



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118436776 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 06

(21) 申请号 202410427006.0

(22) 申请日 2018.08.14

(30) 优先权数据

62/545864 2017.08.15 US

62/574690 2017.10.19 US

62/630756 2018.02.14 US

62/637281 2018.03.01 US

(62) 分案原申请数据

201880052958.1 2018.08.14

(71) 申请人 奥默罗斯公司

地址 美国华盛顿州

申请人 莱斯特大学

(72) 发明人 G·A·德莫普洛斯 T·杜德勒

H-W·施维布尔

(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 彭昶

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61P 9/14 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

权利要求书1页 说明书163页

序列表(电子公布) 附图70页

(54) 发明名称

用于治疗和/或预防弥漫性肺泡出血的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗 and/或预防弥漫性肺泡出血的方法。在一个方面,本发明提供在患有与造血干细胞移植有关的移植物抗宿主病和/或弥漫性肺泡出血和/或静脉闭塞性病的人受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的作用的方法。所述方法包括给予有需要的受试者有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的步骤。

1. MASP-2抑制性单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗患有或有风险发生弥漫性肺泡出血的人受试者的药物中的用途,其中所述MASP-2抑制性单克隆抗体基本上不抑制经典途径。

2. 权利要求1的用途,其进一步包括鉴定患有或有风险发生弥漫性肺泡出血的人受试者。

3. 权利要求1的用途,其中所述受试者之前已经历,或当前正经历,或将经历造血干细胞移植。

4. 权利要求1的用途,其中所述MASP-2抑制性单克隆抗体或其抗原结合片段包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

5. 权利要求1或4的用途,其中所述MASP-2抑制性单克隆抗体或其抗原结合片段包括(a)重链可变区,包含:i)包括SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包括SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii)包括SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和(b)轻链可变区,包含:i)包括SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包括SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包括SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3。

6. 权利要求1的用途,其中所述MASP-2抑制性单克隆抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

7. MASP-2抑制性单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗患有或有风险发生移植抗宿主病(GVHD)或静脉闭塞性病的人受试者的药物中的用途,其中所述MASP-2抑制性单克隆抗体基本上不抑制经典途径。

用于治疗 and/或预防弥漫性肺泡出血的方法

[0001] 本申请是申请日为2018年8月14日,申请号为201880052958.1,发明名称为“用于治疗 and/或预防与造血干细胞移植有关的移植物抗宿主病和/或弥漫性肺泡出血和/或静脉闭塞性病的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 关于序列表的说明

[0003] 本申请随附的序列表以文本格式代替纸质副本提供,并由此通过引用结合到本说明书中。包含序列表的文本文件的名称为MP_1_0278_PCT_SequenceListingsFiled_20180807;文本文件为116KB;创建于2018年8月7日,和经过EFS-Web随本说明书的申请一起提交。

背景

[0005] 补体系统提供在人和其它脊椎动物中起始、扩大和协调对微生物感染和其它急性损伤的免疫反应的早期作用机制(M.K.Liszewski和J.P.Atkinson,1993,Fundamental Immunology,第三版,由W.E.Paul编辑,Raven Press,Ltd.,New York)。尽管补体活化对潜在的病原体提供重要的第一线防御,但促进防护性免疫反应的补体活性也可代表对宿主的潜在威胁(K.R.Kalli等,Springer Semin.Immunopathol.15:417-431,1994;B.P.Morgan,Eur.J.Clinical Investig.24:219-228,1994)。例如,C3和C5蛋白水解产物募集和激活中性粒细胞。尽管对宿主防御是必不可少的,但激活的中性粒细胞无差别地释放破坏性的酶并可导致器官损伤。另外,补体活化可引起溶解的补体组分沉积在邻近的宿主细胞上以及微生物靶上,导致宿主细胞溶解。

[0006] 补体系统还涉及许多急性和慢性疾病状态的发病机理,包括:心肌梗死、中风、ARDS、再灌注损伤、感染性休克、热烧伤后的毛细血管渗漏、心肺分流术后的炎症、移植物排斥、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。在几乎所有的这些病况中,补体不是原因,而是涉及发病机理的数个因素之一。然而,补体活化可能是主要的病理机制和代表在许多这些疾病状态中临床控制的有效点。越来越承认在各种疾病状态中补体-介导的组织损伤的重要性,强调了对有效的补体抑制性药物的需求。迄今为止,艾库单抗(eculizumab)(Solaris®),一种针对C5的抗体,是唯一的补体-靶向药物,其已被批准用于人用。然而,C5是在补体系统中位于“下游”的数个效应分子之一,并且C5的阻断并不抑制补体系统的活化。因此,与“下游”补体抑制剂相比,补体活化的起始步骤的抑制剂将具有显著的优势。

[0007] 目前,广为接受的是,补体系统可通过三个不同的途径激活:经典途径、凝集素途径和替代途径。经典途径通常通过包含与外来颗粒(即,抗原)结合的宿主抗体的复合物触发,因此需要在先暴露于抗原以产生特异性抗体反应。因为经典途径的活化依赖于通过宿主的在的适应性免疫反应,因此经典途径是获得性免疫系统的一部分。相比之下,凝集素和替代途径两者均不依赖于适应性免疫,并且是先天性免疫系统的一部分。

[0008] 补体系统的活化导致丝氨酸蛋白酶原的序贯活化。经典途径活化的第一步骤是特定的识别分子C1q与抗原-结合的IgG和IgM分子的结合。C1q与C1r和C1s丝氨酸蛋白酶酶

原作为称为C1的复合物缔合。在C1q与免疫复合物结合后,C1r的Arg-Ile位点的自体蛋白水解裂解之后是C1r-介导的C1s的裂解和活化,其由此需要裂解C4和C2的能力。C4被裂解成两个片段,称为C4a和C4b,并且类似地,C2被裂解成C2a和C2b。C4b片段能够与邻近的羟基或氨基形成共价键和通过与激活的C2的C2a片段的非共价相互作用产生C3转化酶(C4b2a)。C3转化酶(C4b2a)通过蛋白水解裂解成C3a和C3b亚组分来激活C3,导致产生C5转化酶(C4b2a3b),其通过裂解C5导致形成膜攻击复合物(与C6、C7、C8和C-9组合的C5b,亦称为“MAC”),其可破坏细胞膜,导致细胞溶解。激活形式的C3和C4(C3b和C4b)共价地沉积在外来靶标表面上,其被多个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活化的第一步骤也是特定的识别分子的结合,其之后是缔合的丝氨酸蛋白酶酶原的活化。然而,不是通过C1q的免疫复合物的结合,凝集素途径中的识别分子包括一组糖-结合蛋白(甘露聚糖-结合凝集素(MBL)、H-纤维胶凝蛋白(H-ficolin)、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,Biochim.Biophys.Acta

[0010] 1572:387-400,(2002);Holmskov等,Annu.Rev.Immunol.21:547-578(2003);Teh等,Immunology 101:225-232(2000)。还参见J.Luet等,Biochim BiophysActa 1572:387-400(2002);Holmskov等,Annu Rev Immunol 21:547-578(2003);Teh等,Immunology 101:225-232(2000);Hansen等,J.Immunol 185(10):6096-6104(2010)。

[0011] Ikeda等首先证实,像C1q一样,在以C4-依赖性方式结合至酵母甘露聚糖-包被的红细胞时,MBL能够激活补体系统(Ikeda等,J.Biol.Chem.262:7451-7454,(1987))。MBL,胶原凝集素蛋白家族的一个成员,是钙-依赖性凝集素,其结合具有位于吡喃糖环的赤道面中的3-和4-羟基的糖。因此,MBL的主要配体是D-甘露糖和N-乙酰基-D-葡萄糖胺,而不适应该立体要求的糖具有对MBL不可检出的亲和力(Weis等,Nature 360:127-134,(1992))。MBL和单价糖之间的相互作用非常弱,解离常数通常在单位数毫摩尔范围内。通过亲合力,即通过同时与彼此紧密靠近的多个单糖残基相互作用,MBL实现与聚糖配体紧密的特异性结合(Lee等,Archiv.Biochem.Biophys.299:129-136,(1992))。MBL识别通常装饰微生物例如细菌、酵母、寄生虫和某些病毒的糖模式。相比之下,MBL不识别D-半乳糖和唾液酸,次末端和末端的糖,其通常装饰在哺乳动物血浆和细胞表面糖蛋白上存在的“成熟的”复杂糖缀合物。认为该结合特异性促进“外来”表面的识别和有助于保护免于“自-活化”。然而,MBL以高亲和力结合至在哺乳动物细胞的内质网和高尔基体中隔离的N-连接的糖蛋白和糖脂上的高-甘露糖“前体”聚糖簇(Maynard等,J.Biol.Chem.257:3788-3794,(1982))。因此,损坏的细胞是经过MBL结合的凝集素途径活化的潜在靶标。

[0012] 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⁺⁺-非依赖性的方式结合糖残基。在人中,已经鉴定了三类纤维胶凝蛋白(L-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白)。两类血清纤维胶凝蛋白,L-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白,共同具有对N-乙酰基-D-葡萄糖胺的特异性;然而,H-纤维胶凝蛋白还结合N-乙酰基-D-半乳糖胺。L-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白、CL-11和MBL的糖特异性的差异意味着通过交错的糖缀合物,不同的凝集素可以是互补的和靶标不同的。这一概念得到了最近报道的支持,即,在凝集素途径的已知凝集素中,仅L-纤维胶凝蛋白特异性结合至脂磷壁酸,一种在所有革兰氏阳性细菌上存在的细胞壁糖缀合物(Lynch等,

J. Immunol.

[0013] 172:1198-1202, (2004))。胶原凝集素(即,MBL)和纤维胶凝蛋白在氨基酸序列中具有不显著的相似性。然而,这两类蛋白具有相似的结构域组织,并且像C1q一样,装配成寡聚体结构,其使多位点结合的可能性最大化。

