了通过包被医疗装置等等的组合物的局部施用。

[0473] 用于经由注射、输注或冲洗的肠胃外递送和局部递送的合适载体包括蒸馏水、生理磷酸盐缓冲盐水、正常或乳酸林格氏溶液、右旋糖溶液、汉克氏溶液或丙二醇。另外,无菌的不挥发性油可以用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以采用任何生物相容性油,包括合成甘油单酯或甘油二酯。另外,脂肪酸如油酸可用于注射剂的制备中。载体和药剂可以混合为液体、悬浮液、可聚合或不可聚合凝胶、糊剂或药膏。

[0474] 载体还可以包含递送媒介物,以维持(即延长、延迟或调控)药剂的递送,或者增强治疗剂的递送、摄取、稳定性或药代动力学。作为非限制性实例,此类递送媒介物可以包括由蛋白质、脂质体、碳水化合物、合成有机化合物、无机化合物、聚合或共聚水凝胶和聚合胶束构成的微粒、微球体、纳米球或纳米颗粒。合适的水凝胶和胶束递送系统包括在WO 2004/009664 A2中公开的PEO:PHB:PEO共聚物和共聚物/环糊精复合物,以及在美国专利申请公开号2002/0019369 A1中公开的PEO和PEO/环糊精复合物。此类水凝胶可以在预期作用部位处进行局部注射,或者进行皮下或肌肉注射以形成持续释放贮库。

[0475] 对于关节内递送, MASP-2抑制剂可以在上述可注射的液体或凝胶载体、上述可注射的持续释放递送媒介物、或者透明质酸或透明质酸衍生物中携带。

[0476] 对于非肽能药剂的经口施用, MASP-2抑制剂可以在惰性填料或稀释剂如蔗糖、玉米淀粉或纤维素中携带。

[0477] 对于局部施用, MASP-2抑制剂可以在软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体或粉末中,或者经由透皮贴剂在凝胶或微囊递送系统中携带。

[0478] 各种经鼻和肺递送系统,包括气溶胶、计量吸入器、干粉吸入器和雾化器,正在开发中并且可以适当地适于本发明分别在气溶胶、吸入剂或雾化递送媒介物中的递送。

[0479] 对于鞘内 (IT) 或脑室内 (ICV) 递送,适当地无菌的递送系统 (例如,液体;凝胶、悬浮液等) 可以用于施用本发明。

[0480] 本发明的组合物还可以包括生物相容性赋形剂,例如分散剂或润湿剂、助悬剂、稀释剂、缓冲剂、渗透增强剂、乳化剂、粘合剂、增稠剂、调味剂 (用于经口施用)。

[0481] 用于抗体和肽的药物载体

[0482] 更具体而言,关于抗MASP-2抗体和抑制肽,示例性制剂可以作为化合物在生理学上可接受的稀释剂中的可注射剂量的溶液或悬浮液进行肠胃外施用,其中药物载体可以是无菌液体,例如水、油、盐水、甘油或乙醇。另外,辅助物质如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH缓冲物质等等可以存在于包含抗MASP-2抗体和抑制肽的组合物中。药物组合物的另外组分包括石油 (例如具有动物、植物或合成起源),例如大豆油和矿物油。一般而言,二醇如丙二醇或聚乙二醇是用于可注射溶液的优选液体载体。

[0483] 抗MASP-2抗体和抑制肽也可以以贮库注射或植入制剂的形式进行施用,所述制剂可以以这样的方式进行配制,以便允许活性剂的持续或脉冲式释放。

[0484] 用于表达抑制剂的药学上可接受的载体

[0485] 更具体而言,关于可用于本发明的方法中的表达抑制剂,提供了包含如上所述的表达抑制剂和药学上可接受的载体或稀释剂的组合物。组合物可以进一步包含胶态分散系统。

[0486] 包括表达抑制剂的药物组合物可以包括但不限于溶液、乳剂和含有脂质体的制剂。这些组合物可以由各种组分生成,所述组分包括但不限于预制液体、自乳化固体和自乳化半固体。此类组合物的制备通常涉及将表达抑制剂与下述中的一种或多种组合:缓冲剂,抗氧化剂,低分子量多肽,蛋白质,氨基酸,碳水化合物包括葡萄糖、蔗糖或糊精,螯合剂例如EDTA,谷胱甘肽以及其它稳定剂和赋形剂。中性缓冲盐水或与非特异性血清白蛋白混合的盐水是合适稀释剂的实例。

[0487] 在一些实施方案中,组合物可以作为乳剂进行制备且配制,所述乳剂通常为一种液体以液滴的形式分散在另一种液体中的非均相系统 (参见,Idson,于Pharmaceutical Dosage Forms,第1卷,Rieger和Banker (编辑),Marcek Dekker,Inc.,N.Y.,1988)。用于乳剂制剂中的天然存在的乳化剂的实例包括阿拉伯胶、蜂蜡、羊毛脂、卵磷脂和磷脂。

[0488] 在一个实施方案中,包括核酸的组合物可以配制为微乳剂。如本文使用的,微乳剂指水、油和两亲分子的系统,其是单一的光学各向同性和热力学稳定的液体溶液 (参见Rosoff于Pharmaceutical Dosage Forms,第1卷)。本发明的方法还可以使用脂质体用于将反义寡核苷酸转移和递送至所需位点。

[0489] 用于局部施用的表达抑制剂的药物组合物和制剂可以包括透皮贴剂、软膏、洗剂、乳膏、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉末。可以使用常规药物载体,以及水性、粉末或油性基质和增稠剂等等。

[0490] 施用模式

[0491] 取决于局部还是全身施用模式对于待治疗的状况是最适当的,包含 MASP-2抑制剂的药物组合物可以以多种方式进行施用。另外,如本文上文关于体外再灌注程序所述的,

MASP-2抑制剂可以经由将本发明的组合物引入再循环血液或血浆中进行施用。进一步地,本发明的组合物可以通过将组合物包被到可植入医疗装置上或掺入或其内进行递送。

[0492] 全身递送

[0493] 如本文使用的,术语“全身递送”和“全身施用”预期包括但不限于经口和肠胃外途径,包括肌内(IM)、皮下、静脉内(IV)、动脉内、吸入、舌下、经颊、局部、经皮、经鼻、直肠、阴道及其它施用途,其有效地导致所递送的药剂分散到预期治疗作用的单个或多个部位。用于本组合物的优选全身递送途径包括静脉内、肌内、皮下和吸入。应了解,考虑到该药剂对与给定施用途相关的代谢转化途径的敏感性,部分地确定在本发明的特定组合物中利用的关于所选药剂的确切全身施用途。例如,肽能药剂可能最合适地通过除经口外的途径进行施用。

[0494] MASP-2抑制性抗体和多肽可以通过任何合适的手段递送到有此需要的受试者内。MASP-2抗体和多肽的递送方法包括通过经口、肺、肠胃外(例如,肌内、腹膜内、静脉内(IV)或皮下注射)、吸入(例如,经由细粉制剂)、经皮、经鼻、阴道、直肠或舌下施用途的施用,并且可以以对于每种施用途适当的剂型进行配制。

[0495] 作为代表性实例,MASP-2抑制性抗体和肽可以通过施加于能够吸收多肽的体膜,例如鼻膜、胃肠膜和直肠膜而引入活体内。多肽通常与渗透增强剂结合施加于吸收膜。(参见例如, Lee, V.H.L., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys. 5:69, 1988; Lee, V.H.L., J. Controlled Release 13:213, 1990; Lee, V.H.L., 编辑, Peptide and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G. 等人, J. Controlled Release 13:241, 1990。)例如, STDHF 是夫西地酸的合成衍生物, 在结构上类似于胆汁盐的甾体表面活性剂, 并且已用作用于经鼻递送的渗透增强剂。(Lee, W.A., Biopharm. 22, Nov./Dec. 1990.)

[0496] MASP-2抑制性抗体和多肽可以与另一种分子如脂质结合引入, 以保护多肽免于酶促降解。例如, 聚合物, 尤其是聚乙二醇(PEG)的共价附着已用于保护某些蛋白质免于在体内的酶促水解, 并且因此延长半衰期(Fuertges, F. 等人, J. Controlled Release 11:139, 1990)。已报道了用于蛋白质递送的许多聚合物系统(Bae, Y.H. 等人, J. Controlled Release 9:271, 1989; Hori, R. 等人, Pharm. Res. 6:813, 1989; Yamakawa, I. 等人, J. Pharm. Sci. 79:505, 1990; Yoshihiro, I. 等人, J. Controlled Release 10:195, 1989; Asano, M. 等人, J. Controlled Release 9:111, 1989; Rosenblatt, J. 等人, J. Controlled Release 9:195, 1989; Makino, K., J. Controlled Release 12:235, 1990; Takakura, Y. 等人, J. Pharm. Sci. 78:117, 1989; Takakura, Y. 等人, J. Pharm. Sci. 78:219, 1989)。

[0497] 最近, 已开发了具有改善的血清稳定性和循环半衰期的脂质体(参见例如, 授予 Webb 的美国专利号 5,741,516)。此外, 已综述了脂质体和脂质体样制剂作为潜在药物载体的各种方法(参见例如, 授予 Szoka 的美国专利号 5,567,434; 授予 Yagi 的美国专利号 5,552,157; 授予 Nakamori 的美国专利号 5,565,213; 授予 Shinkarenko 的美国专利号 5,738,868; 以及授予 Gao 的美国专利号 5,795,587)。

[0498] 对于透皮应用, MASP-2抑制性抗体和多肽可以与其它合适的成分例如载体和/或佐剂组合。不存在关于此类其它成分的性质限制, 除了它们对于其预期施用必须是药学上可接受的, 并且不能降解组合物的活性成分的活性之外。合适媒介物的实例包括软膏、乳

膏、凝胶或悬浮液,伴随或不伴随纯化的胶原。MASP-2抑制性抗体和多肽也可以浸渍到透皮贴剂、膏药和绷带内,优选以液体或半液体形式。

[0499] 本发明的组合物可以确定为维持所需疗效水平的间隔定期全身施用。例如,组合物可以例如通过皮下注射每两到四周或以更不频繁的间隔进行施用。剂量方案将由医生考虑到可能影响药剂组合作用的各种因素来确定。这些因素将包括待治疗状况的进展程度,患者的年龄、性别和重量,以及其它临床因素。关于每种个别药剂的剂量将根据组合物中包括的MASP-2抑制剂,以及任何药物递送媒介物(例如,持续释放递送媒介物)的存在和性质而变。另外,可以调整剂量数量,以负责施用频率和所递送药剂的药代动力学行为的变化。

[0500] 局部递送

[0501] 如本文使用的,术语“局部”包含在预期的局限性作用部位中或周围的药物施加,并且可以包括例如对皮肤或其它受累组织的局部递送、眼部递送、鞘内(IT)、脑室内(ICV)、关节内、腔内、颅内或膀胱内(intravesicular)施用、放置或冲洗。局部施用可能是优选的,以使得能够施用较低剂量,以避免全身不良作用,并且用于更准确控制施用时机和活性剂在局部施用部位处的浓度。局部施用提供了在靶部位处的已知浓度,不管在代谢、血流等方面的患者间变化性如何。通过直接递送模式也提供了改善的剂量控制。

[0502] MASP-2抑制剂的局部递送可以在用于治疗疾病或状况的外科方法的背景下,例如在手术例如动脉旁路术、旋磨术、激光手术、超声手术、球囊血管成形术和支架放置期间实现。例如,MASP-2抑制剂可以与球囊血管成形术程序结合施用于受试者。球囊血管成形术程序涉及将具有放气球囊的导管插入动脉内。放气的球囊放置在动脉粥样硬化斑块附近并充气,使得斑块被压迫到血管壁上。结果,球囊表面与血管表面上的血管内皮细胞层接触。MASP-2抑制剂可以附着到球囊血管成形术导管,其方式允许药剂在动脉粥样硬化斑块的部位处释放。可以按照本领域已知的标准程序,将药剂附着到球囊导管。例如,药剂可以贮存于球囊导管的区室中,直到球囊充气,此时它被释放到局部环境内。可替代地,可以将药剂浸渍到球囊表面上,使得当球囊充气时,它与动脉壁的细胞接触。药剂也可以在穿孔的球囊导管中递送,所述穿孔的球囊导管例如在Flugelman,M.Y.等人,Circulation 85:1110-1117,1992中公开的那些穿孔的球囊导管。关于用于将治疗性蛋白质附着到球囊血管成形术导管的示例性程序,还参见公开的PCT申请W0 95/23161。同样地,MASP-2抑制剂可以包括在施加于支架的凝胶或聚合物包衣中,或者可以掺入支架的材料内,使得支架在血管放置后洗脱MASP-2抑制剂。

[0503] 用于关节炎及其它肌肉骨骼病症的治疗中的MASP-2抑制组合物可以通过关节内注射进行局部递送。此类组合物可以适当地包括持续释放递送媒介物。作为其中可能需要局部递送的情况的进一步实例,用于泌尿生殖状况的治疗中的MASP-2抑制组合物可以适当地在膀胱内或在另一个泌尿生殖器结构内滴注。

[0504] 在医疗装置上的包被

[0505] MASP-2抑制剂如抗体和抑制肽可以固定到可植入或可附接的医疗装置的表面上(或其内)。在植入动物体内之后,修饰的表面通常与活组织接触。“可植入或可附接的医疗装置”预期在装置(例如,支架和可植入的药物递送装置)的正常操作期间,植入到动物体的组织内或附接至其的任何装置。此类可植入或可附接的医疗装置可以由例如以下进行制

备：硝酸纤维素、重氮纤维素 (diazocellulose)、玻璃、聚苯乙烯、聚氯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、琼脂糖、琼脂、淀粉、尼龙、不锈钢、钛和可生物降解和/或生物相容性聚合物。蛋白质与装置的连接可以通过并不破坏连接蛋白质的生物活性的任何技术，例如通过将蛋白质的N-C末端残基之一或两者附着到装置来实现。附着也可以在蛋白质中的一个或多个内部位点处进行制备。还可以使用多个附着(蛋白质的内部和端部处两者)。可植入或可附接的医疗装置的表面可以进行修饰，以包括用于蛋白质与之固定的官能团(例如，羧基、酰胺、氨基、醚、羟基、氰基、次氨基(nitrido)、氨磺酰基(sulfanamido)、乙炔基(acetylinic)、环氧化物、硅烷基(silanic)、酸酐(anhydric)、琥珀酰胺(succinimic)、叠氮基)。偶联化学包括但不限于形成酯、醚、酰胺、叠氮基和氨磺酰基衍生物，氰酸酯以及与MASP-2抗体或抑制肽上可用的官能团的其它键合。MASP-2抗体或抑制片段也可以通过向蛋白质添加亲和和标签序列非共价地附着，所述亲和和标签序列例如GST(D.B.Smith和K.S.Johnson, Gene 67:31, 1988)、多组氨酸(E.Hochuli 等人, J.Chromatog. 411:77, 1987)或生物素。此类亲和和标签可以用于蛋白质与装置的可逆附着。

[0506] 例如，通过医疗装置表面的共价激活，蛋白质也可以共价附着到装置主体的表面。作为代表性实例，基质细胞蛋白可以通过下述反应基团对的任一种附着到装置主体(该对的一个成员存在于装置主体的表面上，而该对的另一个成员存在于基质细胞蛋白上)：羟基/羧酸以产生酯键合；羟基/酸酐以产生酯键合；羟基/异氰酸酯以产生氨基甲酸酯键合。可以用射频放电等离子体(RFGD) 蚀刻处理不具有有用反应基团的装置主体的表面，以生成反应基团，以便允许基质细胞蛋白的沉积(例如，用氧等离子体处理以引入含氧基团；用丙基氨基等离子体处理以引入胺基)。

[0507] 包含核酸分子例如反义、RNAi或DNA编码肽抑制剂的MASP-2抑制剂可以嵌入附着到装置主体的多孔基质中。可用于制备表面层的代表性多孔基质是如可以得自各种商业来源(例如, Sigma and Collagen Corporation)、由肌腱或真皮胶原制备的那些多孔基质，或者如授予Jefferies的美国专利号4,394,370 和授予Koezuka的4,975,527中所述制备的胶原基质。一种胶原材料被称为 UltraFiber™，并且可从Norian Corp. (Mountain View, California) 获得。

[0508] 需要时，还可以采用某些聚合物基质，并且包括丙烯酸酯聚合物和乳酸聚合物，例如在授予Urist的美国专利号4,526,909和4,563,489中公开的。有用聚合物的特定实例是原酸酯、酸酐、丙烯共富马酸酯的聚合物，或者一种或多种 α -羟基羧酸单体(例如 α -羟基乙酸(乙醇酸)和/或 α -羟基丙酸(乳酸)) 的聚合物。

[0509] 治疗方案

[0510] 在预防应用中，将药物组合物施用于易患或在其它方面处于与MASP-2 依赖性补体激活相关的状况的风险中的受试者，其量足以消除或减少发展状况症状的风险。在治疗应用中，以足以缓解或至少部分减轻状况症状的治疗有效量，将药物组合物施用于怀疑或已经患有与MASP-2依赖性补体激活相关的状况的受试者。在预防方案和治疗方案两者中，包含MASP-2抑制剂的组合物可以以几个剂量进行施用，直到已在受试者中实现足够的治疗结果。本发明的MASP-2抑制组合物的施加可以通过组合物的单次施用或有限的施用顺序来进行，用于治疗急性状况例如再灌注损伤或其它创伤性损伤。可替代地，组合物可以在延长的时间段内以周期性间隔进行施用，用于慢性状况例如关节炎或银屑病的治疗。

[0511] 本发明的方法和组合物可以用于抑制通常起因于诊断和治疗性医学和外科手术的炎症和相关过程。为了抑制此类过程，本发明的MASP-2抑制组合物可以在围手术期应用。如本文使用的，“围手术期”指在手术前和/或手术内和/或手术后，即在手术之前，在手术之前和期间，在手术之前和之后，在手术之前、期间和之后，在手术期间，在手术期间和之后，或在手术之后施用抑制组合物。围手术期应用可以通过将组合物局部施用于外科或手术部位来进行，例如通过注射或连续或间歇冲洗该部位或者通过全身施用。用于局部围手术期递送MASP-2抑制剂溶液的合适方法公开于授予Demopoulos的美国专利号6,420,432和授予Demopoulos的美国专利号6,645,168中。用于局部递送包括MASP-2抑制剂的软骨保护组合物的合适方法公开于国际PCT专利申请WO 01/07067 A2中。用于靶向全身递送包括MASP-2抑制剂的软骨保护组合物的合适方法和组合物公开于国际PCT专利申请WO 03/063799 A2中。

[0512] 在本发明的一个方面，将药物组合物施用于患有或处于发展血栓性微血管病（TMA）的风险中的受试者。在一个实施方案中，TMA选自溶血性尿毒症综合征（HUS）、血栓性血小板减少性紫癜（TTP）和非典型溶血性尿毒症综合征（aHUS）。在一个实施方案中，TMA是aHUS。在一个实施方案中，将组合物施用于在疾病的急性期过程中的aHUS患者。在一个实施方案中，将组合物施用于在缓解期过程中的aHUS患者（即，在已从急性期aHUS的发作中恢复或部分恢复的受试者中，此类缓解例如通过增加的血小板计数和/或减少的血清LDH浓度得到证明，例如如在此通过引用并入本文的Loirat C等人，Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60,2011中所述）。在一个实施方案中，受试者患有或处于发展TMA的风险中，所述TMA是（i）继发于癌症的TMA；（ii）继发于化学疗法的TMA；或（iii）继发于移植（例如器官移植，例如肾移植或同种异体造血干细胞移植）的TMA。在一个实施方案中，受试者患有或处于发展厄舒尔曼综合征（USS）的风险中。在一个实施方案中，受试者患有或处于发展德戈斯病的风险中。在一个实施方案中，受试者患有或处于发展灾难性抗磷脂综合征（CAPS）的风险中。在治疗应用中，以足以抑制血栓形成、缓解或至少部分减轻状况症状的治疗有效量，将药物组合物施用于患有或处于发展 TMA的风险中的受试者。

[0513] 在预防方案和治疗方案两者中，包含MASP-2抑制剂的组合物可以以几个剂量进行施用，直到已在受试者中实现足够的治疗结果。在本发明的一个实施方案中，MASP-2抑制剂包含抗MASP-2抗体，其可以适当地以0.1mg 至10,000mg，更适当地1.0mg至5,000mg，更适当地10.0mg至2,000mg，更适当地10.0mg至1,000mg，并且还更适当地50.0mg至500mg的剂量施用于成人患者（例如，70kg的平均成人重量）。对于儿科患者，可以与患者的重量成比例地调整剂量。本发明的MASP-2抑制组合物的施加可以通过组合物的单次施用或有限的施用顺序来进行，用于TMA的治疗。可替代地，组合物可以在延长的时间段内以周期性间隔，例如每天一次、每两周一次、每周一次、每隔一周、每月一次或每两个月一次进行施用，用于TMA的治疗。

[0514] 在一些实施方案中，患有或处于发展TMA的风险中的受试者先前已经历或目前正在经历用终末补体抑制剂的治療，所述终末补体抑制剂抑制补体蛋白C5的切割。在一些实施方案中，该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制剂的本发明的组合物，并且进一步向受试者施用抑制补体蛋白C5切割的终末补体抑制剂。在一些实施方案中，终末补体抑制剂是人源化抗C5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中，终末补体抑制剂是依库珠单抗。

[0515] 在本发明的一个方面，将药物组合物施用于易患或在其它方面处于aHUS 的风险

中的受试者,其量足以消除或减少发展状况症状的风险。在治疗应用中,以足以缓解或至少部分减轻状况症状的治疗有效量,将药物组合物施用于怀疑或已经患有aHUS的受试者。在本发明的一个方面,在施用之前,可以检查受试者以确定受试者是否显示出aHUS的一种或多种症状,其包括(i) 贫血、(ii) 血小板减少症、(iii) 肾功能不全和(iv) 肌酐升高,然后以有效量和足够的时间段施用本发明的组合物以改善这些症状。

[0516] 在本发明的另一个方面,本发明的MASP-2抑制组合物可以用于预防性治疗具有发展aHUS的升高风险的受试者,并且从而减少受试者发展aHUS 的可能性。首先通过对从受试者获得的样品执行遗传筛选测试,并且鉴定与 aHUS相关的至少一种遗传标记物的存在,来确定受试者中已知与aHUS相关的遗传标记物的存在,所述遗传标记物即补体因子H (CFH)、因子I (CFI)、因子B (CFB)、膜辅因子CD46、C3、补体因子H相关蛋白 (CFHR1)、抗凝蛋白血栓调节蛋白 (THBD)、补体因子H相关蛋白3 (CFHR3) 或补体因子H相关蛋白4 (CFHR4)。然后定期监测受试者(例如,每月一次、每季度一次、每年两次或每年一次),以确定aHUS的至少一种症状的存在或不存在,所述症状例如贫血、血小板减少症、肾功能不全和肌酐升高。在确定这些症状中的至少一种的存在后,可以以改善所述一种或多种症状的有效量和足够的时间段,向受试者施用有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制剂。在本发明的一个再进一步的方面,可以就与触发aHUS临床症状相关的事件的发生,监测由于已进行筛查并确定为具有与aHUS相关的遗传标记物之一而处于发展aHUS的增加风险中的受试者,所述事件包括药物暴露、感染(例如,细菌感染)、恶性肿瘤、损伤、器官或组织移植和妊娠。

[0517] 在本发明的一个再进一步的方面,包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的MASP-2抑制剂的量的组合物,可以施用于患有或处于发展继发于感染的非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS) 的风险中的患者。例如,患有处于发展与肺炎链球菌感染相关的非肠道aHUS的风险中的患者可以用本发明的组合物进行治疗。

[0518] 在本发明的一个再进一步的方面,患有aHUS的受试者最初可以用本发明的MASP-2抑制组合物治疗第一时间段,例如一小时、十二小时、一天、两天或三天,所述MASP-2抑制组合物通过导管例如静脉内导管或皮下导管进行施用。受试者然后可以用MASP-2抑制组合物治疗第二时间段,所述MASP-2抑制组合物通过定期皮下注射,例如每天一次、每两周一次、每周一次、每隔一周、每月一次或每两个月一次的注射进行施用。

[0519] 在本发明的一个再进一步的方面,本发明的MASP-2抑制组合物可以在血浆置换术的不存在下施用于患有aHUS的受试者(即,其aHUS症状并未用血浆置换术进行治疗,并且在用MASP-2抑制组合物治疗时没有用血浆置换术进行治疗的受试者),以避免血浆置换术的潜在并发症,包括出血、感染和暴露于血浆供体中固有的病症和/或过敏,或在其它方面反对血浆置换术的受试者中、或在其中血浆置换术不可用的背景下进行施用。

[0520] 在本发明的一个再进一步的方面,本发明的MASP-2抑制组合物可以在用血浆置换术治疗患者的同时施用于患有aHUS的受试者。例如,接受血浆置换术治疗的受试者然后可以在血浆置换之后或与血浆置换交替施用 MASP-2抑制组合物。

[0521] 在本发明的一个再进一步的方面,患有或处于发展aHUS的风险中,并且正在用本发明的MASP-2抑制组合物治疗的受试者,可以通过例如每十二小时或在每天一次的基础上定期确定至少一种补体因子的水平进行监测,其中与标准值或健康受试者相比,至少一种补体因子的减少水平的确定指示了关于用组合物的继续治疗的需要。

[0522] 在预防方案和治疗方案两者中,包含MASP-2抑制剂的组合物可以以几个剂量进行施用,直到已在受试者中实现足够的治疗结果。在本发明的一个实施方案中,MASP-2抑制剂包含抗MASP-2抗体,其可以适当地以0.1mg 至10,000mg,更适当地1.0mg至5,000mg,更适当地10.0mg至2,000mg,更适当地10.0mg至1,000mg,并且还更适当地50.0mg至500mg的剂量施用于成人患者(例如,70kg的平均成人重量)。对于儿科患者,可以与患者的重量成比例地调整剂量。本发明的MASP-2抑制组合物的施加可以通过组合物的单次施用或有限的施用顺序来进行,用于aHUS的治疗。可替代地,组合物可以在延长的时间段内以周期性间隔,例如每天一次、每两周一次、每周一次、每隔一周、每月一次或每两个月一次进行施用,用于aHUS的治疗。

[0523] 在一些实施方案中,患有aHUS的受试者先前已经历或目前正在经历用终末补体抑制剂的的治疗,所述终末补体抑制剂抑制补体蛋白C5的切割。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制剂的本发明的组合物,并且进一步向受试者施用抑制补体蛋白C5切割的终末补体抑制剂。在一些实施方案中,终末补体抑制剂是人源化抗C5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,终末补体抑制剂是依库珠单抗。

[0524] 在本发明的一个方面,将药物组合物施用于易患或在其它方面处于HUS 的风险中的受试者,其量足以消除或减少发展状况症状的风险。在治疗应用中,以足以缓解或至少部分减轻状况症状的治疗有效量,将药物组合物施用于怀疑或已经患有HUS的受试者。

[0525] 在本发明的另一个方面,可以通过以有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量,向受试者施用本发明的MASP-2抑制组合物,来减少处于发展HUS的风险中的受试者中发展肾功能受损的可能性。例如,处于发展HUS的风险中且待用本发明的MASP-2抑制组合物治疗的受试者可能显示出与HUS相关的一种或多种症状,包括腹泻、血细胞比容水平小于30%伴随血管内红细胞破坏的涂片证据、血小板减少症和肌酐水平升高。作为进一步的实例,处于发展HUS的风险中且待用本发明的MASP-2抑制组合物治疗的受试者可能由大肠杆菌、志贺氏菌属或沙门氏菌属感染。由大肠杆菌、志贺氏菌属或沙门氏菌属感染的受试者可以与抗生素治疗同时用本发明的MASP-2抑制组合物进行治疗,或者可替代地,特别是对于抗生素治疗对于其是禁忌的肠源性大肠杆菌,可以不伴随用抗生素的同时治疗用MASP-2抑制组合物进行治疗。已用抗生素进行治疗的由肠源性大肠杆菌感染的受试者可能处于发展HUS的升高风险中,并且可以用本发明的MASP-2抑制组合物适当地进行治疗,以减少该风险。由肠源性大肠杆菌感染的受试者可以在抗生素的不存在下用本发明的MASP-2抑制组合物治疗第一时间段,然后用本发明的MASP-2抑制组合物和抗生素两者治疗第二时间段。

[0526] 在本发明的一个再进一步的方面,患有HUS的受试者最初可以用本发明的MASP-2抑制组合物治疗第一时间段,例如一小时、十二小时、一天、两天或三天,所述MASP-2抑制组合物通过导管线例如静脉内导管线或皮下导管线进行施用。受试者然后可以用MASP-2抑制组合物治疗第二时间段,所述MASP-2抑制组合物通过定期皮下注射,例如每天一次、每两周一次、每周一次、每隔一周、每月一次或每两个月一次的注射进行施用。

[0527] 在本发明的一个再进一步的方面,本发明的MASP-2抑制组合物可以在血浆置换术的不存在下施用于患有HUS的受试者(即,其HUS症状并未用血浆置换术进行治疗,并且在用MASP-2抑制组合物治疗时没有用血浆置换术进行治疗的受试者),以避免血浆置换术的潜在并发症,包括出血、感染和暴露于血浆供体中固有的病症和/或过敏,或在其它方面反对

血浆置换术的受试者中、或在其中血浆置换术不可用的背景下进行施用。

[0528] 在本发明的一个再进一步的方面,本发明的MASP-2抑制组合物可以在用血浆置换术治疗患者的同时施用于患有HUS的受试者。例如,接受血浆置换术治疗的受试者然后可以在血浆置换之后或与血浆置换交替施用MASP-2 抑制组合物。

[0529] 在本发明的一个再进一步的方面,患有或处于发展HUS的风险中,并且正在用本发明的MASP-2抑制组合物治疗的受试者,可以通过例如每十二小时或在每天一次的基础上定期确定至少一种补体因子的水平进行监测,其中与标准值或健康受试者相比,至少一种补体因子的减少水平的确定指示了关于用组合物的继续治疗的需要。

[0530] 在预防方案和治疗方案两者中,包含MASP-2抑制剂的组合物可以以几个剂量进行施用,直到已在受试者中实现足够的治疗结果。在本发明的一个实施方案中,MASP-2抑制剂包含抗MASP-2抗体,其可以适当地以0.1mg 至10,000mg,更适当地1.0mg至5,000mg,更适当地10.0mg至2,000mg,更适当地10.0mg至1,000mg,并且还更适当地50.0mg至500mg的剂量施用于成人患者(例如,70kg的平均成人重量)。对于儿科患者,可以与患者的重量成比例地调整剂量。本发明的MASP-2抑制组合物的施加可以通过组合物的单次施用或有限的施用顺序来进行,用于HUS的治疗。可替代地,组合物可以在延长的时间段内以周期性间隔,例如每天一次、每两周一次、每周一次、每隔一周、每月一次或每两个月一次进行施用,用于HUS的治疗。

[0531] 在一些实施方案中,患有HUS的受试者先前已经历或目前正在经历用终末补体抑制剂的抑制治疗,所述终末补体抑制剂抑制补体蛋白C5的切割。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制剂的发明的组合物,并且进一步向受试者施用抑制补体蛋白C5切割的终末补体抑制剂。在一些实施方案中,终末补体抑制剂是人源化抗C5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,终末补体抑制剂是依库珠单抗。

[0532] 在本发明的一个方面,将药物组合物施用于易患或在其它方面处于TTP 的风险中的受试者,其量足以消除或减少发展状况症状的风险。在治疗应用中,以足以缓解或至少部分减轻状况症状的治疗有效量,将药物组合物施用于怀疑或已经患有TTP的受试者。

[0533] 在本发明的另一个方面,显示出TTP的一种或多种症状,包括中枢神经系统受累、血小板减少症、严重的心脏受累、严重的肺部受累、胃肠梗塞和坏疽的受试者,可以用本发明的MASP-2抑制组合物进行治疗。在本发明的另一个方面,确定为具有降低水平的ADAMTS13并且还对于ADAMTS13的抑制剂(即抗体)的存在测试呈阳性的受试者,可以用本发明的MASP-2抑制组合物进行治疗。在本发明的一个再进一步的方面,对于ADAMTS13的抑制剂的存在测试呈阳性的受试者,可以与用本发明的MASP-2抑制组合物的治疗同时,用免疫抑制剂(例如皮质类固醇、利妥昔单抗或环孢菌素)进行治疗。在本发明的一个再进一步的方面,确定为具有减少水平的ADAMTS13并且对于 ADAMTS13的抑制剂的存在测试呈阳性的受试者,可以与用本发明的 MASP-2抑制组合物的治疗同时,用ADAMTS13进行治疗。

[0534] 在本发明的一个再进一步的方面,患有TTP的受试者最初可以用本发明的MASP-2抑制组合物治疗第一时间段,例如一小时、十二小时、一天、两天或三天,所述MASP-2抑制组合物通过导管例如静脉内导管或皮下导管进行施用。受试者然后可以用MASP-2抑制组合物治疗第二时间段,所述MASP-2抑制组合物通过定期皮下注射,例如每天一次、每两周一次、每周一次、每隔一周、每月一次或每两个月一次的注射进行施用。

[0535] 在本发明的一个再进一步的方面,本发明的MASP-2抑制组合物可以在血浆置换术的不存在下施用于患有HUS的受试者(即,其TTP症状并未用血浆置换术进行治疗,并且在用MASP-2抑制组合物治疗时没有用血浆置换术进行治疗的受试者),以避免血浆置换术的潜在并发症,包括出血、感染和暴露于血浆供体中固有的病症和/或过敏,或在其它方面反对血浆置换术的受试者中、或在其中血浆置换术不可用的背景下进行施用。

[0536] 在本发明的一个再进一步的方面,本发明的MASP-2抑制组合物可以在用血浆置换术治疗患者的同时施用于患有TTP的受试者。例如,接受血浆置换术治疗的受试者然后可以在血浆置换之后或与血浆置换交替施用MASP-2抑制组合物。

[0537] 在本发明的一个再进一步的方面,患有难治性TTP,即并未充分响应其它治疗如血浆置换术的TTP的症状的受试者,可以用本发明的MASP-2抑制组合物进行治疗,伴随或不伴随另外的血浆置换术。

[0538] 在本发明的一个再进一步的方面,患有或处于发展TTP的风险中,并且正在用本发明的MASP-2抑制组合物治疗的受试者,可以通过例如每十二小时或在每天一次的基础上定期确定至少一种补体因子的水平进行监测,其中与标准值或健康受试者相比,至少一种补体因子的减少水平的确定指示了关于用组合物的继续治疗的需要。

[0539] 在预防方案和治疗方案两者中,包含MASP-2抑制剂的组合物可以以几个剂量进行施用,直到已在受试者中实现足够的治疗结果。在本发明的一个实施方案中,MASP-2抑制剂包含抗MASP-2抗体,其可以适当地以0.1mg至10,000mg,更适当地1.0mg至5,000mg,更适当地10.0mg至2,000mg,更适当地10.0mg至1,000mg,并且还更适当地50.0mg至500mg的剂量施用于成人患者(例如,70kg的平均成人重量)。对于儿科患者,可以与患者的重量成比例地调整剂量。本发明的MASP-2抑制组合物的施加可以通过组合物的单次施用或有限的施用顺序来进行,用于TTP的治疗。可替代地,组合物可以在延长的时间段内以周期性间隔,例如每天一次、每两周一次、每周一次、每隔一周、每月一次或每两个月一次进行施用,用于TTP的治疗。

[0540] 在一些实施方案中,患有TTP的受试者先前已经历或目前正在经历用终末补体抑制剂的抑制补体蛋白C5的切割。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制剂的发明的组合物,并且进一步向受试者施用抑制补体蛋白C5切割的终末补体抑制剂。在一些实施方案中,终末补体抑制剂是人源化抗C5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,终末补体抑制剂是依库珠单抗。

[0541] VI. 实施例

[0542] 下述实施例仅仅说明了目前考虑用于实践本发明的最佳模式,但不应解释为限制本发明。本文的所有文献引用都明确地通过引用并入。

[0543] 实施例1

[0544] 该实施例描述了MASP-2缺陷(MASP-2^{-/-})但MAp19充足(MAp19^{+/+})的小鼠品系的生成。

[0545] 材料和方法:靶向载体pKO-NTKV 1901设计为破坏编码鼠MASP-2的C末端的三个外显子,包括编码丝氨酸蛋白酶结构域的外显子,如图3中所示。PKO-NTKV 1901用于转染鼠ES细胞系E14.1a(SV12901a)。选择新霉素抗性和胸苷激酶敏感性克隆。筛选了600个ES克隆,并且在这些中,鉴定了四个不同的克隆,并且通过DNA印迹验证为含有预计的选择性靶

向和重组事件,如图3中所示。通过胚胎移植由这四个阳性克隆生成嵌合体。然后将嵌合体在遗传背景C57/BL6中回交,以产生转基因雄性。使转基因雄性与雌性杂交,以生成其中50%的后代显示关于破坏的MASP-2基因的杂合性的F1。使杂合小鼠杂交,以生成纯合MASP-2缺陷后代,导致分别以1:2:1比率的杂合小鼠和野生型小鼠。

[0546] 结果和表型:发现所得到的纯合MASP-2^{-/-}缺陷小鼠是有活力和有生育力的,并且通过以下验证为MASP-2缺陷的:确认正确的靶向事件的DNA印迹,确认MASP-2 mRNA的不存在的RNA印迹,以及确认MASP-2蛋白的不存在的蛋白质印迹(数据未显示)。在LightCycler机器上,使用时间分辨RT-PCR,进一步确认了MAp19mRNA的存在和MASP-2 mRNA的不存在。MASP-2^{-/-}小鼠的确如预计的继续表达MAp19、MASP-1和MASP-3mRNA和蛋白质(数据未显示)。通过LightCycler分析评价MASP-2^{-/-}小鼠中关于备解素、因子B、因子D、C4、C2和C3的mRNA的存在和丰度,并且发现与野生型同窝仔畜对照相同(数据未显示)。来自纯合MASP-2^{-/-}小鼠的血浆完全缺乏凝集素途径介导的补体激活,如实施例2中进一步描述的。

[0547] 在纯C57BL6背景上的MASP-2^{-/-}品系的生成:在MASP-2^{-/-}品系用作实验动物模型之前,将MASP-2^{-/-}小鼠与纯C57BL6系回交九代。

[0548] 还如下生成了转基因小鼠品系,其是鼠MASP-2^{-/-}、MAp19^{+/+}并且表达人MASP-2转基因(鼠MASP-2敲除和人MASP-2敲入):

[0549] 材料和方法:构建了如图4中所示的称为“微型hMASP-2”(SEQ ID NO:49)的编码人MASP-2的小基因,其包括人MASP 2基因的启动子区,包括前3个外显子(外显子1至外显子3),随后为代表下述8个外显子的编码序列的cDNA序列,从而编码由其内源启动子驱动的全长MASP-2蛋白。将微型hMASP-2构建体注射到MASP-2^{-/-}的受精卵内,以便通过转基因表达的人MASP-2替换缺陷的鼠MASP 2基因。

[0550] 实施例2

[0551] 该实施例证实了MASP-2是经由凝集素途径的补体激活所需的。

[0552] 方法和材料:

[0553] 凝集素途径特异性C4切割测定:C4切割测定已通过Petersen等人,J. Immunol.Methods 257:107(2001)进行描述,其测量起因于来自金黄色葡萄球菌的脂磷壁酸(LTA)的凝集素途径激活,所述脂磷壁酸与L-纤维胶凝蛋白结合。通过Petersen等人(2001)描述的测定适于通过以下测量经由MBL的凝集素途径激活:在如下所述添加来自MASP-2^{-/-}小鼠的血清之前,用LPS和甘露聚糖或酵母聚糖包被板。该测定还进行修改,以去除由于经典途径的C4切割的可能性。这通过使用含有1M NaCl的样品稀释缓冲液来实现,所述缓冲液允许凝集素途径识别组分与其配体的高亲和力结合,但阻止内源性C4的激活,从而通过使C1复合物解离来排除经典途径的参与。简言之,在改善的测定中,将血清样品(在高盐(1M NaCl)缓冲液中稀释)加入配体包被的板中,随后在具有生理浓度的盐的缓冲液中添加恒定量的纯化C4。含有MASP-2的结合的识别复合物切割C4,导致C4b沉积。

[0554] 测定方法:

[0555] 1) Nunc Maxisorb微量滴定板(Maxisorb, Nunc, Cat.No.442404, Fisher Scientific)用在包被缓冲液(15mM Na₂CO₃、35mM NaHCO₃, pH 9.6)中稀释的1μg/ml甘露聚糖(M7504 Sigma)或任何其它配体(例如,下文列出的那些配体)进行包被。

[0556] 下述试剂用于测定中:

- [0557] a. 甘露聚糖 (在100 μ l包被缓冲液中的1 μ g/孔的甘露聚糖 (M7504 Sigma)):
- [0558] b. 酵母聚糖 (在100 μ l包被缓冲液中的1 μ g/孔的酵母聚糖 (Sigma));
- [0559] c. LTA (在100 μ l包被缓冲液中的1 μ g/孔或在20 μ l甲醇中的2 μ g/孔)
- [0560] d. 在包被缓冲液中的1 μ g H-纤维胶凝蛋白特异性Mab 4H5
- [0561] e. 来自绿色气球菌 (*Aerococcus viridans*) 的PSA (在100 μ l包被缓冲液中的2 μ g/孔)
- [0562] f. 在包被缓冲液中的100 μ l/孔的福尔马林固定的金黄色葡萄球菌 DSM20233 ($OD_{550}=0.5$)。
- [0563] 2) 使板在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。
- [0564] 3) 在过夜温育后,通过使板与0.1% HSA-TBS封闭缓冲液 (在10mM Tris-CL、140mM NaCl、1.5mM NaN_3 , pH 7.4中的0.1% (w/v) HAS) 一起温育1-3小时,然后用TBS/tween/ Ca^{2+} (含有0.05% Tween 20和5mM $CaCl_2$ 的 TBS、1mM $MgCl_2$, pH 7.4) 将板洗涤3X,使残留的蛋白质结合位点饱和。
- [0565] 4) 待测试的血清样品在MBL结合缓冲液 (1M NaCl) 中进行稀释,并且将稀释的样品加入板中,且在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。仅接受缓冲液的孔用作阴性对照。
- [0566] 5) 在4 $^{\circ}$ C下温育过夜后,用TBS/tween/ Ca^{2+} 将板洗涤3X。然后将人C4 (100 μ l/孔的在BBS (4mM巴比妥、145mM NaCl、2mM $CaCl_2$ 、1mM $MgCl_2$, pH 7.4) 中稀释的1 μ g/ml) 加入板中,并且在37 $^{\circ}$ C下温育90分钟。用 TBS/tween/ Ca^{2+} 再次将板洗涤3X。
- [0567] 6) 用碱性磷酸酶缀合的鸡抗人C4c (在TBS/tween/ Ca^{2+} 中1:1000稀释的) 检测C4b沉积,将所述鸡抗人C4c加入板中并在室温下温育90分钟。然后用 TBS/tween/ Ca^{2+} 再次将板洗涤3X。
- [0568] 7) 碱性磷酸酶通过以下进行检测:加入100 μ l对硝基苯基磷酸酯底物溶液,在室温下温育20分钟,并且在微板阅读器中读取 OD_{405} 。
- [0569] 结果:图5A-B显示了在来自MASP-2+/+ (交叉)、MASP-2+/- (实心圆圈) 和MASP-2-/- (实心三角形) 的血清稀释物中,在甘露聚糖 (图5A) 和酵母聚糖 (图 5B) 上的C4b沉积量。图5C显示了基于测量针对野生型血清标准化的C4b沉积量,相对于野生型小鼠 (n=5), 来自MASP-2-/+小鼠 (n=5) 和MASP-2-/-小鼠 (n=4)、用酵母聚糖 (白色条) 或甘露聚糖 (阴影条) 包被的板上的相对C4转化酶活性。误差条代表标准差。如图5A-C中所示,来自MASP-2-/-小鼠的血浆在甘露聚糖和酵母聚糖包被的板上完全缺乏凝集素途径介导的补体激活。这些结果明确地证实了MASP-2是凝集素途径的效应组分。
- [0570] 重组MASP-2在来自MASP-2-/-小鼠的血清中重构凝集素途径依赖性C4 激活
- [0571] 为了确定MASP-2的缺乏是MASP-2-/-小鼠中的凝集素途径依赖性C4激活丧失的直接原因,在上述C4切割测定中检查了向血清样品中添加重组 MASP-2蛋白的效应。如下文实施例3中所述产生且纯化功能活性的鼠 MASP-2和无催化活性的鼠MASP-2A (其中丝氨酸蛋白酶结构域中的活性位点丝氨酸残基取代丙氨酸残基) 重组蛋白。使来自4只MASP-2-/-小鼠的合并血清与蛋白质浓度渐增的重组鼠MASP-2或无活性的重组鼠MASP-2A一起预温育,并且如上所述测定C4转化酶活性。
- [0572] 结果:如图6中所示,向从MASP-2-/-小鼠获得的血清中添加功能活性的鼠重组MASP-2蛋白 (显示为空心三角形),以蛋白质浓度依赖性方式恢复了凝集素途径依赖性C4激

活,而无催化活性的鼠MASP-2A蛋白(显示为星号)并未恢复C4激活。图6中显示的结果针对用合并的野生型小鼠血清(显示为虚线)观察到的C4激活进行标准化。

[0573] 实施例3

[0574] 该实施例描述了重组全长人、大鼠和鼠MASP-2、MASP-2衍生的多肽和 MASP-2的催化失活突变形式的重组表达和蛋白质生产。

[0575] 全长人、鼠和大鼠MASP-2的表达:

[0576] 还将人MASP-2的全长cDNA序列(SEQ ID NO:4)亚克隆到哺乳动物表达载体pCI-Neo (Promega)内,所述载体在CMV增强子/启动子区的控制下驱动真核表达(在Kaufman R.J.等人,Nucleic Acids Research 19:4485-90,1991; Kaufman,Methods in Enzymology,185:537-66(1991)中进行描述)。将全长小鼠cDNA(SEQ ID NO:50)和大鼠MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:53)各自亚克隆到pED表达载体内。然后使用Maniatis等人,1989中描述的标准磷酸钙转染程序,将MASP-2表达载体转染到贴壁的中国仓鼠卵巢细胞系DXB1内。用这些构建体转染的细胞生长非常缓慢,暗示了编码的蛋白酶是细胞毒性的。

[0577] 在另一种方法中,将含有由其内源启动子驱动的MASP-2的人cDNA的小基因构建体(SEQ ID NO:49)瞬时转染到中国仓鼠卵巢细胞(CHO)内。人 MASP-2蛋白分泌到培养基内并且如下所述进行分离。

[0578] 全长无催化活性MASP-2的表达:

[0579] 基本原理:在识别亚组分MBL或纤维胶凝蛋白(L-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白或M-纤维胶凝蛋白)与其分别的碳水化合物模式结合后,MASP-2 通过自催化切割得到激活。导致MASP-2激活的自催化切割经常在来自血清的MASP-2的分离程序期间,或在重组表达之后的纯化期间发生。为了获得用作抗原的更稳定的蛋白质制剂,指定为MASP-2A的MASP-2的无催化活性形式通过用丙氨酸残基替换存在于以下中的蛋白酶结构域的催化三联体中的丝氨酸残基而产生:大鼠(SEQ ID NO:55 Ser617至Ala617);小鼠(SEQ ID NO:52Ser617至Ala617);或人(SEQ ID NO:3 Ser618至Ala618)。

[0580] 为了生成无催化活性的人和鼠MASP-2A蛋白,使用表5中所示的寡核苷酸进行定点诱变。

[0581] 表5中的寡核苷酸被设计为对编码酶促活性的丝氨酸的人和鼠cDNA的区域退火,并且寡核苷酸含有错配,以便将丝氨酸密码子变成丙氨酸密码子。例如,PCR寡核苷酸SEQ ID NO:56-59与人MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:4)组合使用,以扩增从起始密码子到酶促活性的丝氨酸的区域以及从丝氨酸到终止密码子的区域,以生成含有Ser618至Ala618突变的突变MASP-2A的完整开放读码框。在琼脂糖凝胶电泳和条带制备后纯化PCR产物,并且使用标准加尾程序生成单个腺苷重叠。然后将腺苷加尾的MASP-2A克隆到pGEM-T easy载体内,转化到大肠杆菌内。

[0582] 通过将这两种寡核苷酸以等摩尔量组合,在100℃加热2分钟并缓慢冷却至室温,通过对SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65进行激酶激活(kinasing)且退火,来生成无催化活性的大鼠MASP-2A蛋白。所得到的退火片段具有Pst1 和Xba1相容的端部,并且插入代替野生型大鼠MASP-2 cDNA(SEQ ID NO:53) 的Pst1-Xba1片段,以生成大鼠MASP-2A。

[0583] 5'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3'(SEQ ID NO:64)

[0584] 5'CTAGAAACACTAATGCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3'(SEQ ID NO:65)

[0585] 将人、鼠和大鼠MASP-2A各自进一步亚克隆到哺乳动物表达载体pED 或pCI-Neo内,并且如下所述转染到中国仓鼠卵巢细胞系DXB1内。

[0586] 在另一种方法中,使用Chen等人,J.Biol.Chem.,276 (28):25894-25902,2001中所述的方法,来构建MASP-2的无催化活性形式。简言之,用Xho1和EcoR1消化含有全长人MASP-2 cDNA(在Thiel等人,Nature386:506,1997中描述)的质粒,并且将MASP-2 cDNA(本文描述为SEQ ID NO:4)克隆到pFastBac1杆状病毒转移载体(Life Technologies,NY)的相应限制性位点内。然后通过用天然区域氨基酸610至625取代编码肽区域氨基酸610-625(SEQ ID NO:13)的双链寡核苷酸,将在Ser618处的MASP-2丝氨酸蛋白酶活性位点改变为Ala618,以产生具有无活性的蛋白酶结构域的 MASP-2全长多肽。含有衍生自人Masp-2的多肽区域的表达质粒的构建。

[0587] 使用MASP-2信号肽(SEQ ID NO:5的残基1-15)产生下述构建体,以分泌 MASP-2的各种结构域。通过PCR扩增编码MASP-2(SEQ ID NO:6)的残基 1-121的区域(对应于N末端CUB1结构域),来制备表达人MASP-2CUB1结构域(SEQ ID NO:8)的构建体。通过PCR扩增编码MASP-2(SEQ ID NO:6)的残基1-166的区域(对应于N末端CUB1EGF结构域),来制备表达人MASP-2 CUB1EGF结构域(SEQ ID NO:9)的构建体。通过PCR扩增编码MASP-2(SEQ ID NO:6)的残基1-293的区域(对应于N末端CUB1EGFCUBII结构域),来制备表达人MASP-2CUB1EGFCUBII结构域(SEQ ID NO:10)的构建体。根据建立的PCR方法,通过使用Vent_R聚合酶和pBSMASP-2作为模板的PCR来扩增上文提到的结构域。有义引物的5'引物序列(5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO:34)在PCR产物的 5'端处引入BamHI限制性位点(加下划线的)。下表5中所示的关于每个 MASP-2结构域的反义引物设计为在每个PCR产物的端部处引入终止密码子(粗体),随后为EcoRI位点(加下划线的)。一旦扩增,DNA片段就用BamHI 和EcoRI进行消化,并且克隆到pFastBac1载体的相应位点内。所得到的构建体的特征在于限制性图谱,并且通过dsDNA测序加以确认。

[0588] 表5:MASP-2 PCR引物

[0589]	MASP-2 结构域	5' PCR 引物	3' PCR 引物

[0590]

MASP-2 结构域	5' PCR 引物	3' PCR 引物
SEQ ID NO:8 CUBI (SEQ ID NO:6 的 aa 1-121)	5'CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCATA (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (SEQ ID NO:6 的 aa 1-166)	5'CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGCT-3' (SEQ ID NO:36)
SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (SEQ ID NO:6 的 aa 1-293)	5'CGGGATCCATGAG GCTGCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGAT 3' (SEQ ID NO:37)
SEQ ID NO:4 人 MASP-2	5'ATGAGGCTGCTGAC CCTCCTGGGCCTTC 3' (SEQ ID NO:56) hMASP-2_正向	5'TTAAATCACTAATTATGTTC TCGATC 3' (SEQ ID NO:59) hMASP-2_反向
SEQ ID NO:4 人 MASP-2 cDNA	5'CAGAGGTGACGCA GGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO:58) hMASP-2_ala_正向	5'GTGCCCTCCTGCGTCACCTC TG 3' (SEQ ID NO:57) hMASP-2_ala_反向
SEQ ID NO:50 鼠 MASP-2 cDNA	5'ATGAGGCTACTCAT CTTCCTGG3' (SEQ ID NO:60) mMASP-2_正向	5'TTAGAAATTACTTATTATGTT CTCAATCC3' (SEQ ID NO:63) mMASP-2_反向
SEQ ID NO:50 鼠 MASP-2 cDNA	5'CCCCCCTGCGTCA CCTCTGCAG3' (SEQ ID NO:62) mMASP-2_ala_正向	5'CTGCAGAGGTGACGCAGGGG GGG 3' (SEQ ID NO:61) mMASP-2_ala_反向

[0591] MASP-2的重组真核表达以及无酶促活性的小鼠、大鼠和人MASP-2A 的蛋白质生产。

[0592] 使用标准磷酸钙转染程序 (Maniatis等人,1989),将上述MASP-2和 MASP-2A表达构建体转染到DXB1细胞内。MASP-2A在无血清培养基中生产,以确保制剂不被其它血清蛋白质污染。每隔一天收获来自汇合细胞的培养基(总共四次)。对于这三个物种中的每一个,重组MASP-2A的水平取平均值为大约1.5mg/升培养基。

[0593] MASP-2A蛋白纯化:MASP-2A(上述Ser-Ala突变体)通过MBP-A琼脂糖柱上的亲和层析进行纯化。这种策略使得无需使用外来标签的快速纯化成为可能。将MASP-2A(用等体积的上样缓冲液(含有150mM NaCl和25mM CaCl₂的50mM Tris-Cl,pH 7.5)稀释的100-200ml培养基)装载到用10ml上样缓冲液预平衡的MBP-琼脂糖亲和柱(4ml)上。在用进一步的10ml上样缓冲液洗涤之后,用含有1.25M NaCl和10mM EDTA的50mM Tris-Cl,pH 7.5,将蛋白质洗脱到1ml级分中。通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定含有 MASP-2A的级分。必要时,MASP-2A通过在MonoQ柱(HR5/5)上的离子交换层析进行进一步纯化。蛋白质用含有50mM NaCl的50mM Tris-Cl pH 7.5 进行透析,并且装载到在相同的缓冲液中平衡的柱上。在洗涤之后,结合的 MASP-2A用0.05-1M NaCl梯度在10ml中洗脱。

[0594] 结果:从200ml培养基中获得0.25-0.5mg MASP-2A蛋白的产率。由于糖基化,通过

MALDI-MS确定的77.5kDa的分子量大于未修饰多肽的计算值 (73.5kDa)。在每个N-糖基化位点处的聚糖附着解释了观察到的质量。MASP-2A在SDS-聚丙烯酰胺凝胶上作为单个条带迁移,证实了它在生物合成过程中没有进行蛋白酶解加工。通过平衡超速离心确定的重均分子量与糖基化多肽的同源二聚体的计算值一致。

[0595] 重组人MASP-2多肽的生产

[0596] 用于生产重组MASP-2和MASP2A衍生多肽的另一种方法在Thielens, N.M.等人, J.Immunol.166:5068-5077,2001中进行描述。简言之,草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 昆虫细胞 (从Novagen, Madison, WI获得的 Ready-Plaque Sf9细胞) 在Sf900II 无血清培养基 (Life Technologies) 中生长且维持,所述培养基补充有50IU/ml青霉素和50mg/ml链霉素 (Life Technologies)。粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) (High Five) 昆虫细胞 (由Jadwiga Chroboczek, Institut de Biologie Structurale, Grenoble, 法国提供) 维持在含有 10% FCS (Dominique Dutscher, Brumath, 法国) 的TC100培养基 (Life Technologies) 中,所述培养基补充有50IU/ml青霉素和50mg/ml链霉素。使用Bac-to-Bac系统 (Life Technologies) 生成重组杆状病毒。杆粒DNA使用 Qiagen midiprep纯化系统 (Qiagen) 进行纯化,并且用于在Sf900II SFM培养基 (Life Technologies) 中使用 cellfectin转染Sf9昆虫细胞,如制造商的方案中所述的。4天后收集重组病毒颗粒,通过病毒斑块测定进行滴定且扩增,如通过King和Possee在The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, Chapman and Hall Ltd., London, 第111-114页, 1992中所述的。

[0597] High Five细胞 (1.75×10^7 个细胞/175-cm²组织培养瓶) 在Sf900 II SFM培养基中用含有MASP-2多肽的重组病毒以感染复数2在28℃下感染96小时。通过离心收集上清液,并且将氟磷酸二异丙酯加入至1mM的最终浓度。

[0598] MASP-2多肽在培养基中进行分泌。培养上清液针对50mM NaCl、1mM CaCl₂、50mM三乙醇胺盐酸盐, pH 8.1进行透析,并且以1.5ml/分钟装载到在相同的缓冲液中平衡的Q-Sepharose Fast Flow柱 (Amersham Pharmacia Biotech) (2.8 x 12cm) 上。通过将1.2升线性梯度施加到相同缓冲液中的350 mM NaCl进行洗脱。通过蛋白质印迹分析鉴定含有重组MASP-2多肽的级分,通过将(NH₄)₂SO₄添加至60% (w/v) 进行沉淀,并且在4℃下放置过夜。将团块重悬浮于145mM NaCl、1mM CaCl₂、50mM三乙醇胺盐酸盐, pH 7.4中,并且施加到在相同缓冲液中平衡的TSK G3000 SWG柱 (7.5 x 600mm) (Tosohaas, Montgomeryville, PA) 上。然后通过Microsep微型浓缩器 (m.w. 截断=10,000) (Filtron, Karlstein, 德国) 上的超滤,将纯化的多肽浓缩至0.3 mg/ml。

[0599] 实施例4

[0600] 该实施例描述了产生针对MASP-2多肽的多克隆抗体的方法。

[0601] 材料和方法:

[0602] MASP-2抗原:多克隆抗人MASP-2抗血清通过用下述分离的MASP-2 多肽对兔进行免疫而产生:从血清中分离的人MASP-2 (SEQ ID NO:6);如实施例3中所述的,重组人MASP-2 (SEQ ID NO:6),含有无活性的蛋白酶结构域 (SEQ ID NO:13) 的MASP-2A;以及如上文实施例3中所述表达的重组 CUBI (SEQ ID NO:8)、CUBEGFI (SEQ ID NO:9) 和CUBEGFCUBII (SEQ ID NO:10)。

[0603] 多克隆抗体:通过注射在无菌盐水溶液中以100 μ g/ml的100 μ g MASP-2 多肽,对用BCG(卡介苗疫苗)引发的6周龄兔进行免疫。注射每4周完成,其中如实施例5中所述的通过ELISA测定监测抗体滴度。收集培养上清液用于通过蛋白A亲和层析的抗体纯化。

[0604] 实施例5

[0605] 该实施例描述了用于产生针对大鼠或人MASP-2多肽的鼠单克隆抗体的方法。

[0606] 材料和方法:

[0607] 8-12周龄的雄性A/J小鼠(Harlan,Houston, Tex.)用在200 μ l磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH 7.4中的完全弗氏佐剂(Difco Laboratories, Detroit, Mich.)中的 100 μ g人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽(如实施例3中所述制备的)进行皮下注射。以两周间隔,小鼠用在不完全弗氏佐剂中的50 μ g人或大鼠 rMASP-2或rMASP-2A多肽进行两次皮下注射。在第四周时,小鼠用在PBS 中的50 μ g人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽进行注射,并且在4天后融合。

[0608] 对于每次融合,从免疫小鼠的脾制备单细胞悬浮液,并且用于与Sp2/0 骨髓瘤细胞融合。5 $\times 10^8$ 个Sp2/0和5 $\times 10^8$ 个脾细胞在含有50%聚乙二醇(M.W. 1450)(Kodak, Rochester, N.Y.)和5%二甲亚砜(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)的培养基中融合。细胞然后在Iscove培养基(Gibco, Grand Island, N.Y.) 中调整至1.5 $\times 10^5$ 个脾细胞/200 μ l悬浮液的浓度,所述培养基补充有10%胎牛血清、100单位/ml青霉素、100 μ g/ml链霉素、0.1mM次黄嘌呤、0.4 μ M 氨基蝶呤和16 μ M胸苷。将200微升的细胞悬浮液加入约20块96孔微量培养板的每个孔中。在约十天后,抽取培养上清液用于在ELISA测定中筛选与纯化的因子MASP-2的反应性。

[0609] ELISA测定:通过加入50 μ l以50ng/ml的纯化hMASP-2或大鼠 rMASP-2(或rMASP-2A),将Immulon 2(Dynatech Laboratories, Chantilly, Va.)微量测试板的孔在室温下包被过夜。用于包被的低浓度MASP-2使得能够选择高亲和力抗体。在通过轻弹板去除包被溶液后,将200 μ lBLOTT0(脱脂奶粉)的PBS溶液加入每个孔中1小时,以封闭非特异性位点。一小时后,然后用缓冲液PBST(含有0.05%Tween 20的PBS)洗涤孔。收集来自每个融合孔的50微升培养上清液并且与50 μ l BLOTT0混合,然后加入微量测试板的各个孔中。在温育1小时后,用PBST洗涤孔。然后通过辣根过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗小鼠IgG(Fc特异性的)(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa.)的反应来检测结合的鼠抗体,并且在BLOTT0中以1:2,000 进行稀释。将含有0.1%3,3',5,5'-四甲基联苯胺(Sigma, St. Louis, Mo.)和0.0003%过氧化氢(Sigma)的过氧化物酶底物溶液加入孔中,用于显色30分钟。通过加入50 μ l 2M H₂SO₄/孔来终止反应。用BioTek ELISA Reader(BioTek Instruments, Winooski, Vt.)读取反应混合物在450nm处的光密度。

[0610] MASP-2结合测试:

[0611] 在上述MASP-2 ELISA测定中测试呈阳性的培养上清液可以在结合测定中进行测试,以确定MASP-2抑制剂对于MASP-2具有的结合亲和力。类似的测定也可以用于确定抑制剂是否与补体系统中的其它抗原结合。

[0612] 聚苯乙烯微量滴定板孔(96孔培养基结合板, Corning Costar, Cambridge, MA)用在磷酸盐缓冲盐水(PBS) pH 7.4中的MASP-2(20ng/100 μ l/孔, Advanced Research Technology, San Diego, CA)在4 $^{\circ}$ C下包被过夜。在吸出MASP-2溶液后,用含有1%牛血清白

蛋白 (BSA;Sigma Chemical) 的 PBS在室温下将孔封闭2小时。不含MASP-2包被的孔充当本底对照。将杂交瘤上清液或在封闭溶液中以各种浓度的纯化的抗MASP-2 MoAb等分试样加入孔中。在室温下的2小时温育之后,用PBS彻底冲洗孔。MASP-2结合的抗MASP-2 MoAb通过加入在封闭溶液中的过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠 IgG (Sigma Chemical) 进行检测,允许其在室温下温育1小时。板再次用PBS 彻底冲洗,并且添加100 μ l 3,3',5,5'四甲基联苯胺 (TMB) 底物 (Kirkegaard and Perry Laboratories,Gaithersburg,MD)。通过添加100 μ l 1M 磷酸来淬灭TMB 的反应,并且在微板阅读器 (SPECTRA MAX 250,Molecular Devices, Sunnyvale,CA) 中,在450nm处读取板。

[0613] 然后测试来自阳性孔的培养上清液在功能测定例如如实施例2中描述的 C4切割测定中抑制补体激活的能力。然后通过有限稀释克隆阳性孔中的细胞。在如上所述的ELISA测定中再次测试MoAb与hMASP-2的反应性。所选择的杂交瘤在转瓶中生长,并且收集耗尽的培养上清液用于通过蛋白A亲和层析的抗体纯化。

[0614] 实施例6

[0615] 该实施例描述了人源化的鼠抗MASP-2抗体和抗体片段的生成和产生。

[0616] 如实施例5中所述的,在雄性A/J小鼠中生成鼠抗MASP-2单克隆抗体。然后如下所述通过用其人对应物替换鼠恒定区,以生成嵌合IgG和抗体的Fab 片段,使鼠抗体人源化,以减少其免疫原性,所述抗体按照根据本发明可用于抑制人受试者中的MASP-2依赖性补体激活的不良作用。

[0617] 1.从鼠杂交瘤细胞中克隆抗MASP-2可变区基因。遵循制造商的方案 (Biotech, Houston,Tex.),使用RNAzol从分泌抗MASP-2 MoAb的杂交瘤细胞(如实施例7中所述获得)中分离总RNA。使用寡聚dT作为引物,从总RNA 合成第一链cDNA。使用免疫球蛋白恒定C区衍生的3'引物和衍生自前导肽或者鼠VH或VK基因的第一构架区的简并引物组作为5'引物来执行PCR。如通过Chen和Platsucas (Chen,P.F.,Scand.J.Immunol.35:539-549,1992) 所述的进行锚定PCR。为了克隆V_k基因,使用Not1-MAK1引物 (5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTIT-3'SEQ ID NO:38) 来制备双链cDNA。将退火的衔接子AD1 (5'-GGAATTCACCTCGTTATTCTCGGA-3'SEQ ID NO:39) 和AD2 (5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3'SEQ ID NO:40) 连接到双链cDNA的5'和3'末端两者。通过Not1消化去除在3'端处的衔接子。消化的产物然后用作PCR中的模板,其中AD1寡核苷酸作为5'引物,且MAK2 (5'-CATTGAAAGCTITGGGGTAGAAGTTGTTC-3'SEQ ID NO:41) 作为3'引物。将大约500bp的DNA片段克隆到pUC19内。选择几个克隆用于序列分析,以验证克隆的序列包含预计的鼠免疫球蛋白恒定区。Not1-MAK1和MAK2 寡核苷酸衍生自VK区,并且分别为C_k基因第一个碱基对下游的182和84bp。选择包括完整VK和前导肽的克隆。

[0618] 为了克隆VH基因,使用Not1 MAG1引物 (5'-CGCGGCCGCGAGCTGCTCAGAGTGTAGA-3'SEQ ID NO:42) 来制备双链 cDNA。将退火的衔接子AD1和AD2连接到双链cDNA的5'和3'末端两者。通过Not1消化去除在3'端处的衔接子。消化的产物用作PCR中的模板,其中 AD1寡核苷酸和MAG2 (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3'SEQ ID NO:43) 作为引物。将长度为500至600bp的DNA片段克隆到pUC19 内。Not1-MAG1和MAG2寡核苷酸衍生自鼠C γ .7.1区域,并且分别为鼠C γ .7.1 基因第一个bp下游的180和93bp。选择包含完整VH和前导肽的克隆。

[0619] 2.用于嵌合MASP-2 IgG和Fab的表达载体的构建。上述克隆的V_H和 V_K基因在PCR反应中用作模板,以将Kozak共有序列加入核苷酸序列的5'端,并且将剪接供体加入核苷酸序

列的3'端。在分析序列以确认不存在PCR 错误后,将V_H和V_K基因分别插入含有人C. γ 1和C. κ 的表达载体盒内,以给出pSV2neoVH-huC γ 1和pSV2neoV-huC γ 。重链和轻链载体的CsCl1梯度纯化的质粒DNA用于通过电穿孔转染COS细胞。在48小时后,通过ELISA 测试培养上清液,以确认大约200ng/ml的嵌合IgG的存在。收获细胞并制备总RNA。使用寡聚dT作为引物,从总RNA合成第一链cDNA。该cDNA在 PCR中用作模板,以生成Fd和 κ DNA片段。对于Fd基因,使用5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAC-3' (SEQ ID NO:44) 作为5'引物和CH1衍生的3'引物 (5'-CGGGATCCTCAAACCTTCTTGTCACCTTGG-3' SEQ ID NO:45) 来进行 PCR。DNA序列被确认为含有人IgG1的完整VH和CH1结构域。在用适当的酶消化后,将Fd DNA片段插入表达载体盒pSV2dhfr-TUS的HindIII和 BamHI限制性位点处,以给出pSV2dhfrFd。pSV2质粒是商购可得的,并且由来自各种来源的DNA区段组成:pBR322 DNA (细线) 含有pBR322的DNA 复制起点 (pBR ori) 和内酰胺酶氨苄青霉素抗性基因 (Amp); 由更宽的阴影线表示并标记的SV40 DNA含有SV40的DNA复制起点 (SV40ori)、早期启动子 (5'到dhfr和neo基因) 和多聚腺苷酸化信号 (3'到dhfr和neo基因)。SV40衍生的多聚腺苷酸化信号 (pA) 也置于Fd基因的3'端处。

[0620] 对于 κ 基因,使用 5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3' (SEQ ID NO:46) 作为5'引物和C_K衍生的3'引物 (5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO:47) 来进行PCR。DNA序列确认为含有完整的V_K和人C_K区域。在用适当的限制性酶消化后,将 κ DNA片段插入表达载体盒pSV2neo-TUS的HindIII和BamHI限制性位点处,以给出pSV2neoK。Fd和 κ 基因两者的表达均由HCMV衍生的增强子和启动子元件驱动。由于Fd基因并不包括涉及链间二硫键的半胱氨酸氨基酸残基,因此该重组嵌合Fab含有非共价连接的重链和轻链。该嵌合Fab被指定为cFab。

[0621] 为了获得具有重链和轻链间二硫键的重组Fab,上述Fd基因可以进行延伸,以包括来自人IgG1的铰链区的另外9个氨基酸的编码序列 (EPKSCDKTH SEQ ID NO:48)。在Fd基因的3'端处编码30个氨基酸的BstEII-BamHI DNA 区段可以由编码延伸的Fd的DNA区段替换,导致pSV2dhfrFd/9aa。

[0622] 3. 嵌合抗MASP-2 IgG的表达和纯化

[0623] 为了生成分泌嵌合抗MASP-2 IgG的细胞系,NS0细胞通过电穿孔用 pSV2neoV_H-huC. γ 1和pSV2neoV-huC κ 的纯化质粒DNA进行转染。在0.7 mg/ml G418的存在下选择转染的细胞。细胞使用含血清培养基在250ml转瓶中进行生长。

[0624] 将100ml旋转培养的培养上清液装载到10-ml PROSEP-A柱 (Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.) 上。用10床体积的PBS洗涤柱。结合的抗体用50mM柠檬酸盐缓冲液, pH 3.0进行洗脱。将等体积的1M Hepes, pH 8.0加入含有纯化抗体的级分中,以将pH调整至7.0。通过Millipore膜超滤 (M.W. 截断:3,000),通过与PBS的缓冲液交换而去除残留的盐。纯化抗体的蛋白质浓度通过BCA方法 (Pierce) 进行确定。

[0625] 4. 嵌合抗MASP-2 Fab的表达和纯化

[0626] 为了生成分泌嵌合抗MASP-2 Fab的细胞系,CHO细胞通过电穿孔用 pSV2dhfrFd (或pSV2dhfrFd/9aa) 和pSV2neo κ 的纯化质粒DNA进行转染。在 G418和氨甲蝶呤的存在下选择转染的细胞。所选择的细胞系在渐增浓度的氨甲蝶呤中进行扩增。细胞通过有限稀释进行单细胞亚克隆。高生产性单细胞亚克隆细胞系然后使用无血清培养基在100ml旋转培养

中进行生长。

[0627] 嵌合抗MASP-2 Fab通过亲和层析使用针对MASP-2 MoAb的小鼠抗独特型MoAb进行纯化。抗独特型MASP-2 MoAb可以通过以下进行制备：用与钥孔血蓝蛋白 (KLH) 缀合的鼠抗MASP-2 MoAb对小鼠进行免疫，并且筛选可以与人MASP-2竞争的特异性MoAb结合。为了纯化，来自产生cFab或 cFab/9aa的CHO细胞的旋转培养物的100ml上清液装载到与抗独特型MASP-2 MoAb偶联的亲和柱上。然后用PBS彻底洗涤柱，之后用50mM二乙胺，pH 11.5洗脱结合的Fab。如上所述通过缓冲液交换而去除残留的盐。纯化Fab的蛋白质浓度通过BCA方法 (Pierce) 进行确定。

[0628] 嵌合MASP-2 IgG、cFab和cFab/9aa抑制MASP-2依赖性补体途径的能力可以通过使用实施例2或实施例7中描述的抑制测定来确定。

[0629] 实施例7

[0630] 该实施例描述了用作功能性筛选的体外C4切割测定，以鉴定能够阻断经由L-纤维胶凝蛋白/P35、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白或甘露聚糖的 MASP-2依赖性补体激活的MASP-2抑制剂。

[0631] C4切割测定：C4切割测定已通过Petersen, S.V.等人, J. Immunol. Methods 257: 107, 2001进行描述，其测量起因于来自金黄色葡萄球菌的脂磷壁酸 (LTA) 的凝集素途径激活，所述脂磷壁酸与L-纤维胶凝蛋白结合。

[0632] 试剂：福尔马林固定的金黄色葡萄球菌 (DSM20233) 如下进行制备：细菌在胰蛋白酶大豆血培养基中在37℃下生长过夜，用PBS洗涤3次，然后在室温下在PBS/0.5%福尔马林中固定1小时，并且用PBS再洗涤3次，之后重悬浮于包被缓冲液 (15mM Na₂CO₃、35mM NaHCO₃，pH 9.6) 中。

[0633] 测定：Nunc MaxiSorb微量滴定板 (Nalgene Nunc International, Rochester, NY) 的孔用以下进行包被：100μl在包被缓冲液中的福尔马林固定的金黄色葡萄球菌DSM20233 (OD550=0.5)，其中在包被缓冲液中具有1μg L-纤维胶凝蛋白。在过夜温育后，用0.1%人血清白蛋白 (HSA) 的TBS (10mM Tris-HCl、140mM NaCl, pH 7.4) 溶液封闭孔，然后用含有0.05% Tween 20和 5mM CaCl₂的TBS (洗涤缓冲液) 进行洗涤。人血清样品在20mM Tris-HCl、1M NaCl、10mM CaCl₂、0.05% Triton X-100、0.1% HSA, pH 7.4中进行稀释，其阻止内源性C4激活并且使C1复合物 (由C1q、C1r和C1s组成) 解离。MASP-2抑制剂，包括抗MASP-2 MoAb和抑制肽，以各种浓度加入血清样品中。将稀释的样品加入板中，并在4℃下温育过夜。在24小时后，用洗涤缓冲液彻底洗涤板，然后将100μl 4mM巴比妥、145mM NaCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂, pH 7.4中的0.1μg纯化的人C4 (如Dodds, A.W., Methods Enzymol. 223: 46, 1993中所述获得) 加入每个孔中。在37℃下1.5小时后，再次洗涤板，并且使用碱性磷酸酶缀合的鸡抗人C4c (从Immunsystem, Uppsala, 瑞典获得) 检测C4b沉积，并且使用比色底物对硝基苯基磷酸酯进行测量。

[0634] 在甘露聚糖上的C4测定：上述测定适于在加入与各种MASP-2抑制剂混合的血清之前，通过用LSP和甘露聚糖包被板，测量经由MBL的凝集素途径激活。

[0635] 在H-纤维胶凝蛋白 (Hakata Ag) 上的C4测定：上述测定适于在加入与各种MASP-2抑制剂混合的血清之前，通过用LSP和H-纤维胶凝蛋白包被板，测量经由H-纤维胶凝蛋白的凝集素途径激活。

[0636] 实施例8

[0637] 下述测定证实了在野生型和MASP-2^{-/-}小鼠中存在经典途径激活。

[0638] 方法:免疫复合物通过以下原位生成:用在10mM Tris、140mM NaCl, pH 7.4中的0.1%人血清白蛋白将微量滴定板(Maxisorb, Nunc, 目录号442404, Fisher Scientific)在室温下包被1小时,随后为在4℃下与在TBS/tween/Ca²⁺中1:1000稀释的绵羊抗全血清抗血清(Scottish Antibody Production Unit, Carluke, 苏格兰)的过夜温育。血清样品从野生型和MASP-2^{-/-}小鼠中获得并且加入包被的板中。制备其中从野生型和MASP-2^{-/-}血清样品中耗尽C1q的对照样品。根据供应商的说明书,使用由兔抗人C1q IgG(Dako, Glostrup, 丹麦)包被的蛋白A偶联的Dynabeads(Dynal Biotech, Oslo, 挪威)制备C1q耗尽的小鼠血清。使板在37℃下温育90分钟。用在TBS/tw/Ca⁺⁺中以1:1000稀释的多克隆抗人C3c抗体(Dako A 062)检测结合的C3b。二抗是山羊抗兔 IgG。

[0639] 结果:图7显示了在野生型血清、MASP-2^{-/-}血清、C1q耗尽的野生型和 C1q耗尽的MASP-2^{-/-}血清中,用IgG包被的板上的相对C3b沉积水平。这些结果证实了经典途径在MASP-2^{-/-}小鼠品系中是完整的。

[0640] 实施例9

[0641] 下述测定通过分析MASP-2抑制剂在其中经典途径由免疫复合物启动的条件下的效应,用于测试MASP-2抑制剂是否阻断经典途径。

[0642] 方法:为了测试MASP-2抑制剂对其中经典途径由免疫复合物启动的补体激活条件的作用,使含有90%NHS的一式三份的50μl样品在10μg/ml免疫复合物(IC)或PBS的存在下在37℃下温育。并且在37℃温育期间还包括平行的一式三份样品(+/-IC),其含有200nM抗备解素单克隆抗体。在37℃下的两小时温育后,将13mM EDTA加入所有样品中,以停止进一步的补体激活,并且将样品立即冷却至5℃。然后将样品贮存于70℃下,然后遵循制造商的说明书,使用ELISA试剂盒(Quidel, 目录号A015和A009),来测定补体激活产物(C3a和sC5b-9)。

[0643] 实施例10

[0644] 该实施例描述了阻断MASP-2活性的高亲和力抗MASP-2 Fab2抗体片段的鉴定。

[0645] 背景和基本原理:MASP-2是具有许多分开的功能结构域的复杂蛋白质,所述功能结构域包括:关于MBL和纤维胶凝蛋白的结合位点、丝氨酸蛋白酶催化位点、关于蛋白酶解底物C2的结合位点、关于蛋白酶解底物C4的结合位点、用于MASP-2酶原的自激活的MASP-2切割位点和两个Ca⁺⁺结合位点。鉴定了以高亲和力与MASP-2结合的Fab2抗体片段,并且在功能测定中测试所鉴定的Fab2片段,以确定它们是否能够阻断MASP-2功能活性。

[0646] 为了阻断MASP-2功能活性,抗体或Fab2抗体片段必须结合并干扰 MASP-2上对于MASP-2功能活性所需的结构表位。因此,许多或所有高亲和力结合抗MASP-2 Fab2可能并不抑制MASP-2功能活性,除非它们结合 MASP-2上直接涉及MASP-2功能活性的结构表位。

[0647] 测量凝集素途径C3转化酶形成的抑制的功能测定用于评估抗MASP-2 Fab2的“阻断活性”。已知MASP-2在凝集素途径中的主要生理作用是生成凝集素介导的补体途径的下一个功能组分,即凝集素途径C3转化酶。凝集素途径C3转化酶是关键酶促复合物(C4bC2a),其将C3蛋白酶解切割成C3a和 C3b。MASP-2不是凝集素途径C3转化酶(C4bC2a)的结构组分;然而,需要MASP-2功能活性,以便生成构成凝集素途径C3转化酶的两蛋白质组

分 (C4b、C2a)。此外,似乎需要上文列出的MASP-2的所有分开的功能活性,以便使MASP-2生成凝集素途径C3转化酶。由于这些原因,用于评估抗 MASP-2 Fab2的“阻断活性”的优选测定被视为测量凝集素途径C3转化酶形成的抑制的功能测定。

[0648] 高亲和力Fab2的生成:人可变轻链和重链抗体序列的噬菌体展示文库、以及用于鉴定与所选目的配体反应的Fab2的自动化抗体选择技术,用于产生针对大鼠MASP-2蛋白 (SEQ ID NO:55) 的高亲和力Fab2。利用已知量的大鼠 MASP-2 (~1mg, >85%纯的) 蛋白质用于抗体筛选。三轮扩增用于选择具有最佳亲和力的抗体。挑选了大约250个表达抗体片段的不同命中用于ELISA筛选。随后对高亲和力命中进行测序,以确定不同抗体的独特性。

[0649] 纯化了50种独特的抗MASP-2抗体,并且250μg每种纯化的Fab2抗体用于MASP-2结合亲和力的表征和补体途径功能测试,如下文更详细地描述的。

[0650] 用于评估抗MASP-2 Fab2的抑制(阻断)活性的测定

[0651] 1. 测量凝集素途径C3转化酶形成的抑制的测定:

[0652] 背景:凝集素途径C3转化酶是一种酶促复合物(C4bC2a),其将C3蛋白酶解切割成两种有力的促炎片段:过敏毒素C3a和调理素C3b。就介导炎症而言,C3转化酶的形成似乎是凝集素途径中的关键步骤。MASP-2不是凝集素途径C3转化酶(C4bC2a)的结构组分;因此抗MASP-2抗体(或Fab2)并不直接抑制预先存在的C3转化酶的活性。然而,需要MASP-2丝氨酸蛋白酶活性,以便生成构成凝集素途径C3转化酶的两蛋白质组分(C4b、C2a)。因此,抑制MASP-2功能活性的抗MASP-2 Fab2(即,阻断性抗MASP-2 Fab2)将抑制凝集素途径C3转化酶的从头形成。C3含有罕见且高度反应性的硫酯基团作为其结构的部分。在该测定中通过C3转化酶切割C3后,C3b上的硫酯基团可以经由酯或酰胺键合与固定在塑料孔的底部上的大分子上的羟基或氨基形成共价键,因此促进在ELISA测定中的C3b检测。

[0653] 酵母甘露聚糖是已知的凝集素途径激活物。在测量C3转化酶形成的下述方法中,用甘露聚糖包被的塑料孔在37℃下与稀释的大鼠血清一起温育30分钟,以激活凝集素途径。然后洗涤孔,并且使用标准ELISA方法测定固定到孔上的C3b。在该测定中生成的C3b的量是凝集素途径C3转化酶的从头形成的直接反映。以所选浓度的抗MASP-2 Fab2在该测定中测试了其抑制C3转化酶形成和后续C3b生成的能力。

[0654] 方法:

[0655] 96孔Costar Medium Binding板与以1μg/50T1/孔的甘露聚糖一起在5℃下温育过夜,所述甘露聚糖在50mM碳酸盐缓冲液,pH 9.5中进行稀释。在过夜温育后,每个孔用200T1 PBS洗涤3次。孔然后用100T1/孔的1%牛血清白蛋白的PBS溶液进行封闭,并且在室温下伴随轻轻混合温育1小时。每个孔然后用200T1 PBS洗涤3次。抗MASP-2 Fab2样品在含有Ca⁺⁺和Mg⁺⁺的GVB缓冲液(4.0mM巴比妥、141mM NaCl、1.0mM MgCl₂、2.0mM CaCl₂、0.1%明胶,pH 7.4)中在5℃下稀释至所选浓度。0.5%大鼠血清在5℃下加入上述样品中,并且将100T1转移到每个孔中。将板覆盖并且在37℃水浴中温育30分钟,以允许补体激活。通过将板从37℃水浴转移到含有冰水混合物的容器来停止反应。每个孔用200T1 PBS-Tween 20 (0.05% Tween 20的PBS溶液)洗涤5次,然后用200T1 PBS洗涤两次。将100T1/孔的一抗(兔抗人C3c, DAKO A0062)的1:10,000稀释物加入含有2.0mg/ml牛血清白蛋白的PBS中,并且在室温下伴随轻轻混合温育1小时。每个孔用5 x 200T1 PBS进行洗涤。将100T1/孔的二抗(过氧化物酶缀合的山羊抗兔IgG,American Qualex A102PU)的1:10,000稀释物加入含有

2.0mg/ml牛血清白蛋白的PBS中,并且在室温下在振荡器上伴随轻轻混合温育1小时。每个孔用200Tl PBS洗涤5次。加入100Tl/孔的过氧化物酶底物TMB (Kirkegaard&Perry Laboratories),并且在室温下温育10分钟。通过添加100Tl/孔的1.0M H_3PO_4 来停止过氧化物酶反应,并且测量 OD_{450} 。