[0014] MBL的血清浓度在健康群体中高度可变,这在遗传上受到MBL基因的启动子和编码区中的多态性/突变控制。作为急性期蛋白,MBL的表达还在炎症期间被增量调节。L-纤维胶凝蛋白以类似于MBL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臂相当。MBL和纤维胶凝蛋白也可作为调理素起作用,其允许吞噬细胞靶向MBL-和纤维胶凝蛋白-装饰的表面(参见Jack等,JLeukoc Biol.,77(3):328-36(2004),Matsushita和Fujita,Immunobiology,205(4-5):490-7(2002),Aoyagi等,JImmunol,174(1):418-25(2005)。这种调理素作用需要这些蛋白与吞噬细胞受体的相互作用(Kuhlman等,J.Exp.Med.169:1733,(1989);Matsushita等,J.Biol.Chem.271:2448-54,(1996)),其身份尚未确定。

[0015] 人MBL通过其胶原-样结构域与独特的C1r/C1s-样丝氨酸蛋白酶(称为MBL-相关丝氨酸蛋白酶(MASP))形成特异性和高-亲和力相互作用。迄今为止,描述了三种MASP。首先,单一酶“MASP”被鉴定和表征为负责补体级联起始(即,裂解C2和C4)的酶(Matsushita等,JExp Med 176(6):1497-1502(1992);Ji等,J.Immunol.150:571-578,

[0016] (1993))。随后确定MASP活性事实上是两种蛋白酶的混合物:MASP-1和MASP-2(Thiel等,Nature 386:506-510,(1997))。然而,已证实MBL-MASP-2复合物单独足以补体活化(Vorup-Jensen等,J.Immunol.165:2093-2100,(2000))。此外,MASP-2单独以高速裂解C2和C4(Ambrus等,J.Immunol.170:1374-1382,(2003))。因此,MASP-2是负责活化C4和C2以产生C3转化酶C4b2a的蛋白酶。这与经典途径的C1复合物显著不同,在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活化。另外,第三种新的蛋白酶MASP-3已经分离(Dahl,M.R.等,Immunity 15:127-35,2001)。MASP-1和MASP-3是相同基因的可变剪接产物。

[0017] MASP与C1复合物的酶组分C1r和C1s共有相同的结构域组织(Sim等,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。如在C1蛋白酶中,MASP-2的活化通过裂解邻近丝氨酸蛋白酶结构域的Arg-Ile键发生,这将所述酶分成二硫键连接的A和B链,后者由丝氨酸蛋白酶结构域组成。

[0018] MBL还可与MASP-2的可变剪接形式缔合,称为19kDa的MBL-相关蛋白(MAp19)或小MBL-相关蛋白(sMAP),其缺少催化活性MASP2(Stover,J.Immunol.162:3481-90,(1999);Takahashi等,Int.Immunol.11:859-863,(1999))。MAp19包括MASP-2的起始两个结构域,接着是四个独特氨基酸的额外序列。Map19的功能尚不清楚(Degn等,JImmunol.Methods,2011)。MASP-1和MASP-2基因分别位于人第3和1号染色体上(Schwaebler等,Immunobiology [0019] 205:455-466,(2002))。

[0020] 若干条证据表明,存在不同的MBL-MASP复合物和在血清中大部分的MASP不与MBL复合(Thiel等,J.Immunol.165:878-887,

[0021] (2000))。H-和L-纤维胶凝蛋白两者均结合所有的MASP和激活凝集素补体途径,如MBL一样(Dahl等,Immunity 15:127-35, (2001));

[0022] Matsushita等,J.Immunol.168:3502-3506, (2002))。凝集素和经典途径两者形成共同的C3转化酶(C4b2a),这两个途径在该步骤处汇合。

[0023] 广泛认为在首次感染的宿主中,凝集素途径在宿主防御感染方面具有重要作用。MBL参与宿主防御的有力证据来自功能MBL的血清水平降低的患者的分析(Kilpatrick, Biochim.Biophys.

[0024] Acta1572:401-413, (2002))。这样的患者显示对复发细菌和真菌感染的易感性。在生命的早期,因为母体来源的抗体滴度减弱,在易损性的表观窗口期间,但在抗体反应的完全库发展之前,这些症状通常是明显的。该综合征经常因为MBL的胶原部分的数个位点的突变导致,其干扰MBL寡聚体的正确形成。然而,因为MBL可起不依赖于补体的调理素的作用,尚不清楚对感染的易感性增加归因于受损的补体活化的程度。

[0025] 与经典和凝集素途径相反,未发现替代途径的引发剂实现C1q和凝集素在其它两个途径中进行的识别功能。目前广泛公认的是,替代途径自发地经历低水平的更新活化(turnover activation),其可容易地在外来或其它异常表面(细菌、酵母、病毒感染的细胞或受损组织)上被放大,所述表面缺少控制自发补体活化的适当分子元件。存在四种血浆蛋白直接参与替代途径的活化:C3、因子B和D、和备解素。

[0026] 尽管广泛的证据表明在非感染性人类疾病的发病机理中牵涉到经典和替代补体途径两者,但凝集素途径的作用仅刚开始评估。最近的研究提供了凝集素途径的活化可能是在缺血/再灌注损伤中补体活化和相关炎症的原因的证据。Collard等(2000)报道了经受氧化应激的培养的內皮细胞结合MBL和在暴露于人血清时显示C3沉积(Collard等, Am.J.Pathol.156:1549-1556, (2000))。另外,用封闭性抗-MBL单克隆抗体处理人血清抑制MBL结合和补体活化。这些发现延伸到心肌缺血-再灌注的大鼠模型,其中与用对照抗体处理的大鼠相比,用针对大鼠MBL的封闭性抗体处理的大鼠显示在冠状动脉阻塞后显著较低的心肌损伤(Jordan等,Circulation 104:1413-1418,

[0027] (2001))。在氧化应激后MBL与血管內皮结合的分子机制尚不清楚;最近的研究表明在氧化应激后凝集素途径的活化可通过MBL结合血管內皮细胞角蛋白和不结合糖缀合物而被介导(Collard等, Am.J.Pathol.159:1045-1054, (2001))。其它研究在缺血/再灌注损伤的发病机理中牵涉到经典和替代途径,并且凝集素途径在该疾病中的作用仍有争议(Riedermann,N.C.等, Am.J.Pathol.162:363-367, 2003)。

[0028] 最近的研究表明,需要MASP-1(和可能还有MASP-3)以将替代途径活化酶因子D从其酶原形式转化成其酶活性形式(参见Takahashi M.等, JExp Med207(1):29-37 (2010))。该过程的生理学重要性通过在MASP-1/3-缺陷小鼠的血浆中缺少替代途径功能活性来说明。从天然C3蛋白水解产生C3b对于替代途径发挥功能是必需的。因为替代途径C3转化酶(C3bBb)包含C3b作为基本亚基,关于经过替代途径的第一C3b的来源的疑问提出了令人困扰的问题和引起了大量的研究。

[0029] C3属于包含罕见的称为硫酯键的翻译后修饰的蛋白(以及C4和 α -2巨球蛋白)的家族。硫酯基团包含谷氨酰胺,其末端羰基与远离三个氨基酸的半胱氨酸的巯基形成共价硫酯键。该键是不稳定的和亲电子谷氨酰胺基-硫酯可与亲核部分例如羟基或氨基反应,因此与

其它分子形成共价键。当隔离在完整C3的疏水袋内时,硫酯键是相当稳定的。然而,C3蛋白水解裂解成C3a和C3b导致高反应性硫酯键暴露在C3b上,并且在包括羟基或氨基的邻近部分亲核攻击后,C3b变成与靶标共价地连接。除了其在C3b与补体靶标共价连接中的充分证明的作用之外,还认为C3硫酯在触发替代途径中具有关键的作用。根据广泛公认的“tick-over理论”,替代途径通过产生液相转化酶iC3Bb而开始,其自具有水解的硫酯的C3(iC3;C3(H₂O))和因子B形成(Lachmann,P.J.等,SpringerSemin.Immunopathol.7:143-162,[0030] (1984))。C3b-样C3(H₂O)通过蛋白的内部硫酯的缓慢自发水解,自天然C3产生(Pangburn,M.K.等,J.Exp.Med.154:856-867,1981)。通过C3(H₂O)Bb转化酶的活性,C3b分子沉积在靶标表面上,从而引发替代途径。

[0031] 关于替代途径的活化的引发剂了解甚少。认为激活剂包括酵母细胞壁(酵母聚糖)、许多纯的多糖、兔红细胞、某些免疫球蛋白、病毒、真菌、细菌、动物肿瘤细胞、寄生虫和受损的细胞。这些激活剂共同的唯一特征是存在糖,但糖结构的复杂性和多样性使得其难以建立共有的被识别的分子决定簇。广泛公认的是,替代途径活化通过在该途径的抑制性调节组分(例如因子H、因子I、DAF和CR1以及作为替代途径的唯一正调节剂的备解素)之间的精细平衡得到控制(参见Schwaebble W.J.和Reid K.B.,Immunol Today 20(1):17-21(1999))。

[0032] 除了上述明显未调节的活化机制之外,替代途径还可为凝集素/经典途径C3转化酶(C4b2a)提供有力的扩增环,因为产生的任何C3b可与因子B一起参与形成另外的替代途径C3转化酶(C3bBb)。替代途径C3转化酶通过结合备解素而稳定。备解素延长替代途径C3转化酶的半寿期6-10倍。将C3b添加至替代途径C3转化酶导致形成替代途径C5转化酶。

[0033] 认为所有三个途径(即,经典、凝集素和替代)在C5处汇合,其经裂解形成具有多种促炎效应的产物。汇合的途径被称为末端补体途径。C5a是最有效的过敏毒素,诱发平滑肌和血管紧张度以及血管通透性的改变。它也是有力的化学吸引素以及中性粒细胞和单核细胞的活化剂。C5a-介导的细胞活化可通过诱导释放多种另外的炎性介质,包括细胞因子、水解酶、花生四烯酸代谢物和活性氧物质,显著放大炎性反应。C5裂解导致形成C5b-9,亦称为膜攻击复合物(MAC)。现在存在有力的证据表明,除了其作为溶解孔-形成复合物的作用之外,亚溶解的(sublytic)MAC沉积还可在炎症中起重要作用。

[0034] 除了其在免疫防御中的基本作用之外,在许多临床条件下补体系统还有助于组织损伤。因此,对开发治疗上有效的补体抑制剂以预防这些不良作用存在迫切的需要。

[0035] 简述

[0036] 提供本简述,以简单的形式介绍所选择的概念,其在下文的详细描述中进一步描述。本简述不意欲鉴别所要求保护的的主题的关键特征,也不意欲用作确定所要求保护的的主题的范围的辅助。

[0037] 在一个方面,本发明提供在患有血栓性微血管病(TMA)的受试者中抑制微血管内皮细胞损伤和/或血栓形成的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一些实施方案中,所述受试者患有或有风险发生选自溶血性尿毒综合征(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)和非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的TMA。在一些实施方案中,在给予组合物之前,所述受试者被确定显示选自以下的一个或多个症状:(i)贫血、(ii)血小板减少、(iii)肾功能不全和(iv)肌酸酐升高,和所

述组合物以改进所述一个或多个症状的有效量和足够时间给予。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂是抗-MASP-2抗体或其片段。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂是特异性结合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂抑制微血管内皮细胞损伤。

[0038] 在另一方面,本发明提供在患有或有风险发生非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物。在一个实施方案中,在给予组合物之前,所述受试者被确定显示选自以下的一个或多个症状:(i)贫血、(ii)血小板减少、(iii)肾机能不全和(iv)肌酸酐升高,和所述组合物以改进所述一个或多个症状的有效量和足够时间给予。在一个实施方案中,所述受试者患有或有风险发生非-因子H依赖性aHUS。在一个实施方案中,所述受试者患有与因子I、因子B或膜辅因子CD46相关的aHUS。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂是特异性结合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗体或其片段,例如抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制微血管内皮细胞损伤。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制血栓形成。

[0039] 在另一方面,本发明提供减少有风险发生非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的受试者将患有与aHUS有关的临床症状的可能性的方法。根据本发明的该方面的方法包括:(a)在已知与aHUS有关的受试者中确定遗传标记的存在;(b)定期监测所述受试者以确定选自贫血、血小板减少、肾机能不全和肌酸酐升高的至少一种症状的存在与否;和(c)在确定贫血、血小板减少、肾机能不全或肌酸酐升高的至少之一存在时,给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物,其中所述组合物以改进所述一个或多个症状的有效量和足够时间给予。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂是特异性结合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗体或其片段,例如抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在所述方法的一个实施方案中,步骤(a)包括对获自所述受试者的样品进行遗传筛选试验和鉴定在选自补体因子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)、抗凝血蛋白凝血调节蛋白(THBD)、补体因子H-相关蛋白3(CFHR3)和补体因子H-相关蛋白4(CFHR4)的基因中与aHUS有关的至少一种遗传标记的存在。在一个实施方案中,所述方法进一步包括监测所述受试者已知与触发aHUS临床症状有关的事件的发生,和在触发事件发生之前、期间或之后,给予所述受试者包含MASP-2抑制剂的组合物。在一个实施方案中,与触发aHUS临床症状有关的事件选自药物暴露、感染、恶性肿瘤、损伤、器官或组织移植和妊娠。在一个实施方案中,感染是细菌感染。在一个实施方案中,组合物经皮下给予。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制微血管内皮细胞损伤。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制血栓形成。

[0040] 在另一方面,本发明提供在患有或有风险发生感染继发的非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物。在一个实施方案中,所述受试者患有或有风险发生与肺炎链球菌(*S. pneumonia*)感染有关的非肠道aHUS。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂是特异性结合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗体或其片段,例如抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制微血管内皮细胞损伤。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制血栓形成。

[0041] 在另一方面,本发明提供治疗患有非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物,其中MASP-2抑制剂通过静脉内导管或其它导管递送方法给予。在一个实施方案中,所述方法进一步包括用血浆去除术治疗患者。在一个实施方案中,在不存在血浆去除术时给予包含MASP-2抑制剂的组合物。在一个实施方案中,包含MASP-2抑制剂的组合物通过导管给予第一段时间,进一步包括给予包含MASP-2抑制剂的组合物第二段时间,其中组合物在第二段时间期间经皮下给予。在一个实施方案中,所述方法进一步包括定期测定至少一种补体因子的水平,其中与标准值或健康受试者相比,测定至少一种补体因子的水平降低指示需要继续用组合物治疗。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂是特异性结合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗体或其片段,例如抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制微血管内皮细胞损伤。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制血栓形成。

[0042] 在另一方面,本发明提供治疗患有血栓性血小板减少性紫癜(TTP)或显示与TTP的诊断一致的症状的受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物,其中MASP-2抑制剂通过静脉内导管或其它导管递送方法给予所述受试者。在一个实施方案中,所述受试者显示选自中枢神经系统受累、血小板减少、严重的心脏受累、严重的肺受累、胃肠梗塞和坏疽的至少一个或多个症状。在一个实施方案中,所述受试者对ADAMTS13的抑制剂的存在测试阳性,和所述方法进一步包括给予受试者免疫抑制剂。在一个实施方案中,在不存在血浆去除术时给予包含MASP-2抑制剂的组合物第一段时间。在一个实施方案中,所述受试者对ADAMTS-13的抑制剂的存在测试阳性,和所述方法进一步包括给予ADAMTS-13。在一个实施方案中,所述方法进一步包括用血浆去除术治疗患者。在一个实施方案中,包含MASP-2抑制剂的组合物在存在血浆去除术时给予。在一个实施方案中,包含MASP-2抑制剂的组合物通过导管给予第一段时间,进一步包括给予包含MASP-2抑制剂的组合物第二段时间,其中在第二段时间期间组合物经皮下给予。在一个实施方案中,所述方法进一步包括定期测定至少一种补体因子的水平,其中与标准值或健康受试者相比,测定至少一种补体因子的水平降低指示需要继续用组合物治疗。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂是特异性结合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗体或其片段,例如抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制微血管内皮细胞损伤。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制血栓形成。

[0043] 在另一方面,本发明提供治疗患有难治性血栓性血小板减少性紫癜(TTP)的受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物。在一个实施方案中,组合物经皮下给予。在一个实施方案中,所述方法进一步包括定期测定至少一种补体因子的水平,其中与标准值或健康受试者相比,测定至少一种补体因子的水平降低指示需要继续用组合物治疗。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂是特异性结合SEQ ID NO:6的一部分的抗-MASP-2抗体或其片段,例如抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制微血管内皮细胞损伤。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂抑制血栓形成。

[0044] 在另一个方面中,本发明提供在患有或有风险发生血栓性微血管病(TMA)的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法,其中TMA是以下的至少一种:(i) 癌症继发性TMA;(ii) 化学疗法继发性TMA;或(iii) 移植继发性TMA,包括给予受试者包含有效抑制MASP-2-

依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物。在一些实施方案中,所述受试者患有或有风险发生癌症继发性TMA,和MASP-2抑制剂以有效降低发生TMA的风险或减少TMA的严重性的量系统性给予所述受试者。在一些实施方案中,所述受试者患有或有风险发生化学疗法继发性TMA,和MASP-2抑制剂在化学疗法之前、期间或之后以有效降低发生TMA的风险或减少TMA的严重性的量系统性给予所述受试者。在一些实施方案中,所述受试者患有或有风险发生移植继发性TMA,和MASP-2抑制剂在移植程序之前、期间或之后以有效降低发生TMA的风险或减少TMA的严重性的量系统性给予所述受试者。在一些实施方案中移植程序是同种异体造血干细胞移植。在一些实施方案中,所述受试者先前已经经历或目前正在经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂的治疗。在一些实施方案中,所述方法还包括给予受试者抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂,例如人源化的抗-C5抗体或其抗原结合片段,例如艾库组单抗。

[0045] 在另一方面,本发明提供在患有或有风险发生Upshaw-Schulman综合征(USS)的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法,包括给予受试者包含有效抑制MASP-2依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物。在一些实施方案中,所述方法包括治疗有风险发生USS的受试者,其中所述方法包括给予一定量的MASP-2抑制剂一段时间,其有效改善或预防与TTP有关的一个或多个临床症状。在一些实施方案中,所述方法还包括周期性地监测所述受试者和在存在已知与触发TTP临床症状有关的事件时给予MASP-2抑制剂。在一些实施方案中,所述方法还包括周期性地监测所述受试者和在确定存在贫血、血小板减少症或肌酸上升时给予MASP-2抑制剂。在一些实施方案中,所述受试者先前已经经历或目前正在经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂治疗。在一些实施方案中,所述方法还包括给予受试者抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂,例如人源化的抗-C5抗体或其抗原结合片段,例如艾库组单抗。

[0046] 在另一方面,本发明提供在患有德戈斯病(Degos病)的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法,包括给予受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物。在一些实施方案中,所述受试者先前已经经历或目前正在经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂的治疗。在一些实施方案中,所述方法还包括给予受试者抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂,例如人源化的抗-C5抗体或其抗原结合片段,例如艾库组单抗。

[0047] 在另一方面,本发明提供在患有灾难性抗磷脂综合征(CAPS)的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法,包括给予受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物。在一些实施方案中,所述受试者先前已经经历或目前正在经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂的治疗。在一些实施方案中,所述方法还包括给予受试者抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂,例如人源化的抗-C5抗体或其抗原结合片段,例如艾库组单抗。

[0048] 在本发明公开的任何方法的一些实施方案中,MASP-2抑制剂是MASP-2抑制性抗体或其片段。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体具有减少的效应器功能。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体基本上不抑制经典途径。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂是抗-MASP-2单克隆抗体或其片段,其特异性结合SEQ ID NO:6的一部分。在一些实施方案中,抗-MASP-2抗体或其片段选自重组抗体、具有降低的效应器功能的抗体、嵌合抗体、人源化的抗

体和人抗体。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗体片段。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体是单链分子。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体选自IgG1分子、IgG2和IgG4分子。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体是包括S228P突变的IgG4分子。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体结合人MASP-2的KD为10nM或更小。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位。在一些实施方案中,在体外测定法中在1%人血清中MASP-2抑制性抗体以10nM或更小的IC50抑制C3b沉积。在一些实施方案中,在90%人血清中MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的IC50抑制C3b沉积。