[0656] 2. 测量MASP-2依赖性C4切割的抑制的测定

[0657] 背景:MASP-2的丝氨酸蛋白酶活性是高度特异性的,并且仅鉴定了关于MASP-2的两种蛋白质底物;C2和C4。C4的切割生成C4a和C4b。抗MASP-2 Fab2可以结合MASP-2上直接涉及C4切割的结构表位(例如,关于C4的MASP-2结合位点;MASP-2丝氨酸蛋白酶催化位点),并且从而抑制MASP-2的C4切割功能活性。

[0658] 酵母甘露聚糖是已知的凝集素途径激活物。在测量MASP-2的C4切割活性的下述方法中,用甘露聚糖包被的塑料孔在37℃下与稀释的大鼠血清一起温育30分钟,以激活凝集素途径。由于该ELISA测定中使用的一抗仅识别人C4,因此稀释的大鼠血清还补充有人C4(1.0Tg/ml)。然后洗涤孔,并且使用标准ELISA方法测定固定到孔上的人C4b。在该测定中生成的C4b的量是MASP-2依赖性C4切割活性的量度。以所选浓度的抗MASP-2 Fab2在该测定中测试了其抑制C4切割的能力。

[0659] 方法:96孔Costar Medium Binding板与以1.0Tg/50Tl/孔的甘露聚糖一起在5℃下温育过夜,所述甘露聚糖在50mM碳酸盐缓冲液,pH 9.5中进行稀释。每个孔用200Tl PBS洗涤3X。孔然后用100Tl/孔的1%牛血清白蛋白的PBS溶液进行封闭,并且在室温下伴随轻轻混合温育1小时。每个孔用200 Tl PBS洗涤3X。抗MASP-2 Fab2样品在含有 Ca^{++} 和 Mg^{++} 的GVB缓冲液(4.0 mM巴比妥、141mM NaCl、1.0mM $MgCl_2$ 、2.0mM $CaCl_2$ 、0.1%明胶、pH 7.4)中在5℃下稀释至所选浓度。在这些样品中还包括了1.0Tg/ml人C4(Quidel)。0.5%大鼠血清在5℃下加入上述样品中,并且将100Tl转移到每个孔中。将板覆盖并且在37℃水浴中温育30分钟,以允许补体激活。通过将板从37℃水浴转移到含有冰水混合物的容器来停止反应。每个孔用5 x 200Tl PBS-Tween 20 (0.05% Tween 20的PBS溶液)进行洗涤,然后每个孔用200Tl PBS洗涤2X。将100Tl/孔的生物素缀合的鸡抗人C4c (Immunosystem AB, Uppsala, 瑞典)的1:700稀释物加入含有2.0mg/ml牛血清白蛋白(BSA)的PBS中,并且在室温下伴随轻轻混合温育1小时。每个孔用5 x 200Tl PBS进行洗涤。将100Tl/孔的0.1Tg/ml的过氧化物酶缀合的链霉抗生物素蛋白(Pierce Chemical#21126)加入含有2.0mg/ml BSA的PBS中,并且在室温下在振荡器上伴随轻轻混合温育1小时。每个孔用5 x 200Tl PBS进行洗涤。加入100Tl/孔的过氧化物酶底物TMB (Kirkegaard&Perry Laboratories),并且在室温下温育16分钟。通过添加100Tl/孔的1.0M H_3PO_4 来停止过氧化物酶反应,并且测量 OD_{450} 。

[0660] 3. 抗大鼠MASP-2 Fab2与‘天然’大鼠MASP-2的结合测定

[0661] 背景:MASP-2通常作为MASP-2二聚体复合物存在于血浆中,所述MASP-2二聚体复合物还包括特异性凝集素分子(甘露糖结合蛋白(MBL)和纤维胶凝蛋白)。因此,如果对研究抗MASP-2 Fab2与生理相关形式的MASP-2的结合感兴趣,重要的是开发这样的结合测定,其中使用血浆中的Fab2和‘天然’MASP-2之间的相互作用,而不是纯化的重组MASP-2。在该结合测定中,首先将来自10%大鼠血清的‘天然’MASP-2 MBL复合物固定到甘露聚糖包被的孔上。然后使用标准ELISA方法,研究各种抗MASP-2 Fab2对固定的‘天然’MASP-2的结合亲和力。

[0662] 方法:96孔Costar High Binding板与以1Tg/50Tl/孔的甘露聚糖一起在 5℃下温育过夜,所述甘露聚糖在50mM碳酸盐缓冲液,pH 9.5中进行稀释。每个孔用200Tl PBS洗涤3X。孔用100Tl/孔的0.5%脱脂奶粉的PBST(具有 0.05%Tween 20的PBS)溶液进行封闭,并且在室温下伴随轻轻混合温育1小时。每个孔用200Tl的TBS/Tween/Ca⁺⁺洗涤缓冲液(Tris缓冲盐水,0.05% Tween 20,含有5.0mM CaCl₂,pH 7.4)洗涤3X。在冰上制备在高盐结合缓冲液(20mM Tris、1.0M NaCl、10mM CaCl₂、0.05%Triton-X100、0.1% (w/v) 牛血清白蛋白,pH 7.4)中的10%大鼠血清。加入100Tl/孔并在5℃下温育过夜。孔用200Tl的TBS/Tween/Ca⁺⁺洗涤缓冲液洗涤3X。孔然后用200Tl PBS 洗涤2X。加入100Tl/孔的在含有Ca⁺⁺和Mg⁺⁺的GVB缓冲液(4.0mM巴比妥、141mM NaCl、1.0mM MgCl₂、2.0mM CaCl₂、0.1%明胶,pH 7.4)中稀释的所选浓度的抗MASP-2 Fab2,并且在室温下伴随轻轻混合温育1小时。每个孔用5x 200Tl PBS进行洗涤。加入100Tl/孔的在2.0mg/ml牛血清白蛋白的PBS 溶液中1:5000稀释的HRP缀合的山羊抗Fab2(Biogenesis目录号0500-0099),并且在室温下伴随轻轻混合温育1小时。每个孔用5 x 200Tl PBS进行洗涤。加入100Tl/孔的过氧化物酶底物TMB(Kirkegaard&Perry Laboratories),并且在室温下温育70分钟。通过添加100Tl/孔的1.0M H₃PO₄来停止过氧化物酶反应,并且测量OD₄₅₀。

[0663] 结果:

[0664] 挑选了以高亲和力与大鼠MASP-2蛋白反应的大约250种不同的Fab2用于ELISA筛选。对这些高亲和力Fab2进行测序,以确定不同抗体的独特性,并且纯化了50种独特的抗MASP-2抗体用于进一步分析。250ug每种纯化的 Fab2抗体用于MASP-2结合亲和力的表征和补体途径功能测试。该分析的结果显示于下表6中。

[0665] 表6:阻断凝集素途径补体激活的抗MASP-2 Fab2

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

[0667] 如上表6中所示,在测试的50种抗MASP-2 Fab2中,17种Fab2被鉴定为有力地抑制

C3转化酶形成的MASP-2阻断性Fab2,其 IC_{50} 等于或小于10 nM Fab2 (34%的阳性命中率)。所鉴定的17种Fab2中的8种具有在亚纳摩尔范围内的 IC_{50} 。此外,表6中显示的所有17种MASP-2阻断性Fab2在凝集素途径C3转化酶测定中给出了C3转化酶形成的基本上完全抑制。图8A以图形方式说明了,关于Fab2抗体#11的C3转化酶形成测定的结果,所述Fab2 抗体#11是测试的其它Fab2抗体的代表,其结果显示于表6中。这是重要的考虑因素,因为理论上可能的是,即使当每个MASP-2分子都被Fab2结合时,“阻断性”Fab2也可能仅部分抑制MASP-2功能。

[0668] 尽管甘露聚糖是已知的凝集素途径激活物,但理论上可能的是,大鼠血清中存在的抗甘露聚糖抗体也可能激活经典途径,并且经由经典途径C3转化酶生成C3b。然而,该实施例中列出的17种阻断性抗MASP-2 Fab2中的每一种都有力地抑制C3b生成(>95%),因此证实了该测定对于凝集素途径C3转化酶的特异性。

[0669] 还对于所有17种阻断性Fab2执行结合测定,以便计算关于每种的表观 K_d 。关于六种阻断性Fab2,抗大鼠MASP-2 Fab2与天然大鼠MASP-2的结合测定结果也显示于表6中。图8B以图形方式说明了,用Fab2抗体#11的结合测定的结果。还对于其它Fab2进行了类似的结合测定,其结果显示于表6 中。一般而言,关于六种Fab2中的每一种与‘天然’MASP-2的结合获得的表观 K_d 相当良好地对应于C3转化酶功能测定中关于Fab2的 IC_{50} 。存在MASP-2在其蛋白酶活性激活后经历了从‘无活性’到‘活性’形式的构象变化的证据(Feinberg等人,EMBO J 22:2348-59 (2003);Gal等人,J.Biol.Chem. 280:33435-44 (2005))。在用于C3转化酶形成测定的正常大鼠血浆中,MASP-2 主要以‘无活性’酶原构象存在。相比之下,在结合测定中,MASP-2作为具有与固定化甘露聚糖结合的MBL的复合物的部分存在;因此,MASP-2将处于‘活性’构象(Petersen等人,J.Immunol Methods257:107-16,2001)。因而,对于这两种功能测定中测试的17种阻断性Fab2中的每一种,不一定预计在 IC_{50} 和 K_d 之间的精确对应关系,因为在每种测定中,Fab2将结合MASP-2的不同构象形式。然而,除了Fab2#88之外,对于两种测定中测试的其它16种 Fab2中的每一种,似乎存在 IC_{50} 和表观 K_d 之间相当密切的对应关系(参见表 6)。

[0670] 评估了几种阻断性Fab2对于MASP-2介导的C4切割的抑制。图8C以图形方式说明了C4切割测定的结果,其显示了用Fab2#41以 $IC_{50}=0.81nM$ 的抑制(参见表6)。如图9中所示,发现测试的所有Fab2都抑制C4切割,其 IC_{50} 类似于C3转化酶测定中获得的 IC_{50} (参见表6)。

[0671] 尽管甘露聚糖是已知的凝集素途径激活物,但理论上可能的是,大鼠血清中存在的抗甘露聚糖抗体也可能激活经典途径,并且从而通过C1s介导的 C4切割而生成C4b。然而,已鉴定了有力地抑制C4b生成(>95%)的几种抗MASP-2 Fab2,因此证实了该测定对于MASP-2介导的C4切割的特异性。如同C3,C4含有罕见且高度反应性的硫酯基团作为其结构的部分。在该测定中通过MASP-2切割C4后,C4b上的硫酯基团可以经由酯或酰胺键合与固定在塑料孔的底部上的大分子上的羟基或氨基形成共价键,因此促进在ELISA测定中的C4b检测。

[0672] 这些研究明确地证实了针对大鼠MASP-2蛋白的高亲和力FAB2的产生,所述FAB2在功能上阻断C4和C3转化酶活性两者,从而阻止凝集素途径激活。

[0673] 实施例11

[0674] 该实施例描述了关于几种阻断性抗大鼠MASP-2 Fab2抗体的表位作图,所述抗体如实施例10中所述生成。

[0675] 方法:

[0676] 如图10中所示,使用pED4载体在CHO细胞中表达全部具有N末端6X His标签的下述蛋白质:

[0677] 大鼠MASP-2A,全长MASP-2蛋白,通过将在活性中心处的丝氨酸变为丙氨酸(S613A)而失活;

[0678] 大鼠MASP-2K,全长MASP-2蛋白,经过改变以减少自激活(R424K);

[0679] CUBI-II,大鼠MASP-2的N末端片段,其仅含有CUBI、EGF样和CUBII 结构域;和

[0680] CUBI/EGF样,大鼠MASP-2的N末端片段,其仅含有CUBI和EGF样结构域。

[0681] 如先前所述(Chen等人,J.Biol.Chem.276:25894-02(2001)),通过镍亲和层析从培养上清液中纯化这些蛋白质。

[0682] 含有CCPII和大鼠MASP-2的丝氨酸蛋白酶结构域的C末端多肽(CCPII-SP)使用pTrxFus(Invitrogen)在大肠杆菌中作为硫氧还蛋白融合蛋白进行表达。使用Thiobond亲和树脂,从细胞裂解物中纯化蛋白质。硫氧还蛋白融合配偶体作为阴性对照由空的pTrxFus进行表达。

[0683] 将所有重组蛋白透析到TBS缓冲液内,并且通过测量在280nm处的OD 确定其浓度。

[0684] 斑点印迹分析:

[0685] 将上文中所述和图10中所示的五种重组MASP-2多肽(以及作为CCPII 丝氨酸蛋白酶多肽的阴性对照的硫氧还蛋白多肽)的系列稀释物点样到硝酸纤维素膜上。所点样蛋白质的量在5倍步骤中范围为100ng至6.4pg。在以后的实验中,所点样蛋白质的量再次在5倍步骤中范围为50ng降至16pg。膜用5%脱脂奶粉的TBS(封闭缓冲液)溶液进行封闭,然后与封闭缓冲液(含有 5.0mM Ca^{2+})中的1.0μg/ml抗MASP-2 Fab2一起温育。使用HRP缀合的抗人Fab(AbD/Serotec;1/10,000稀释)和ECL检测试剂盒(Amersham)检测结合的 Fab2。使一个膜与作为阳性对照的多克隆兔抗人MASP-2 Ab(在Stover等人,J Immunol 163:6848-59(1999)中进行描述)一起温育。在这种情况下,使用HRP 缀合的山羊抗兔IgG(Dako;1/2,000稀释)检测结合的Ab。

[0686] MASP-2结合测定

[0687] ELISA板在4℃下用1.0μg/孔的在碳酸盐缓冲液(pH 9.0)中的重组 MASP-2A或CUBI-II多肽包被过夜。孔用1%BSA的TBS溶液进行封闭,然后将抗MASP-2 Fab2的连续稀释物加入含有5.0mM Ca^{2+} 的TBS中。使板在 RT下温育1小时。在用TBS/tween/ Ca^{2+} 洗涤3次后,加入在TBS/ Ca^{2+} 中 1/10,000稀释的HRP缀合的抗人Fab(AbD/Serotec),并且使板在RT下再温育 1小时。使用TMB过氧化物酶底物试剂盒(Biorad)检测结合的抗体。

[0688] 结果:

[0689] 在下表7中提供了证实Fab2与各种MASP-2多肽的反应性的斑点印迹分析的结果。表7中提供的数值指示了给出大约一半最大信号强度所需的所点样蛋白质的量。如图所示,所有多肽(除了单独的硫氧还蛋白融合配偶体之外) 都被阳性对照Ab(在兔中产生的多克隆抗人MASP-2血清)识别。

[0690] 表7:在斑点印迹上与各种重组大鼠MASP-2多肽的反应性

[0691]

Fab2抗体#	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-样	CCPII-SP	硫氧还蛋白
40	0.16ng	NR	NR	0.8ng	NR

41	0.16ng	NR	NR	0.8ng	NR
11	0.16ng	NR	NR	0.8ng	NR
49	0.16ng	NR	NR	>20ng	NR
52	0.16ng	NR	NR	0.8ng	NR
57	0.032ng	NR	NR	NR	NR
58	0.4ng	NR	NR	2.0ng	NR
60	0.4ng	0.4ng	NR	NR	NR
63	0.4ng	NR	NR	2.0ng	NR
66	0.4ng	NR	NR	2.0ng	NR
67	0.4ng	NR	NR	2.0ng	NR
71	0.4ng	NR	NR	2.0ng	NR
81	0.4ng	NR	NR	2.0ng	NR
86	0.4ng	NR	NR	10ng	NR
87	0.4ng	NR	NR	2.0ng	NR
阳性对照	<0.032ng	0.16ng	0.16ng	<0.032ng	NR

[0692] 在第二周和第三周内观察到途径活性,到抗MASP-2 MoAb施用后17天,具有小鼠中的完全凝集素途径恢复。NR=无反应。阳性对照抗体是在兔中产生的多克隆抗人MASP-2血清。

[0693] 所有Fab2都与MASP-2A以及MASP-2K反应(数据未显示)。大多数Fab2 识别CCPII-SP多肽,但不识别N末端片段。两个例外是Fab2#60和Fab2#57。Fab2#60识别MASP-2A和CUBI-II片段,但不识别CUBI/EGF样多肽或 CCPII-SP多肽,提示了它与CUBII中或跨越CUBII和EGF样结构域的表位结合。Fab2#57识别MASP-2A,但不识别测试的任何MASP-2片段,指示了该Fab2识别CCP1中的表位。Fab2#40和#49仅与完整MASP-2A结合。在图11中所示的ELISA结合测定中,Fab2#60也与CUBI-II多肽结合,尽管具有略微更低的表观亲和力。

[0694] 这些发现证实了针对MASP-2蛋白的多个区域的独特阻断性Fab2的鉴定

[0695] 实施例12

[0696] 该实施例描述了MASP-2^{-/-}小鼠在鼠肾缺血/再灌注模型中的分析。

[0697] 背景/基本原理:在体温下在肾中的缺血再灌注(I/R)损伤具有在许多临床状况下的相关性,所述临床状况包括低血容量性休克、肾动脉阻塞和交叉钳夹程序。

[0698] 肾缺血再灌注(I/R)是急性肾衰竭的重要原因,与高达50%的死亡率相关(Levy等人,JAMA 275:1489-94,1996;Thadhani等人,N.Engl.J.Med. 334:1448-60,1996)。移植后肾衰竭是肾移植后常见且危险的并发症(Nicholson等人,Kidney Int.58:2585-91,2000)。用于肾I/R损伤的有效治疗目前是不可用的,并且血液透析是唯一可用的治疗。肾I/R损伤的病理生理学是复杂的。最近的研究已显示了,补体激活的凝集素途径可能在肾I/R损伤的发病机制中具有重要作用(deVries等人,Am.J.Path.165:1677-88,2004)。

[0699] 方法:

[0700] MASP-2^(-/-)小鼠如实施例1中所述生成,并且与C57Bl/6回交至少10代。向称重为22-25g的六只雄性MASP-2^(-/-)和六只野生型(+/+)小鼠施用咪达唑仑(6.64mg/kg; Roche products Ltd.Welwyn Garden City,UK)的腹膜内注射,并且随后通过吸入异氟醚

(Abbott Laboratories Ltd., Kent, UK) 进行麻醉。选择异氟醚是因为它是一种温和的吸入麻醉剂, 具有最低限度的肝毒性; 即使在延长麻醉后, 浓度也准确地产生且动物快速恢复。施用咪达唑仑是因为它在动物中产生神经镇痛状态, 并且意味着需要施用较少的异氟醚。在动物下方放置热垫以便维持恒定的体温。接下来, 执行腹部中线切口, 并且使用一对牵引器使体腔保持打开。清除在右肾和左肾两者的肾静脉和动脉上方和下方的结缔组织, 并且经由微动脉瘤钳的应用将肾蒂夹住55分钟的时期。这一缺血时期最初基于在该实验室执行的先前研究(Zhou等人, J.Clin. Invest. 105:1363-71 (2000))。另外, 在缺血性滴定后选择了55分钟的标准缺血时间, 并且发现55分钟给出也是可逆的一致损伤, 具有低于5%的死亡率。在阻塞后, 将0.4ml温盐水(37°C)置于腹腔中, 然后对于缺血期间关闭腹部。在去除微动脉瘤夹后, 观察肾直至变色, 血液回流至肾的指示。将进一步的0.4ml温盐水置于腹腔中并缝合开口, 其后将动物放回其笼中。在去除夹子后24小时获取尾部血液样品, 并且在48小时处死小鼠并收集另外的血液样品。

[0701] 肾损伤的评价: 在六只雄性MASP-2 (-/-) 和六只WT (+/+) 小鼠中的再灌注后24和48小时评价肾功能。血液肌酐测量通过质谱法进行确定, 所述质谱法提供了可重现的肾功能指数(灵敏度 $<1.0\mu\text{mol/L}$)。图12以图形方式说明了, 在再灌注后24小时和48小时, 关于野生型C57B1/6对照和MASP-2 (-/-) 的血尿素氮清除率。如图12中所示, 与野生型对照小鼠相比, MASP-2 (-/-) 小鼠展示了在24和48小时的血尿素量的显著减少, 指示了免于缺血再灌注损伤模型中的肾损害的保护性功能效应。

[0702] 总体而言, 在外科手术和缺血性损伤后24和48小时, 在WT (+/+) 和 MASP-2 (-/-) 小鼠两者中均可见增加的血尿素。非缺血性WT (+/+) 手术动物中的血尿素水平分别确定为 5.8mmol/L 。除图12中提供的数据之外, 一只 MASP-2 (-/-) 动物显示了免于缺血性损伤的几乎完全保护, 其中在24小时和48小时的值分别为6.8和 9.6mmol/L 。该动物作为其中可能不存在缺血性损伤的潜在异常值从组分析中排除。因此, 图12中所示的最终分析包括5只MASP-2 (-/-) 小鼠和6只WT (+/+) 小鼠, 并且在MASP-2 (-/-) 小鼠中, 在24小时和48小时可见血尿素的统计学显著减少(斯氏t检验 $p<0.05$)。这些发现指示了MASP-2活性的抑制预计具有免于由于缺血性损伤的肾损害的保护或治疗效应。

[0703] 实施例13

[0704] 该实施例描述了MASP-2 -/- 在鼠黄斑变性模型中的结果。

[0705] 背景/基本原理: 年龄相关性黄斑变性 (AMD) 是工业化世界中55岁后失明的主要原因。AMD以两种主要形式发生: 新生血管性(湿性) AMD和萎缩性(干性) AMD。新生血管性(湿性) 形式负责与AMD相关的严重视力丧失的90%, 尽管仅~20%的AMD个体发展湿性形式。AMD的临床标志包括多发性玻璃疣、地图状萎缩和脉络膜新生血管(CNV)。在2004年12月, FDA批准了 Macugen (哌加他尼), 特异性地靶向且阻断血管内皮生长因子(VEGF) 的效应的新一类眼科药物, 用于治疗湿性(新生血管) 形式的AMD (Ng等人, Nat Rev. Drug Discov 5: 123-32 (2006))。尽管Macugen代表了用于AMD患者亚组的有希望的新治疗选项, 但仍然迫切需要开发用于这种复杂疾病的另外治疗。多个独立的调查线暗示了补体激活在AMD的发病机制中的核心作用。最严重的 AMD形式, 脉络膜新生血管(CNV) 的发病机制可能涉及补体途径的激活。

[0706] 25年以前, Ryan描述了动物中激光诱导的CNV损伤模型 (Ryan, S. J.,

Tr.Am.Opth.Soc.LXXVII:707-745,1979)。该模型最初使用恒河猴进行开发,然而,相同的技术自那以后已用于在各种研究动物包括小鼠中开发类似的 CNV模型(Tobe等人,Am.J.Pathol.153:1641-46,1998)。在这个模型中,激光光凝术用于破坏玻璃膜,导致CNV样的膜形成的行为。激光诱导的模型捕获了人状况的许多重要特征(关于最近的综述,参见Ambati等人,Survey Ophthalmology 48:257-293,2003)。激光诱导的小鼠模型目前是充分确立的,并且用作大量且不断增加的研究项目的实验基础。一般公认的是,激光诱导的模型与人中的CNV共享足够的生物学相似性,使用该模型的发病机制和药物抑制的临床前研究与人中的CNV有关。

[0707] 方法:

[0708] MASP-2-/-小鼠如实施例1中所述生成,并且与C57B1/6回交10代。当前研究比较了当在激光诱导CNV的过程中评估MASP-2(-/-)和MASP-2(+/-)雄性小鼠时的结果,所述激光诱导CNV是新生血管性AMD的加速模型,集中于通过扫描激光共聚焦显微镜检查的激光诱导CNV的体积作为组织损伤的量度,以及在激光损伤后通过ELISA确定视网膜色素上皮(RPE)/脉络膜中的 VEGF(CNV中牵涉的有力血管生成因子)水平。

[0709] 脉络膜新生血管(CNV)的诱导:通过对药物组分配不知情的单一个体,在第0天时,对每只动物的双眼执行激光光凝术(532nm,200mW,100ms,75 μ m;Oculight GL,Iridex,Mountain View,CA)。使用裂隙灯递送系统和盖玻片作为接触镜片,在视神经周围以标准化方式施加激光点。激光损伤的形态学终点是空化气泡的出现,所述空化气泡是被认为与玻璃膜的破坏相关联的体征。评估的详细方法和终点如下。

[0710] 荧光素血管造影术:在激光光凝术后1周,用照相机和成像系统(TRC 50 1A照相机;ImageNet 2.01系统;Topcon,Paramus,NJ)执行荧光素血管造影术。在腹膜内注射0.1ml 2.5%荧光素钠后,用与眼底照相机镜头接触的20-D 镜头拍摄照片。不涉及激光光凝术或血管造影术的视网膜专家以不知情方式一次性评估了荧光素血管造影片。

[0711] 脉络膜新生血管(CNV)的体积:在激光损伤一周后,将眼球摘除,并且用4%多聚甲醛在4℃下固定30分钟。通过取出眼前段获得眼杯,并在PBS中洗涤3次,随后为通过甲醇系列的脱水和再水化。在室温下用缓冲液(含有1%牛血清白蛋白和0.5%Triton X-100的PBS)封闭两次30分钟后,使眼杯与0.5% FITC-同工凝集素B4(Vector laboratories,Burlingame,CA)一起在4℃下温育过夜,所述FITC-同工凝集素B4用含有0.2%BSA和0.1% Triton X-100的PBS 进行稀释,其结合在内皮细胞的表面上的末端 β -D-半乳糖残基,并且选择性地标记小鼠血管系统。在用含有0.1%Triton X-100的PBS的两次洗涤后,使感觉神经性视网膜从视神经轻轻脱离并切断。制备四个松弛的径向切口,并且将剩余的RPE-脉络膜-巩膜复合体平面固定(flatmounted)在抗荧光淬灭介质(Immu-Mount Vectashield Mounting Medium;Vector Laboratories)中,并且盖上盖玻片。

[0712] 用扫描激光共聚焦显微镜(TCS SP;Leica,Heidelberg,德国)检查平面固定。通过用蓝色氩波长(488nm)激发并捕获在515和545nm之间的发射来显现血管。40X油浸物镜用于所有成像研究。从RPE-脉络膜-巩膜复合体的表面获得水平光学切片(1 μ m步长)。其中可以鉴定与病变相接的周围脉络膜血管网络的最深焦平面被判断为病变底部。激光靶向区域中以及对于该参考平面浅表的任何血管都被判断为CNV。每个切片的图像都以数字方式存储。CNV 相关荧光的面积通过用显微镜软件(TCS SP;Leica)的计算机化图像分析来测量。每个

水平切片中的整个荧光面积的总和用作CNV体积的指数。成像通过对治疗组分配不知情的操作员来执行。

[0713] 因为每个激光病变发展CNV的概率受其所属组(小鼠、眼和激光点)的影响,所以使用带有裂区重复测量设计的线性混合模型比较平均病变体积。全区因子是动物所属的遗传组,而裂区因子是眼。统计显著性在0.05水平下确定。平均值的事后比较用关于多重比较的邦弗朗尼调整进行构建。

[0714] VEGF ELISA。在通过12个激光点的损伤后三天,RPE-脉络膜复合体在裂解缓冲液(具有蛋白酶抑制剂的20mM盐酸咪唑、10mM KCl、1mM $MgCl_2$ 、10mM EGTA、1% Triton X-100、10mM NaF、1mM钼酸钠和1mM EDTA)中在冰上超声处理15分钟。通过ELISA试剂盒(R&D Systems,Minneapolis,MN)确定上清液中的VEGF蛋白水平,其识别在450至570nm 处的所有剪接变体(Emax;Molecular Devices,Sunnyvale,CA),并且针对总蛋白进行标准化。由不涉及光凝术、成像或血管造影术的操作员以不知情方式执行一式两份测量。VEGF数目表示为至少三次独立实验的平均值 $\pm$ SEM,并且使用曼怀二氏U检验进行比较。零假设在 $P < 0.05$ 时被拒绝。

[0715] 结果:

[0716] VEGF水平的评价:

[0717] 图13A以图形方式说明了,在第0天,从C57B16野生型和MASP-2(-/-)小鼠分离的RPE-脉络膜复合体中的VEGF蛋白水平。如图13A中所示,VEGF 水平的评价指示了相对于C57b1野生型对照小鼠,关于MASP-2(-/-)小鼠中的 VEGF基线水平的降低。图13B以图形方式说明了,在激光诱导的损伤之后的第三天测量的VEGF蛋白水平。如图13B中所示,VEGF水平在激光诱导的损伤之后的三天,在野生型(+/+)小鼠中显著增加,与公开的研究一致(Nozaki 等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:2328-33(2006))。然而,在MASP-2(-/-)小鼠中可见惊人地极低水平的VEGF。

[0718] 脉络膜新生血管(CNV)的评价:

[0719] 除在激光诱导的黄斑变性之后的VEGF水平减少之外,还测定了在激光损伤之前和之后的CNV面积。图14以图形方式说明了,在激光诱导的损伤之后的第7天,在C57b1野生型小鼠和MASP-2(-/-)小鼠中测量的CNV体积。如图14中所示,与野生型对照小鼠相比,MASP-2(-/-)小鼠在激光诱导的损伤之后的第7天展示CNV面积的约30%减少。

[0720] 这些发现指示了,相对于野生型(+/+)对照,如MASP(-/-)小鼠中可见的 VEGF和CNV减少,并且用抑制剂阻断MASP-2在黄斑变性的治疗中具有预防或治疗效应。

[0721] 实施例14

[0722] 该实施例证实了凝血酶活化可以在生理条件下在凝集素途径激活之后发生,并且证实了MASP-2涉及的程度。在正常大鼠血清中,凝集素途径的激活导致与补体激活(评价为C4沉积)并发的凝血酶激活(评价为凝血酶沉积)。如图15A和15B中可见的,该系统中的凝血酶活化受到MASP-2阻断抗体(Fab2形式)的抑制,显示出与补体激活(图15A)平行的抑制浓度-应答曲线(图 15B)。这些数据提示了,如在创伤中发生的凝集素途径的激活将导致在完全依赖于MASP-2的过程中补体系统和凝血系统两者的激活。通过推断,MASP2 阻断抗体可能在过度全身凝血例如弥散性血管内凝血的减轻病例下证明是有效的,所述弥散性血管内凝血是导致重大创伤病例中的死亡率的标志之一。

[0723] 实施例15

[0724] 该实施例提供了在MASP-2^{-/-}缺陷和MASP-2^{+/+}充足的小鼠中,使用弥散性血管内凝血("DIC")的局限性施瓦茨曼反应模型生成的结果,以评估凝集素途径在DIC中的作用。

[0725] 背景/基本原理:

[0726] 如上文所述,MASP-2的阻断抑制凝集素途径激活并且减少过敏毒素C3a 和C5a两者的生成。C3a过敏毒素在体外可以显示为有力的血小板聚集剂,但其在体内的牵涉不太明确,并且伤口修复中的血小板物质和纤溶酶的释放可能仅次要地涉及补体C3。在该实施例中,凝集素途径的作用在MASP-2^(-/-) 和WT^(+/+) 小鼠中进行分析,以便解决C3激活的延长升高对于生成弥散性血管内凝血是否是必要的。

[0727] 方法:

[0728] 这项研究中使用的MASP-2^(-/-) 小鼠如实施例1中所述生成,并且与 C57B1/6回交至少10代。

[0729] 本实验中使用局限性施瓦茨曼反应模型。局限性施瓦茨曼反应(LSR)是脂多糖(LPS)诱导的应答,具有来自先天免疫系统的细胞和体液元件的充分表征的贡献。LSR对补体的依赖性是完全确立的(Polak,L.等人,Nature 223:738-739 (1969);Fong J.S.等人,J Exp Med 134:642-655(1971))。在LSR模型中,小鼠用TNF α (500ng,阴囊内)预处理4小时,然后将小鼠麻醉并准备用于提睾肌的活体显微镜检查。选择具有良好血流(1-4mm/s)的毛细血管后微静脉(15-60 μ m直径)网络用于观察。用荧光抗体治疗动物,以选择性地标记嗜中性粒细胞或血小板。序贯地扫描血管网络,并且以数字方式记录所有血管的图像用于以后分析。在记录微循环的基础状态后,小鼠接受单独或与下文列出的药剂一起的LPS(100 μ g)的单次静脉内注射。然后每10分钟扫描同一血管网络共1小时。特异性荧光团累积通过扣除本底荧光进行鉴定,并且通过对图像进行阈值化得到增强。从记录的图像中测量反应的量级。施瓦茨曼反应的主要量度是综合数据。

[0730] 这些研究比较了暴露于已知补体途径消耗剂眼镜蛇毒因子(CVF)或终末途径抑制剂(C5aR拮抗剂)的MASP-2^{+/+}充足或野生型小鼠。结果(图16A)证实了CVF以及C5aR拮抗剂两者均阻止了血管系统中聚集体的出现。另外, MASP-2^{-/-}缺陷小鼠(图16B)也证实了局限性施瓦茨曼反应的完全抑制,支持凝集素途径涉及。这些结果明确地证实了MASP-2在DIC生成中的作用,并且支持使用MASP-2抑制剂用于DIC的治疗和预防。

[0731] 实施例16

[0732] 该实施例描述了MASP-2^(-/-) 小鼠在鼠肾移植模型中的分析。

[0733] 背景/基本原理:

[0734] 使用小鼠模型评价MASP-2在肾移植的功能结果中的作用。

[0735] 方法:

[0736] 肾移植的功能结果使用单个肾同基因移植到单侧肾切除后的(uninephrectomized)受体小鼠内进行评价,具有6只WT^(+/+) 移植受体(B6)和6只MASP-2^(-/-) 移植受体。为了评价移植肾的功能,在移植后5天从受体中去除剩余的天然肾,并且24小时后通过测量血尿素氮(BUN)水平来评价肾功能。

[0737] 结果:

[0738] 图17以图形方式说明了,WT^(+/+) 受体和MASP-2^(-/-) 受体中的肾移植后6天的肾

的血尿素氮 (BUN) 水平。如图17中所示,在WT (+/+) (B6) 移植受体中观察到强烈升高的BUN水平(小鼠中的正常BUN水平<5mM),指示了肾衰竭。相比之下,MASP-2 (-/-) 同基因移植受体小鼠显示了基本上更低的 BUN水平,提示了改善的肾功能。值得注意的是,这些结果使用来自WT (+/+) 肾供体的移植物获得,提示了在移植受体中缺乏功能性凝集素途径单独足以实现治疗益处。

[0739] 总的来说,这些结果指示了经由MASP-2抑制的凝集素途径的瞬时抑制提供了减少肾移植中的发病率和延迟移植物功能的方法,并且这种方法很可能可用于其它移植背景下。

[0740] 实施例17

[0741] 该实施例证实了MASP-2 (-/-) 小鼠对鼠多微生物败血性腹膜炎模型中的败血性休克是抗性的。

[0742] 背景/基本原理:

[0743] 为了评估MASP-2 (-/-) 在感染中的潜在效应,评估了盲肠结扎和穿刺 (CLP) 模型,多微生物败血性腹膜炎模型。该模型被认为最准确地模拟了人败血性腹膜炎的过程。盲肠结扎和穿刺 (CLP) 模型是这样的模型,其中将盲肠结扎且通过针穿刺,导致细菌不断渗漏到腹腔内,所述细菌通过淋巴引流到达血液,然后分布到所有腹部器官内,导致多器官衰竭和败血性休克(Eskandari等人, J Immunol 148 (9):2724-2730 (1992))。CLP模型模拟了在患者中观察到的败血症过程,并且诱导了早期的高炎症应答,随后为明显的低炎症阶段。在此阶段过程中,动物对细菌攻击是高度敏感的 (Wichterman等人, J.Surg.Res.29 (2):189-201 (1980))。

[0744] 方法:

[0745] 使用盲肠结扎和穿刺 (CLP) 模型的多微生物感染的死亡率在WT (+/+) (n=18) 和MASP-2 (-/-) (n=16) 小鼠中进行测量。简言之,将MASP-2缺陷小鼠及其野生型同窝仔畜麻醉,并且将盲肠外置并在远端上方30%处结扎。这之后,用0.4mm直径的针将盲肠穿刺一次。然后将盲肠放回腹腔内,并用夹子使皮肤闭合。在CLP后14天的时期内监测经受CLP的小鼠的存活。在CLP 后16小时,在小鼠中收集腹腔灌洗液,以测量细菌负荷。在PBS中制备腹膜灌洗液的系列稀释物并接种到Mueller Hinton板中,伴随在37°C下在厌氧条件下的24小时后继续温育,这之后确定细菌负荷。

[0746] 还经由定量实时聚合酶链反应 (qRT-PCR),在CLP后16小时,在WT (+/+) 和MASP-2 (-/-) 小鼠的肺和脾中测量对细菌感染的TNF- α 细胞因子应答。还通过夹心ELISA定量在WT (+/+) 和MASP-2 (-/-) 小鼠中在CLP后16小时的TNF- α 的血清水平。

[0747] 结果:

[0748] 图18以图形方式说明了,根据CLP程序后的天数,CLP处理动物的百分比存活。如图18中所示,与WT (+/+) 小鼠相比,MASP-2 (-/-) 小鼠中的凝集素途径缺陷并不增加使用盲肠结扎和穿刺模型的多微生物感染后小鼠的死亡率。然而,如图19中所示,当与其WT (+/+) 同窝仔畜相比较时,MASP-2 (-/-) 小鼠显示了在CLP后的腹腔灌洗液中显著更高的细菌负荷(细菌数目的大约 1000倍增加)。这些结果指示了MASP-2 (-/-) 缺陷小鼠对败血性休克是抗性的。该模型中的MASP-2缺陷小鼠的细菌清除率减少可能是由于C3b介导的吞噬作用受损,因为证实了C3沉积是MASP-2依赖性的。

[0749] 确定了与WT (+/+) 对照相比,对细菌感染的TNF- α 细胞因子应答在 MASP-2 (-/-) 中小鼠并未升高(数据未显示)。还确定了与MASP-2 (-/-) 小鼠形成对比,在CLP后16小时,在WT (+/+) 小鼠中存在显著更高的血清TNF- α 浓度,其中TNF- α 的血清水平保持几乎不变。这些结果提示了,对败血性状况的强烈炎症应答在MASP-2 (-/-) 小鼠中得到缓和,并且允许动物在较高细菌计数的存在下存活。

[0750] 总的来说,这些结果证实了在败血病的情况下的凝集素途径补体激活的潜在有害效应以及患有压倒性败血症的患者中的死亡率增加。这些结果进一步证实了MASP-2缺陷调节炎症免疫应答,并且减少在败血症期间的炎症介质的表达水平。因此,认为通过施用针对MASP-2的抑制性单克隆抗体来抑制MASP-2 (-/-) 将有效减少患有败血性休克的受试者中的炎症应答。

[0751] 实施例18

[0752] 该实施例描述了MASP-2 (-/-) 小鼠在鼠鼻内感染性模型中的分析。

[0753] 背景/基本原理:

[0754] 铜绿假单胞菌是革兰氏阴性机会性人细菌病原体,其特别是在无免疫应答的个体中引起广泛范围的感染。它是获得性医院感染,特别是医院获得性肺炎的主要来源。它还负责囊性纤维化(CF)患者中的显著发病率和死亡率。铜绿假单胞菌肺部感染的特征在于强烈的嗜中性粒细胞募集和显著肺部炎症,其导致广泛的组织损害(Palanki M.S.等人, J.Med.Chem 51:1546-1559 (2008))。

[0755] 在该实施例中,进行了研究以确定在MASP-2 (-/-) 小鼠中去除凝集素途径是否增加小鼠对细菌感染的易感性。

[0756] 方法:

[0757] 用铜绿假单胞菌细菌菌株的鼻内施用,来攻击22只WT (+/+) 小鼠、22 只MASP-2 (-/-) 小鼠和11只C3 (-/-) 小鼠。在感染后的六天内监测小鼠,并且构建了显示百分比存活的Kaplan-Mayer图。

[0758] 结果:

[0759] 图20是感染后6天WT (+/+)、MASP-2 (-/-) 或C3 (-/-) 小鼠的百分比存活的Kaplan-Mayer图。如图20中所示,相对于WT (+/+) 小鼠,在MASP-2 (-/-) 小鼠中并未观察到差异。然而,在C3 (-/-) 小鼠中去除经典(C1q) 途径导致对细菌感染的严重易感性。这些结果证实了, MASP-2抑制并不增加对细菌感染的易感性,指示了可能通过抑制MASP-2来减少创伤患者中的不期望的炎症并发症,而不损害患者使用经典补体途径来抵抗感染的能力。

[0760] 实施例19

[0761] 该实施例描述了如实施例10中所述鉴定的代表性高亲和力抗MASP-2 Fab2抗体的药效学分析。

[0762] 背景/基本原理:

[0763] 如实施例10中所述,为了鉴定阻断大鼠凝集素途径的高亲和力抗体,大鼠MASP-2蛋白用于淘选噬菌体展示文库。该文库设计为提供高免疫多样性,并且使用完全人免疫球蛋白基因序列进行构建。如实施例10中所述,通过 ELISA筛选鉴定了大约250个个别的噬菌体克隆,其以高亲和力与大鼠 MASP-2蛋白结合。这些克隆的测序鉴定了50个独特的MASP-2抗体编码噬菌体。Fab2蛋白由这些克隆表达,纯化并分析MASP-2结合亲和力和凝集素补体

途径功能抑制。

[0764] 如实施例10的表6中所示,作为该分析的结果,鉴定了具有功能阻断活性的17种抗MASP-2 Fab2 (关于阻断抗体34%的命中率)。凝集素补体途径通过Fab2的功能性抑制在C4沉积的水平上是显而易见的,所述C4沉积是通过MASP-2的C4切割的直接测量。重要的是,当评价C3转化酶活性时,抑制是同样显而易见的,证实了凝集素补体途径的功能性阻断。如实施例10中所述鉴定的17种MASP-2阻断性Fab2有力地抑制C3转化酶形成,其 IC_{50} 值等于或小于10nM。所鉴定的17种Fab2中的8种具有在亚纳摩尔范围内的 IC_{50} 值。此外,所有17种MASP-2阻断性Fab2在凝集素途径C3转化酶测定中给出了C3转化酶形成的基本上完全抑制,如图8A-C中所示,并且在实施例10的表6中概括。此外,表6中显示的17种阻断性抗MASP-2 Fab2各自有力地抑制C3b生成(>95%),因此证实了该测定对于凝集素途径C3转化酶的特异性。

[0765] 大鼠IgG2c和小鼠IgG2a全长抗体同种型变体衍生自Fab2#11。该实施例描述了这些同种型关于药效学参数的体内表征。

[0766] 方法:

[0767] 如实施例10中所述,大鼠MASP-2蛋白用于淘选Fab噬菌体展示文库,从其中鉴定了Fab2#11。大鼠IgG2c和小鼠IgG2a全长抗体同种型变体衍生自Fab2#11。大鼠IgG2c和小鼠IgG2a全长抗体同种型两者均如下就药效学参数进行体内表征。

[0768] 小鼠中的体内研究:

[0769] 在小鼠中进行了药效学研究,以调查抗MASP-2抗体给药对体内血浆凝集素途径活性的作用。在这项研究中,在0.3mg/kg或1.0mg/kg的小鼠抗 MASP-2 MoAb (衍生自Fab2#11的小鼠IgG2a全长抗体同种型)的皮下(sc)和腹膜内(ip)施用之后的各个时间点,在凝集素途径测定中离体测量C4沉积。

[0770] 图21以图形方式说明了,在0.3mg/kg或1.0mg/kg的小鼠抗MASP-2 MoAb的皮下给药后的各个时间点,在从小鼠(n=3只小鼠/组)获取的未稀释血清样品中离体测量的凝集素途径特异性C4b沉积。在抗体给药之前收集的来自小鼠的血清样品充当阴性对照(100%活性),而在体外补充有100nM相同阻断性抗MASP-2抗体的血清用作阳性对照(0%活性)。

[0771] 图21中显示的结果证实了在1.0mg/kg剂量的小鼠抗MASP-2 MoAb的皮下施用之后,C4b沉积的快速和完全抑制。在0.3mg/kg剂量的小鼠抗MASP-2 MoAb的皮下施用之后,可见C4b沉积的部分抑制。

[0772] 小鼠抗MASP-2 MoAb以0.6mg/kg在小鼠中的单次ip施用之后,跟踪凝集素途径恢复的时间过程共三周。如图22中所示,凝集素途径活性的急剧下降在抗体给药后发生,随后为在ip施用后持续约7天的完全凝集素途径抑制。凝集素的缓慢恢复

[0773] 这些结果证实了,当全身递送时,衍生自Fab2#11的小鼠抗MASP-2 Moab 以剂量应答性方式抑制小鼠的凝集素途径。

[0774] 实施例20

[0775] 该实施例描述了衍生自Fab2#11的小鼠抗MASP-2Moab关于年龄相关性黄斑变性的小鼠模型中的功效的分析。

[0776] 背景/基本原理:

[0777] 如实施例10中所述,大鼠MASP-2蛋白用于淘选Fab噬菌体展示文库,从其中将Fab2#11鉴定为功能活性抗体。大鼠IgG2c和小鼠IgG2a同种型的全长抗体由Fab2#11生成。

如实施例19中所述,小鼠IgG2a同种型的全长抗MASP-2抗体就药效学参数进行表征。在该实施例中,在通过Bora P.S.等人, J Immunol 174:491-497 (2005) 描述的年龄相关性黄斑变性(AMD)的小鼠模型中,分析了衍生自Fab2#11的小鼠抗MASP-2全长抗体。

[0778] 方法:

[0779] 如实施例19中所述衍生自Fab2#11的小鼠IgG2a全长抗MASP-2抗体同种型,在如实施例13中所述的年龄相关性黄斑变性(AMD)的小鼠模型中进行测试,伴随下述修改。

[0780] 小鼠抗MASP-2 MoAb的施用

[0781] 在CNV诱导之前16小时,将两种不同剂量(0.3mg/kg和1.0mg/kg)的小鼠抗MASP-2 MoAb连同同种型对照MoAb治疗一起ip注射到WT(+/+)小鼠(n=8只小鼠/组)内。

[0782] 脉络膜新生血管(CNV)的诱导

[0783] 如实施例13中所述,使用激光光凝术进行脉络膜新生血管(CNV)的诱导和CNV体积的测量。

[0784] 结果:

[0785] 图23以图形方式说明了,在用同种型对照MoAb或小鼠抗MASP-2 MoAb (0.3mg/kg和1.0mg/kg) 治疗的小鼠中,在激光损伤后7天测量的CNV面积。如图23中所示,在用1.0mg/kg抗MASP-2 MoAb预处理的小鼠中,在激光处理后7天观察到CNV的统计学显著的($p < 0.01$)大约50%减少。如图23中进一步所示,观察到0.3mg/kg剂量的抗MASP-2 MoAb在减少CNV方面无效。注意到如实施例19中所述和图21中所示,0.3mg/kg剂量的抗MASP-2 MoAb显示了在皮下施用之后具有C4b沉积的部分和瞬时抑制。

[0786] 该实施例中描述的结果证实了用抑制剂例如抗MASP-2 MoAb阻断MASP-2在黄斑变性的治疗中具有预防和/或治疗效应。注意到这些结果与实施例13中描述的在MASP-2(-/-)小鼠中进行的研究中观察到的结果一致,其中与野生型对照小鼠相比,在MASP-2(-/-)小鼠中观察到在激光处理后7天CNV的30%减少。此外,该实施例中的结果进一步证实了全身递送的抗MASP-2抗体提供了在眼中的局部治疗益处,从而突出显示了全身施用途径治疗AMD患者的潜力。总之,这些结果提供了支持在AMD的治疗中使用MASP-2 MoAb的证据。

[0787] 实施例21

[0788] 该实施例证实了,与野生型对照小鼠相比,MASP-2缺陷小鼠在由脑膜炎奈瑟球菌感染后受保护免于脑膜炎奈瑟球菌诱导的死亡率,并且具有增强的菌血症清除率。

[0789] 基本原理:脑膜炎奈瑟球菌是异养革兰氏阴性双球菌,因其在脑膜炎及其它形式的脑膜炎球菌疾病如脑膜炎球菌血症中的作用而己知。脑膜炎奈瑟球菌是在儿童期过程中的发病率和死亡率的主要原因。严重的并发症包括败血病、华弗二氏综合征(Waterhouse-Friderichsen syndrome)、肾上腺功能不全和弥散性血管内凝血(DIC)。参见例如,Rintala E.等人,Critical Care Medicine 28(7):2373-2378(2000)。在该实施例中,凝集素途径的作用在MASP-2(-/-)和WT(+/+)小鼠中进行分析,以便解决MASP-2缺陷小鼠是否对脑膜炎奈瑟球菌诱导的死亡率敏感。

[0790] 方法:

[0791] MASP-2敲除小鼠如实施例1中所述生成,并且与C57B1/6回交至少10代。通过用在400mg/kg葡聚糖铁中的 5×10^8 cfu/100 μ l、 2×10^8 cfu/100 μ l或 3×10^7 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟球

菌血清群A Z2491的剂量的静脉内注射,来接种10周龄的MASP-2 KO小鼠($n=10$)和野生型C57/B6小鼠($n=10$)。在72小时的时间段内监测感染后小鼠的存活。血液样品在感染后以一小时时间间隔从小鼠中获取,并且进行分析以确定脑膜炎奈瑟球菌的血清水平(log cfu/ml),以便验证感染并确定细菌从血清中的清除率。

[0792] 结果:

[0793] 图24A以图形方式说明了,在感染剂量的 $5 \times 10^8/100\mu\text{l}$ cfu脑膜炎奈瑟球菌的施用后,MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活。如图24A中所示,在由最高剂量的 $5 \times 10^8/100\mu\text{l}$ cfu脑膜炎奈瑟球菌感染后,100%的MASP-2 KO小鼠在感染后的72小时时期自始至终存活。相比之下,仅20%的WT小鼠在感染后24小时仍活着。这些结果证实了,MASP-2缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌诱导的死亡率。

[0794] 图24B以图形方式说明了,在从由 $5 \times 10^8\text{cfu}/100\mu\text{l}$ 脑膜炎奈瑟球菌感染的MASP-2 KO和WT小鼠获取的血液样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌的log cfu/ml。如图24B中所示,在WT小鼠中,在血液中的脑膜炎奈瑟球菌水平在感染后24小时达到约 $6.5\log\text{cfu/ml}$ 的峰值,并且到感染后48小时降至零。相比之下,在MASP-2 KO小鼠中,脑膜炎奈瑟球菌的水平在感染后6小时达到约 $3.5\log\text{cfu/ml}$ 的峰值,并且到感染后36小时降至零。

[0795] 图25A以图形方式说明了,在由 $2 \times 10^8\text{cfu}/100\mu\text{l}$ 脑膜炎奈瑟球菌感染后,MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活。如图25A中所示,在由 $2 \times 10^8\text{cfu}/100\mu\text{l}$ 脑膜炎奈瑟球菌的剂量感染后,100%的MASP-2 KO小鼠在感染后的72小时时期自始至终存活。相比之下,仅80%的WT小鼠在感染后24小时仍活着。与图24A中所示的结果一致,这些结果进一步证实了,MASP-2缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌诱导的死亡率。

[0796] 图25B以图形方式说明了,在从由 $2 \times 10^8\text{cfu}/100\mu\text{l}$ 脑膜炎奈瑟球菌感染的WT小鼠获取的血液样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌的log cfu/ml。如图25B中所示,在由 $2 \times 10^8\text{cfu}$ 感染的WT小鼠的血液中的脑膜炎奈瑟球菌水平在感染后12小时达到约 $4\log\text{cfu/ml}$ 的峰值,并且到感染后24小时降至零。图25C以图形方式说明了,在从由 $2 \times 10^8\text{cfu}/100\mu\text{l}$ 脑膜炎奈瑟球菌感染的MASP-2 KO小鼠获取的血液样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌的log cfu/ml。如图25C中所示,在由 $2 \times 10^8\text{cfu}$ 感染的MASP-2 KO小鼠的血液中的脑膜炎奈瑟球菌水平在感染后2小时达到约 $3.5\log\text{cfu/ml}$ 的峰值水平,并且在感染后3小时降至零。与图24B中所示的结果一致,这些结果证实了,尽管MASP-2 KO小鼠由与WT小鼠相同剂量的脑膜炎奈瑟球菌感染,但与WT相比,MASP-2 KO小鼠具有增强的菌血症清除率。

[0797] 在由最低剂量的 $3 \times 10^7\text{cfu}/100\mu\text{l}$ 脑膜炎奈瑟球菌感染后,MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活在72小时时期为100% (数据未显示)。

[0798] 讨论

[0799] 这些结果显示了,与WT小鼠相比,MASP-2缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌诱导的死亡率,并且具有增强的菌血症清除率。因此,鉴于这些结果,MASP-2抑制剂例如MASP-2 MoAb的治疗应用预计有效治疗、预防或减轻由脑膜炎奈瑟球菌的感染效应(即,败血症和DIC)。进一步地,这些结果指示了,MASP-2抑制剂例如MASP-2 MoAb的治疗应用并不使受试者倾向于感染脑膜炎奈瑟球菌感染的风险增加。

[0800] 实施例22

[0801] 该实施例描述了新型凝集素途径介导和MASP-2依赖性的补体C3的C4 旁路激活的

发现。

[0802] 基本原理:

[0803] 利用补体激活的抑制剂来限制心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)的主要治疗益处在于20年前的心肌梗塞的实验大鼠模型中得到令人信服地证实:静脉内给予重组sCR1,细胞表面补体受体1型(CR1)的可溶性截短衍生物,并且在大鼠体内MIRI模型中评价其效应。用sCR1治疗使梗塞体积减少了多于40% (Weisman,H.F.等人,Science 249:146-151(1990))。这种重组抑制剂的治疗潜力随后在一项临床试验中得到证实,所述临床试验显示了在MI患者中施用 sCR1预防缺血后心脏的收缩衰竭(Shandelya,S.等人,Circulation 87:536-546(1993))。然而,导致缺血组织中的补体激活的主要机制尚未最终确定,主要是由于缺乏适当的实验模型、导致氧剥夺细胞的补体激活的分子过程的有限理解、以及不同补体激活途径之间的串扰和协同作用。

[0804] 作为免疫应答的基本组分,补体系统通过抗体依赖性和不依赖性机制两者提供了免受入侵微生物的保护。它协调免疫应答内的许多细胞和体液相互作用,包括趋化性、吞噬作用、细胞粘附和B细胞分化。三种不同的途径启动补体级联:经典途径、旁路途径和凝集素途径。经典途径识别亚组分C1q 与各种靶结合-最突出的是免疫复合物-以启动相关丝氨酸蛋白酶C1r和 C1s的逐步激活,提供了通过适应性免疫系统在接合之后的病原体和免疫复合物清除的主要机制。C1q与免疫复合物的结合将C1r酶原二聚体转换为其活性形式,以切割并从而激活C1s。C1s在两个切割步骤中将C1q结合转变成补体激活:它首先将C4转换成C4a和C4b,然后切割C4b结合的C2,以形成 C3转化酶C4b2a。该复合物将丰富的血浆组分C3转换成C3a和C3b。C3b 在C4b2a复合物附近的累积将关于C3的底物特异性转变为C5,以形成C5 转化酶C4b2a(C3b)₂。经由经典途径激活生成的C3和C5转化酶复合物与通过凝集素途径激活路线生成的相同。在旁路途径中,组分C3的自发低水平水解导致蛋白质片段沉积到细胞表面上,触发外来细胞上的补体激活,而宿主组织上的细胞相关调控蛋白避免激活,因此预防自身损害。如同旁路途径,凝集素途径可能在免疫复合物的不存在下被激活。激活通过多分子凝集素途径激活复合物与病原体相关分子模式(PAMP)的结合来启动,所述PAMP主要是存在于细菌、真菌或病毒病原体上的碳水化合物结构,或者细胞凋亡、坏死、恶性或氧剥夺细胞上的异常糖基化模式(Collard,C.D.等人,Am.J.Pathol. 156:1549-1556(2000); Walport,M.J.,N.Engl.J.Med.344:1058-1066 (2001);Schwaebler,W.等人,Immunobiology 205:455-466(2002);以及 Fujita,T.,Nat.Rev.Immunol.2:346-353(2002))。

[0805] 甘露聚糖结合凝集素(MBL)是显示与一组新型丝氨酸蛋白酶(命名为MBL相关丝氨酸蛋白酶(MASP))形成复合物的首个碳水化合物识别亚组分,并且根据其发现顺序进行编号(即MASP-1,MASP-2和MASP-3)。在人中,凝集素途径激活复合物可以由具有不同碳水化合物结合特异性的四种替代碳水化合物识别亚组分(即MBL 2)和纤维胶凝蛋白家族的三种不同成员(即L-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白和M-纤维胶凝蛋白)以及MASP形成。两种形式的MBL,MBL A和MBL C,以及纤维胶凝蛋白-A与小鼠和大鼠血浆中的 MASP形成凝集素激活途径复合物。我们先前已在人、小鼠和大鼠中克隆并表征了MASP-2和另外的19kDa的截短的MASP-2基因产物,称为MAp19 或sMAP(Thiel,S.等人,Nature 386:506-510(1997); Stover,C.M.等人,J. Immunol.162:3481-3490(1999);Takahashi,M.等人,Int.Immunol. 11:859-863(1999);以及Stover,C.M.等人,J.Immunol.163:6848-6859(1999))。MAp19/

sMAP缺乏蛋白酶活性,但可以通过竞争MASP与碳水化合物识别复合物的结合来调控凝集素途径激活(Iwaki,D.等人,J.Immunol.177:8626-8632 (2006))。

[0806] 存在提示以下的证据:在三种MASP中,仅需要MASP-2以将凝集素途径识别复合物的结合转变成补体激活(Thiel,S.等人(1997);Vorup-Jensen,T. 等人,J.Immunol.165:2093-2100(2000);Thiel,S.等人,J.Immunol. 165:878-887(2000);Rossi,V.等人,J.Biol.Chem.276:40880-40887(2001))。这一结论通过最近描述的在MASP-1和MASP-3方面缺陷的小鼠品系的表型得到强调。除了在体外延迟凝集素途径介导的补体激活的开始之外,MASP-1/3 缺陷小鼠保留凝集素途径功能活性。用重组MASP-1重构MASP-1和MASP-3 缺陷血清克服了凝集素途径激活的这一延迟,暗示MASP-1可能促进MASP-2 激活(Takahashi,M.等人,J.Immunol.180:6132-6138(2008))。最近的一项研究已显示了,需要MASP-1(以及可能的MASP-3),以将旁路途径激活酶因子 D从其酶原形式转换成其酶促活性形式(Takahashi,M.等人,J.Exp.Med. 207:29-37(2010))。这一过程的生理重要性通过MASP-1/3缺陷小鼠的血浆中的旁路途径功能活性缺乏得到强调。

[0807] 最近生成的具有凝集素途径碳水化合物识别亚组分MBL A和MBL C的组合靶向缺陷的小鼠品系可能仍经由剩余的鼠凝集素途径识别亚组分纤维胶凝蛋白A启动凝集素途径激活(Takahashi,K.等人,Microbes Infect.4:773-784 (2002))。在MASP-2缺陷小鼠中任何残留的凝集素途径功能活性的缺乏提供了结论性模型,以研究先天体液免疫的这个效应臂在健康和疾病中的作用。

[0808] C4和MASP-2缺陷小鼠品系的可用性允许我们限定新型凝集素途径特异性但MASP-2依赖性的补体C3的C4旁路激活路线。这种新型凝集素途径介导的C4旁路激活路线针对缺血后组织损失的基本贡献,通过MIRI中的 MASP-2缺陷的突出保护表型得到强调,而在同一模型中测试的C4缺陷小鼠并未显示保护。

[0809] 在该实施例中,我们描述了新型凝集素途径介导和MASP-2依赖性的补体C3的C4旁路激活。这种新激活路线的生理相关性通过心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)的实验模型中的MASP-2缺陷的保护表型来确定,其中C4缺陷动物并未受到保护。

[0810] 方法:

[0811] MASP-2缺陷小鼠并未显示肉眼可见的异常。如实施例1中所述生成 MASP-2缺陷小鼠。杂合($^{+/-}$)和纯合($^{-/-}$)MASP-2缺陷小鼠两者均是健康且有生育力的,且并未显示肉眼可见的异常。它们的预期寿命与其WT同窝仔畜相似(>18个月)。在疾病实验模型中研究这些小鼠的表型之前,我们的MASP-2 $^{-/-}$ 系在C57BL/6背景上回交了11代。MASP-2 mRNA的完全缺失通过多聚A⁺ 选择的肝RNA制剂的RNA印迹得到确认,而编码MAp19或sMAP(MASP2 基因的截短的可变剪接产物)的1.2kb mRNA是丰富表达的。

[0812] 使用对于MASP-2的丝氨酸蛋白酶结构域(B链)的编码序列或A链的编码序列的剩余部分特异性的引物对的qRT-PCR分析显示了,在MASP-2 $^{-/-}$ 小鼠中并未检测到B链编码mRNA,而破坏的A链mRNA转录物的丰度显著增加。同样地,MAp19/sMAP编码mRNA的丰度在MASP-2 $^{+/-}$ 和MASP-2 $^{-/-}$ 小鼠增加。对于每种基因型的5只动物通过ELISA确定的血浆MASP-2水平,对于WT对照为300ng/ml(范围260-330ng/ml),对于杂合小鼠为360ng/ml(范围330-395ng/ml),并且在MASP-2 $^{-/-}$ 小鼠中无法检测。使用qRT-PCR,建立了mRNA表达谱,证实了MASP-2 $^{-/-}$ 小鼠表达了关于MBL A、MBL C、纤维胶凝蛋白A、MASP-1、MASP-3、C1q、C1rA、C1sA、

因子B、因子D、C4 和C3的mRNA,其丰度与其MASP-2充足的同窝仔畜相似(数据未显示)。

[0813] 使用商购可得的小鼠C3 ELISA试剂盒(Kamiya,Biomedical,Seattle, WA),测量MASP-2^{-/-} (n=8)和MASP-2^{+/+} (n=7)同窝仔畜的血浆C3水平。MASP-2缺陷小鼠的C3水平(平均为0.84mg/ml, +/-0.34)与WT对照(平均为 0.92, +/-0.37)相似。

[0814] 结果:

[0815] MASP-2对于凝集素途径功能活性是必需的。

[0816] 如实施例2中所述和图5中所示,MASP-2^{-/-} 血浆的体外分析显示了在激活甘露聚糖和酵母聚糖包被的表面上用于C4激活的凝集素途径功能活性的完全缺乏。同样地,凝集素途径依赖性C4和C3切割两者在用N-乙酰葡萄糖胺包被的表面上在MASP-2^{-/-} 血浆中均无法检测,所述N-乙酰葡萄糖胺经由MBL A、MBL C和纤维胶凝蛋白A结合并触发激活(数据未显示)。

[0817] MASP-2^{-/-}小鼠的血清和血浆的分析明确地证实了MASP-2是经由凝集素途径激活补体基本上所需的。然而,凝集素途径功能活性的完全缺乏使其它补体激活途径保持完整:MASP-2^{-/-} 血浆仍可以经由经典途径(图26A)和旁路途径(图26B)激活补体。在图26A和26B中,符号"*"指示了来自WT的血清(MASP-2(+/+));符号"●"指示了来自WT的血清(C1q耗尽的);符号"□"指示了来自MASP-2(-/-)的血清;并且符号"Δ"指示了来自MASP-2(-/-)的血清(C1q 耗尽的)。

[0818] 图26A以图形方式说明了,MASP-2^{-/-}小鼠保留了功能性经典途径:在用免疫复合物包被的微量滴定板(通过用BSA包被然后加入山羊抗BSA IgG而原位生成)上测定C3b沉积。图26B以图形方式说明了,MASP-2缺陷小鼠保留了功能性旁路途径:在仅允许旁路途径激活的条件下(含有Mg²⁺和EGTA 的缓冲液),在酵母聚糖包被的微量滴定板上测定C3b沉积。图26A和图26B 中显示的结果是一式两份的平均值,并且是三次独立实验的典型结果。自始至终使用了关于血浆来源的相同符号。这些结果显示了,功能性旁路途径存在于MASP-2缺陷小鼠中,如在设计为直接触发旁路途径,同时使经典途径和凝集素途径两者失活的实验条件下,图26B中所示的结果所证明的。

[0819] 补体激活的凝集素途径关键地促成心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)中的炎性组织损失。

[0820] 为了研究凝集素途径功能活性对MIRI的贡献,我们在冠状动脉左前降支(LAD)的瞬时结扎和再灌注之后的MIRI模型中,比较了MASP-2^{-/-}小鼠和WT 同窝仔畜对照。补体C4的存在或不存在对MIRI中的缺血性组织损失程度没有影响。我们评价了C4缺陷对实验性MIRI之后的梗死面积的影响。如图27A 和图27B中所示,在C4缺陷小鼠及其WT同窝仔畜两者中观察到相同的梗塞面积。图27A以图形方式说明了,在C4^{-/-}小鼠(n=6)和匹配的WT同窝仔畜对照(n=7)中,在LAD结扎和再灌注之后MIRI诱导的组织损失。图27B以图形方式说明了,根据AAR的INF,明确地证实了C4^{-/-}小鼠与其WT对照(虚线)一样易受MIRI的影响。

[0821] 这些结果证实了C4缺陷小鼠未受保护免于MIRI。这一结果是出乎意料的,因为它与广泛公认的观点相矛盾:主要的C4激活片段C4b是经典途径和凝集素途径C3转化酶C4b2a的必需组分。因此,我们评价了是否可以在C4 缺陷小鼠和人血浆中检测到补体C3的残留凝集素途径特异性激活。

[0822] 凝集素途径可以经由新型MASP-2依赖性C4旁路激活路线在C4的不存在下激活补体C3。

[0823] 在指示了C4缺陷的豚鼠血清中的C4旁路激活路线的存在的历史报道 (May, J.E. 和M.Frank, J. Immunol. 111:1671-1677 (1973)) 的鼓励下, 我们分析了C4-缺陷小鼠是否可能具有残留的经典或凝集素途径功能活性, 并且在排除旁路途径的贡献的途径特异性测定条件下监测C3的激活。

[0824] 使用以禁止旁路途径激活的血浆浓度 (1.25% 及以下) 的重新钙化的血浆, 在甘露聚糖包被的微量滴定板上测定C3b沉积。虽然在对于经典途径激活测试的C4缺陷血浆中并未检测到C3的切割 (数据未显示), 但当经由凝集素途径启动补体激活时, 在C4缺陷小鼠血浆中观察到强烈的残留C3切割活性。凝集素途径依赖性通过在C4缺陷血浆稀释物与可溶性甘露聚糖一起预温育之后C3切割的竞争性抑制得到证实 (参见图28A)。如图28A-D中所示, 在C4的不存在下观察到C3的MASP-2依赖性激活。图28A以图形方式说明了, 通过C4+/+ (交叉) 和C4-/- (空心圆圈) 小鼠血浆的C3b沉积。在测定之前使C4-/-血浆与过量的 (1 μ g/ml) 液相甘露聚糖一起预温育完全抑制C3沉积 (实心圆圈)。结果是3次独立实验的典型结果。图28B以图形方式说明了实验的结果, 在所述实验中, 野生型、MASP-2缺陷 (空心方块) 和C4-/-小鼠血浆 (1%) 与各种浓度的抗大鼠MASP-2 mAbM11 (横坐标) 混合, 并且在甘露聚糖包被的板上测定C3b沉积。结果是4次测定 (每种类型血浆的2个一式两份) 的平均值 ($\pm$ SD)。图28C以图形方式说明了实验的结果, 在所述实验中, 人血浆: 合并的NHS (交叉)、C4-/-血浆 (空心圆圈) 和C4-/-血浆与1 μ g/ml甘露聚糖 (实心圆圈) 一起预温育。结果是三次独立实验的代表。图28D以图形方式说明了, 通过抗人MASP-2 mAbH3抑制C4充足和C4缺陷的人血浆 (1%) 中的C3b沉积 (一式三份的平均值 $\pm$ SD)。如图28B中所示, 在平行测定的MASP-2-/-血浆中并未检测到凝集素途径依赖性C3激活, 暗示C3的这种C4旁路激活路线是MASP-2依赖性的。

[0825] 为了进一步确证这些发现, 我们通过针对重组人和大鼠MASP-2A的亲筛选, 建立了从噬菌体展示抗体文库中分离的一系列重组抑制性mAb (其中活性蛋白酶结构域的丝氨酸残基通过定点诱变被丙氨酸残基替换, 以阻止抗原的自溶降解)。使用重组人和大鼠MASP-2A作为抗原 (Chen, C.B. 和Wallis, J. Biol. Chem. 276:25894-25902 (2001)), 从组合抗体文库 (Knappik, A. 等人, J. Mol. Biol. 296:57-86 (2000)) 中分离针对MASP-2的重组抗体 (AbH3和 AbM11)。有力地抑制小鼠血浆中的凝集素途径介导的C4和C3激活的抗大鼠Fab2片段 (IC₅₀~1nM) 转换为全长IgG2a抗体。在大鼠中产生多克隆抗鼠MASP-2A抗血清。这些工具允许我们确认C3的这种新型凝集素途径特异性C4旁路激活路线的MASP-2依赖性, 如下文进一步描述的。

[0826] 如图28B中所示, M211, 与小鼠和大鼠MASP-2选择性结合的抑制性单克隆抗体, 以浓度依赖性方式抑制C4缺陷小鼠中C3的C4旁路激活以及经由凝集素途径的WT小鼠血浆的C3激活, 具有相似的IC₅₀值。所有测定都在高血浆稀释度下进行, 致使旁路途径激活路线功能失调 (其中最高血浆浓度为1.25%)。

[0827] 为了调查在人中类似的C3的凝集素途径特异性C4旁路激活的存在, 我们分析了具有两种人C4基因 (即C4A和C4B) 的遗传缺陷的供体的血浆, 导致C4的完全不存在 (Yang, Y. 等人, J. Immunol. 173:2803-2814 (2004))。图28C 显示了该患者的血浆在高血浆稀释度 (致使旁路激活途径功能失调) 下有效激活C3。通过加入过量浓度的液相甘露聚糖, 在鼠C4缺陷血浆 (图28A) 和人C4缺陷血浆 (图28C) 中, 证实了在甘露聚糖包被的板上C3激活的凝集素

途径特异性模式。使用AbH3评价了人C4缺陷血浆中的这种C3激活机制的MASP-2依赖性,所述AbH3是与人MASP-2特异性结合并消除MASP-2功能活性的单克隆抗体。如图28D中所示,AbH3以可比较的效力抑制C4充足和C4缺陷的人血浆两者中的C3b(和C3dg)沉积。

[0828] 为了评价其它补体组分在C3的C4旁路激活中的可能作用,我们在凝集素途径特异性和经典途径特异性测定条件两者下,测试了MASP-1/3-/-和Bf/C2-/-小鼠的血浆连同MASP-2-/-、C4-/-和C1q-/-血浆(作为对照)。C3切割的相对量针对使用WT血浆时沉积的C3量进行标绘。

[0829] 图29A以图形方式说明了,来自各种补体缺陷小鼠品系的血浆中的C3转化酶活性的比较分析,所述血浆在凝集素激活途径或经典激活途径特异性测定条件下进行测试。WT小鼠(n=6)、MASP-2-/-小鼠(n=4)、MASP-1/3-/-小鼠(n=2)、C4-/-小鼠(n=8)、C4/MASP-1/3-/-小鼠(n=8)、Bf/C2-/(n=2)和C1q-/-小鼠(n=2)的稀释血浆样品(1%)平行进行测试。用2.5μg/ml重组大鼠C2(Bf/C2-/-+C2)重构Bf/C2-/-血浆恢复C3b沉积。结果是平均值(±SD)。**p<0.01(与WT血浆相比)。如图29A中所示,大量C3沉积在凝集素途径特异性测定条件下测试的C4-/-血浆中可见,但在经典途径特异性条件下不可见。再次,C3沉积经由凝集素途径激活路线在MASP-2缺陷的血浆中不可见,而相同的血浆经由经典途径使C3沉积。在MASP-1/3-/-血浆中,C3沉积在凝集素和经典途径特异性测定条件两者下发生。使用凝集素途径或经典途径特异性条件,C3沉积在具有C4和MASP-1/3的组合缺陷的血浆中不可见。经由凝集素途径或经由经典途径,C3沉积在C2/Bf-/-血浆中无法检测到。然而,用重组C2重构C2/Bf-/-小鼠血浆恢复了凝集素途径和经典途径两者介导的C3切割。使用C1q-/-血浆验证了测定条件。

[0830] 图29B以图形方式说明了,来自各种补体缺陷小鼠品系的血浆WT、fB-/-、C4-/-、MASP-1/3-/-和MASP-2-/-血浆中的C3转化酶活性的时间分辨动力学,所述血浆在凝集素激活途径特异性测定条件下进行测试(1%血浆,结果是三次独立实验的典型结果)。如图29B中所示,虽然C3切割在MASP-2-/-血浆中不可见,但fB-/-血浆以与WT血浆相似的动力学切割C3。凝集素途径依赖性的C3至C3b(和C3dg)转换的显著延迟在C4-/-以及MASP-1/3缺陷血浆中可见。MASP-1/3-/-血浆中的这种C3激活延迟最近显示为MASP-1,而不是MASP-3依赖性的(Takahashi,M.等人,J.Immunol.180:6132-6138(2008))。

[0831] 讨论:

[0832] 该实施例中描述的结果强烈提示了MASP-2功能活性对于在C4的存在和不存在两者下经由凝集素途径的C3激活是必需的。此外,需要C2和MASP-1,用于C3的这种新型凝集素途径特异性C4旁路激活路线起作用。在MASP-2-/-以及C4-/-血浆中的凝集素途径功能活性的比较分析揭示了先前未认识到的补体C3的C4不依赖性,但MASP-2依赖性的激活路线,并且显示了C3可以在C4的完全不存在下以凝集素途径依赖性模式被激活。虽然这种新型MASP-2依赖性C3转化酶的详细分子组成和激活事件顺序仍有待阐明,但我们的结果暗示这种C4旁路激活路线另外需要补体C2以及MASP-1的存在。具有组合的C4和MASP-1/3缺陷的小鼠血浆中凝集素途径介导的C3切割活性的丧失,可以通过最近描述的MASP-1通过MASP-2的直接切割和激活来增强MASP-2依赖性补体激活的作用来解释(Takahashi,M.等人,J.Immunol.180:6132-6138(2008))。同样地,MASP-1可以通过其切割C2的能力来帮助MASP-2功能活性(Moller-Kristensen等人,Int.Immunol.19:141-149(2007))。这两种活性

均可以解释MASP-1/3缺陷血浆通过其经由凝集素激活途径切割 C3的速率减少,以及为何可能需要MASP-1来维持经由C4旁路激活路线的 C3转换。

[0833] C2/fB-/-血浆不能经由凝集素途径激活C3显示为C2依赖性的,因为将重组大鼠C2加入C2/fB-/-血浆中恢复了重构血浆激活甘露聚糖包被的板上的C3 的能力。

[0834] C4缺陷特异性地破坏经典补体激活途径,同时凝集素途径经由MASP-2 依赖性C4旁路激活路线保留生理学临界水平的C3转化酶活性的发现,需要重新评价凝集素途径在各种疾病模型中的作用,所述疾病模型包括实验性肺炎链球菌感染(Brown,J.S.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.99:16969-16974 (2002);实验性过敏性脑脊髓炎(Boos,L.A.等人,Glia 49:158-160 (2005);以及C3依赖性鼠肝再生模型(Clark,A.等人,Mol.Immunol.45:3125-3132 (2008))。后一组证实了C4缺陷小鼠可以以旁路途径不依赖性方式激活C3,因为旁路途径通过抗体介导的因子B功能活性耗尽的体内抑制并不影响C4-/-小鼠中的C3切割依赖性肝再生(Clark,A.等人(2008))。C3的这种凝集素途径介导的C4旁路激活路线也可以解释我们的MIRI模型以及先前描述的同种异体肾移植排斥模型(Lin,T.等人,Am.J.Pathol.168:1241-1248 (2006))中C4缺陷的保护性表型的缺乏。相比之下,我们最近的结果已独立地证实了 MASP-2-/-小鼠在肾移植模型中的显著保护表型(Farrar,C.A.等人,Mol. Immunol.46:2832 (2009))。

[0835] 总之,该实施例的结果支持了以下观点:C3的MASP-2依赖性C4旁路激活是在其中C4的可用性限制C3激活的条件下可能是重要的生理相关机制。

[0836] 实施例23

[0837] 该实施例描述了在WT (+/+)、MASP-2 (-/-)、F11 (-/-)、F11/C4 (-/-) 和C4 (-/-) 小鼠中,通过凝血酶底物的C3激活和甘露聚糖上的C3沉积。

[0838] 基本原理:

[0839] 如实施例14中所述,确定了凝血酶激活可以在生理条件下的凝集素途径激活之后发生,并且证实了MASP-2涉及的程度。C3在补体系统的激活中起核心作用。C3激活是经典和旁路补体激活途径两者均需要的。进行了实验以确定C3是否被凝血酶底物激活。

[0840] 方法:

[0841] 通过凝血酶底物的C3激活

[0842] 在下述活化形式的凝血酶底物的存在下测量C3的激活;人FCX1a、人 FVIIa、牛FXa、人FXa、人活化蛋白C和人凝血酶。使C3与各种凝血酶底物一起温育,然后在还原条件下在10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上进行分离。在使用纤维素膜的电泳转移后,使膜与单克隆生物素偶联的大鼠抗小鼠C3一起温育,用链霉抗生物素蛋白-HRP试剂盒检测并使用ECL试剂显色。

[0843] 结果:

[0844] C3的激活涉及将完整的 α 链切割成截短的 α' 链和可溶性C3a(图30中未显示)。图30显示了关于通过凝血酶底物的人C3激活的蛋白质印迹分析结果,其中未切割的C3 α 链和激活产物 α' 链由箭头显示。如图30中所示,在任何补体蛋白酶的不存在下,C3与活化形式的人凝血因子XI和因子X以及活化的牛凝血因子X一起温育可以在体外切割C3。

[0845] 在甘露聚糖上的C3沉积

[0846] 对从WT、MASP-2 (-/-)、F11 (-/-)、F11 (-/-)/C4 (-/-) 和C4 (-/-) 中获得的血清样品

进行C3沉积测定。F11是编码凝血因子XI的基因。为了测量C3激活,微量滴定板用甘露聚糖(1 μ g/孔)进行包被,然后加入在TBS/tween/Ca²⁺中的绵羊抗HSA血清(2 μ g/ml)。板用0.1% HAS的TBS溶液进行封闭并如上进行洗涤。血浆样品在4mM巴比妥、145mM NaCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂, pH 7.4中进行稀释,加入板中并在37℃下温育1.5小时。在洗涤后,使用兔抗人C3c (Dako) 检测结合的C3b,随后为碱性磷酸酶缀合的山羊抗兔IgG和 pNPP。

[0847] 结果:

[0848] 图31显示了关于从WT、MASP-2(-/-)、F11(-/-)、F11(-/-)/C4(-/-)和C4(-/-)获得的血清样品的C3沉积测定结果。如图31中所示,即使在C4的完全不存在下,也存在功能性凝集素途径。如图31中进一步所示,这种新型凝集素途径依赖性补体激活需要凝血因子XI。

[0849] 讨论:

[0850] 在该实验中获得的结果之前,本领域技术人员认为补体的凝集素途径需要C4用于活性。因此,来自C4敲除小鼠(和C4缺陷的人)的数据用下述假设进行解释:此类生物是凝集素途径缺陷的(除经典途径缺陷之外)。目前的结果证实了,这个概念是错误的。因此,过去研究的结论可能是错误的,其提示了基于C4缺陷动物的表型,凝集素途径在某些疾病背景下并不重要。该实施例中描述的数据还显示了,在全血清的生理背景下,凝集素途径可以激活凝血级联的组分。因此,证实了补体和涉及MASP-2的凝血之间存在串扰。

[0851] 实施例24

[0852] 该实施例描述了评价抗MASP-2抗体对来自血液样品的红血细胞裂解的作用的方法,所述血液样品从阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)患者中获得。

[0853] 背景/基本原理:

[0854] 阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH),也称为马米二氏综合征(Marchiafava-Micheli syndrome),是一种获得性、潜在地危及生命的血液疾病,其特征不在于补体诱导的血管内溶血性贫血。PNH的标志是慢性血管内溶血,其是不受控制的补体旁路途径激活的结果。Lindorfer, M.A.等人, Blood 115(11) (2010)。PNH中的贫血是由于血流中的红血细胞的破坏。PNH的症状包括红色尿(由于尿中出现血红蛋白)和血栓形成。PNH可能自行发展,称为“原发性PNH”,或在其它骨髓病症如再生障碍性贫血的背景下发展,称为“继发性PNH”。用于PNH的治疗包括用于贫血的输血、用于血栓形成的抗凝和单克隆抗体依库珠单抗(Soliris)的使用,所述依库珠单抗通过抑制补体系统来保护血细胞免受免疫破坏(Hillmen P.等人, N.Engl. J. Med. 350(6):552-9(2004))。然而,显著部分的用依库珠单抗治疗的PNH患者出现临床上显著的免疫介导的溶血性贫血,因为该抗体并不阻断补体旁路途径的激活。

[0855] 该实施例描述了评价抗MASP-2抗体对与ABO匹配的酸化的正常人血清一起温育、来自血液样品的红血细胞裂解的作用的方法,所述血液样品从PNH患者(未用Soliris治疗)中获得。

[0856] 方法:

[0857] 试剂:

[0858] 通过静脉穿刺获得来自正常供体和患有PNH的患者(未用Soliris治疗)的红细胞,并且如在此通过引用并入本文的Wilcox, L.A.等人, Blood 78:820-829 (1991)中所述进行制备。可以如实施例10中所述生成具有凝集素途径的功能性阻断活性的抗MASP-2抗体。

[0859] 溶血分析:

[0860] 用于确定抗MASP-2抗体对阻断来自PNH患者的红细胞溶血的能力的作用的方法,使用Lindorfer,M.A.等人,Blood 15(11):2283-91(2010)和 Wilcox,L.A.等人,Blood 78:820-829(1991)中所述的方法进行,所述两篇参考文献均在此通过引用并入本文。如Lindorfer等人中所述,将来自PNH患者样品的红细胞离心,吸出血沉棕黄层,并且在每次实验前用明胶弗洛拿缓冲液(GVB)洗涤细胞。如下测试红细胞对APC介导的裂解的敏感性。ABO匹配的正常人血清用含有0.15mM CaCl_2 和0.5mM MgCl_2 的GVB(GVB^{+2})进行稀释,并且酸化至pH 6.4(酸化的NHS,aNHS),并且用于将红细胞重构为在50%aNHS中1.6%的血细胞比容。然后使混合物在37℃下温育,并且在1小时后,通过离心使红细胞形成团块。回收的上清液的等分试样的光密度在405 nm下进行测量,并且用于计算百分比裂解。在酸化的血清-EDTA中重构的样品进行类似加工,并且用于限定本底非补体介导的裂解(通常小于3%)。在使红细胞在蒸馏水中温育后确定完全裂解(100%)。

[0861] 为了确定抗MASP-2抗体对PNH红细胞溶血的作用,使来自PNH患者的红细胞在增加浓度的抗MASP-2抗体的存在下在aNHS中温育,并且随后定量溶血的存在/量。

[0862] 鉴于抗MASP-2抗体已显示阻断旁路补体途径的后续激活的事实,预计抗MASP-2抗体将有效阻断旁路途径介导的PNH红细胞溶血,并且可用作治疗患有PNH的患者的治疗剂。

[0863] 实施例25

[0864] 该实施例描述了评价抗MASP-2阻断抗体对通过血液样品中的冷球蛋白的补体激活的作用的方法,所述血液样品从患有冷球蛋白血症的患者中获得。

[0865] 背景/基本原理:

[0866] 冷球蛋白血症的特征在于血清中的冷球蛋白存在。冷球蛋白是单一或混合的免疫球蛋白(通常为IgM抗体),其在低温下经历可逆聚集。聚集导致特别是在外周中的经典途径补体激活和血管床中的炎症。冷球蛋白血症的临床表现包括血管炎和肾小球肾炎。

[0867] 冷球蛋白血症可以基于冷球蛋白组成如下进行分类:I型冷球蛋白血症或单纯性冷球蛋白血症是单克隆免疫球蛋白,通常为免疫球蛋白M(IgM)的结果;II型和III型冷球蛋白血症(混合性冷球蛋白血症)含有类风湿因子(RF),其通常为与多克隆IgG的Fc部分复合的IgM。