[0049] 在本发明公开的任何方法的一些实施方案中,MASP-2抑制性单克隆抗体或其抗原结合片段包括:(a)重链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii)包含SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和(b)轻链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3。在一些实施方案中,MASP-2抑制性单克隆抗体包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段特异性地识别由参考抗体所识别的表位的至少一部分,所述参考抗体包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[0050] 在本发明的另一方面,提供在患有非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体抑制在来自患有aHUS的受试者的血清中的血栓形成达至少40%。

[0051] 在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体以比其对来自同一受试者的血清中的C5b-9沉积的抑制作用高至少20%(例如,高至少30%,高至少40%或高至少50%)的水平抑制在来自患有aHUS的受试者的血清中的血栓形成。在一些实施方案中,所述受试者处于aHUS的急性期。在一些实施方案中,所述受试者处于aHUS的缓解期。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体是单克隆抗体或其片段,其特异性结合SEQ ID NO:6的一部分。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其片段选自重组抗体、具有降低的效应器功能的抗体、嵌合抗体、人源化的抗体和人抗体。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗体片段。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体是单链分子。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体选自IgG1分子、IgG2和IgG4分子。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体是包括S228P突变的IgG4分子。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体结合人MASP-2的KD是10nM或更小。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位。在一些实施方案中,在体外测定法中在1%人血清中MASP-2抑制性抗体以10nM或更小的IC50抑制C3b沉积。在一些实施方案中,在90%人血清中MASP-2抑制性抗体以30nM或更小的IC50抑制C3b沉积。在一些实施方案中MASP-2抑制性单克隆抗体或其抗原结合片段包括:(a)重链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii)包含SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和(b)轻链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:70的24-34

的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3。在一些实施方案中,MASP-2抑制性单克隆抗体包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段特异性地识别由参考抗体所识别的表位的至少一部分,所述参考抗体包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[0052] 在另一方面,本发明提供治疗患有血浆疗法抵抗性aHUS的受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是特异性结合人MASP-2的抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,抗体或其片段选自重组抗体、具有降低的效应器功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中,所述受试者之前已经历,或目前正经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂治疗,例如其中末端补体抑制剂是人源化抗-C5抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,所述方法进一步包括用血浆去除术治疗患者。在一个实施方案中,包含MASP-2抑制性抗体的组合物在不存在血浆去除术时给予。

[0053] 在另一方面,本发明提供治疗患有与造血干细胞移植有关的TMA的受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是特异性结合人MASP-2的抗-MASP-2单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,抗体或其片段选自重组抗体、具有降低的效应器功能的抗体、嵌合抗体、人源化抗体和人抗体。在一个实施方案中,所述受试者之前已经历,或当前正经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂治疗。在一个实施方案中,所述受试者正患有与造血干细胞移植有关的TMA,其对用血小板输注的治疗有抵抗,和/或对用血浆去除术的治疗有抵抗。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以有效改进与造血干细胞移植有关的TMA相关的至少一个或多个临床参数的量给予,例如血小板计数增加(例如,治疗之前的血小板计数的至少2倍、至少3倍、至少4倍)、结合珠蛋白增加和/或乳酸脱氢酶减少。

[0054] 在另一方面,本发明提供治疗患有与造血干细胞移植有关的持续性TMA (HSCT-TMA) 的人受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的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,所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定具有与造血干细胞移植有关的持续性TMA的人受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是特异性结合人MASP-2的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段选自重组抗体、具有降低的效应器功能的抗体、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抑制性抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC₅₀抑制C3b沉积。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,其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3;和轻链可变区,其包含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,在不存在血浆去除术时MASP-2抑制性抗体给予患者。在一个实施方案中,所述受试者之前已经历,或当前正经历用人源化抗-C5抗体或其抗原结合片段治疗,例如其中末端补体抑制剂是人源化抗-C5抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体经全身递送至所述受试

者。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段以有效改进与造血干细胞移植有关的持续性TMA相关的至少一个或多个以下临床参数的量给予: (i) 血小板计数增加(例如, 治疗之前的血小板计数的至少2倍、至少3倍、至少4倍); (ii) 结合珠蛋白增加; (iii) 乳酸脱氢酶(LDH) 减少; 和/或(iv) 肌酸酐减少。

[0055] 在另一方面, 本发明提供治疗患有或有风险发生移植物抗宿主病(GVHD) 的人受试者的方法, 包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的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, 所述受试者之前已经历, 或当前正经历, 或将经历造血干细胞移植。在一个实施方案中, 所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前, 鉴定患有或有风险发生移植物抗宿主病的人受试者。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体是特异性结合人MASP-2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、具有降低的效应器功能的抗体、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抑制性抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC₅₀抑制C3b沉积。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体经全身递送至所述受试者。在一个实施方案中, 所述受试者患有急性GVHD。在一个实施方案中, 所述受试者患有类固醇抵抗性GVHD。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, 其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 和轻链可变区, 其包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0056] 在另一方面, 本发明提供治疗、预防或改善与移植物抗宿主病或TMA有关的一个或多个神经学症状的方法, 包括给予有需要的受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的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, 与移植物抗宿主病或TMA有关的一个或多个神经学症状选自虚弱、感觉异常、四肢麻痹、感觉运动缺乏、植物神经功能不全性多神经病和/或神经源性膀胱。在一个实施方案中, 所述受试者已接受造血干细胞移植和所述受试者正患有选自感觉异常、四肢麻痹和神经源性膀胱的一个或多个神经学症状。在一个实施方案中, 所述受试者已接受造血干细胞移植和正患有移植物抗宿主病。在一个实施方案中, 所述受试者已接受造血干细胞移植和正患有HSCT-TMA。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体是特异性结合人MASP-2的单克隆抗体或其片段。在一个实施方案中, 抗体或其片段选自重组抗体、具有降低的效应器功能的抗体、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抑制性抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC₅₀抑制C3b沉积。在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体经全身递送至所述受试者。在一个实施方案中, 所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前, 鉴定患有与造血干细胞移植有关的一个或多个神经学症状的人受试者。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, 其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3, 和轻链可变区, 其包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。

[0057] 在另一方面, 本发明提供治疗患有或有风险发生与造血干细胞移植有关的弥漫性肺泡出血(DAH) 的人受试者的方法, 包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体

活化的量的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,所述受试者之前已经历,或当前正经历,或将经历造血干细胞移植。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有或有风险发生弥漫性肺泡出血(DAH)的人受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是特异性结合人MASP-2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、具有降低的效应器功能的抗体、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抑制性抗体在90%人血清中以30nM或更小的 IC_{50} 抑制C3b沉积。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体经全身递送至所述受试者。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,其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在另一方面,本发明提供用于抑制MASP-2-依赖性补体活化的不良作用的组合物,包括治疗有效量的MASP-2抑制剂,例如MASP-2抑制性抗体和药学上可接受的载体。还提供了制备用于在有需要的活受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的不良作用的药物的方法,其包括在药用载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂。还提供了制备用于抑制MASP-2-依赖性补体活化的药物的方法,所述药物用于治疗下文描述的病况、疾病和病症的每一种。

[0058] 在另一方面,本发明提供治疗患有或有风险发生与造血干细胞移植有关的静脉闭塞性病(VOD)的人受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的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,所述受试者之前已经历,或当前正经历,或将经历造血干细胞移植。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤之前,鉴定患有或有风险发生静脉闭塞性病(VOD)的人受试者。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体是特异性结合人MASP-2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、具有降低的效应器功能的抗体、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抑制性抗体在90%人血清中以30nM或更小的 IC_{50} 抑制C3b沉积。在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体经全身递送至所述受试者。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,其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3,和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3。在另一方面,本发明提供用于抑制MASP-2-依赖性补体活化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。还提供了制备用于在有需要的活受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的不良作用的药物的方法,其包含在药用载体中的治疗有效量的MASP-2抑制剂。还提供了制备用于抑制MASP-2-依赖性补体活化的药物的方法,所述药物用于治疗下文描述的病况、疾病和病症的每一种。

[0059] 本发明的方法、组合物和药物可用于在患有或有风险发生血栓性微血管病(TMA)的哺乳动物受试者(包括人),和/或患有或有风险发生GVHD的受试者,和/或患有或有风险发生干细胞移植后弥漫性肺泡出血的受试者,和/或患有或有风险发生静脉闭塞性病(VOD)

的受试者中体内抑制MASP-2-依赖性补体活化的不良作用,如本文进一步描述的。

附图简述

[0061] 当结合附图时,本发明的前述方面和许多附带的优势将变得更易理解,如同参考下面的详细描述将变得更好理解一样,其中:

[0062] 图1是说明人MASP-2的基因组结构的图示;

[0063] 图2A是说明人MASP-2蛋白的结构域结构的示意图;

[0064] 图2B是说明人MAp19蛋白的结构域结构的示意图;

[0065] 图3是说明鼠MASP-2敲除策略的图示;

[0066] 图4是说明人MASP-2微基因构建体的图示;

[0067] 图5A表示证明MASP-2-缺陷导致凝集素-途径-介导的C4活化的丢失的结果,如实施例2中所述的通过在甘露聚糖上缺乏C4b沉积所测量的;

[0068] 图5B表示证明MASP-2-缺陷导致凝集素-途径-介导的C4活化的丢失的结果,如实施例2中所述的通过在酵母聚糖上缺乏C4b沉积所测量的;

[0069] 图5C表示证明获自MASP-2+/-、MASP-2-/-和野生型品系的血清样品的相对C4活化水平的结果,如实施例2中所述的通过在甘露聚糖和酵母聚糖上的C4b沉积所测量的;

[0070] 图6表示证明添加鼠重组MASP-2至MASP-2-/-血清样品以蛋白浓度依赖性方式恢复凝集素-途径-介导的C4活化的结果,如实施例2中所述的通过在甘露聚糖上的C4b沉积所测量的;

[0071] 图7表示证明经典途径在MASP-2-/-品系中起作用的结果,如实施例8中所述的;

[0072] 图8A表示证明抗-MASP-2Fab2抗体#11抑制C3转化酶形成的结果,如实施例10中所述的;

[0073] 图8B表示证明抗-MASP-2Fab2抗体#11结合天然大鼠MASP-2的结果,如实施例10中所述的;

[0074] 图8C表示证明抗-MASP-2Fab2抗体#41抑制C4裂解的结果,如实施例10中所述的;

[0075] 图9表示证明还发现抑制C3转化酶形成的所有测试的抗-MASP-2Fab2抗体抑制C4裂解的结果,如实施例10中所述的;

[0076] 图10是说明用于抗-MASP-2封闭Fab2抗体的表位作图的源自大鼠MASP-2的重组多肽的图示,如实施例11中所述的;

[0077] 图11表示证明抗-MASP-2Fab2#40和#60结合大鼠MASP-2多肽的结果,如实施例11中所述的;

[0078] 图12表示证明在肾缺血/再灌注损伤模型中在再灌注后24和48小时野生型(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠的血尿素氮清除率的结果,如实施例12中所述的;

[0079] 图13A表示显示在分离自野生型(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠的RPE-脉络膜复合物中基线VEGF蛋白水平的结果,如实施例13中所述的;

[0080] 图13B表示显示在黄斑变性模型中在激光诱导的损伤后在第3天在野生型(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠中在RPE-脉络膜复合物中VEGF蛋白水平的结果,如实施例13中所述的;

[0081] 图14表示显示在野生型(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠中在激光诱导的损伤后在第7天平均脉络膜新血管形成(CNV)体积的结果,如实施例13中所述的;

[0082] 图15A和15B表示在正常大鼠血清中给予MASP-2Fab2抗体后,抑制C4b沉积 (FIG.15A)和抑制凝血酶活化 (FIG.15B)的剂量反应曲线,如实施例14中所述的;

[0083] 图16A和16B表示在弥散性血管内凝血的局部Schwartzman反应模型中,与在未处理的野生型小鼠和其中补体途径被放血剂眼镜蛇毒因子 (CVF) 和末端途径抑制剂 (C5aR拮抗剂) 抑制的野生型小鼠中 (图16A) 的血小板聚集相比,在MASP-2 (-/-) 小鼠中 (FIG.16B) 测量的血小板聚集 (表示为聚集面积),如实施例15中所述的;

[0084] 图17图示说明了在WT (+/+) 供体肾的WT (+/+) (B6) 或MASP-2 (-/-) 移植物受体小鼠中测量的血尿素氮 (BUN) 水平,如实施例16中所述的;

[0085] 图18图示说明了在盲肠结扎和穿刺 (CLP) 模型中作为微生物感染后天数的函数的WT (+/+) 和MASP-2 (-/-) 小鼠的百分比存活率,如实施例17中所述的;

[0086] 图19图示说明了在盲肠结扎和穿刺 (CLP) 模型中在微生物感染后在WT (+/+) 和MASP-2 (-/-) 中测量的细菌数,如实施例17中所述的;

[0087] 图20是Kaplan-Mayer曲线,说明在用鼻内给予铜绿假单胞菌攻击后6天WT (+/+)、MASP-2 (-/-) 和C3 (-/-) 小鼠的百分比存活率,如实施例18中所述的;

[0088] 图21图示说明了在WT小鼠中皮下给予0.3mg/kg或1.0mg/kg的小鼠抗-MASP-2单克隆抗体后在多个时间点获得的样品中按对照的%测量的C4b沉积的水平,如实施例19中所述的;

[0089] 图22图示说明了在WT小鼠中在ip给予0.6mg/kg的小鼠抗-MASP-2单克隆抗体后在多个时间点获得的样品中按对照的%测量的C4b沉积的水平,如实施例19中所述的;

[0090] 图23图示说明了在用单次ip注射0.3mg/kg或1.0mg/kg小鼠抗-MASP-2单克隆抗体预处理的WT (+/+) 小鼠中在激光诱导的损伤后第7天平均脉络膜新血管形成 (CNV) 体积,如实施例20中所述的;

[0091] 图24A图示说明了在用 $5 \times 10^8/100 \mu\text{l}$ cfu脑膜炎奈瑟菌感染后MASP-2 (-/-) 和WT (+/+) 小鼠的百分比存活率,如实施例21中所述的;

[0092] 图24B图示说明了在取自用 5×10^8 cfu/100 μl 脑膜炎奈瑟菌感染的MASP-2KO (-/-) 和WT (+/+) 小鼠的血液样品中,在不同的时间点回收的脑膜炎奈瑟菌的log cfu/ml,如实施例21中所述的;

[0093] 图25A图示说明了在用 2×10^8 cfu/100 μl 脑膜炎奈瑟菌感染后MASP-2KO (-/-) 和WT (+/+) 小鼠的百分比存活率,如实施例21中所述的;

[0094] 图25B图示说明了在取自用 2×10^8 cfu/100 μl 脑膜炎奈瑟菌感染的WT (+/+) 小鼠的血液样品中在不同的时间点回收的脑膜炎奈瑟菌的log cfu/ml,如实施例21中所述的;

[0095] 图25C图示说明了在取自用 2×10^8 cfu/100 μl 脑膜炎奈瑟菌感染的MASP-2 (-/-) 小鼠的血液样品中在不同的时间点回收的脑膜炎奈瑟菌的log cfu/ml,如实施例21中所述的;

[0096] 图26A图示说明了C3b沉积测定的结果,证明MASP-2 (-/-) 小鼠保留有功能的经典途径,如实施例22中所述的;

[0097] 图26B图示说明了在酵母聚糖包被板上C3b沉积测定的结果,证明MASP-2 (-/-) 小鼠保留有功能的替代途径,如实施例22中所述的;

[0098] 图27A图示说明了在C4 (-/-) 小鼠 (n=6) 和匹配的WT同窝对照 (n=7) 中冠状动脉

的左前降支 (LAD) 的结扎和再灌注后心肌缺血/再灌注损伤 (MIRI) - 诱导的组织损失, 表明处于风险的面积 (AAR) 和梗塞面积 (INF), 如实施例22中所述的;

[0099] 图27B图示说明了处理的C4 (-/-) 和WT小鼠中作为处于风险的面积 (AAR) 的函数的梗塞面积 (INF), 证明C4 (-/-) 小鼠与WT对照一样对MIRI易感 (虚线), 如实施例22中所述的;

[0100] 图28A图示说明了使用来自WT小鼠、C4 (-/-) 小鼠的血清和用甘露聚糖预孵育的来自C4 (-/-) 小鼠的血清的C3b沉积测定的结果, 如实施例22中所述的;

[0101] 图28B图示说明了对与各种浓度的抗-鼠MASP-2mAb (mAbM11) 混合的来自WT、C4 (-/-) 和MASP-2 (-/-) 小鼠的血清的C3b沉积测定的结果, 如实施例22中所述的;

[0102] 图28C图示说明了对来自WT (C4充分) 和C4缺陷血清的人血清和用甘露聚糖预孵育的来自C4缺陷受试者的血清的C3b沉积测定的结果, 如实施例22中所述的;

[0103] 图28D图示说明了对与抗-人MASP-2mAb (mAbH3) 混合的来自WT (C4充分) 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中所述的;

[0104] 图29A图示说明了在凝集素活化途径特异性测定条件下或在经典活化途径特异性测定条件下测试的在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, 如实施例22中所述的;

[0105] 图29B图示说明了在凝集素活化途径特异性条件下测试的在来自各种补体缺陷小鼠品系的血浆中的C3转化酶活性的时间解析动力学, 如实施例22中所述的;

[0106] 图30说明了蛋白质印迹分析的结果, 表明通过凝血酶底物FXIa和FXa的 α' 链的存在所证明的人C3的活化, 如实施例23中所述的;

[0107] 图31显示对获自WT、MASP-2 (-/-)、F11 (-/-)、F11 (-/-)/C4 (-/-) 和C4 (-/-) 的血清样品的C3沉积测定的结果, 如实施例23中所述的;

[0108] 图32A是Kaplan-Meier存活曲线, 显示在对照小鼠中和在用抗-鼠MASP-2抗体 (mAbM11) 或抗-人MASP-2抗体 (mAbH6) 处理的小鼠中在暴露于7.0Gy辐射后随时间的百分比存活率, 如实施例29中所述的;

[0109] 图32B是Kaplan-Meier存活曲线, 显示在对照小鼠中和在用抗-鼠MASP-2抗体 (mAbM11) 或抗-人MASP-2抗体 (mAbH6) 处理的小鼠中在暴露于6.5Gy辐射后随时间的百分比存活率, 如实施例29中所述的;

[0110] 图33是Kaplan-Meier曲线, 其图示说明了在给予 2.6×10^7 cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟菌血清型A Z2491后MASP-2KO和WT小鼠的百分比存活率, 证明MASP-2缺陷小鼠被保护免于脑膜炎奈瑟菌诱导的死亡, 如实施例30中所述的;

[0111] 图34是Kaplan-Meier曲线, 其图示说明了在给予 6×10^6 cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58后MASP-2KO和WT小鼠的百分比存活率, 证明MASP-2-缺陷小鼠被保护免于脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58诱导的死亡, 如实施例30中所述的;

[0112] 图35图示说明了在用 6×10^6 cfu的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58 i.p. 感染后取自MASP-2KO和WT小鼠的血液样品中在不同的时间点恢复的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58的log cfu/ml (对于两组小鼠在不同的时间点 $n=3$, 结果表示为平均值 $\pm$ SEM), 证明尽管MASP-2KO小鼠用与WT小鼠相同剂量的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58感染, 但MASP-2KO小鼠与WT相比具有对菌血症提高的清除率, 如实施例30中所述的;

[0113] 图36图示说明了在用 6×10^6 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟菌血清型血清型B品系MC58感

染后3、6、12和24小时, MASP-2和WT小鼠的平均疾病评分, 证明MASP-2缺陷小鼠显示对感染的高抵抗, 在6小时具有低得多的疾病评分, 如实施例30中所述的;