[0868] 与冷球蛋白血症相关的状况包括丙型肝炎感染、淋巴组织增生性病症及其它自身免疫性疾病。含有冷球蛋白的免疫复合物导致全身炎症的临床综合征,可能是由于其激活补体的能力。虽然IgG免疫复合物通常激活补体的经典途径,但含有IgM的复合物也可以经由凝集素途径激活补体(Zhang,M.等人,Mol Immunol 44(1-3):103-110(2007),以及Zhang.M.等人,J.Immunol. 177(7):4727-34(2006))。

[0869] 免疫组织化学研究已进一步证实了冷球蛋白免疫复合物含有凝集素途径的组分,并且来自冷球蛋白血症性肾小球肾炎患者的活组织检查显示了原位凝集素途径激活的免疫组织化学证据(Ohsawa,I.等人,Clin Immunol 101(1):59-66(2001))。这些结果提示了凝集素途径可能促成冷球蛋白血症疾病中的炎症和不良后果。

[0870] 方法:

[0871] 用于确定抗MASP-2抗体对阻断冷球蛋白血症的不良作用的能力的作用的方法,使用如Ng Y.C.等人,Arthritis and Rheumatism 31(1):99-107(1988)中所述的用于液相

C3转换的测定来进行,所述参考文献在此通过引用并入本文。如Ng等人中所述,在原发性混合性冷球蛋白血症(EMC)中,单克隆类风湿因子(mRF),通常为IgM,与多克隆IgG复合,以形成特征性冷沉淀免疫复合物(IC)(II型冷球蛋白)。免疫球蛋白和C3已在受累组织如皮肤、神经和肾的血管壁中得到证实。如Ng等人所述,将¹²⁵I标记的mRF加入血清(正常人血清以及从患有冷球蛋白血症的患者中获得的血清)中,在37℃下温育,并测量与红细胞的结合。

[0872] 在抗MASP-2抗体的存在或不存在下,在下述IC的存在或不存在下,在血清(正常人血清以及从患有冷球蛋白血症的患者中获得的血清)中确定液相 C3转换:BSA-抗BSA、mRF、mRF加上IgG或冷球蛋白。使用具有F(ab')₂ 抗C3和F(ab')₂抗C4的共沉淀测定,来测量C3和C4与IC的结合。

[0873] 鉴于抗MASP-2抗体已显示阻断凝集素途径的激活的事实,预计抗 MASP-2抗体将有效阻断补体介导的与冷球蛋白血症相关的不良作用,并且可用作治疗患有冷球蛋白血症的患者的治疗剂。

[0874] 实施例26

[0875] 该实施例描述了评价抗MASP-2抗体对血液样品的作用的方法,所述血液样品从患有冷凝集素病(其表现为贫血)的患者中获得。

[0876] 背景/基本原理:

[0877] 冷凝集素病(CAD)是一类自身免疫性溶血性贫血。冷凝集素抗体(通常为 IgM)被低温激活并且与红血细胞结合且使其聚集。冷凝集素抗体与补体组合,并且攻击在红血细胞的表面上的抗原。这导致红血细胞的调理作用(溶血),其触发它们通过网状内皮系统的清除。凝集在其下发生的温度从患者到患者不等。

[0878] CAD表现为贫血。当红血细胞的破坏速率超过骨髓产生足够数目的携氧细胞的能力时,则发生贫血。CAD可以由潜在疾病或病症引起,称为“继发性 CAD”,所述潜在疾病或病症例如传染病(支原体肺炎、腮腺炎、单核细胞增多症)、淋巴组织增生性疾病(淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病)或结缔组织病症。原发性CAD患者被认为患有低级别淋巴组织增生性骨髓病症。原发性和继发性CAD两者均为获得性状况。

[0879] 方法:

[0880] 试剂:

[0881] 来自正常供体和患有CAD的患者的红细胞通过静脉穿刺获得。可以如实施例10中所述生成具有凝集素途径的功能性阻断活性的抗MASP-2抗体。

[0882] 抗MASP-2抗体阻断冷凝集素介导的凝集素途径激活的效应可以如下进行确定。在抗MASP-2抗体的存在或不存在下,来自血型I阳性患者的红细胞用冷凝集素(即IgM抗体)进行致敏。然后通过测量C3结合来测试红细胞激活凝集素途径的能力。

[0883] 鉴于抗MASP-2抗体已显示阻断凝集素途径的激活的事实,预计抗 MASP-2抗体将有效阻断补体介导的与冷凝集素病相关的不良作用,并且可用作治疗患有冷凝集素病的患者的治疗剂。

[0884] 实施例27

[0885] 该实施例描述了评价抗MASP-2抗体对血液样品中的红血细胞裂解的作用的方法,所述血液样品从患有非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)的小鼠中获得。

[0886] 背景/基本原理:

[0887] 非典型溶血性尿毒症综合征 (aHUS) 的特征在于溶血性贫血、血小板减少症、以及通过肾及其它器官的微循环中的血小板血栓引起的肾衰竭。aHUS与缺陷性补体调控相关,并且可以是散发性或家族性的。aHUS与编码补体激活的基因中的突变相关,所述基因包括补体因子H、膜辅因子B和因子I、以及补体因子H相关1 (CFHR1) 和补体因子H相关3 (CFHR3)。Zipfel, P.F.等人, *PloS Genetics* 3 (3):e41 (2007)。该实施例描述了评价抗MASP-2抗体对来自血液样品的红血细胞裂解的作用的方法,所述血液样品从aHUS小鼠中获得。

[0888] 方法:

[0889] 可以在该疾病的小鼠模型中确定抗MASP-2抗体治疗aHUS的效应,其中内源性小鼠fH基因已由aHUS患者中频繁发现的编码突变形式的fH的人同源物替换。参见Pickering M.C.等人, *J. Exp. Med.* 204 (6):1249-1256 (2007), 其在此通过引用并入本文。如Pickering等人中所述,此类小鼠发展aHUS样病理状况。为了评价抗MASP-2抗体用于治疗aHUS的效应,将抗MASP-2抗体施用于突变型aHUS小鼠,并且比较了从抗MASP-2 ab治疗和未治疗的对照中获得的红血细胞的裂解。鉴于抗MASP-2抗体已显示阻断凝集素途径的激活的事实,预计抗MASP-2抗体将有效阻断患有aHUS的哺乳动物受试者中的红血细胞裂解。

[0890] 实施例28

[0891] 该实施例描述了评价抗MASP-2抗体用于治疗青光眼的的作用的方法。

[0892] 基本原理/背景:

[0893] 已显示了,不受控制的补体激活促成青光眼中的对视网膜神经节细胞 (RGC)、其突触和轴突的退行性损伤的进展。参见Tezel G.等人, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:5071-5082 (2010)。例如,人组织的组织病理学研究和不同动物模型的体内研究已证实了,在青光眼视网膜中合成了补体组分包括C1q和C3,并且形成了终末补体复合物 (参见Stasi K.等人, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1024-1029 (2006), Kuehn M.H.等人, *Exp Eye Res* 83:620-628 (2006))。如Kuehn M.H.等人, *Experimental Eye Research* 87:89-95 (2008) 中进一步描述的,补体合成和沉积由视网膜I/R诱导,并且补体级联的破坏延迟RGC变性。在这项研究中,当与正常动物相比较时,发现携带补体组分C3的靶向破坏的小鼠在瞬时视网膜I/R后显示出延迟的RGC变性。

[0894] 方法:

[0895] 用于确定抗MASP-2抗体对RGC变性的作用的方法在如Kuehn M.H.等人, *Experimental Eye Research* 87:89-95 (2008) 中所述的动物模型中进行,所述参考文献在此通过引用并入本文。如Kuehn等人中所述,视网膜缺血通过以下进行诱导:使动物麻醉,然后将连接到含有磷酸盐缓冲盐水的储库的30号针穿过角质层插入眼前房内。然后将盐水储库升高,以产生104mmHg的眼内压,其足以完全阻止通过视网膜血管系统的循环。升高的眼内缺血通过虹膜和视网膜的变白得到确认,并且缺血仅在左眼中维持45分钟;右眼充当对照并且不接受插管。然后在缺血性损伤后1或3周,对小鼠实施安乐死。将抗MASP-2抗体施用于小鼠,或局部至眼或全身,以评价在缺血性损伤之前施用的抗MASP抗体的效应。

[0896] 使用针对C1q和C3的抗体进行眼的免疫组织化学,以检测补体沉积。也可以使用标准电子显微镜检查方法来评价视神经损害。使用 γ 突触核蛋白标记执行存活的视网膜RGC的定量。

[0897] 结果:

[0898] 如Kuehn等人中所述,在正常对照小鼠中,瞬时视网膜缺血导致视神经的退行性变化、以及可通过免疫组织化学检测到的C1q和C3的视网膜沉积。相比之下,C3缺陷小鼠展示轴突变性的显著减少,在诱导后1周仅显示出轻微水平的视神经损害。基于这些结果,预计当该测定在MASP-2敲除小鼠中进行时,并且当在缺血性损伤之前将抗MASP-2抗体施用于正常小鼠时,将观察到类似的结果。

[0899] 实施例29

[0900] 该实施例证实了MASP-2抑制剂,例如抗MASP-2抗体,有效治疗辐射暴露和/或治疗、改善或预防急性放射综合征。

[0901] 基本原理:

[0902] 暴露于高剂量的电离辐射通过两种主要机制引起死亡率:对骨髓的毒性和胃肠综合征。骨髓毒性导致所有血液细胞的下降,使生物倾向于通过感染和出血的死亡。胃肠综合征更为严重,并且通过肠屏障功能的丧失驱动,所述肠屏障功能的丧失是由于肠道上皮层的分解和肠内分泌功能的丧失。这导致败血症和相关的全身炎症反应综合征,其可以导致死亡。

[0903] 补体的凝集素途径是先天免疫机制,其响应组织损伤和暴露于外来表面(即细菌)而引发炎症。该途径的阻断导致在缺血性肠组织损伤或败血性休克的小鼠模型中的更好结果。假定凝集素途径可能响应辐射诱导的组织损伤而触发过度 and 有害的炎症。因此,凝集素途径的阻断可以减少在急性辐射暴露之后的继发性损伤,并且增加存活。

[0904] 如该实施例中所述进行的研究的目的是通过施用抗鼠MASP-2抗体,来评价凝集素途径阻断对辐射损伤的小鼠模型中存活的作用。

[0905] 方法和材料:

[0906] 材料。这项研究中使用的测试物品是(i)高亲和力抗鼠MASP-2抗体(mAbM11)和(ii)高亲和力抗人MASP-2抗体(mAbH6),其阻断在转染的哺乳动物细胞中产生的凝集素补体途径的MASP-2蛋白质组分。给药浓度为1mg/kg 抗鼠MASP-2抗体(mAbM11)、5mg/kg抗人MASP-2抗体(mAbH6)或无菌盐水。对于每个给药阶段,制备足够体积的新鲜给药溶液。

[0907] 动物。年幼的成年雄性Swiss-Webster小鼠得自Harlan Laboratories (Houston, TX)。动物饲养在具有Alpha-Dri垫料的实心底部笼中,并且提供经检验的PMI 5002 Rodent Diet (Animal Specialties, Inc., Hubbard OR) 和无限量的水。监测温度,并且动物饲养室以12小时光照/12小时黑暗的光循环运行。

[0908] 照射。在设施中的2周适应后,使用配备320-kV高稳定性X射线发生器、金属陶瓷X射线管、可变X射线束准直器和滤光片的Therapax X-RAD 320 系统(Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT),以0.78Gy/分钟的给药速率,在具有10只的组中,通过全身暴露以6.5和7.0Gy对小鼠进行照射。基于对相同小鼠品系进行的先前研究来选择剂量水平,所述先前研究指示了LD₅₀/30在6.5和7.0Gy之间(数据未显示)。

[0909] 药物制剂和施用。根据方案,用冰冷的盐水稀释适当体积的浓缩储备溶液,以制备0.2mg/ml抗鼠MASP-2抗体(mAbM11)或0.5mg/ml抗人MASP-2抗体(mAbH6)的给药溶液。抗MASP-2抗体mAbM11和mAbH6的施用基于动物重量使用25号针经由IP注射,以递送1mg/kgm AbM11、5mg/kgm AbH6 或盐水媒介物。

[0910] 研究设计。将小鼠随机分配到如表8中所述的组。每天测量且记录体重和温度。在

照射后第7天处死第7、11和13组中的小鼠,并且在深度麻醉下通过心脏穿刺收集血液。以相同方式处死在照射后第30天的存活动物并收集血液。根据方案从收集的血液样品制备血浆并返回发起人用于分析。

[0911] 表8:研究组

组 ID	N	照射水平(Gy)	治疗	剂量时间表
1	20	6.5	媒介物	在照射前 18 小时, 在照射后 2 小时, 每周加强一次
2	20	6.5	抗鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	仅在照射前 18 小时
3	20	6.5	抗鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	在照射前 18 小时, 在照射后 2 小时, 每周加强一次
4	20	6.5	抗鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	在照射后 2 小时, 每周加强一次
5	20	6.5	抗人 MASP-2 ab (mAbH6)	在照射前 18 小时, 在照射后 2 小时, 每周加强一次

组 ID	N	照射水平(Gy)	治疗	剂量时间表
6	20	7.0	媒介物	在照射前 18 小时, 在照射后 2 小时, 每周加强一次
7	5	7.0	媒介物	仅在照射后 2 小时
8	20	7.0	抗鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	仅在照射前 18 小时
9	20	7.0	抗鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	在照射前 18 小时, 在照射后 2 小时, 每周加强一次
10	20	7.0	抗鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	在照射后 2 小时, 每周加强一次
11	5	7.0	抗鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	仅在照射后 2 小时
12	20	7.0	抗人 MASP-2 ab (mAbH6)	在照射前 18 小时, 在照射后 2 小时, 每周加强一次
13	5	无	无	无

[0914] 统计分析。生成Kaplan-Meier存活曲线,并且使用时序和威尔科克森 (Wilcoxon) 方法用于比较治疗组之间的平均存活时间。报告了具有标准差的均值或具有平均值的标准误的平均值。使用受控照射动物和个别治疗组之间的双尾非配对t检验进行统计比较。

[0915] 结果

[0916] 关于7.0和6.5Gy暴露组的Kaplan-Meier存活图分别在图32A和32B中提供,并且在表9中概括。总体而言,在6.5 (20%增加) 和7.0Gy (30%增加) 的暴露水平两者下,与媒介物治疗的受照射的对照动物相比,照射前用抗鼠 MASP-2ab (mAbM11) 的治疗增加了受照射小鼠的存活。在6.5Gy暴露水平下,与媒介物对照受照射动物相比,用抗鼠MASP-2ab的照射

后治疗导致存活的适度增加(15%)。

[0917] 相比之下,与媒介物治疗的受照射的对照动物相比,在7.0Gy暴露水平下的所有治疗的动物都显示了存活的增加。存活的最大变化在接受mAbH6的动物中发生,具有与对照动物相比的45%增加。进一步地,在7.0Gy暴露水平下,与媒介物治疗的受照射的对照动物在照射后的第8天相比,mAbH6治疗组中的死亡率首先在照射后的第15天发生,超过对照动物的7天增加。在7.0Gy暴露水平下,与对照动物(20.7 ± 2.0 天)相比,关于接受mAbH6小鼠的平均死亡率时间(27.3 ± 1.3 天)是显著增加的($p=0.0087$)。

[0918] 在研究自始至终记录了与照射前一天(第-1天)相比的体重的百分比变化。瞬时的重量减轻在所有受照射的动物中发生,与对照相比,没有由于mAbM11或mAbH6治疗的差异变化的证据(数据未显示)。在研究终止时,所有存活的动物都显示了距离起始(第-1天)体重的体重增加。

[0919] 表9:暴露于辐射的测试动物的存活率

测试组	暴露水平	存活(%)	死亡的时间(平均值 $\pm$ SEM, 天)	首例/末例死亡(天)
对照照射	6.5 Gy	65 %	24.0 ± 2.0	9/16
暴露前mAbM11	6.5 Gy	85 %	27.7 ± 1.5	13/17
暴露前 + 暴露后mAbM11	6.5 Gy	65 %	24.0 ± 2.0	9/15
暴露后mAbM11	6.5 Gy	80 %	26.3 ± 1.9	9/13
[0920] 暴露前+ 暴露后mAbH6	6.5 Gy	65 %	24.6 ± 1.9	9/19
对照照射	7.0 Gy	35 %	20.7 ± 2.0	8/17
暴露前mAbM11	7.0 Gy	65 %	23.0 ± 2.3	7/13
暴露前 + 暴露后mAbM11	7.0 Gy	55 %	21.6 ± 2.2	7/16
暴露后mAbM11	7.0 Gy	70 %	24.3 ± 2.1	9/14
暴露前 + 暴露后mAbH6	7.0 Gy	80 %	$27.3 \pm 1.3^*$	15/20

[0921] * $p=0.0087$,通过在相同照射暴露水平下,在对照受照射动物和治疗组之间的双尾非配对t检验。

[0922] 讨论

[0923] 急性放射综合征由三种限定的亚综合征组成:造血系统、胃肠道和脑血管。观察到的综合征取决于辐射剂量,其中用超过1Gy的显著部分或全身辐射暴露在人中观察到造血系统效应。造血系统综合征的特征在于骨髓功能的严重阻遏,导致全血细胞减少症,具有与对免疫系统的损害伴随发生的血细胞计数、红血细胞和白血细胞以及血小板的变化。当出现最低点时,伴随外周血中存在的少数嗜中性粒细胞和血小板,嗜中性粒细胞减少症、发热、败血症并发症和不受控制的出血导致死亡。

[0924] 在本研究中,发现mAbH6的施用增加以7.0Gy照射的Swiss-Webster雄性小鼠中的全身X射线照射的存活率。值得注意的是,在7.0Gy暴露水平下,与媒介物治疗的对照受照射动物的35%相比,接受mAbH6的80%动物存活至30天。重要的是,该治疗组中的死亡第一天直到照射后第15天才出现,超过媒介物治疗的对照受照射动物中观察到的7天增加。奇怪的

是,在较低的X射线暴露 (6.5Gy) 下,与媒介物治疗的对照受照射动物相比,mAbH6的施用似乎并不影响存活率或死亡率的延迟。关于暴露水平之间的这种应答差异可能存在多种原因,尽管任何假设的验证可能需要另外的研究,包括用于微生物培养和血液学参数的临时样品收集。一种解释可能仅仅是分配到组的动物数目可能已排除了任何细微的治疗有关的差异。例如,对于n=20的组大小,在65% (在 6.5Gy暴露下的mAbH6) 和80% (在7.0Gy暴露下的mAbH6) 之间的存活差异为 3只动物。另一方面,在35% (在7.0Gy暴露下的媒介物对照) 和80% (在7.0Gy 暴露下的mAbH6) 之间的差异为9只动物,并且提供了治疗有关差异的合理证据。

[0925] 这些结果证实了抗MASP-2抗体有效治疗处于急性放射综合征的风险中、或经受急性放射综合征的有害效应的哺乳动物受试者。

[0926] 实施例30

[0927] 该实施例证实了,在由脑膜炎奈瑟球菌血清群A或脑膜炎奈瑟球菌血清群 B感染后,MASP-2缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌诱导的死亡率。

[0928] 方法:

[0929] 如实施例1中所述生成MASP-2敲除小鼠 (MASP-2 KO小鼠)。通过用在100 μ l体积中的 2.6×10^7 CFU脑膜炎奈瑟球菌血清群A Z2491的剂量的腹膜内 (i.p.) 注射,来接种10周龄的MASP-2 KO小鼠 (n=10) 和野生型 (WT) C57/BL6小鼠 (n=10)。将感染剂量与最终浓度为400mg/kg的葡聚糖铁结合施用于小鼠。在 72小时的时间段内监测感染后小鼠的存活。

[0930] 在分开的实验中,通过用在100 μ l体积中的 6×10^6 CFU脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的剂量的i.p.注射,来接种10周龄的MASP-2 KO小鼠 (n=10) 和野生型C57/BL6小鼠 (n=10)。将感染剂量与最终剂量为400mg/kg的葡聚糖铁结合施用于小鼠。在72小时的时间段内监测感染后小鼠的存活。基于下表10中描述的疾病评分参数,还确定了WT和MASP-2 KO小鼠在感染后的72小时时间段过程中的疾病评分,所述疾病评分参数基于Fransen等人 (2010) 的方案,伴随略微修改。

[0931] 表10:与受感染小鼠中的临床体征相关的疾病评分

[0932]

体征	评分
正常	0
轻微立毛	1
立毛,缓慢而粘滞的眼	2
立毛,昏睡且闭眼	3
病得很重且在刺激后没有运动	4
死亡	5

[0933] 在感染后以一小时间隔从小鼠中获取血液样品并分析,以确定脑膜炎奈瑟球菌的血清水平 (log cfu/mL),以便验证感染并确定细菌从血清中的清除率。

[0934] 结果:

[0935] 图33是Kaplan-Meyer图,其以图形方式说明了,在施用 2.6×10^7 cfu脑膜炎奈瑟球菌血清群A Z2491的感染剂量后,MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活。如图33中所示,100%的MASP-2 KO小鼠在感染后的72小时时期自始至终存活。相比之下,仅80%的WT小鼠 (p=0.012) 在感染后24小时仍活着,并且仅50%的WT小鼠在感染后72小时仍活着。这些结

果证实了MASP-2 缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌血清群A Z2491诱导的死亡率。

[0936] 图34是Kaplan-Meyer图,其以图形方式说明了,在施用 6×10^6 cfu脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的感染剂量后,MASP-2 KO和WT小鼠的百分比存活。如图34中所示,90%的MASP-2 KO小鼠在感染后的72小时时期自始至终存活。相比之下,仅20%的WT小鼠 ($p=0.0022$) 在感染后24小时仍活着。这些结果证实了MASP-2缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌血清群B 菌株MC58诱导的死亡率。

[0937] 图35以图形方式说明了,在由 6×10^6 cfu脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株 MC58的i.p.感染后,在从MASP-2 KO和WT小鼠获取的血液样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的log cfu/mL(对于两组小鼠在不同时间点 $n=3$)。结果表示为平均值 $\pm$ SEM。如图35中所示,在WT 小鼠中,血液中的脑膜炎奈瑟球菌水平在感染后24小时达到约 $6.0 \log$ cfu/mL 的峰值,并且到感染后36小时降至约 $4.0 \log$ cfu/mL。相比之下,在MASP-2 KO小鼠中,脑膜炎奈瑟球菌水平在感染后12小时达到约 $4.0 \log$ cfu/mL的峰值,并且到感染后36小时降至约 $1.0 \log$ cfu/mL(符号"*"指示了 $p<0.05$;符号"**"指示了 $p=0.0043$)。这些结果证实了尽管MASP-2 KO小鼠用与WT小鼠相同剂量的脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58进行感染,MASP-2 KO小鼠仍具有与WT相比增强的菌血症清除率。

[0938] 图36以图形方式说明了,在由 6×10^6 cfu脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株 MC58感染后的3、6、12和24小时,MASP-2 KO和WT小鼠的平均疾病评分。如图36中所示,与WT小鼠相比,MASP-2缺陷小鼠显示对感染的高抗性,具有在感染后的6小时(符号"*"指示了 $p=0.0411$)、12小时(符号"**"指示了 $p=0.0049$)和24小时(符号 "***"指示了 $p=0.0049$)低得多的疾病评分。图36 中的结果表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0939] 总之,该实施例中的结果证实了,在由脑膜炎奈瑟球菌血清群A或脑膜炎奈瑟球菌血清群B感染后,MASP-2缺陷小鼠受保护免于脑膜炎奈瑟球菌诱导的死亡率。

[0940] 实施例31

[0941] 该实施例证实了在由脑膜炎奈瑟球菌感染后施用抗MASP-2抗体增加了由脑膜炎奈瑟球菌感染的小鼠的存活。

[0942] 背景/基本原理:

[0943] 如实施例10中所述,大鼠MASP-2蛋白用于淘选Fab噬菌体展示文库,从其中将Fab2#11鉴定为功能活性抗体。大鼠IgG2c和小鼠IgG2a同种型的全长抗体由Fab2#11生成。小鼠IgG2a同种型的全长抗MASP-2抗体就药效学参数进行表征(如实施例19中所述)。

[0944] 在该实施例中,在脑膜炎奈瑟球菌感染的小鼠模型中分析了衍生自Fab2 #11的小鼠抗MASP-2全长抗体。

[0945] 方法:

[0946] 如下在脑膜炎奈瑟球菌感染的小鼠模型中测试如上所述生成的衍生自Fab2#11的小鼠IgG2a全长抗MASP-2抗体同种型。

[0947] 在感染后施用小鼠抗MASP-2单克隆抗体(MoAb)

[0948] 在用高剂量(4×10^6 cfu)的脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的i.p.注射后3小时,用抑制性小鼠抗MASP-2抗体(1.0mg/kg) ($n=12$) 或对照同种型抗体 ($n=10$) 治疗9周龄的C57/BL6 Charles River小鼠。

[0949] 结果:

[0950] 图37是Kaplan-Meyer图,其以图形方式说明了,在施用 4×10^6 cfu脑膜炎奈瑟球菌血清群B菌株MC58的感染剂量,随后为感染后3小时施用抑制性抗MASP-2抗体(1.0mg/kg)或对照同种型抗体之后小鼠的百分比存活。如图 37中所示,90%用抗MASP-2抗体治疗的小鼠在感染后的72小时时期自始至终存活。相比之下,仅50%用同种型对照抗体治疗的小鼠在感染后的72小时时期自始至终存活。符号"*"指示了 $p=0.0301$,如通过两条存活曲线的比较确定的。

[0951] 这些结果证实了抗MASP-2抗体的施用有效治疗由脑膜炎奈瑟球菌感染的受试者且改善所述受试者的存活。

[0952] 如本文证实的,当在感染后3小时内施用时,抗MASP-2抗体在治疗由脑膜炎奈瑟球菌感染的受试者中的使用是有效的,并且预计在感染后24小时至48小时内是有效的。脑膜炎球菌病(脑膜炎球菌血症或脑膜炎)是医疗急症,并且如果怀疑脑膜炎球菌病(即在脑膜炎奈瑟球菌被阳性鉴定为致病因子之前),则通常立即启动治疗。

[0953] 鉴于实施例30中证实的MASP-2 KO小鼠中的结果,认为在由脑膜炎奈瑟球菌感染之前施用抗MASP-2抗体也将有效预防或改善感染的严重性。

[0954] 实施例32

[0955] 该实施例证实了抗MASP-2抗体的施用有效治疗人血清中的脑膜炎奈瑟球菌感染。

[0956] 基本原理:

[0957] 具有功能性MBL的血清水平降低的患者展示对复发性细菌和真菌感染的易感性增加(Kilpatrick等人,Biochim Biophys Acta 1572:401-413(2002))。已知脑膜炎奈瑟球菌由MBL识别,并且已显示MBL缺陷血清并不使奈瑟球菌属裂解。

[0958] 鉴于实施例30和31中描述的结果,进行了一系列实验,以确定在补体缺陷血清和对照人血清中施用抗MASP-2抗体来治疗脑膜炎奈瑟球菌感染的功效。实验在高浓度的血清(20%)中进行,以便保存补体途径。

[0959] 方法:

[0960] 1. 各种补体缺陷的人血清和用人抗MASP-2抗体处理的人血清中的血清杀菌活性

[0961] 在该实验中使用了下述补体缺陷的人血清和对照人血清:

[0962] 表11:测试的人血清样品(如图38中所示)

[0963]

样品	血清类型
A	正常人血清(NHS)+人抗MASP-2 Ab
B	NHS+同种型对照Ab
C	MBL ^{-/-} 人血清
D	NHS
E	热灭活的(HI)NHS

[0964] 使用重组人MASP-2A作为抗原(Chen,C.B.和Wallis,J.Biol.Chem. 276:25894-25902(2001)),从组合抗体文库(Knappik,A.等人,J.Mol.Biol. 296:57-86(2000))中分离针对人MASP-2的重组抗体。鉴定了抗人scFv片段,并将其转换为全长人IgG4抗体,所述抗人scFv片段有力地抑制人血浆中的凝集素途径介导的C4和C3激活(IC₅₀~20nM)。

[0965] 脑膜炎奈瑟球菌血清群B-MC58与表11中所示的不同血清一起在37℃下伴随振荡进行温育,所述血清各自以20%的血清浓度,伴随或不伴随抑制性人抗MASP-2抗体(100μl

总体积中的3 μ g)的添加。在下述时间点获取样品：0分钟、30分钟、60分钟和90分钟间隔，铺平板，然后确定活菌计数。热灭活的人血清用作阴性对照。

[0966] 结果：

[0967] 图38以图形方式说明了，在表11中所示的入血清样品中，在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌血清群B-MC58的活菌计数的log cfu/mL。表12提供了关于图38的斯氏t检验结果。

[0968] 表12：关于图38的斯氏t检验结果(时间点60分钟)

[0969]

	平均值差异 (Log)	是否显著?P<0.05?	P值概括
A相对于B	-0.3678	是	*** (0.0002)
A相对于C	-1.1053	是	*** (p<0.0001)
A相对于D	-0.2111	是	** (0.0012)
C相对于D	1.9	是	*** (p<0.0001)

[0970] 如图38和表12中所示，人20%血清中的脑膜炎奈瑟球菌的补体依赖性杀死通过添加人抗MASP-2抑制性抗体得到显著增强。

[0971] 2. 在20% (v/v) MASP-2缺陷的小鼠血清中，脑膜炎奈瑟球菌的补体依赖性杀死。

[0972] 在该实验中使用下述补体缺陷的小鼠血清和对照小鼠血清：

[0973] 表13：测试的小鼠血清样品(如图39中所示)

[0974]

样品	血清类型
A	WT
B	MASP-2-/-
C	MBL A/C-/-
D	WT热灭活的 (HIS)

[0975] 脑膜炎奈瑟球菌血清群B-MC58与不同的补体缺陷的小鼠血清一起在 37℃下伴随振荡进行温育，所述血清各自以20%的血清浓度。在下述时间点获取样品：0分钟、15分钟、30分钟、60分钟、90分钟和120分钟间隔，铺平板，然后确定活菌计数。热灭活的人血清用作阴性对照。

[0976] 结果：

[0977] 图39以图形方式说明了，在表13中所示的小鼠血清样品中，在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟球菌血清群B-MC58的活菌计数的log cfu/mL。如图 39中所示，与WT小鼠血清相比，MASP-2-/-小鼠血清对于脑膜炎奈瑟球菌具有更高水平的杀菌活性。符号“**”指示了p=0.0058，符号“***”指示了 p=0.001。表14提供了关于图39的斯氏t检验结果。

[0978] 表14：关于图39的斯氏t检验结果

[0979]

比较	时间点	平均值差异 (LOG)	是否显著? (p<0.05)?	P值概括
A 相对于 B	60 分钟	0.39	是	** (0.0058)
A 相对于 B	90 分钟	0.6741	是	*** (0.001)

[0980] 总之，该实施例中的结果证实了与WT血清相比，MASP-2-/-血清对于脑膜炎奈瑟球菌具有更高水平的杀菌活性。

[0981] 实施例33

[0982] 该实施例证实了MASP-2缺陷对来自血液样品的红血细胞裂解的抑制作用,所述血液样品从阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH)的小鼠模型中获得。

[0983] 背景/基本原理:

[0984] 阵发性睡眠性血红蛋白尿症(PNH),也称为马米二氏综合征,是一种获得性、潜在地危及生命的血液疾病,其特征在于补体诱导的血管内溶血性贫血。PNH的标志是慢性补体介导的血管内溶血,其是由于PNH红细胞上的补体调节因子CD55和CD59缺乏,不受控制的补体旁路途径激活的结果,伴随后续血红蛋白尿症和贫血。Lindorfer, M.A.等人, Blood 115(11) (2010), Risitano, A.M, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11:528-535 (2011)。PNH中的贫血是由于血流中的红血细胞的破坏。PNH的症状包括红色尿(由于尿中出现血红蛋白)、背痛、疲劳、呼吸急促和血栓形成。PNH可能自行发展,称为“原发性PNH”,或在其它骨髓病症如再生障碍性贫血的背景下发展,称为“继发性PNH”。用于PNH的治疗包括用于贫血的输血、用于血栓形成的抗凝和单克隆抗体依库珠单抗(**Soliris®**)的使用,所述依库珠单抗通过抑制补体系统来保护血细胞免受免疫破坏(Hillmen P.等人, N.Engl. J. Med. 350 (6):552-9 (2004))。依库珠单抗(**Soliris®**)是人源化单克隆抗体,其靶向补体组分C5,阻断其通过C5转化酶的切割,从而阻止C5a的产生和MAC的组装。用依库珠单抗治疗PNH患者已导致血管内溶血的减少,如通过乳酸脱氢酶(LDH)测量的,导致约一半患者中的血红蛋白稳定和输血不依赖性(Hillmen P.等人, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 第11(6)卷(2011))。虽然经历用依库珠单抗的治疗的几乎所有患者都达到正常或几乎正常的LDH水平(由于血管内溶血的控制),但仅约三分之一的患者达到高于11gr/dL的血红蛋白值,并且使用依库珠单抗的剩余患者继续显示出以约相等比例的中度至重度(即输血依赖性)贫血(Risitano A.M.等人, Blood 113:4094-100 (2009))。如Risitano等人, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11:528-535 (2011)中所述,证实了使用依库珠单抗的PNH患者含有与其PNH红细胞的显著部分结合的C3片段(而未治疗的患者则不是),导致膜结合的C3片段在PNH红细胞上作为调理素起作用的结论,导致其通过特异性C3受体诱陷在网状内皮细胞中以及后续血管外溶血。因此,对于发展C3片段介导的血管外溶血的那些患者,需要除使用依库珠单抗之外的治疗策略,因为他们继续需要红血细胞输注。

[0985] 该实施例描述了评价MASP-2缺陷的血清以及用MASP-2抑制剂处理的血清对来自从PNH的小鼠模型获得的血液样品的红血细胞裂解的作用的方法,并且证实了MASP-2抑制治疗患有PNH的受试者的功效,并且还支持使用MASP-2抑制剂来改善PNH受试者中的C3片段介导的血管外溶血的效应,所述PNH受试者经历用C5抑制剂如依库珠单抗的治疗。

[0986] 方法:

[0987] PNH动物模型:

[0988] 血液样品得自具有Crry和C3缺陷(Crry/C3-/-)的基因靶向小鼠和CD55/CD59缺陷小鼠。这些小鼠缺少分别的表面补体调节剂,并且因此它们的红细胞易受自发补体自溶的影响,如PNH人血细胞一样。

[0989] 为了使这些红细胞更加敏感,这些细胞伴随和不伴随通过甘露聚糖的包被使用,然后在WT C56/BL6血浆、MBL无效血浆、MASP-2-/-血浆、人NHS、人MBL-/-血浆和用人抗MASP-2抗体处理的NHS中测试溶血。

[0990] 1.MASP-2缺陷/耗尽的血清和对照中的Crry/C3和CD55/CD59双重缺陷鼠红细胞的溶血测定

[0991] 第1天.鼠RBC(±甘露聚糖包被)的制备

[0992] 包括的材料:新鲜小鼠血液、BBS/Mg²⁺/Ca²⁺ (4.4mM巴比妥酸、1.8mM 巴比妥钠、145mM NaCl pH 7.4、5mM Mg²⁺、5mM Ca²⁺)、氯化铬、CrCl₃·6H₂O (在BBS/Mg²⁺/Ca²⁺中的0.5mg/mL)和甘露聚糖,在BBS/Mg²⁺/Ca²⁺中的100 μg/mL。

[0993] 全血(2mL)在4℃下在冷冻离心机中以2000xg向下旋转1-2分钟。将血浆和血沉棕黄层吸出。然后通过将RBC团块重悬浮于2mL冰冷的BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺中,并重复离心步骤,将样品洗涤3次。在第三次洗涤后,将团块重悬浮于4mL BBS/Mg²⁺/Ca²⁺中。将2mL的RBC等分试样留作未包被的对照。向剩余的2mL中加入2mL CrCl₃和2mL甘露聚糖,并且使样品在室温下伴随轻轻混合温育5分钟。通过添加7.5mL BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺来终止反应。样品如上进行向下旋转,重悬浮于2mL BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺中,并且如上再洗涤两次,然后贮存于4℃下。

[0994] 第2天.溶血测定

[0995] 材料包括BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺ (如上),测试血清,96孔圆底和平底板以及在410-414nm处读取96孔板的分光光度计。

[0996] 首先确定RBC的浓度,并且将细胞调整至10⁹/mL,并且以该浓度贮存。在使用前,将测定缓冲液稀释至10⁸/mL,然后使用100μl/孔。在410-414nm处测量溶血(允许比541nm更高的灵敏度)。在冰冷的BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺中制备测试血清的稀释物。将100μl的每种血清稀释物移液到圆底板内(参见板布局)。加入100μl适当稀释的RBC制剂(即,10⁸/mL)(参见板布局),在37℃下温育约1小时,并且观察裂解。(此时可以对板拍照。)然后将板以最大速度向下旋转5分钟。吸出100μl液相,转移至平底板,并且在410-414nm处记录OD。将RBC团块保留(这些随后可以用水裂解,以获得相反的结果)。

[0997] 实验#1:

[0998] 从CD55/CD59双重缺陷小鼠中获得新鲜血液,并且如上文方案中详细描述地制备Crry/C3双重缺陷小鼠的血液和红细胞。将细胞拆分,并且一半细胞用甘露聚糖进行包被,而另一半不予处理,将最终浓度调整为1x 10⁸/mL,其中100μl用于如上所述进行的溶血测定中。

[0999] 实验#1的结果:凝集素途径涉及PNH动物模型中的红细胞裂解

[1000] 在最初的实验中,确定了未包被的WT小鼠红细胞在任何小鼠血清中都不裂解。进一步确定了,甘露聚糖包被的Crry^{-/-}小鼠红细胞在WT小鼠血清中缓慢裂解(在37度下多于3小时),但它们在MBL无效血清中并不裂解。(数据未显示)。

[1001] 确定了甘露聚糖包被的Crry^{-/-}小鼠红细胞在人血清中快速裂解,但在热灭活的NHS中不裂解。重要的是,甘露聚糖包被的Crry^{-/-}小鼠红细胞在稀释至1/640的NHS中裂解(即,1/40、1/80、1/160、1/320和1/640稀释度全都裂解)。(数据未显示)。在这种稀释中,旁路途径不起作用(AP功能活性显著减少至低于8%-血清浓度)。

[1002] 来自实验#1的结论

[1003] 甘露聚糖包被的Crry^{-/-}小鼠红细胞在具有MBL的高度稀释的人血清中非常良好地裂解,但在不含MBL的血清中不裂解。在测试的每一个血清浓度中的有效裂解暗示对于这

种裂解不涉及或不需要旁路途径。MBL缺陷的小鼠血清和人血清不能裂解甘露聚糖包被的Crry-/-小鼠红细胞,指示了经典途径也与观察到的裂解无关。由于需要凝集素途径识别分子(即,MBL),因此这种裂解由凝集素途径介导。

[1004] 实验#2:

[1005] 从Crry/C3和CD55/CD59双重缺陷小鼠中获得新鲜血液,并且在下述人血清的存在下,在如上所述的溶血测定中分析甘露聚糖包被的Crry-/-小鼠红细胞:MBL无效;WT;用人抗MASP-2抗体预处理的NHS;以及作为对照的热灭活的NHS。

[1006] 实验#2的结果:MASP-2抑制剂阻止PNH动物模型中的红细胞裂解

[1007] 具有甘露聚糖包被的Crry-/-小鼠红细胞,NHS在稀释至1/640(即,1/40、1/80、1/160、1/320和1/640)的稀释物、人MBL-/-血清、用抗MASP-2 mAb 预处理的NHS和作为对照的热灭活的NHS中进行温育。

[1008] 将ELISA微量滴定板向下旋转,并且在圆孔板的底部上收集未裂解的红细胞。收集每个孔的上清液,并且通过在ELISA阅读器中读取OD415nm来测量从裂解的红细胞中释放的血红蛋白量。

[1009] 如预计的,在对照热灭活的NHS(阴性对照)中,没有观察到裂解。MBL-/-人血清在1/8和1/16稀释度下裂解甘露聚糖包被的小鼠红细胞。抗MASP-2 抗体预处理的NHS在1/8和1/16稀释度下裂解甘露聚糖包被的小鼠红细胞,而WT人血清降至1/32的稀释度裂解甘露聚糖包被的小鼠红细胞。

[1010] 图40以图形方式说明了,在来自热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、用抗 MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的血清中,在一系列的血清浓度下,甘露聚糖包被的鼠红细胞通过人血清的溶血(如通过光度测定法测量的,通过裂解的小鼠红细胞(Crry/C3-/-)释放到上清液内的血红蛋白测量的)。

[1011] 根据图40中所示的结果,证实了用抗MASP-2抗体的MASP-2抑制显著转变了 CH_{50} ,并且抑制了补体介导的致敏红细胞裂解,具有免于自体补体激活的缺陷性保护。

[1012] 实验#3

[1013] 在下述血清的存在下,在如上所述的溶血测定中,分析在未包被的Crry-/-小鼠红细胞中,从Crry/C3和CD55/CD59双重缺陷小鼠中获得的新鲜血液: MBL-/-;WT血清;用人抗MASP-2抗体预处理的NHS;以及作为对照的热灭活的NHS。

[1014] 结果:

[1015] 图41以图形方式说明了,在来自热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、用抗 MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的血清中,在一系列的血清浓度下,未包被的鼠红细胞通过人血清的溶血(如通过光度测定法测量的,通过裂解的 WT小鼠红细胞释放到上清液内的血红蛋白测量的)。如图41中所示,证实了抑制MASP-2抑制了补体介导的未致敏WT小鼠红细胞的裂解。

[1016] 图42以图形方式说明了,在来自热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、用抗 MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的血清中,在一系列的血清浓度下,未包被的鼠红细胞通过人血清的溶血(如通过光度测定法测量的,通过裂解的小鼠红细胞(CD55/59-/-)释放到上清液内的血红蛋白测量的)。

[1017] 表12:表示为血清浓度的 CH_{50} 值

[1018]	血清	WT	CD55/59 -/-
	热灭活的 NHS	无裂解	无裂解
	MBL AO/XX 供体 (MBL 缺陷的)	7.2%	2.1%
	NHS + 抗 MASP-2 抗体	5.4%	1.5%
	NHS	3.1%	0.73%

[1019] 注：“CH₅₀”是在其下补体介导的溶血达到50%的点。

[1020] 总之，该实施例中的结果证实了，抑制MASP-2抑制了补体介导的致敏红细胞和未致敏红细胞的裂解，具有免于自体补体激活的缺陷性保护。因此，MASP-2抑制剂可以用于治疗患有PNH的受试者，并且还可以用于改善（即，抑制、预防或减轻其严重性）PNH患者中的血管外溶血，所述PNH患者经历用C5抑制剂如依库珠单抗(**Soliris®**)的治疗。

[1021] 实施例34

[1022] 该实施例描述了上文实施例29中所述的研究的后续研究，提供了确认 MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体有效治疗辐射暴露和/或治疗、改善或预防急性放射综合征的进一步证据。

[1023] 基本原理：在实施例29中所述的初始研究中，证实了在6.5Gy和7.0Gy 暴露水平两者下，与媒介物治疗的受照射的对照动物相比，在小鼠中用抗 MASP-2抗体的照射前治疗增加了受照射小鼠的存活。在实施例29中进一步证实了，在6.5Gy暴露水平下，与媒介物对照受照射的动物相比，用抗MASP-2 抗体的照射后治疗导致适度的存活增加。该实施例描述了进行的第二次辐射研究，以确认第一次研究的结果。

[1024] 方法：

[1025] 研究A的设计：

[1026] 使Swiss Webster小鼠 (n=50) 暴露于电离辐射 (8.0Gy)。评价了在辐射暴露前18小时和辐射暴露后2小时以及其后每周一次施用的抗MASP-2抗体疗法 (mAbH6 5mg/kg) 对死亡率的作用。

[1027] 研究A的结果：

[1028] 如图43中所示，确定了抗MASP-2抗体mAbH6的施用增加了暴露于8.0 Gy的小鼠中的存活，与接受媒介物对照的小鼠相比，其调整的中值存活率从 4天增加到6天，并且当与接受媒介物对照的小鼠相比较时，死亡率减少了 12% (时序检验，p=0.040)。

[1029] 研究B的设计：

[1030] Swiss Webster小鼠 (n=50) 在下述组中暴露于电离辐射 (8.0Gy)：(I：媒介物) 盐水对照；(II：低) 在照射前18小时和照射后2小时施用的抗MASP-2抗体mAbH6 (5mg/kg)；(III：高) 在照射前18小时和照射后2小时施用的mAbH6 (10mg/kg)；(IV：后高) 仅在照射后2小时施用的mAbH6 (10mg/kg)。

[1031] 研究B的结果：

[1032] 与接受媒介物对照的动物相比，照射前和照射后的抗MASP-2抗体施用将平均存活从4天调整到5天。与媒介物对照小鼠相比，抗MASP-2抗体治疗的小鼠中的死亡率减少了6-12%。进一步注意到，并未观察到显著有害的治疗效应 (数据未显示)。

[1033] 总之，该实施例中显示的结果与实施例29中显示的结果一致，并且进一步证实了

抗MASP-2抗体有效治疗处于急性放射综合征的风险中、或经受急性放射综合征的有害效应的哺乳动物受试者。

[1034] 实施例35

[1035] 这项研究调查了MASP-2缺陷在LPS (脂多糖) 诱导的血栓形成的小鼠模型中的效应。

[1036] 基本原理:

[1037] 由产志贺毒素大肠杆菌感染引起的溶血性尿毒症综合征 (HUS) 是儿童中的急性肾衰竭的主要原因。在该实施例中,在MASP-2^{-/-} (KO) 小鼠中进行LPS 诱导的血栓形成(微血管凝血)的施瓦茨曼模型,以确定MASP-2抑制是否有效抑制或预防血管内血栓的形成。

[1038] 方法:

[1039] 在LPS诱导的血栓形成(微血管凝血)的施瓦茨曼模型中分析MASP-2^{-/-} (n=9) 和 WT(n1=10) 小鼠。向小鼠施用沙雷氏菌属LPS,并且随着时间过去监测血栓形成。进行了微血栓和LPS诱导的微血管凝血的发生率的比较。

[1040] 结果:

[1041] 值得注意的是,测试的所有MASP-2^{-/-}小鼠 (9/9) 在沙雷氏菌属LPS施用后都没有形成血管内血栓。相比之下,在平行测试的10只WT小鼠的7只中检测到微血栓 (p=0.0031, 费希尔氏精确)。如图44中所示,在MASP-2^{-/-}和 WT小鼠中测量在LPS感染之后的微血管阻塞开始的时间,显示了具有在60 分钟内测量的血栓形成的WT小鼠百分比,其中血栓形成早在约15分钟检测到。高达80%的WT小鼠证实了在60分钟的血栓形成。相比之下,如图44 中所示,MASP-2^{-/-}无一具有在60分钟的血栓形成(时序:p=0.0005)。

[1042] 这些结果证实了,MASP-2抑制针对HUS模型中的血管内血栓的发展是保护性的。

[1043] 实施例36

[1044] 该实施例描述了使用纯化的志贺毒素2 (STX2) 加上LPS的腹膜内共注射,抗MASP-2抗体在HUS的小鼠模型中的效应。

[1045] 背景:

[1046] 使用纯化的志贺毒素2 (STX2) 加上LPS的腹膜内共注射,开发了HUS的小鼠模型。小鼠肾的生物化学和微阵列分析揭示了,STX2加上LPS攻击与单独的任一药剂的效应不同。这些小鼠的血液和血清分析显示了嗜中性粒细胞增多症、血小板减少症、红细胞溶血、以及血清肌酐和血尿素氮升高。另外,小鼠肾的组织学分析和电子显微镜检查证实了肾小球纤维蛋白沉积、红细胞拥挤、微血栓形成和肾小球超微结构变化。已确定了,这种HUS模型在C57BL/6小鼠中诱导人HUS病理状况的所有临床症状,包括限定人疾病的血小板减少症、溶血性贫血和肾衰竭。(J.Immunol 187 (1):172-80 (2011))

[1047] 方法:

[1048] 称重18至20g之间的C57BL/6雌性小鼠购自Charles River Laboratories,并且分成2组(每组5只小鼠)。一组小鼠通过用在150 μ l盐水的总体积中稀释的重组抗MASP-2抗体mAbM11 (100 μ g/小鼠;对应于5mg/kg 体重的最终浓度)的腹膜内(i.p.)注射进行预处理。对照组接受不含任何抗体的盐水。在抗MASP-2抗体mAbM11的i.p注射后六小时,所有小鼠都接受在 150 μ l的总体积中粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 的LPS (L6136; Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) 的亚致死剂量 (3 μ g/动物;对应于150 μ g/kg体重) 和STX2的4.5ng/动

物的剂量(对应于225ng/kg) (LD50剂量的两倍)的组合 i.p.注射。盐水注射用于对照。

[1049] 在给药后每6小时监测小鼠的存活。一旦小鼠达到HUS病理状况的昏睡阶段,它们就被淘汰。在36小时后,所有小鼠都被淘汰,并且取出两个肾用于免疫组织化学和扫描电子显微镜检查。在实验结束时通过心脏穿刺获取血液样品。将血清分离并保持在-80℃下冷冻,用于测量治疗组和对照组两者中的BUN和血清肌酐水平。

[1050] 免疫组织化学

[1051] 每个小鼠肾的三分之一在4%多聚甲醛中固定24小时,加工并在石蜡中包埋。切下3微米厚的切片并置于荷电的载玻片上,用于用H&E染剂的后续染色。

[1052] 电子显微镜检查

[1053] 将肾的中间部分切割成大约1至2mm³的块,并且在4℃下在1x PBS中的2.5%戊二醛中固定过夜。固定的组织随后通过University of Leicester Electron Microscopy Facility进行加工。

[1054] 冷冻切片

[1055] 将另外三分之一的肾切割成大约1至2mm³的块,并且在液氮中快速冷冻,并且保持在-80℃下用于冷冻切片和mRNA分析。

[1056] 结果:

[1057] 图45以图形方式说明了,随着时间过去(小时),在STX/LPS诱导的模型中,盐水治疗的对照小鼠(n=5)和抗MASP-2抗体治疗的小鼠(n=5)的百分比存活。值得注意的是,如图45中所示,所有对照小鼠到42小时都死亡。形成鲜明对比的是,100%的抗MASP-2抗体治疗的小鼠在实验的时间过程自始至终都存活。与图45中显示的结果一致,观察到死亡或因严重疾病的迹象而不得不淘汰的所有未治疗的小鼠都具有显著的肾小球损伤,而所有抗MASP-2治疗的小鼠的肾小球看起来都正常(数据未显示)。这些结果证实了,MASP-2抑制剂,例如抗MASP-2抗体,可以用于治疗患有或处于发展血栓性微血管病(TMA)的风险中的受试者,所述血栓性微血管病例如溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型HUS(aHUS)或血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。

[1058] 实施例37

[1059] 该实施例描述了MASP-2缺陷和MASP-2抑制在鼠FITC-葡聚糖/光诱导的血栓形成的内皮细胞损伤模型中的效应。

[1060] 背景/基本原理:如实施例35和36中证实的,MASP-2缺陷(MASP-2 KO)和MASP-2抑制(经由抑制性MASP-2抗体的施用)保护典型HUS模型中的小鼠,而暴露于STX和LPS的所有对照小鼠都发展严重的HUS,并且在48小时内变得垂死或死亡。例如,如图54中所示,用MASP-2抑制性抗体治疗然后暴露于STX和LPS的所有小鼠都存活(费希尔氏精确p<0.01;N=5)。因此,抗MASP-2疗法保护该HUS模型中的小鼠。

[1061] 进行下述实验,以在异硫氰酸荧光素(FITC)-葡聚糖诱导的血栓性微血管病(TMA)的内皮细胞损伤模型中分析MASP-2缺陷和MASP-2抑制的效应,以便进一步证实MASP-2抑制剂用于治疗HUS、aHUS、TTP和具有其它病因学的TMA的益处。

[1062] 方法:

[1063] 活体显微镜检查

[1064] 如通过Frommhold等人,BMC Immunology 12:56-68,2011所述的,使小鼠准备用于

活体显微镜检查。简言之,小鼠用氯胺酮(125mg/kg体重, Ketanest, Pfitzer GmbH, Karlsruhe, 德国)和甲苯噻嗪(12.5mg/kg体重; Rompun, Bayer, Leverkusen, 德国)的腹膜内(i.p.)注射进行麻醉,并且放在加热垫上以将体温维持在37℃下。在具有盐水浸没物镜(SW 40/0.75数值孔径, Zeiss, Jena, 德国)的正置显微镜(Leica, Wetzlar, 德国)上进行活体显微镜检查。为了缓解呼吸,小鼠使用PE 90配管(Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA)插入喉管。左颈动脉用PE10配管(Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA)进行插管,用于血液取样和全身性单克隆抗体(mAb)施用。

[1065] 提睾肌制备

[1066] 如通过Sperandio等人, Blood, 97:3812-3819, 2001所述的, 执行用于活体显微镜检查的提睾肌的外科制备。简言之, 打开阴囊并动员提睾肌。在肌肉的纵向切开和在盖玻片上铺展后, 将附睾和睾丸移动并固定在一侧, 给予提睾肌微循环的完全显微镜接近。在Panasonic S-VHS记录仪上经由CCD照相机(CF8/1; Kappa, Gleichen, 德国)记录提睾肌小静脉。如通过Frommhold 等人, BMC Immunology 12:56-68, 2011 2011 先前描述的, 伴随温控(35℃碳酸氢盐缓冲盐水)灌流提睾肌。

[1067] 光激发FITC-葡聚糖损伤模型

[1068] 通过光毒性(FITC)-葡聚糖(目录号FD150S, Sigma Aldrich, Poole, U.K.)的光激发, 来诱导提睾肌小静脉和小动脉内皮的受控的、光剂量依赖性血管损伤。这个程序启动局限性血栓形成。作为光毒性试剂, 将60μL 10%w/v的 FITC-葡聚糖溶液通过左颈动脉通路进行注射, 并且允许在循环血液各处均匀地传播10分钟。在选择灌注良好的小静脉后, 将低至中间范围强度(800-1500)的卤素灯集中于目的血管上, 以诱导FITC-葡聚糖荧光以及对内皮表面的轻度至中度光毒性, 以便以可重现的受控方式刺激血栓形成。使用卤素灯(12V, 100W, Zeiss, Oberkochen, 德国)生成用于激发FITC-葡聚糖所需的光毒性光强度。起因于光诱导的荧光染料激发的光毒性需要光照的光强度和/或持续时间的阈值, 并且由内皮表面的直接加热或活性氧自由基的生成引起, 如通过 Steinbauer等人, Langenbecks Arch Surg 385:290-298, 2000描述的。

[1069] 测量施加到每根血管的光强度, 用于通过用于低功率测量的波长校正二极管检测器(Labmaster LM-2, Coherent, Auburn, USA)的调整。借助于计算机辅助微循环分析系统(CAMAS, Dr. Zeintl, Heidelberg)执行视频扫描的离线分析, 并且如通过Zeintl等人, Int J Microcirc Clin Exp, 8(3):293-302, 2000描述的, 测量红血细胞速度。

[1070] 在血栓形成诱导之前应用单克隆抗人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)和媒介物对照

[1071] 使用盲法研究设计, 在活体显微镜检查的提睾肌模型中的光毒性诱导的血栓形成之前16小时, 向9周龄的雄性C57BL/6 WT同窝仔畜小鼠给予重组单克隆人MASP-2抗体(mAbH6)、MASP-2功能活性的抑制剂(以10mg/kg体重的最终浓度给予)、或相同数量的同种型对照抗体(不含MASP-2抑制活性)的i.p.注射。在血栓形成诱导前一小时, 给予mAbH6或对照抗体的第二个剂量。在该模型中还评估了MASP-2敲除(KO)小鼠。

[1072] mAbH6(针对重组人MASP-2建立)是人MASP-2功能活性的有力抑制剂, 其与小鼠MASP-2交叉反应, 结合且抑制其, 但由于其物种特异性而具有较低的亲和力(数据未显示)。为了补偿mAbH6对小鼠MASP-2的较低亲和力, 以高浓度(10mg/kg体重)给予mAbH6, 以克服物种特异性的变化, 以及对于小鼠MASP-2的较低亲和力, 以提供在体内条件下鼠MASP-2功能

活性的有效阻断。

[1073] 在这项盲法研究中,记录了关于测试的每根个别小静脉(选择标准是通过可比较的直径和血流速度)完全阻塞所需的时间。

[1074] 使用活体显微镜视频记录,在60分钟的观察期内,评估具有微血管阻塞的小鼠百分比、发作时间和阻塞时间。

[1075] 结果:

[1076] 图46以图形方式说明了,根据损伤诱导后的时间,在用FITC/葡聚糖注射前16小时和1小时给药的同种型对照或人MASP-2抗体mAbH6(10mg/kg) 治疗后,在FITC/葡聚糖UV模型中具有微血管阻塞的小鼠百分比。如图46 中所示,85%接受同种型对照抗体的野生型小鼠在30分钟或更短时间内阻塞,而仅19%用人MASP-2抗体(mAbH6) 预治疗的野生型小鼠在同一时间段内阻塞,并且阻塞时间在人MASP-2抗体治疗组中最终的确阻塞的小鼠中是延迟的。进一步注意到,三只MASP-2 mAbH6治疗的小鼠在60分钟的观察期内根本没有阻塞(即,受保护免于血栓性阻塞)。

[1077] 图47以图形方式说明了,对于用人MASP-2抗体(mAbH6) 和同种型对照抗体治疗的小鼠,按分钟计的阻塞时间。数据报告为具有平均值(水平条) 和标准误差条(垂直条) 的散点。该图显示了其中可观察到阻塞的小鼠中的阻塞时间。因此,在60分钟观察期过程中并未阻塞的三只MASP-2抗体治疗的小鼠不包括在该分析中(不存在并未阻塞的对照治疗的小鼠)。用于分析的统计检验是非配对t检验;其中符号“*”指示了 $p=0.0129$ 。如图47中所示,与用同种型对照抗体治疗的小鼠相比,在阻塞的四只MASP-2抗体(mAbH6) 治疗的小鼠中,用MASP-2抗体治疗显著增加了用低光强度(800-1500) 的FITC-葡聚糖/光诱导的血栓形成的内皮细胞损伤模型中的静脉阻塞时间。同种型对照的完全阻塞时间的均值为19.75分钟,而MASP-2抗体治疗组的完全阻塞时间的均值为 32.5分钟。

[1078] 图48以图形方式说明了,对于野生型小鼠、MASP-2 KO小鼠、以及用人MASP-2抗体(mAbH6) 预治疗的野生型小鼠(所述抗体在用低光强度 (800-1500) 的FITC-葡聚糖/光诱导的血栓形成的内皮细胞损伤模型中的血栓形成诱导前16小时以10mg/kg i.p.施用,然后再次在诱导前1小时i.v.施用),按分钟计直至阻塞的时间。图48中仅包括阻塞的动物;对于接受同种型对照抗体的野生型小鼠, $n=2$;对于MASP-2 KO, $n=2$;并且对于接受人MASP-2抗体(mAbH6) 的野生型小鼠, $n=4$ 。符号“*”指示了 $p<0.01$ 。如图48中所示, MASP-2缺陷和MASP-2抑制(以10mg/kg的mAbH6) 增加了用低光强度 (800-1500) 的FITC-葡聚糖/光诱导的血栓形成的内皮细胞损伤模型中的静脉阻塞时间。

[1079] 结论:

[1080] 该实施例中的结果进一步证实了,在TMA的小鼠模型中,阻断凝集素途径的MASP-2抑制剂(例如阻断MASP-2功能的抗体) 抑制微血管凝血和血栓形成,多种微血管病症的标志。因此,预计MASP-2抑制剂例如MASP-2抑制性抗体的施用,将是患有HUS、aHUS、TTP或其它微血管病症的患者中的有效治疗,并且提供免于微血管凝血和血栓形成的保护。

[1081] 实施例38

[1082] 该实施例描述了一项研究,其证实了人MASP-2抑制性抗体(mAbH6) 对富含血小板的人血浆中的血小板功能没有作用。

[1083] 背景/基本原理:如实施例37中所述,证实了用人MASP-2抑制性抗体(mAbH6) 的

MASP-2抑制,增加了FITC-葡聚糖/光诱导的血栓形成的内皮细胞损伤模型中的静脉阻塞时间。进行下述实验,以确定MASP-2抑制性抗体 (mAbH6) 是否对血小板功能具有作用。

[1084] 方法:如下测试人mAbH6 MASP-2抗体对ADP诱导的血小板聚集的作用。将浓度为1 μ g/ml或0.1 μ g/ml的人MASP-2 mAbH6在40 μ L溶液中加入 360 μ L新鲜制备的富含血小板的人血浆中。同种型对照抗体用作阴性对照。在将抗体加入血浆中之后,通过添加最终浓度为2 μ M的ADP来诱导血小板活化。通过在1mL比色皿中用小磁体搅拌溶液来起始测定。在双通道Chrono-log Platelet Aggregometer Model 700 Whole Blood/Optical Lumi-Aggregometer中测量血小板聚集。

[1085] 结果:

[1086] 在五分钟的时间段内测量溶液中的百分比聚集。结果显示于下表13中。

[1087] 表13:在五分钟的时间段内的血小板聚集。

抗体	幅度 (百分比聚集)	斜率 (随着时间过去的 百分比聚集)
MASP-2抗体(mAbH6) (1 μ g/ml)	46%	59
同种型对照抗体 (1 μ g/ml)	49%	64
MASP-2抗体(mAbH6) (0.1 μ g/ml)	52%	63
同种型对照抗体 (0.1 μ g/ml)	46%	59

[1088] 如上表13中所示,在用对照抗体或MASP-2 mAbH6抗体处理的ADP诱导的血小板聚集之间没有观察到显著差异。这些结果证实了人MASP-2抗体 (mAbH6) 对血小板功能没有作用。因此,实施例37中描述的结果不是由于 mAbH6对血小板功能的作用,所述结果证实了,用人MASP-2抑制性抗体 (mAbH6) 的MASP-2抑制增加了FITC-葡聚糖/光诱导的血栓形成的内皮细胞损伤模型中的静脉阻塞时间。因此,MASP-2抑制阻止血栓形成而不直接影响血小板功能,揭示了不同于现有抗血栓剂的治疗机制。

[1090] 实施例39

[1091] 该实施例描述了MASP-2抑制对TMA的鼠模型中的血栓形成和血管阻塞的作用。

[1092] 背景/基本原理:凝集素途径在内皮细胞应激或损伤的背景下在激活补体系统中起主导作用。这种激活通过旁路途径快速放大,所述旁路途径在呈现 aHUS的许多患者中是失调的。因此,阻止MASP-2的激活和凝集素途径预计停止酶促反应的顺序,所述酶促反应导致膜攻击复合物的形成、血小板活化和白细胞募集。这种效应限制了组织损害。

[1093] 另外,MASP-2具有因子Xa样活性并切割凝血酶原以形成凝血酶。这种 MASP-2驱动的凝血系统激活可能使止血失衡并且导致TMA的病理状况。因此,使用MASP-2抑制剂(例如阻断补体系统和凝血系统激活的MASP-2抑制性抗体)的MASP-2抑制预计改善aHUS及其它TMA相关状况中的结果。

[1094] 如实施例37中所述,证实了用人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)的MASP-2抑制增加了FITC-葡聚糖/光诱导的血栓形成的内皮细胞损伤模型中的静脉阻塞时间。在这种TMA模型中,通过FITC-葡聚糖的IV注射使小鼠致敏,随后为在小鼠提睾肌的微血管系统中FITC-葡聚糖的局限性光激活(Thorlacius H等人,Eur J Clin.Invest 30(9):804-10,2000;Agero等人,Toxicon 50(5):698-706,2007)。

[1095] 进行下述实验,以确定MASP-2抑制性抗体(mAbH6)是否对TMA的小鼠模型中的血栓形成和血管阻塞具有剂量应答作用。

[1096] 方法:通过C57Bl/6小鼠的提睾肌的微血管系统中的异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖(FITC-葡聚糖)的光激活来诱导局限性血栓形成,并且使用实施例37中描述的方法,伴随下述修改,使用活体显微镜检查来测量血栓形成和血管阻塞的开始。在TMA诱导前一小时,通过静脉内(iv)注射施用,向小鼠组给药 mAbH6 (2mg/kg、10mg/kg或20mg/kg) 或同种型对照抗体(20mg/kg)。记录血栓形成的开始时间和完全血管阻塞的时间。在30到60分钟内记录的活体显微镜检查图像的视频回放分析用于评估血管大小、血流速度、光强度、作为血小板粘附等价物的血栓形成的开始速率、血栓形成的开始时间、总血管阻塞的速率和直到总血管阻塞的时间。使用SigmaPlot v12.0进行统计分析。

[1097] 结果:

[1098] 血栓形成的开始

[1099] 图49是Kaplan-Meier图,其显示了在用渐增剂量的人MASP-2抑制性抗体(以2mg/kg、10mg/kg或20mg/kg的mAbH6)或同种型对照抗体治疗的小鼠中,在FITC-葡聚糖诱导的血栓性微血管病中,根据时间具有血栓的小鼠的百分比。如图49中所示,相对于对照治疗的小鼠,血栓形成的开始在mAbH6治疗的小鼠中以剂量依赖性方式延迟。

[1100] 图50以图形方式说明了,根据mAbH6剂量的血栓形成开始的中值时间(分钟)(与对照相比 $p < 0.01$)。如图50中所示,随着mAbH6的渐增剂量,血栓形成开始的中值时间从对照组中的6.8分钟增加到20mg/kg mAbH6治疗组中的17.7分钟($p < 0.01$)。表14和15中提供了基础实验数据和统计分析。

[1101] 基于视频记录的评估记录的各个小鼠中的血栓形成开始的时间在下表14中进行详述。

[1102] 表14:在光染料诱导的损伤后的血栓形成开始的时间

[1103]

对照治疗		mAbH6治疗		
开始时间 (分钟)	对照	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
	6.07	5.93	12.75	10.00
	1.07	6.95	2.53	10.33
	8.00	8.92	14.00	21.00
	2.40	11.92	3.05	11.50
	8.48	12.75	8.00	19.00
	4.00	12.53	8.17	10.37
	4.00		15.83	22.65
	7.83		11.70	16.37
	6.83		50.67	21.75*
	15.00			32.25*
	15.67			

[1104] *血管并未显示在指示的观察期过程中的开始

[1105] 比较对照和mAbH6治疗的动物之间的阻塞开始时间的统计分析显示于下表15中。

[1106] 表15:开始时间:来自FITC Dex剂量应答研究的数据

统计学	对照	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
事件数目/动物数目(%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/10 (80.0%)
中值时间(分钟) (95% CI)	6.8 (2.4, 8.5)	10.4 (5.9, 12.8)	11.7 (2.5, 15.8)	17.7 (10.0, 22.7)
威尔科克森p值*		0.2364	0.1963	0.0016
事件=观察到的开始时间 中值(分钟)及其95% CI基于Kaplan-Meier估计量 NE=无法估计 *p值通过Dunnett-Hsu多重比较进行调整				

[1108] 微血管阻塞

[1109] 图51是Kaplan-Meier图,其显示了在用渐增剂量的人MASP-2抑制性抗体(以2mg/kg、10mg/kg或20mg/kg的mAbH6)或同种型对照抗体治疗的小鼠中,在FITC-葡聚糖诱导的血栓性微血管病中,根据时间具有微血管阻塞的小鼠的百分比。如图51中所示,与对照小鼠相比,完全微血管阻塞在mAbH6治疗组中是延迟的。

[1110] 图52以图形方式说明了,根据mAbH6剂量的微血管阻塞的中值时间(与对照相比* $p < 0.05$)。如图52中所示,完全微血管阻塞的中值时间从对照组中的23.3 分钟增加到2mg/kg mAbH6治疗组中的38.6分钟($p < 0.05$)。10mg/kg或20mg/kg mAbH6的剂量表现(完全微血管阻塞的中值时间分别为40.3和38分钟)与2 mg/kg mAbH6治疗组相似。表16和17中提供了基础实验数据和统计分析。

[1111] 基于视频记录的初步评估记录的各个小鼠中的完全血管阻塞的时间在下表16中进行详述。

[1112] 表16:在光染料诱导的损伤后的完全阻塞的时间

对照治疗		mAbH6治疗		
阻塞时间 (分钟)	对照	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
[1113]	37.50	42.3	30.92	38.00
	29.07	21.91	17.53	28.00
	27.12	24.4	51.38	40.58
	19.38	31.38	36.88	33.00
	19.55	61.17*	26.83	39.10
	18.00	61.55*	40.28	32.03
	16.50		55.83	38.53
	23.33		71.93*	21.75*
	14.83		98.22*	32.25*
	30*			33.17*
	61.8*			

[1114] *血管在指示的观察期过程中并未完全阻塞。

[1115] 比较对照和mAbH6治疗的动物之间的完全阻塞时间的统计分析显示于下表17中。

[1116] 表17:完全微血管阻塞的时间:来自FITC Dex剂量应答研究的数据

统计学	对照	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
[1117] 事件数目/动物数目(%)	9/11 (81.8%)	4/6 (66.7%)	7/9 (77.8%)	7/10 (70.0%)
中值时间(分钟) (95% CI)	23.3	36.8	40.3	38.0
	(16.5, 37.5)	(21.9, NE)	(17.5, NE)	(28.0, 40.6)
威尔科克森p值*		0.0456	0.0285	0.0260
[1118] 事件=观察到的阻塞时间 中值(分钟)及其95% CI基于Kaplan-Meier估计量 NE=无法估计 * p值通过Dunnett-Hsu多重比较进行调整				

[1119] 概括

[1120] 如表18中概括的,相对于对照治疗的小鼠,血栓形成的开始在mAbH6治疗的小鼠中以剂量依赖性方式延迟(开始的中值时间为10.4至17.7分钟相对于6.8分钟)。相对于对照治疗组,完全阻塞的中值时间在所有mAbH6治疗组中是显著延迟的(表18)。

[1121] 表18:血栓形成开始和完全阻塞的中值时间

	对照	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
[1122] 血栓形成开始的中值#时间(分钟)	6.8	10.4	11.7	17.7*
完全微血管阻塞的中值#时间(分钟)	23.3	36.8*	40.3*	38.0*

[1123] #中值基于Kaplan-Meier估计量

[1124] *p<0.05与对照相比(威尔科克森通过用于多重比较的Dunnett-Hsu进行调整)

[1125] 这些结果证实了,mAbH6,与MASP-2结合并阻断补体系统的凝集素途径的人单克隆抗体,在TMA的实验小鼠模型中以剂量依赖性方式减少微血管血栓形成。因此,预计MASP-2抑制剂例如MASP-2抑制性抗体的施用,将是患有HUS、aHUS、TTP或其它微血管病症的患者中的有效疗法,所述其它微血管病症例如其它TMA,包括灾难性抗磷脂综合征(CAPS),全身性德戈斯病,以及继发于癌症、癌症化学疗法和移植的TMA,并且提供了免于微血管凝血和血栓形成的保护。

[1126] 实施例40

[1127] 该实施例描述了使用噬菌体展示鉴定全人scFv抗体,其与MASP-2结合并抑制凝集素介导的补体激活,同时使免疫系统的经典(C1q依赖性)途径和旁路途径组分保持完整。

[1128] 概述:

[1129] 通过筛选噬菌体展示文库来鉴定全人、高亲和力MASP-2抗体。抗体的可变轻链和

重链片段以scFv形式和全长IgG形式两者进行分离。人MASP-2抗体可用于抑制与凝集素途径介导的旁路补体途径激活相关的细胞损伤,同时使免疫系统的经典(C1q依赖性)途径组分保持完整。在一些实施方案中,主题 MASP-2抑制性抗体具有下述特性:(a) 对于人MASP-2的高亲和力(例如10nM 或更小的 K_D),并且(b) 以约30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的MASP-2 依赖性补体活性。

[1130] 方法:

[1131] 全长无催化活性的MASP-2的表达:

[1132] 编码具有前导序列的人MASP-2多肽(SEQ ID NO:5)的人MASP-2的全长 cDNA序列(SEQ ID NO:4)被亚克隆到哺乳动物表达载体pCI-Neo(Promega)内,其驱动在CMV增强子/启动子区的控制下的真核表达(在Kaufman R.J.等人,Nucleic Acids Research 19:4485-90,1991;Kaufman,Methods in Enzymology,185:537-66(1991)中进行描述)。

[1133] 为了生成无催化活性的人MASP-2A蛋白,如在此通过引用并入本文的 US2007/0172483中所述进行定点诱变。在琼脂糖凝胶电泳和条带制备后纯化 PCR产物,并且使用标准加尾程序生成单个腺苷重叠。然后将腺苷加尾的 MASP-2A克隆到pGEM-T easy载体内,并且转化到大肠杆菌内。将人MASP-2A 进一步亚克隆到哺乳动物表达载体pED或pCI-Neo内。

[1134] 使用标准磷酸钙转染程序(Maniatis等人,1989),将上述MASP-2A表达构建体转染到DXB1细胞内。MASP-2A在无血清培养基中生产,以确保制剂不被其它血清蛋白质污染。每隔一天收获来自汇合细胞的培养基(总共四次)。重组 MASP-2A的水平取平均值为大约1.5mg/升培养基。MASP-2A(上述Ser-Ala突变体)通过在MBP-A琼脂糖柱上的亲和层析进行纯化。

[1135] 关于通过淘选/scFv转换和过滤筛选鉴定的ScFv候选克隆的MASP-2A ELISA

[1136] 使人免疫球蛋白轻链和重链可变区序列的噬菌体展示文库经受抗原淘选,随后为自动化抗体筛选和选择,以鉴定针对人MASP-2蛋白的高亲和力 scFv抗体。进行scFv噬菌体文库针对加上HIS标签或加上生物素标签的 MASP-2A的三轮淘选。第三轮淘选首先用MBL进行洗脱,然后用TEA(碱性) 进行洗脱。为了监测展示针对靶MASP-2A的scFv片段的噬菌体的特异性富集,进行了针对固定化MASP-2A的多克隆噬菌体ELISA。将来自第3轮淘选的scFv基因克隆到pHOG表达载体内,并且在小规模过滤筛选中运行,以寻找针对 MASP-2A的特异性克隆。

[1137] 挑取来自第三轮淘选的含有编码scFv片段的质粒的细菌菌落,在硝酸纤维素膜上铺网,并且在非诱导培养基上生长过夜以产生母板。从第三轮淘选中挑选且分析了总共18,000个菌落,其中一半来自竞争性洗脱,且一半来自后续 TEA洗脱。scFv噬菌粒文库针对MASP-2A的淘选,随后为scFv转换和过滤筛选,得到137个阳性克隆。108/137个克隆在ELISA测定中对于MASP-2结合呈阳性(数据未显示),其中进一步分析了45个克隆阻断正常人血清中的MASP-2 活性的能力。

[1138] 测量凝集素途径C3转化酶形成的抑制的测定

[1139] 测量凝集素途径C3转化酶形成的抑制的功能测定用于评估MASP-2 scFv 候选克隆的“阻断活性”。需要MASP-2丝氨酸蛋白酶活性,以便生成构成凝集素途径C3转化酶两种蛋白质组分(C4b、C2a)。因此,抑制MASP-2功能活性的MASP-2 scFv(即,阻断性MASP-2 scFv)将抑制凝集素途径C3转化酶的从头形成。C3含有罕见且高度反应性的硫酯基团作为

其结构的部分。在该测定中通过C3转化酶切割C3后,C3b上的硫酯基团可以经由酯或酰胺键合与固定在塑料孔的底部上的大分子上的羟基或氨基形成共价键,因此促进在ELISA测定中的C3b检测。

[1140] 酵母甘露聚糖是已知的凝集素途径激活物。在测量C3转化酶形成的下述方法中,用甘露聚糖包被的塑料孔与稀释的人血清一起温育,以激活凝集素途径。然后洗涤孔,并且使用标准ELISA方法测定固定到孔上的C3b。在该测定中生成的C3b的量是凝集素途径C3转化酶的从头形成的直接反映。以所选浓度的MASP-2 scFv克隆在该测定中测试了其抑制C3转化酶形成和后续 C3b生成的能力。

[1141] 方法:

[1142] 将如上所述鉴定的45个候选克隆表达,纯化并稀释至相同的原种浓度,其再次在含有Ca⁺⁺和Mg⁺⁺的GVB缓冲液(4.0mM巴比妥、141mM NaCl、1.0 mM MgCl₂、2.0mM CaCl₂、0.1%明胶,pH 7.4)中稀释,以确保所有克隆都具有相同的缓冲液量。scFv克隆各自以2μg/mL的浓度一式三份进行测试。阳性对照是OMS100 Fab2,并且以0.4μg/mL进行测试。在scFv/IgG克隆的存在和不存在下监测C3c形成。

[1143] 甘露聚糖在50mM碳酸盐缓冲液(15mM Na₂CO₃+35mM NaHCO₃+1.5 mM NaN₃),pH 9.5中稀释至20μg/mL(1μg/孔)的浓度,并且在4℃下在ELISA板上包被过夜。第二天,甘露聚糖包被的板用200μl PBS洗涤3次。然后将100 μl 1%HSA封闭溶液加入孔中,并且在室温下温育1小时。将板用200μl PBS 洗涤3次,并且与200μl PBS一起贮存于冰上,直到样品添加。

[1144] 正常人血清在CaMgGVB缓冲液中稀释至0.5%,并且scFv克隆或OMS100 Fab2阳性对照以0.01μg/mL;1μg/mL(仅OMS100对照)和10μg/mL一式三份加入该缓冲液中,并且在加入封闭的ELISA板之前,在冰上预温育45分钟。反应通过在37℃下温育1小时来启动,并且通过将板转移到冰浴来停止。用兔α-小鼠C3c抗体,随后为山羊α-兔HRP来检测C3b沉积。阴性对照是不含抗体的缓冲液(无抗体=最大C3b沉积),且阳性对照是含EDTA的缓冲液(无C3b沉积)。除了孔不含甘露聚糖之外,通过进行相同的测定来确定本底。从含有甘露聚糖的孔中的信号中扣除针对不含甘露聚糖的板的本底信号。截断标准设定为不相关的scFv克隆(VZV)和单独缓冲液的一半活性。

[1145] 结果:基于截断标准,发现总共13个克隆阻断MASP-2的活性。选择并测序产生>50%途径压制的所有13个克隆,产生10个独特的克隆。发现所有十个克隆具有相同的轻链亚类λ3,但具有三个不同的重链亚类:VH2、VH3和VH6。在功能测定中,十个候选scFv克隆中的五个给出的IC₅₀nM值低于使用0.5%人血清的25nM靶标准。

[1146] 为了鉴定具有改善效力的抗体,使如上所述鉴定的三个母scFv克隆经受轻链改组。该过程涉及组合文库的生成,所述组合文库由与衍生自六个健康供体的首次实验的人λ轻链(VL)文库配对的每个母克隆的VH组成。然后在该文库中筛选具有改善的结合亲和力和/或功能性的scFv克隆。

[1147] 表19:前导子克隆及其分别的母克隆(全都为scFv形式)以IC₅₀(nM)的功能效力比较

	1%人血清 C3 测定 (IC ₅₀ nM)	90%人血清 C3 测定 (IC ₅₀ nM)	90%人血清 C4 测定 (IC ₅₀ nM)
[1148] 17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

[1149] 下文呈现的是关于上文表19中所示的母克隆和子克隆的重链可变区 (VH) 序列。

[1150] Kabat CDR (31-35 (H1)、50-65 (H2) 和95-107 (H3)) 是粗体的;而Chothia CDR (26-32 (H1)、52-56 (H2) 和95-101 (H3)) 是加下划线的。

[1151] 17D20_35VH-21N11VL重链可变区 (VH) (由SEQ ID NO:66编码的SEQ ID NO:67)

[1152] QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQPPGKAL
EWLAHIFSSDEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYC
ARIRRGGIDYWGGTLVTSS

[1153] d17N9重链可变区 (VH) (SEQ ID NO:68)

[1154] QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSTSAAWNWIWIRQSPSRGLE
WLGRTYYRSKWyNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVY
YCARDPFGVPFDIWGGTMVTVSS

[1155] 下文呈现的是关于母克隆和子克隆的轻链可变区 (VL) 序列。

[1156] Kabat CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2); 和89-97 (L3)) 是粗体的;而Chothia CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2) 和89-97 (L3)) 是加下划线的。这些区域无论是按 Kabat系统还是按Chothia系统编号都是相同的。

[1157] 17D20m_d3521N11轻链可变区 (VL) (由SEQ ID NO:69编码的SEQ ID NO:70)

[1158] QPVLTPPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQSPVLVM
YQDKORPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDSSTAVF
GGGTKLTVL

[1159] 17N16m_d17N9轻链可变区 (VL) (SEQ ID NO:71)

[1160] SYELIQPPSVSVAPGQTATITCAGDNLGKKRVHWYQQRPGQAPVLVI
YDDSDRPSGIPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQVWDIATDHY
VFGGGTKLTVLAAAGSEQLISE

[1161] 通过斑点印迹分析就表位结合分析了MASP-2抗体OMS100和 MoAb_d3521N11VL (包含如SEQ ID NO:67所示的重链可变区以及如SEQ ID NO:70所示的轻链可变区,也称为“OMS646”和“mAbH6”),其已证实以高亲和力与人MASP-2结合并具有阻断功能性补体活性的能力。结果显示了, OMS646和OMS100抗体对于MASP-2是高度特异性的,并且不与MASP-1/3结合。抗体既不结合MAp19,也不结合不含MASP-2的CCP1结构域的MASP-2 片段,导致结合位点包含CCP1的结论。

[1162] 当与C1s、C1r或MASP-1相比较时, MASP-2抗体OMS646确定以>5000 倍的选择性与重组MASP-2亲合地结合 (Kd 60-250pM) (参见下表20):

[1163] 表20:如通过固相ELISA研究评价的,OMS646 MASP-2抗体-MASP-2 相互作用的亲

和力和特异性

[1164]	抗原	K_D (pM)
	MASP-1	$>500,000$
	MASP-2	$62 \pm 23^*$
	MASP-3	$>500,000$
	纯化的人C1r	$>500,000$
	纯化的人C1s	$\sim 500,000$

[1165] *平均值 $\pm$ 标准差;n=12

[1166] OMS646特异性阻断终末补体组分的凝集素依赖性激活

[1167] 方法:

[1168] 使用关于凝集素途径、经典途径和旁路途径的途径特异性条件,分析了 OMS646对膜攻击复合物 (MAC) 沉积的作用。为了这个目的,遵循制造商的说明书,使用了Wieslab Comp300补体筛选试剂盒 (Wieslab,Lund,瑞典)。

[1169] 结果:

[1170] 图53A以图形方式说明了,在凝集素途径特异性测定条件下,在抗MASP-2抗体 (OMS646) 的存在或不存在下的MAC沉积水平。图53B以图形方式说明了,在经典途径特异性测定条件下,在抗MASP-2抗体 (OMS646) 的存在或不存在下的MAC沉积水平。图53C以图形方式说明了,在旁路途径特异性测定条件下,在抗MASP-2抗体 (OMS646) 的存在或不存在下的MAC 沉积水平。

[1171] 如图53A中所示,OMS646以大约1nM的 IC_{50} 值阻断凝集素途径介导的 MAC沉积激活。然而,OMS646对由经典途径介导的激活 (图53B) 或旁路途径介导的激活 (图53C) 生成的MAC沉积没有作用。

[1172] 在静脉内 (IV) 或皮下 (SC) 施用于小鼠之后,OMS646的药代动力学和药效学

[1173] OMS646的药代动力学 (PK) 和药效学 (PD) 在小鼠中的28天单剂量PK/PD 研究中进行评估。该研究测试了皮下 (SC) 施用的5mg/kg和15mg/kg OMS646 的剂量水平,以及静脉内 (IV) 施用的5mg/kg OMS646的剂量水平。

[1174] 关于OMS646的PK概况,图54以图形方式说明了,在以指示剂量的OMS646施用后,根据时间的OMS646浓度 (n=3只动物/组的平均值)。如图 54中所示,在5mg/kg SC下,OMS646在给药后大约1-2天达到5-6ug/mL 的最大血浆浓度。OMS646在5mg/kg SC下的生物利用度为大约60%。如图 54中进一步所示,在15mg/kg SC下,OMS646在给药后大约1至2天达到10-12ug/mL的最大血浆浓度。对于所有组,OMS646从体循环中缓慢清除,具有大约8-10天的终末半衰期。OMS646的概况对于小鼠中的人抗体是典型的。

[1175] OMS646的PD活性在图55A和55B中以图形方式进行说明。图55A和 55B显示了对于5mg/kg IV (图55A) 和5mg/kg SC (图55B) 组中的每只小鼠的 PD应答 (全身凝集素途径活性的下降)。虚线指示了测定的基线 (最大抑制;在测定前在体外用过量OMS646掺料的首次实验的小鼠血清)。如图55A中所示,在5mg/kg OMS646的IV施用之后,全身凝集素途径活性立即下降至几乎无法检测的水平,并且凝集素途径活性在28天观察期内仅显示适度恢复。如图 55B中所示,在用5mg/kg OMS646 SC给药的小鼠中,观察到凝集素途径活性的时间依赖性抑制。凝集素途径活性在药物施用的24小时内降至几乎无法检测的水平,并且对于至少7

天保持在低水平下。凝集素途径活性随着时间过去逐渐增加,但在28天观察期内并未恢复到剂量前水平。在15mg/kg SC 施用后观察到的凝集素途径活性相对于时间曲线类似于5mg/kg SC剂量(数据未显示),指示了PD终点的饱和。数据进一步指示了,IV或SC施用的5mg/kg OMS646的每周一次剂量足以实现小鼠中的全身凝集素途径活性的持续压制。

[1176] 实施例41

[1177] 该实施例证实了,在暴露于在疾病的急性期和缓解期过程中获得的来自非典型溶血性尿毒症(aHUS)患者的血清后,MASP-2抑制性抗体(OMS646)抑制aHUS血清诱导的在活化的人微血管内皮细胞(HMEC-1)的表面的补体 C5b-9沉积。

[1178] 背景/基本原理:进行下述研究,以分析在OMS646(特异性结合MASP-2 并抑制凝集素途径激活的MASP-2抗体)的存在或不存在下,在暴露于(1)在疾病的急性期过程中以及(2)在缓解期过程中获得的aHUS患者血清后,aHUS血清诱导的在活化的HMEC-1细胞的表面上的补体C5b-9沉积。

[1179] 方法:

[1180] 患者:选择用于这项研究的在疾病的急性期过程中以及在缓解中均进行研究的4个aHUS患者,在HUS/TTP的国际登记处(International Registry)包括的那些患者中,并且由Mario Negri Institute的移植和罕见病免疫学和遗传学实验室(Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases)进行基因分型。一个aHUS患者具有杂合的p.R1210C补体因子H (CFH)突变,且一个具有抗CFH自身抗体,而在其它两个aHUS患者中并未发现突变或针对CFH的抗体。

[1181] 表21和22概括了这项研究中分析的四个aHUS患者中的补体基因突变和抗CFH自身抗体的筛查结果,连同在急性期过程中或缓解时测量的临床和生物化学数据。

[1182] 表21:这项研究中的四个aHUS患者的临床参数

[1183]

病例 编号	突变或抗 CFH Ab	疾病阶段	血小板 (150-400*10 ³ /μl)	LDH (266-500 IU/l)	血红蛋白 (14-18g/dl)	s-肌酐 (0.55-1.25m g/dl)
#1	无突变, 无抗 CFH Ab	急性	31,000	1396	12.9	2.37
		缓解	267,000	n.a.	11.5	3.76
#2	CFH-R1210C	急性	46,000	1962	7	5.7
		缓解	268,000	440	13.4	7.24
#3	抗 CFH Ab	急性	40,000	3362	9.5	1.77
		缓解	271,000	338	8.8	0.84
#4	无突变, 无抗 CFH Ab	急性	83,000	1219	7.8	6.8
		缓解	222,000	495	12.2	13

[1184] 注:n.a.=不可用

[1185] 表22:这项研究中的四个aHUS患者的补体参数

[1186]

病 例 编号	突变或抗 CFH Ab	疾病阶段	血清 C3 (83-180 mg/dl)	血浆 SC5b-9 (127-400 ng/ml)
#1	无突变, 无抗 CFH Ab	急性	51	69
		缓解	n.a.	117
#2	CFH-R1210C	急性	79	421
		缓解	119	233
#3	抗 CFH Ab	急性	58	653
		缓解	149	591
#4	无突变, 无抗 CFH Ab	急性	108	n.a.
		缓解	n.a.	n.a.

[1187] 实验方法:将来自具有真皮起源的人微血管内皮细胞系 (HMEC-1) 的细胞在载玻片上铺平板,并且当汇合时使用。汇合的HMEC-1细胞用10 μ M ADP (二磷酸腺苷) 活化10分钟,然后与来自以下的血清一起温育4小时:在疾病的急性期过程中收集的上表23和24中所述的四个aHUS患者、或缓解时的相同aHUS 患者,或4个健康对照受试者。在如上文实施例40中所述生成的MASP-2抑制性抗体OMS646 (100 μ g/mL) 的存在或不存在下、或者在作为补体抑制的阳性对照的可溶性补体受体1 (sCR1) (150 μ g/mL) 的存在下,用测试培养基 (具有 0.5%BSA 的HBSS) 将血清1:2稀释。在温育步骤结束时,HMEC-1细胞用兔抗人补体C5b-9,随后为FITC缀合的二抗进行处理。在每个实验中,来自一个健康对照的血清与aHUS患者血清 (急性期和缓解) 平行进行测试。共聚焦倒置激光显微镜用于采集内皮细胞表面上的荧光染色。每个样品采集15个视野,并且使用软件Image J的内置特定功能,通过自动边缘检测来评估由荧光染色占据的面积,并且表示为每个分析视野的像素2。从计算中排除了显示最低值和最高值的视野。

[1188] 对于统计分析 (单因素ANOVA,随后为用于多重比较的Tukey氏检验),使用了在每个实验条件中对于每个患者和对照考虑的13个视野的以像素2的结果。

[1189] 结果:

[1190] 用来自四个aHUS患者的血清的补体沉积分析的结果概括于下表23A中,而用来自四个健康受试者的血清的结果概括于下表23B中。

[1191] 表23A:补体抑制剂对aHUS血清诱导的在ADP活化的HMEC-1细胞上的 C5b-9沉积的作用

[1192]

aHUS 患者#	aHUS急性期			aHUS缓解期		
	未治疗的	+sCR1	+OMS646	未治疗的	+sCR1	+OMS646
患者#1 (无突变, 无抗CFH ab)	5076 ± 562°	551 ± 80*	3312 ± 422**	4507 ± 533°	598 ± 101§	1650 ± 223§
患者#2 (CFH-R1 210C)	5103 ± 648°	497 ± 67*	2435 ± 394*	3705 ± 570°	420 ± 65§	2151 ± 250§§
患者#3 (抗 CFH ab)	3322 ± 421°	353 ± 64*	2582 ± 479	6790 ± 901°	660 ± 83§	2077 ± 353§
患者#4 (无突变, 无抗CFH ab)	4267 ± 488°	205 ± 34*	2369 ± 265**	5032 ± 594°	182 ± 29§	3290 ± 552§§

[1193] 表23B:补体抑制剂对来自四个健康对照受试者(未患有aHUS)的血清对ADP活化的HMEC-1细胞上的C5b-9沉积的作用

[1194]

健康对照	未治疗的	+sCR1	+OMS646
受试者#			
对照受试者#1 (与aHUS受试者#1平行 测定)	481 ± 66	375 ± 43	213 ± 57
对照受试者#2 (与aHUS受试者#2平行 测定)	651 ± 61	240 ± 33	490 ± 69
对照受试者#3 (与aHUS受试者#3平行 测定)	602 ± 83	234 ± 35	717 ± 109
对照受试者#4 (与aHUS受试者#4平行 测定)	370 ± 53	144 ± 20	313 ± 36

[1195]

[1196] 对于表23A和23B:数据是平均值±SE。°P<0.001相对于对照;*P<0.001,**P<0.01相对于未治疗的aHUS急性期;§P<0.001,§§P<0.01,§§§P<0.05相对于未治疗的aHUS缓解期。

[1197] 图56以图形方式说明了,MA SP-2抗体(OMS646)和sCR1对aHUS血清诱导的在ADP活化的HMEC-1细胞上的C5b-9沉积的抑制作用。在图56中,数据为平均值±SE。°P<0.0001相对于对照;*P<0.0001相对于未治疗的aHUS急性期;^P<0.0001相对于aHUS急性期+sCR1;§P<0.0001相对于未治疗的aHUS缓解期,并且#P<0.0001相对于aHUS缓解期+sCR1。

[1198] 如表23A、23B和图56中所示,在静态条件下暴露于来自aHUS患者的血清(在急性期或缓解中收集)4小时的ADP刺激的HMEC-1细胞,显示了C5b-9在细胞表面上的强烈沉积,如通过共聚焦显微镜检查检测到的。通过测量由C5b-9覆盖的面积,与暴露于来自健康对照受试者的血清的细胞相比,在暴露于来自aHUS患者的血清的细胞上观察到显著更高的C5b-9沉积量,不管aHUS血清是在急性期中还是在缓解过程中进行收集。在急性期和缓解之间没有观察到血清诱导的内皮C5b-9沉积的差异。

[1199] 如表23A、23B和图56中进一步所示,与未治疗的aHUS血清相比,向aHUS血清(从在急性期过程中或处于缓解的患者中获得)中添加MASP-2抗体OMS646导致内皮细胞表面上的C5b-9沉积的显著减少。然而,与通过补体泛抑制剂sCR1发挥的效应相比,OMS646对C5b-9沉积的抑制作用更不显著。实际上,在OMS646相对于sCR1的存在下,在aHUS血清诱导的C5b-9沉积之间观察到统计学显著差异(图56以及表23A和23B)。

[1200] 当计算为四个aHUS患者的平均值时,在补体抑制剂的存在下观察到的C5b-9沉积的减少百分比(与视为100%的通过来自相同患者的未治疗血清诱导的C5b-9沉积相比)如下:

[1201] 急性期:

[1202] sCR1 (150 μ g/ml):C5b-9沉积的91%减少

[1203] OMS646 (100 μ g/ml):C5b-9沉积的40%减少

[1204] 缓解期:

[1205] sCR1 (150 μ g/ml):C5b-9沉积的91%减少

[1206] OMS646 (100 μ g/ml):C5b-9沉积的54%减少

[1207] 结论:该实施例中描述的结果证实了,补体的凝集素途径受到活化的微血管内皮细胞的刺激,并且这种刺激是aHUS特征性的过度的补体激活应答的重要驱动因素。还证实了这种凝集素途径刺激和所得到的过度的补体激活应答在aHUS的急性期过程中以及临床缓解中均发生。此外,这一发现似乎并不局限于与aHUS相关的任何特定补体缺陷。如该实施例中进一步证实的,用MASP-2抑制性抗体如OMS646的选择性抑制凝集素途径减少具有多种病因学的aHUS患者中的补体沉积。

[1208] 实施例42

[1209] 该实施例证实了,在暴露于在(i) aHUS的急性期和(2) 缓解期过程中获得的aHUS患者血清后,MASP-2抑制性抗体(OMS646)抑制aHUS血清诱导的在活化的人微血管内皮细胞(HMEC-1)的表面上的血小板聚集和血栓形成。

[1210] 方法:

[1211] 患者:三个aHUS患者(如实施例41中的表21、22、23A和23B中所述的患者#1、#2和#4)(一个患者具有杂合的p.R1210C CFH突变,而在其它两个患者中并未发现突变或抗CFH抗体)在疾病的急性期过程中以及在缓解中均进行研究。选择用于这项研究的患者在HUS/TTP的国际登记处包括的那些患者中,并且由Mario Negri Institute的移植和罕见病免疫学和遗传学实验室进行基因分型。还选择了五个健康受试者作为灌注实验的血液供体。

[1212] 方法:汇合的HMEC-1细胞用10 μ M ADP活化10分钟,然后与以下一起温育3小时:来自在疾病的急性期过程中收集的三个aHUS患者(实施例41中描述的患者#1、2和4)、或来自缓解时的相同患者的血清,或来自健康受试者的对照血清。在如实施例40中所述生成的

MASP-2抑制性抗体OMS646 (100 μ g/mL)的存在或不存在下、或者在作为补体抑制的阳性对照的sCR1 (150 μ g/mL)的存在下,用测试培养基(具有0.5%BSA的HBSS)将血清1:2稀释。对于患者#1和#2,使另外的孔与血清(来自急性期和缓解)一起温育,所述血清用含有100 μ g/mL无关同种型对照抗体或20 μ g/mL OMS646(对于后者,病例#1仅在缓解中进行测试,而病例#2在急性期过程中以及缓解时均进行测试)的测试培养基进行1:2稀释。

[1213] 在温育步骤结束时,在微循环中遇到的剪切应力(60达因/ cm^2 ,三分钟)下,将HMEC-1细胞灌注到具有从健康受试者(含有标记血小板的荧光染料麦帕克林)获得的肝素化全血(10UI/mL)的流动室中。在灌注三分钟后,在丙酮中固定内皮细胞单层。通过共聚焦倒置激光显微镜获得在内皮细胞表面上的每个血小板血栓样品的15张图像,并且使用Image J软件评估由血栓占据的面积。从计算中排除了显示最低值和最高值的视野。

[1214] 对于统计分析(单因素ANOVA,随后为用于多重比较的Tukey氏检验),使用了在每个实验条件中对于每个患者和对照考虑的13个视野的以像素²的结果。

[1215] 结果:

[1216] 用来自三个aHUS患者的血清的血栓形成实验的结果概括于下表24A中,而用来自五个健康受试者的血清的结果概括于下表24B中。

[1217] 表24A:补体抑制剂对aHUS血清诱导的在ADP活化的HMEC-1细胞上的血栓形成(像素² $\pm$ SE)的作用

[1218]	实验条件	疾病阶段	aHUS病例#1 血栓形成(像素 ² $\pm$ SE) (无突变, 无抗 CFH ab)	aHUS病例#2 血栓形成(像素 ² $\pm$ SE) (CFH-R1210C)	aHUS病例#4 血栓形成(像素 ² $\pm$ SE) (无突变, 无抗 CFH ab)
[1219]	未治疗的	急性	5499 $\pm$ 600	22320 $\pm$ 1273°	10291 $\pm$ 1362°
		缓解	6468 $\pm$ 1012°	3387 $\pm$ 443°	17676 $\pm$ 1106°
	+sCR1 (150 μ g/mL)	急性	4311 $\pm$ 676	5539 $\pm$ 578*	5336 $\pm$ 1214***
		缓解	573 $\pm$ 316§	977 $\pm$ 102§	2544 $\pm$ 498§
	+OMS646 (20 μ g/mL)	急性	未确定	6974 $\pm$ 556*	未确定
		缓解	832 $\pm$ 150§	1224 $\pm$ 252§	未确定
	+OMS646 (100 μ g/mL)	急性	3705 $\pm$ 777	9913 $\pm$ 984*	2836 $\pm$ 509*
		缓解	3321 $\pm$ 945§§§	733 $\pm$ 102§	1700 $\pm$ 321§
	+ 无关同种型对 照 抗 体 (100 μ g/mL)	急性	5995 $\pm$ 725	18655 $\pm$ 1699	未确定
		缓解	10885 $\pm$ 1380	2711 $\pm$ 371	未确定

[1220] 表24B:补体抑制剂对来自五个健康对照受试者(未患有aHUS)的血清在ADP活化的HMEC-1细胞上的血栓形成(像素² $\pm$ SE)测定中的作用

[1221]

实验条件	对照#1 血栓形成(像素 ² ±SE)	对照#2 血栓形成(像素 ² ±SE)	对照#3 血栓形成(像素 ² ±SE)	对照#4 血栓形成(像素 ² ±SE)	对照#5 血栓形成(像素 ² ±SE)
未治疗的	2880±510	1046 ± 172	1144 ± 193	735 ± 124	2811 ± 609
+sCR1 (150 µg/mL)	5192 ± 637	1527 ± 153	1198 ± 138	2239 ± 243	2384 ± 410
+OMS646 (100 µg/mL)	7637 ± 888	1036 ± 175	731 ± 203	2000 ± 356	7177 ± 1477
+无关同种型 对照抗体(100 µg/mL)	6325 ± 697	1024 ± 235	399 ± 82	45269	未确定

[1222]

与来自aHUS受 试者的血清平 行测定	#1 (急性期血 清)	#1 (缓解期血 清)	#2 (急性期 血清)	#2 (缓解期血 清)	#5 (急性期和 缓解期血清)

[1223] 对于表24A和24B:数据是平均值±SE。[°]P<0.001相对于对照;*P<0.001,***P<0.05相对于未治疗的aHUS急性期;§P<0.001,§§§P<0.05相对于未治疗的aHUS缓解期。

[1224] 图57以图形方式说明了,MASP-2抗体(OMS646)和sCR1对aHUS血清诱导的在ADP活化的HMEC-1细胞上的血栓形成的作用。在图57中,显示的数据为平均值±SE。[°]P<0.0001,^{°°}P<0.01相对于对照;*P<0.0001,**P<0.01 相对于未治疗的aHUS急性期;§P<0.0001相对于未治疗的aHUS缓解期。

[1225] 如表24A和图57中所示,与暴露于来自健康对照受试者的血清的细胞相比,在用在急性期过程中或缓解时收集的aHUS血清处理的HMEC-1细胞上观察到由血栓覆盖的面积显著增加(表24B和图57)。如图57和表24A中所示,OMS646(以100µg/ml和20µg/ml两者)显示了在预先暴露于在急性期过程中获取的aHUS血清的细胞上的血栓形成的部分抑制。抗血栓形成效应在两种不同剂量的OMS646之间是可比较的,并且与sCR1的效应并无不同(图 57和表24A)。无关同种型对照抗体的添加对aHUS血清诱导的血栓形成没有抑制作用。

[1226] 如图57和表24A中进一步所示,OMS646的抑制效应对在缓解期过程中收集的aHUS血清更为明显。事实上,将以100µg/ml和20µg/ml剂量的 OMS646加入在缓解时收集的aHUS患者血清中,导致血栓形成的几乎完全抑制,类似于用sCR1添加观察到的。无关同种型对照

抗体并未显示显著的抑制效应。

[1227] 当计算为三个aHUS患者的平均值时,用补体抑制剂记录的由血栓沉积覆盖的HMEC-1表面的减少百分比(与视为100%的由来自相同患者的未处理血清诱导的血栓面积相比)如下:

[1228] 急性期:

[1229] sCR1 (150 μ g/ml):60%减少

[1230] OMS646 (100 μ g/ml):57%减少

[1231] OMS646 (20 μ g/ml):45%减少

[1232] 缓解期:

[1233] sCR1 (150 μ g/ml):85%减少

[1234] OMS646 (100 μ g/ml):79%减少

[1235] OMS646 (20 μ g/ml):89%减少

[1236] 结果讨论:

[1237] 该实施例中的结果证实了MASP-2抑制性抗体,例如OMS646(如实施例40中所述生成),对aHUS血清诱导的在HMEC-1细胞上的血栓形成具有强抑制作用。令人惊讶的是,OMS646对血栓形成的抑制作用大于其对在HMEC-1上诱导的C5b-9沉积的作用(如实施例41中所述)。同样令人惊讶的是,将以100 μ g/ml和20 μ g/ml剂量的OMS646加入在缓解时收集的aHUS患者血清中,导致血栓形成的几乎完全抑制。另一个令人惊讶的发现是OMS646在急性期和缓解时均与阳性对照sCR1一样有效的观察,所述sCR1是补体系统的广泛且几乎完全的抑制剂(Weisman H.等人,Science 249:146-151,1990;Lazar H. 等人,Circulation 100:1438-1442,1999)。

[1238] 值得注意的是,来自健康受试者的对照血清也诱导了在HMEC-1细胞上的适度血栓形成。我们并未观察到用OMS646或sCR1对于对照血清诱导的血栓形成的一致抑制作用。尽管不希望受任何特定理论的束缚,但认为对照诱导的血栓并不依赖于补体,如通过在与对照血清一起温育的HMEC-1上观察到的非常低的C5b-9沉积所支持的(参见实施例41)。

[1239] 结论:

[1240] 总之,观察到的MASP-2抑制性抗体例如OMS646的抗血栓效应似乎基本上大于基于在该实验系统中观察到的OMS646对C5b-9沉积的抑制作用所预计的(如实施例41中所述和图56中所示的)。例如,如名称为“C5a/C5aR interaction mediates complement activation and thrombosis on endothelial cells in atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS)”的Gastoldi等人,Immunobiology 217:1129-1222 Abstract 48(2012)中所述,确定了抑制C5b-9沉积(60%减少)的C5抗体的添加将HMEC-1上的血栓形成限制到可比较的程度(60%减少)。相比之下,MASP-2抑制性抗体(以100 μ g/mL的OMS646)以(急性期=40%减少;缓解期=54%减少)的平均值抑制C5b-9沉积;并且以基本上更高的百分比(急性期=57%减少;缓解期=79%减少)抑制血栓形成。相比之下,OMS646抑制补体沉积的百分比低于阳性对照补体抑制剂(以150 μ g/mL的sCR1,C5b-9沉积的急性期抑制=91%减少;缓解期=91%减少),但在抑制血栓形成方面与sCR1阳性对照(以150 μ g/mL的sCR1,急性期=60%减少;缓解期=85%减少)同样有效。这些结果证实了,MASP-2抑制性抗体(例如,OMS646)在抑制血清中的血栓形成方面令人惊讶地有效,所述血清从在急性期和缓解期两

者中的aHUS受试者获得。

[1241] 按照前文,在一个实施方案中,本发明提供了抑制患有或处于发展血栓性微血管病(TMA)的风险中的受试者中的血栓形成的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,TMA选自溶血性尿毒症综合征(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)。在一个实施方案中,TMA是aHUS。在一个实施方案中,将组合物施用于在疾病的急性期过程中的aHUS患者。在一个实施方案中,将组合物施用于在缓解期过程中的aHUS患者(即,在已从急性期aHUS的发作中恢复或部分恢复的受试者中,此类缓解例如通过增加的血小板计数和/或减少的血清LDH浓度得到证明,例如如在此通过引用并入本文的Loirat C等人,Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60,2011中所述)。

[1242] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P突变,和/或其中所述抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制旁路途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径或旁路途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径和旁路补体途径保持完整)。

[1243] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自患有TMA例如aHUS(急性期或缓解期)的受试者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。在一些实施方案中,与对血清中的C5b-9沉积的抑制作用相比,MASP-2抑制性抗体以至少20%或更高(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制来自患有aHUS的受试者的血清中的血栓形成。

[1244] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体将来自缓解期中的aHUS患者的血清中的血栓形成抑制至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。在一些实施方案中,与对血清中的C5b-9沉积的抑制作用相比,MASP-2抑制性抗体以至少20%或更高(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制缓解期中的aHUS患者的血清中的血栓形成。

[1245] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体经由静脉内导管或其它导管递送方法施用于受试者。

[1246] 在一个实施方案中,本发明提供了抑制患有TMA的受试者中的血栓形成的方法,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含(I)(a)包含以下的重链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii)包含来自SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b)包含

以下的轻链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67 具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70 具有至少90%同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[1247] 在一个实施方案中,TMA选自非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)(急性期或缓解期)、HUS和TTP。在一个实施方案中,受试者在aHUS的急性期中。在一个实施方案中,受试者在aHUS的缓解期中。

[1248] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1249] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。结合成员之间的竞争可以容易地在体外进行测定,例如使用ELISA和/或通过给一个结合成员加上特异性报告分子标签,所述结合成员可以在其它未加上标签的结合成员的存在下检测到,以使得能够鉴定结合相同表位或重叠表位的特异性结合成员。因此,目前提供了包含人抗体抗原结合位点的特异性抗体或其抗原结合片段,其与参考抗体OMS646竞争结合人MASP-2。

[1250] 实施例43

[1251] 该实施例证实了人MASP-2抑制性抗体(OMS646)能够抑制TMA患者血浆介导的具有真皮起源的原代人微血管内皮细胞(MVEC)中的细胞凋亡诱导。

[1252] 背景/基本原理:

[1253] 已知TMA的病理生理学涉及由各种因素诱导的内皮细胞损伤,其随后为通过血小板栓子和/或纤维蛋白血栓的小血管(例如小动脉和毛细血管)阻塞(Hirt-Minkowsk P.等人,Nephron Clin Pract 114:c219-c235,2010;Goldberg R.J.等人,Am J Kidney Dis 56(6):1168-1174,2010)。已显示了,当在体外暴露于来自患有TMA相关病症的患者的血浆时,MVEC经历细胞凋亡损伤(参见Stefanescu等人,Blood第112(2)卷:340-349,2008;Mitra D.等人,Blood 89:1224-1234,1997)。已在从此类患者的组织活组织检查(皮肤、骨髓、脾、肾、回肠)获得的MVEC中记录了与TMA相关的细胞凋亡损伤。还已显示了,对MVEC的细胞凋亡性损伤减少了MVEC中的膜结合补体调节蛋白的水平(参见例如,Mold&Morris,Immunology 102:359-364,2001;Christmas等人,Immunology 119:522,2006)。

[1254] 涉及终末补体组分的正反馈环被认为涉及TMA的病理生理学,包括非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS),以及与灾难性抗磷脂综合征(CAPS)相关的 TMA、德戈斯病,以及继发于癌症、癌症化学疗法、自身免疫和移植的TMA,这些状况各自己知或被认为响应用mAb依库

珠单抗的抗C5疗法 (Chapin J. 等人, Brit. J. Hematol 157:772-774, 2012; Tsai 等人, Br J Haematol 162 (4):558-559, 2013); Magro C.M. 等人, Journal of Rare Diseases 8:185, 2013)。

[1255] 进行下述实验,以分析人MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 阻断TMA患者血浆介导的在从患者获得的血浆样品中的原代人真皮MVEC中的细胞凋亡诱导的能力,所述患者患有aHUS、ADAMTS13缺陷相关血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)、CAPS和全身性德戈斯病,以及继发于癌症、移植、自身免疫性疾病和化学疗法的TMA。

[1256] 方法:

[1257] 进行体外测定,以分析MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 阻断TMA患者血浆介导的具有真皮起源的原代人MVEC中的细胞凋亡诱导的功效,如在此通过引用并入本文的Stefanescu R. 等人, Blood第112 (2) 卷:340-349, 2008中所述。该测定中使用的血浆样品得自健康对照受试者和患有急性期或恢复期血栓性微血管病的个体的集合。通过检测在外周血涂片上的裂红细胞来评价TMA患者中微血管病的存在。另外, TTP如Stefanescu R. 等人, Blood第112 (2) 卷:340-349, 2008中所述进行诊断。

[1258] 内皮细胞 (EC) 培养

[1259] 如Stefanescu等人中所述,具有真皮起源的原代人MVEC购自ScienCell Research Labs (San Diego, CA)。MVEC一直到第5和第6代表达CD34 (Blood 89:1224-1234, 1997)。将MVEC维持在用0.1%明胶水溶液包被的聚苯乙烯烧瓶中的ECM1001培养基 (ScienCell Research Labs) 中,所述培养基含有内皮细胞生长补充剂、青霉素、链霉素和15%胎牛血清。所有MVEC都以第2至6代使用。传代培养涉及5至10分钟暴露于0.25%胰蛋白酶-EDTA。

[1260] 细胞凋亡测定

[1261] 已知对TTP/HUS血浆诱导的细胞凋亡敏感的具有真皮起源的代表性原代人MVEC用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 进行洗涤,并且在用0.1%明胶水溶液包被的12孔板的腔室中以 0.15×10^6 个活细胞/mL铺平板。铺平板的MVEC细胞在完全培养基中饥饿24小时,然后在MASP-2 mAb OMS646 (150 μ g/mL) 的存在或不存在下,暴露于各种浓度 (2%至20% v/v) 的TMA患者血浆样品或健康供体血浆18小时,然后通过胰蛋白酶消化来收获细胞。每个TMA患者样品一式两份进行分析。使用碘化丙啶 (PI) 染色来评价血浆介导的细胞凋亡程度,具有在细胞荧光图中分析的 $>5 \times 10^3$ 个细胞,并且通过计算机软件 (MCycle Av, Phoenix Flow Systems, San Diego, CA) 定义A0峰。还按照制造商的说明书 (Roche Diagnostics, Mannheim, 德国), 执行来自细胞裂解物的细胞质组蛋白相关DNA片段的基于酶联免疫吸附测定 (ELISA) 的定量。

[1262] 结果:

[1263] 在MASP-2 mAb (OMS646) 的存在下, TMA患者血浆诱导的MVEC细胞凋亡测定的结果显示于下表25中。

[1264] 表25: 在MASP-2 mAb (OMS646) 的存在下,对具有真皮起源的原代人 MVEC测试的TMA患者血浆

[1265]

受试者#	年龄/性别	临床诊断 (TMA) 及其它状况	MASP-2 ng/ml	基于 Cre/LDH 的诊断	C5a	sC5-b9	ADAMS 活性	基于 ADAMS 活性的诊断	用 OMS646 的保护
#2	41/f	TTP	174	TTP	34.42	772	30%	aHUS	应答者
#3	52/f	TTP	150	TTP	48.32	1399	70%	aHUS	无应答者
#4	20/m	TTP	224	TTP	36.9	1187	<10%	TTP	应答者
#10	60/f	TTP	175.4	TTP	49.5	4406	64%	aHUS	无应答者
#11	59/f	TTP	144.9	TTP	40.3	1352	<10%	TTP	无应答者
#13	49/f	HUS、癌症、TTP	142.8	TTP	48.6	3843	86%	aHUS	无应答者
#42	27/m	TTP	341.5	TTP	100.0	5332	<5%	TTP	无应答者
#46	25/f	TTP、Degos、SLE	225.11	TTP	53.9	3426	ND	ND	应答者
#48	53/f	TTP、SLE、肾炎 s/p 肾移植	788.5	aHUS	31.2	1066	66%	aHUS	应答者
#49	64/f	TTP、APLA、CVA	494.5		35.4	2100	ND	ND	应答者
#51	25/f	aHUS、APLA	313.1	TTP	26.8	1595	23%	aHUS	应答者
#52	56/f	aHUS、SLE	333.1	TTP	18.9	1103	97%	aHUS	无应答者
#53	56/f	aHUS 缓解	189.9	缓解TTP	28.69	344	74%	aHUS	无应答者

[1266] 表25中使用的缩写：

[1267] “APLA”=与灾难性抗磷脂综合征 (CAPS) 相关的抗磷脂抗体。

[1268] “SLE”=系统性红斑狼疮

[1269] “CVA”=脑血管意外 (中风)

[1270] 与Stefanescu R.等人,Blood第112(2)卷:340-349,2008中报道的结果一致,在MASP-2抗体的不存在,在13个TMA患者血浆样品的存在下,对于具有真皮起源的原代MVEC观察到显著的细胞凋亡。来自健康人受试者的对照血浆样品平行运行,并且不诱导MVEC中的细胞凋亡(数据未显示)。如表25中所示, MASP-2抑制性mAb (OMS646) 在所测试的13个患者血浆样品的6个(46%)中,抑制TMA患者血浆介导的原代MVEC中的细胞凋亡诱导(表25中的“应答者”)。特别地,注意到MASP-2抑制性mAb (OMS646) 抑制从患有aHUS、TTP、德戈斯病、SLE、移植和APLA (CAPS) 的患者获得的血浆中的细胞凋亡。关于在该测定中测试的其中

MASP-2 mAb并未阻断细胞凋亡的七个患者样品(表25中的“无应答者”),注意到细胞凋亡可以通过几种途径进行诱导,并非所有途径都是补体依赖性的。例如,如Stefanescu R.等人,Blood第112(2)卷:340-349,2008中指出的,EC测定中的细胞凋亡取决于基础EC活化状态,其受可能在确定诱导细胞凋亡所需的损伤水平中起作用的血浆因子影响。如Stefanescu R.等人进一步指出的,TMA患者血浆中可能存在能够调节细胞凋亡的另外因子,例如细胞因子和补体系统的各种组分。因此,由于这些复杂因子,MASP-2抗体并未在显示出TMA血浆诱导的细胞凋亡的所有血浆样品中显示阻断效应并不令人惊讶。

[1271] 在这方面进一步值得注意的是,使用具有抗C5抗体依库珠单抗的TMA血浆诱导的细胞凋亡测定进行类似分析,并且观察到非常相似的结果(参见 Chapin等人,Blood (ASH Annual Meeting Abstracts):Abstract#3342,120:2012)。依库珠单抗(高度成功的商业产品)的临床功效似乎大于该模型中证实的功效,提示了该体外模型可能低估了补体抑制药物的临床潜力。

[1272] 这些结果证实了,MASP-2抑制性抗体例如OMS646有效抑制TMA血浆诱导的从患者获得的血浆中的细胞凋亡,所述患者患有TMA例如aHUS、TTP、德戈斯病、SLE、移植和APLA(CAPS)。已知内皮损害和细胞凋亡在TMA例如特发性TTP和散发性HUS的病理学中起关键作用(Kim等人,Microvascular Research第62(2)卷:83-93,2001)。如Dang等人中所述,在TTP患者的脾红髓中证实了细胞凋亡,但在健康对照受试者中并未证实(Dang等人,Blood 93(4):1264-1270,1999)。在HUS患者中具有MVEC起源的肾小球细胞中也已观察到细胞凋亡的证据(Arends M.J.等人,Hum Pathol 20:89,1989)。因此,预计MASP-2抑制剂,例如MASP-2抑制性抗体(例如,OMS646)的施用将是患者中的有效疗法,所述患者患有TMA例如aHUS、TTP或其它微血管病症例如其它TMA,包括CAPS、全身性德戈斯病和继发于癌症的TMA;继发于化学疗法的TMA,或继发于移植的TMA。

[1273] 按照前文,在一个实施方案中,本发明提供了抑制患有或处于发展血栓性微血管病(TMA)的风险中的受试者中的内皮细胞损害和/或内皮细胞凋亡和/或血栓形成的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,TMA选自非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和溶血性尿毒症综合征(HUS)。在一个实施方案中,TMA是aHUS。在一个实施方案中,将组合物施用于在疾病的急性期过程中的aHUS患者。在一个实施方案中,将组合物施用于在缓解期过程中的aHUS患者(即,在已从急性期aHUS的发作中恢复或部分恢复的受试者中,此类缓解例如通过增加的血小板计数和/或减少的血清LDH浓度得到证明,例如如在此通过引用并入本文的Loirat C等人,Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60,2011中所述)。

[1274] 在一个实施方案中,受试者患有或处于发展TMA的风险中,所述TMA是(i)继发于癌症的TMA;(ii)继发于化学疗法的TMA;或(iii)继发于移植(例如器官移植,例如肾移植或同种异体造血干细胞移植)的TMA。在一个实施方案中,受试者患有或处于发展厄舒尔曼综合征(USS)的风险中。在一个实施方案中,受试者患有或处于发展德戈斯病的风险中。在一个实施方案中,受试者患有或处于发展灾难性抗磷脂综合征(CAPS)的风险中。

[1275] 按照本文公开的任何实施方案,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中

的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P突变,和/或其中所述抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制旁路途径。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径保持完整)。

[1276] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体抑制血浆诱导的血清中的MVEC 细胞凋亡,所述血清来自患有TMA例如aHUS(急性期或缓解期)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、继发于癌症的TMA;继发于化学疗法的TMA;继发于移植(例如器官移植,例如肾移植或同种异体造血干细胞移植)的TMA的受试者,或来自患有厄舒尔曼综合征(USS)的受试者,或来自患有德戈斯病的受试者,或来自患有灾难性抗磷脂综合征(CAPS)的受试者,其中与未处理的血清相比,所述血浆诱导的MVEC细胞凋亡被抑制至少5%,例如至少10%,例如至少20%,例如至少30%,例如至少40%,例如至少50%,例如至少60%,例如至少70%,例如至少80%,例如至少85%,例如至少90%,例如至少95%直到99%。在一些实施方案中,与对血清中的C5b-9沉积的抑制作用相比,MASP-2抑制性抗体以至少20%或更高(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制血清中的血栓形成,所述血清来自患有TMA例如aHUS(急性期或缓解期)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、继发于癌症的TMA;继发于化学疗法的TMA;继发于移植(例如器官移植,例如肾移植或同种异体造血干细胞移植)的TMA的受试者,或来自患有厄舒尔曼综合征(USS)的受试者,或来自患有德戈斯病的受试者,或来自患有灾难性抗磷脂综合征(CAPS)的受试者。

[1277] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体经由静脉内导管或其它导管递送方法施用于受试者。

[1278] 在一个实施方案中,本发明提供了抑制受试者中的血栓形成的方法,所述受试者患有TMA例如aHUS(急性期或缓解期)、溶血性尿毒症综合征(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、继发于癌症的TMA;继发于化学疗法的TMA;继发于移植(例如器官移植,例如肾移植或同种异体造血干细胞移植)的TMA,或在来自患有厄舒尔曼综合征(USS)的受试者的血清中,或在来自患有德戈斯病的受试者的血清中,或在来自患有灾难性抗磷脂综合征(CAPS)的受试者的血清中,所述方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含(I)(a)包含以下的重链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii)包含来自SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b)包含以下的轻链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II)其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如,至少91%、至少

92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少 97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[1279] 在一个实施方案中,受试者患有选自以下的TMA:继发于癌症的TMA;继发于化学疗法的TMA;继发于移植(例如器官移植,例如肾移植或同种异体造血干细胞移植)的TMA、厄舒尔曼综合征(USS)、德戈斯病和灾难性抗磷脂综合征(CAPS)。

[1280] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1281] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[1282] 实施例44

[1283] 该实施例描述了进行中的2期临床试验的初步结果,以评估全人单克隆 MASP-2抑制性抗体在患有血栓性微血管病(TMA)的成人中的安全性和临床功效。

[1284] 背景:TMA是一组罕见的、使人衰弱且危及生命的病症,其特征是在身体器官最常见的肾和大脑的微循环中的过量血栓(凝块)-血小板聚集。

[1285] 方法:

[1286] 开放标签的2期临床试验的第一阶段在患有原发性非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)、血浆疗法抗性aHUS和血栓性血小板减少性紫癜(TTP)的受试者中进行。鉴于该疾病的危及生命的性质,这项2期临床试验没有安慰剂臂。

[1287] 受试者在筛选时年龄 ≥ 18 岁,并且仅在他们具有下述TMA之一的诊断时,才包括在这项研究中:

[1288] 1) 原发性aHUS,临床上诊断且具有血浆中的ADAMTS13活性 $> 10\%$ 。具有或不具有记录的补体突变或抗CFH抗体的患者是合格的。患者根据其对血浆疗法(血浆置换或血浆输注)的应答进行分类:

[1289] o 为了这项研究的目的,血浆疗法抗性的aHUS患者满足下述全部:

[1290] (a) 尽管在筛选之前的至少四次血浆疗法治疗,但筛查血小板计数 $< 150,000/\mu\text{L}$;

[1291] (b) 微血管病性溶血的证据(裂红细胞、血清乳酸脱氢酶(LDH) $>$ 正常上限(ULN)、结合珠蛋白 $<$ LLN的存在);和

[1292] (c) 血清肌酐 $>$ ULN。

[1293] o 响应慢性血浆疗法的aHUS患者(血浆疗法敏感性)必须需要在OMS646 的第一次剂量前每周至少一次的血浆疗法,共4周,具有血清肌酐 $>$ ULN。

[1294] 2) TIP定义为具有下述全部:

[1295] o 血小板计数 $< 150,000/\mu\text{L}$;

[1296] o 微血管病性溶血的证据(裂红细胞、血清LDH $>$ ULN或结合珠蛋白 $<$ LLN的存在);

和

[1297] o在TTP的当前发作期间或历史上的ADAMTS13活性 $\leq 10\%$ 。

[1298] 注意:如果受试者在筛查之前的三个月内具有依库珠单抗疗法,则他们从研究中排除。作为血浆疗法抗性合格的患者的标准是为了确定这项研究中的合格性的目的。在本发明的进一步方面,待用MASP-2抑制剂治疗的血浆疗法抗性的患者先用血浆疗法治疗至少一次,并且在此类血浆疗法治疗后仍具有aHUS的一种或多种临床标记物,其通过此类血浆疗法治疗并未充分减少或消除。

[1299] 这项研究中使用的单克隆抗体OMS646是针对人MASP-2的全人IgG4 mAb。如实施例40中证实的,OMS646与重组MASP-2亲合地结合(在100pM的范围内的表观平衡解离常数),并且显示出超过同源蛋白C1s、C1r和MASP-1 大于5,000倍的选择性。在功能测定中,OMS646以纳摩尔效力(导致50%抑制 $[IC_{50}]$ 的大约3nM的浓度)抑制人凝集素途径,但对经典途径没有显著作用。通过对小鼠、非人灵长类动物和人的静脉内(IV)或皮下(SC)注射施用的OMS646 导致高血浆浓度,其与离体测定中的凝集素途径激活的压制相关。如实施例42中进一步描述的,OMS646治疗减少了TMA的体外模型中的C5b-9沉积和血栓形成以及TMA的小鼠模型中的血栓形成,因此证实了OMS646具有治疗效用。

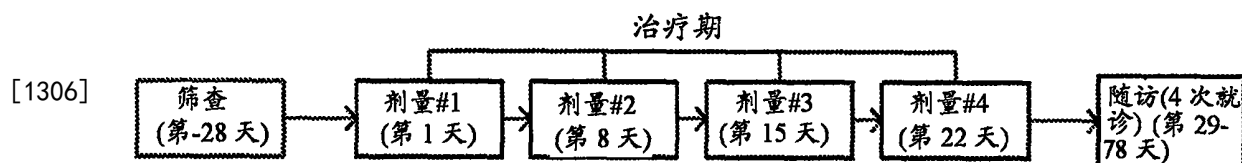
[1300] 在这项研究中,OMS646原料药以100mg/mL的浓度提供,其进一步稀释用于IV施用。使用注射器从小瓶中抽取适当计算体积的OMS646 100mg/mL注射溶液用于剂量制备。输液袋在制备的四小时内施用。

[1301] 在研究的第1阶段,将OMS646施用于三个受试者/队列的剂量递增队列。第1阶段的每个受试者接受四个每周一次的OMS646剂量,如下表26中所示。

[1302] 表26:关于第1阶段的给药时间表

阶段, 队列	受试者数	OMS646 剂量
	目	(mg/kg)
[1303] 1, 队列 1	3	0.675, 每周一次 x 4
1, 队列 2	3	2.0, 每周一次 x 4
[1304] 1, 队列 3	3	4.0, 每周一次 x 4

[1305] 第1阶段研究设计示意图



[1307] 稀释的研究药物在30分钟时期内进行静脉内输注。

[1308] 主要终点

[1309] 共同主要终点是:

[1310] • 如通过AE、生命体征、ECG和临床实验室测试评价的安全性

[1311] • 如通过血小板计数的变化评价的临床活性

[1312] 次要终点

- [1313] 次要终点是：
- [1314] • TMA临床活性
- [1315] o血清LDH
- [1316] o血清结合珠蛋白
- [1317] o血红蛋白
- [1318] o血清肌酐
- [1319] o TMA相关症状
- [1320] o需要血浆治疗(血浆置换或血浆输注)
- [1321] o需要透析
- [1322] 允许的伴随疗法
- [1323] • 血浆疗法抗性aHUS-如果研究者将其视为医学上指示的,则允许在 OMS646治疗期间的血浆疗法。
- [1324] • 响应慢性血浆疗法的aHUS-研究者建议应该继续血浆疗法,直到存在 TMA改善的迹象,例如血小板计数增加、LDH降低、结合珠蛋白增加、血红蛋白增加、肌酐降低,此时研究者建议考虑撤消血浆疗法,并且监测TMA参数以评价是否可以停用血浆疗法。
- [1325] • TTP-如果研究者将其视为医学上指示的,则允许血浆疗法。
- [1326] • 研究者建议肾透析疗法应该根据护理标准进行管理。
- [1327] • 在研究期间并未施用依库珠单抗。
- [1328] 结果:
- [1329] 受试者的第一个队列由用最低剂量的OMS646治疗的三个aHUS患者组成。在这项研究队列的所有患者中,观察到跨越TMA疾病标记物的改善。血小板计数、血清乳酸脱氢酶(LDH)和血清结合珠蛋白作为疾病活性的标记物进行测量。当与基线水平相比较时,血小板计数在所有患者中得到改善。血清 LDH水平在一个患者中保持正常,在另一个患者中基本上降低至接近于正常范围,并且在第三个患者中保持升高。结合珠蛋白在两个患者中得到改善,在一个患者中正常化。具有独立肾功能的一个患者中的肌酐水平也得到改善。
- [1330] 如设计的,三个患者在该临床试验的第二个中剂量队列中进行治疗。两个患者患有血浆疗法抗性aHUS,并且一个患者患有血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。两个aHUS患者均在研究入选之前和之时处于肾透析。在第二个或中剂量队列中,患有血浆疗法抗性aHUS的两个患者证实了:
- [1331] • 平均血小板计数的47%增加,导致具有在正常范围内的计数的两个患者
- [1332] • 平均裂红细胞计数的86%减少,其中裂红细胞在一个患者中消失
- [1333] • 平均结合珠蛋白的71%增加,其中两个患者在治疗期间达到正常范围,一个在最后一个剂量之后的一周略低于正常
- [1334] • LDH平均水平的5%降低,其中两个患者中的水平保持略微高于正常范围。
- [1335] 患有TTP的中剂量队列患者在进入研究之前需要重复的血浆输注疗法。实验室参数并未显示一致的改善,但患者在处于用OMS646的治疗时不需要血浆治疗,迄今为止,自从治疗完成以后也不需要。
- [1336] 在治疗期自始至终,该药物由所有患者良好耐受。基于来自第二个或中剂量队列的阳性数据,启动第三个或高剂量队列,并且一个aHUS患者已经完成了研究治疗期。关于所

有患者提及的数据包括到最后一个剂量之后一周的测量。

[1337] 第三个(高剂量)队列中的第一个患者-患有另外的并发症包括丙型肝炎、冷球蛋白血症和淋巴瘤的血浆疗法抗性的aHUS患者-也已完成了用OMS646的治疗。在OMS646治疗之前,患者需要重复透析。在治疗自始至终以及OMS646疗程完成之后,迄今为止,患者仍未进行透析。血液学和肾参数显示了:

[1338] • 血小板计数的63%改善,恢复到正常水平

[1339] • 裂红细胞的100%降低

[1340] • 结合珠蛋白从无法检测的水平增加并且正常化

[1341] • LDH的43%降低,导致仅略高于正常的水平

[1342] • 肌酐水平的24%减少

[1343] 与第一队列和第二队列一样,该药物是良好耐受的。

[1344] 这项开放标签的2期临床试验的主要终点是血小板计数的变化。中剂量队列和高剂量队列中的所有三个aHUS患者(中剂量队列中的两个和高剂量队列中的一个)中的血小板计数都恢复正常,具有距离基线大约68,000个血小板 /mL的统计学显著的平均增加($p=0.0055$)。

[1345] 总之,迄今为止从这项2期临床试验获得的数据显示OMS646在患有原发性aHUS、血浆疗法抗性aHUS的患者和患有TIP的患者中的功效。

[1346] 按照前文,在一个实施方案中,本发明提供了治疗患有血浆疗法抗性 aHUS的受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一些实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体的组合物之前,鉴定患有血浆疗法抗性aHUS的受试者的步骤。

[1347] 按照本文公开的任何实施方案,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P突变。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径保持完整)。

[1348] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以有效改善与aHUS相关的至少一种或多种临床参数的量进行施用,所述临床参数例如血小板计数增加、LDH 降低、结合珠蛋白增加、血红蛋白增加和/或肌酐降低。

[1349] 在一些实施方案中,该方法包括经由导管(例如,静脉内)将MASP-2抑制性抗体施用于患有血浆疗法抗性aHUS的受试者第一时间段(例如,至少一天至一周或两周),随后将MASP-2抑制性抗体皮下施用于受试者第二时间段(例如,至少两周或更长时间的慢性期)。在一些实施方案中,在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆疗法的不存在下发生。在一些实施方案中,在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆疗法的存在下发生。

[1350] 在一些实施方案中,该方法包括向患有血浆疗法抗性aHUS的受试者静脉内、肌内或优选地皮下施用MASP-2抑制性抗体。治疗可以是慢性的,并且每天至每月施用一次,但优

选每两周一次。MASP-2抑制性抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[1351] 在一个实施方案中,该方法包括治疗患有血浆疗法抗性aHUS的受试者,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含(I) (a) 包含以下的重链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含来自 SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b) 包含以下的轻链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[1352] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1353] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[1354] 实施例45

[1355] 该实施例描述了在进行中的2期临床试验中获得的另外结果,以评估实施例44中描述的全人单克隆MASP-2抑制性抗体在患有血栓性微血管病 (TMA) 的成人中的安全性和临床功效。

[1356] 背景:如实施例44中所述,TMA是一组罕见的、使人衰弱且危及生命的病症,其特征存在于在身体器官最常见的肾和大脑的微循环中的过量血栓(凝块) -血小板聚集。如本文所述,移植相关TMA (TA-TMA) 是可以在移植患者例如造血干细胞移植 (HSCT) 受体中发生的破坏性综合征。该实施例描述了2期临床试验的初步结果,以评估全人单克隆MASP-2抑制性抗体在患有造血干细胞移植相关TMA的患者中的安全性和临床功效。

[1357] 方法:

[1358] 如实施例44中所述,2期TMA试验由MASP-2抑制性抗体OMS646的三级剂量范围阶段,随后为固定剂量阶段组成。如实施例44中进一步描述的,从aHUS患者和一个TTP患者中获得阳性结果,具有在功效测量方面一致和稳固的改善。如低剂量队列中,在治疗期自始至终,OMS646由中剂量队列和高剂量队列中的所有患者良好耐受。临床前毒性研究已完成,并且证实了没有安全问题,允许在临床试验中的慢性给药。

[1359] 如实施例44中所述,来自OMS646 2期TMA临床试验的数据从aHUS 和TTP患者中获得。使用实施例44中所述的方法,目前已对于高剂量队列中的另外一个造血干细胞移植相关TMA患者完成了给药。这是具有淋巴瘤病史的患者,他经历了关于其的造血干细胞移植。他的移植后病程因许多危及生命的病症,包括需要血小板输注的TMA而复杂化。尽管输血,

他的干细胞移植相关TMA仍持续,并且他入选了OMS646 2期试验。

[1360] 结果:

[1361] 在如实施例44中所述的4周给药期(高剂量队列)之后,患有干细胞移植相关TMA的患者证实了:

[1362] • 血小板计数翻了两番,导致多于100,000的血小板计数;

[1363] • 结合珠蛋白水平增加了多于一倍并且正常;

[1364] • 血浆乳酸脱氢酶水平(血管内损害的量度)降低了35%,但仍高于正常;

[1365] • 裂红细胞计数保持为仅一个。

[1366] 在用OMS646给药自始至终以及自从完成OMS646治疗以后,患者不需要任何血小板输注或血浆置换术。

[1367] 总之,迄今为止从这项2期临床试验获得的数据(如实施例44和该实施例中所述)显示了OMS646在患有原发性aHUS、血浆疗法抗性aHUS、TTP的患者和患有与造血干细胞移植相关的TMA的患者中的功效。

[1368] 按照前文,在一个实施方案中,本发明提供了治疗患有与造血干细胞移植相关的TMA的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,受试者患有与造血干细胞移植相关的TMA,所述TMA对用血小板输注和/或血浆置换术的治疗是抗性的。在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物的步骤之前,鉴定患有与造血干细胞移植相关的TMA的人受试者,所述TMA对用血小板输注和/或血浆置换术的治疗是抗性的。

[1369] 按照本文公开的任何实施方案,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P突变。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径保持完整)。

[1370] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以有效改善与造血干细胞移植相关的TMA相关的至少一种或多种临床参数的量进行施用,所述临床参数例如血小板计数增加(例如,在治疗前的血小板计数的至少两倍、至少三倍、至少四倍)、结合珠蛋白增加和/或乳酸脱氢酶降低。

[1371] 在一些实施方案中,该方法包括经由导管(例如,静脉内)将MASP-2抑制性抗体施用于患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者第一时间段(例如,至少一天至一周或两周),随后将MASP-2抑制性抗体皮下施用于受试者第二时间段(例如,至少两周或更长时间的慢性期)。在一些实施方案中,在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆疗法的不存在下发生。在一些实施方案中,在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆疗法的存在下发生。

[1372] 在一些实施方案中,该方法包括向患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者静

脉内、肌内或优选地皮下施用MASP-2抑制性抗体。治疗可以是慢性的,并且每天至每月施用一次,但优选每两周一次。MASP-2抑制性抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[1373] 在一个实施方案中,该方法包括治疗患有与造血干细胞移植相关的TMA 的受试者,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含(I) (a) 包含以下的重链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和 ii) 包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b) 包含以下的轻链可变区:i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链 CDR-L1;和 ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70 具有至少90%同一性(例如,至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[1374] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1375] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[1376] 实施例46

[1377] 该实施例描述了在进行中的2期临床试验中获得的另外结果,以评估实施例44和45中描述的全人单克隆MASP-2抑制性抗体在患有血栓性微血管病(TMA)的成人中的安全性和临床功效。

[1378] 背景:如实施例45中所述,移植相关TMA (TA-TMA) 是可以在移植患者例如造血干细胞移植(HSCT)受体中发生的破坏性综合征。造血干细胞移植相关TMA (HSCT-TMA) 是由内皮损伤触发的危及生命的并发症。肾是最常受累的器官,尽管HSCT-TMA可以是也涉及肺、肠、心脏和脑的多系统疾病。即使轻度TMA的发生也与长期肾功能受损相关。基于不同的诊断标准和预处理以及移植物抗宿主病预防方案,同种异体HSCT后相关TMA的发展频率不同,其中钙调磷酸酶抑制剂是最常见的所牵涉的药物(Ho VT等人,Biol Blood Marrow Transplant,11(8):571-5,2005)。免疫抑制性钙调磷酸酶抑制剂方案的修改可能导致一些患者在减少或停用钙调磷酸酶抑制剂施用的几周内的 TMA改善。

[1379] TMA是潜在地危及生命的HSCT并发症,并且目前在很大程度上通过改善诱发因素进行管理,包括免疫抑制剂(例如钙调磷酸酶抑制剂)的避免和进行中感染的治疗,以及支持性措施例如血液透析。尽管许多HSCT-TMA患者良好响应免疫抑制剂的减少或停用,但存在尽管保守治疗措施,但仍具有持续性HSCT-TMA(即TMA并不响应免疫抑制剂的减少或停用)的患者子集。并不响应这些保守治疗措施的患者具有较差的预后。血浆置换并未显示功

效,并且没有其它疗法被批准。

[1380] 实施例45描述了2期临床试验的初步积极结果,以评估全人单克隆 MASP-2抑制性抗体(OMS646)在患有持续性造血干细胞移植相关TMA (HSCT-TMA)的患者中的安全性和临床功效。该实施例描述了进行中的2期临床试验的另外结果,以评估OMS646在对保守治疗措施抗性的另外三个患有持续性HSCT-TMA的受试者中的安全性和临床功效。

[1381] 方法:

[1382] 如实施例44中所述,2期TMA试验由MASP-2抑制性抗体OMS646的三级剂量范围阶段,随后为固定剂量阶段组成。在治疗期自始至终,OMS646 由低剂量队列、中剂量队列和高剂量队列中的所有患者良好耐受。临床前毒性研究已完成,并且证实了没有安全问题,允许在临床试验中的慢性给药。

[1383] 2期TMA试验包括患有对保守治疗措施抗性的持续性HSCT相关TMA 的受试者,为了这项研究的目的,所述受试者定义为在免疫抑制剂(例如,钙调磷酸酶抑制剂治疗)的减少或停用之后至少两周之后或在移植后至少30天具有下述全部:

[1384] -血小板减少症(血小板计数 $<150,000/\mu\text{L}$);和

[1385] -微血管病性溶血性贫血的证据(裂红细胞、血清乳酸脱氢酶(LDH) $>$ 正常上限(ULN)、或结合珠蛋白 $<$ 正常下限(LLN)的存在)。

[1386] 用于HSCT相关TMA的允许的伴随疗法

[1387] • 如果研究者将其视为医学上指示的,则允许在OMS646治疗期间的血浆疗法。给予血浆疗法的患者可以接受另外一半剂量的OMS646。

[1388] • 研究者建议肾透析疗法应该根据护理标准进行管理。

[1389] • 在研究期间并未施用依库珠单抗。

[1390] 进行中的TMA研究包括患有持续性HSCT-TMA的受试者,所述持续性 HSCT-TMA对标准治疗措施是抗性的(即,在钙调磷酸酶抑制剂治疗的减少或停用后至少两周的持续性TMA)。

[1391] 如实施例45中所述,使用实施例44中所述的方法,对于高剂量队列(每周一次IV施用的4mg/kg OMS646,共4周)中的患有持续性HSCT-TMA的患者(患者#1)完成了给药。

[1392] 如下所述,目前已对于另外4个患有持续性HSCT-TMA的患者完成了给药。

[1393] 患者#1(在实施例44中描述)用OMS646(每周IV一次4mg/kg)治疗4周;

[1394] 患者#2和#3用OMS646(每周IV一次4mg/kg)治疗8周;

[1395] 患者#4和#5分别用OMS646(每周IV一次4mg/kg)治疗两周和三周。患者#4和#5分别在两周和三周后退出研究,并不响应治疗并且恶化。值得注意的是,这些患者之一在研究进入时具有显著升高的肌酐。

[1396] 结果:

[1397] 患有持续性HSCT-TMA的5个患者入选了这项研究。所有受试者都是成人并且接受用于血液系统恶性肿瘤的HSCT。图58、59和60提供了在用 MASP-2抑制性抗体OMS646治疗后,TMA变量距离基线的变化。这些图提供了关于所有五个患者的数据,其中两个在2-3周后中止研究,其中一个随后复发,而另一个接受姑息疗法。如图58、59和60中注意到的,所给予的最后一次可能的治疗在第7周发生。

[1398] 图58以图形方式说明了,在用MASP-2抑制性抗体(OMS646)治疗后,在患有持续性

造血干细胞移植相关血栓性微血管病 (HSCT-TMA) 的受试者中,随着时间过去(周),血小板计数距离基线的平均变化。

[1399] 图59以图形方式说明了,在用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗后,在患有持续性 (HSCT-TMA) 的受试者中,随着时间过去(周),LDH距离基线的平均变化。

[1400] 图60以图形方式说明了,在用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗后,在患有持续性 (HSCT-TMA) 的受试者中,随着时间过去(周),结合珠蛋白距离基线的平均变化。

[1401] 如图59和60中所示,在治疗期间观察到LDH和结合珠蛋白的统计学显著改善。如图58中所示,血小板计数得到改善,但在这少数患者中并未达到统计学显著性。在完成治疗的三个患者中,一个并未显示肌酐的改善,但正在接受伴随的肾毒性药剂。肌酐在另外两个患者中得到改善或保持正常。在延长随访中,一个患者经历了移植失败,并且正在等待第二次移植。另外两个患者保持稳定。

[1402] 尽管在两个受试者中与骨髓压制和肾毒性相关的用药的潜在混杂效应,在患有持续性HSCT-TMA的三个受试者(其中之一在实施例45中进行描述)中,观察到用OMS646的有益治疗效应,并且在下文进一步描述。值得注意的是,在用OMS646的大约三周治疗后,最初可见三个应答者各自中的治疗效应。

[1403] 患者#1(如实施例45中所述的治疗4周)。简言之,血小板计数翻了两番,导致多于100,000/ μ L的血小板计数;结合珠蛋白水平增加了多于一倍并且正常;血浆乳酸脱氢酶水平降低了35%,但仍高于正常;并且裂红细胞计数保持为仅一个。

[1404] 患者#2(治疗8周):血小板计数并不响应治疗,尽管患者还经受继发于用缬更昔洛韦 (valganciclovir) 的并发治疗的骨髓压制和随后的移植失败;血浆乳酸脱氢酶水平从712U/L降低到低至256U/L;结合珠蛋白水平从无法检测的水平增加到高达250mg/dL。

[1405] 患者#3(治疗8周):血小板计数从13,500/ μ L增加到133,000/ μ L;血浆乳酸脱氢酶水平从537降低到225U/L,结合珠蛋白水平从无法检测的水平增加到高达181mg/dL。

[1406] 结果概括:

[1407] 对于完成了用OMS646的给药的患有持续性HSCT相关TMA的三个患者,数据证实了强烈且一致的功效信号。在治疗期间观察到LDH和结合珠蛋白的统计学显著改善。血小板计数得到改善,但在这少数患者中并未达到统计学显著性。在完成治疗的三个患者中,一个并未显示肌酐的改善,但正在接受伴随的肾毒性药剂。肌酐在另外两个患者中得到改善或保持正常。

[1408] 结论:

[1409] OMS646改善了患有持续性HSCT-TMA的患者中的TMA标记物,所述患者并不响应保守治疗措施。用OMS646治疗的HSCT-TMA患者代表了一些最难治疗的患者,从而证实了OMS646在尽管保守治疗措施,仍患有高危持续性HSCT-TMA的患者中的疗效的临床证据。

[1410] 按照前文,在一个实施方案中,本发明提供了治疗患有与造血干细胞移植相关的TMA的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,受试者患有与造血干细胞移植相关的持续性TMA,所述持续性TMA对保守治疗措施是抗性的。在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物的步骤之前,鉴定患有与造血干细胞移植相关的持续性TMA的人受试者,所述持续性TMA

对保守治疗措施是抗性的。

[1411] 按照本文公开的任何实施方案, MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种: 所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2, 所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位, 所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积, 所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积, 其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段, 其中所述抗体是单链分子, 其中所述抗体是IgG2分子, 其中所述抗体是IgG1分子, 其中所述抗体是IgG4分子, 其中所述IgG4分子包含S228P突变。在一个实施方案中, 抗体与MASP-2结合, 并且选择性地抑制凝集素途径, 并且基本上不抑制经典途径(即, 抑制凝集素途径, 同时使经典补体途径保持完整)。

[1412] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体以有效改善与造血干细胞移植相关的TMA相关的至少一种或多种临床参数的量进行施用, 所述临床参数例如血小板计数增加(例如, 在治疗前的血小板计数的至少两倍、至少三倍、至少四倍)、结合珠蛋白增加和/或乳酸脱氢酶降低。

[1413] 在一些实施方案中, 该方法包括经由导管(例如, 静脉内)将MASP-2抑制性抗体施用于患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者第一时间段(例如, 至少一天至一周或两周或三周或四周或更长时间), 随后将MASP-2抑制性抗体皮下施用于受试者第二时间段(例如, 至少两周或更长时间的慢性期)。在一些实施方案中, 在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆疗法的不存在下发生。在一些实施方案中, 在第一时间段和/或第二时间段的施用在血浆疗法的存在下发生。

[1414] 在一些实施方案中, 该方法包括向患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者静脉内、肌内或皮下施用MASP-2抑制性抗体。治疗可以是慢性的, 并且每天至每月施用一次, 但优选每两周至少一次, 或每周至少一次, 例如每周两次或每周三次。MASP-2抑制性抗体可以单独施用, 或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[1415] 在一个实施方案中, 该方法包括治疗患有与造血干细胞移植相关的持续性TMA的受试者, 其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物, 所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中, 组合物包含MASP-2抑制性抗体, 其包含(a)包含以下的重链可变区: i) 包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1; 和ii) 包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2; 和iii) 包含来自SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3, 以及b) 包含以下的轻链可变区: i) 包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1; 和ii) 包含来自SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2; 和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3, 或(II) 其包含以下的变体: 与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如, 与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如, 至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[1416] 在一些实施方案中, 该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或

其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1417] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[1418] 在一些实施方案中,该方法包括将包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物施用于患有或处于发展与HSCT相关的TMA的风险中的受试者,包括患有对保守治疗措施抗性的与造血干细胞移植相关的持续性TMA的受试者,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其剂量为1 mg/kg至10mg/kg (即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),每周至少一次 (例如每周至少两次或每周至少3次),共至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周的时期。

[1419] 实施例47

[1420] 该实施例描述了证实用MASP-2抑制性抗体OMS646有效治疗移植物抗宿主病 (GVHD) 相关的微血管病的病例研究。

[1421] 背景:移植物抗宿主病是造血干细胞移植 (HSCT) 的常见并发症。急性形式和慢性形式两者均存在,并且起因于将受体患者识别为外来组织的供体免疫细胞。这触发针对受体患者的免疫应答。急性GvHD在接受同种异体移植的高达50%或更多的患者中发生。急性GvHD最常见地靶向皮肤、胃肠道和肝,但也可以影响肾、眼、肺和血细胞。慢性GvHD在接受同种异体移植的大约40%的患者中发生,并且最常见地影响皮肤、肝、眼、胃肠道和肺。急性和慢性GvHD两者均与显著的发病率和死亡率有关。

[1422] 方法和结果

[1423] 在第二次完全缓解 (CR) 中受T细胞急性成淋巴细胞性白血病 (T-ALL) 影响的46岁男性经历了用环磷酰胺和全身照射方案 (TBI-Cy) 的完全清髓性预处理,以及来自无关的9/10HLA相容 (在基因座A处的抗原错配) 的35岁女性供体的外周血干细胞 (PBSC) 的同种异体 HSCT移植。移植物抗宿主病 (GVHD) 预防基于在预处理期间的抗胸腺细胞球蛋白 (ATG, 5mg/kg)、环孢菌素A (CSA) 和氨甲蝶呤的短疗程 (即在+1、+3、+6天时的氨甲蝶呤 (由于低CD34+的剂量减少))。他实现了稳固的血液重构 (植入:WBC>1000/mm³,在第+15天时的嗜中性粒细胞>500/mm³;在第+18天时的血小板>20000/mm³,在第+21天时的50000/mm³)。在第+30、+60、+90、+180、+354天时,观察到具有完全供体 (骨髓和外周血、CD3+和CD3-部分) 的嵌合现象。在第+30、+60、+90、+180 天时,确认完全缓解 (免疫表型、分子MRD)。

[1424] 在移植后的第+35天,他发展胃肠道 (GI) GVHD (呈现呕吐、厌食、腹泻、腹痛;结肠镜检查:弥漫性糜烂;组织学:弥漫性粘膜溃疡、固有层中的淋巴粒细胞性炎症、腺体和隐窝扭曲、细胞凋亡小体),并且诊断为急性GvHD,第4阶段 (肠道),总体4级连同巨细胞病毒 (CMV) 结肠炎 (通过在肠道活组织检查时的阳性免疫组织化学和实时PCR确定;全身CMV再激活 (关于外周血的2614UI/mL)。这两种状况同时用甲泼尼龙 (1mg/Kg)、膦甲酸和更昔洛韦进行治疗,具有良好应答,且类固醇逐渐减少至撤药。

[1425] 在移植后的第+121天,他经历了类固醇难治性GI GVHD的复发 (呈现呕吐、厌食、腹

泻、腹痛;组织学发现(胃和十二指肠),并且诊断为迟发性急性 GI GvHD第4阶段(肠道),总体4级,其根据注册的临床研究(ClinicalTrials.Gov Identifier NCT02032446),通过继续CSA以及用喷司他丁和间充质干细胞的序贯施用进行治疗,具有良好应答。

[1426] 在移植后的第+210天,患者呈现重量减轻、明显虚弱、全身性肌肉萎缩、四肢轻瘫、深腱反射减弱、双侧小腿感觉异常、神经源性膀胱和在minctional (即排尿)刺激的不存在下的尿失禁。临床检查和脑脊液、神经放射学和电生理学发现描述了轴突、感觉运动和自主神经功能障碍性多发性神经病。神经放射学指示了正常MRI(脑和脊柱),并且脑脊液是正常的。排除T-ALL复发、感染、血管损害、营养缺乏、脱髓鞘病症和可逆性后部脑病综合征(PRES)。施用高剂量免疫球蛋白没有益处。还记录了无肾损伤的具有大血管病性溶血性贫血(6.7g/dL)特征的伴随血小板减少症($6 \times 10^9/L$),网织红细胞增多症($335 \times 10^9/L$),增加的LDH(1635U/L)和无法检测的结合珠蛋白。直接抗球蛋白试验呈阴性。在外周血涂片(2-3个/视野50x)上观察到裂红细胞,以及抗B ab(主要不相容性患者/供体)的缺乏、正常的ADAMTS13活性、抗ADAMTS13 Ab 的缺乏、正常的凝血测试和具有正常肌酐值的蛋白尿。他还在内窥镜检查时呈现具有记录的绞痛溃疡的黑粪症;组织病理学研究揭示了粘膜水肿、纤维化、伴有管腔内纤维蛋白沉积的扩张的小血管、腺体萎缩和细胞凋亡小体,没有微生物学发现。因此,尽管存在持续性胃肠道GVHD的证据,但临床和组织病理学图像也与结肠移植相关的血栓性微血管病的诊断一致。由于复发性GI GVHD,CSA逐渐减少但没有撤药(谷水平100-150ng/mL),没有获得临床或血液学变化。

[1427] 在移植后的第+263天,患者入选上文实施例45和46中所述的临床试验,其涉及用OMS646的治疗,所述OMS646是抑制补体激活的凝集素途径的 MASP-2抑制性抗体。如图61中所示,在药物的前2个每周一次的剂量后,观察到临床和实验室应答,具有黑粪症和溶血的消退以及血小板计数的升高。有趣的是,在4个剂量后,还记录了显著的神经系统改善,伴随感觉运动缺陷的临床改善和电生理改善两者。在OMS646的8个剂量后,尽管CSA逐渐减少,但GvHD应答维持,没有观察到毒性。到移植后的第+354天,患者证实了进一步的神经系统改善以及minctional(即,排尿)缺陷的初始恢复。通过该患者达到的快速临床益处提示了,起因于OMS646施用的补体介导的内皮损害的有效抑制对于治疗GVHD相关的TMA可能是高度有效的。

[1428] 总之,该实施例描述了具有共同存在的HSCT-TMA和GvHD的移植后 HSCT患者的病例报告,这两者在用MASP-2抑制性抗体(OMS646)治疗之后均消退。在用OMS646治疗之前,患者具有通过类固醇难治性GvHD的多次发作、巨细胞病毒感染和HSCT-TMA复杂化的艰难的移植后病程。在GvHD 的两次先前发作后,患者呈现血性腹泻。肠活组织检查证实了HSCT-TMA和 GvHD两者。未鉴定感染。值得注意的是,患者还具有新发作的感觉异常、四肢瘫痪和神经源性膀胱的神经系统症状,其已报道为GvHD和TMA的神经系统表现。由于四肢瘫痪,患者无法行走,并且需要每天至少一次的输血。血液学标记物证实了伴有血小板减少症、乳酸脱氢酶(LDH)升高和裂红细胞的 HSCT-TMA。患者进入临床试验并且开始接受OMS646。2周前,他的免疫压制(环孢菌素)已降低,并且鉴于他的类固醇难治性GvHD病史,他仅接受了低剂量的皮质类固醇。他没有接受其它GvHD治疗。在2个OMS646剂量后,他的血性腹泻得到消退,并且他的血液学标记物得到改善。在4个OMS646 剂量后,他能够行走。他完成了8周的OMS646治疗,并且在家中良好康复。HSCT-TMA和GvHD的所有体征和症状都已消退。他的神经系统

症状继续改善。在OMS646治疗之前,该患者正在恶化并且处于早期死亡的高风险中。在用OMS646治疗之后,观察到GvHD、HSCT-TMA和神经系统症状的改善,并且患者在家中良好康复。

[1429] 按照前文,在一个实施方案中,本发明提供了治疗患有或处于发展移植物抗宿主病(GVHD)的风险中的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活,并且从而治疗或减少发展GVHD的风险、或者减少与GVHD相关的一种或多种症状的严重性的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,GVHD是活跃的急性GVHD。在一个实施方案中,GVHD是慢性GVHD。在一个实施方案中,GVHD是类固醇抗性的(即,尽管类固醇治疗仍持续)。在一个实施方案中,GVHD是胃肠道(GI) GVHD。在一个实施方案中,该方法进一步包括在用MASP-2抑制性抗体治疗之前,确定受试者中的GVHD存在的步骤。

[1430] 在一个实施方案中,受试者患有或处于发展与造血干细胞移植相关的 GVHD的风险中。在一个实施方案中,受试者患有或处于发展与造血干细胞移植相关的TMA相关的GVHD的风险中。在一个实施方案中,受试者患有白血病,例如T细胞急性成淋巴细胞性白血病。

[1431] 在一个实施方案中,受试者患有与GvHD和/或TMA相关的一种或多种神经系统症状,例如虚弱、感觉异常、四肢瘫痪、感觉运动缺陷、自主神经功能障碍性多发性神经病和/或神经源性膀胱,并且MASP-2抑制性抗体以足以改善一种或多种神经症状的量和时间段进行施用。

[1432] 按照本文公开的任何实施方案,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P突变。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径保持完整)。

[1433] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以有效改善与GVHD相关的至少一种或多种临床参数的量进行施用。

[1434] 在一些实施方案中,该方法包括向患有与造血干细胞移植相关的GVHD的受试者静脉内、肌内或皮下施用MASP-2抑制性抗体。治疗可以是慢性的,并且每天至每月施用一次,但优选每两周至少一次,或每周至少一次,例如每周两次或每周三次。MASP-2抑制性抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[1435] 在一个实施方案中,该方法包括治疗患有与造血干细胞移植相关的 GVHD的受试者,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,组合物包含MASP-2抑制性抗体,其包含(a)包含以下的重链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含来自SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii)包含来自SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b)包含以下的轻

链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含来自SEQ ID NO:70 的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包含来自SEQ ID NO:70的89-97 的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II)其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少 93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如,至少 91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[1436] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1437] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[1438] 在一些实施方案中,该方法包括将包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物施用于患有或处于发展GVHD的风险中的受试者,例如将经历、正在经历或已经历HSCT的受试者,包括患有GVHD相关的TMA的受试者,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其剂量为1mg/kg 至10mg/kg(即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),每周至少一次(例如每周至少两次或每周至少3次),共至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周的时期。

[1439] 实施例48

[1440] 该实施例描述了证实用MASP-2抑制性抗体OMS646有效治疗在造血干细胞移植后的TMA和弥漫性肺泡出血(DAH)的病例研究。

[1441] 背景:造血干细胞移植(HSCT)诱导大量内皮损伤,其促成严重的HSCT 后并发症,如血栓性微血管病(TMA)、移植物抗宿主病(GvHD)、弥漫性肺泡出血(DAH)和静脉阻塞性疾病(VOD)。(参见E.Carreras和M.Diaz-Ricart,Bone Marrow Transplant第46卷:1495-1502,2011;Akil等人,Biol Blood Marrow Transplant 21:1739-1745,2015;以及Vion等人,Semin Thromb Hemost 41 (06):629-643,2015,所述参考文献各自在此通过引用并入本文)。

[1442] 弥漫性肺泡出血(DAH)是可能在造血干细胞移植(HSCT)受体中发生的综合征。HSCT受体中的DAH的诊断标准包括肺浸润、呼吸困难和缺氧(参见 E.Carreras和M.Diaz-Ricart,Bone Marrow Transplant第46卷:1495-1502, 2011,其在此通过引用并入本文)。DAH的怀疑发病机制是通过HSCT预处理的肺毛细血管内皮损害加上植入的嗜中性粒细胞和无症状感染,允许红血细胞渗漏到肺泡内(E.Carreras和M.Diaz-Ricart,Bone Marrow Transplant第46 卷:1495-1502,2011)。静脉阻塞性疾病(VOD),也称为肝窦阻塞综合征(SOS),是可能在造血干细胞移植(HSCT)患者中发生的另一种综合征。VOD的临床表现包括由于体液潴留的显著重量增加、肝大小增加和血液中的胆红素水平升高(参见Carreras和M.Diaz-Ricart,Bone Marrow Transplant第46卷:1495-1502, 2011,其在此通过引用并入

本文)。

[1443] 方法和结果:

[1444] 人口统计学和既往病史

[1445] 患者在治疗启动时是14岁的白人女性,在该实施例中称为“同情用药患者#1”。患者具有戴布二氏贫血(Diamond-Blackfan anemia)和空蝶鞍综合征病史。

[1446] 患者结果

[1447] 患者在第877天时活着。

[1448] 需要移植的疾病

[1449] 患者具有戴布二氏贫血病史。她自从婴儿期开始需要每3周的RBC输注,并且先前发展铁超负荷。

[1450] 移植

[1451] 患者于2015年9月经历了她的干细胞移植。她接受了来自9/10匹配的无关供体的PBSC移植。嗜中性粒细胞植入到大约第35天发生。血小板植入到第184天仍未实现。她需要血小板和RBC输注超过1年。

[1452] 移植后并发症

[1453] 患者具有复杂的移植后病程。出院后不久,她在第67天时因呼吸急促和疑似肺炎再次入院。她在第162天时出院。她在第167天时再次入院,具有用阿昔洛韦治疗的水痘带状疱疹复发以及用皮质类固醇治疗的多浆膜炎。她患有持续性血小板减少症和贫血、LDH升高、结合珠蛋白降低、裂红细胞和阴性直接抗体测试。做出了TMA的诊断。免疫压制改变为MMF和泼尼松。她还经历了HHV6和EBV复发。她在第197天时出院。

[1454] 在第229天时,她因持续性TMA和严重呼吸窘迫再次入院。她诊断有弥漫性肺泡出血,其用CPAP和皮质类固醇进行治疗。在第231天时,她具有胸腔积液和心包积液,伴随恶化的氧合。她的血压升高。她需要ACE抑制剂、钙通道阻滞剂、β受体阻滞剂、利尿剂和硝酸甘油用于BP控制。她经历了癫痫发作并添加了可乐定。脑部MRI显示了在脑中与来自她的RBC输血史的继发性色素沉着症一致的铁。在第231天时开始血液透析。在第259天时,由于持续的肾功能不全和恶化的肺部状况,她开始了依库珠单抗治疗。她的TMA得到改善,但她发展了急性肺水肿,并且因此停用依库珠单抗。她的TMA恶化,并且她在第269、276和278天时经历了血浆置换,而无改善。她用去纤苷进行治疗,但由于凝血病以及没有TMA改善而停用。从大约第320天开始,她再次接受了较低剂量的依库珠单抗。由于肺水肿,依库珠单抗再次停止。TMA持续存在。她还发展了艰难梭菌(*C.difficile*)感染。她在第379天出院,接受泼尼松、MMF、伏立康唑、克霉唑(cotrimazole)、氨氯地平、促红细胞生成素、熊二醇和奥美拉唑。

[1455] 她在第380天时因发热、寒战和呼吸困难再次入院。她患有肺炎克雷伯氏菌(*K.pneumoniae*)肺炎和屎肠球菌(*E.faecium*)败血症。她的MMF停止。她用特治星、美罗培南和万古霉素进行治疗。由于持续的菌血症,她的中心线被改变,并且她的抗生素改变为利奈唑胺、达托霉素和克林霉素。她的TMA持续存在,需要每周3次的血液透析和每天一次的血小板输注。肺水肿诊断为弥漫性肺泡出血(用皮质类固醇治疗无应答)。在第404天时,OMS646治疗在同情用药的协议下开始。如本文所述,OMS646是抑制补体激活的凝集素途径的MASP-2抑制性抗体。

[1456] 她每周3次用4mg/kg OMS646的剂量进行治疗。她的吸氧停用并且她的皮质类固醇

剂量降低。她的实验室TMA标记物得到改善。她在第414天时出院。

[1457] 她继续每周3次的门诊OMS646治疗,并且在第416天时,她的血液透析降低到每周一次。她的抗高血压用药也减少至仅氨氯地平、可乐定和呋塞米。在第423天时,她可以停用血液透析,并且在第428天时,她的OMS646 降低到每周两次,伴随她的皮质类固醇和呋塞米剂量减少。在此期间,她的血小板输注基本上降低。

[1458] 她继续良好康复,直到第486天她发展RSV感染时。她的肌酐和LDH 增加,并且她的血小板计数和结合珠蛋白下降。她诊断有复发性TMA,并且 OMS646治疗增加到每周3次。伴随增加的OMS646治疗,她的TMA得到消退。

[1459] 她一直没有进行血液透析,并且她的最后一次血小板输注在约第630天时发生。她目前良好康复,并且正在接受用OMS646、去铁胺、左甲状腺素、司维拉姆、奥格门汀、左乙拉西坦、别嘌醇、氨氯地平、奈比洛尔、可乐定和促红细胞生成素的治疗。她正在接受用于血色素沉着症的静脉切开术。

[1460] TMA发作

[1461] 该患者具有持续性和/或复发性TMA的艰难病程。她的病程与多器官 TMA一致,并且她患有弥漫性肺泡出血 (DAH),另一种内皮损伤综合征。她最初响应依库珠单抗,但不耐受治疗。在启动OMS646治疗之前,她处于血液透析,并且需要每天一次的输血。在OMS646治疗后不久,她的TMA消退,她的DAH消退,并且她能够停用透析。她后来能够基本上减少并随后停用血小板和RBC输注,同时维持稳定或增加的血小板计数和血红蛋白值。这些结果在如下的图62A-62E中得到证实:

[1462] 图62A以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的肌酐水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始。

[1463] 图62B以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的结合珠蛋白水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始。

[1464] 图62C以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的血红蛋白水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始。

[1465] 图62D以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的LDH 水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始。

[1466] 图62E以图形方式说明了,随着时间过去,同情用药患者#1中的血小板水平,其中垂直线指示了用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 的治疗起始。

[1467] 总体而言,该患者的病程证实了成功的TMA和DAH的OMS646治疗,允许患者停用氧疗法、血液透析和输血。

[1468] 概述

[1469] 总之,该实施例描述了青春期女孩(同情用药患者#1)的HCST-TMA病例报告,其不耐受依库珠单抗治疗,但良好响应OMS646治疗的同情用药。在 OMS646治疗后不久,她的TMA消退,她的DAH消退,并且她能够停用透析。如实施例47中所述,提供了描述具有艰难的移植后病程的患者的另一份 HSCT-TMA病例报告,所述病程包括类固醇抗性GvHD和巨细胞病毒感染。他发展了并不响应保守措施的TMA,并且患有具有多种神经系统并发症的共存GvHD,并且无法行走。如实施例47中所述,在OMS646治疗之后,他的 TMA和GvHD消退并且他的神经系统并发症得到改善。他能够重返工作岗位,并且他的神经系统状况已持续改善。

[1470] 与这些危重病患者中的GvHD消退和弥漫性肺泡出血消退组合的HSCT 受体中的总体存活和TMA标记物的改善,指示了凝集素途径在这些综合征中发挥的作用,以及使用MASP-2抑制性抗体OMS646在治疗和/或预防干细胞移植后TMA、移植物抗宿主病和弥漫性肺泡出血中的功效。

[1471] 按照前文,在一个实施方案中,本发明提供了治疗患有与造血干细胞移植相关的弥漫性肺泡出血的人受试者(即,在HSCT受体中)的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物的步骤之前,鉴定患有与HSCT相关的弥漫性肺泡出血的人受试者。

[1472] 按照本文公开的任何实施方案,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P突变。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径保持完整)。

[1473] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以有效改善与HSCT受体中的弥漫性肺泡出血相关的至少一种或多种临床参数的量进行施用。在一些实施方案中,该方法包括向患有弥漫性肺泡出血的受试者静脉内、肌内或皮下施用 MASP-2抑制性抗体。治疗可以是慢性的,并且每天至每月施用一次,但优选每两周至少一次,或每周至少一次,例如每周两次或每周三次。MASP-2抑制性抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[1474] 在一个实施方案中,该方法包括治疗患有与造血干细胞移植相关的弥漫性肺泡出血的受试者,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,组合物包含MASP-2抑制性抗体,其包含(a)包含以下的重链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含来自SEQ ID NO:67 的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii)包含来自SEQ ID NO:67的95-107 的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b)包含以下的轻链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含来自SEQ ID NO:70 的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包含来自SEQ ID NO:70的89-97 的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II)其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少 93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如,至少 91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[1475] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨

氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70 所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1476] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[1477] 在一些实施方案中,该方法包括将包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物施用于患有或处于发展与HSCT相关的弥漫性肺泡出血的风险中的受试者,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其剂量为1mg/kg至10mg/kg (即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),每周至少一次 (例如每周至少两次或每周至少3次),共至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周的时期。

[1478] 按照前文,在另一个实施方案中,本发明提供了治疗患有与造血干细胞移植相关的静脉阻塞性疾病 (VOD) 的人受试者 (即,在HSCT受体中) 的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2 抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体的组合物的步骤之前,鉴定患有与HSCT相关的静脉阻塞性疾病的人受试者。