[0114] 图37是Kaplan-Meyer曲线, 其图示说明在给予 $4 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58, 接着在感染后3小时给予抑制性抗-MASP-2抗体 (1mg/kg) 或对照同种型抗体后, 小鼠的百分比存活率, 证明抗-MASP-2抗体有效治疗和改善用脑膜炎奈瑟菌感染的受试者的存活率, 如实施例31中所述的;

[0115] 图38图示说明了在以下存在的情况下在孵育后0、30、60和90分钟在用 6.5×10^6 cfu/100 μl 脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58 i.p. 感染后在20%人血清浓度下在不同的时间点回收的脑膜炎奈瑟菌血清型B-MC58的活计数的log cfu/ml: (A) 正常人血清 (NHS) 加入抗-MASP-2抗体; (B) 正常人血清 (NHS) 加同种型对照抗体; (C) MBL-/- 人血清; (D) 正常人血清 (NHS) 和 (E) 热灭活的正常人血清 (NHS), 显示在人血清中脑膜炎奈瑟菌的补体依赖性杀伤通过加入人抗-MASP-2抗体而显著提高, 如实施例32中所述的;

[0116] 图39图示说明了在小鼠血清样品中在不同的时间点回收的脑膜炎奈瑟菌血清型B-MC58的活计数的log cfu/ml, 证明MASP-2-/-小鼠血清比WT小鼠血清具有对脑膜炎奈瑟菌较高水平的杀菌活性, 如实施例32中所述的;

[0117] 图40图示说明了通过一定范围的血清浓度的人血清的甘露聚糖-包被的鼠红细胞的溶血 (如通过溶解的小鼠红细胞 (Crry/C3-/-) 释放进入上清液的血红蛋白所测量, 通过光度法测量)。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中所述的;

[0118] 图41图示说明了通过一定范围的血清浓度的人血清的未包被的鼠红细胞的溶血 (如通过溶解的WT小鼠红细胞释放进入上清液的血红蛋白所测量, 通过光度法测量)。测试的血清包括热灭活的 (HI) NHS、MBL-/-、NHS+抗-MASP-2抗体和NHS对照, 证明抑制MASP-2抑制非致敏的WT小鼠红细胞的补体-介导的溶解, 如实施例33中所述的;

[0119] 图42图示说明了通过一定范围的血清浓度的人血清的未包被的鼠红细胞的溶血 (如通过溶解的小鼠红细胞 (CD55/59-/-) 释放进入上清液的血红蛋白所测量, 通过光度法测量)。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中所述的;

[0120] 图43图示说明了在对照小鼠中和在用抗-人MASP-2抗体 (mAbH6) 处理的小鼠中在暴露于8.0Gy辐射后随时间 (天) 的百分比存活率, 如实施例34中所述的;

[0121] 图44图示说明了在LPS注射MASP-2-/-和WT小鼠后, 微血管阻塞起始的时间, 显示经60分钟测量的具有血栓形成的小鼠的百分比, 证明在15分钟后在WT小鼠中检出血栓形成, 多达80%的WT小鼠证实了在60分钟时血栓形成; 相比之下, 在60分钟期间没有MASP-2-/-小鼠显示任何血栓形成 (log秩: $p=0.0005$), 如实施例35中所述的;

[0122] 图45图示说明了在STX/LPS-诱导的HUS模型中盐水处理的对照小鼠 ($n=5$) 和抗-MASP-2抗体处理的小鼠 ($n=5$) 的随时间 (小时) 的百分比存活率, 证明到42小时所有对照小鼠死亡, 而相比之下, 在实验的整个时间过程中100%的抗-MASP-2抗体-处理的小鼠存活, 如实施例36中所述的;

[0123] 图46图示说明了, 作为损伤诱导后的时间的函数, 在注射FITC/葡聚糖之前16小时和1小时通过给予同种型对照或人MASP-2抗体mAbH6 (10mg/kg) 处理后在FITC/葡聚糖UV模

型中具有微血管阻塞的小鼠的百分比,如实施例37中所述的;

[0124] 图47图示说明了用人MASP-2抗体(mAbH6)和同种型对照抗体处理的小鼠的阻塞时间(分钟),其中数据报告为散点,带有平均值(水平条)和标准误差条(垂直条)。用于分析的统计学检验是非配对t检验;其中符号“*”表示 $p=0.0129$,如实施例37中所述的;和

[0125] 图48图示说明了在用低光强度(800-1500)的FITC-葡聚糖/光诱导的内皮细胞损伤血栓形成模型中,对于野生型小鼠、MASP-2KO小鼠和诱导血栓形成之前16小时和再次在之前1小时通过i.p.给予10mg/kg人MASP-2抗体(mAbH6)预处理的野生型小鼠的直到阻塞的时间(分钟),如实施例37中所述的;

[0126] 图49是Kaplan-Meier曲线,显示在FITC-葡聚糖诱导的血栓性微血管病中在用增加剂量的人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)或同种型对照抗体处理的小鼠中作为时间的函数的具有血栓的小鼠的百分比,如实施例39中所述的;

[0127] 图50图示说明了作为mAbH6剂量的函数的血栓形成起始的中位数时间(分钟)(与对照相比 $*p<0.01$),如实施例39中所述的;

[0128] 图51是Kaplan-Meier曲线,显示在FITC-葡聚糖诱导的血栓性微血管病中在用增加剂量的人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)或同种型对照抗体处理的小鼠中作为时间的函数的具有微血管阻塞的小鼠的百分比,如实施例39中所述的;

[0129] 图52图示说明了作为mAbH6剂量的函数的至微血管阻塞的中位数时间(与对照相比 $*p<0.05$),如实施例39中所述的;

[0130] 图53A图示说明了在人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的存在或不存在下在凝集素途径-特异性测定条件下MAC沉积的水平,证明OMS646抑制凝集素-介导的MAC沉积, IC_{50} 值为大约1nM,如实施例40中所述的;

[0131] 图53B图示说明了在人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的存在或不存在下在经典途径-特异性测定条件下MAC沉积的水平,证明OMS646不抑制经典途径-介导的MAC沉积,如实施例40中所述的;

[0132] 图53C图示说明了在人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的存在或不存在下在替代途径-特异性测定条件下MAC沉积的水平,证明OMS646不抑制替代途径-介导的MAC沉积,如实施例40中所述的;

[0133] 图54图示说明了在小鼠中人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的药代动力学(PK)概况,显示OMS646浓度(平均值, $n=3$ 只动物/组)作为以指定剂量给予后时间的函数,如实施例40中所述的;

[0134] 图55A图示说明了人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的药效学(PD)反应,作为在静脉内给予后在小鼠中系统凝集素途径活性的下降测量,如实施例40中所述的;

[0135] 图55B图示说明了人MASP-2单克隆抗体(OMS646)的药效学(PD)反应,作为在皮下给予后在小鼠中系统凝集素途径活性的下降测量,如实施例40中所述的;

[0136] 图56图示说明了与sCR1相比,MASP-2抗体(OMS646)对ADP-激活的HMEC-1细胞上aHUS血清-诱导的C5b-9沉积的抑制作用,如实施例41中所述的;

[0137] 图57图示说明了与sCR1相比,MASP-2抗体(OMS646)对ADP-激活的HMEC-1细胞上aHUS血清-诱导的血栓形成的抑制作用,如实施例42中所述的;

[0138] 图58图示说明了在用MASP-2抑制性抗体(OMS646)治疗后,在患有持续性造血干细

胞移植相关的血栓性微血管病 (HSCT-TMA) 的受试者中随时间 (周) 从基线的血小板计数的平均变化, 如实施例46所述的;

[0139] 图59图示说明了在用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗后, 在患有持续性 (HSCT-TMA) 的受试者中随时间 (周) 从基线的LDH的平均变化, 如实施例46所述的;

[0140] 图60图示说明了在用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗后, 在患有持续性 (HSCT-TMA) 的受试者中随时间 (周) 从基线的结合珠蛋白的平均变化, 如实施例46所述的;

[0141] 图61说明了患者在造血干细胞移植 (HSCT) 后发生HSCT-TMA和移植物抗宿主病 (GVHD) 的临床过程, 证实了在用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗后HSCT-TMA、GVHD的改善和神经学症状的改善, 如实施例47所述的;

[0142] 图62A图示说明了随时间进行, 在同情使用患者#1中肌酸酐的水平, 其中垂直线表示用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 开始治疗, 如实施例48所述的;

[0143] 图62B图示说明了随时间进行, 在同情使用患者#1中结合珠蛋白的水平, 其中垂直线表示用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 开始治疗, 如实施例48所述的;

[0144] 图62C图示说明了随时间进行, 在同情使用患者#1中血红蛋白的水平, 其中垂直线表示用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 开始治疗, 如实施例48所述的;

[0145] 图62D图示说明了随时间进行, 在同情使用患者#1中LDH的水平, 其中垂直线表示用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 开始治疗, 如实施例48所述的; 和

[0146] 图62E图示说明了随时间进行, 在同情使用患者#1中血小板的水平, 其中垂直线表示用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 开始治疗, 如实施例48所述的。

[0147] 序列表描述

[0148] SEQ ID NO:1人MAp19 cDNA

[0149] SEQ ID NO:2人MAp19蛋白 (具有前导序列)

[0150] SEQ ID NO:3人MAp19蛋白 (成熟)

[0151] SEQ ID NO:4人MASP-2cDNA

[0152] SEQ ID NO:5人MASP-2蛋白 (具有前导序列)

[0153] SEQ ID NO:6人MASP-2蛋白 (成熟)

[0154] SEQ ID NO:7人MASP-2gDNA (外显子1-6)

[0155] 抗原: (参考MASP-2成熟蛋白)

[0156] SEQ ID NO:8CUBI序列 (aa 1-121)

[0157] SEQ ID NO:9CUBEGF序列 (aa 1-166)

[0158] SEQ ID NO:10CUBEGFCUBII (aa 1-293)

[0159] SEQ ID NO:11EGF区 (aa 122-166)

[0160] SEQ ID NO:12丝氨酸蛋白酶结构域 (aa429-671)

[0161] SEQ ID NO:13无活性的丝氨酸蛋白酶结构域 (aa 610-625, 具有Ser618至Ala突变)

[0162] SEQ ID NO:14TPLGPKWPEPVFGRL (CUB1肽)