[1479] 按照本文公开的任何实施方案,MASP-2抑制性抗体显示出下述特性中的至少一种或多种:所述抗体以10nM或更小的 K_D 结合人MASP-2,所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位,所述抗体在体外测定中以10nM或更小的 IC_{50} 抑制1%人血清中的C3b沉积,所述抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积,其中所述抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段,其中所述抗体是单链分子,其中所述抗体是IgG2分子,其中所述抗体是IgG1分子,其中所述抗体是IgG4分子,其中所述IgG4分子包含S228P突变。在一个实施方案中,抗体与MASP-2结合,并且选择性地抑制凝集素途径,并且基本上不抑制经典途径 (即,抑制凝集素途径,同时使经典补体途径保持完整)。

[1480] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以有效改善与HSCT受体中的静脉阻塞性疾病相关的至少一种或多种临床参数的量进行施用。在一些实施方案中,该方法包括向患有静脉阻塞性疾病的受试者静脉内、肌内或皮下施周 MASP-2抑制性抗体。治疗可以是慢性的,并且每天至每月施用一次,但优选每两周至少一次,或每周至少一次,例如每周两次或每周三次。MASP-2抑制性抗体可以单独施用,或与C5抑制剂如依库珠单抗组合施用。

[1481] 在一个实施方案中,该方法包括治疗患有与造血干细胞移植相关的静脉阻塞性疾病的受试者,其包括向受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一些实施方案中,组合物包含MASP-2抑制性抗体,其包含(a)包含以下的重链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含来自SEQ ID NO:67 的50-65的氨基酸序列重链CDR-H2;和iii)包含来自SEQ ID NO:67的95-107 的氨基酸序列的重链CDR-H3,以及b)包含以下的轻链可变区:i)包含来自SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)

包含来自SEQ ID NO:70 的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含来自SEQ ID NO:70的89-97 的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其包含以下的变体:与SEQ ID NO:67具有至少90%同一性(例如,与SEQ ID NO:67具有至少91%、至少92%、至少 93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的重链可变区、以及与SEQ ID NO:70具有至少90%同一性(例如,至少 91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%同一性)的轻链可变区。

[1482] 在一些实施方案中,该方法包括向患有与HSCT相关的静脉阻塞性疾病的受试者施用包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1483] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体特异性识别人MASP-2上由参考抗体 OMS646识别的表位的至少一部分,所述参考抗体OMS646包含如SEQ ID NO:67中所示的重链可变区、以及如SEQ ID NO:70中所示的轻链可变区。

[1484] 在一些实施方案中,该方法包括将包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物施用于患有或处于发展与HSCT相关的静脉阻塞性疾病的风险中的受试者,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其剂量为1mg/kg至10mg/kg(即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),每周至少一次(例如每周至少两次或每周至少3次),共至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少 6周、或至少7周、或至少8周的时期。

[1485] 实施例49

[1486] 该实施例描述了在患有造血干细胞移植(HSCT)后的特发性肺炎综合征(IPS)的受试者的治疗中,使用MASP-2抑制性单克隆抗体OMS646的研究。

[1487] 背景/基本原理:

[1488] 特发性肺炎综合征(IPS),也称为非感染性特发性肺炎,定义为在心脏或肾功能障碍、医源性诱导的循环超负荷或感染的不存在下发生的广泛肺泡损伤。IPS通常在移植后的前100天内呈现呼吸困难、低氧血症、发热和肺炎的临床特征,并且影响高达10%的造血干细胞(HSCT)受体(参见Wieruszewski 等人,World J.Crit.Car Med 7(5):62-72,2018)。这种肺损伤可能在自体或同种异体HSCT后发生。IPS在同种异体HSCT中更普遍,并且通常在移植后早期(即,移植后4天至120天)过程中发生。

[1489] 在同种异体HSCT之后的IPS与对皮质类固醇的弱应答和进行性呼吸衰竭相关(Pagliuca S.等人,Blood Advance第3(15)卷:2424-2435,2019)。如 Fukuda T.等人,Blood 102:2777-2785,2003中所述,分析了其中在具有常规和非清髓性预处理的同种异体HSCT后发展IPS的81个患者的临床过程和结果,并且确定了IPS发作的中值时间分别为在具有常规或非清髓性方案的 HSCT后的第22天(范围,第4-106天)和第16天(范围,第7-34天)。来自IPS 的死亡率高达80%,并且在需要用机械呼吸机的呼吸支持的患者中甚至更高。死亡的中值时间为距离IPS发作14天(Fukuda等人,2003)。目前用于IPS的标准疗法包括静脉内皮质类固醇,然而,诊断有IPS的患者中的对皮质类固醇疗法的响应已显示了混合但有限

的功效 (Fukuda T. 等人, Blood 102:2777-2785, 2003), 并且预后仍然极差 (75%-85% 死亡率), 参见 Clark J.G. 等人, Am Rev Respir Dis. 第147 (6) 卷, 第:1601-1606 页, 1993; Afessa 等人, Bone Marrow Transplantation 28:425-434, 2001。

[1490] 在 IPS 患者的一个小子集中, 发生急性肺出血或出血性肺泡炎, 也称为弥漫性肺泡出血 (DAH), 其一般在与骨髓恢复开始相关的 HSCT 后立即时期 (即, 移植后 12-19 天) 发展, 参见 Panoskaltsis-Mortari 等人, Am J Respir Crit Care Med 第183卷:1262-1279, 2011。DAH 诊断的特征在于弥漫性双肺浸润, BAL 液的进行性带血回流, 以及 BAL 液中存在 >20% 的充满含铁血黄素的巨噬细胞 (Robbins 等人, Am J Med 87:511-518, 1989)。对于诊断有 DAH 形式的 IPS 的患者小子集, 高剂量类固醇可能具有增加的功效, 伴随改善的死亡率 (91% 相对于 67%)。Metcalf J.P. 等人, Am J Med 96:327-334, 1994。

[1491] 关于在 HSCT 之后的 IPS (HSCT-IPS) 的基因本体富集分析已证实了, 急性期应答信号传导蛋白、补体系统 (即 CD55、C3、CFI、CFH、C5) 和凝血系统 (即 KNG1、PLG、PROS1、F2) 参与, 可能继发于所利用的准备性预处理方案的强度 (Bhargava M. 等人, Biol Marrow Transplant 22:1383-1390, 2016)。已在鼠模型中显示了内皮细胞活化和损伤是 IPS 发展的因素 (Cooke 等人, Biol Blood Marrow Transplant 14:23-32, 2008)。在经历 HSCT 的 313 个儿科患者的回顾性研究中, 其中 9 个发展 IPS, 其中 8 个已执行了肺活组织检查, 确定了所有 8 个患者都显示了潜在的疾病过程, 其被解释为与内皮细胞活化损伤相关 (Altmann T. 等人, Bone Marrow Transplantation 53:515-518, 2018)。

[1492] 凝集素途径充当组织应激和损伤的先天免疫传感器, 并且被认为在内皮细胞应激或损伤的背景下激活补体中具有作用。另外, 凝集素补体级联与凝血级联相互作用。特别地, MASP-2 能够以与因子 Xa 类似的方式激活凝血酶原, 生成活性凝血酶。因此, MASP-2 的抑制可能限制凝集素介导的凝血系统激活, 作为其 HSCT-IPS 的有益效应的部分。如本文所述, 研究已证实了, MASP-2 抑制性抗体 OMS646 抑制用人血清激活的内皮细胞上的 C5b-9 沉积或血栓形成, 所述人血清来自患有非典型溶血性尿毒症综合征 (aHUS) 的患者。凝集素途径可能在启动且持续 HSCT-IPS 中的激活补体方面起关键作用, 并且经由 MASP-2 抑制性抗体如 OMS646 抑制凝集素途径可以解决补体系统和凝血系统两者介导的与 HSCT-IPS 有关的肺损伤。

[1493] 方法 •

[1494] 进行下述研究, 以分析 OMS646 在患有造血干细胞移植后的特发性肺炎综合征 (IPS) (HSCT-IPS) 的受试者的治疗中的用途。

[1495] 该方法涉及鉴定患有 HSCT-IPS 的受试者, 所述 HSCT-IPS 定义为在 HSCT 后 (即, HSCT 后 4 天至 120 天) 发展, 并且满足下述标准 (如 Clark J.G. 等人, Am Rev Respir Dis. 1993 年 6 月: 第 147 卷 No. 6 Pt 1): 1601-1606 中所述) 中的一种或多种的非感染性呼吸临床综合征:

[1496] (1) 广泛肺泡损伤的证据, 其包括下述中的一种或多种:

[1497] (a) 在胸部 X 光片或计算机断层成像 (CT) 扫描时的多叶浸润;

[1498] (b) 肺炎的症状和体征 (例如咳嗽、呼吸困难、啰音); 和/或

[1499] (c) 通过增加的肺泡-动脉氧梯度或需要补充供氧来表现的异常肺部生理学的证据; 和

[1500] (2) 受试者中的活动性下呼吸道感染的不存在。

[1501] 关于活动性下呼吸道感染的存在的评估方法包括例如：

[1502] (a) 支气管肺泡灌洗液对于显著细菌病原体呈阴性和/或用广谱抗生素缺乏改善；

[1503] (b) 支气管肺泡灌洗液对于病原性非细菌微生物呈阴性(如常规细菌、病毒和真菌培养, shell小瓶CMV培养, 关于CMB包涵体、真菌和卡氏肺囊虫 (*Pneumocystis carinii*) 的细胞学, 用于呼吸道合胞病毒、副流感病毒及其它微生物的检测方法)；

[1504] (c) 如果患者的状况允许, 则经支气管活组织检查；

[1505] (d) 任选地, 完成关于感染的第二次确认阴性测试, 其通常在初始阴性支气管肺泡灌洗后2至14天执行。

[1506] 治疗施用

[1507] 患有HSCT-IPS的受试者在重量>50kg的成人中经由静脉内输注用370 mg OMS646进行给药。儿科患者或者处于或低于50kg的患者需要根据体重的剂量调整, 并且以4mg/kg给药。取决于对治疗的响应, 每周施用两次治疗, 共8周至12周。如果患者达到维持4周的应答, 则施用频率在每周治疗两次的患者中可以降低至每周一次。

[1508] 当观察到HSCT-IPS的一种或多种症状中的改善时, 确定对治疗的积极响应。

[1509] 按照前文, 在一个方面, 本发明提供了治疗患有造血干细胞移植后的特发性肺炎综合征(IPS)(HSCT-IPS)的人受试者的方法, 其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物, 并且从而改善HSCT-IPS的至少一种症状。在一个实施方案中, 该方法包括将组合物施用于先前已经历同种异体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中, 该方法包括将组合物施用于先前已经历自体造血干细胞移植的受试者。

[1510] 在一个实施方案中, 该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前, 鉴定患有特发性肺炎综合征(IPS)的人受试者。在一个实施方案中, 患有特发性肺炎综合征(IPS)的受试者被确定为未患有DAH。

[1511] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b沉积。在一个实施方案中, 将MASP-2抑制性抗体全身递送至受试者。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1512] 在一些实施方案中, 该方法包括向患有HSCT-IPS的受试者施用包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物, 所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区, 其剂量为1mg/kg至10mg/kg(即, 1mg/kg、2 mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg)

kg 或10mg/kg),每周至少一次(例如每周至少两次或每周至少3次),共至少2 周、或至少3 周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的时期。

[1513] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约4mg/kg(即,3.6 mg/kg至4.4mg/kg)。

[1514] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约300mg至约450mg(即,约300mg至约400mg、或约350mg至约400mg),例如约300mg、约 305mg、约310mg、约315mg、约320mg、约325mg、约330mg、约335mg、约340mg、约345mg、约350mg、约355mg、约360mg、约365mg、约370mg、约375mg、约380mg、约385mg、约390mg、约395mg、约400mg、约405mg、约410mg、约415mg、约420mg、约425mg、约430mg、约 435mg、约440mg、约445mg或约450mg的固定剂量。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约370mg($\pm 10\%$)的固定剂量。

[1515] 在一个实施方案中,该方法包括向患有HSCT-IPS每周两次静脉内施用以约370mg($\pm 10\%$)的MASP-2抑制性抗体的固定剂量,共至少8周的治疗期。

[1516] 实施例50

[1517] 该实施例描述了在患有造血干细胞移植(HSCT)后的毛细血管渗漏综合征(CLS)的受试者的治疗中,使用MASP-2抑制性单克隆抗体OMS646的研究。

[1518] 背景/基本原理:

[1519] 毛细血管渗漏综合征(CLS)是造血干细胞移植(HSCT)的严重并发症,并且临床特征在于在HSCT后的前15天内发展的重量增加(在24小时内 $>3\%$)和全身水肿综合征(腹水、胸腔积液或心包炎),其通常并不响应用利尿剂例如呋塞米的治疗。Pagliuca S.等人,Blood Advances第3卷(15):2424-2435,2019。主要的CLS发病机制是毛细血管内皮的损伤,导致血管内液体流失到间质间隙内。在其最严重的形式中,CLS可以导致显著的血流动力学崩溃和多器官系统衰竭(Lucchini G.等人,Pediatr Transplant 20(8):1132-1136,2016)。患有CLS的受试者也可能显示出肾功能不全、心动过速、低血压和/或低白蛋白血症。参见Pagliuca S.等人,Blood Advances第3(15)卷:2424-2435,2019。尽管体重增加是静脉阻塞性疾病(VOD)的定义中包括的症状,但CLS可以基于VOD中的病理学发现与VOD区分开,所述病理学发现包括肝小静脉中富含纤维蛋白的血栓和/或血浆胆红素水平增加(Shulman H.等人,Am J Pathol 127: 549-558,1987)。CLS在同种异体和自体骨髓移植受体中发生(参见例如Cahill R.A.等人,Bone Marrow Transplant 18(1):177-84,1996;Cornell R.F等人,Biol Blood Marrow Transplant 21:2061-2068,2015)。

[1520] 已观察到在骨髓移植后的CLS中存在补体C4(C4d)、C3a和终末补体复合物的活化产物的血浆水平增加(Salat C.等人,Ann Hematol 71:271-274, 1995)。在儿科研究中观察到,在具有不复杂的骨髓移植的儿童中,C1-INH的血浆活性显示了1.3至1.5倍的增加,具有在骨髓移植后的第11天的最大值。相比之下,患有CLS的儿童在骨髓移植后的第二周具有 $15 \pm 7\%$ 的降低,导致骨髓移植后的CLS部分是由于经典补体激活和C1-INH功能的相对缺乏的假设(Nurnberger W.等人,Ann Hematol 67:17-21,1996)。在后来的研究中,(Nurnberger W.等人,Ann Hematol 75:95-101,1997),将纯化的C1-INH浓缩物施用于在骨髓移植后患有CLS的15个患者,并且与评价为历史对照的在骨髓移植后患有CLS的7个患者进行比较。在诊断CLS后4小时内开始用人纯化的C1-INH浓缩物的治疗。补体激活参数C4d和

C5a在骨髓移植前处于正常范围内,并且在CLS诊断时显示了显著增加。在C1-INH的首次输注后,C4d和C5a两者均降低至骨髓移植前的起始范围并保持稳定。相比之下,对照患者的补体水平显示了C4d的增加和C1-INH活性的降低。接受C1-INH的患者在治疗开始约1天后经历体重降低,并且即使在使用C1-INH的治疗停用后,在除一个外的所有患者中,体重的正常化也继续。在CLS后一年,与历史对照组中的7个中的6个相比较,C1-INH浓缩物治疗组中的累积死亡率为15个中的6个($p < 0.001$)。参见Nurnberger W.等人,Ann Hematol 75:95-101, 1997。

[1521] 方法:

[1522] 进行下述研究,以分析OMS646在患有造血干细胞移植后的毛细血管渗漏综合征(CLS) (HSCT-CLS) 的受试者的治疗中的用途。

[1523] 该方法涉及鉴定患有HSCT-CLS的受试者,所述HSCT-CLS定义为在HSCT后(即,在HSCT后的前15天内)发展,并且满足如Pagliuca S.等人, Blood Advances第3卷(15): 2424-2435,2019中所述的下述标准的临床综合征:

[1524] i) 重量增加(在24小时内 $> 3\%$)和全身水肿综合征(腹水、胸腔积液或心包炎),其通常并不响应利尿剂治疗(例如呋塞米);和任选地;

[1525] ii) 患有CLS的受试者也可能显示出下述中的一种或多种:肾功能不全、心动过速、低血压和/或低白蛋白血症。

[1526] 在一些实施方案中,该方法涉及鉴定患有HSCT-CLS的受试者,其被确定为未患有VOD。如上所述,CLS可以基于VOD中的病理学发现与VOD区分开,所述病理学发现包括肝小静脉中富含纤维蛋白的血栓和/或血浆胆红素水平增加(Shulman H.等人,Am J Pathol 127: 549-558,1987)。

[1527] 治疗施用

[1528] 患有HSCT-CLS的受试者在重量 $> 50\text{kg}$ 的成人中经由静脉内输注用370 mg OMS646进行给药。儿科患者或者处于或低于 50kg 的患者需要根据体重的剂量调整,并且以 4mg/kg 给药。取决于对治疗的响应,每周施用两次治疗,共8周至12周。如果患者达到维持4周的应答,则施用频率在每周治疗两次的患者中可以降低至每周一次。

[1529] 当观察到HSCT-CLS的一种或多种症状中的改善时,确定对治疗的积极响应。

[1530] 按照前文,在一个方面,本发明提供了治疗患有造血干细胞移植后的毛细血管渗漏综合征(CLS) (HSCT-CLS) 的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活,并且从而改善HSCT-CLS的至少一种症状的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。

[1531] 在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历同种异体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历自体造血干细胞移植的受试者。

[1532] 在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有毛细血管渗漏综合征(CLS) 的人受试者。在一个实施方案中,患有CLS的受试者被确定为未患有VOD。

[1533] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或

其片段。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b 沉积。在一个实施方案中, 将MASP-2抑制性抗体全身递送至受试者。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1534] 在一些实施方案中, 该方法包括向患有HSCT-CLS的受试者施用包含 MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物, 所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区, 其剂量为1mg/kg至10mg/kg (即, 1mg/kg、2 mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg 或10mg/kg), 每周至少一次 (例如每周至少两次或每周至少3次), 共至少2 周、或至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的时期。

[1535] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约4mg/kg (即, 3.6 mg/kg至4.4mg/kg)。

[1536] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约300mg至约450mg (即, 约300mg至约400mg、或约350mg至约400mg), 例如约300mg、约 305mg、约310mg、约315mg、约320mg、约325mg、约330mg、约335mg、约340mg、约345mg、约350mg、约355mg、约360mg、约365mg、约370mg、约375mg、约380mg、约385mg、约390mg、约395mg、约400mg、约405mg、约410mg、约415mg、约420mg、约425mg、约430mg、约 435mg、约440mg、约445mg或约450mg的固定剂量。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约370mg ($\pm 10\%$) 的固定剂量。

[1537] 在一个实施方案中, 该方法包括向患有HSCT-CLS的受试者每周两次静脉内施用以约370mg ($\pm 10\%$) 的MASP-2抑制性抗体的固定剂量, 共至少8周的治疗期。

[1538] 实施例51

[1539] 该实施例描述了在患有造血干细胞移植 (HSCT) 后的液体超负荷 (F0) 的受试者的治疗中, 使用MASP-2抑制性抗体OMS646的研究。

[1540] 背景/基本原理:

[1541] 液体超负荷 (F0) 是在造血干细胞移植后早期 (即, 在HSCT后的前30天内) 发生的综合征, 并且特征在于各种程度的重量增加和需要体液去除的水肿, 伴随或不伴随器官毒性。在一些情况下, F0在入院的前7天内发生, 此时患者接受静脉内补液和预处理化学疗法。

[1542] 如Rondon G.等人, Biol Blood Marrow Transplant 23:2166-2171, 2017) 中所述, 如下识别F0的四个级别:

[1543] 1级: 距离基线的重量增加 $<10\%$, 无症状或轻度水肿, 可能需要利尿剂治疗或静脉内液体更换的降低;

[1544] 2级: 有症状的体液潴留, 具有或不具有距离基线的重量增加 $\geq 10\%$ 至 $<20\%$, 需要持续利尿剂治疗;

[1545] 3级:距离基线的重量增加 $\geq 20\%$,并不响应利尿剂治疗,具有需要进一步治疗的可能的肾、肺或心功能障碍;

[1546] 4级:多于一个器官系统或需要重症监护的进行性功能障碍。

[1547] 关于每个患者的上述级别基于在另一个明显原因或综合征的不存在下,在入院日期和HSCT后的第30天之间观察到的最大等级。

[1548] 如Rondon等人,2017中所述的,进行了回顾性研究,以评估同种异体基因HSCT受体中的F0毒性的患病率、严重性和预后价值。这项研究的主要终点是F0的患病率和严重性及其对非复发死亡率的影响。所有F0病例都在移植后的第30天或之前进行诊断,并且从入院到F0诊断的中值时间为2至6天。确定了 ≥ 2 级F0与较高的非复发死亡率和较差的存活强烈相关。与此结论一致,Bouchard等人,Kidney Int 76(4):422-7,2009报告了,具有定义为体重增加超过10%的F0的患者具有显著更多的呼吸衰竭、需要机械通气和更多的败血症。

[1549] 方法 •

[1550] 进行下述研究,以分析OMS646在患有造血干细胞移植后的液体超负荷(F0)(HSCT-F0)的受试者的治疗中的用途。

[1551] 该方法涉及鉴定患有HSCT-F0的受试者,所述HSCT-F0定义为在HSCT后(即,在HSCT后的前30天内)发展,并且满足下述标准(Rondon G.等人, Biol Blood Marrow Transplant 23:2166-2171,2017)中的一种或多种的临床综合征:

[1552] 1级:距离基线的重量增加 $< 10\%$,无症状或轻度水肿,可能需要利尿剂治疗或静脉内液体更换的降低;

[1553] 2级:有症状的体液潴留,具有或不具有距离基线的重量增加 $\geq 10\%$ 至 $< 20\%$,需要持续利尿剂治疗;

[1554] 3级:距离基线的重量增加 $\geq 20\%$,并不响应利尿剂治疗,具有需要进一步治疗的可能的肾、肺或心功能障碍;

[1555] 4级:距离基线的重量增加 $\geq 20\%$,具有多于一个器官系统或需要重症监护的进行性功能障碍。

[1556] 治疗施用

[1557] 患有HSCT-F0的受试者在重量 $> 50\text{kg}$ 的成人中经由静脉内输注用370mg OMS646进行给药。儿科患者或者处于或低于50kg的患者需要根据体重的剂量调整,并且以4mg/kg给药。取决于对治疗的响应,每周施用两次治疗,共8周至12周。如果患者达到维持4周的应答,则施用频率在每周治疗两次的患者中可以降低至每周一次。

[1558] 当观察到HSCT-F0的一种或多种症状中的改善时,确定对治疗的积极响应。

[1559] 按照前文,在一个方面,本发明提供了治疗患有造血干细胞移植后的液体超负荷(F0)(HSCT-F0)的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活,并且从而改善HSCT-F0的至少一种症状的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。

[1560] 在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历同种异体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历自体造血干细胞移植的受试者。

[1561] 在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制MASP-2依

赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有液体超负荷(F0)的人受试者。

[1562] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b 沉积。在一个实施方案中,将MASP-2抑制性抗体全身递送至受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1563] 在一些实施方案中,该方法包括向患有HSCT-F0的受试者施用包含 MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,其剂量为1mg/kg至10mg/kg(即,1mg/kg、2 mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),每周至少一次(例如每周至少两次或每周至少3次),共至少2 周、或至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的时期。

[1564] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约4mg/kg(即,3.6 mg/kg至4.4mg/kg)。

[1565] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约300mg至约450mg(即,约300mg至约400mg、或约350mg至约400mg),例如约300mg、约 305mg、约310mg、约315mg、约320mg、约325mg、约330mg、约335mg、约340mg、约345mg、约350mg、约355mg、约360mg、约365mg、约370mg、约375mg、约380mg、约385mg、约390mg、约395mg、约400mg、约405mg、约410mg、约415mg、约420mg、约425mg、约430mg、约 435mg、约440mg、约445mg或约450mg的固定剂量。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体的剂量为约370mg($\pm 10\%$)的固定剂量。

[1566] 在一个实施方案中,该方法包括向患有HSCT-F0的受试者每周两次静脉内施用以约370mg($\pm 10\%$)的MASP-2抑制性抗体的固定剂量,共至少8周的治疗期。

[1567] 实施例52

[1568] 该实施例描述了在患有造血干细胞移植后的植入综合征(ES)(HSCT-ES) 的受试者的治疗中,使用MASP-2抑制性单克隆抗体OMS646的研究。

[1569] 背景/基本原理:

[1570] 植入综合征(ES)通常在自体HSCT后的嗜中性粒细胞植入时(即,在植入 7天内)发生。在这个背景下,在自体HSCT后ES的发生率范围为5%至25%。ES也偶尔在同种异体HSCT后被诊断。ES响应当它们在它们症状开始后早期施用时的皮质类固醇,然而,当治疗延迟时,ES可以演变为不可逆的多器官功能障碍综合征(Carreras E.等人,BMT45:1417-1422,2010)。

[1571] HSCT-ES与粒细胞恢复同时发生,并且很可能由内皮损害、活化的白细胞和促炎细胞因子介导,所述细胞因子引起血管渗漏、器官功能障碍和发热 (Spitzer T.R.,BMT 50:

469-475,2015;Pagliuca S.等人,Blood Advances第3 (15) 卷:2424-2435,2019)。

[1572] 方法:

[1573] 进行下述研究,以分析OMS646在患有造血干细胞移植后的植入综合征 (HSCT-ES) 的受试者的治疗中的用途。

[1574] 该方法涉及鉴定患有HSCT-ES的受试者,所述HSCT-ES定义为在嗜中性粒细胞植入时(即,在植入的7天内)发生,并且满足如Spitzer,T.R.,Bone Marrow Transplant第27卷:893-898,2001中所述的关于HSCT-ES的诊断标准的临床综合征。关于HSCT-ES诊断的基本标准是如下的3个主要标准或2 个主要标准加上1个次要标准:

[1575] 主要标准:

[1576] (a) 非感染性发热(即,温度 $>38.3^{\circ}\text{C}$,没有可鉴定的传染性病因学);

[1577] (b) 皮疹(即,涉及多于25%的体表面积,并且无法归于用药的红皮病性皮疹(erythrodermatous rash));和/或

[1578] (c) 通过与此诊断一致的弥漫性肺浸润和缺氧来体现的非心源性肺水肿。

[1579] 次要标准:

[1580] (a) 总胆红素 $\geq 2\text{mg/dL}$ 或转氨酶水平大于正常两倍的肝功能障碍;

[1581] (b) 肾功能不全(大于基线两倍的血清肌酐);

[1582] (c) 重量增加 $>$ 基线体重的2.5%;和/或

[1583] (d) 无法通过其它原因解释的短暂性脑病。

[1584] 治疗施用

[1585] 患有HSCT-ES的受试者在重量 $>50\text{kg}$ 的成人中经由静脉内输注用370mg OMS646进行给药。儿科患者或者处于或低于50kg的患者需要根据体重的剂量调整,并且以4mg/kg给药。取决于对治疗的响应,每周施用两次治疗,共 8周至12周。如果患者达到维持4周的应答,则施用频率在每周治疗两次的患者中可以降低至每周一次。

[1586] 当观察到HSCT-ES的一种或多种症状中的改善时,确定对治疗的积极响应。

[1587] 按照前文,在一个方面,本发明提供了治疗患有造血干细胞移植后的植入综合征(ES) (HSCT-ES) 的人受试者的方法,其包括向受试者施用包含有效抑制MASP-2依赖性补体激活,并且从而改善HSCT-ES的至少一种症状的量的 MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物。

[1588] 在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历同种异体造血干细胞移植的受试者。在一个实施方案中,该方法包括将组合物施用于先前已经历自体造血干细胞移植的受试者。

[1589] 在一个实施方案中,该方法进一步包括在向受试者施用包含有效抑制 MASP-2依赖性补体激活的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有移植后植入综合征(HSCT-ES) 的人受试者。

[1590] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是与人MASP-2特异性结合的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有减少的效应子功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的 IC_{50} 抑制90%人血清中的C3b 沉积。在一个实施方案中,将MASP-2抑制性抗体全身递送至受试者。在一个实

施方案中, MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包含重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 所述轻链可变区包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1591] 在一些实施方案中, 该方法包括向患有HSCT-ES的受试者施用包含 MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物, 所述抗体包括包含如SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区、以及包含如SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区, 其剂量为1mg/kg至10mg/kg (即, 1mg/kg、2 mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg), 每周至少一次 (例如每周至少两次或每周至少3次), 共至少2 周、或至少3周、或至少4周、或至少5周、或至少6周、或至少7周、或至少8周、或至少9周、或至少10周、或至少11周、或至少12周的时期。

[1592] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约4mg/kg (即, 3.6 mg/kg至4.4mg/kg)。

[1593] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约300mg至约450mg (即, 约300mg至约400mg、或约350mg至约400mg), 例如约300mg、约 305mg、约310mg、约315mg、约320mg、约325mg、约330mg、约335mg、约340mg、约345mg、约350mg、约355mg、约360mg、约365mg、约370mg、约375mg、约380mg、约385mg、约390mg、约395mg、约400mg、约405mg、约410mg、约415mg、约420mg、约425mg、约430mg、约 435mg、约440mg、约445mg或约450mg的固定剂量。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体的剂量为约370mg ($\pm 10\%$) 的固定剂量。

[1594] 在一个实施方案中, 该方法包括向患有HSCT-ES的受试者每周两次静脉内施用以约370mg ($\pm 10\%$) 的MASP-2抑制性抗体的固定剂量, 共至少8周的治疗期。

[1595] 尽管已说明且描述了说明性实施方案, 但应了解, 可以在其中做出各种改变而不背离本发明的精神和范围。

	<110> Omeros Corporation Demopulos, Gregory A. Dudler, Thomas A.	
	<120> 用于治疗 and/或预防与造血干细胞移植相关的特发性肺炎综合征 (IPS) 和/或 毛细血管渗漏综合征 (CLS) 和/或植入综合征 (ES) 和/或液体超负荷 (FO) 的方法	
	<130> MP. 1. 0307. PCT	
	<150> US 62/940, 720	
	<151> 2019-11-26	
	<150> US 62/940, 735	
	<151> 2019-11-26	
	<160> 71	
	<170> PatentIn version 3.5	
[0001]	<210> 1	
	<211> 725	
	<212> DNA	
	<213> 智人 (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 tcg gtg gcc acc ccc ttg ggc ccg aag tgg cct gaa cct	101
	Leu Cys Gly Ser Val Ala Thr Pro Leu Gly Pro Lys Trp Pro Glu Pro	
	10 15 20 25	
	gtg ttc ggg cgc ctg gca tcc ccc ggc ttt cca ggg gag tat gcc aat	149
	Val Phe Gly Arg Leu Ala Ser Pro Gly Phe Pro Gly Glu Tyr Ala Asn	
	30 35 40	

	gac cag gag cgg cgc tgg acc ctg act gca ccc ccc ggc tac cgc ctg Asp Gln Glu Arg Arg Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr Arg Leu 45 50 55	197
	cgc ctc tac ttc acc cac ttc gac ctg gag ctc tcc cac ctc tgc gag Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu 60 65 70	245
	tac gac ttc gtc aag ctg agc tcg ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu 75 80 85	293
	tgc ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr 90 95 100 105	341
	ttc tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac Phe Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr 110 115 120	389
[0002]	tcc aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu 125 130 135	437
	gac att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac Asp Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp 140 145 150	485
	cac cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca His His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala 155 160 165	533
	ggc tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gag cag agc ctc Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu 170 175 180 185	581
	tag cctccccctgg agctccggcc tgcccagcag gtcagaagcc agagccagcc	634
	tgctggcctc agctccgggt tgggctgaga tggctgtgcc ccaactccca ttcaccaccc	694
	atggaccctaa taataaacct ggccccaccc c	725

<210> 2
<211> 185
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

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

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

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

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

[0003]

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

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

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

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

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

Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His His Cys His Asn His Leu

145 150 155 160

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

Lys Arg Thr Cys Ser Glu Gln Ser Leu
180 185

<210> 3

<211> 170

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

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

[0004]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
 <211> 2460
 <212> DNA
 <213> 智人

[0005]

<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 Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser His Leu Cys Glu Tyr 60 65 70	243
	gac ttc gtc aag ctg agc tgc ggg gcc aag gtg ctg gcc acg ctg tgc Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Ala Lys Val Leu Ala Thr Leu Cys 75 80 85 90	291
	ggg cag gag agc aca gac acg gag cgg gcc cct ggc aag gac act ttc Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Arg Ala Pro Gly Lys Asp Thr Phe 95 100 105	339
	tac tcg ctg ggc tcc agc ctg gac att acc ttc cgc tcc gac tac tcc Tyr Ser Leu Gly Ser Ser Leu Asp Ile Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser 110 115 120	387
	aac gag aag ccg ttc acg ggg ttc gag gcc ttc tat gca gcc gag gac Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp 125 130 135	435
[0006]	att gac gag tgc cag gtg gcc ccg gga gag gcg ccc acc tgc gac cac Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly Glu Ala Pro Thr Cys Asp His 140 145 150	483
	cac tgc cac aac cac ctg ggc ggt ttc tac tgc tcc tgc cgc gca ggc His Cys His Asn His Leu Gly Gly Phe Tyr Cys Ser Cys Arg Ala Gly 155 160 165 170	531
	tac gtc ctg cac cgt aac aag cgc acc tgc tca gcc ctg tgc tcc ggc Tyr Val Leu His Arg Asn Lys Arg Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly 175 180 185	579
	cag gtc ttc acc cag agg tct ggg gag ctc agc agc cct gaa tac cca Gln Val Phe Thr Gln Arg Ser Gly Glu Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro 190 195 200	627
	cgg ccg tat ccc aaa ctc tcc agt tgc act tac agc atc agc ctg gag Arg Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu 205 210 215	675
	gag ggg ttc agt gtc att ctg gac ttt gtg gag tcc ttc gat gtg gag Glu Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu 220 225 230	723

	aca cac cct gaa acc ctg tgt ccc tac gac ttt ctc aag att caa aca	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	
[0007]	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 Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu Lys Ser 415 420 425	1299
	ctc cca gtc tgt gag cct gtt tgt gga cta tca gcc cgc aca aca gga Leu Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Ala Arg Thr Thr Gly 430 435 440	1347
	ggg cgt ata tat gga ggg caa aag gca aaa cct ggt gat ttt cct tgg Gly Arg Ile Tyr Gly Gly Gln Lys Ala Lys Pro Gly Asp Phe Pro Trp 445 450 455	1395
	caa gtc ctg ata tta ggt gga acc aca gca gca ggt gca ctt tta tat Gln Val Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr 460 465 470	1443
	gac aac tgg gtc cta aca gct gct cat gcc gtc tat gag caa aaa cat Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu Gln Lys His 475 480 485 490	1491
[0008]	gat gca tcc gcc ctg gac att cga atg ggc acc ctg aaa aga cta tca Asp Ala Ser Ala Leu Asp Ile Arg Met Gly Thr Leu Lys Arg Leu Ser 495 500 505	1539
	cct cat tat aca caa gcc tgg tct gaa gct gtt ttt ata cat gaa ggt Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Ser Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly 510 515 520	1587
	tat act cat gat gct ggc ttt gac aat gac ata gca ctg att aaa ttg Tyr Thr His Asp Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu 525 530 535	1635
	aat aac aaa gtt gta atc aat agc aac atc acg cct att tgt ctg cca Asn Asn Lys Val Val Ile Asn Ser Asn Ile Thr Pro Ile Cys Leu Pro 540 545 550	1683
	aga aaa gaa gct gaa tcc ttt atg agg aca gat gac att gga act gca Arg Lys Glu Ala Glu Ser Phe Met Arg Thr Asp Asp Ile Gly Thr Ala 555 560 565 570	1731
	tct gga tgg gga tta acc caa agg ggt ttt ctt gct aga aat cta atg Ser Gly Trp Gly Leu Thr Gln Arg Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met 575 580 585	1779

	tat gtc gac ata ccg att gtt gac cat caa aaa tgt act gct gca tat Tyr Val Asp Ile Pro Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr 590 595 600	1827
	gaa aag cca ccc tat cca agg gga agt gta act gct aac atg ctt tgt Glu Lys Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys 605 610 615	1875
	gct ggc tta gaa agt ggg ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly 620 625 630	1923
	ggg gca ctg gtg ttt cta gat agt gaa aca gag agg tgg ttt gtg gga Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly 635 640 645 650	1971
	gga ata gtg tcc tgg ggt tcc atg aat tgt ggg gaa gca ggt cag tat Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr 655 660 665	2019
[0009]	gga gtc tac aca aaa gtt att aac tat att ccc tgg atc gag aac ata Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile 670 675 680	2067
	att agt gat ttt taa cttgcgtgtc tgcagtcgaag gattcttcat ttttagaaat Ile Ser Asp Phe 685	2122
	gcctgtgaag accttggcag cgacgtggct cgagaagcat tcatcattac tgtggacatg	2182
	gcagttgttg ctccacccaa aaaaacagac tccaggtgag gctgctgtca tttctccact	2242
	tgccagttaa attccagcct tacccattga ctcaagggga cataaaccac gagagtgaca	2302
	gtcatctttg cccacccagt gtaatgtcac tgcicaaatt acatttcatt accttaaaaa	2362
	gccagtctct tttcatactg gctgttggca tttctgtaaa ctgcctgtcc atgctctttg	2422
	tttttaaact tgttcttatt gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2460
	<210> 5	
	<211> 686	

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

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

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

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

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

[0010] 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
[0011]	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
[0012]	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
[0013]	Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr Pro	
	595	600 605
	Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly	
	610	615 620
	Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu	
	625	630 635 640
	Asp Ser Glu Thr Glu Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly	
		645 650 655
	Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val	
	660	665 670
	Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Ser Asp Phe	
	675	680 685

<210> 6

<211> 671

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

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

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

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

[0014] 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	
[0015]	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
[0016]	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

[0017] Ile Val Asp His Gln Lys Cys Thr Ala Ala Tyr Glu Lys Pro Pro Tyr
580 585 590

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

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

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

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

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

<210>	7	
<211>	4900	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	7	
	cctgtcctgc ctgcctggaa ctctgagcag gctggagtca tggagtcgat tcccagaatc	60
	ccagagtcag ggaggctggg ggcaggggca ggtcactgga caaacagatc aaaggtgaga	120
	ccagcgtagg actgcagacc aggccaggcc agctggacgg gcacaccatg aggtaggtgg	180
	gcgccacagc ctccctgcag ggtgtggggt gggagcacag gcctgggcct caccgcccct	240
	gccctgccc a taggtctgtg accctcctgg gccttctgtg tggctcggtg gccaccccct	300
	taggcccga gttggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc atcccccggc tttccagggg	360
	agtatgcaa tgaccaggag cggcgctgga cctgactgc accccccggc taccgcctgc	420
	gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct ctgcgagtac gacttcgtca	480
[0018]	aggtgccgtc agacgggagg gctggggttt ctcagggtcg ggggggtccc aaggagtagc	540
	cagggttcag ggacacctgg gagcaggggc caggcttggc caggagggag atcaggcctg	600
	ggtcttgcct tcactccctg tgacacctga cccacagct gagctcgggg gccaaaggtgc	660
	tggccacgct gtgcgggcag gagagcacag acacggagcg gggccctggc aaggacactt	720
	tctactcgct gggctccagc ctggacatta ccttccgctc cgactactcc aacgagaagc	780
	cgttcacggg gttcgaggcc ttctatgcag ccgagggtga gccaaagagg gtcctgcaac	840
	atctcagtct gcgcagctgg ctgtgggggt aactctgtct taggccaggc agccctgcct	900
	tcagtttccc cacctttccc agggcagggg agaggcctct ggcctgacat catccacaat	960
	gcaaagacca aaacagccgt gacctccatt cacatgggct gagtgccaac tctgagccag	1020
	ggatctgagg acagcatcgc ctcaagtac gcagggactg gccgggcgcg gcagctcacg	1080
	cctgtaattc cagcactttg ggaggccgag gctggcttga taatttgagg gtcaggagtt	1140

	caaggccagc cagggcaaca cggtgaaact ctatctccac taaaactaca aaaattagct	1200
	gggcgtggtg gtgcgcacct ggaatcccag ctactagga ggctgaggca ggagaattgc	1260
	ttgaacctgc gaggtggagg ctgcagtgaa cagagattgc accactacac tccacctggg	1320
	cgacagacta gactccgtct caaaaaacaa aaaacaaaaa ccacgcaggc cggaggccc	1380
	atttacaagc tgacaaagtg ggccctgcc a ggggagcgc tgcaggatgt ttgattttca	1440
	gatcccgatc cctgcagaga ccaactgtgt gacctctggc aagtggctca atttctctgc	1500
	tccttagaag ctgctgcaag ggttcagcgc tgtagccccg cccctgggt ttgattgact	1560
	cccctcatta gctgggtgac ctggccgga cactgaaact cccactggtt taacagaggt	1620
	gatgtttgca tctttctccc agcgtgctg ggagcttgca gcgaccctag gcctgtaagg	1680
	tgattggccc ggcaccagtc ccgcacccta gacaggacct aggcctctc tgaggccac	1740
	tctgaggcca tggatctcct gggaggagtc caggctggat cccgcctctt tccctcctga	1800
[0019]	cggcctgcct ggccctgcct ctccccaga cattgacgag tgccagggtg cccgggaga	1860
	ggcgcccacc tgcgaccacc actgccacaa ccacctgggc ggtttctact gctcctgccg	1920
	cgcaggctac gtcctgcacc gtaacaagcg cacctgctca ggtgaggag gctgcctggg	1980
	ccccaacgca ccctctctg ggatacccg ggctcctcag ggccattgct gctctgcca	2040
	ggggtgcgga gggcctgggc ctggacactg ggtgcttcta ggccctgctg cctccagctc	2100
	cccttctcag ccctgcttcc cctctcagca gccaggctca tcagtccac cctgccctag	2160
	cactgagact aattctaaca tcccactgtg tacctggttc cacctgggt ctgggaaccc	2220
	ctcatgtagc cacgggagag tcggggatc taccctcgtt ccttggactg ggttctgtt	2280
	ccctgcactg ggggacgggc cagtgtctg gggcgtgggc agccccacc tgtggcgtg	2340
	acctgctcc cccgactcgg tttctctct cggggtctct ccttgcctct ctgatctctc	2400
	ttccagagca gagcctctag cctcccctgg agctccggt gcccagcagg tcagaagcca	2460

	gagccaggct gctggcctca gctccgggtt gggctgagat gctgtgcccc aactccatt	2520
	caccacccat ggacccaata ataaacctgg cccacccca cctgctgccg cgtgtctctg	2580
	gggtgggagg gtcgggaggc ggtggggcgc gtcctctctt gcctaccctc ctcacagcct	2640
	catgaacccc aggtctgtgg gagcctcctc catggggcca cacggtcctt ggcctcacc	2700
	cctgttttga agatggggca ctgaggccgg agaggggtaa ggcctcgtc gagtccaggt	2760
	ccccagaggc tgagcccaga gtaatcttga accacccca ttcagggtct ggcctggagg	2820
	agcctgacct acagaggaga caccctggga gatattcatt gaggggtaat ctggtcccc	2880
	gcaaatccag gggtgattcc cactgcccc taggcacagc cacgtggaag aaggcaggca	2940
	atgttggggc tcctcacttc ctagaggcct cacaactcaa atgccccca ctgcagctgg	3000
	gggtggggtg gtggtatggg atggggacca agccttcctt gaaggataga gccagccca	3060
	acaccccgcc ccgtggcagc agcatcacgt gttccagcga ggaaggagag caccagactc	3120
[0020]	agtcattgatc actgttgctt tgaacttcca agaacagccc cagggaagg gtcaaaacag	3180
	gggaaagggg gtgatgagag atccttcttc cggatgttcc tccaggaacc agggggctgg	3240
	ctggtcttgg ctgggttcgg gtaggagacc catgatgaat aaacttggga atcactgggg	3300
	tggctgtaag ggaatttagg ggagctccga aggggccctt aggcctcagg agatgtcct	3360
	ctcttttccc gaattcccag ggaccagga gagtgtcctt tcttctctt cctgtgtgtc	3420
	catccacccc cgccccgc cctggcagag ctggtggaac tcagtgtctt agcccctacc	3480
	ctggggttgc gactctggct caggacacca ccacgtccc tgggggtgtg agtgagggcc	3540
	tgtgcgtcc atcccagtg ctgcctgttt cagctaaagc ctcaaagcaa gagaaacccc	3600
	ctctctaagc ggcccctcag ccatcggtg ggtcgtttgg tttctgggta ggcctcaggg	3660
	gctggccacc tgcagggcc agccaaccc agggatgcag atgtcccagc cacatccctg	3720
	tcccagtttc ctgctccca aggcattcac cctgtgttg gtgcgagggc tgatagaggg	3780

	cacgccaagt cactccccctg cccttccctc ctccagccc tgtgctccgg ccaggtcttc	3840
	accagaggt ctggggagct cagcagccct gaataccac ggccgtatcc caaactctcc	3900
	agttgcactt acagcatcag cctggaggag gggttcagtg tcattctgga ctttgtggag	3960
	tccttcgatg tggagacaca ccctgaaacc ctgtgtccct acgactttct caaggtctgg	4020
	ctcctgggcc cctcatcttg tcccagatcc tccccctca gccagctgc accccctact	4080
	tcctgcagca tggccccac cacgttcccg tcaccctcg tgacccacc tcttcaggtg	4140
	ctctatggag gtcaaggctg gggcttcgag tacaagtgtg ggaggcagag tggggagggg	4200
	cacccaatc catggcctgg gttagcctca ttggctgtcc ctgaaatgct gaggaggtgg	4260
	gttacttccc tccgccagg ccagaccag gcagctgctc ccagctttc atgagcttct	4320
	ttctcagatt caaacagaca gagaagaaca tggccattc tgtgggaaga cattgcccc	4380
	caggattgaa acaaaaagca acacggtgac catcaccttt gtcacagatg aatcaggaga	4440
[0021]	ccacacaggc tggaagatcc actacacgag cacagtgagc aagtgggctc agatccttgg	4500
	tggaagcgca gagctgcctc tctctggagt gcaaggagct gtagagtgtg gggctcttct	4560
	gggcaggact aggaaggac accaggttta gtggtgctga ggtctgaggc agcagcttct	4620
	aaggggaagc acccgtgcc tcctcagcag caccagcat ctcaccact cattcttcaa	4680
	ccaccattc acccatcact catcttttac ccaccacc tttgccactc atccttctgt	4740
	ccctcactct tccaaccatt catcaatcac ccaccatcc atcctttgcc acacaacat	4800
	ccaccattc ttctacctac ccatcctatc catccatcct tctatcagca tccttctacc	4860
	accatcctt cgttcggtea tccatcatca tccatccatc	4900
	<210> 8	
	<211> 136	
	<212> PRT	
	<213> 智人	

<400> 8

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

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

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

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

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

[0022]

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

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

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

Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala
130 135

<210> 9

<211> 181

<212> PRT

<213> 智人

<400> 9

	Met	Arg	Leu	Leu	Thr	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Cys	Gly	Ser	Val	Ala	Thr
	1				5				10						15	
	Pro	Leu	Gly	Pro	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	Ala	Ser
				20				25						30		
	Pro	Gly	Phe	Pro	Gly	Glu	Tyr	Ala	Asn	Asp	Gln	Glu	Arg	Arg	Trp	Thr
			35					40					45			
	Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe
		50					55					60				
	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	His	Leu	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser
	65					70					75					80
[0023]	Ser	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala	Thr	Leu	Cys	Gly	Gln	Glu	Ser	Thr	Asp
					85					90					95	
	Thr	Glu	Arg	Ala	Pro	Gly	Lys	Asp	Thr	Phe	Tyr	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser
				100					105					110		
	Leu	Asp	Ile	Thr	Phe	Arg	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Glu	Lys	Pro	Phe	Thr
		115						120					125			
	Gly	Phe	Glu	Ala	Phe	Tyr	Ala	Ala	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Gln	Val
		130					135						140			
	Ala	Pro	Gly	Glu	Ala	Pro	Thr	Cys	Asp	His	His	Cys	His	Asn	His	Leu
	145					150				155						160
	Gly	Gly	Phe	Tyr	Cys	Ser	Cys	Arg	Ala	Gly	Tyr	Val	Leu	His	Arg	Asn
					165					170					175	

Lys Arg Thr Cys Ser
180

<210> 10
<211> 293
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

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

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

[0024] 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
[0025]	Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile Ser Leu Glu Glu Gly Phe Ser Val Ile	
	210	215 220
	Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Thr His Pro Glu Thr Leu	
	225	230 235 240
	Cys Pro Tyr Asp Phe Leu Lys Ile Gln Thr Asp Arg Glu Glu His Gly	
		245 250 255
	Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro His Arg Ile Glu Thr Lys Ser Asn	
		260 265 270
	Thr Val Thr Ile Thr Phe Val Thr Asp Glu Ser Gly Asp His Thr Gly	
		275 280 285
	Trp Lys Ile His Tyr	
	290	

<210> 11
<211> 41
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

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

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

Ala Gly Tyr Val Leu His Arg Asn Lys
35 40

[0026] <210> 12
<211> 242
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

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

Leu Ile Leu Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Ala Leu Leu Tyr Asp Asn
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

[0027] Pro Pro Tyr Pro Arg Gly Ser Val Thr Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly
165 170 175

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

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

Val Ser Trp Gly Ser Met Asn Cys Gly Glu Ala Gly Gln Tyr Gly Val
210 215 220

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

Asp Phe

<210> 13
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 13

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

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

[0028] <220>
<223> 合成的

<400> 14

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

<210> 15
<211> 43
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 15

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

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

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

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 16

Thr Phe Arg Ser Asp Tyr Ser Asn
1 5

[0029]

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 17

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

Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr Gly Phe
20 25

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 18

Ile Asp Glu Cys Gln Val Ala Pro Gly

1 5

<210> 19

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 19

Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Ser Gly Gly Lys Asp Ser Cys

1 5 10 15

[0030]

Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val

20 25

<210> 20

<211> 960

<212> DNA

<213> 智人

<220>

<221> CDS

<222> (51)..(797)

<400> 20

attaactgag attaaccctc 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

[0031]	Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Ser Met Val Ala Ala Ser	
	5 10 15	
	tac tca gaa act gtg acc tgt gag gat gcc caa aag acc tgc cct gca	152
	Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys Pro Ala	
	20 25 30	
	gtg att gcc tgt agc tct cca ggc atc aac ggc ttc cca ggc aaa gat	200
	Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly Lys Asp	
	35 40 45 50	
	ggg cgt gat ggc acc aag gga gaa aag ggg gaa cca ggc caa ggg ctc	248
	Gly Arg Asp Gly Thr Lys Gly Glu Lys Gly Glu Pro Gly Gln Gly Leu	
	55 60 65	
	aga ggc tta cag ggc ccc cct gga aag ttg ggg cct cca gga aat cca	296
	Arg Gly Leu Gln Gly Pro Pro Gly Lys Leu Gly Pro Pro Gly Asn Pro	
	70 75 80	
	ggg cct tct ggg tca cca gga cca aag ggc caa aaa gga gac cct gga	344
	Gly Pro Ser Gly Ser Pro Gly Pro Lys Gly Gln Lys Gly Asp Pro Gly	
	85 90 95	
	aaa agt ccg gat ggt gat agt agc ctg gct gcc tca gaa aga aaa gct	392
	Lys Ser Pro Asp Gly Asp Ser Ser Leu Ala Ala Ser Glu Arg Lys Ala	
	100 105 110	
	ctg caa aca gaa atg gca cgt atc aaa aag tgg ctc acc ttc tct ctg	440
	Leu Gln Thr Glu Met Ala Arg Ile Lys Lys Trp Leu Thr Phe Ser Leu	
	115 120 125 130	
	ggc aaa caa gtt ggg aac aag ttc ttc ctg acc aat ggt gaa ata atg	488
	Gly Lys Gln Val Gly Asn Lys Phe Phe Leu Thr Asn Gly Glu Ile Met	
	135 140 145	
	acc ttt gaa aaa gtg aag gcc ttg tgt gtc aag ttc cag gcc tct gtg	536
	Thr Phe Glu Lys Val Lys Ala Leu Cys Val Lys Phe Gln Ala Ser Val	
	150 155 160	
	gcc acc ccc agg aat gct gca gag aat gga gcc att cag aat ctc atc	584
	Ala Thr Pro Arg Asn Ala Ala Glu Asn Gly Ala Ile Gln Asn Leu Ile	
	165 170 175	
	aag gag gaa gcc ttc ctg ggc atc act gat gag aag aca gaa ggg cag	632

	Lys Glu Glu Ala Phe Leu Gly Ile Thr Asp Glu Lys Thr Glu Gly Gln	
	180 185 190	
	ttt gtg gat ctg aca gga aat aga ctg acc tac aca aac tgg aac gag	680
	Phe Val Asp Leu Thr Gly Asn Arg Leu Thr Tyr Thr Asn Trp Asn Glu	
	195 200 205 210	
	ggt gaa ccc aac aat gct ggt tct gat gaa gat tgt gta ttg cta ctg	728
	Gly Glu Pro Asn Asn Ala Gly Ser Asp Glu Asp Cys Val Leu Leu Leu	
	215 220 225	
	aaa aat ggc cag tgg aat gac gtc ccc tgc tcc acc tcc cat ctg gcc	776
	Lys Asn Gly Gln Trp Asn Asp Val Pro Cys Ser Thr Ser His Leu Ala	
	230 235 240	
	gtc tgt gag ttc cct atc tga agggctcatat cactcaggcc ctccttgtct	827
	Val Cys Glu Phe Pro Ile	
	245	
	ttttactgca acccacaggc ccacagtatg cttgaaaaga taaattatat caatttcctc	887
[0032]	atatccagta ttgttccttt tgtgggcaat cactaaaaat gatcactaac agcaccaaca	947
	aagcaataat agt	960
	<210> 21	
	<211> 248	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 21	
	Met Ser Leu Phe Pro Ser Leu Pro Leu Leu Leu Leu Ser Met Val Ala	
	1 5 10 15	
	Ala Ser Tyr Ser Glu Thr Val Thr Cys Glu Asp Ala Gln Lys Thr Cys	
	20 25 30	
	Pro Ala Val Ile Ala Cys Ser Ser Pro Gly Ile Asn Gly Phe Pro Gly	
	35 40 45	

	Lys	Asp	Gly	Arg	Asp	Gly	Thr	Lys	Gly	Glu	Lys	Gly	Glu	Pro	Gly	Gln	
	50						55					60					
	Gly	Leu	Arg	Gly	Leu	Gln	Gly	Pro	Pro	Gly	Lys	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	
	65					70					75					80	
	Asn	Pro	Gly	Pro	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Pro	Lys	Gly	Gln	Lys	Gly	Asp	
					85					90					95		
	Pro	Gly	Lys	Ser	Pro	Asp	Gly	Asp	Ser	Ser	Leu	Ala	Ala	Ser	Glu	Arg	
				100					105						110		
	Lys	Ala	Leu	Gln	Thr	Glu	Met	Ala	Arg	Ile	Lys	Lys	Trp	Leu	Thr	Phe	
		115						120					125				
[0033]	Ser	Leu	Gly	Lys	Gln	Val	Gly	Asn	Lys	Phe	Phe	Leu	Thr	Asn	Gly	Glu	
		130						135					140				
	Ile	Met	Thr	Phe	Glu	Lys	Val	Lys	Ala	Leu	Cys	Val	Lys	Phe	Gln	Ala	
	145					150					155				160		
	Ser	Val	Ala	Thr	Pro	Arg	Asn	Ala	Ala	Glu	Asn	Gly	Ala	Ile	Gln	Asn	
					165						170				175		
	Leu	Ile	Lys	Glu	Glu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Thr	Asp	Glu	Lys	Thr	Glu	
			180						185					190			
	Gly	Gln	Phe	Val	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Leu	Thr	Tyr	Thr	Asn	Trp	
		195							200					205			
	Asn	Glu	Gly	Glu	Pro	Asn	Asn	Ala	Gly	Ser	Asp	Glu	Asp	Cys	Val	Leu	
		210						215					220				

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

Leu Ala Val Cys Glu Phe Pro Ile
245

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 其中在位置 1 处的 X 代表羟脯氨酸

[0034]

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> 其中在位置 4 处的 X 代表疏水残基

<400> 22

Xaa Gly Lys Xaa Gly Pro
1 5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>

<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> 其中 X 代表羟脯氨酸

<400> 23

Xaa Gly Lys Leu Gly
1 5

<210> 24
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0035] <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(15)
<223> 其中在位置 9 和 15 处的 X 代表羟脯氨酸

<400> 24

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

<210> 25
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(27)
<223> 其中在位置 3、6、15、21、24、27 的 X 代表羟脯氨酸

<400> 25

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

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

<210> 26

<211> 53

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> misc_feature

[0036]

<222> (26)..(26)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (41)..(41)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<220>

<221> misc_feature

<222> (50)..(50)

<223> Xaa 可以是任何天然存在的氨基酸

<400> 26

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

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

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

Asp Xaa Gly Lys Ser
50

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

[0037] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(33)

<223> 其中在位置 3、6、12、18、21、30、33 处的 X 代表羟脯氨酸

<400> 27

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

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

Xaa

<210> 28
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(45)
<223> 其中在位置 3、6、9、27、30、36、42、45 处的 X 代表羟脯氨酸

<400> 28

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

[0038]

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

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

<210> 29
<211> 24
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 29

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

Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile
20

<210> 30

<211> 559

<212> DNA

<213> 智人

<400> 30

atgaggctgc tgaccctcct gggccttctg tgtggctcgg tggccacccc cttgggcccg	60
aagtggcctg aacctgtgtt cgggcgcctg gcatcccccg gctttccagg ggagtatgcc	120
aatgaccagg agcggcgctg gaccctgact gcaccccccg gctaccgcct gcgcctctac	180
ttcaccact tcgacctgga gctctccac ctcgcgagt acgacttcgt caagctgagc	240
tcgggggcca aggtgctggc cacgctgtgc gggcaggaga gcacagacac ggagcgggcc	300
cctggcaagg acactttcta ctgctgggc tccagcctgg acattacctt ccgctccgac	360
tactccaacg agaagccgtt cacgggggtc gaggccttct atgcagccga ggacattgac	420
gagtgccagg tggccccggg agaggcgccc acctgcgacc accactgcca caaccacctg	480
ggcggtttct actgctcctg ccgcgcaggc tacgtcctgc accgtaacaa gcgcacctgc	540
tcagccctgt gctccggcc	559

[0039]

<210> 31

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 31

cgggcacacc atgaggctgc tgaccctcct gggc	34

<210> 32

<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 32
gacattacct tccgctccga ctccaacgag aag

33

<210> 33
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 33
agcagccctg aatacccacg gccgtatccc aaa

33

[0040]

<210> 34
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 34
cgggatccat gaggctgctg accctc

26

<210> 35
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 35

	ggaattccta ggctgcata	19
	<210> 36	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 36	
	ggaattccta caggcgct	19
	<210> 37	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0041]	<223> 合成的	
	<400> 37	
	ggaattccta gtagtgat	19
	<210> 38	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 38	
	tgcggccgct gtagtgctg tcttt	25
	<210> 39	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 39		
	ggaattcact cgttattctc gga	23	
	<210> 40		
	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 40		
	tccgagaata acgagtg	17	
	<210> 41		
	<211> 29		
	<212> DNA		
[0042]	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 41		
	cattgaaagc tttagggtag aagttgttc	29	
	<210> 42		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成的		
	<400> 42		
	cgcggccgca gctgctcaga gtgtaga	27	
	<210> 43		

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 43

cggtaaagctt cactggctca gggaaata

28

<210> 44

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 44

aagaagcttg ccgccacat ggattggctg tggaact

37

[0043]

<210> 45

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 45

cgggatcctc aaactttctt gtccaccttg g

31

<210> 46

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 46

	aagaaagctt gccgccacca tgttctcact agctct	36
	<210> 47	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<400> 47	
	cgggatcctt ctccctctaa cactct	26
	<210> 48	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0044]	<223> 合成的	
	<400> 48	
	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His	
	1 5	
	<210> 49	
	<211> 4960	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 49	
	ccggacgtgg tggcgcatgc ctgtaatccc agctactcgg gaggctgagg caggagaatt	60
	gctcgaaccc cggaggcaga ggtttggtgg ctcacacctg taatcccagc actttgcgag	120
	gctgaggcag gtgcatcgct ttggctcagg agttcaagac cagcctgggc aacacaggga	180
	gacccccatc tctacaaaaa acaaaaacaa atataaaggg gataaaaaaa aaaaaaagac	240
	aagacatgaa tccatgagga cagagtgtgg aagaggaagc agcagcctca aagttctgga	300

	agctggaaga acagataaac aggtgtgaaa taactgcctg gaaagcaact tctttttttt	360
	tttttttttt tttaggtgg agtctcactc tgtcgtccag gctggagtgc agtggtgcga	420
	tctcgatca ctgcaacctc cgctcccag gctcaagcaa ttctcctgcc tcagcctccc	480
	gagtagctgg gattataagt gcgcgtgcc acacctggat gatttttgta 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 accaacaatgg	840
	agaaaccca tccctacca aaataaaaaa ttagccaggt gtggtggtgc tcgctgtaa	900
	tcccagctac ttgggaggct gaggtgggag gattgctga acacaggaag tagaggctgc	960
[0045]	agtgagctat gattgcagca ctgcactgaa gccggggcaa cagaacaaga tccaaaaaa	1020
	agggaggggt gaggggcaga gccaggattt gttccaggc tgttgttacc taggtccgac	1080
	tcctggctcc cagagcagcc tgtcctgcct gcctggaact ctgagcaggc tggagtcatg	1140
	gagtcgattc ccagaatccc agagtcaggg aggctggggg caggggcagg tcaactggaca	1200
	aacagatcaa aggtgagacc agcgtagggc tgcagaccag gccaggccag ctggacgggc	1260
	acacatgag gtaggtgggc gccacagcc tccctgcagg gtgtggggtg ggagcacagg	1320
	cctgggccct caccgccct gccctgccca taggtgtctg accctcctgg gccttctgtg	1380
	tggctcgtg gccacccct tgggccgaa gtggcctgaa cctgtgttcg ggcgcctggc	1440
	atccccggc tttccagggg agtatgcaa tgaccaggag cggcgtgga ccctgactgc	1500
	acccccggc taccgcctgc gcctctactt caccacttc gacctggagc tctccacct	1560
	ctgcgagtac gacttcgtca aggtgccgtc aggacgggag ggctggggtt tctcagggtc	1620

[0046]	gggggggtccc caaggagtag ccagggttca gggacacctg ggagcagggg ccaggcttgg	1680
	ccaggaggga gatcaggcct gggctcttgc ttcactccct gtgacacctg accccacagc	1740
	tgagctcggg ggccaaggtg ctggccacgc tgtgcgggca ggagagcaca gacacggagc	1800
	gggcccctgg caaggacact ttctactcgc tgggctccag cctggacatt accttccgct	1860
	ccgactactc caacgagaag ccgttcacgg ggttcgaggc cttctatgca gccgagggtg	1920
	agccaagagg ggtcctgcaa catctcagtc tgcgcagctg gctgtggggg taactctgtc	1980
	ttaggccagg cagccctgcc ttcagtttcc ccacctttcc cagggcaggg gagaggcctc	2040
	tggcctgaca tcatccacaa tgcaaagacc aaaacagccg tgacctccat tcacatgggc	2100
	tgagtgccaa ctctgagcca gggatctgag gacagcatcg cctcaagtga cgcagggact	2160
	ggccggggcgc agcagctcac gcctgtaatt ccagcacitt gggaggccga ggctggctga	2220
	tcatttgagg tcaggagtgc aaggccagcc agggcaacac ggtgaaactc tatctccact	2280
	aaaactacaa aaattagctg ggcgtggtgg tgcgcacctg gaatcccagc tactagggag	2340
	gctgaggcag gagaattgct tgaacctgcg aggtggaggc tgcagtgaac agagattgca	2400
	ccactacact ccagcctggg cgacagagct agactccgtc tcaaaaaaca aaaaacaaaa	2460
	acgacgcagg ggccgagggc cccatttaca gctgacaaag tggggccctg ccagcgggag	2520
	cgtgccagg atgtttgatt tcagatccca gtccctgcag agaccaactg tgtgacctct	2580
	ggcaagtggc tcaatttctc tgctccttag gaagctgctg caagggttca gcgtgtagc	2640
	cccgccccct gggtttgatt gactcccctc attagctggg tgacctcggg ccggacactg	2700
	aaactcccac tggtttaaca gaggtgatgt ttgcatcttt ctcccagcgc tgctgggagc	2760
	ttgcagcgac cctaggcctg taaggtgatt ggcccggcac cagtcccga ccctagacag	2820
	gacgaggcct cctctgaggt ccactctgag gtcatggatc tcctgggagg agtccaggct	2880
	ggateccgcc tctttccctc ctgacggcct gcctggccct gcctctcccc cagacattga	2940

	cgagtgccag gtggccccgg gagaggcgcc cacctgcgac caccactgcc acaaccacct	3000
	gggcggtttc tactgtcctt gccgcgcagg ctacgtcctg caccgtaaca agcgcacctg	3060
	ctcagccctg tgctccggcc aggtcttcac ccagaggtct ggggagctca gcagccctga	3120
	ataccacagg ccgtatccca aactctccag ttgcacttac agcatcagcc tggaggaggg	3180
	gttcagtgtc attctggact ttgtggagtc cttcgatgtg gagacacacc ctgaaacct	3240
	gtgtccctac gactttctca agattcaaac agacagagaa gaacatggcc cattctgttg	3300
	gaagacattg cccacagga ttgaaacaaa aagcaacacg gtgaccatca ctttgtcac	3360
	agatgaatca ggagaccaca caggctggaa gatccactac acgagcacag cgcacgcttg	3420
	cccttatccg atggcgccac ctaatggcca cgtttcacct gtgcaagcca aatacatcct	3480
	gaaagacagc ttctccatct ttgcgagac tggctatgag cttctgcaag gtcacttgcc	3540
	cctgaaatcc ttactgcag ttgtcagaa agatggatct tgggaccggc caatgcccgc	3600
[0047]	gtgcagcatt gttgactgtg gccctcctga tgatctaccc agtggccgag tggagtacat	3660
	cacaggtcct ggagtgacca cctacaaagc tgtgattcag tacagctgtg aagagacctt	3720
	ctacacaatg aaagtgaatg atggtaaata tgtgtgtgag gctgatggat tctggacgag	3780
	ctccaaagga gaaaaatcac tcccagtctg tgagcctgtt tgtggactat cagcccgcc	3840
	aacaggaggg cgtatatatg gagggcaaaa ggcaaacct ggtgattttc cttggcaagt	3900
	cctgatatta ggtggaacca cagcagcagg tgcactttta tatgacaact gggtcctaac	3960
	agctgctcat gccgtctatg agcaaaaaca tgatgcatcc gccctggaca ttcgaatggg	4020
	caccctgaaa agactatcac ctcatatac acaagcctgg tctgaagctg tttttataca	4080
	tgaaggttat actcatgatg ctggctttga caatgacata gcactgatta aattgaataa	4140
	caaagttgta atcaatagca acatcacgcc tatttgtctg ccaagaaaag aagctgaatc	4200
	ctttatgagg acagatgaca ttggaactgc atctggatgg ggattaaccc aaaggggttt	4260

	tcttgctaga aatctaagt atgtcgacat accgattgtt gaccatcaaa aatgtactgc	4320
	tgcatatgaa aagccaccct atccaagggg aagtgtact gctaacaatgc tttgtgctgg	4380
	cttagaaagt gggggcaagg acagctgcag aggtgacagc ggaggggcac tgggtgttct	4440
	agatagttaa acagagaggt ggtttgtggg aggaatagtg tcctgggggt ccatgaattg	4500
	tggggaagca ggtcagtatg gagtctacac aaaagttatt aactatattc cctggatcga	4560
	gaacataatt agtgattttt aacttgcgtg tctgcagtca aggattcttc atttttagaa	4620
	atgcctgtga agaccttggc agcgacgtgg ctcgagaagc attcatcatt actgtggaca	4680
	tggcagttgt tgctccaccc aaaaaaacag actccaggtg aggtgtgtgt catttctcca	4740
	cttgccagtt taattccagc cttaaccatt gactcaaggg gacataaacc acgagagtga	4800
	cagtcattct tgcccacca gtgtaattgt actgtcctaa ttacatttca ttacctaaa	4860
	aagccagtct cttttcatac tggctgttgg catttctgta aactgcctgt ccatgtcttt	4920
[0048]	tgtttttaa cttgttctta ttgaaaaaa aaaaaaaaaa	4960

<210> 50
 <211> 2090
 <212> DNA
 <213> 鼠

<220>
 <221> CDS
 <222> (33)..(2090)

<400> 50	
ggcgctggac tgcagagcta tgggtggcaca cc atg agg cta ctc atc ttc ctg	53
Met Arg Leu Leu Ile Phe Leu	
1 5	
ggt ctg ctg tgg agt ttg gtg gcc aca ctt ctg ggt tca aag tgg cct	101
Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro	
10 15 20	

	gaa cct gta ttc ggg cgc ctg gtg tcc cct ggc ttc cca gag aag tat	149
	Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu Val Ser Pro Gly Phe Pro Glu Lys Tyr	
	25 30 35	
	gct gac cat caa gat cga tcc tgg aca ctg act gca ccc cct ggc tac	197
	Ala Asp His Gln Asp Arg Ser Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Tyr	
	40 45 50 55	
	cgc ctg cgc ctc tac ttc acc cac ttt gac ctg gaa ctc tct tac cgc	245
	Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr His Phe Asp Leu Glu Leu Ser Tyr Arg	
	60 65 70	
	tgc gag tat gac ttt gtc aag ttg agc tca ggg acc aag gtg ctg gcc	293
	Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Ser Ser Gly Thr Lys Val Leu Ala	
	75 80 85	
	aca ctg tgt ggg cag gag agt aca gac act gag cag gca cct ggc aat	341
	Thr Leu Cys Gly Gln Glu Ser Thr Asp Thr Glu Gln Ala Pro Gly Asn	
	90 95 100	
[0049]	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 Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu Ser Ser Cys Thr Tyr Ser Ile 200 205 210 215	677
	cgc ctg gag gac ggc ttc agt gtc atc ctg gac ttc gtg gag tcc ttc Arg Leu Glu Asp Gly Phe Ser Val Ile Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe 220 225 230	725
	gat gtg gag acg cac cct gaa gcc cag tgc ccc tat gac tcc ctc aag Asp Val Glu Thr His Pro Glu Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys 235 240 245	773
	att caa aca gac aag ggg gaa cac ggc cca ttt tgt ggg aag acg ctg Ile Gln Thr Asp Lys Gly Glu His Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu 250 255 260	821
	cct ccc agg att gaa act gac agc cac aag gtg acc atc acc ttt gcc Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser His Lys Val Thr Ile Thr Phe Ala 265 270 275	869
[0050]	act gac gag tcg ggg aac cac aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser 280 285 290 295	917
	aca gca cgg ccc tgc cct gat cca acg gcg cca cct aat ggc agc att Thr Ala Arg Pro Cys Pro Asp Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly Ser Ile 300 305 310	965
	tca cct gtg caa gcc acg tat gtc ctg aag gac agg ttt tct gtc ttc Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr Val Leu Lys Asp Arg Phe Ser Val Phe 315 320 325	1013
	tgc aag aca ggc ttc gag ctt ctg caa ggt tct gtc ccc ctg aaa tca Cys Lys Thr Gly Phe Glu Leu Leu Gln Gly Ser Val Pro Leu Lys Ser 330 335 340	1061
	ttc act gct gtc tgt cag aaa gat gga tct tgg gac cgg ccg atg cca Phe Thr Ala Val Cys Gln Lys Asp Gly Ser Trp Asp Arg Pro Met Pro 345 350 355	1109
	gag tgc agc att att gat tgt ggc cct ccc gat gac cta ccc aat ggc Glu Cys Ser Ile Ile Asp Cys Gly Pro Pro Asp Asp Leu Pro Asn Gly 360 365 370 375	1157

	cat gtg gac tat atc aca ggc cct caa gtg act acc tac aaa gct gtg His Val Asp Tyr Ile Thr Gly Pro Gln Val Thr Thr Tyr Lys Ala Val 380 385 390	1205
	att cag tac agc tgt gaa gag act ttc tac aca atg agc agc aat ggt Ile Gln Tyr Ser Cys Glu Glu Thr Phe Tyr Thr Met Ser Ser Asn Gly 395 400 405	1253
	aaa tat gtg tgt gag gct gat gga ttc tgg acg agc tcc aaa gga gaa Lys Tyr Val Cys Glu Ala Asp Gly Phe Trp Thr Ser Ser Lys Gly Glu 410 415 420	1301
	aaa ctc ccc ccg gtt tgt gag cct gtt tgt ggg ctg tcc aca cac act Lys Leu Pro Pro Val Cys Glu Pro Val Cys Gly Leu Ser Thr His Thr 425 430 435	1349
	ata gga gga cgc ata gtt gga ggg cag cct gca aag cct ggt gac ttt Ile Gly Gly Arg Ile Val Gly Gly Gln Pro Ala Lys Pro Gly Asp Phe 440 445 450 455	1397
[0051]	cct tgg caa gtc ttg ttg ctg ggt caa act aca gca gca gca ggt gca Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Gly Gln Thr Thr Ala Ala Ala Gly Ala 460 465 470	1445
	ctt ata cat gac aat tgg gtc cta aca gcc gct cat gct gta tat gag Leu Ile His Asp Asn Trp Val Leu Thr Ala Ala His Ala Val Tyr Glu 475 480 485	1493
	aaa aga atg gca gcg tcc tcc ctg aac atc cga atg ggc atc ctc aaa Lys Arg Met Ala Ala Ser Ser Leu Asn Ile Arg Met Gly Ile Leu Lys 490 495 500	1541
	agg ctc tca cct cat tac act caa gcc tgg ccc gag gaa atc ttt ata Arg Leu Ser Pro His Tyr Thr Gln Ala Trp Pro Glu Glu Ile Phe Ile 505 510 515	1589
	cat gaa ggc tac act cac ggt gct ggt ttt gac aat gat ata gca ttg His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu 520 525 530 535	1637
	att aaa ctc aag aac aaa gtc aca atc aac gga agc atc atg cct gtt Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr Ile Asn Gly Ser Ile Met Pro Val 540 545 550	1685

	tgc cta ccg cga aaa gaa gct gca tcc tta atg aga aca gac ttc act Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala Ser Leu Met Arg Thr Asp Phe Thr 555 560 565	1733
	gga act gtg gct ggc tgg ggg tta acc cag aag ggg ctt ctt gct aga Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln Lys Gly Leu Leu Ala Arg 570 575 580	1781
	aac cta atg ttt gtg gac ata cca att gct gac cac caa aaa tgt acc Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Ala Asp His Gln Lys Cys Thr 585 590 595	1829
	acc gtg tat gaa aag ctc tat cca gga gta aga gta agc gct aac atg Thr Val Tyr Glu Lys Leu Tyr Pro Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met 600 605 610 615	1877
	ctc tgt gct ggc tta gag act ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp 620 625 630	1925
[0052]	agt ggg ggg gca tta gtg ttt cta gat aat gag aca cag cga tgg ttt Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe 635 640 645	1973
	gtg gga gga ata gtt tcc tgg ggt tcc att aat tgt ggg gcg gca ggc Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly 650 655 660	2021
	cag tat ggg gtc tac aca aaa gtc atc aac tat att ccc tgg aat gag Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile Asn Tyr Ile Pro Trp Asn Glu 665 670 675	2069
	aac ata ata agt aat ttc taa Asn Ile Ile Ser Asn Phe 680 685	2090
	<210> 51 <211> 685 <212> PRT <213> 鼠	
	<400> 51	

	Met	Arg	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	Leu	Leu	Trp	Ser	Leu	Val	Ala	Thr
	1				5						10				15	
	Leu	Leu	Gly	Ser	Lys	Trp	Pro	Glu	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Leu	Val	Ser
				20					25					30		
	Pro	Gly	Phe	Pro	Glu	Lys	Tyr	Ala	Asp	His	Gln	Asp	Arg	Ser	Trp	Thr
			35					40					45			
	Leu	Thr	Ala	Pro	Pro	Gly	Tyr	Arg	Leu	Arg	Leu	Tyr	Phe	Thr	His	Phe
		50					55					60				
	Asp	Leu	Glu	Leu	Ser	Tyr	Arg	Cys	Glu	Tyr	Asp	Phe	Val	Lys	Leu	Ser
	65					70					75					80
[0053]	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

[0054] 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	
[0055]	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

[0056] Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly Gly
610 615 620

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

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

Ile Asn Cys Gly Ala Ala Gly Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ile
660 665 670

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

<210> 52

<211> 670

<212> PRT

<213> 鼠

<400> 52

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

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

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

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

[0057] 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

[0058] 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
[0059]	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

[0060] Gly Val Arg Val Ser Ala Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Glu Thr Gly
 595 600 605

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

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

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

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

<210> 53
 <211> 2091
 <212> DNA
 <213> 大鼠

<220>		
<221>	CDS	
<222>	(10).. (2067)	
<400>	53	
tggcacaca atg agg cta ctg atc gtc ctg ggt ctg ctt tgg agt ttg gtg		51
Met Arg Leu Leu Ile Val Leu Gly Leu Leu Trp Ser Leu Val		
1 5 10		
gcc aca ctt ttg ggc tcc aag tgg cct gag cct gta ttc ggg cgc ctg		99
Ala Thr Leu Leu Gly Ser Lys Trp Pro Glu Pro Val Phe Gly Arg Leu		
15 20 25 30		
gtg tcc ctg gcc ttc cca gag aag tat ggc aac cat cag gat cga tcc		147
Val Ser Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser		
35 40 45		
tgg acg ctg act gca ccc cct ggc ttc cgc ctg cgc ctc tac ttc acc		195
Trp Thr Leu Thr Ala Pro Pro Gly Phe Arg Leu Arg Leu Tyr Phe Thr		
50 55 60		
[0061] 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

[0062]	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 Tyr Leu Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His 160 165 170	531
	cag aac aag cat acc tgc tca gcc ctt tgt tca ggc cag gtg ttc act Gln Asn Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr 175 180 185 190	579
	ggg agg tct ggc ttt ctc agt agc cct gag tac cca cag cca tac ccc Gly Arg Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro 195 200 205	627
	aaa ctc tcc agc tgc gcc tac aac atc cgc ctg gag gaa ggc ttc agt Lys Leu Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser 210 215 220	675
	atc acc ctg gac ttc gtg gag tcc ttt gat gtg gag atg cac cct gaa Ile Thr Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu 225 230 235	723
	gcc cag tgc ccc tac gac tcc ctc aag att caa aca gac aag agg gaa Ala Gln Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu 240 245 250	771
	tac ggc ccg ttt tgt ggg aag acg ctg ccc ccc agg att gaa act gac Tyr Gly Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp 255 260 265 270	819
	agc aac aag gtg acc att acc ttt acc acc gac gag tca ggg aac cac Ser Asn Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His 275 280 285	867
	aca ggc tgg aag ata cac tac aca agc aca gca cag ccc tgc cct gat Thr Gly Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp 290 295 300	915
	cca acg gcg cca cct aat ggt cac att tca cct gtg caa gcc acg tat Pro Thr Ala Pro Pro Asn Gly His Ile Ser Pro Val Gln Ala Thr Tyr 305 310 315	963
	gtc ctg aag gac agc ttt tct gtc ttc tgc aag act ggc ttc gag ctt	1011

[0063]	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

[0064]	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 Ala Trp Pro Glu Ala Val Phe Ile His Glu Gly Tyr Thr His Gly Ala 515 520 525	1587
	ggt ttt gac aat gat ata gca ctg att aaa ctc aag aac aaa gtc aca Gly Phe Asp Asn Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Lys Asn Lys Val Thr 530 535 540	1635
	atc aac aga aac atc atg ccg att tgt cta cca aga aaa gaa gct gca Ile Asn Arg Asn Ile Met Pro Ile Cys Leu Pro Arg Lys Glu Ala Ala 545 550 555	1683
	tcc tta atg aaa aca gac ttc gtt gga act gtg gct ggc tgg ggg tta Ser Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu 560 565 570	1731
	acc cag aag ggg ttt ctt gct aga aac cta atg ttt gtg gac ata cca Thr Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro 575 580 585 590	1779
	att gtt gac cac caa aaa tgt gct act gcg tat aca aag cag ccc tac Ile Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr 595 600 605	1827
	cca gga gca aaa gtg act gtt aac atg ctc tgt gct ggc cta gac cgc Pro Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg 610 615 620	1875
	ggt ggc aag gac agc tgc aga ggt gac agc gga ggg gca tta gtg ttt Gly Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe 625 630 635	1923
	cta gac aat gaa aca cag aga tgg ttt gtg gga gga ata gtt tcc tgg Leu Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp 640 645 650	1971
	ggt tct att aac tgt ggg ggg tca gaa cag tat ggg gtc tac acg aaa Gly Ser Ile Asn Cys Gly Gly Ser Glu Gln Tyr Gly Val Tyr Thr Lys 655 660 665 670	2019
	gtc acg aac tat att ccc tgg att gag aac ata ata aat aat ttc taa	2067

Val Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
675 680 685

tttgcaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

2091

<210> 54

<211> 685

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 54

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

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

[0065] Leu Ala Phe Pro Glu Lys Tyr Gly Asn His Gln Asp Arg Ser Trp Thr
35 40 45

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

Asn Leu Glu Leu Ser Tyr Arg Cys Glu Tyr Asp Phe Val Lys Leu Thr
65 70 75 80

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

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

Leu Lys Val Thr Phe His Ser Asp Tyr Ser Asn Glu Lys Pro Phe Thr
115 120 125

	Gly Phe Glu Ala Phe Tyr Ala Ala Glu Asp Val Asp Glu Cys Arg Thr	
	130	140
	Ser Leu Gly Asp Ser Val Pro Cys Asp His Tyr Cys His Asn Tyr Leu	
	145	155
	Gly Gly Tyr Tyr Cys Ser Cys Arg Val Gly Tyr Ile Leu His Gln Asn	
	165	175
	Lys His Thr Cys Ser Ala Leu Cys Ser Gly Gln Val Phe Thr Gly Arg	
	180	190
	Ser Gly Phe Leu Ser Ser Pro Glu Tyr Pro Gln Pro Tyr Pro Lys Leu	
	195	205
[0066]	Ser Ser Cys Ala Tyr Asn Ile Arg Leu Glu Glu Gly Phe Ser Ile Thr	
	210	220
	Leu Asp Phe Val Glu Ser Phe Asp Val Glu Met His Pro Glu Ala Gln	
	225	235
	Cys Pro Tyr Asp Ser Leu Lys Ile Gln Thr Asp Lys Arg Glu Tyr Gly	
	245	255
	Pro Phe Cys Gly Lys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Glu Thr Asp Ser Asn	
	260	270
	Lys Val Thr Ile Thr Phe Thr Thr Asp Glu Ser Gly Asn His Thr Gly	
	275	285
	Trp Lys Ile His Tyr Thr Ser Thr Ala Gln Pro Cys Pro Asp Pro Thr	
	290	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

[0067] 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
[0068]	Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr Gln	
	565	570 575
	Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile Val	
	580	585 590
	Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro Gly	
	595	600 605
	Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly Gly	
	610	615 620
	Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu Asp	
	625	630 635 640
	Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly Ser	
	645	650 655

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

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

<210> 55
 <211> 670
 <212> PRT
 <213> 大鼠
 <400> 55

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

[0069] 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

[0070] 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
[0071]	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
[0072]	Leu Met Lys Thr Asp Phe Val Gly Thr Val Ala Gly Trp Gly Leu Thr	
	545	550 555 560
	Gln Lys Gly Phe Leu Ala Arg Asn Leu Met Phe Val Asp Ile Pro Ile	
		565 570 575
	Val Asp His Gln Lys Cys Ala Thr Ala Tyr Thr Lys Gln Pro Tyr Pro	
		580 585 590
	Gly Ala Lys Val Thr Val Asn Met Leu Cys Ala Gly Leu Asp Arg Gly	
		595 600 605
	Gly Lys Asp Ser Cys Arg Gly Asp Ser Gly Gly Ala Leu Val Phe Leu	
		610 615 620
	Asp Asn Glu Thr Gln Arg Trp Phe Val Gly Gly Ile Val Ser Trp Gly	
		625 630 635 640