[0163] SEQ ID NO:15

[0164] TAPPGYRLRLYFTHFDLELSHLCEYDFVKLSSGAKVLATLCGQ (CUBI肽)

[0165] SEQ ID NO:16TFRSDYSN (MBL结合区核心)

- [0166] SEQ ID NO:17FYSLGSSLDITFRSDYSNEKPFTGF (MBL结合区)
- [0167] SEQ ID NO:18IDECQVAPG (EGF肽)
- [0168] SEQ ID NO:19ANMLCAGLESGGKDSRGS GGALV (丝氨酸蛋白酶结合核心)
- [0169] 肽抑制剂:
- [0170] SEQ ID NO:20MBL全长cDNA
- [0171] SEQ ID NO:21MBL全长蛋白
- [0172] SEQ ID NO:220GK-X-GP (共有结合)
- [0173] SEQ ID NO:230GKLG
- [0174] SEQ ID NO:24GLR GLQ GP0 GKL GP0 G
- [0175] SEQ ID NO:25GP0 GP0 GLR GLQ GP0 GKL GP0 GP0 GP0
- [0176] SEQ ID NO:26
- [0177] GKDGRDGTKGEKGEPPGQGLRGLQGPOGKLGPOG
- [0178] SEQ ID NO:27
- [0179] GAOGSOGKGAOGPPGPOGPOGKMGPKGEOGD0 (人h-纤维胶凝蛋白)
- [0180] SEQ ID NO:28
- [0181] GCOGLOGAOGDKGEAGTNGKRGERGPOGPOGKAGPOGPNGAOG EO (人纤维胶凝蛋白p35)
- [0182] SEQ ID NO:29LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI (C4裂解位点) 表达抑制剂:
- [0183] SEQ ID NO:30CUBI-EGF结构域的cDNA (SEQ ID NO:4的核苷酸22-680)
- [0184] SEQ ID NO:31
- [0185] 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)
- [0186] SEQ ID NO:32
- [0187] 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTCCAACGAGAAG3' SEQ ID NO:4的核苷酸361-396, 编码包括MASP-2MBL结合位点的区域 (有义)
- [0188] SEQ ID NO:33
- [0189] 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCCGTATCCCAA3' SEQ ID NO:4的核苷酸610-642, 编码包括CUBII结构域的区域克隆引物:
- [0190] SEQ ID NO:34CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC (用于CUB的5' PCR)
- [0191] SEQ ID NO:35GGAATTCCTAGGCTGCATA (的用于CUB3'
- [0192] PCR)
- [0193] SEQ ID NO:36GGAATTCCTACAGGGCGCT (用于CUBIEGF的3' PCR)
- [0194] SEQ ID NO:37GGAATTCCTAGTAGTGGAT (用于CUBIEGFCUBII的3' PCR)
- [0195] SEQ ID NOS:38-47是用于人源化的抗体的克隆引物
- [0196] SEQ ID NO:48是9aa肽键
- [0197] 表达载体:
- [0198] SEQ ID NO:49是MASP-2微基因插入片段
- [0199] SEQ ID NO:50是鼠MASP-2cDNA
- [0200] SEQ ID NO:51是鼠MASP-2蛋白 (含前导序列)
- [0201] SEQ ID NO:52是成熟的鼠MASP-2蛋白

- [0202] SEQ ID NO:53是大鼠MASP-2cDNA
- [0203] SEQ ID NO:54是大鼠MASP-2蛋白(含前导序列)
- [0204] SEQ ID NO:55是成熟的大鼠MASP-2蛋白
- [0205] SEQ ID NO:56-59是用于人MASP-2的定点诱变的寡核苷酸,其用于产生人MASP-2A
- [0206] SEQ ID NO:60-63是用于鼠MASP-2的定点诱变的寡核苷酸,其用于产生鼠MASP-2A
- [0207] SEQ ID NO:64-65是用于大鼠MASP-2的定点诱变的寡核苷酸,其用于产生大鼠MASP-2A
- [0208] SEQ ID NO:66编码17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 重链可变区 (VH) (不含信号肽) 的DNA
- [0209] SEQ ID NO:6717D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 重链可变区 (VH) 多肽
- [0210] SEQ ID NO:6817N16mc重链可变区 (VH) 多肽
- [0211] SEQ ID NO:69:编码17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 轻链可变区 (VL) 的DNA
- [0212] SEQ ID NO:70:17D20_dc35VH21N11VL (OMS646) 轻链可变区 (VL) 多肽
- [0213] SEQ ID NO:71:17N16_dc17N9轻链可变区 (VL) 多肽

详细描述

[0215] 本发明基于本发明人的出人意料的发现,即有可能抑制凝集素介导的MASP-2途径,同时保留经典途径完整。本发明还描述了MASP-2作为用于抑制与凝集素-介导的补体途径活化有关的细胞损伤,同时保留免疫系统的经典(C1q-依赖性)途径组分完整的治疗靶标的用途。

[0216] I. 定义

[0217] 除非本文明确定义,否则本文使用的所有术语具有与本发明技术领域的普通技术人员所理解的相同的含义。当术语用于说明书和权利要求书中以描述本发明时,为提供关于术语的清楚性,提供以下定义。

[0218] 如本文所用的,术语“MASP-2-依赖性补体活化”包括凝集素途径的MASP-2-依赖性活化,其在生理学条件下发生(即,在Ca⁺⁺存在的情况下),导致形成凝集素途径C3转化酶C4b2a和在C3裂解产物C3b积聚时,随后形成C5转化酶C4b2a (C3b)_n,其已经确定主要引起调理素作用。

[0219] 如本文所用的,术语“替代途径”是指补体活化,其例如通过来自真菌和酵母细胞壁的酵母聚糖、来自革兰氏阴性细菌外膜的脂多糖(LPS)和兔红细胞,以及许多纯的多糖、兔红细胞、病毒、细菌、动物肿瘤细胞、寄生虫和受损的细胞触发,并且其在传统上被认为自补体因子C3自发蛋白水解产生C3b而产生。

[0220] 如本文所用的,术语“凝集素途径”是指补体活化,其经过血清和非-血清糖结合蛋白的特异性结合发生,所述糖结合蛋白包括甘露聚糖-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)。

[0221] 如本文所用的,术语“经典途径”是指补体活化,其通过与外来颗粒结合的抗体触发并且需要结合识别分子C1q。

[0222] 如本文所用的,术语“MASP-2抑制剂”是指与MASP-2结合或直接相互作用的任何试剂,其有效抑制MASP-2-依赖性补体活化,包括抗-MASP-2抗体和其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,还包括与MASP-2竞争结合凝集素途径中的另一识别分子(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,但不包括结合这样的其它识别分子的抗体。可用于本发明的方法的MASP-2抑制剂可减少MASP-2-依赖性补体活化超过20%,例如超过50%,例如超过90%。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂减少MASP-2-依赖性补体活化超过90%(即,导致仅10%或更小的MASP-2补体活化)。

[0223] 如本文所用的,术语“抗体”包括源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)或杂交瘤、噬菌体筛选、重组表达或转基因动物(或产生抗体或抗体片段的其它方法)的抗体和其抗体片段,其特异性对结合靶多肽,例如MASP-2、多肽或其部分。术语“抗体”不意欲受限于抗体的来源或其制备方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体筛选、重组表达、转基因动物、肽合成等)。示例性的抗体包括多克隆、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);人源化的抗体;鼠抗体;嵌合的小鼠-人、小鼠-灵长类动物、灵长类动物-人单克隆抗体;和抗一个体型抗体,和可以是任何完整的抗体或其片段。如本文所用的,术语“抗体”不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,而且包括其片段(例如dAb、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其合成变体、天然存在的变体、包括具有所需特异性的抗原-结合片段的抗体部分的融合蛋白、人源化的抗体、嵌合抗体和包括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。

[0224] “单克隆抗体”是指同质抗体群,其中所述单克隆抗体包括参与表位的选择性结合的氨基酸(天然存在和非天然存在的)。单克隆抗体对靶抗原具有高度特异性。术语“单克隆抗体”不仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,而且包括其片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(ScFv)、其变体、包括抗原-结合部分的融合蛋白、人源化的单克隆抗体、嵌合的单克隆抗体和包括具有所需特异性和结合表位的能力的抗原-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。不意欲限制抗体的来源或其制备方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体筛选、重组表达、转基因动物等)。该术语包括完整的免疫球蛋白以及上述在“抗体”的定义下的片段等。

[0225] 如本文所用的,术语“抗体片段”是指源自全长抗体或与全长抗体有关的部分,例如抗-MASP-2抗体,通常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、单链抗体分子和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0226] 如本文所用的,“单链Fv”或“scFv”抗体片段包括抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单一多肽链中。一般而言,Fv多肽还包括VH和VL结构域之间的多肽接头,其能够使scFv形成抗原结合所需的结构。

[0227] 如本文所用的,“嵌合抗体”是包含源自非-人物种(例如,啮齿动物)抗体的可变结构域和互补决定区的重组蛋白,而抗体分子的其余部分源自人抗体。

[0228] 如本文所用的,“人源化的抗体”是嵌合抗体,其包括符合源自移植到人抗体框架中的非-人免疫球蛋白的特异性互补决定区的最小序列。人源化的抗体通常是重组蛋白,其中仅抗体互补决定区是非-人来源。

[0229] 如本文所用的,术语“甘露聚糖-结合凝集素”(“MBL”)等同于甘露聚糖-结合蛋白

(“MBP”)。

[0230] 如本文所用的,“膜攻击复合物”(“MAC”)是指插入到膜中并破坏膜的末端5种补体组分(C5b与C6、C7、C8和C-9组合)的复合物(亦称为C5b-9)。

[0231] 如本文所用的,“受试者”包括所有哺乳动物,包括而不限于人、非-人灵长类动物、狗、猫、马、绵羊、山羊、牛、兔、猪和啮齿动物。

[0232] 如本文所用的,氨基酸残基缩写如下: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)。

[0233] 在最广泛的意义上,根据各个氨基酸的侧链的化学性质,天然存在的氨基酸可分成多个组。“疏水”氨基酸是指Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val、Ala、Cys或Pro。“亲水”氨基酸是指Gly、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、Arg或His。氨基酸的这种分组可进一步如下细分。“不带电荷亲水”氨基酸是指Ser、Thr、Asn或Gln。“酸性”氨基酸是指Glu或Asp。“碱性”氨基酸是指Lys、Arg或His。