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

Thr Asn Tyr Ile Pro Trp Ile Glu Asn Ile Ile Asn Asn Phe
660 665 670

<210> 56
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 56
atgaggctgc tgaccctcct gggccttc

28

[0073]

<210> 57
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 57
gtgcccctcc tgcgtcacct ctg

23

<210> 58
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 智人

<400> 58
cagaggtgac gcaggagggg cac

23

	<210> 59	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 智人	
	<400> 59	
	ttaaaatcac taattatggt ctgatc	27
	<210> 60	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 鼠	
	<400> 60	
[0074]	atgaggctac tcattcttct gg	22
	<210> 61	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 鼠	
	<400> 61	
	ctgcagaggt gacgcagggg ggg	23
	<210> 62	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 鼠	

	<400> 62 ccccccctgc gtcacctctg cag	23
	<210> 63 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 鼠	
	<400> 63 ttagaaatta cttattatgt tctcaatcc	29
	<210> 64 <211> 29 <212> DNA <213> 人工序列	
[0075]	<220> <223> 大鼠	
	<400> 64 gaggtgacgc aggaggggca ttagtgttt	29
	<210> 65 <211> 37 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 大鼠	
	<400> 65 ctagaaacac taatgccct cctgcgtcac ctctgca	37
	<210> 66 <211> 354 <212> DNA <213> 人工序列	

<220>

<223> 合成的

<400> 66

caggtcacct tgaaggagtc tggtcctgtg ctggtgaaac ccacagagac cctcacgctg 60

acctgcaccg tctctgggtt ctactcagc aggggtaaaa tgggtgtgag ctggatccgt 120

cagccccag ggaaggccct ggagtggctt gcacacattt tttcgagtga cgaaaaatcc 180

tacaggacat cgctgaagag caggctcacc atctccaagg acacctcaa aaaccaggtg 240

gtccttaca tgaccaacat ggacctgtg gacacagcca cgtattactg tgcacggata 300

cgacgtggag gaattgacta ctggggccag ggaaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 67

<211> 118

<212> PRT

[0076] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 67

Gln	Val	Thr	Leu	Lys	Glu	Ser	Gly	Pro	Val	Leu	Val	Lys	Pro	Thr	Glu
1				5				10					15		

Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Arg	Gly
			20				25					30			

Lys	Met	Gly	Val	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Leu	Glu
		35					40					45			

Trp	Leu	Ala	His	Ile	Phe	Ser	Ser	Asp	Glu	Lys	Ser	Tyr	Arg	Thr	Ser
		50					55					60			

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Arg Arg Gly Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

[0077]

<220>

<223> 合成的

<400> 68

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Asp Tyr Ala
50 55 60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65 70 75 80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Phe Gly Val Pro Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 69
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

[0078]

<220>
<221> misc_feature
<222> (246)..(246)
<223> n 是 a、c、g 或 t

<400> 69
cagccagtgc tgactcagcc cccctcactg tccgtgtccc caggacagac agccagcatc 60
acctgctctg gagagaaatt gggggataaa tatgcttact ggtatcagca gaagccaggc 120
cagtccccctg tgttggtcat gtatcaagat aaacagcggc cctcagggat ccctgagcga 180
ttctctggct ccaactctgg gaacacagcc actctgacca tcagcgggac ccaggctatg 240
gatgangctg actattactg tcaggcgtgg gacagcagca ctgcggtatt cggcggaggg 300
accaagctga ccgtccta 318

<210> 70
<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 70

Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Glu Lys Leu Gly Asp Lys Tyr Ala
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Met Tyr
35 40 45

[0079] Gln Asp Lys Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Ser Thr Ala Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 71

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 71

Ser Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Thr Ile Thr Cys Ala Gly Asp Asn Leu Gly Lys Lys Arg Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

[0080] Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Gly Glu Ala Gly
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ile Ala Thr Asp His
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Ala Ala Ala Gly
100 105 110

Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu
115 120

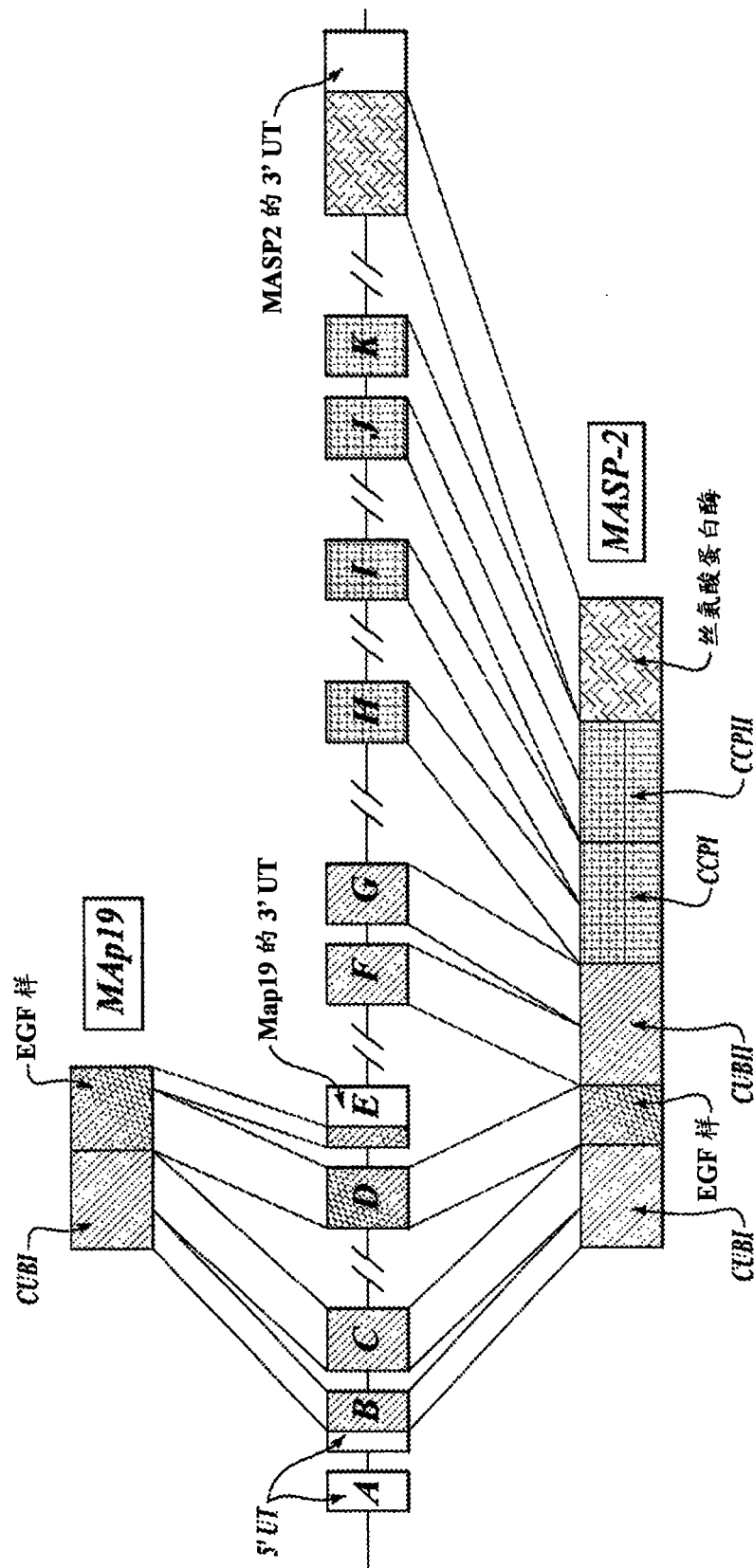


图1

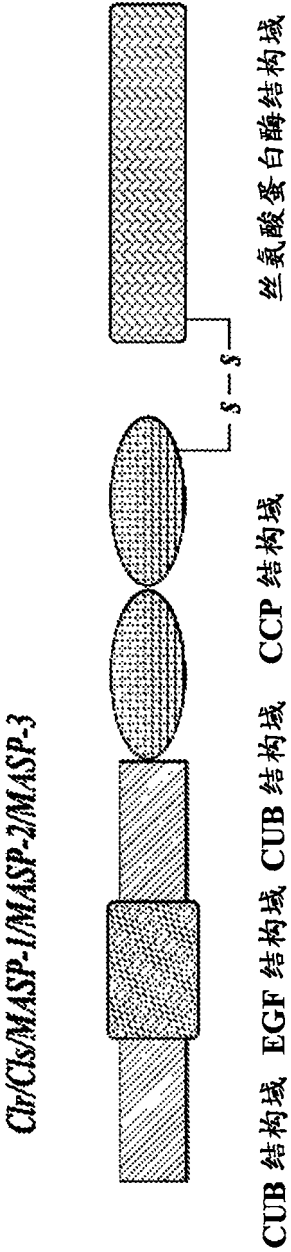


图2A

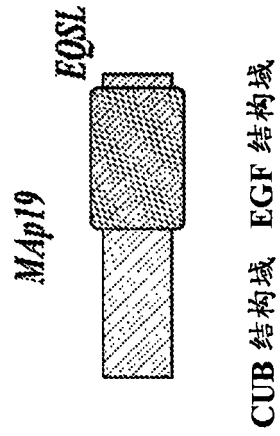


图2B

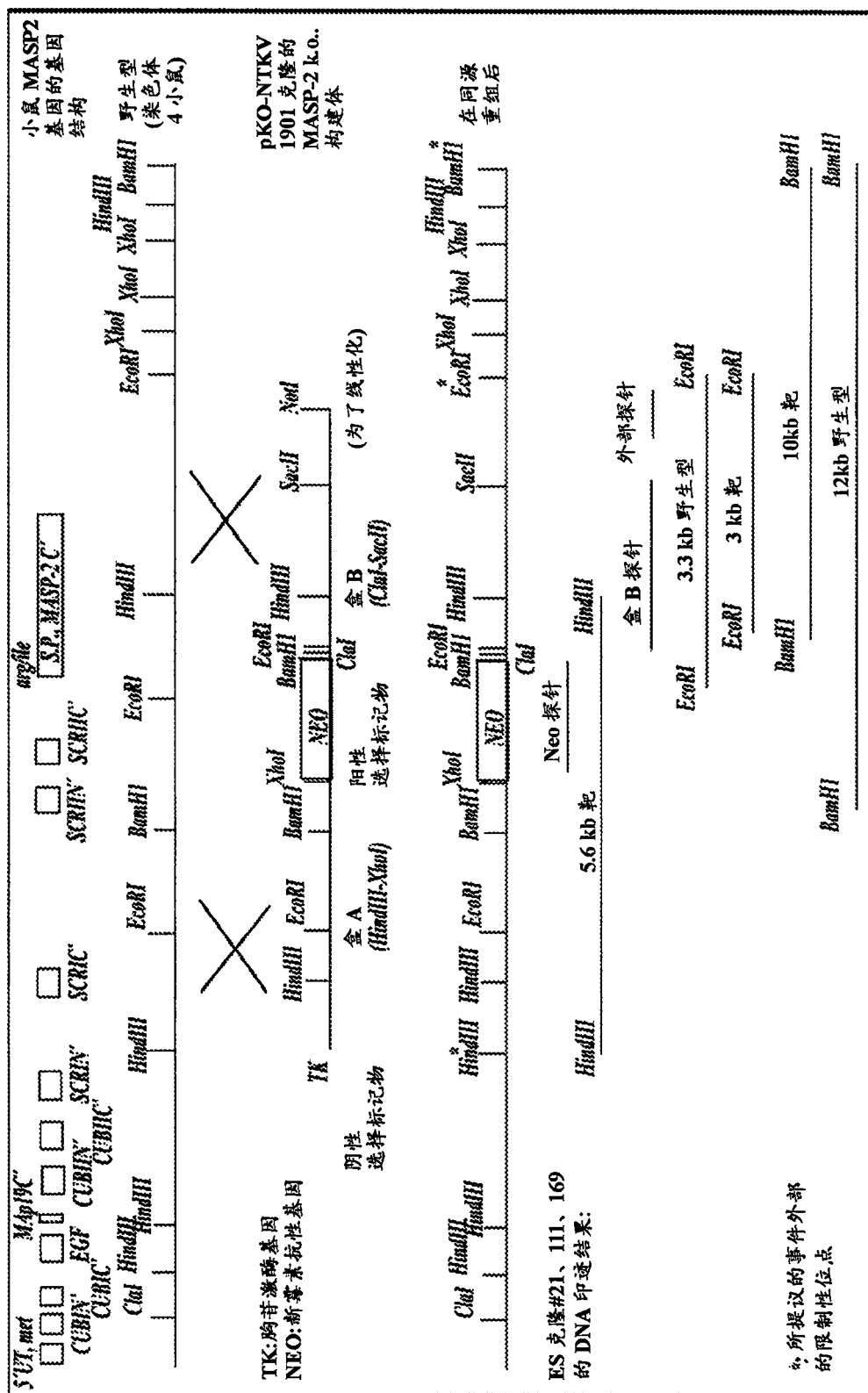


图3

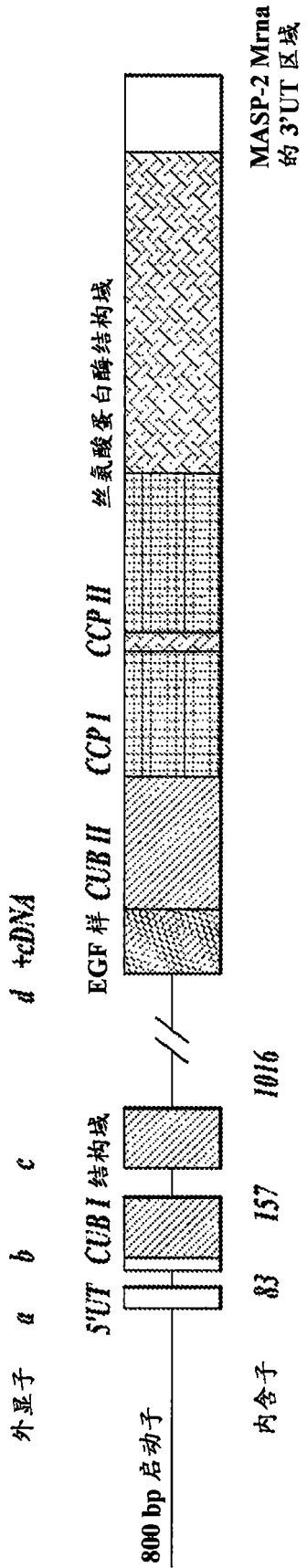


图4

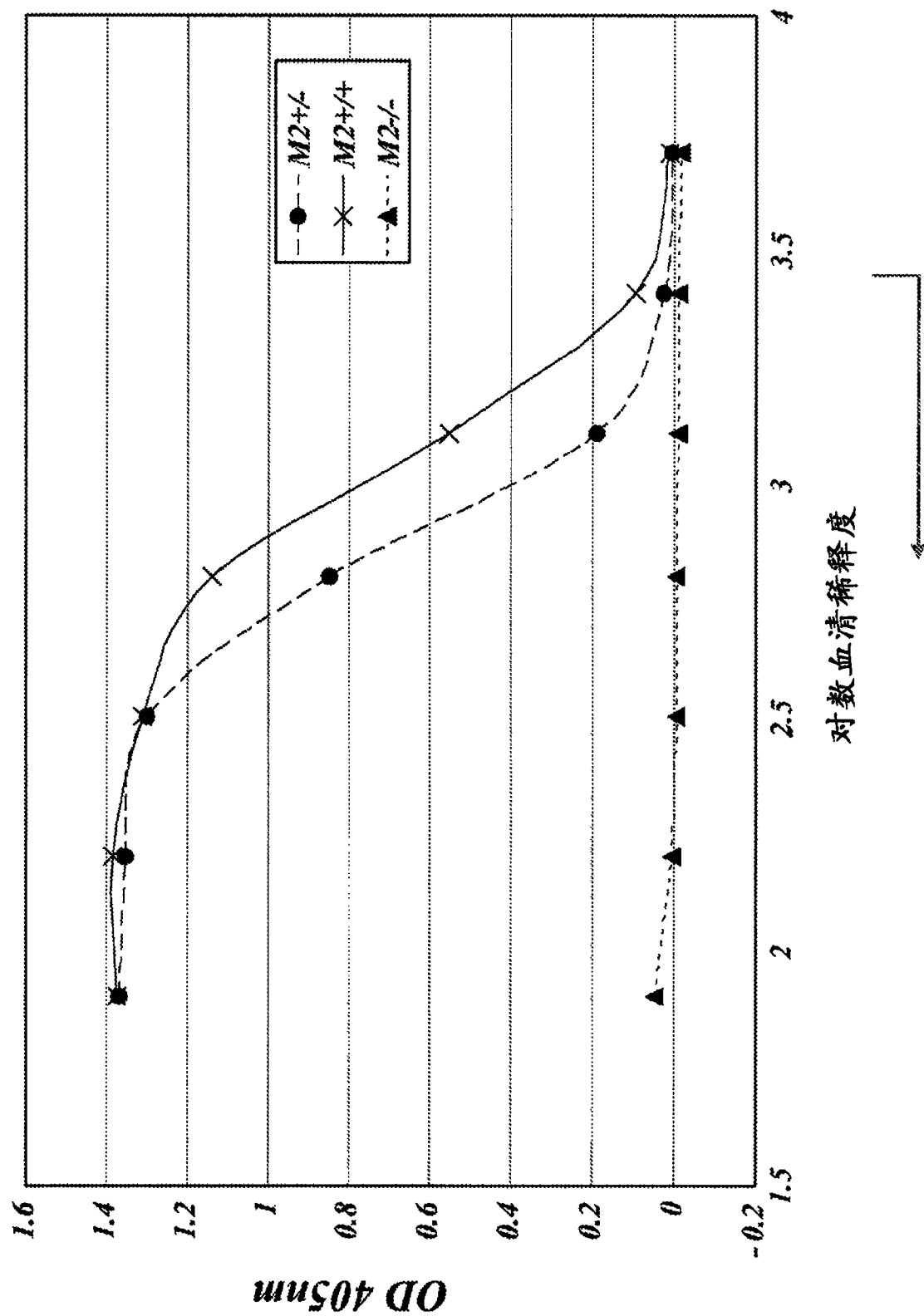


图5A

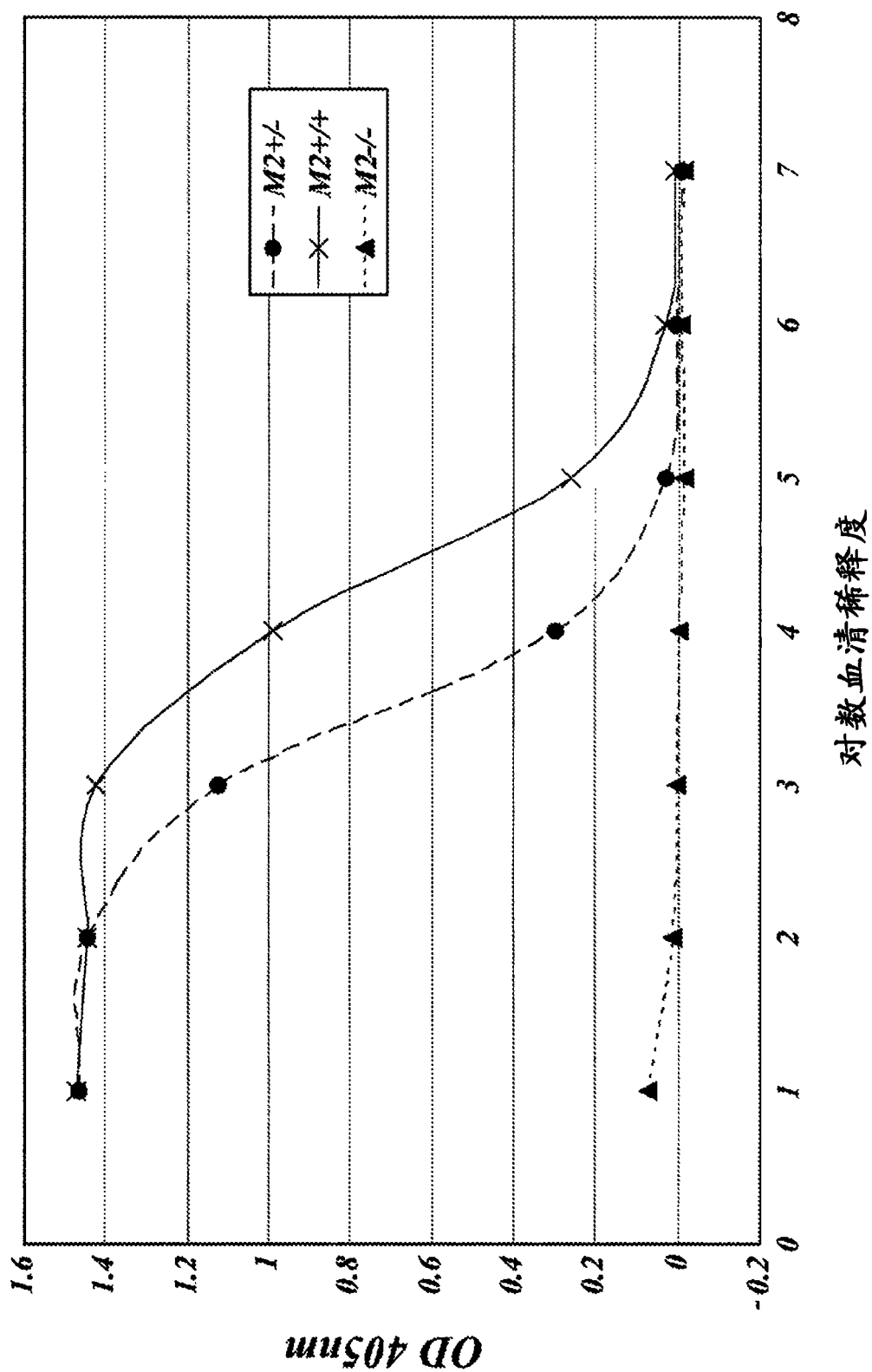


图5B

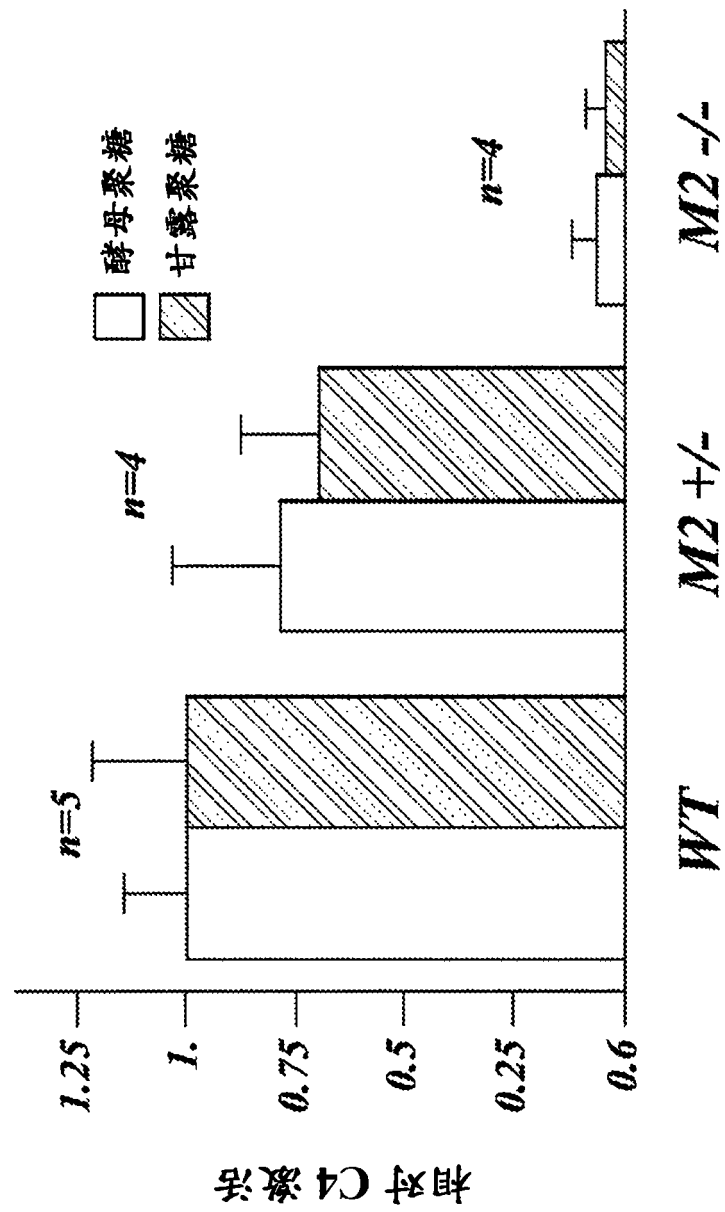


图5C

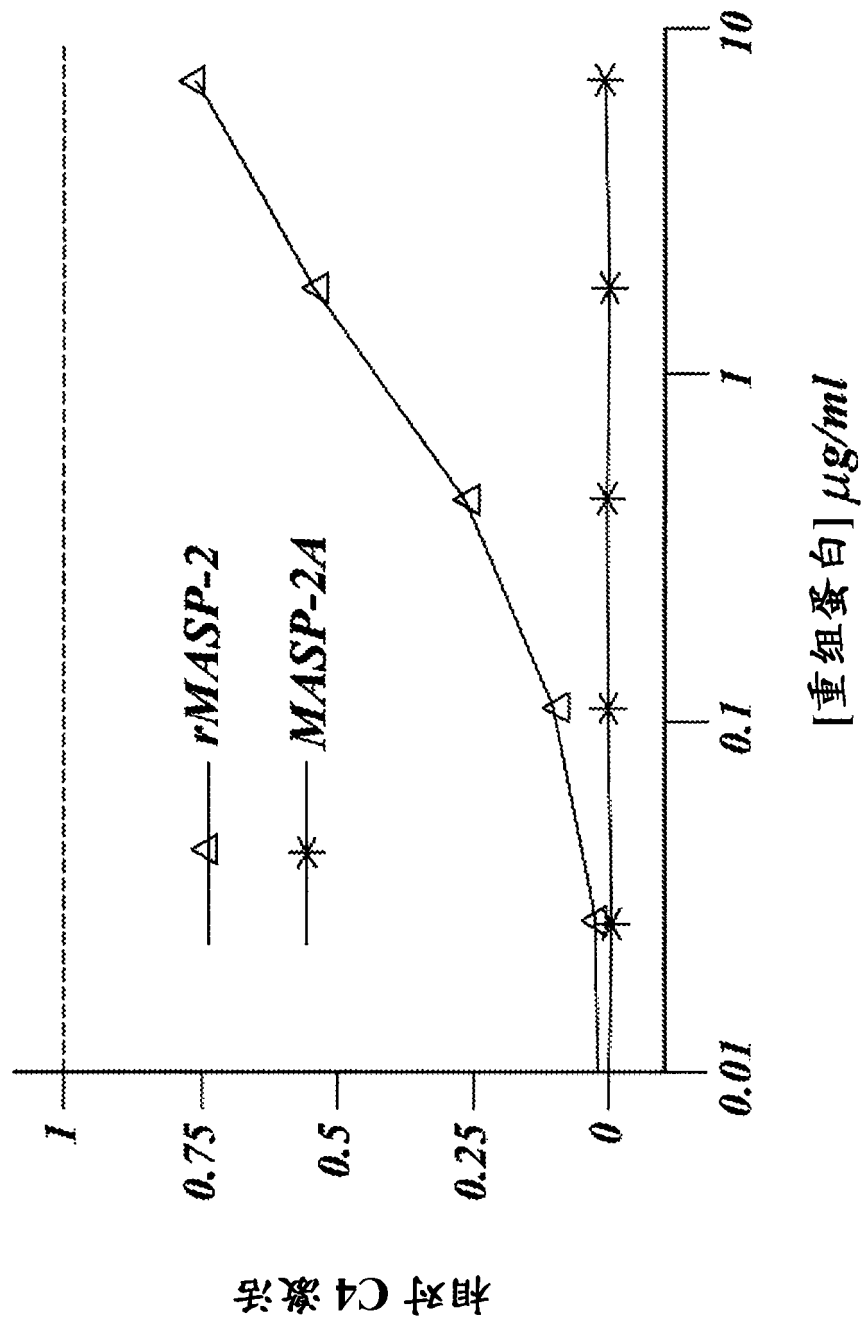


图6

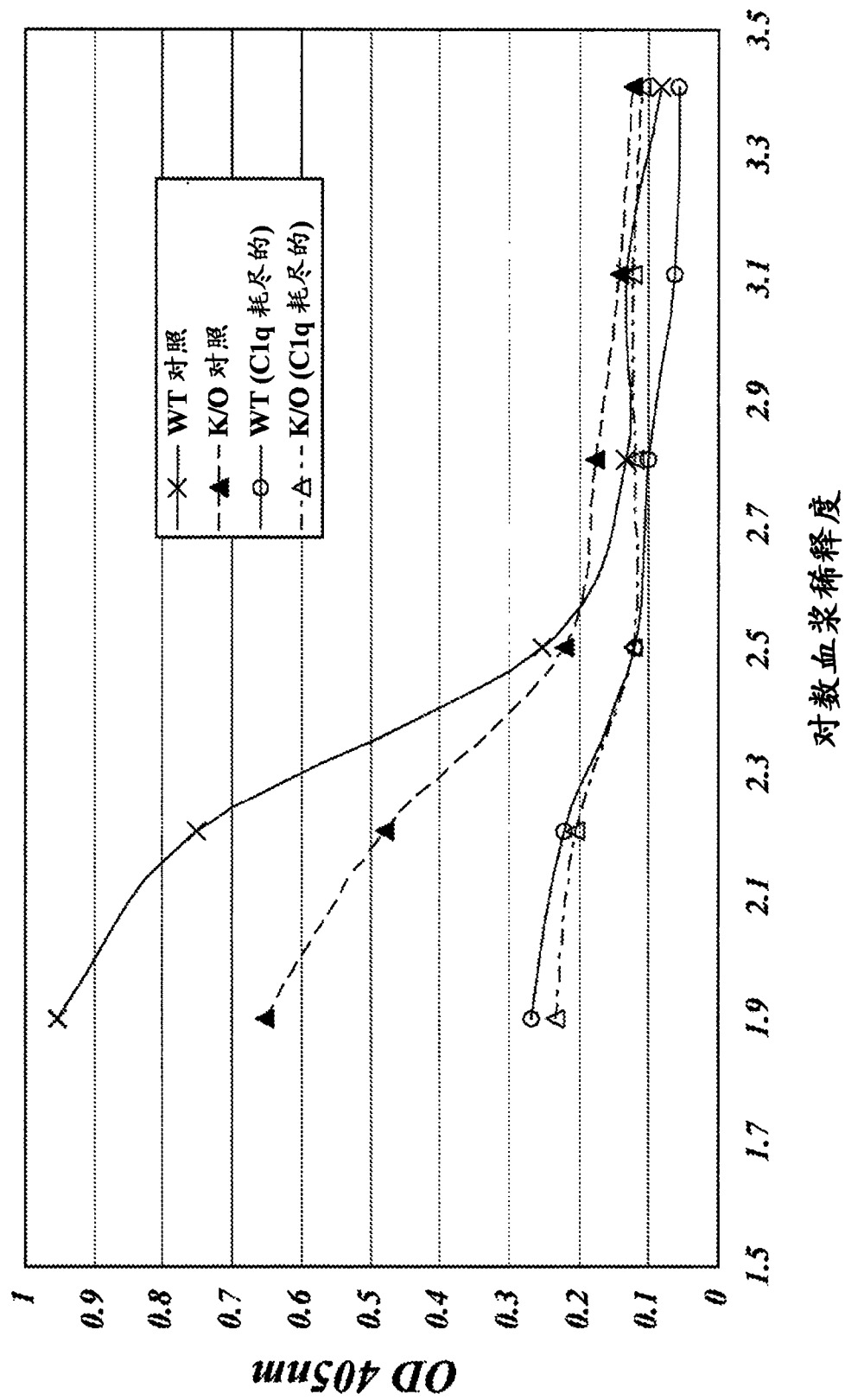


图7

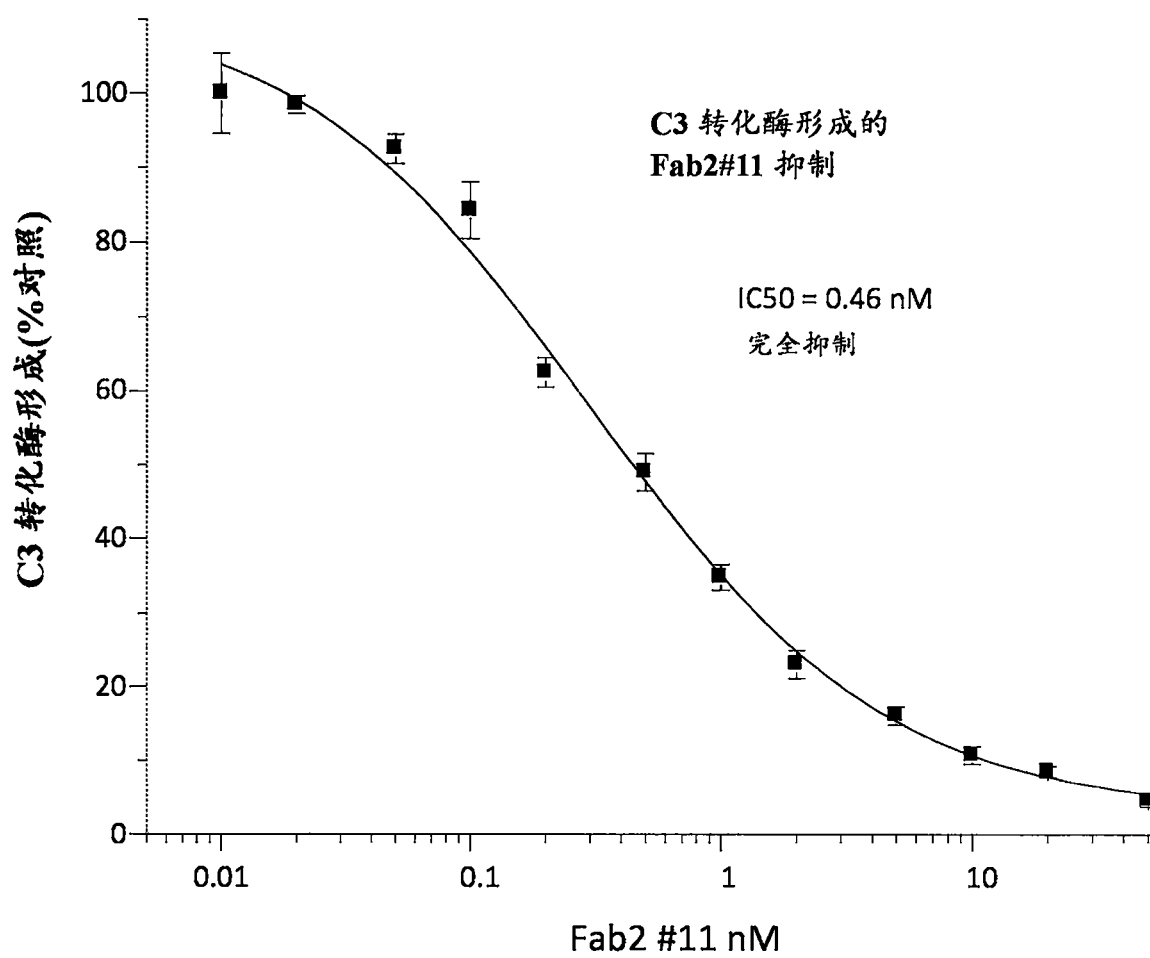


图8A

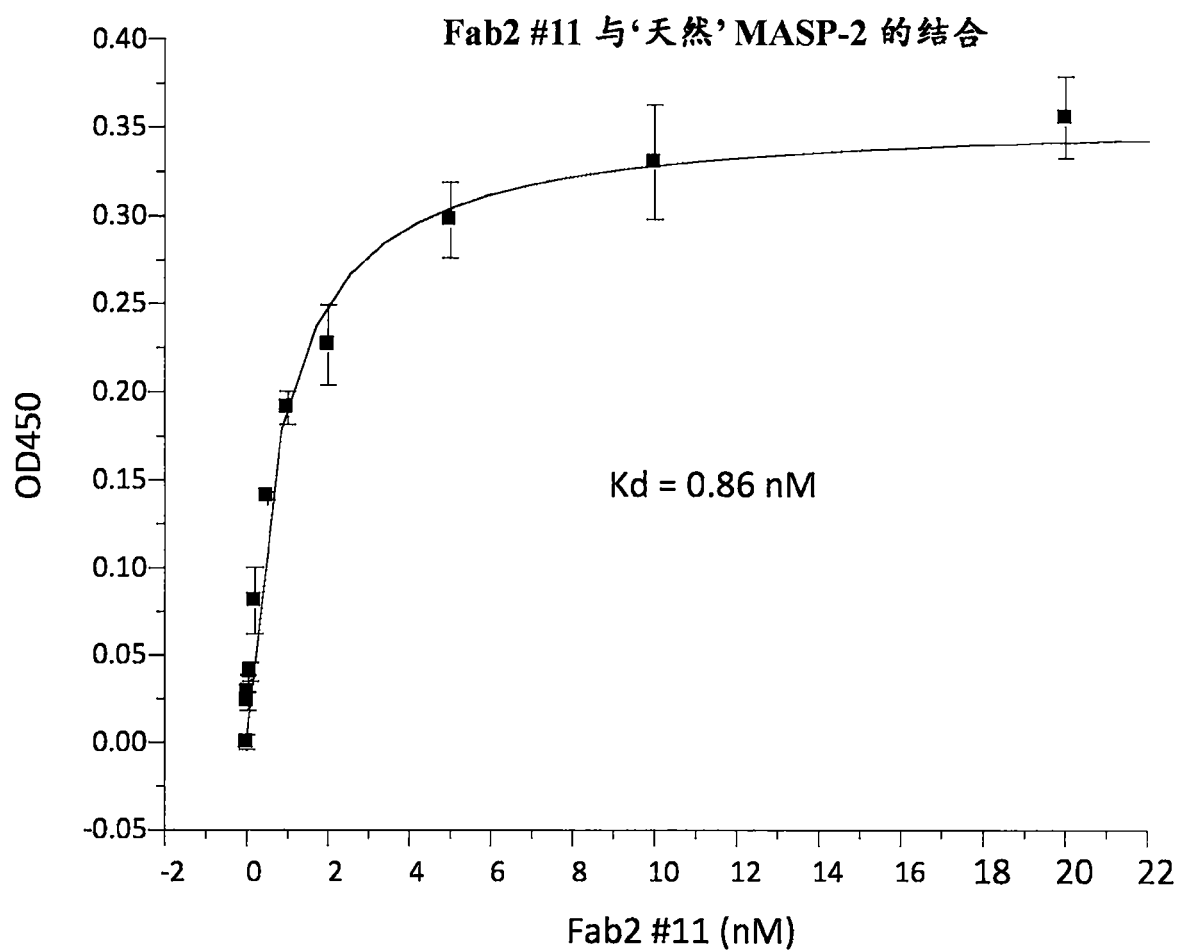


图8B

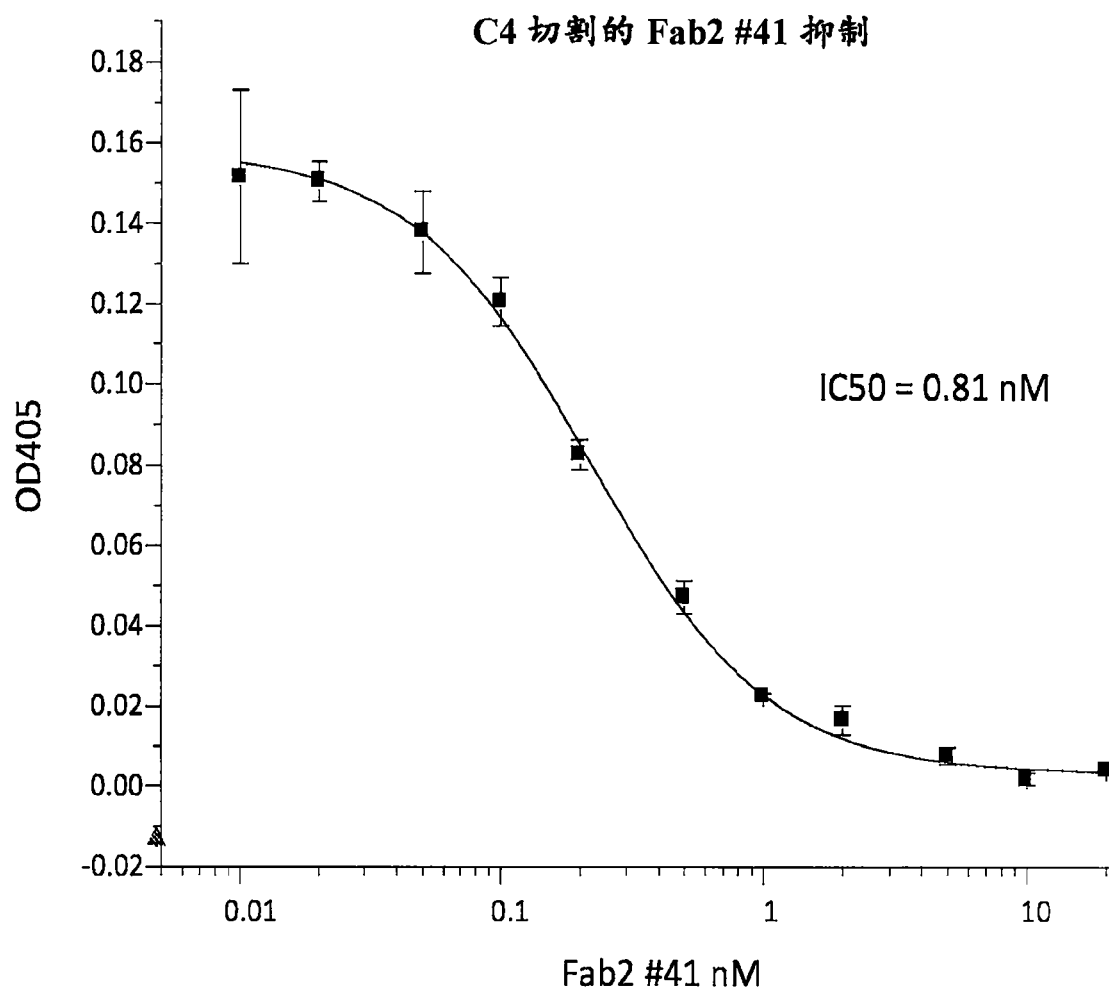


图8C

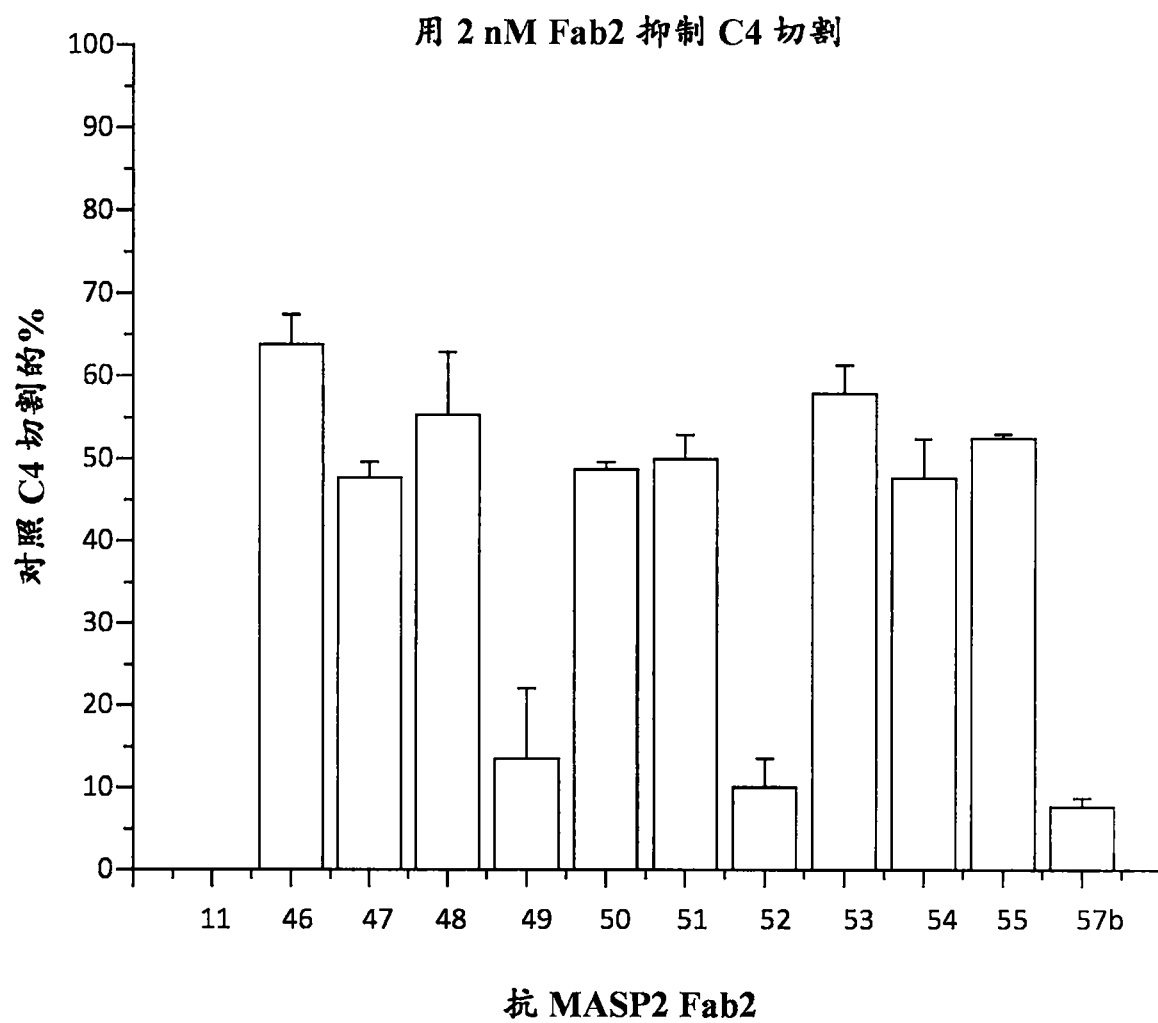


图9

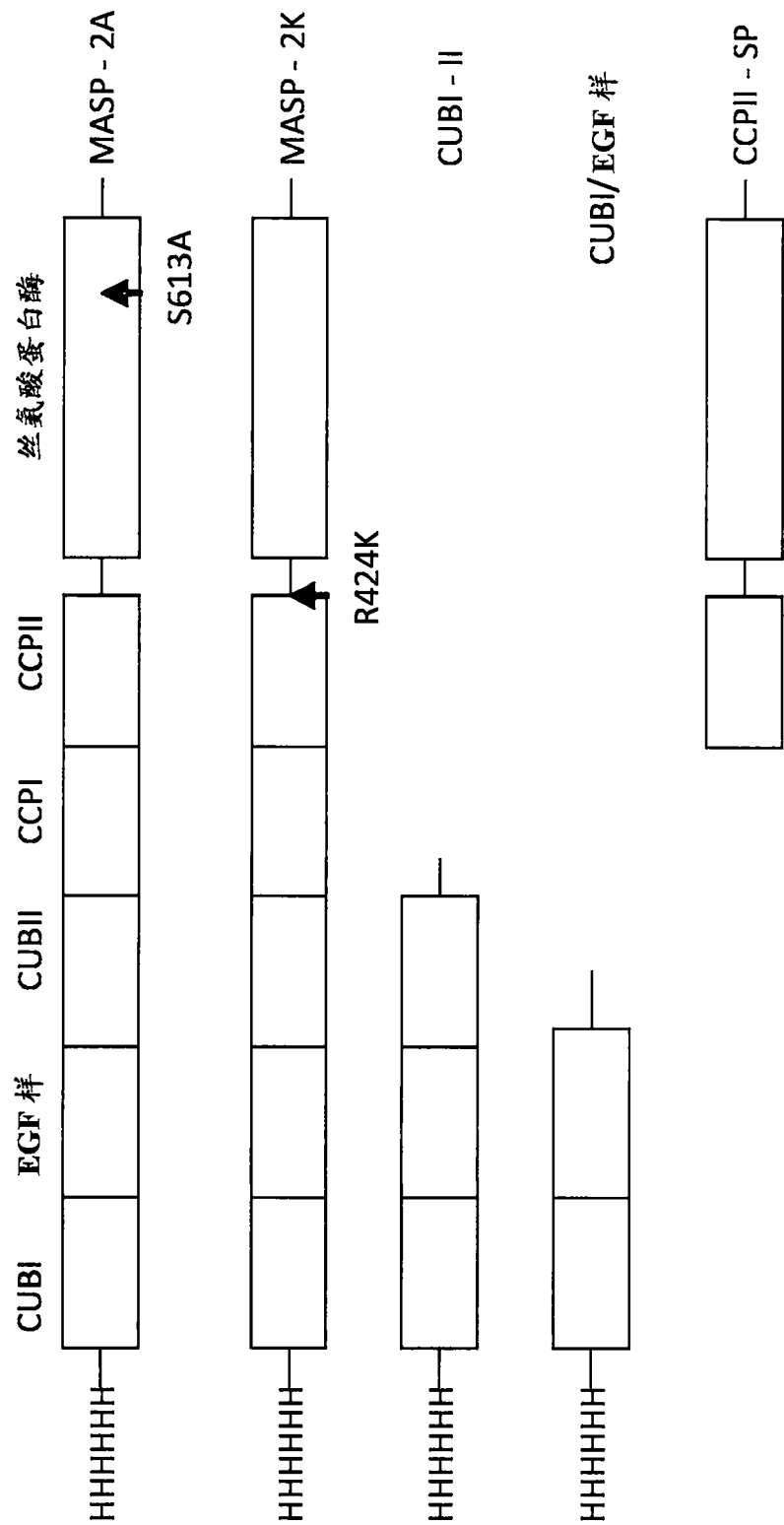


图10

AbD Ab #40 和#60 与大鼠 MASP2 多肽的结合

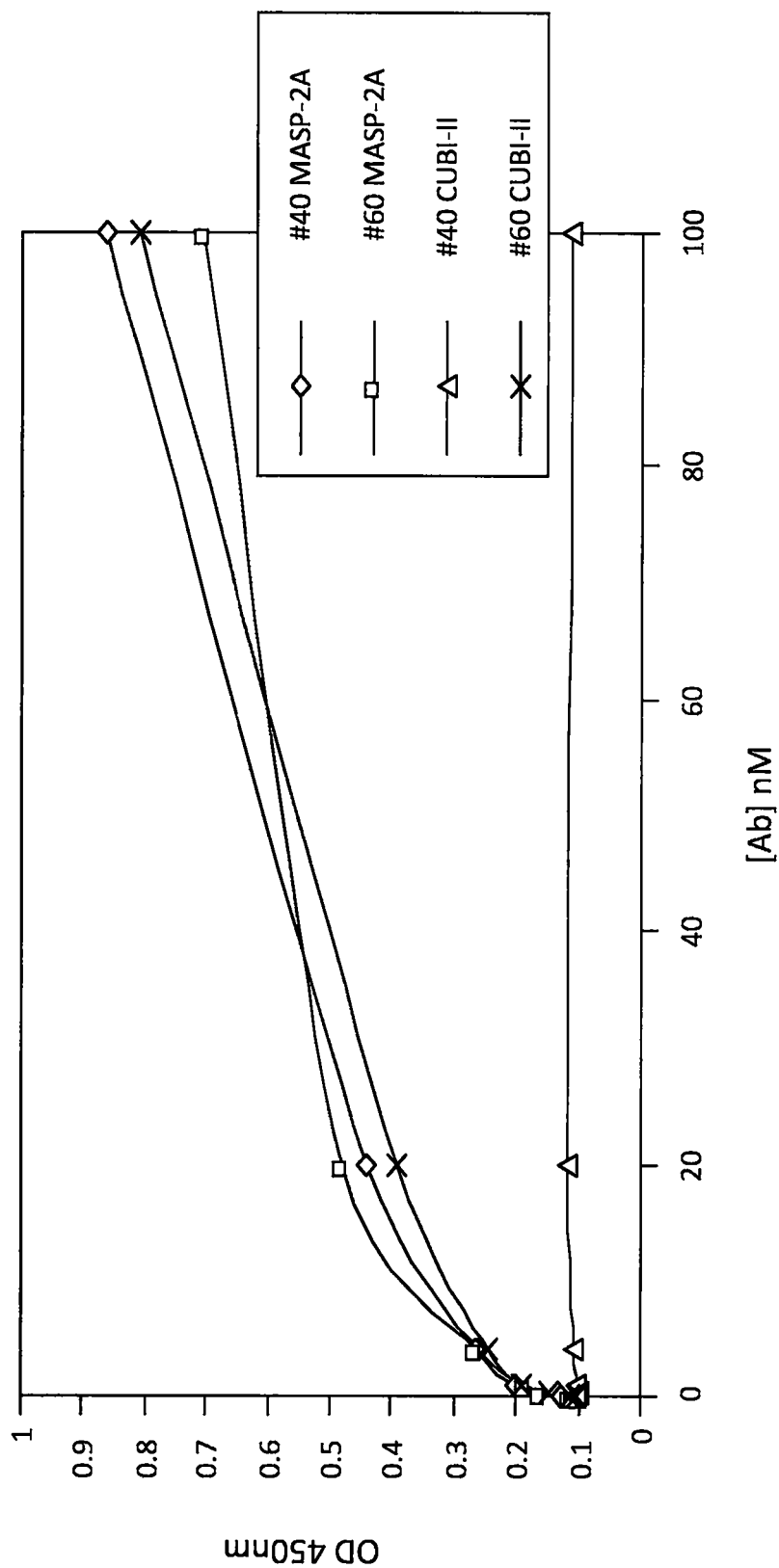


图11

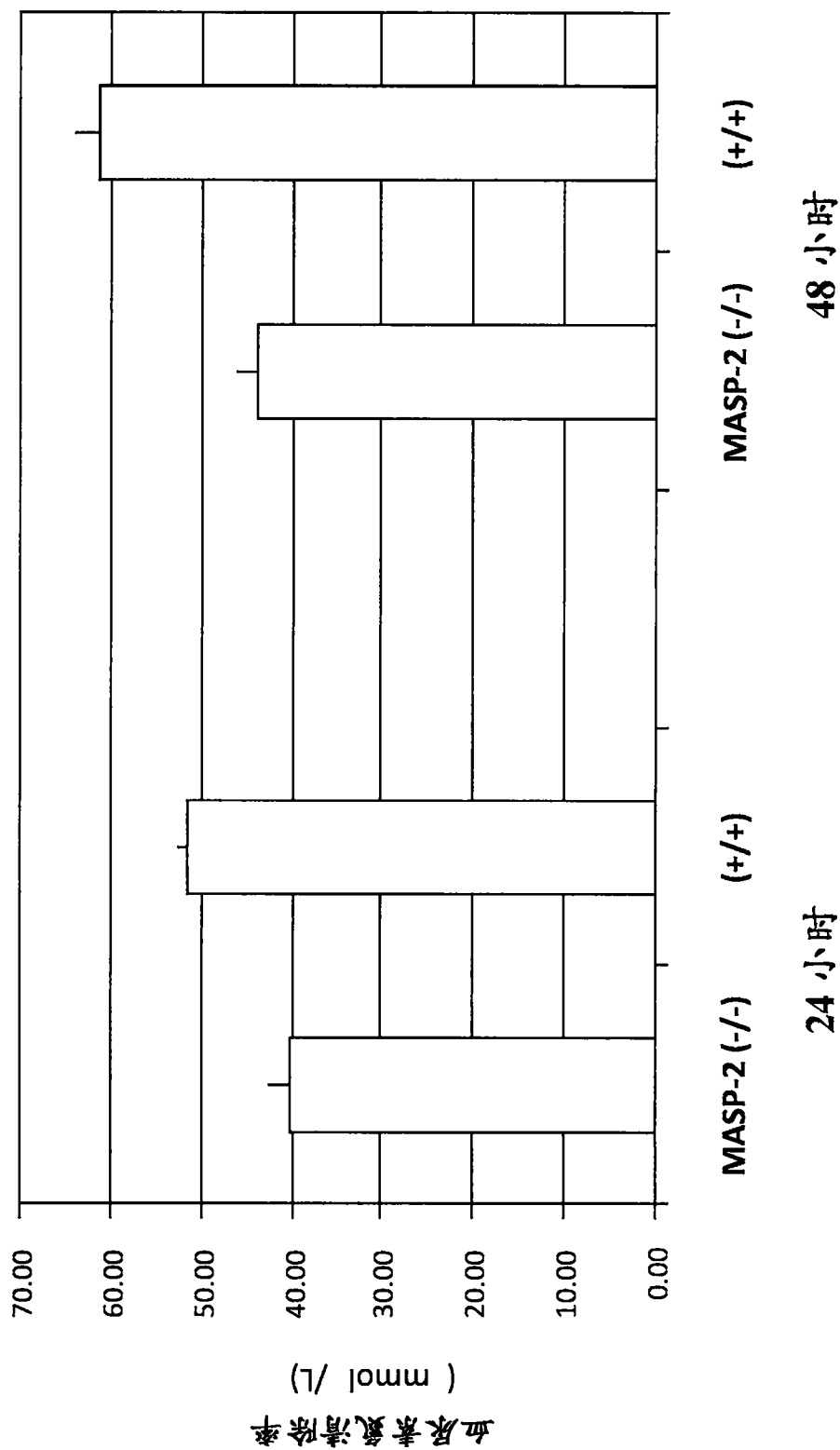


图12

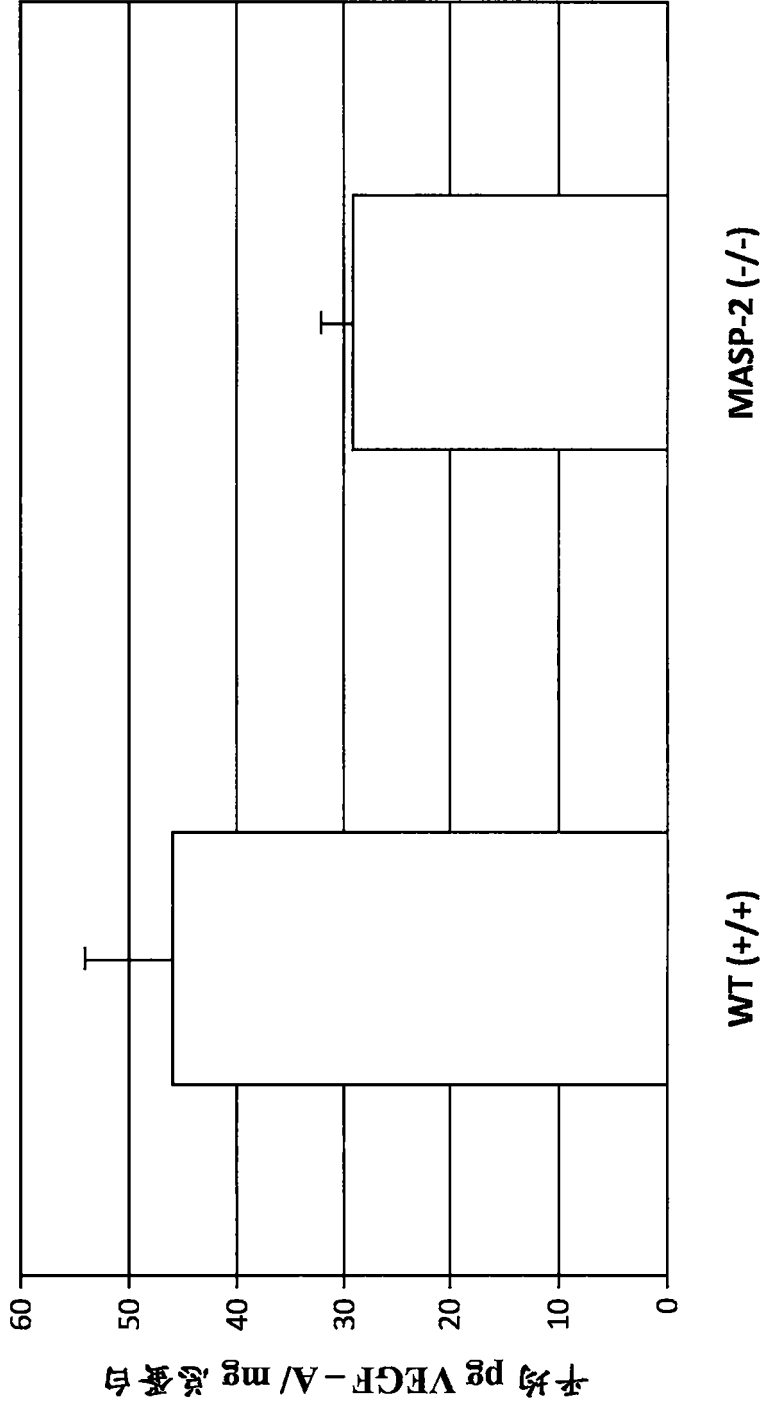


图13A

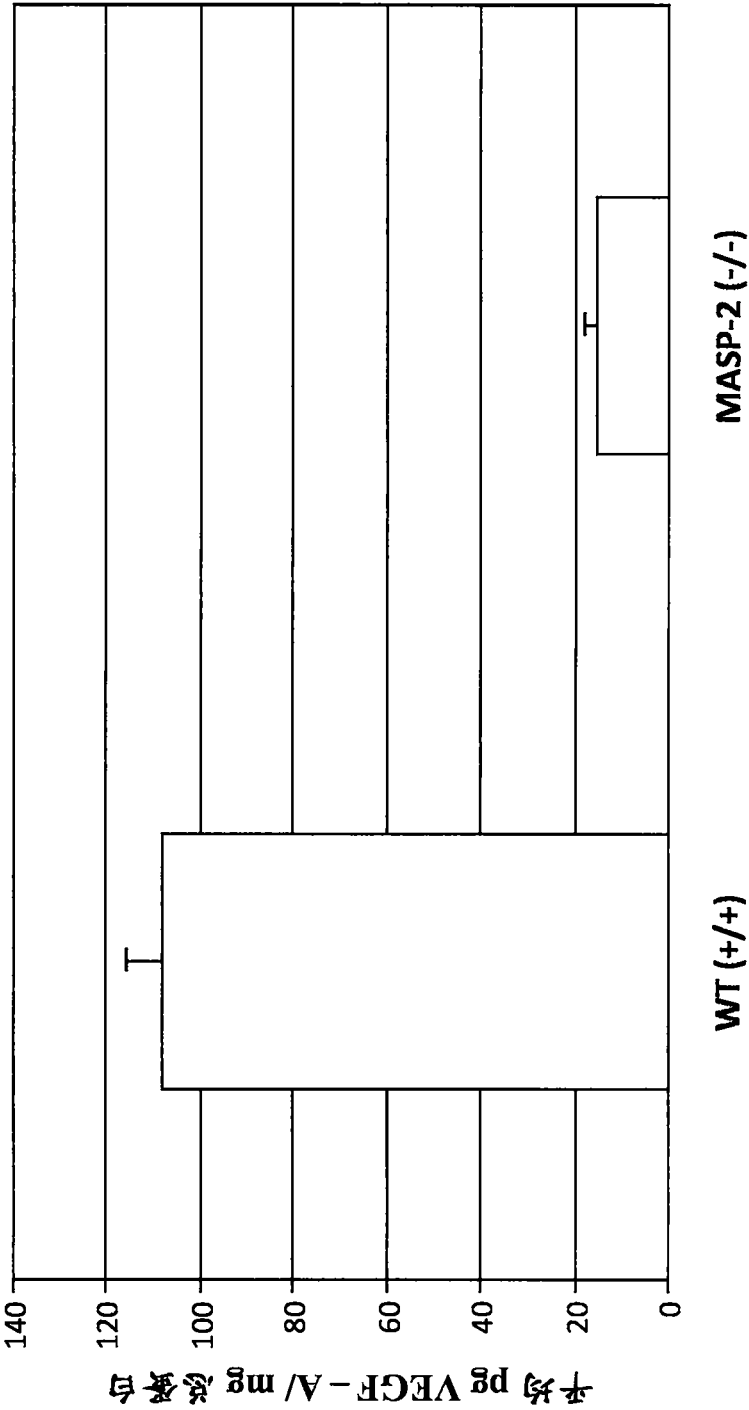


图13B

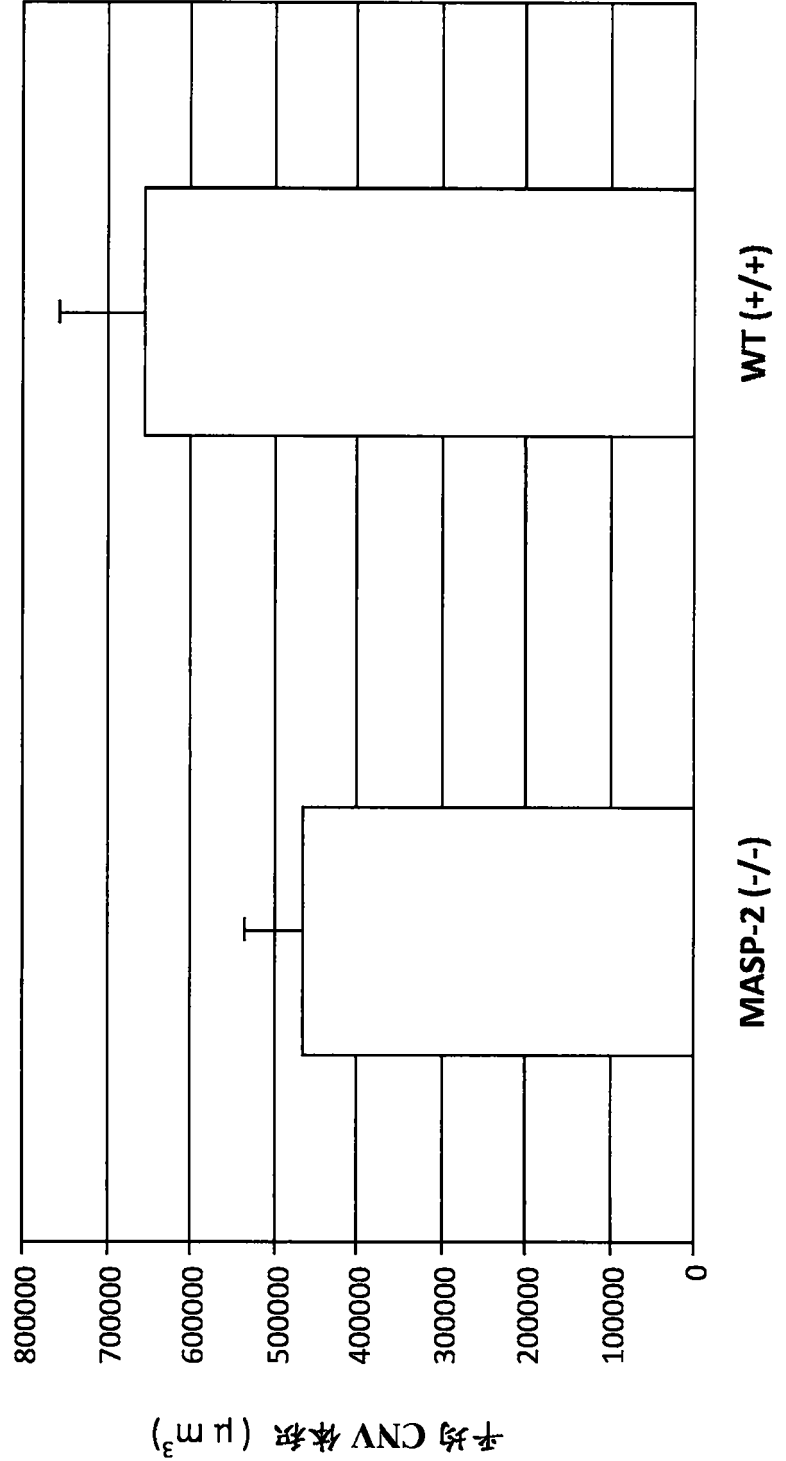


图14

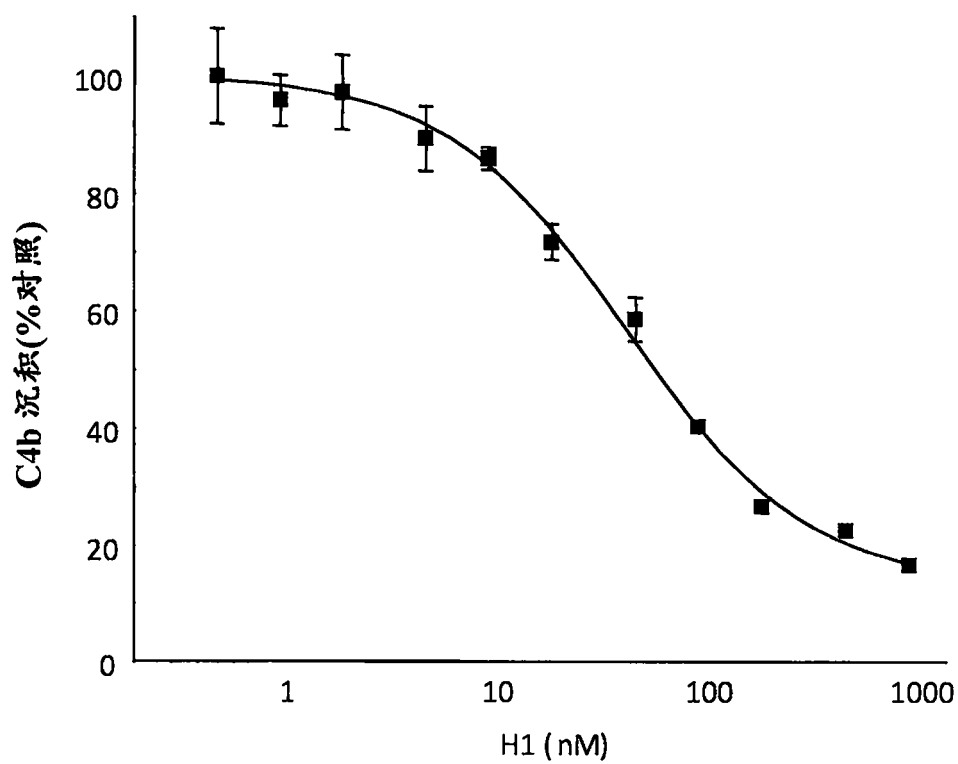


图15A

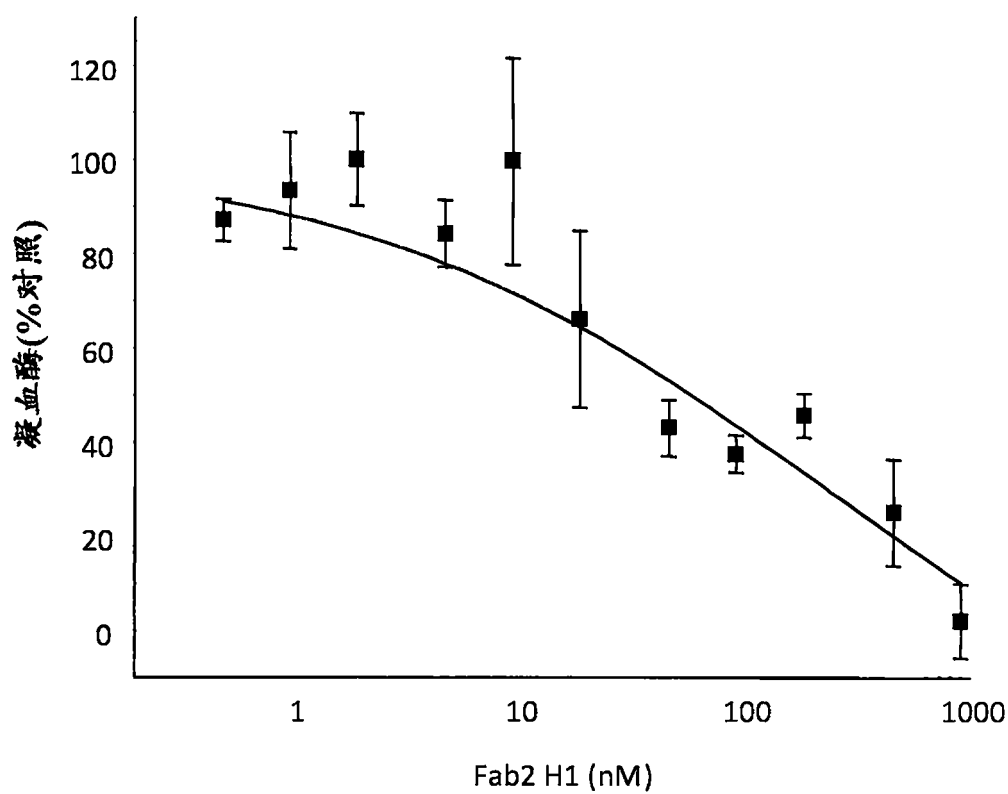


图15B

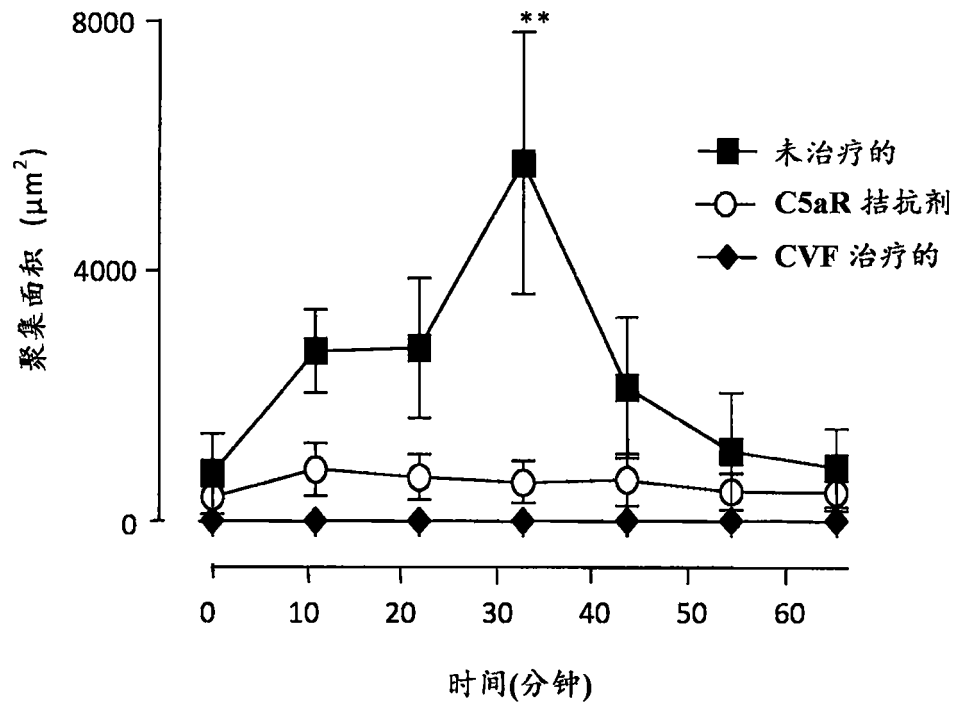


图16A

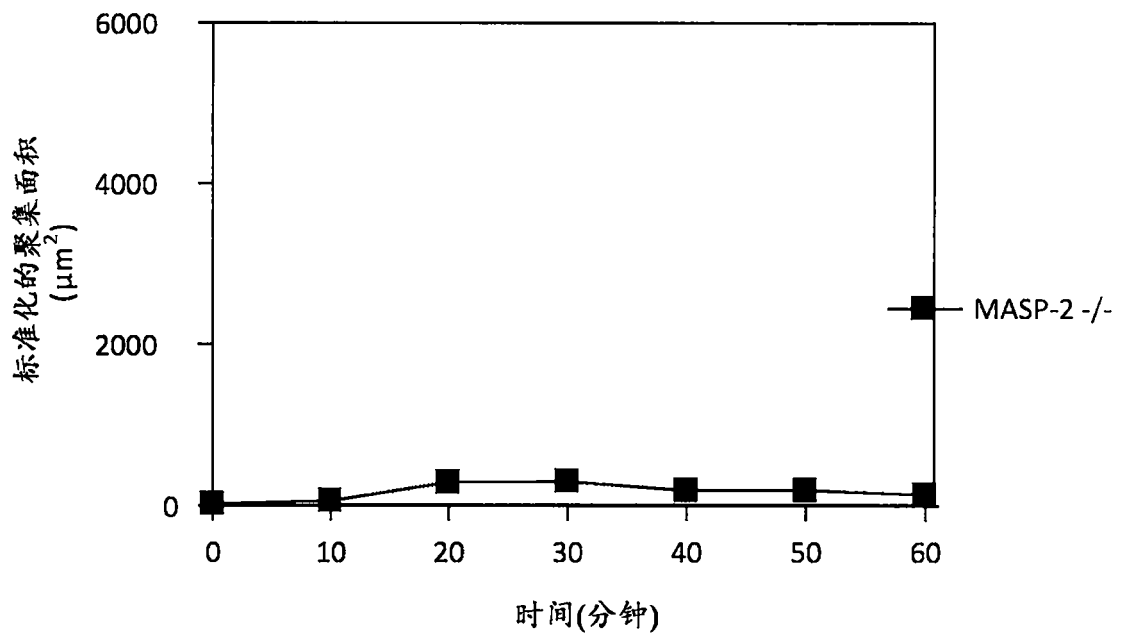


图16B

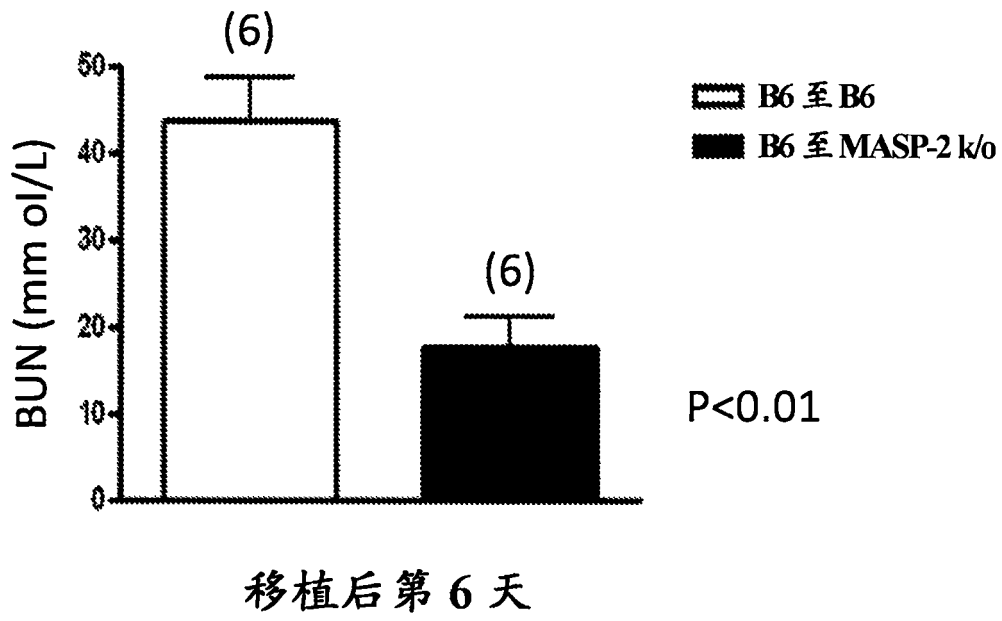


图17

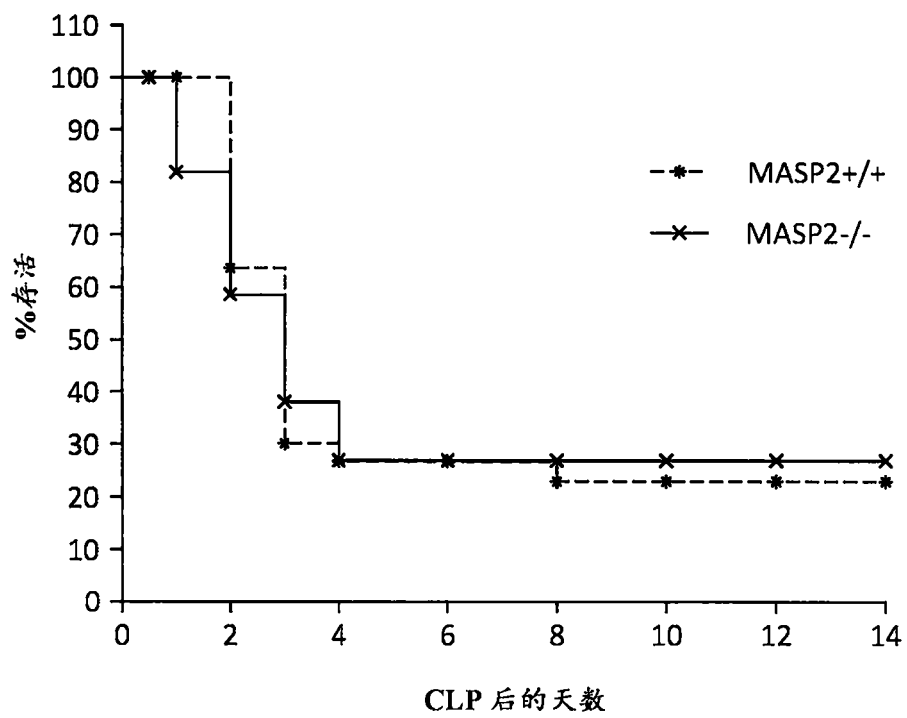


图18

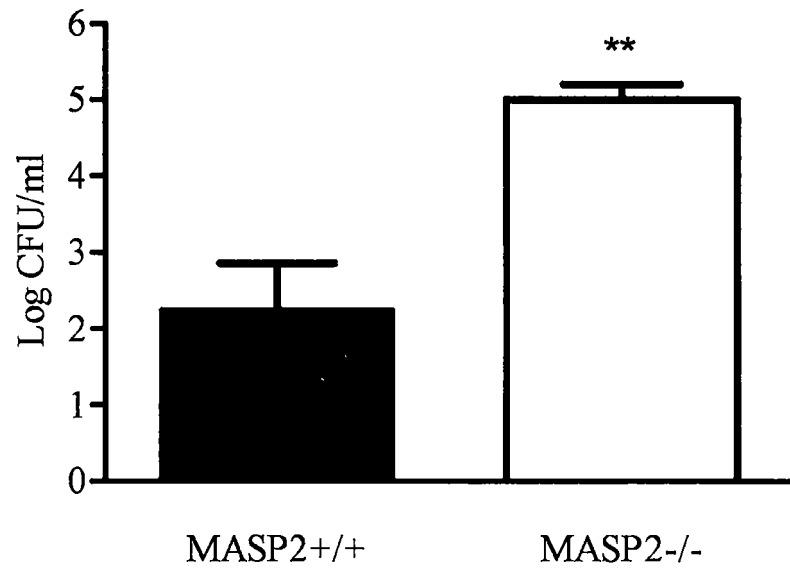


图19

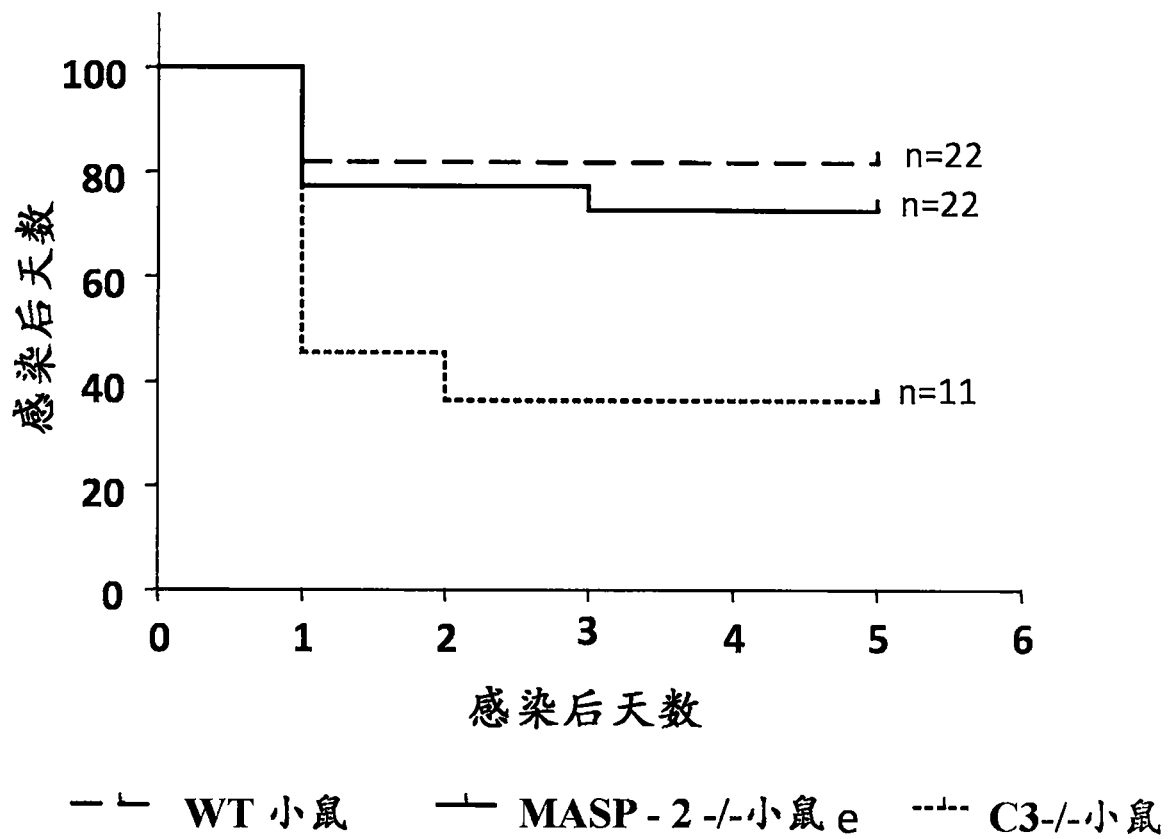


图20

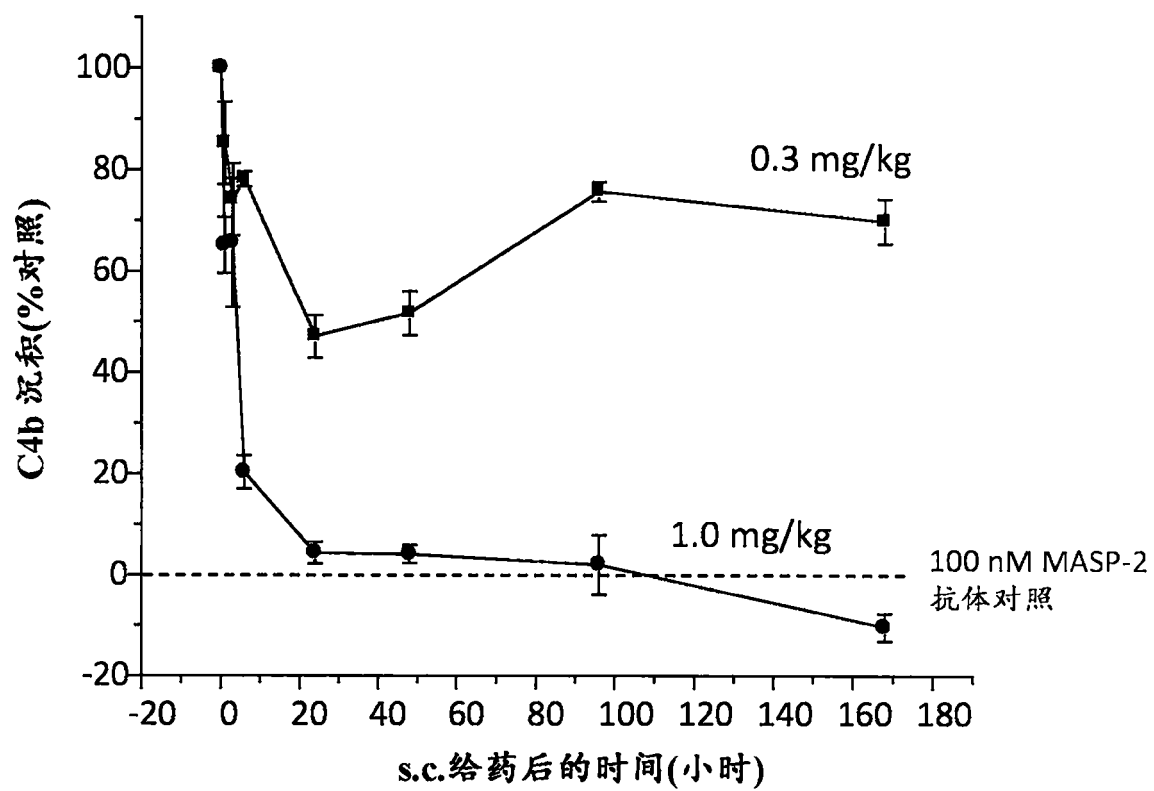


图21

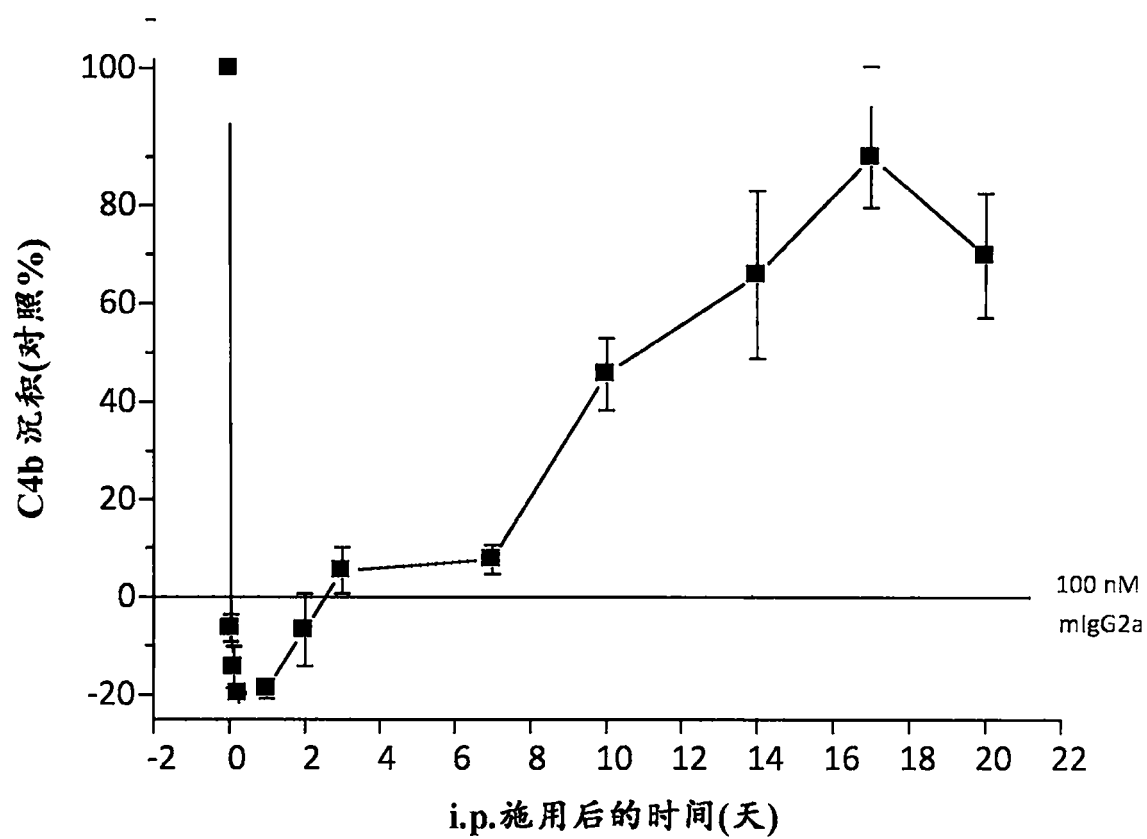


图22

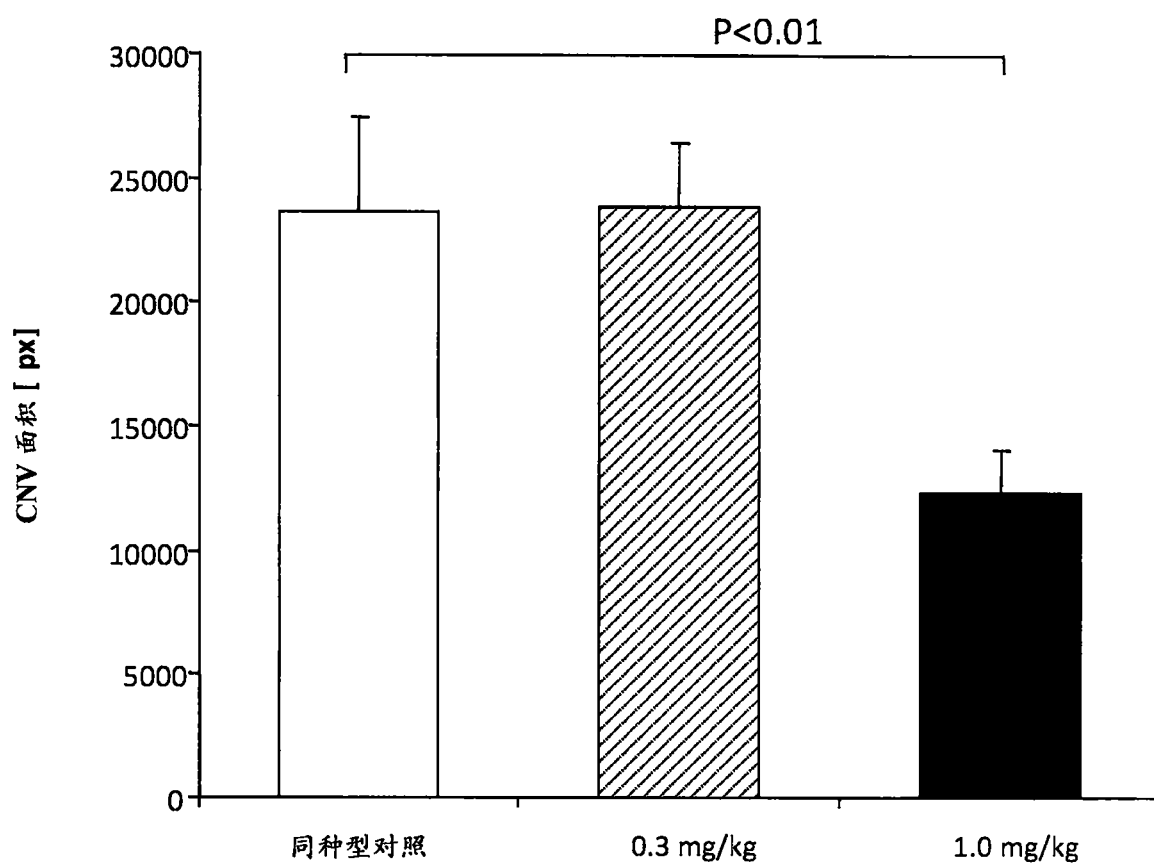


图23

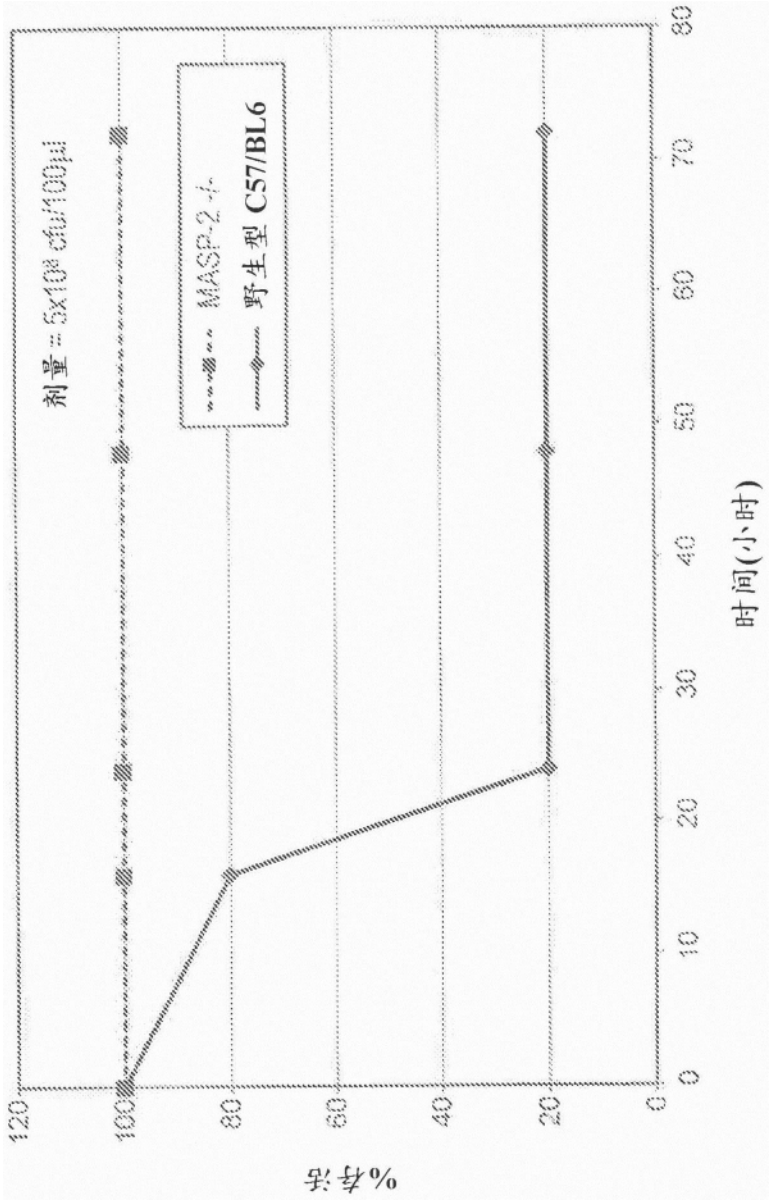


图24A

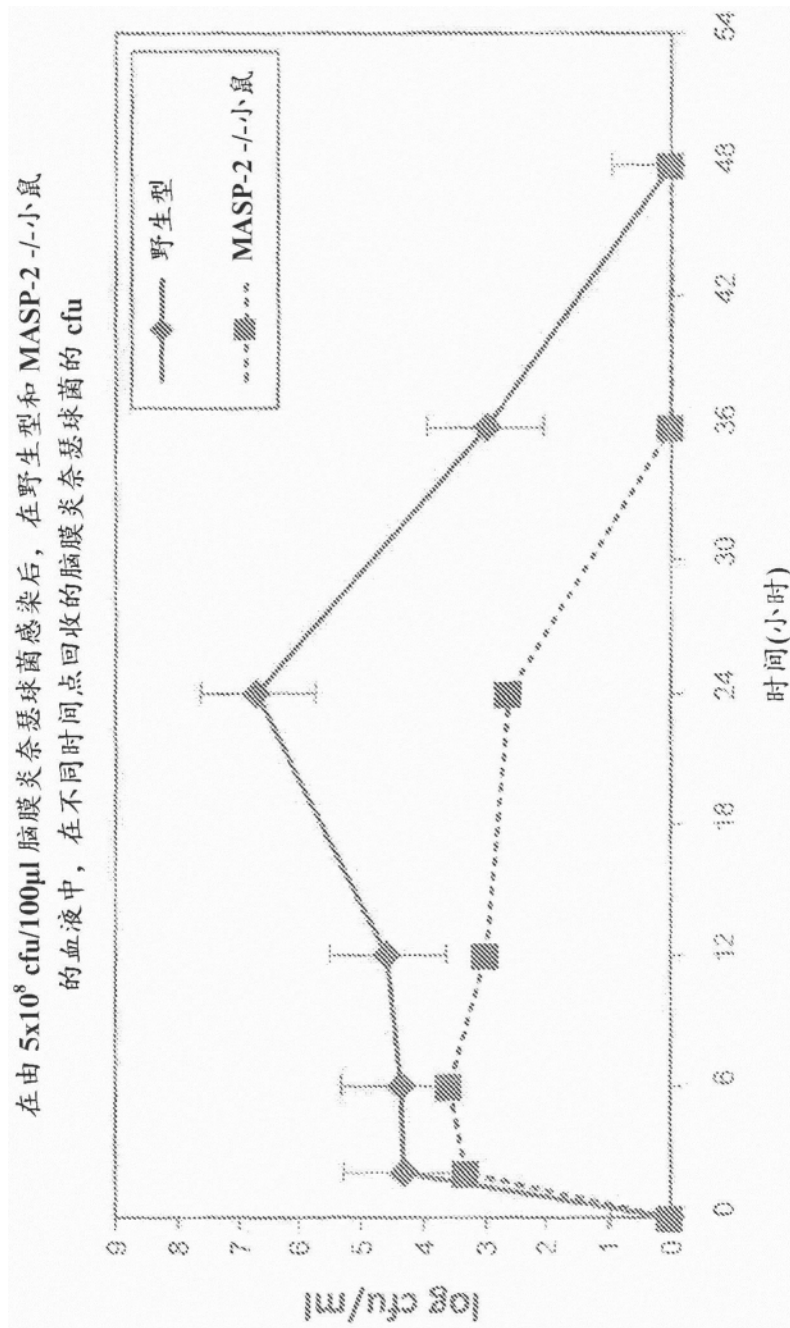


图24B

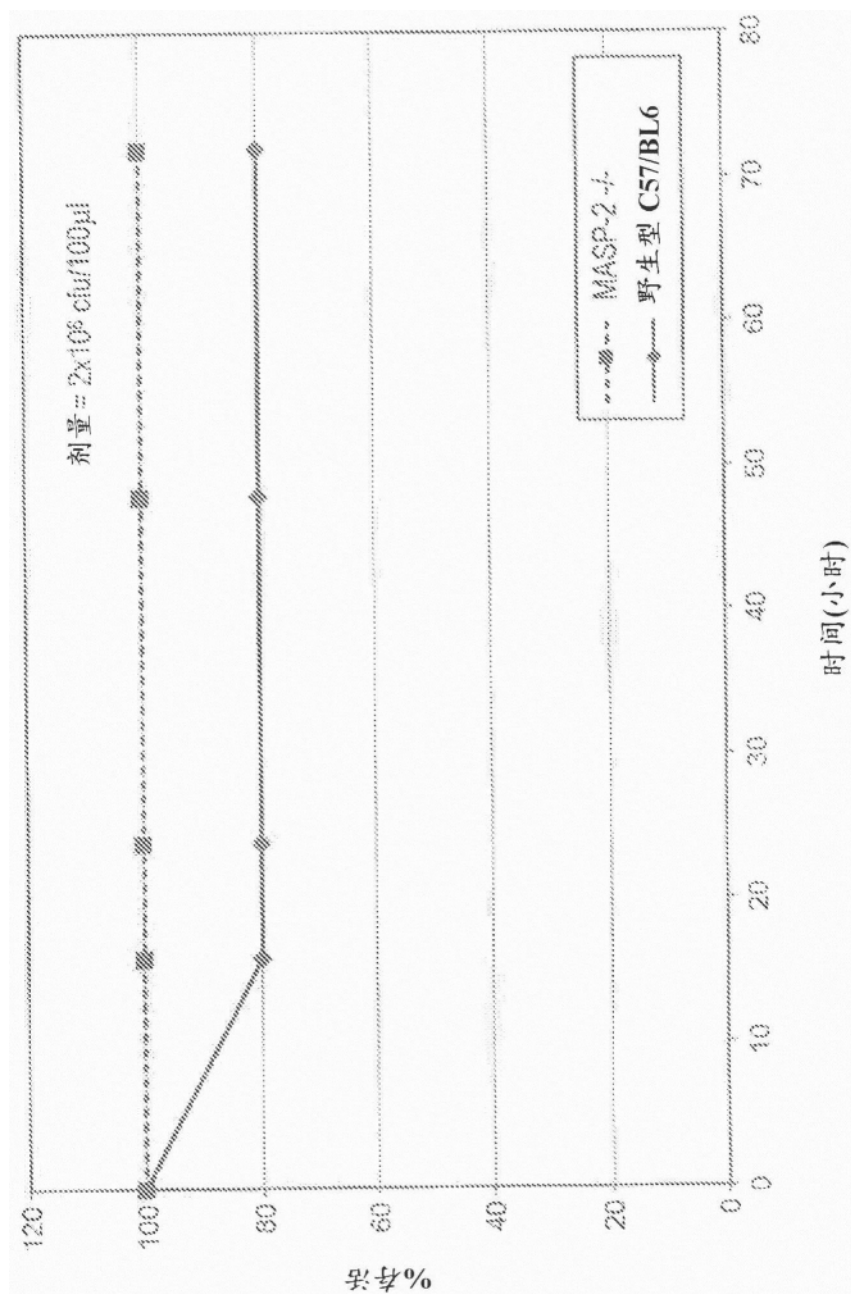


图25A

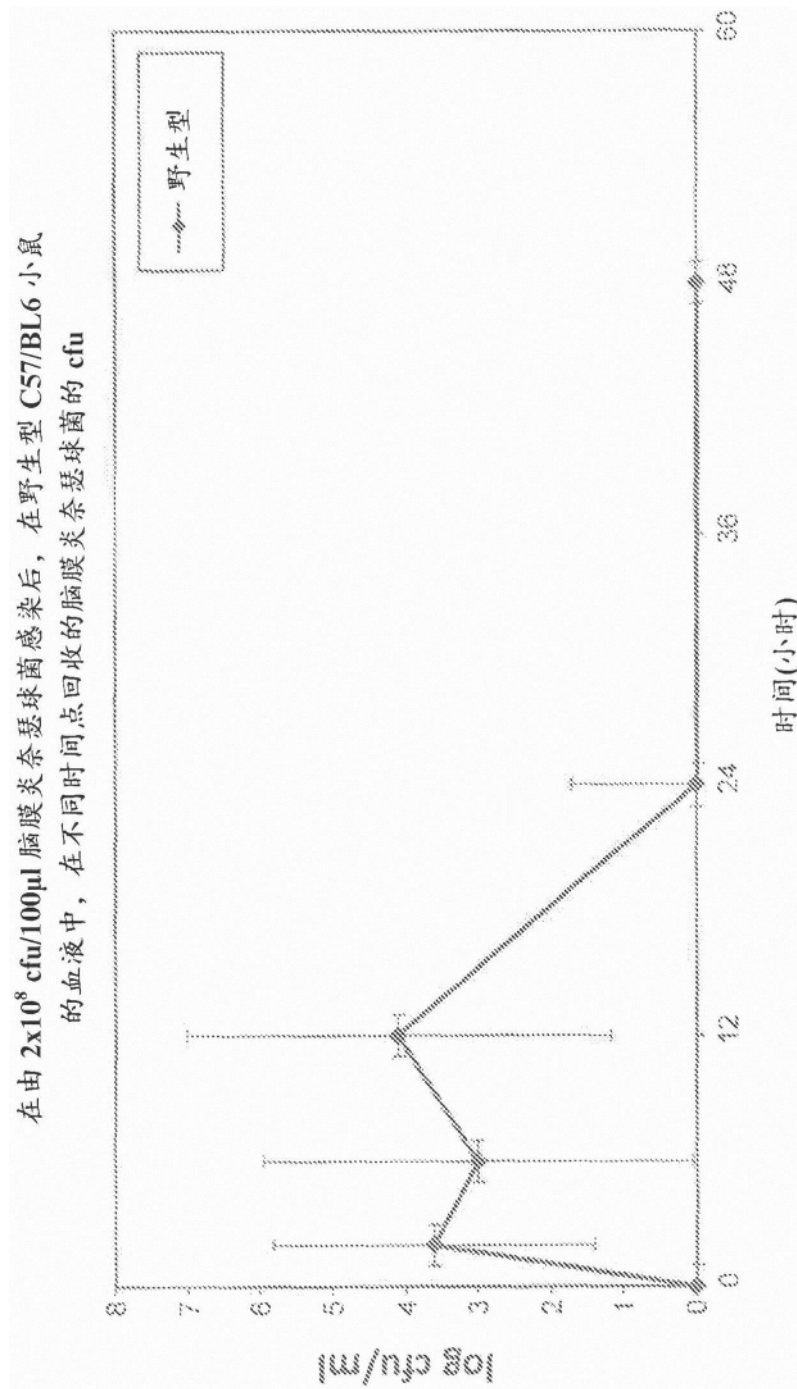


图25B

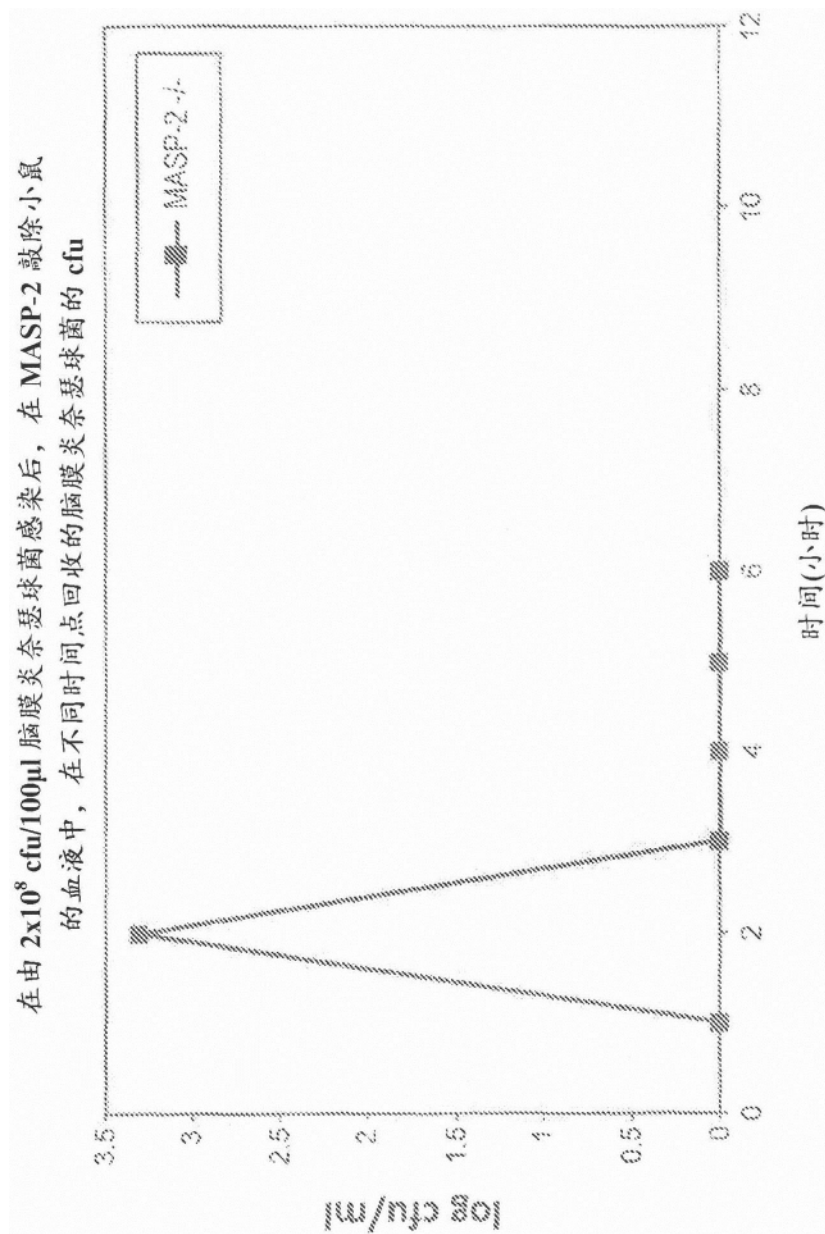


图25C

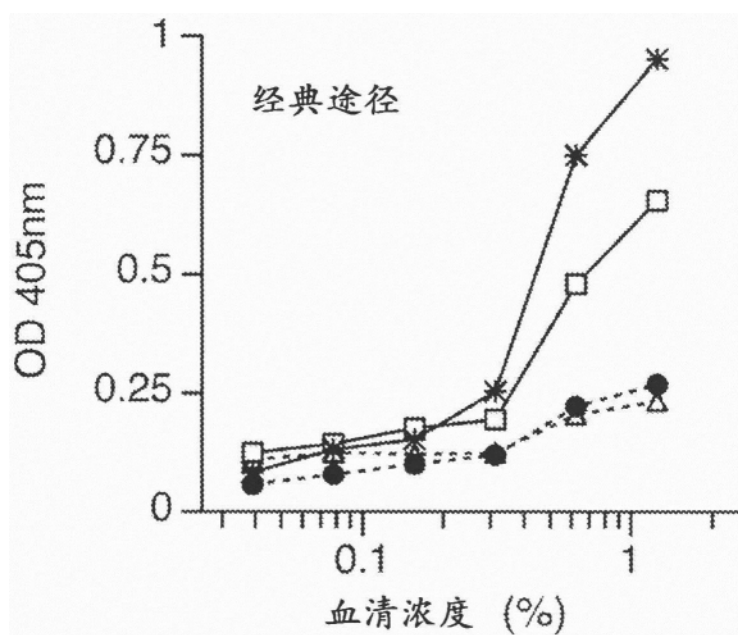


图26A

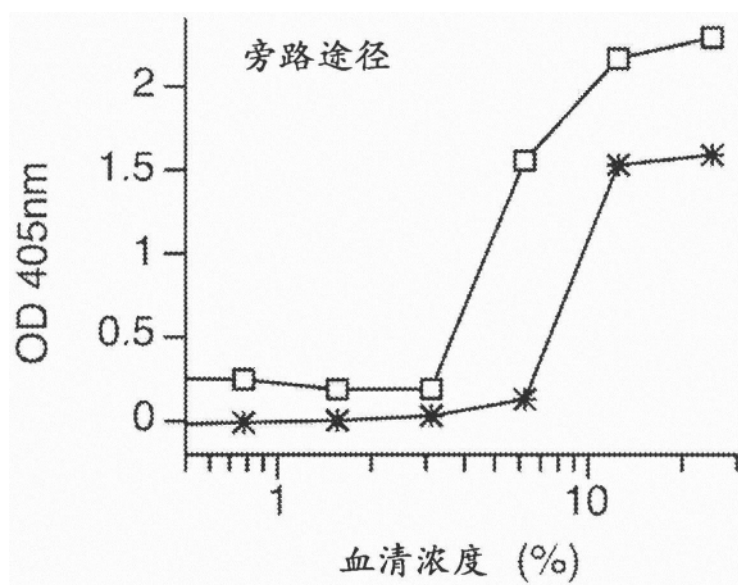


图26B

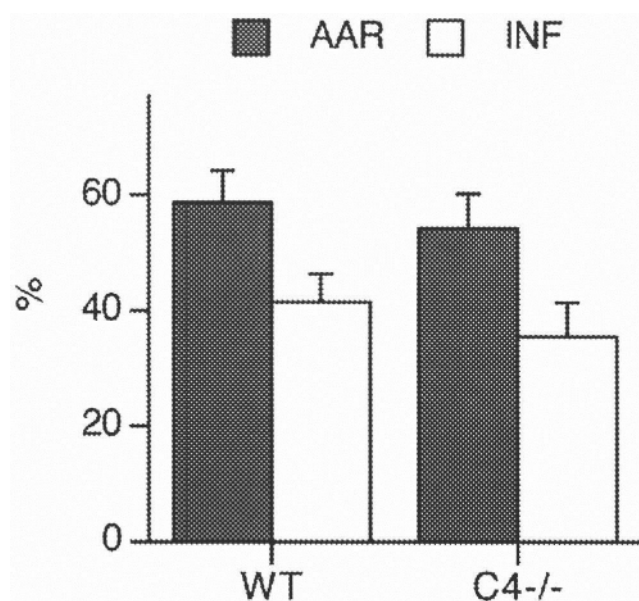


图27A

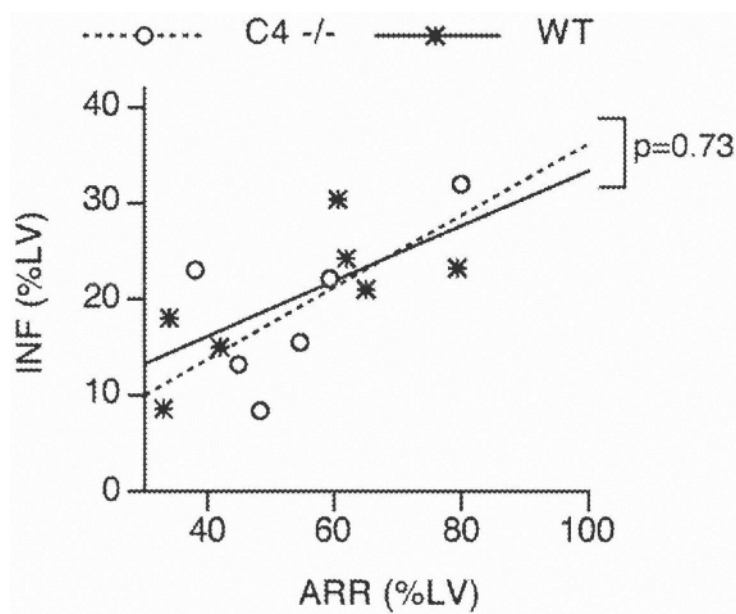


图27B

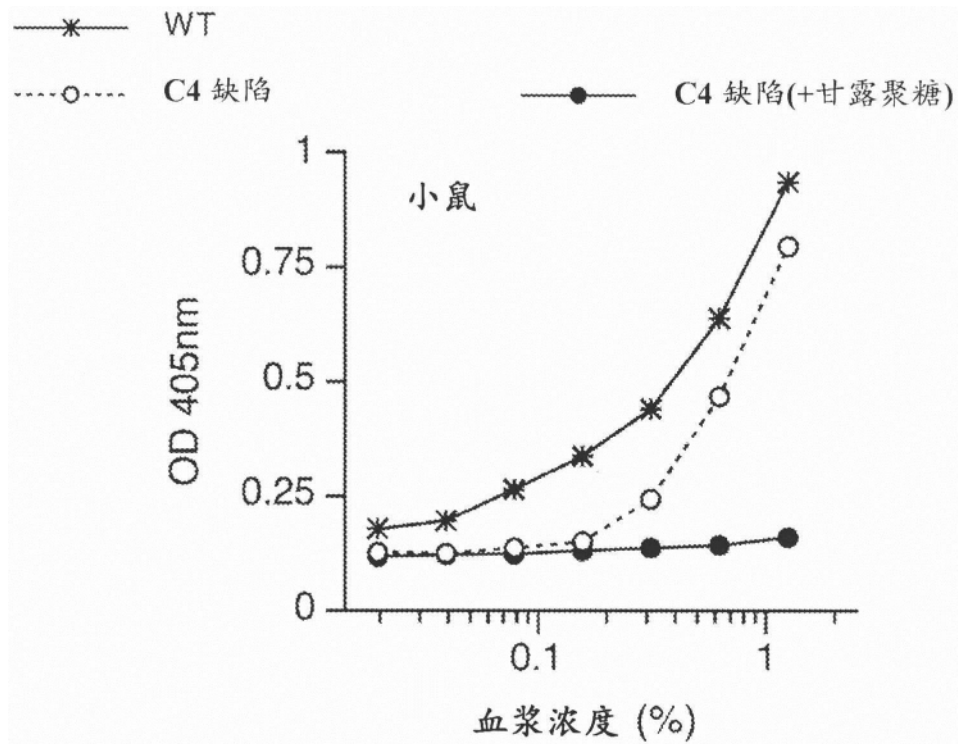


图28A

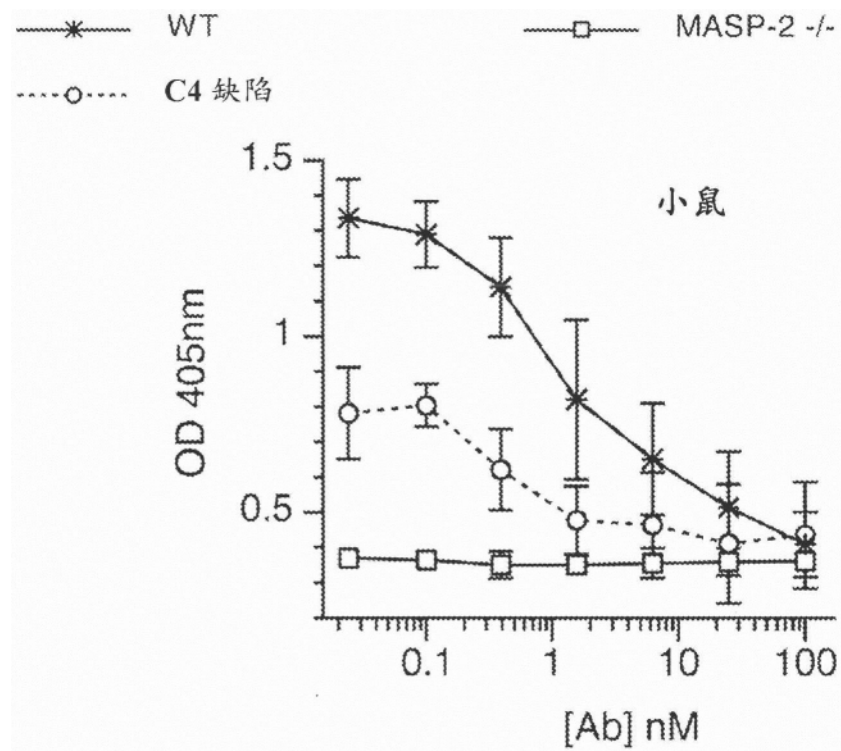


图28B

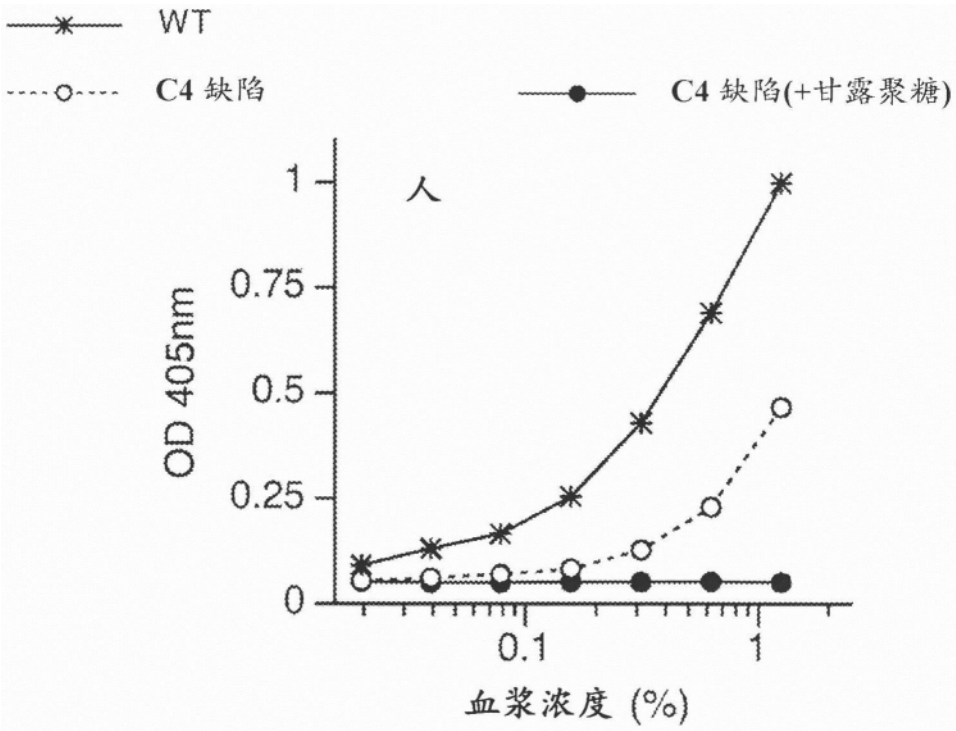


图28C

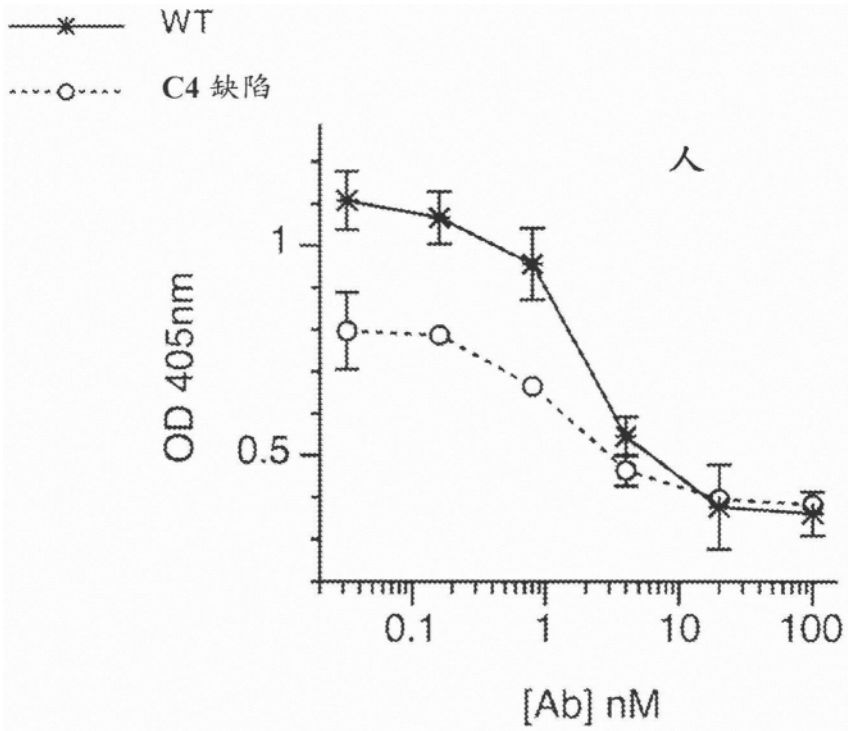


图28D

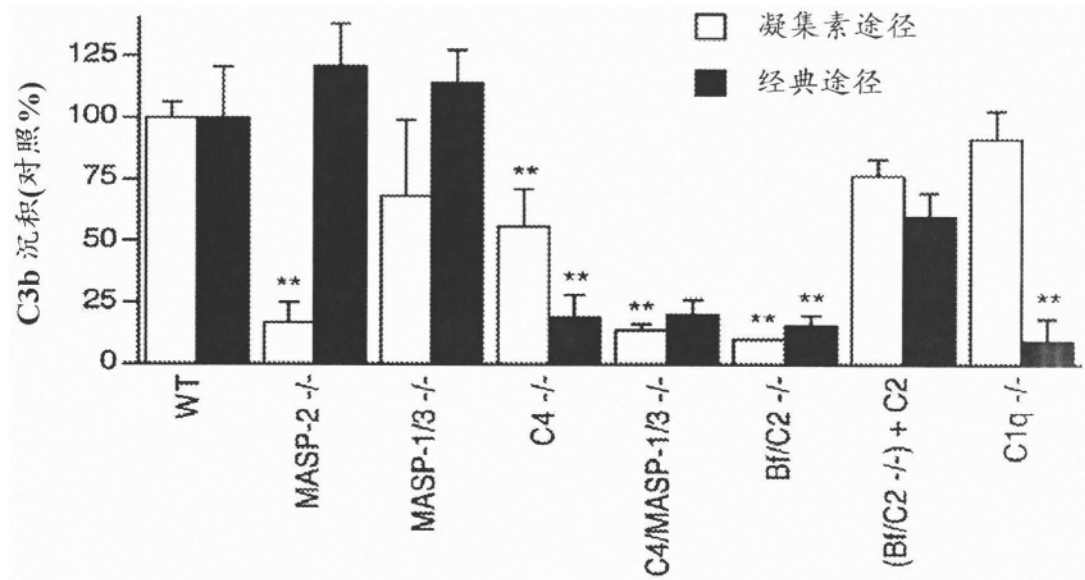


图29A

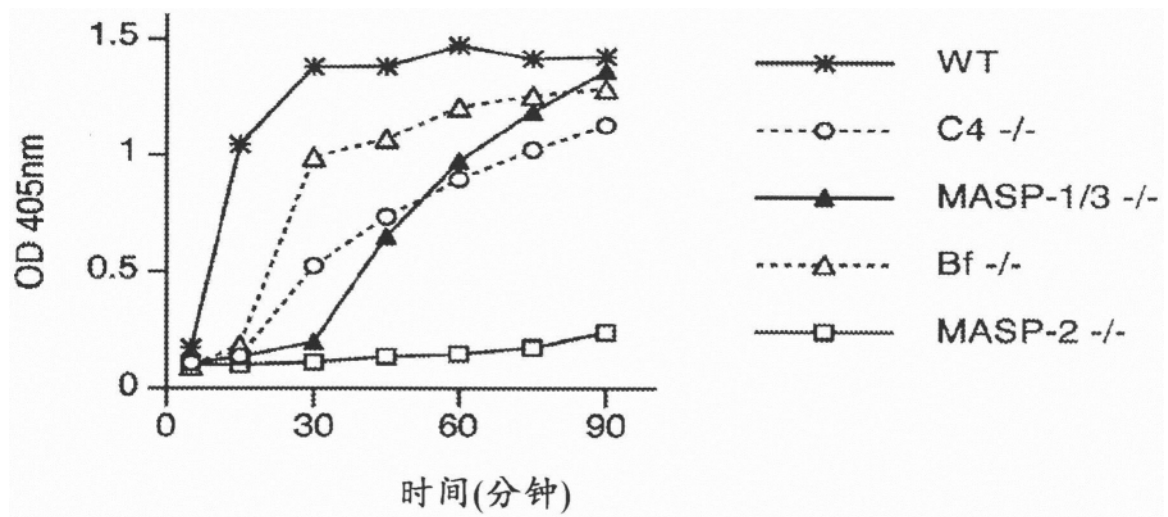


图29B

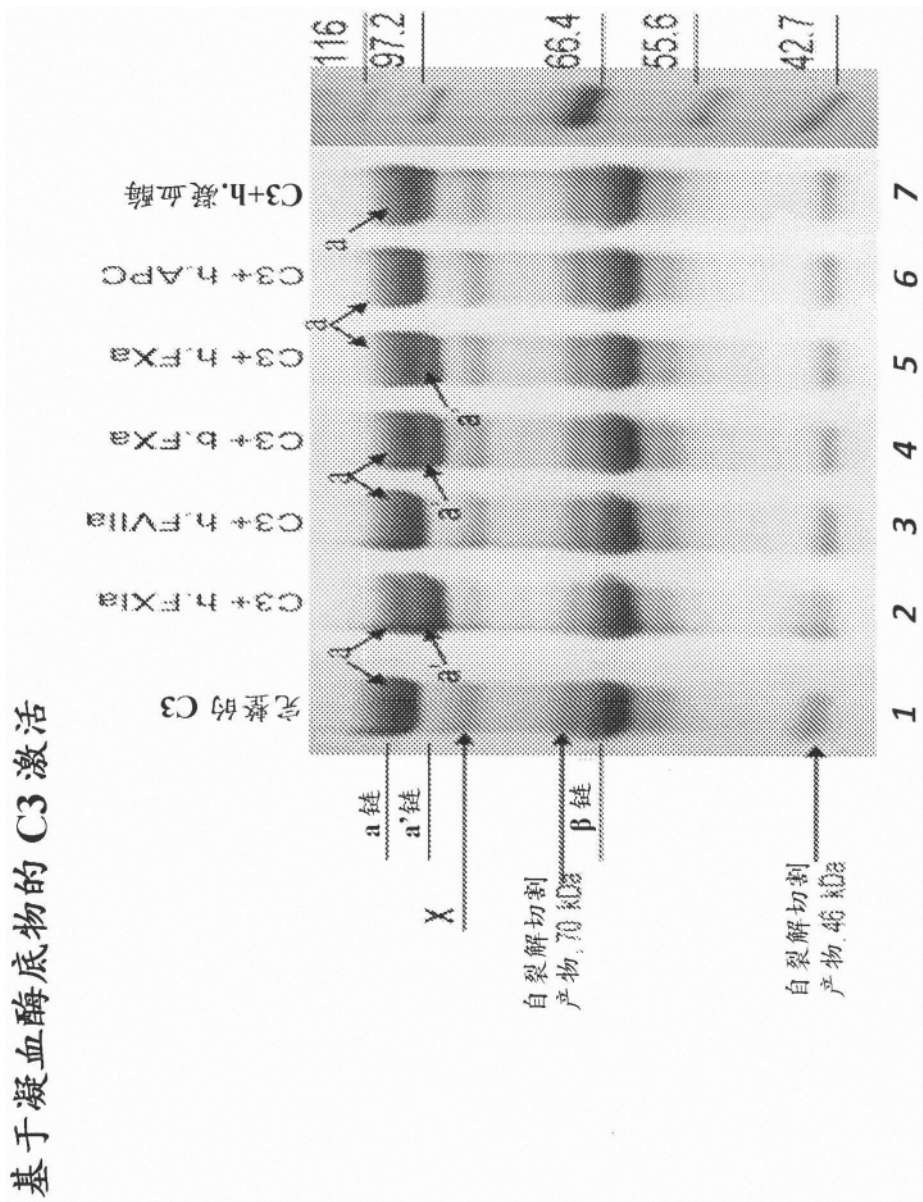


图30

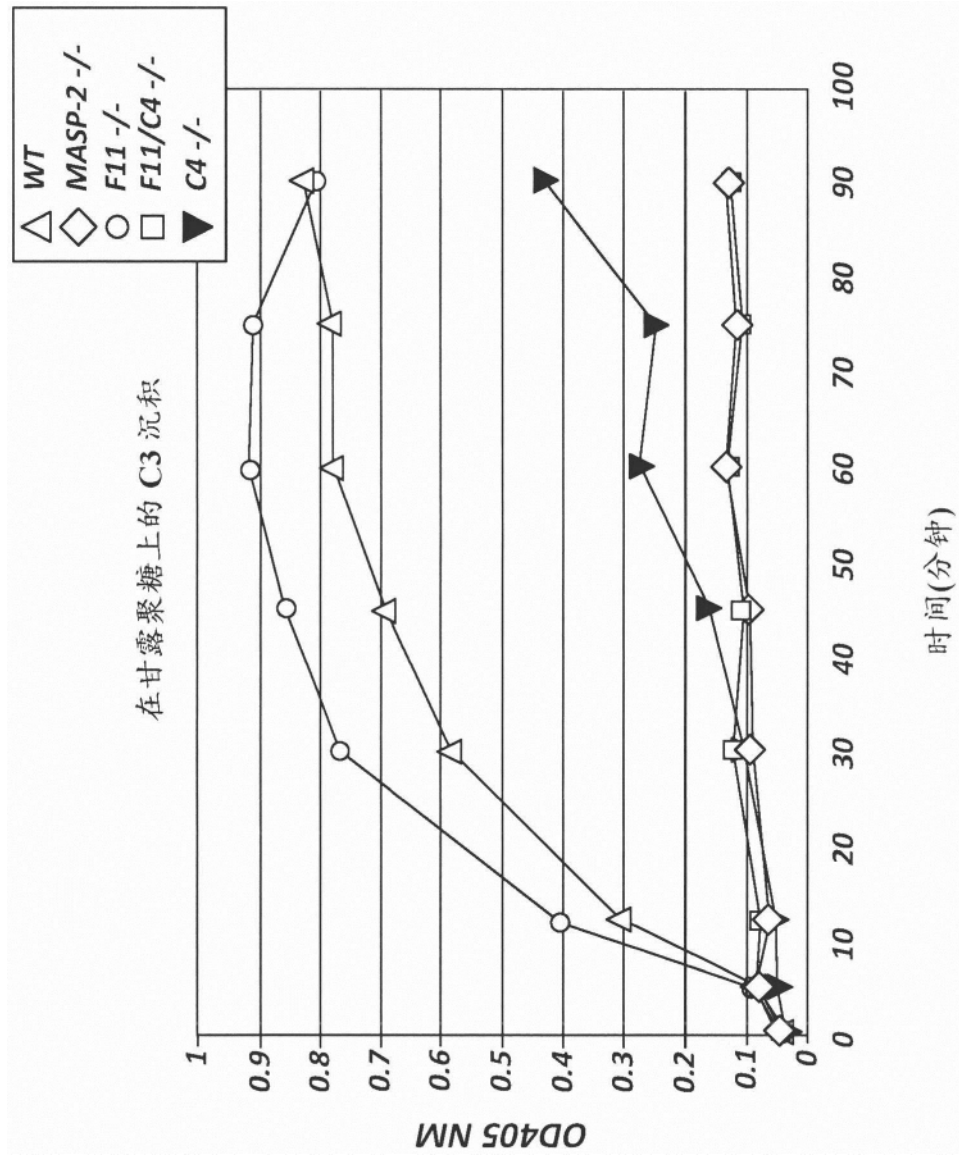


图31

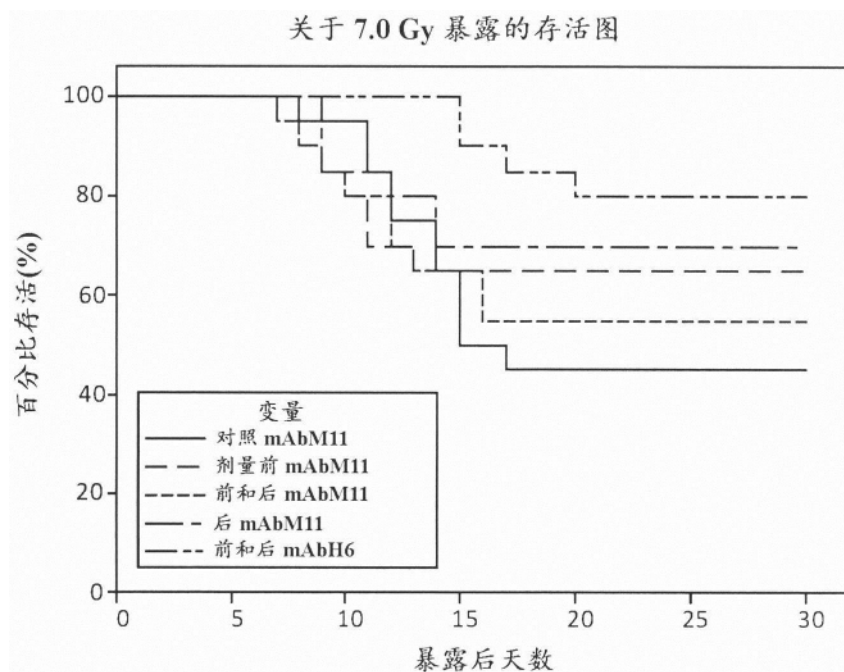


图32A

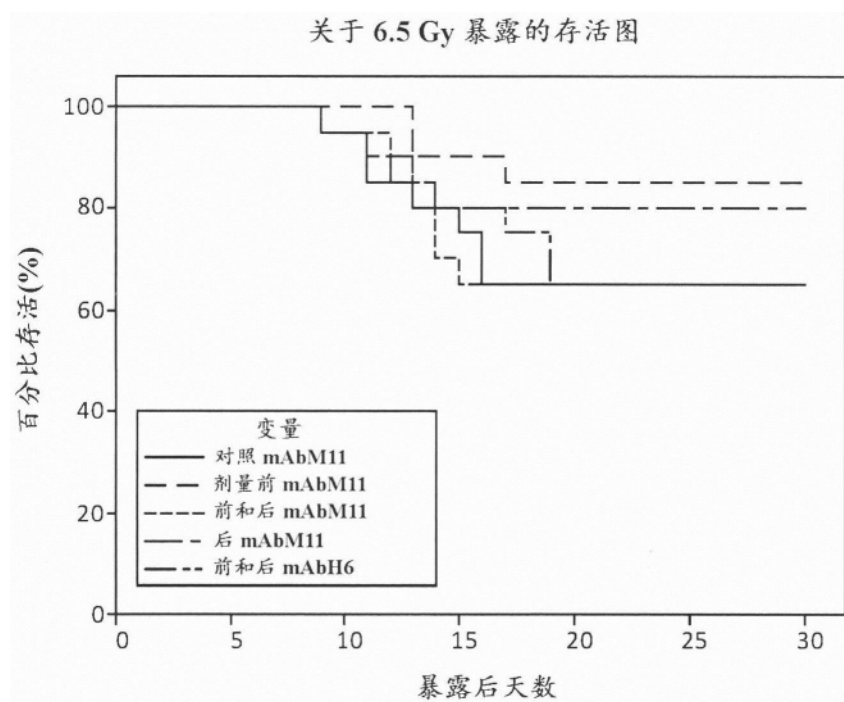


图32B

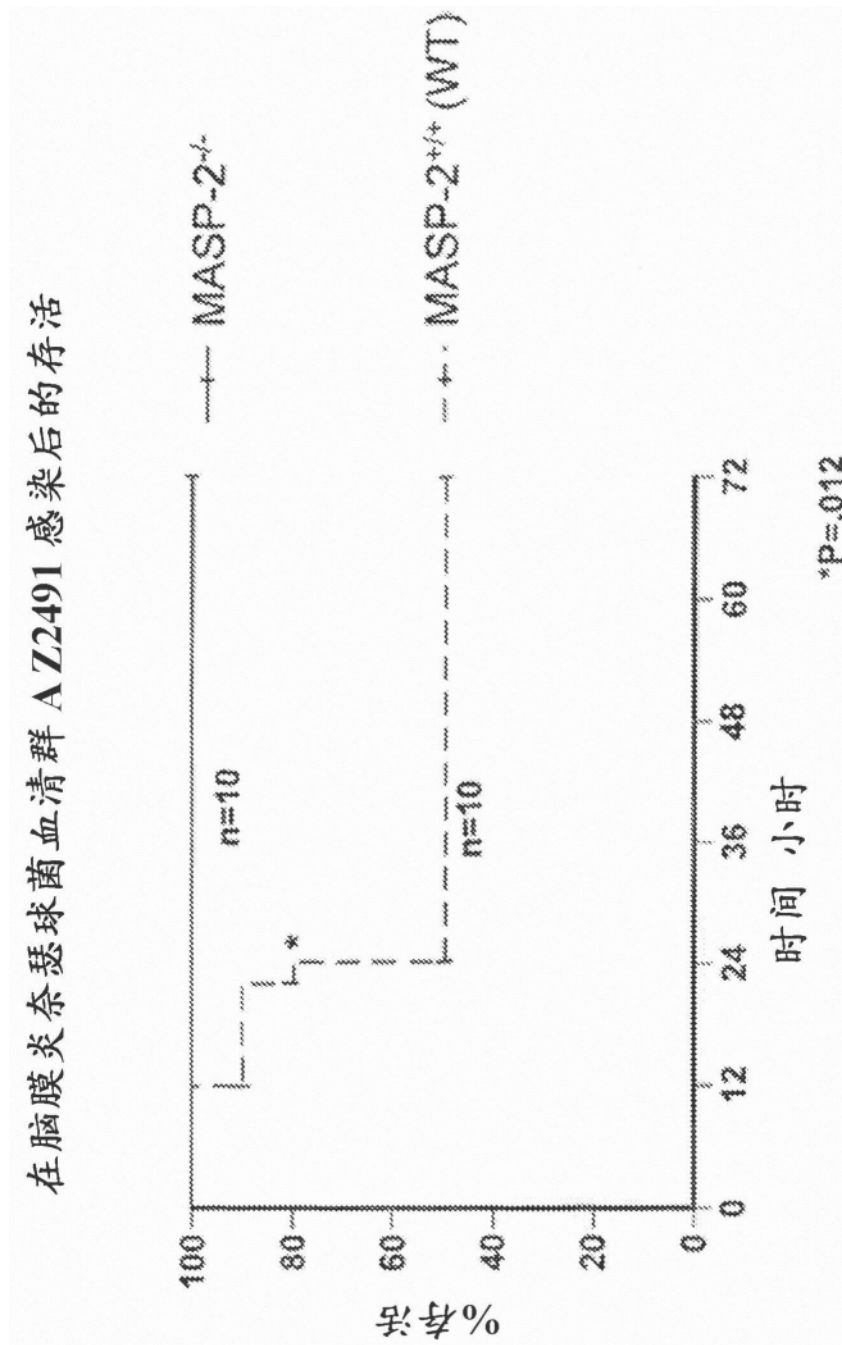


图33

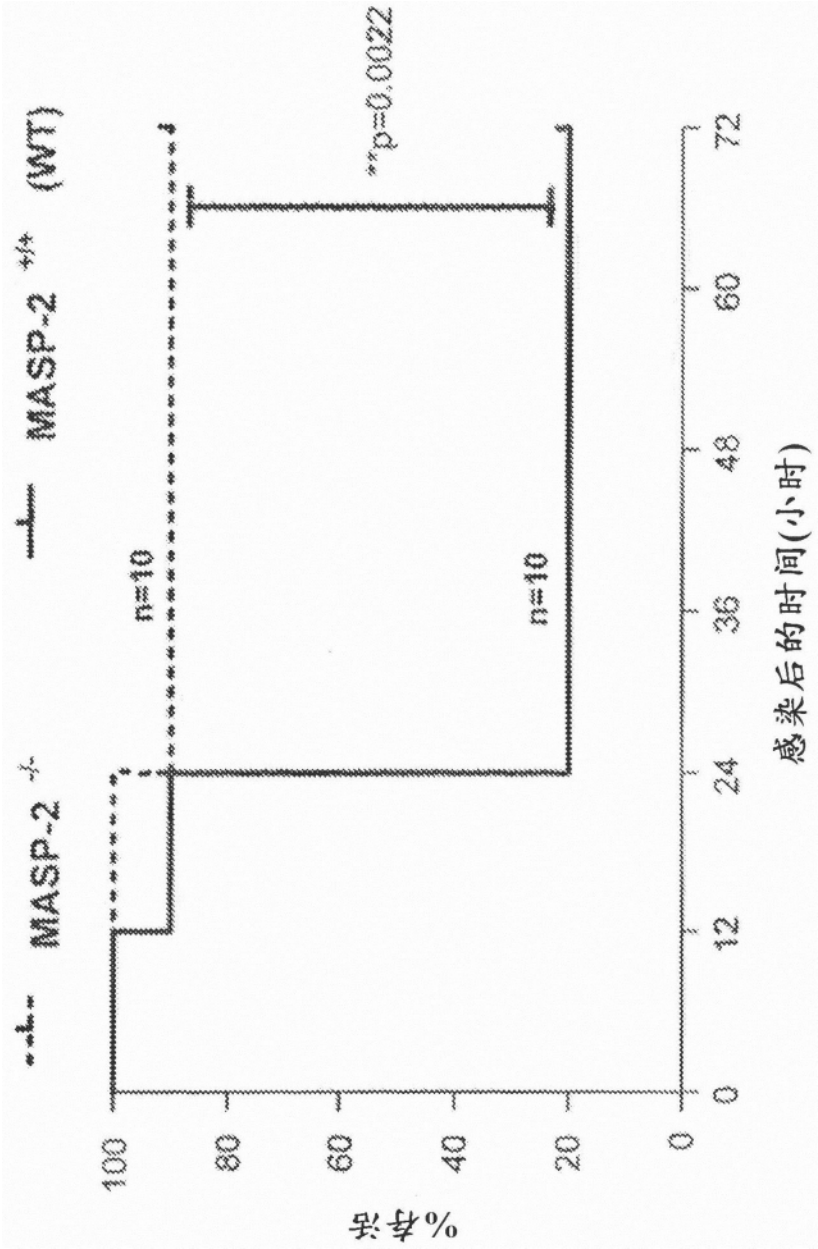


图34

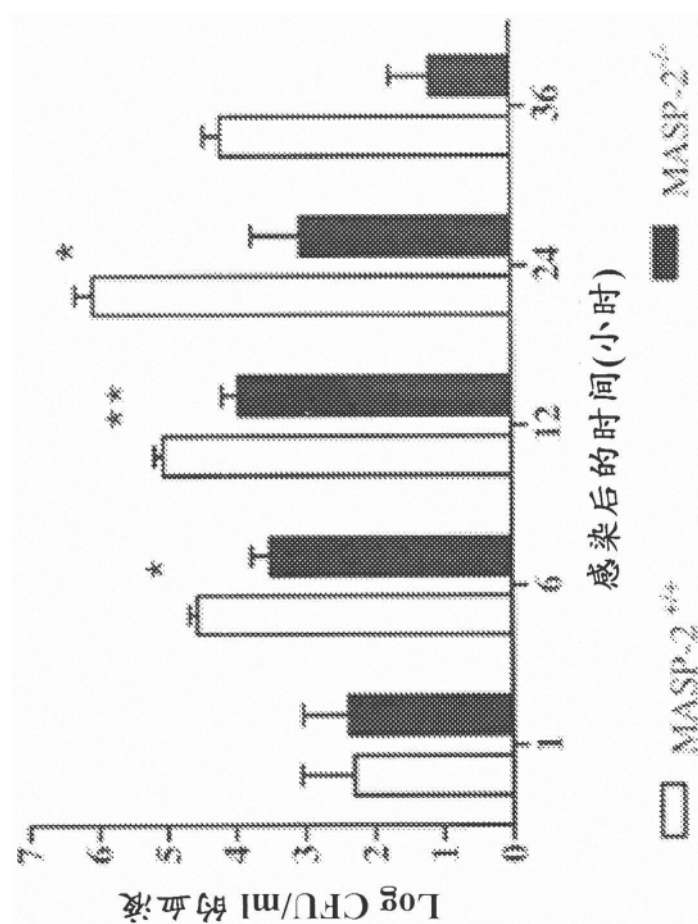


图35

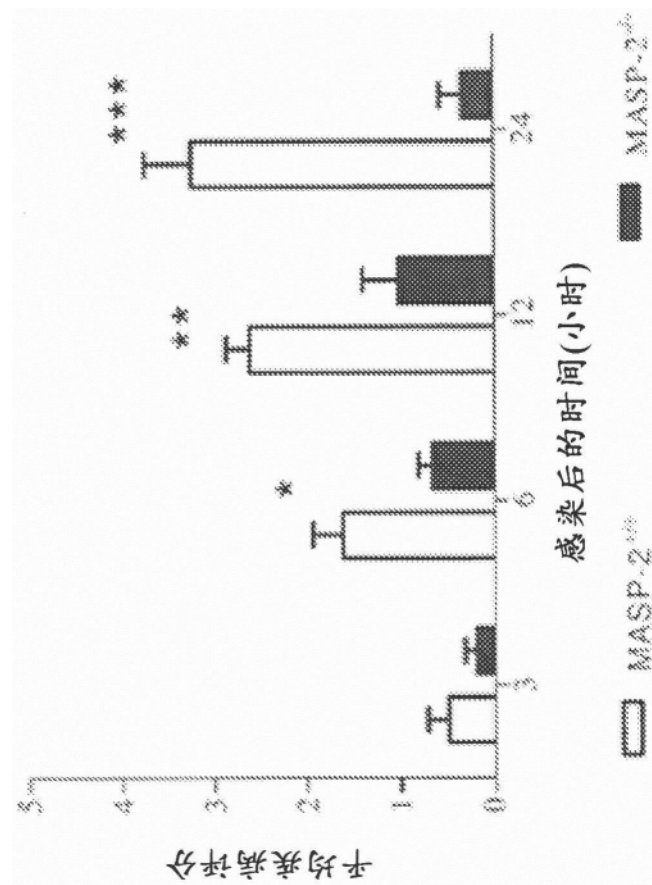


图36

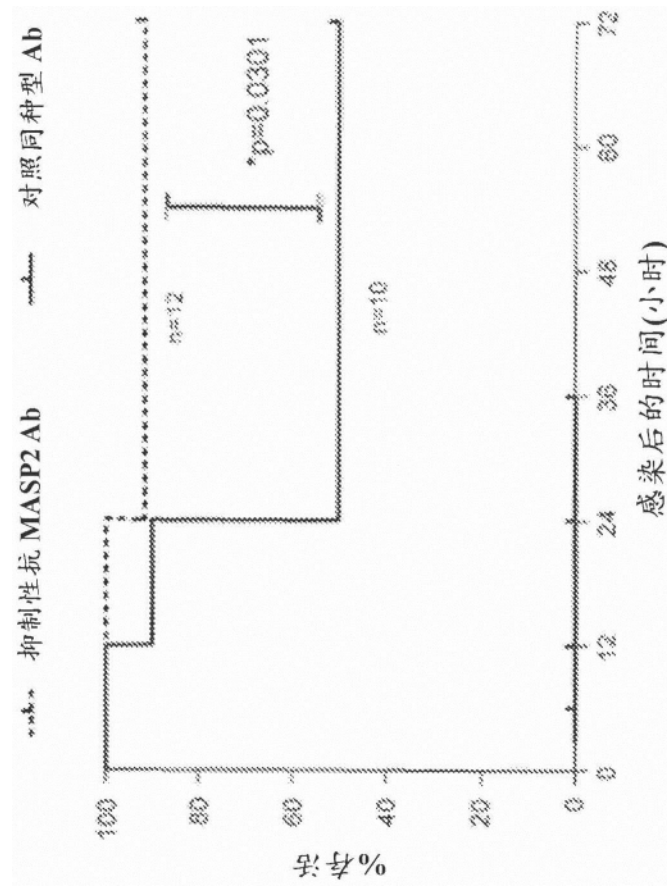


图37

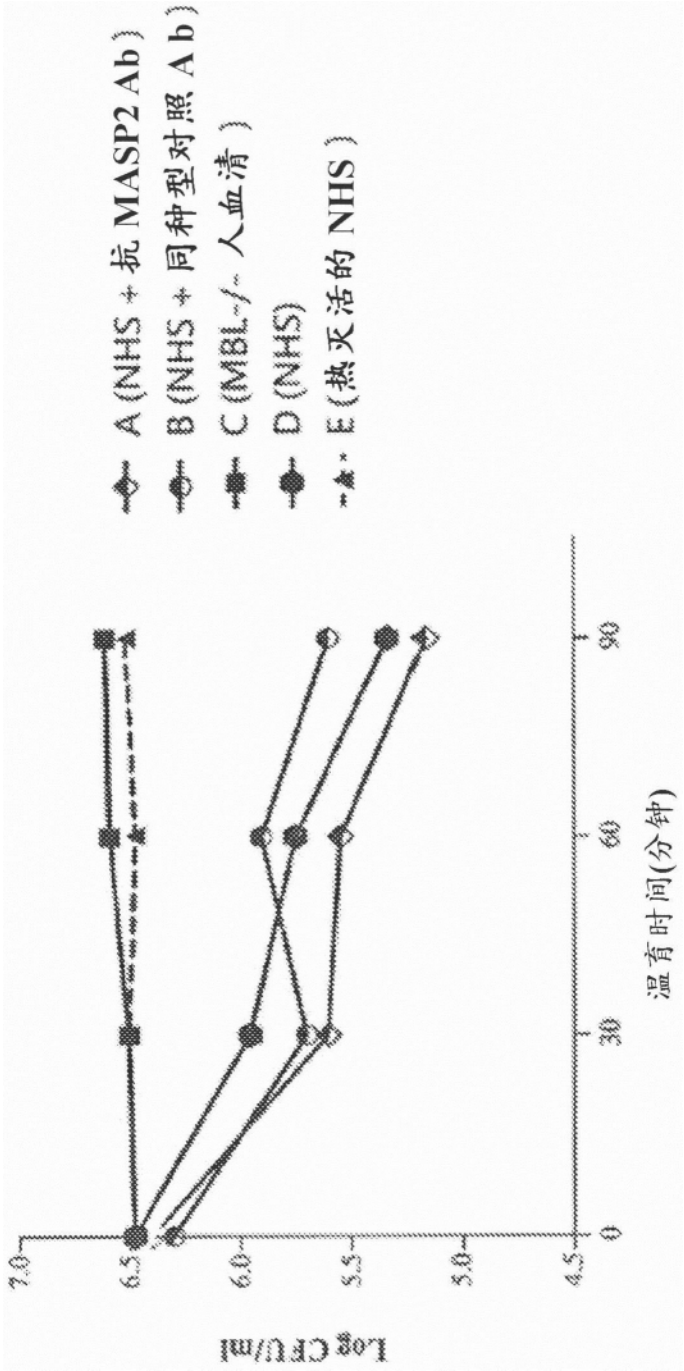


图38

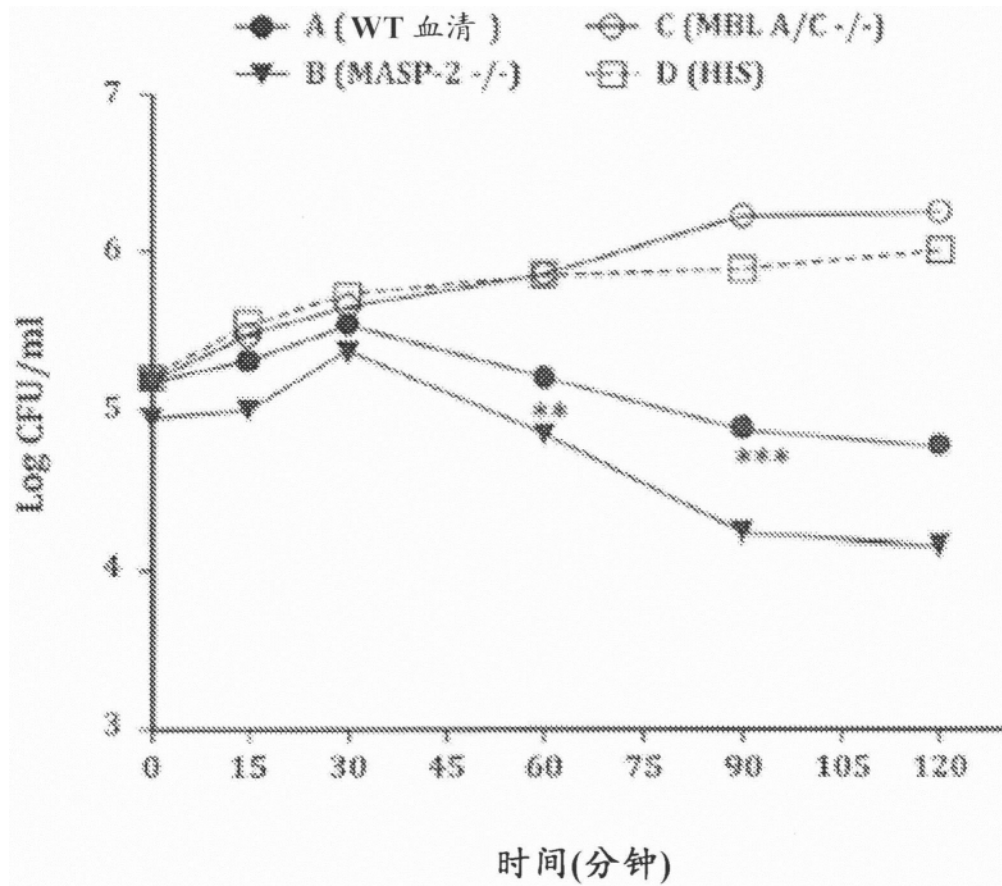


图39

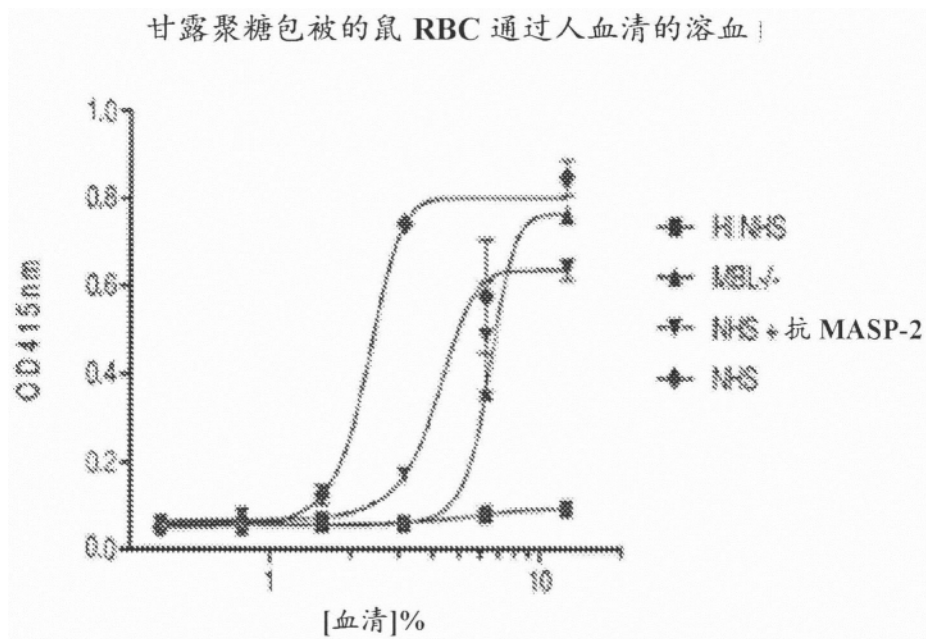


图40

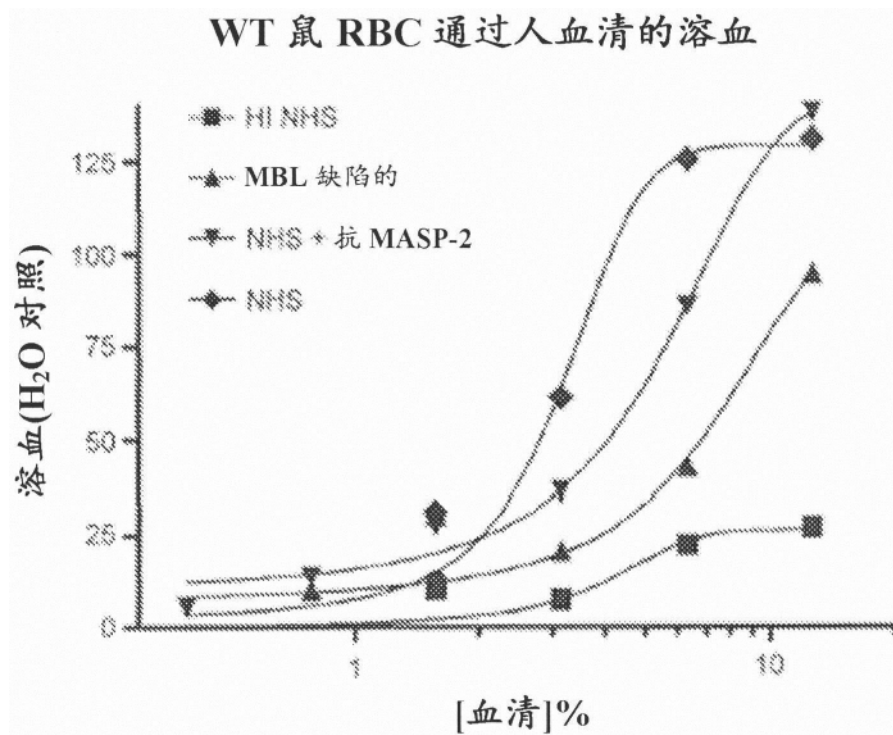


图41

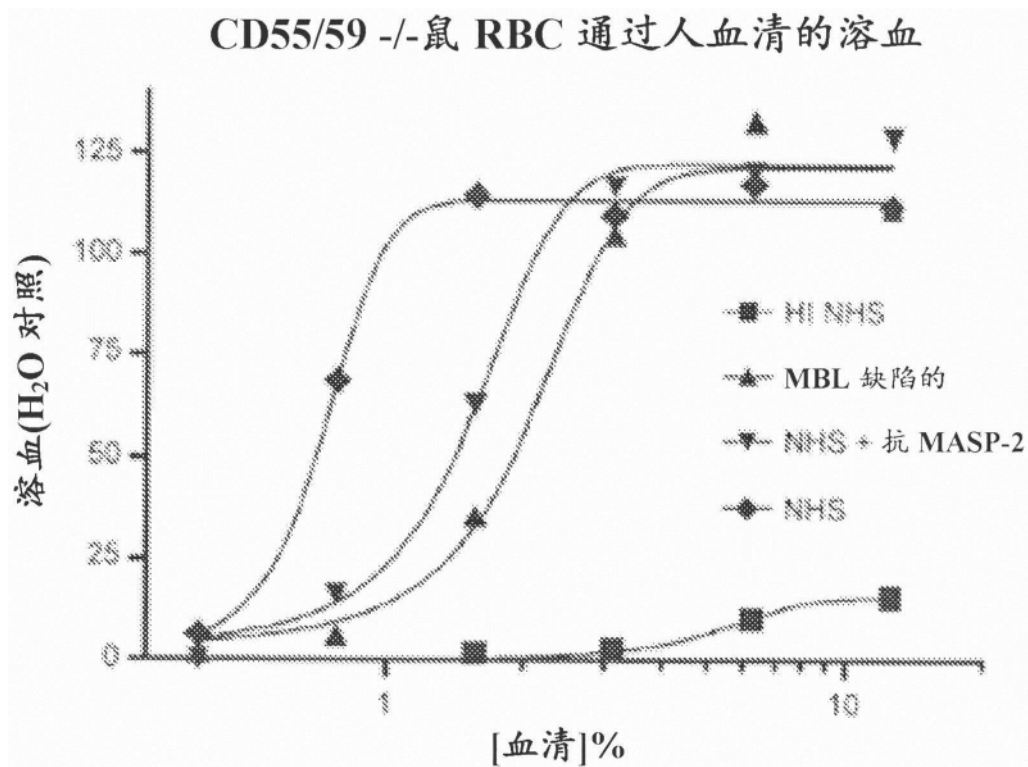


图42

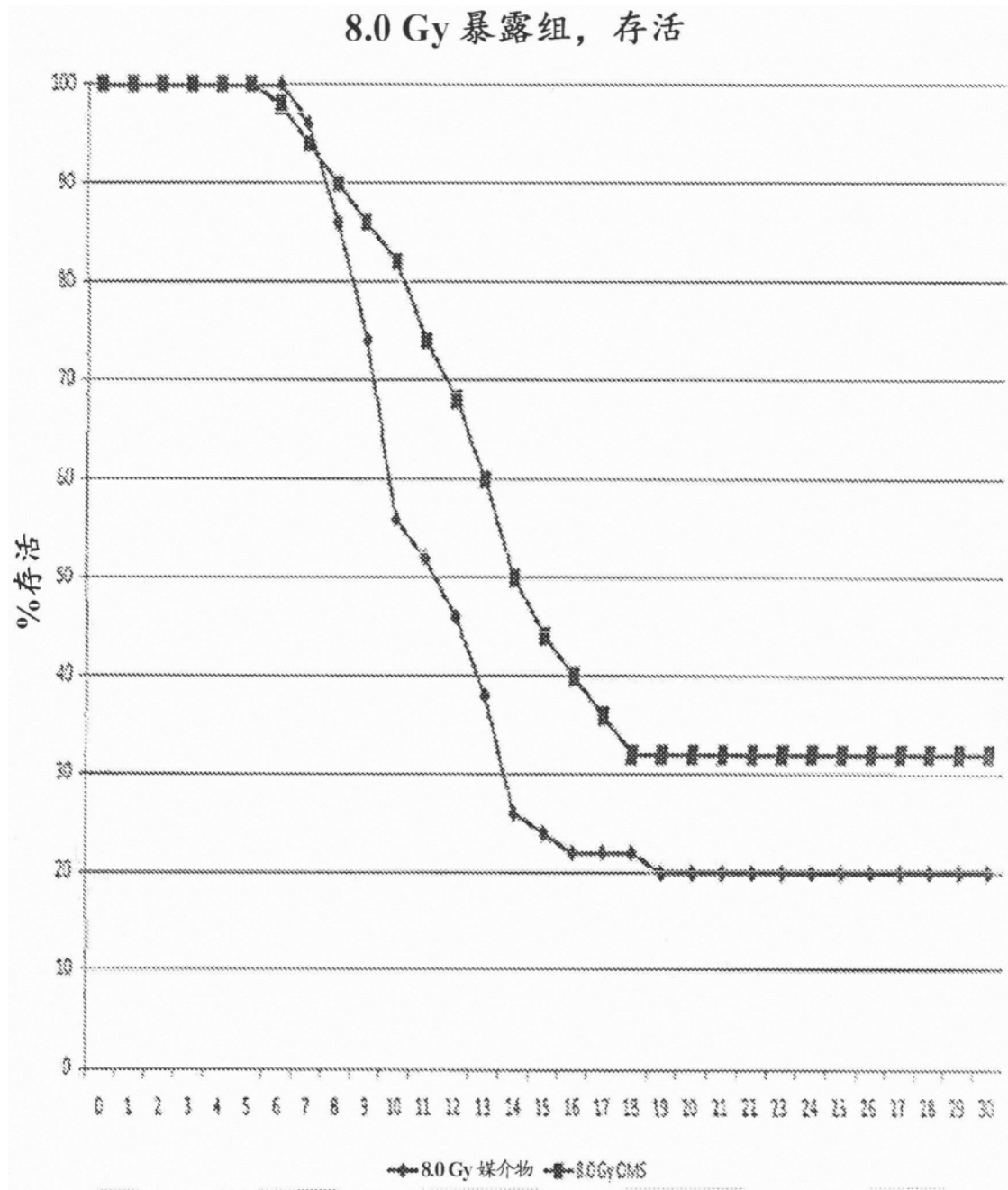


图43

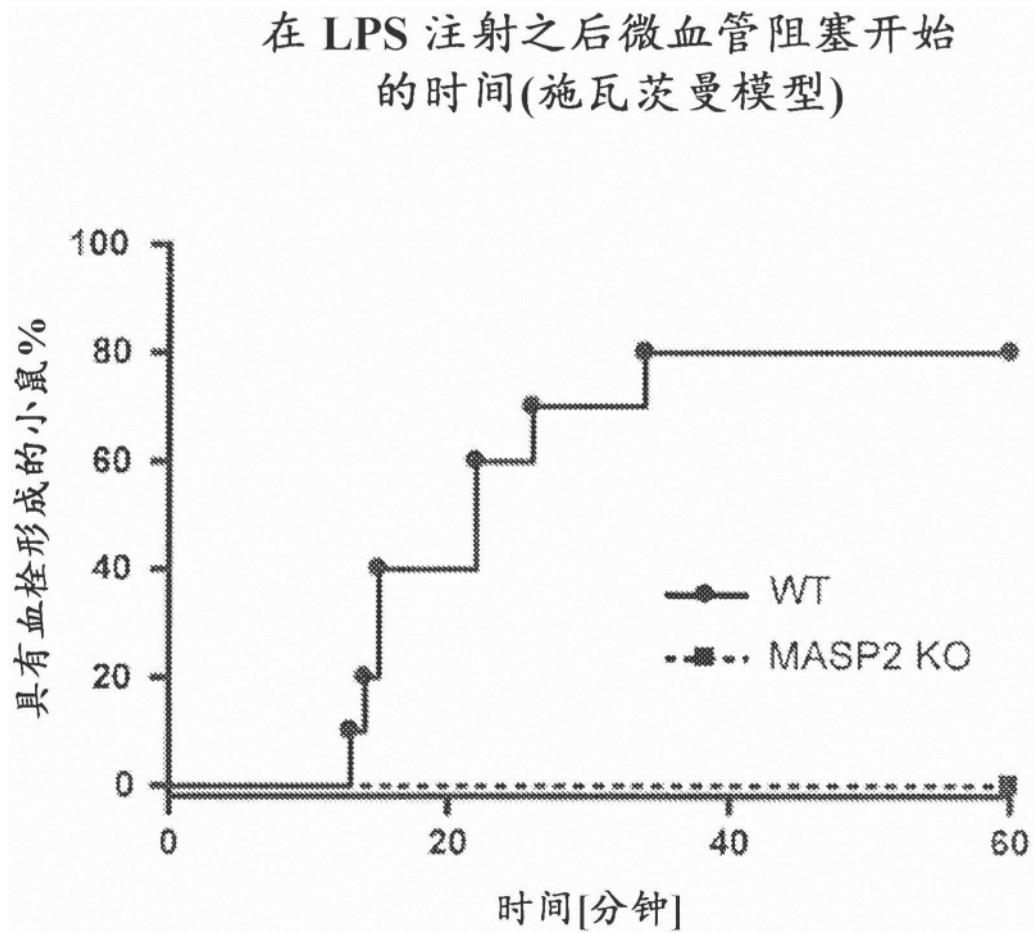


图44

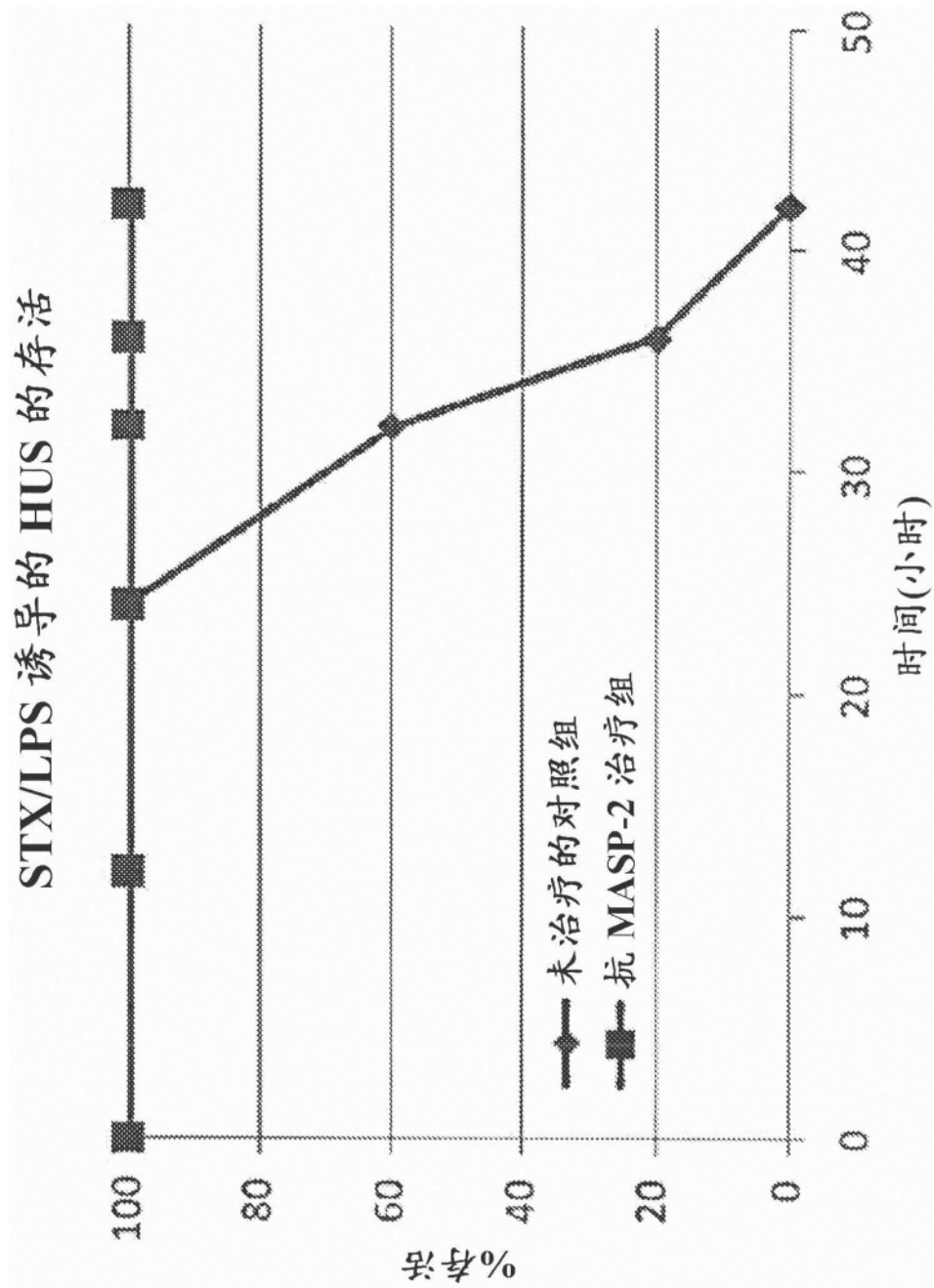


图45

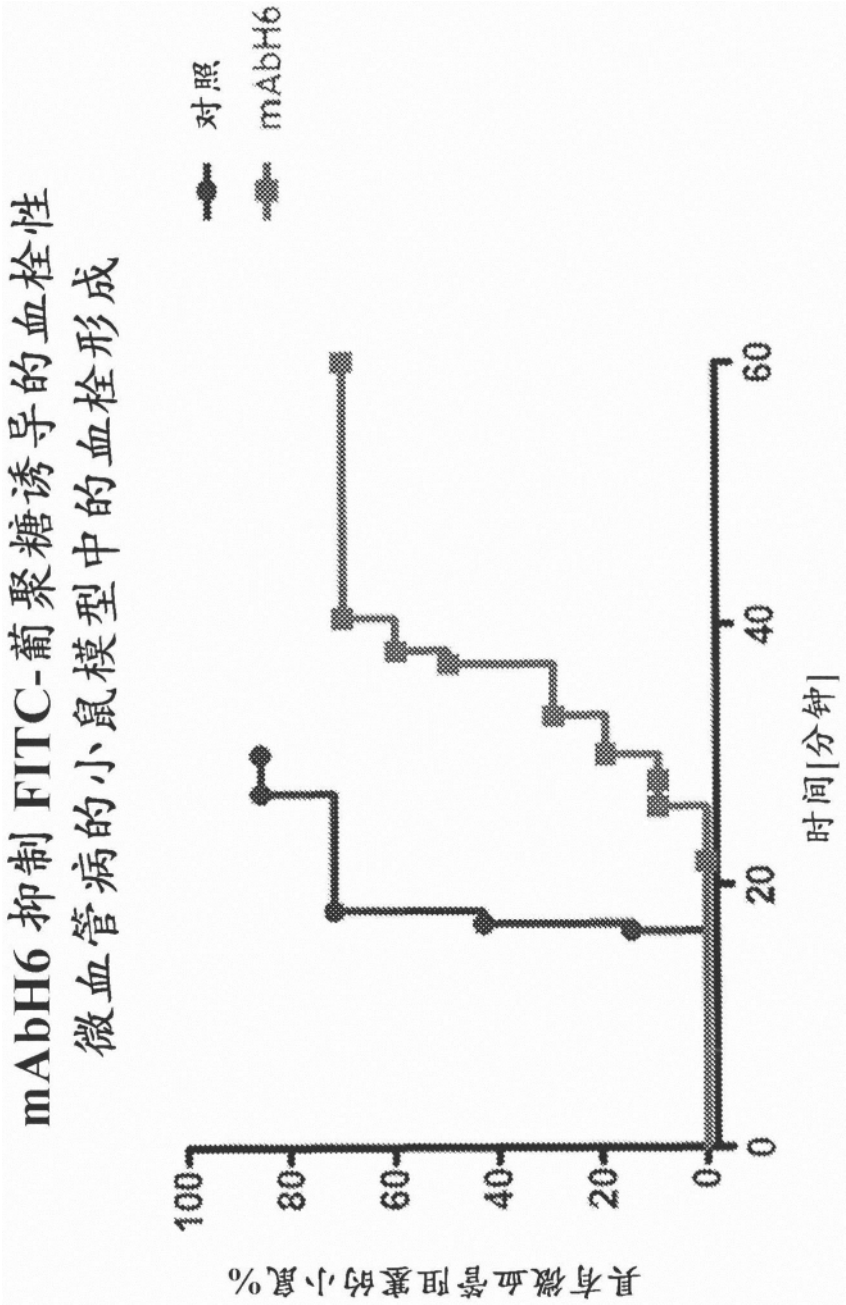


图46

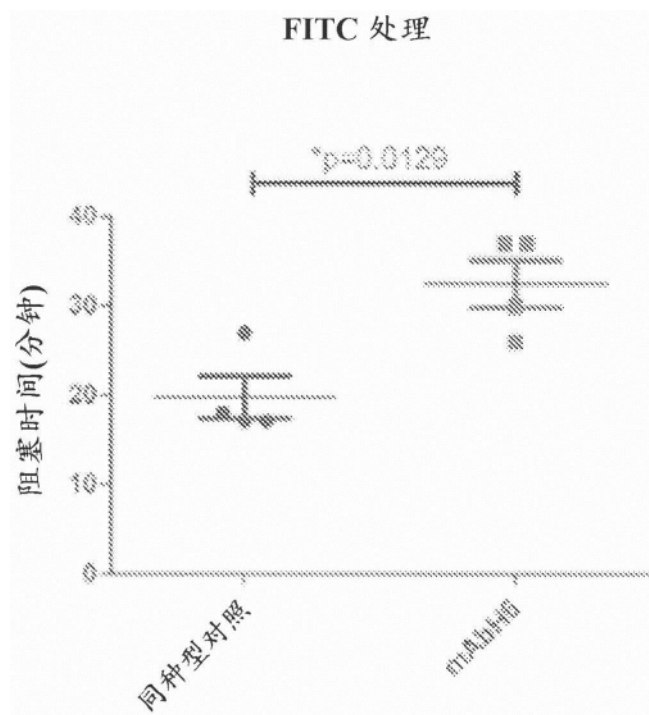


图47

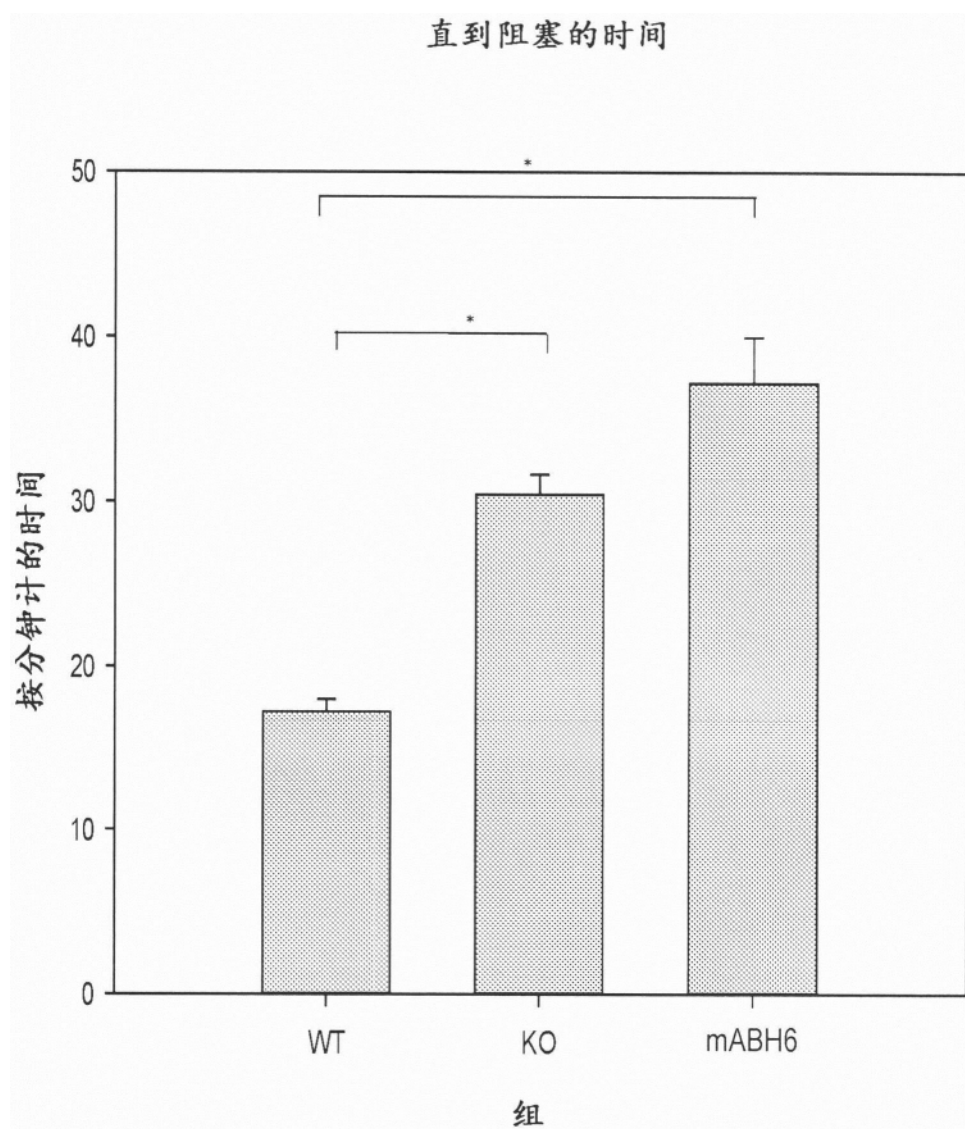


图48

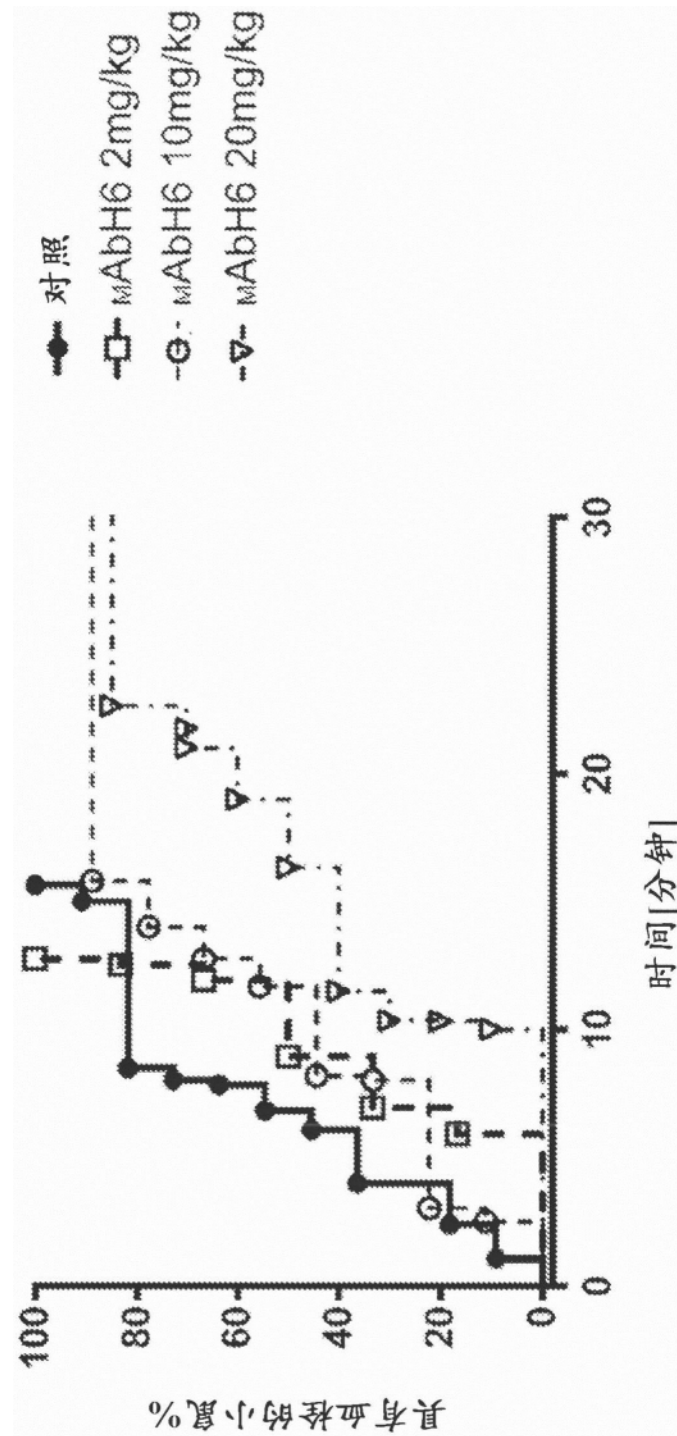


图49

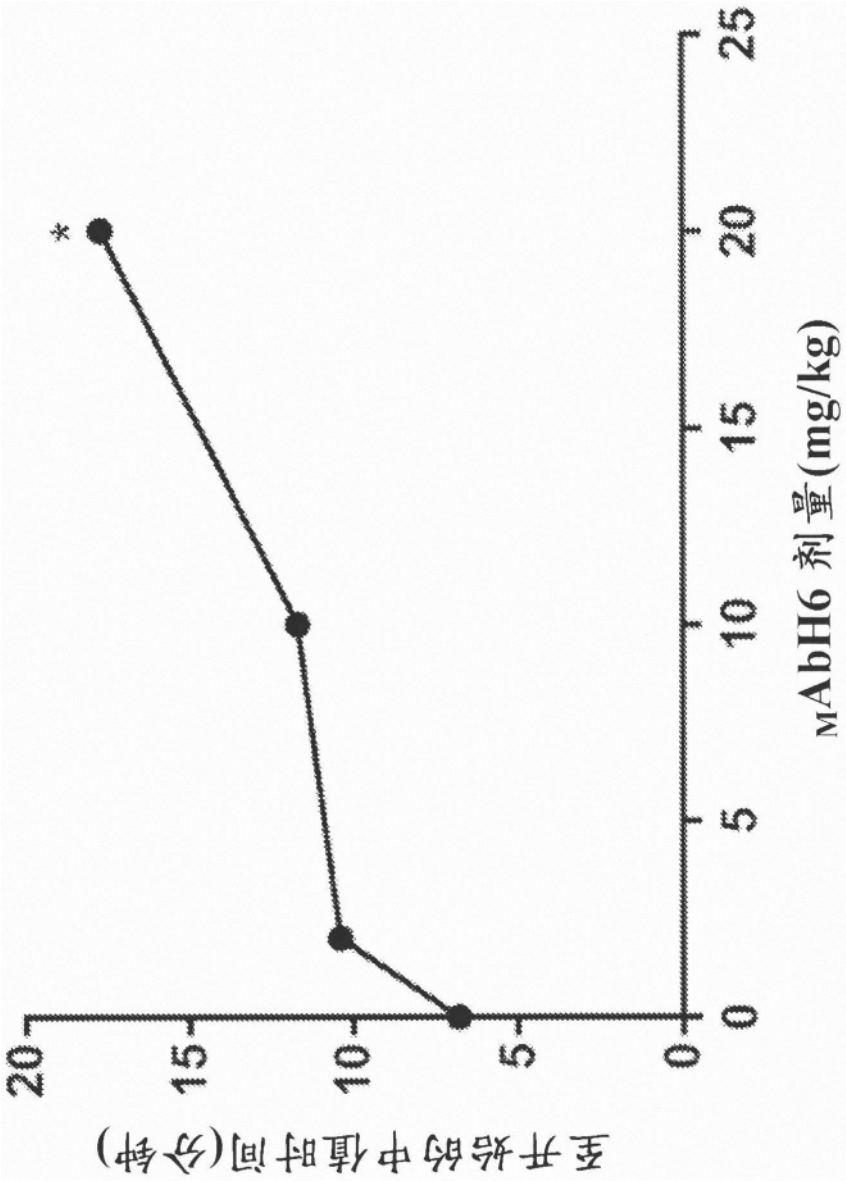


图50

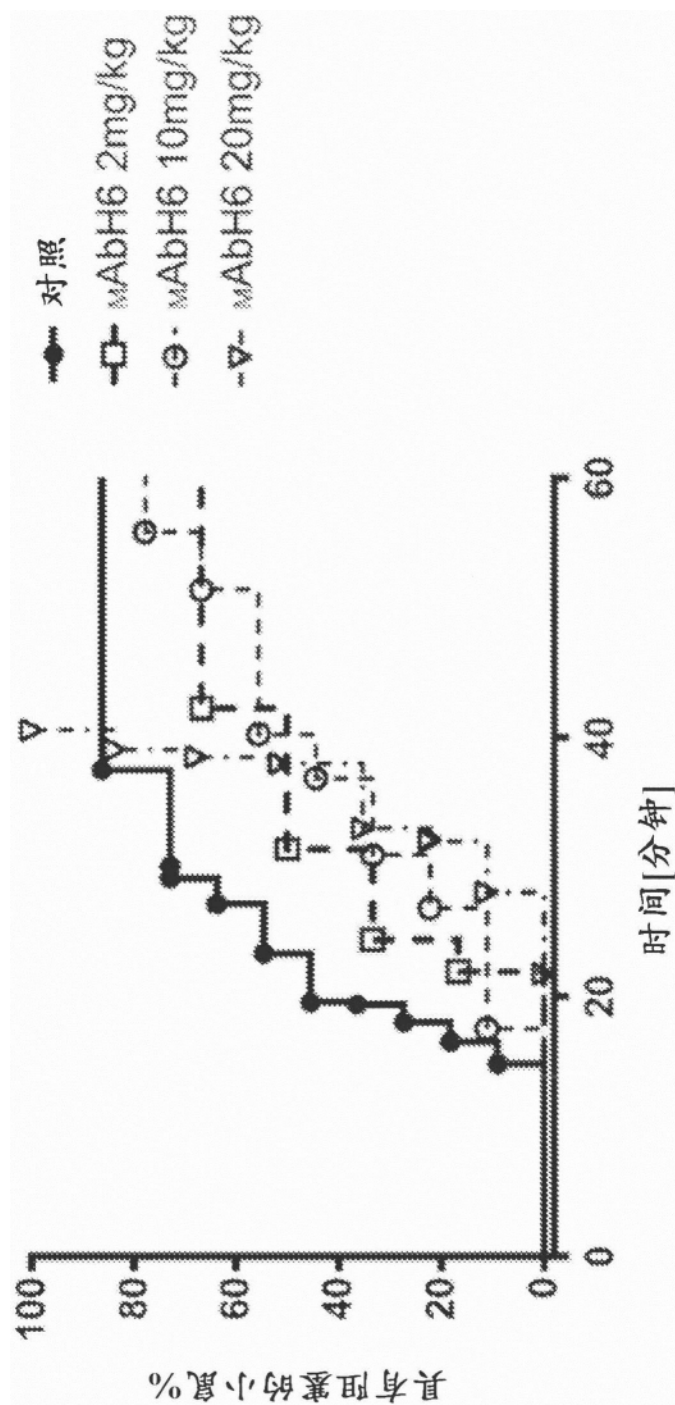


图51

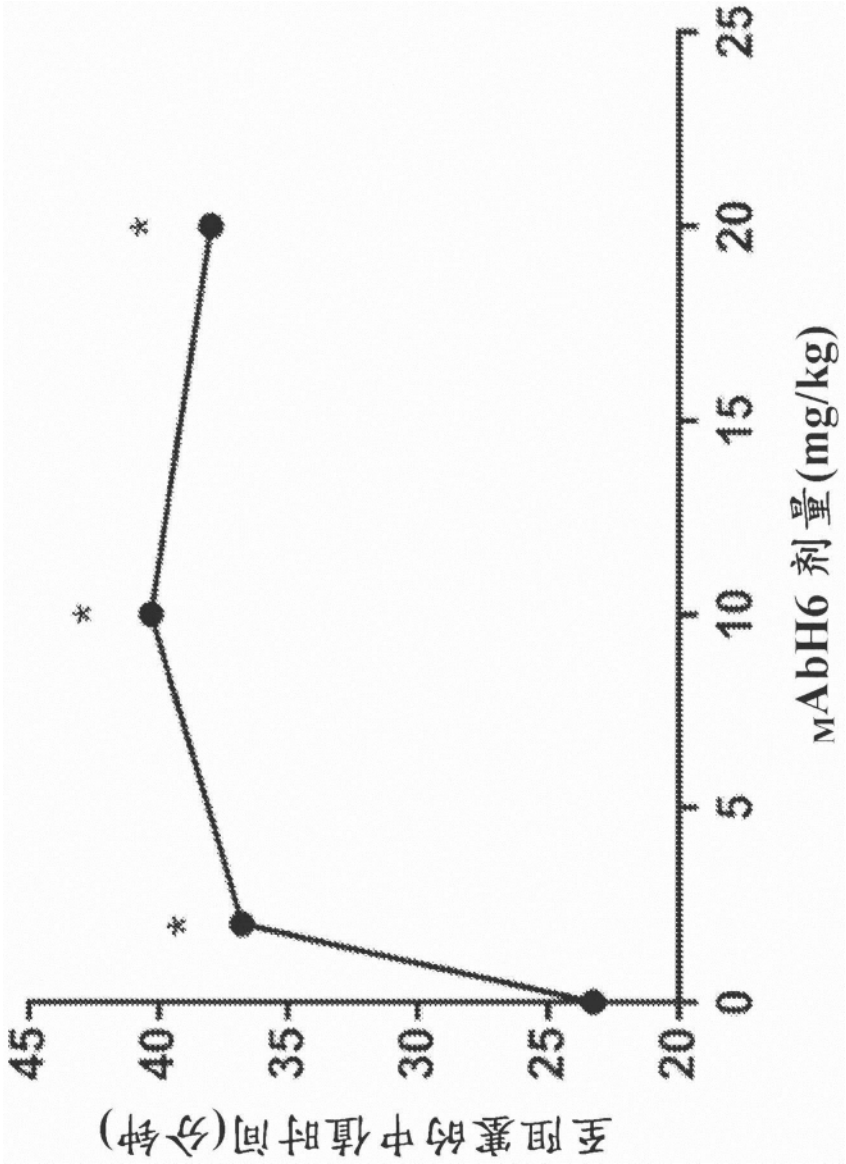


图52

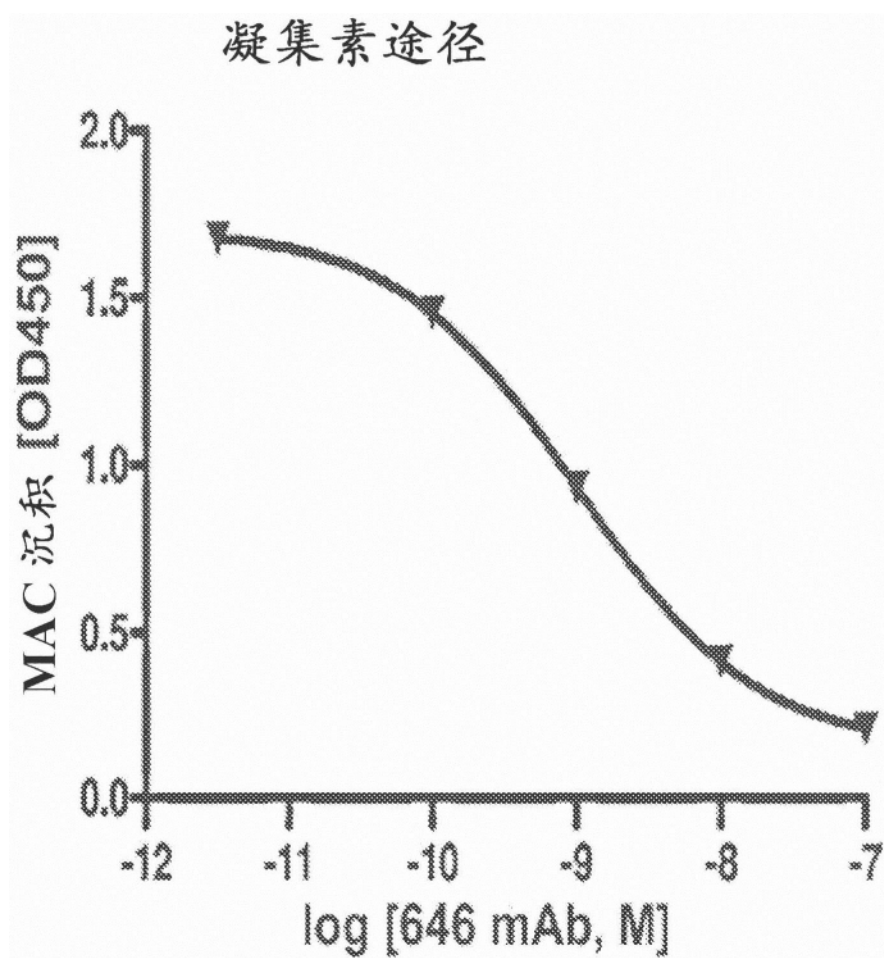


图53A

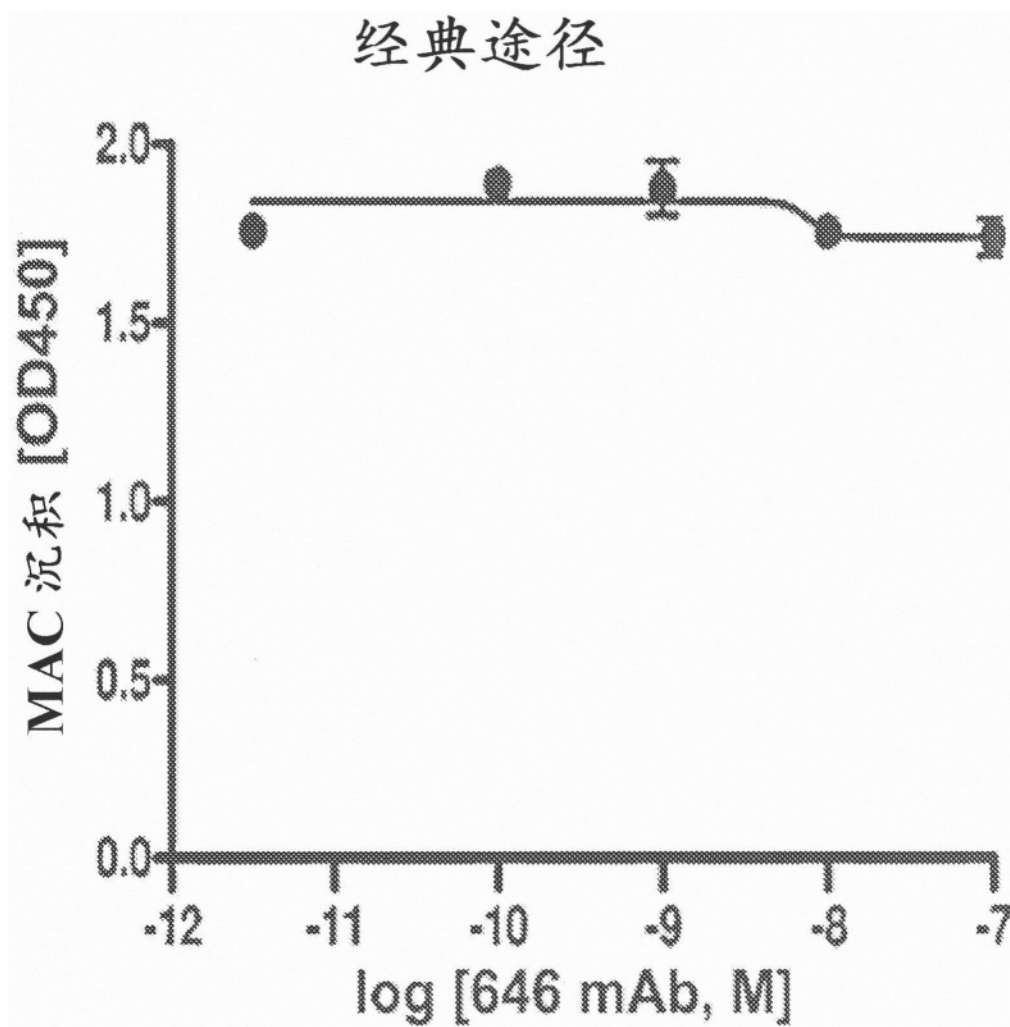


图53B

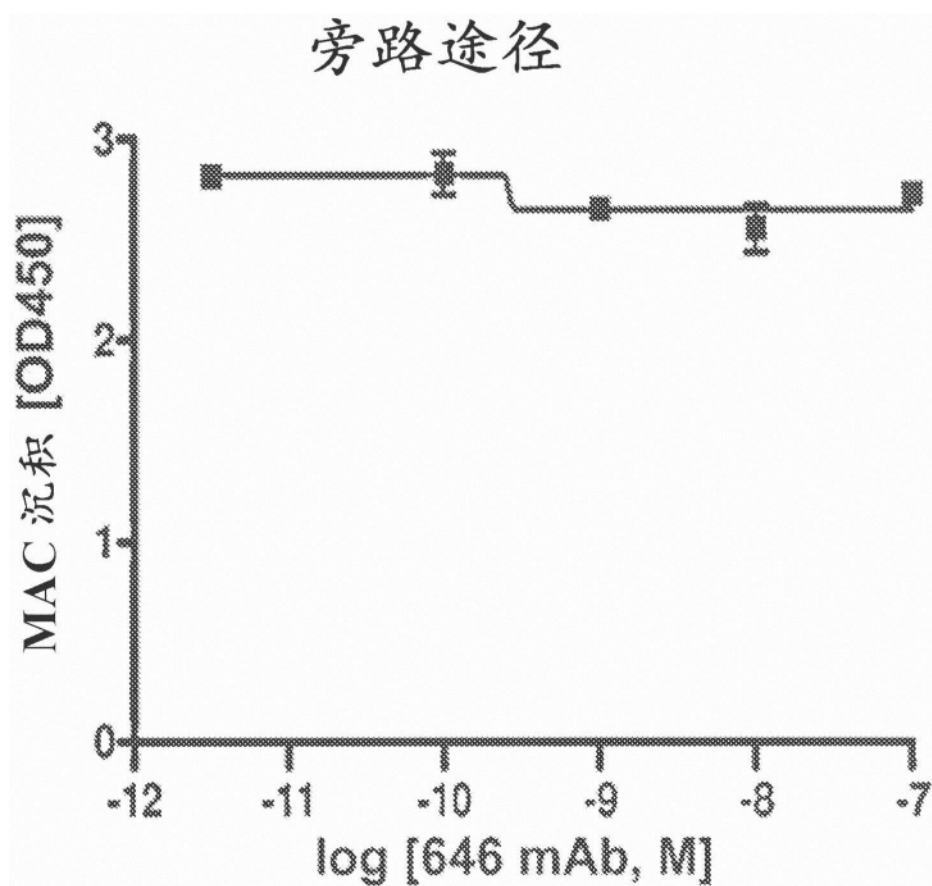


图53C

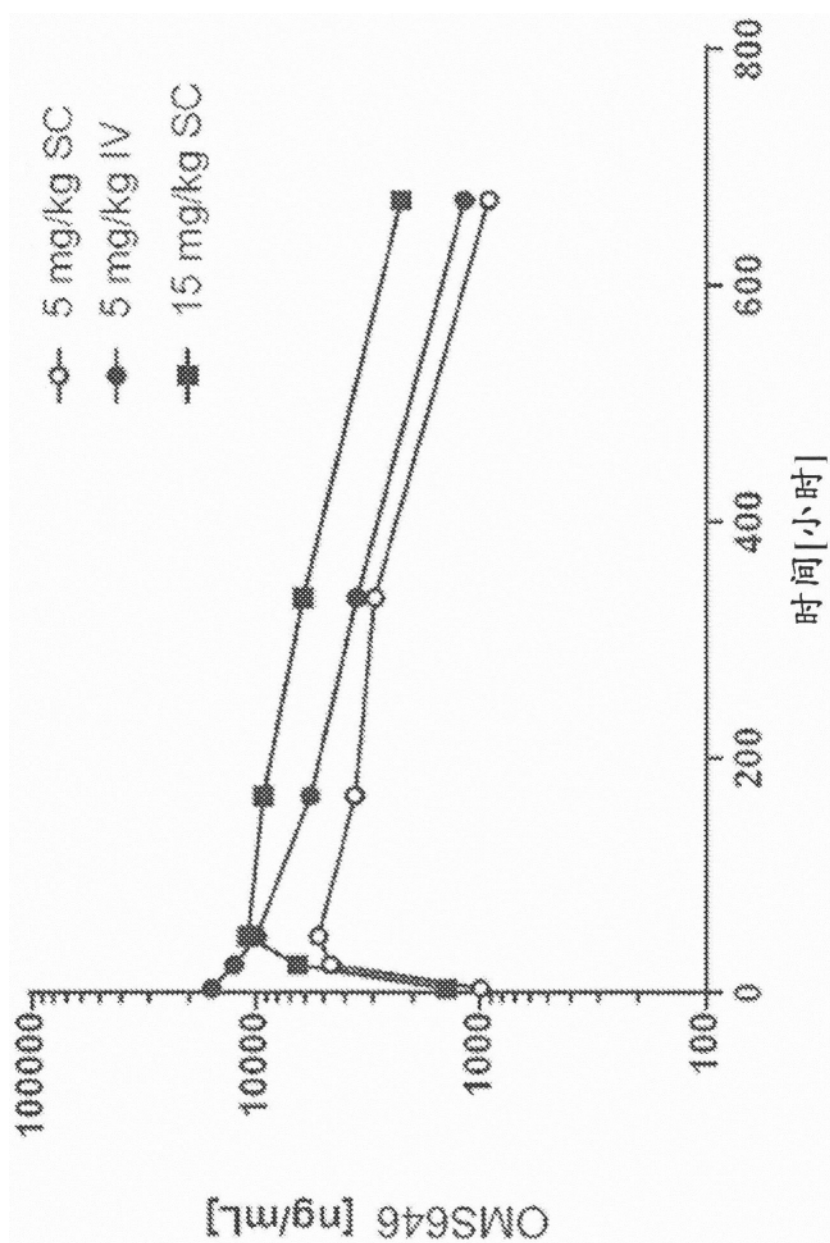


图54

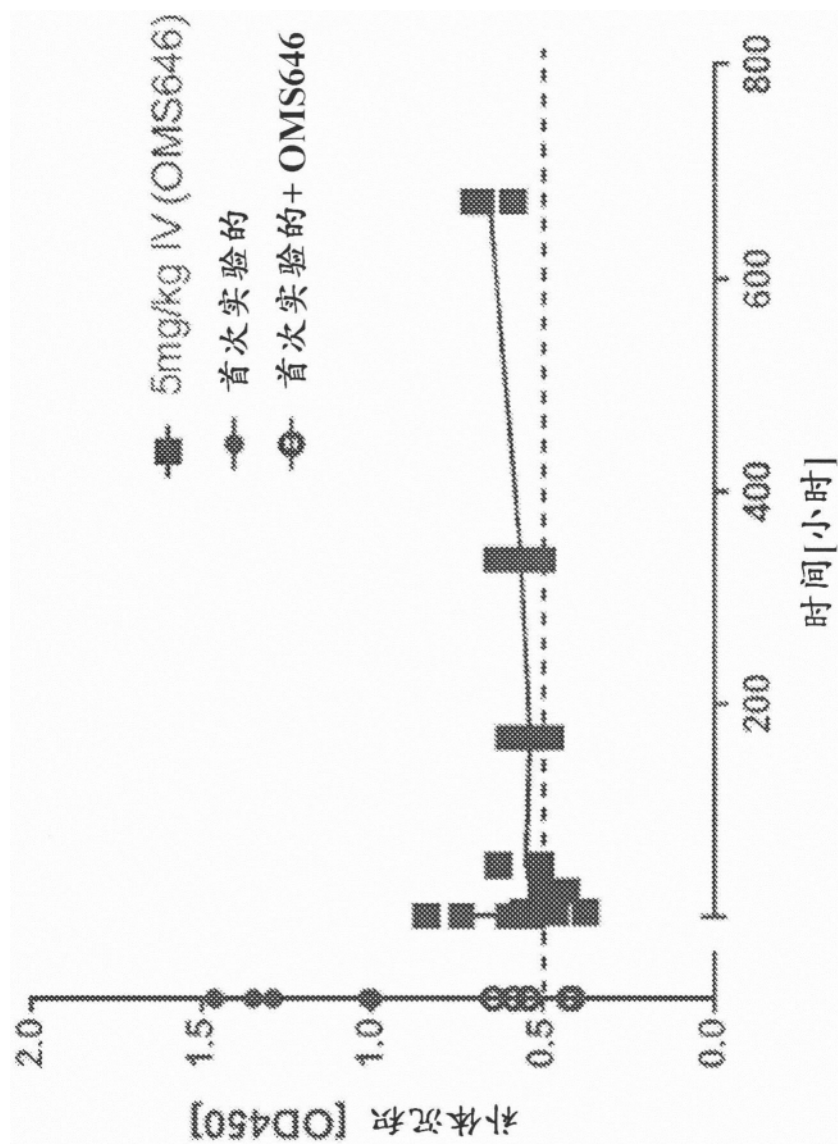


图55A

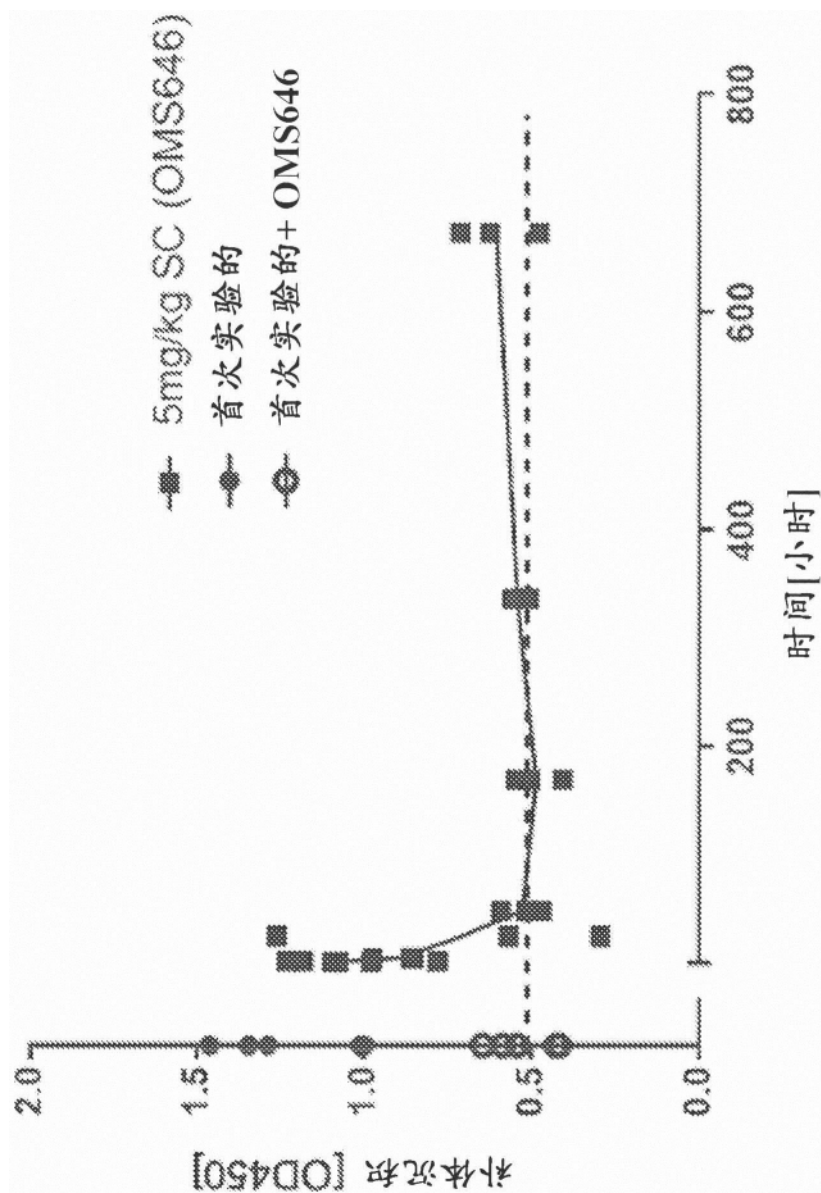


图55B

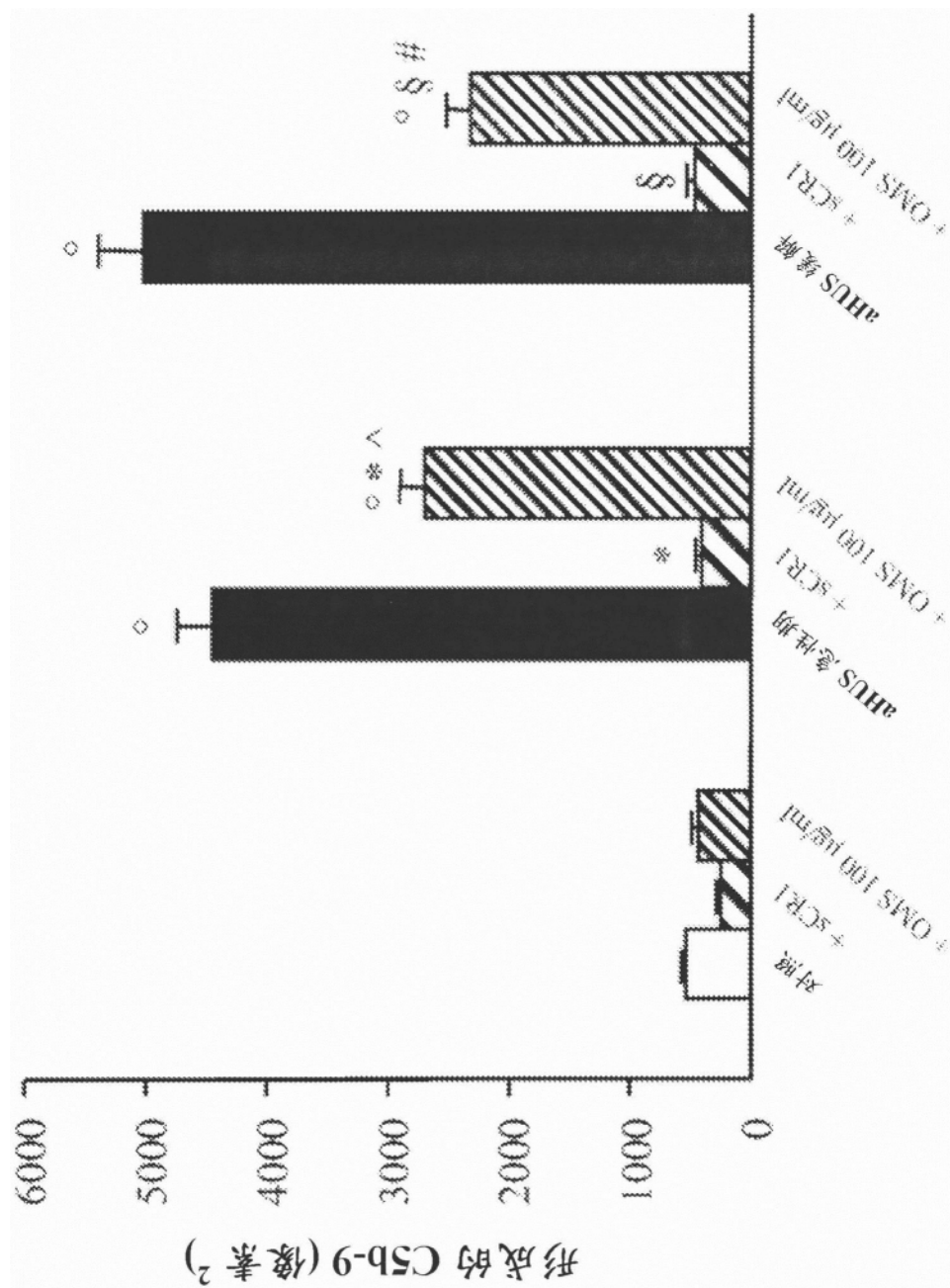


图56

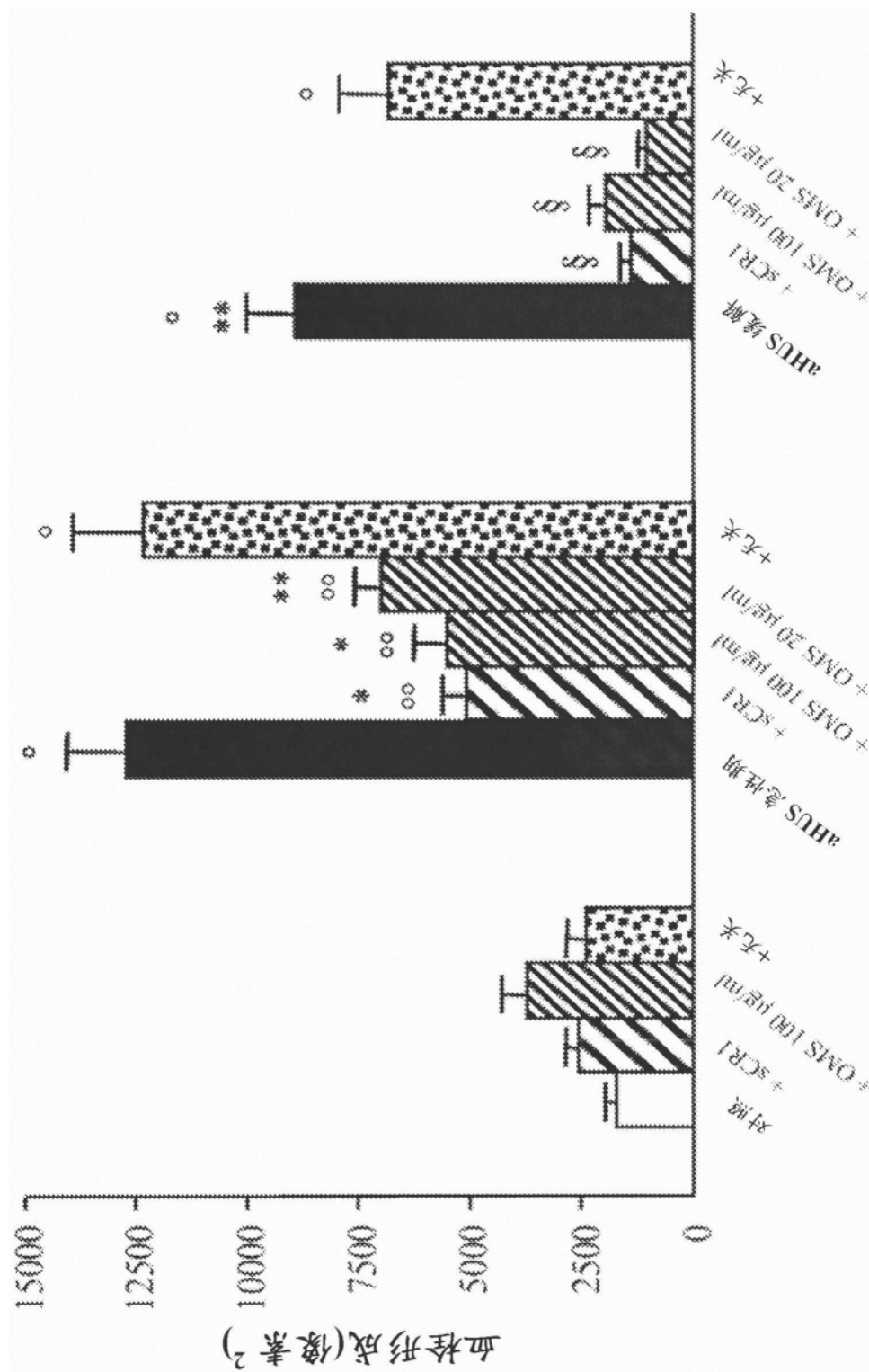


图57

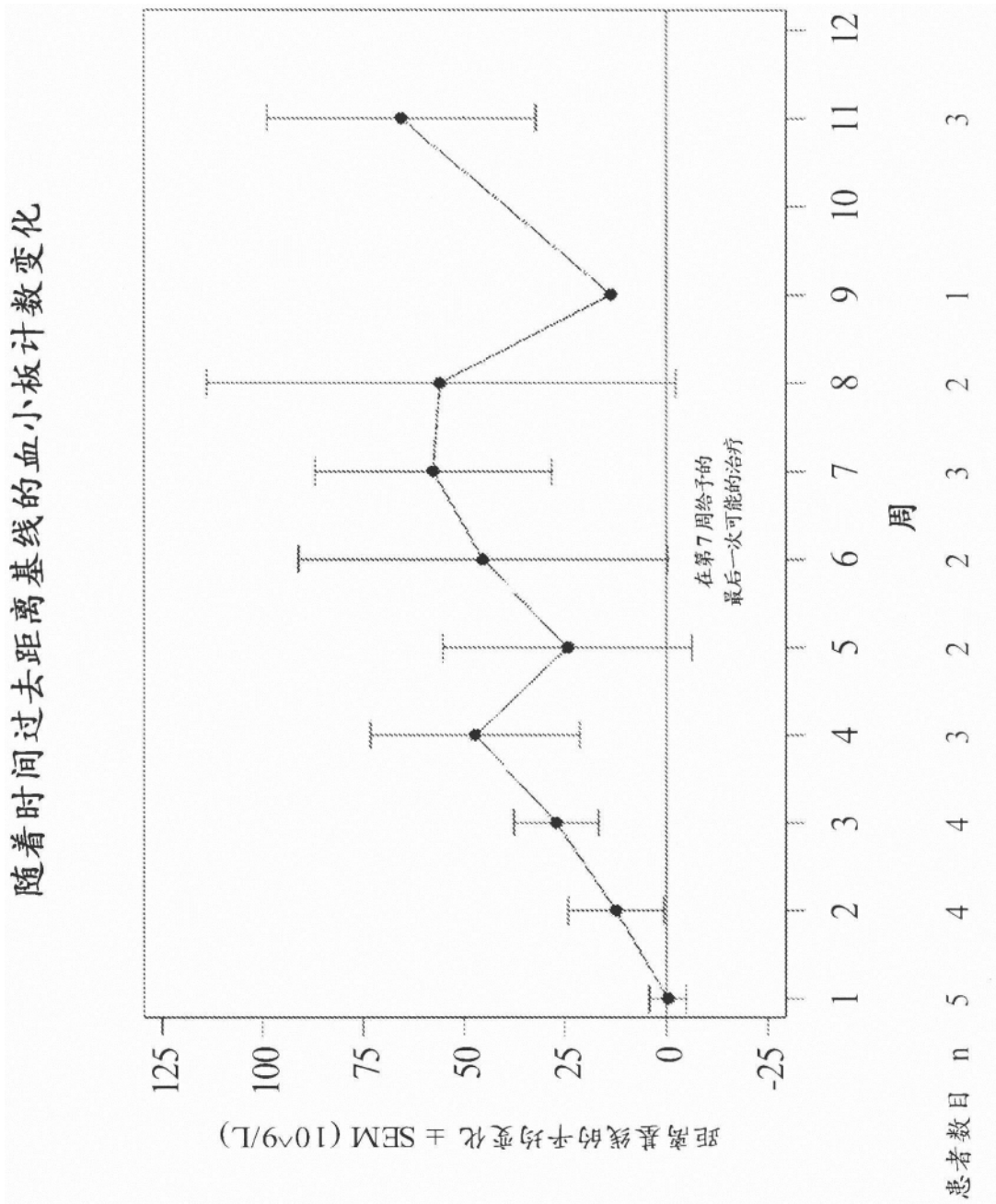


图58

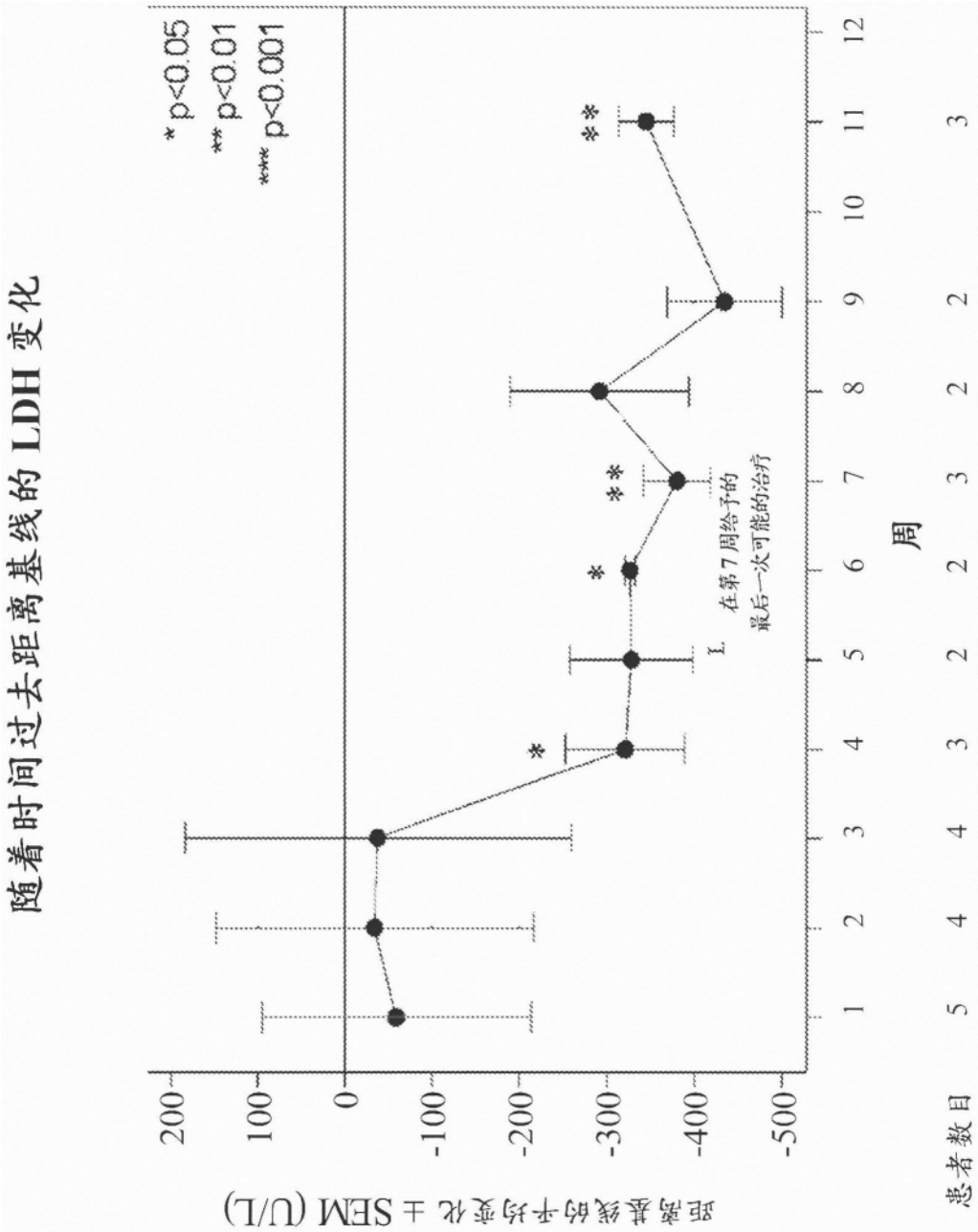


图59

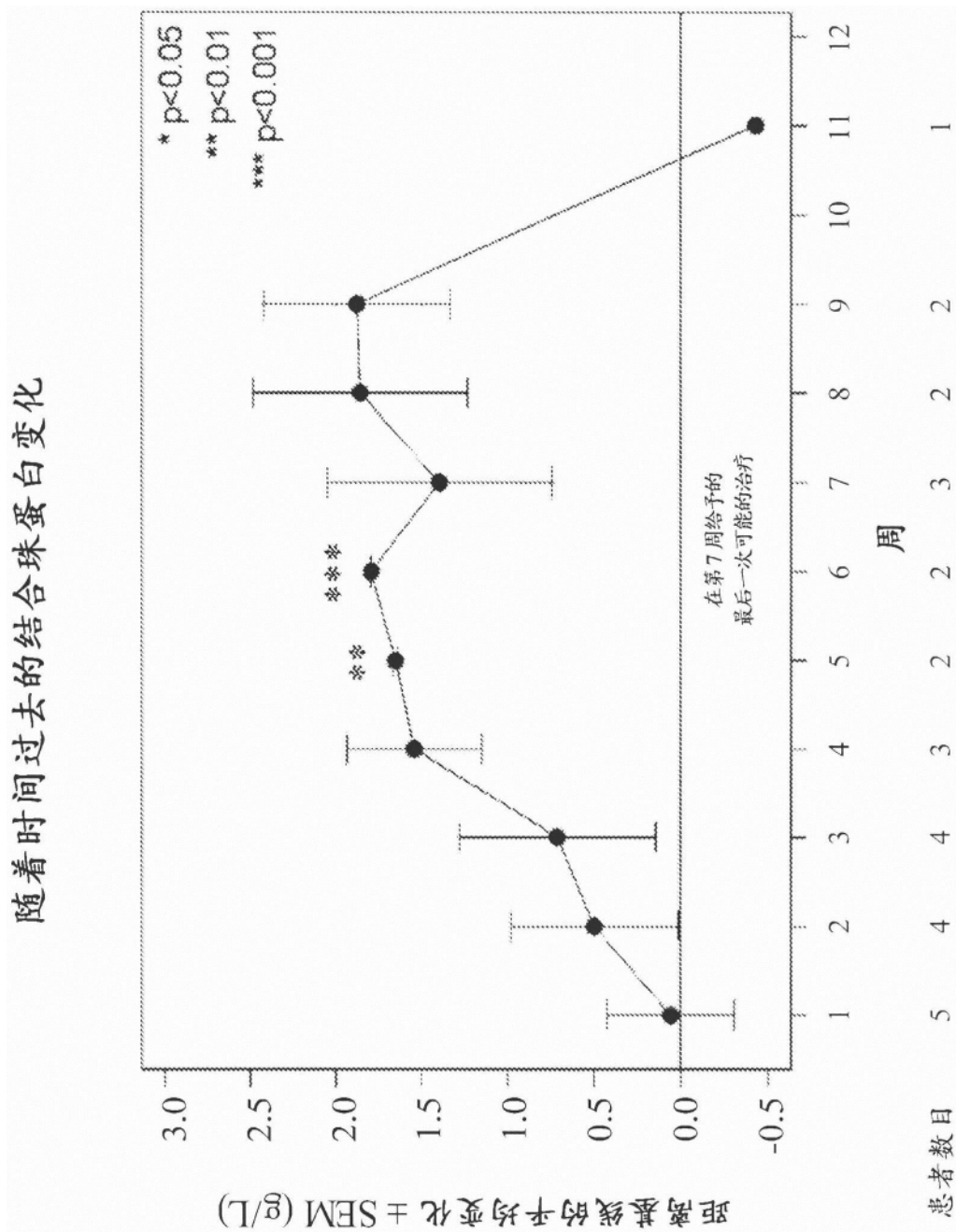


图60

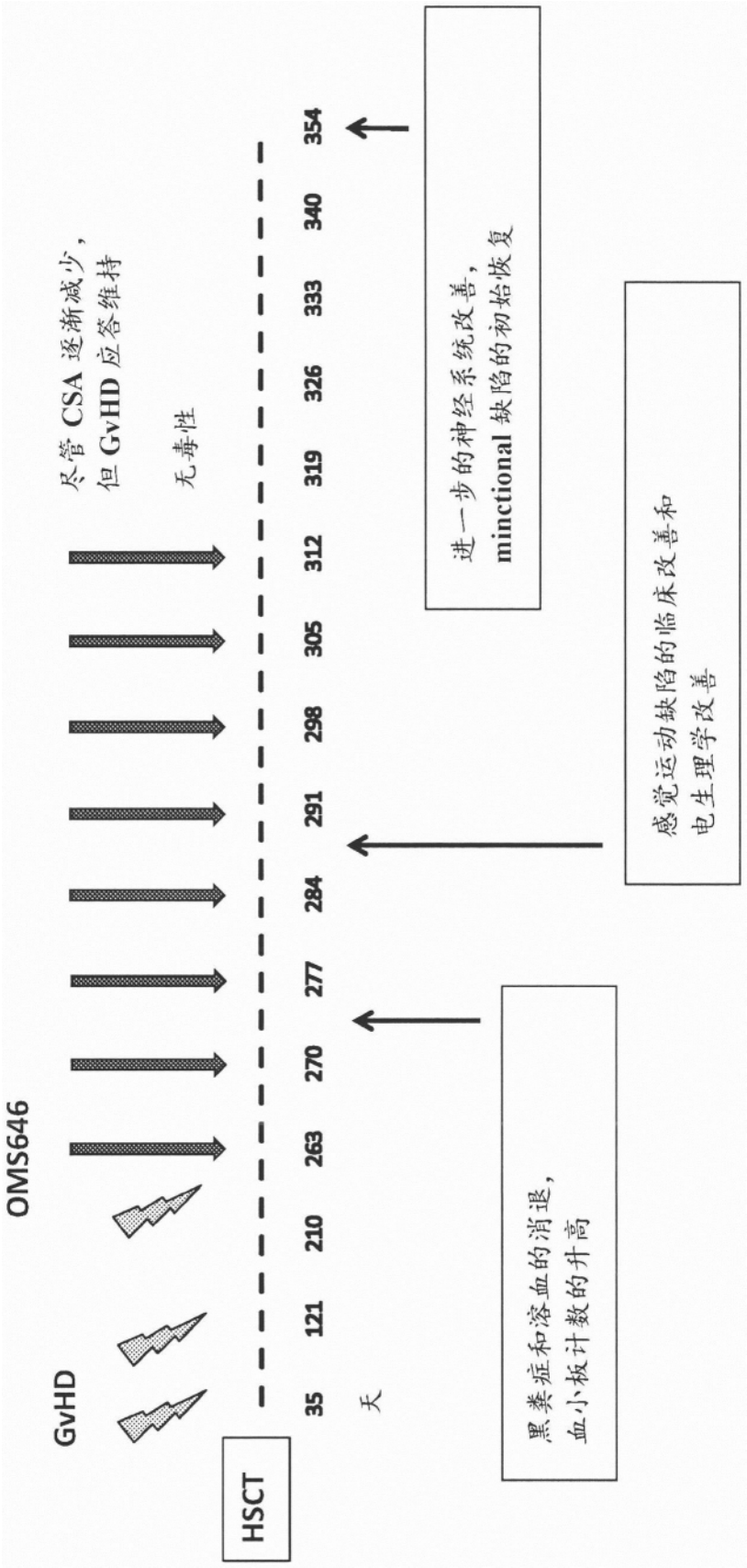


图61

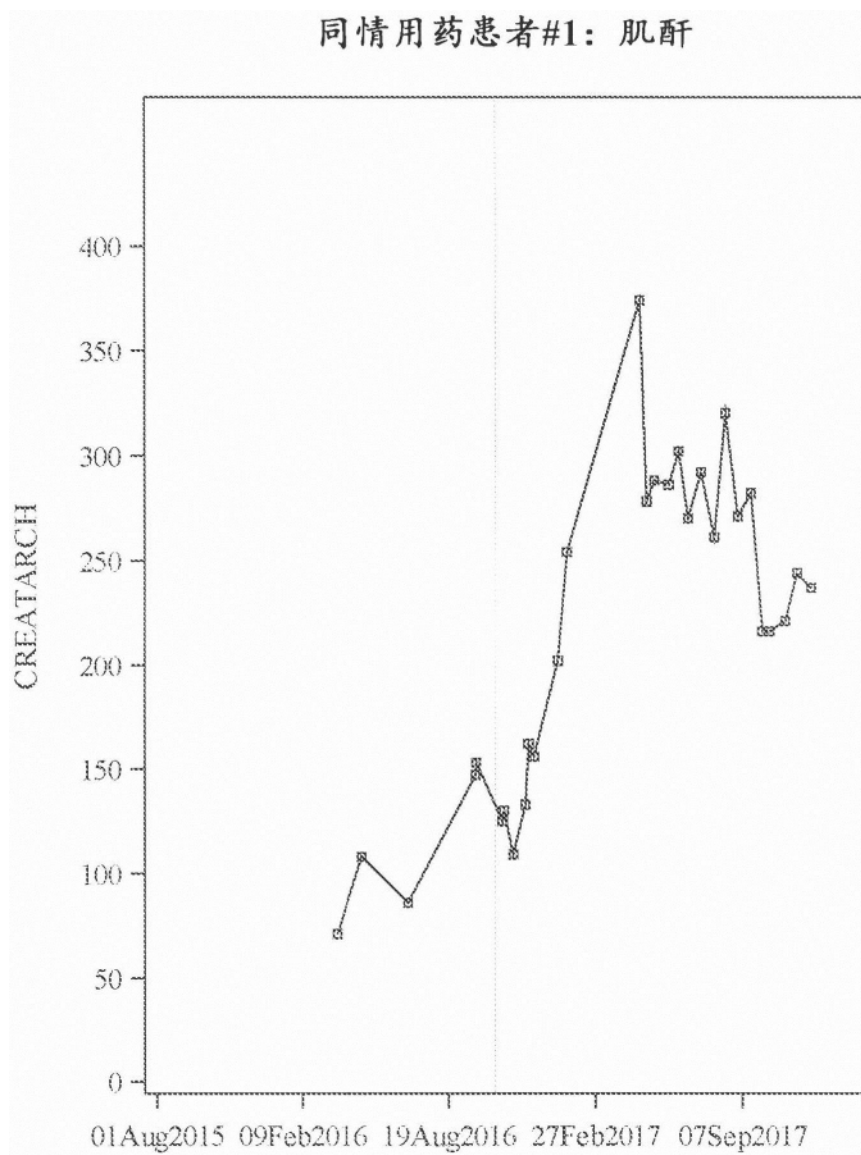


图62A

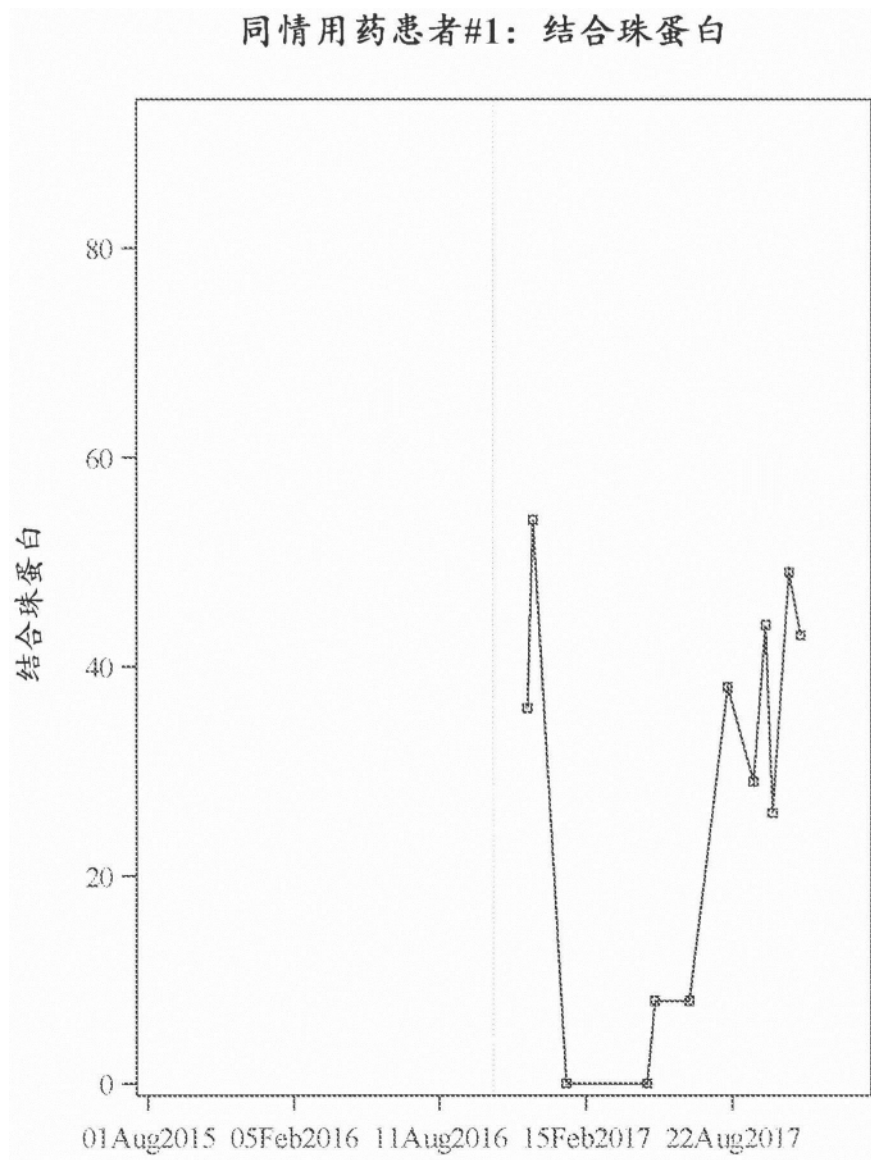


图62B

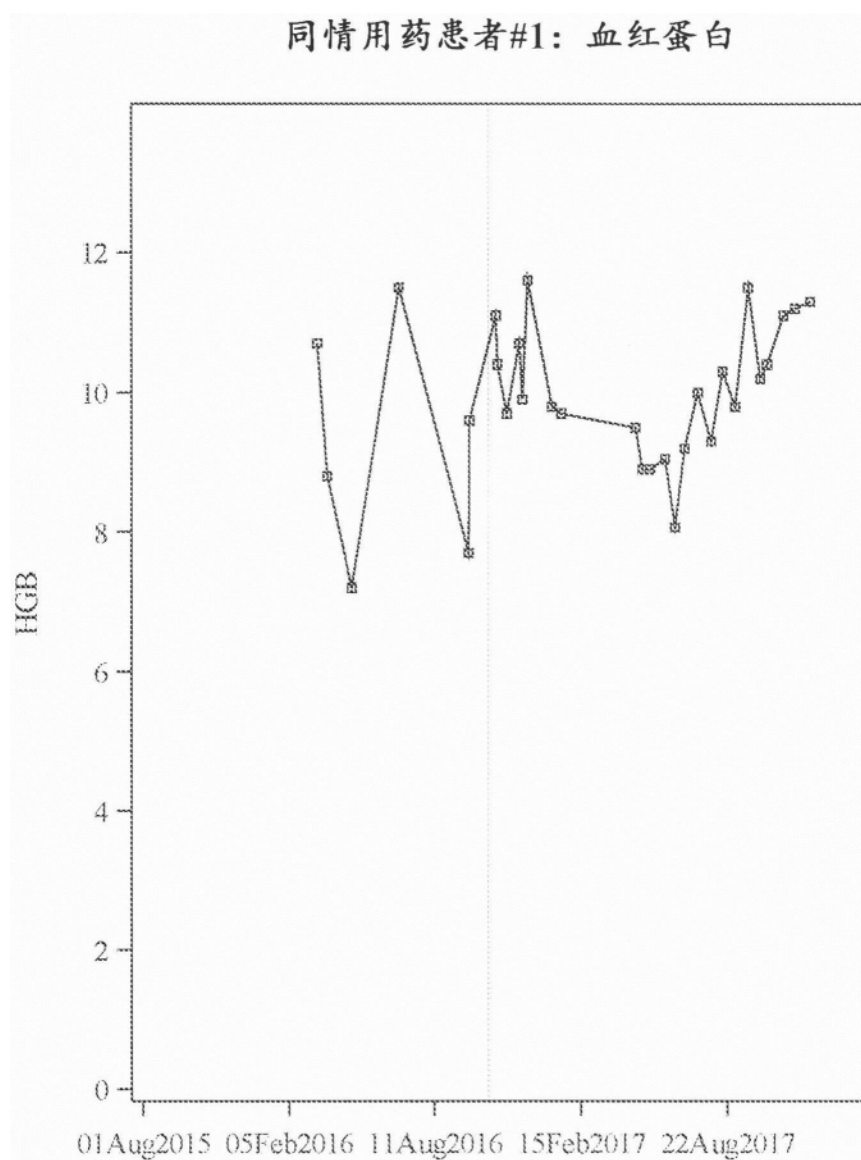


图62C

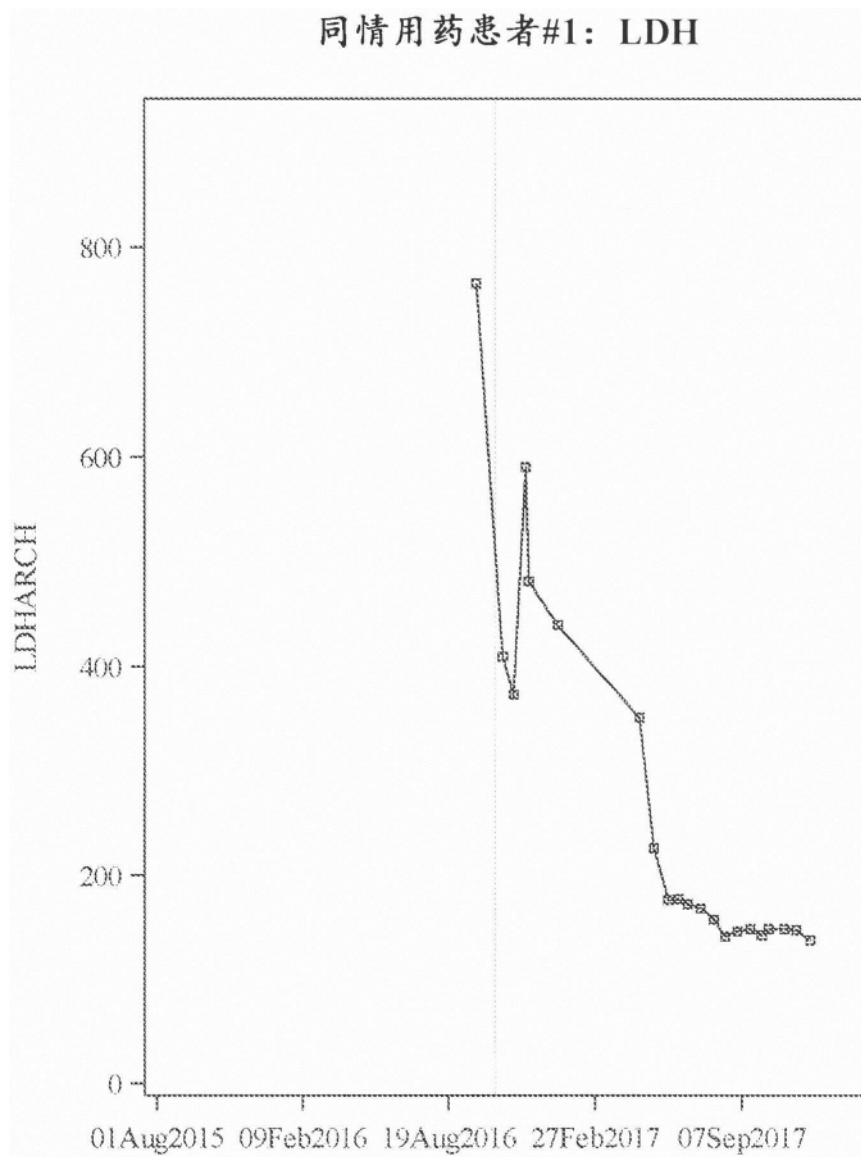


图62D

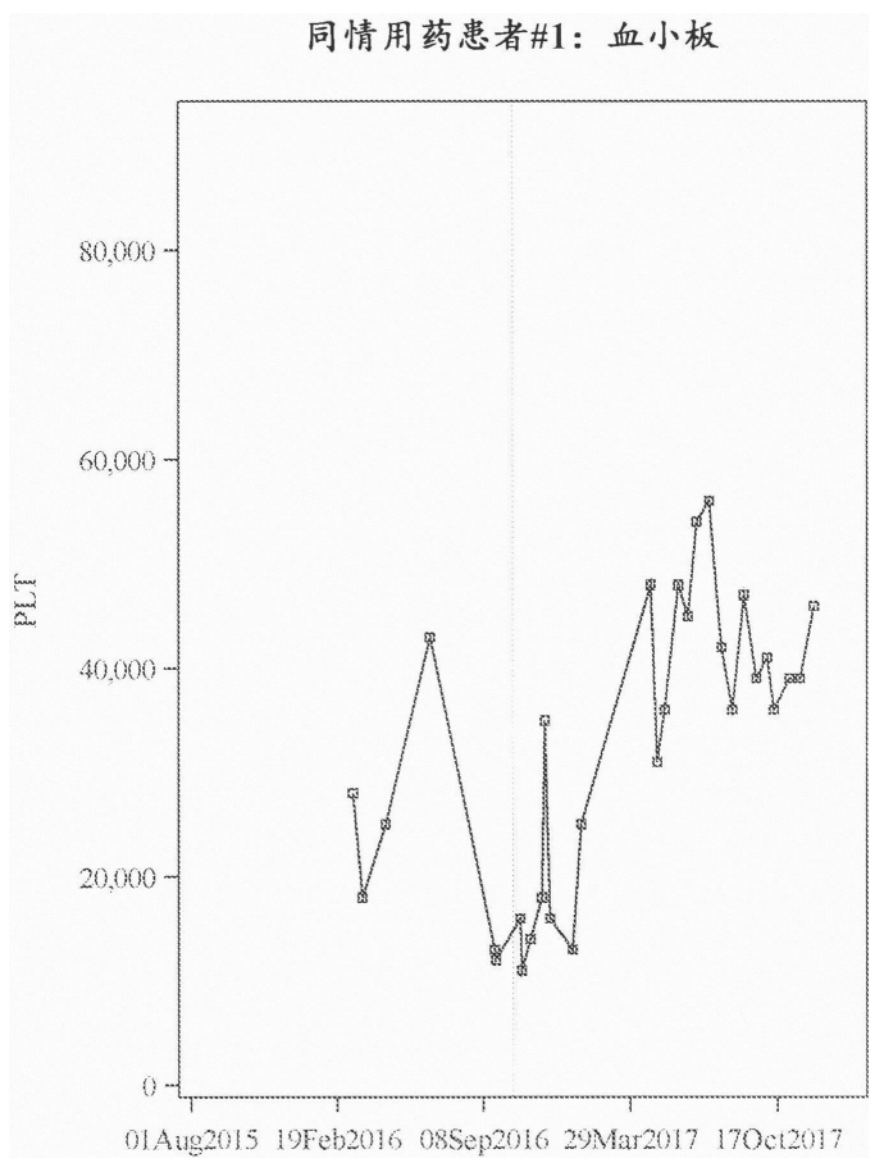


图62E