[0234] 如本文所用的,术语“保守氨基酸置换”通过在以下各组内的氨基酸中置换来说明:(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;和(6)赖氨酸、精氨酸和组氨酸。

[0235] 如本文所用的术语“寡核苷酸”是指核糖核酸(RNA)或脱氧核糖核酸(DNA)或其模拟物的寡聚体或多聚体。该术语还涵盖了包含天然存在的核苷酸、糖和共价核苷间(主链)键以及具有非天然存在的修饰的寡核苷酸的那些寡核苷碱基。

[0236] 如本文所用的,“表位”是指抗体所结合的蛋白(例如,人MASP-2蛋白)上的位点。“重叠表位”包括至少一个(例如,2、3、4、5或6个)共同氨基酸残基,包括线性和非线性表位。

[0237] 如本文所用的,术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,意指任何肽-连接的氨基酸链,无论长度或翻译后修饰如何。本文所述的MASP-2蛋白可包含或可以是野生型蛋白,或可以是具有不超过50个(例如,不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40或50个)保守氨基酸置换的变体。保守置换通常包括在以下组内的置换: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;和苯丙氨酸和酪氨酸。

[0238] 在一些实施方案中,人MASP-2蛋白可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蛋白具有等于或大于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)%同一性。

[0239] 在一些实施方案中,肽片段可以是至少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、

[0240] 38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、

[0241] 60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、

[0242] 150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500或600个或更多个)氨基酸

残基长度(例如,SEQ ID NO:5的至少6个连续的氨基酸残基)。在一些实施方案中,人MASP-2蛋白的抗原肽片段少于500个(例如,少于450、400、350、325、300、275、250、225、200、190、180、170、160、150、140、130、120、

[0243] 110、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、49、48、

[0244] 47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、

[0245] 33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、

[0246] 19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7或6个)氨基酸残基长度(例如,SEQ ID NOS:5的任一个中少于500个连续的氨基酸残基)。

[0247] 百分比(%)氨基酸序列同一性定义为在比对序列和引入缺口(如果需要的话)以实现最大百分比序列同一性后,在候选序列中与参比序列中的氨基酸相同的氨基酸的百分比。为确定百分比序列同一性的目的,比对可以本领域技术内的各种方法实现,例如使用公众可得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign(DNASTAR)软件。用于测量比对的合适参数,包括在待比较的序列全长上实现最大比对所需的任何算法,可通过已知的方法确定。

[0248] II. 发明概述

[0249] 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)是触发先天性补体系统的特异性识别分子,和该系统包括凝集素起始途径和放大凝集素-引发的末端补体效应分子活化的相关末端途径放大环。C1q是触发获得性补体系统的特异性识别分子,和该系统包括经典起始途径和放大C1q-引发的末端补体效应分子活化的相关末端途径放大环。我们分别称这两种主要补体活化系统为凝集素-依赖性补体系统和C1q-依赖性补体系统。

[0250] 除了其在免疫防御中的基本作用之外,补体系统还在许多临床情况下有助于组织损伤。因此,对开发治疗有效补体抑制剂以预防这些不良作用存在迫切需要。由于认识到有可能抑制凝集素介导的MASP-2途径同时保留经典途径完整,因此认识到特异性地仅抑制引起特定病理学的补体活化系统而不完全关闭补体的免疫防御能力是特别需要的。例如,在其中补体活化主要由凝集素-依赖性补体系统介导的疾病状态中,特异性地仅抑制该系统将是有益的。这将保持C1q-依赖性补体活化系统完整,以处理免疫复合物加工和有助于宿主防御感染。

[0251] 在特异性抑制凝集素-依赖性补体系统的治疗剂的开发中优选的靶向蛋白组分是MASP-2。在凝集素-依赖性补体系统的所有已知的蛋白组分(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是凝集素-依赖性补体系统独特的,并且是该系统行使功能所需要的。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,所述凝集素组分的任一个的损失由于凝集素冗余而将不必然抑制该系统的活化。抑制所有5种凝集素以保证凝集素-依赖性补体活化系统的抑制将是必要的。此外,因为还已知MBL和纤维胶凝蛋白具有不依赖于补体的调理素活性,所以凝集素功能的抑制将导致损失该有利的宿主防御感染机制。相比之下,如果MASP-2是抑制性靶标的话,该补体-非依赖性凝集素调理素活性将保持完整。MASP-2作为抑制凝集素-依赖性补体活化系统的治疗靶标的额外益处是MASP-2的血浆浓度是任何补体蛋白中最低的(大约500ng/ml);因此,相对低

浓度的MASP-2高-亲和力抑制剂可足以获得完全抑制 (Moller-Kristensen, M. 等, J. Immunol Methods 282:159-167, 2003)。

[0252] 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

[0253] 概述

[0254] 血栓性微血管病 (TMA) 是一种特征在于在小的血管中的血凝块的病理 (Benz, K. 等, Curr Opin Nephrol Hypertens 19(3):242-7 (2010))。认为对下面的血管内皮的应激或损伤是主要的驱动因素。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是溶血性尿毒综合征 (HUS) 和血栓性血小板减少性紫癜 (TTP)。TMA的特征性基础病理特征是血小板活化和在小动脉和小静脉中小血栓的形成。至少部分地通过对微血管内皮的损伤或应激引发的补体活化还牵涉到其它TMA, 包括灾难性抗磷脂综合征 (CAPS)、系统性德克斯病以及癌症、癌症化学疗法和移植继发的TMA。

[0255] 补体在肾炎宿主中的病理学作用的直接证据通过具有特定补体组分的遗传缺陷的患者的研究来提供。许多报告证明了肾损伤与补体调节因子H的缺陷相关联 (Ault, B.H., Nephrol. 14:1045-1053, 2000; Levy, M. 等, Kidney Int. 30:949-56, 1986; Pickering, M.C. 等, Nat. Genet. 31:424-8, 2002)。因子H缺陷导致因子B和C3的低的血浆水平, 这是由于这些组分的活化-相关的消耗导致。C5b-9的循环水平也在这些患者的血清中提高, 意味着补体活化。膜增生性肾小球肾炎 (MPGN) 和特发性溶血性尿毒综合征 (HUS) 与因子H缺陷或因子H突变有关。因子H-缺陷的猪 (Jansen, J.H. 等, Kidney Int. 53:331-49, 1998) 和因子H敲除小鼠 (Pickering, M.C., 2002) 显示MPGN-样症状, 证实因子H在补体调节中的重要性。其它补体组分的缺陷与系统性红斑狼疮 (SLE) 的发生而继发的肾疾病有关 (Walport, M.J., Davies 等, Ann. N.Y. Acad. Sci. 815:267-81, 1997)。C1q、C4和C2的缺陷通过涉及免疫复合物和细胞凋亡物质的不完全清除的机制强烈引起SLE的发生。在许多这些SLE患者中发生狼疮肾炎, 其特征是在整个肾小球中免疫复合物的沉积。

[0256] aHUS

[0257] 非典型溶血性尿毒综合征 (aHUS) 是一组称为“血栓性微血管病”的病况的一部分。在非典型形式的HUS (aHUS) 中, 疾病与不完全的补体调节有关, 和可以是散发的或家族性的。aHUS的家族性病例与编码补体活化或补体调节蛋白的基因突变有关, 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, PloS Genetics 3(3):e41 (2007))。与aHUS有关的该多种多样的基因突变的统一特征是在细胞或组织表面上提高的补体活化的倾向。因此, 本发明的一个方面包括通过给予有效量的MASP-2抑制剂, 治疗患有与因子H缺陷有关的aHUS的患者。本发明的另一方面包括通过给予有效量的MASP-2抑制剂, 治疗患有与因子I、因子B、膜辅因子CD46、CFHR1或CFHR3缺陷有关的HUS的患者。

[0258] 最近对在通过不同组突变补体因子引起的aHUS中作为增强的补体活化的基础的分子病理生理学的理解已有显著进展。该机制对于因子H突变有最佳理解。因子H是丰富的血清蛋白, 包括20个短的共有重复序列 (SCR) 结构域, 其用作在溶液中以及在宿主细胞表面上补体活化的负调节剂。它靶向激活形式的C3, 并且与因子I和其它辅因子一起, 促进其失活, 阻止进一步的补体活化。为有效控制在宿主细胞表面上的补体活化, 因子H需要与宿主细胞相互作用, 这被SCR结构域16-20介导。迄今描述的与aHUS有关的所有因子H突变聚集在

包括(SCR)结构域16-20的C-末端区。这些突变的因子H蛋白在控制在溶液中的C3活化中具有完全的功能,但不能与宿主细胞表面相互作用,因此不能在细胞表面上控制C3活化(Exp Med 204(6):1249-56(2007))。因此,因子H的某些突变与aHUS有关,这是因为突变的因子H蛋白不能与宿主细胞表面相互作用,因此不能有效下调在宿主细胞表面(包括微血管内皮)上的补体活化。结果,一旦出现初始C3活化,在微血管内皮表面上的随后补体活化继续进行,在具有因子H突变的患者中不减弱。该不受控制的补体活化最终导致对血管内皮的进行性损伤、随后的血小板聚集和微血管凝血,和由RBC通过局部闭塞的微血管的完全应激引起的溶血。因此,aHUS疾病表现以及临床和实验室发现直接与在微血管内皮表面上的补体负调节的缺陷有关。

[0259] 类似于因子H突变,在负补体调节剂因子I和膜辅因子蛋白(CD46)中的功能丧失性突变也与aHUS有关。对于因子B有相反的观察结果,在aHUS中发现C3蛋白与这些蛋白的功能获得性突变有关(PediatrNephrol 25(12):2431-42(2010))。因此,在aHUS发病机理中许多汇聚的数据牵涉到补体活化。该观念通过在治疗aHUS中艾库组单抗(阻断末端补体蛋白C5的单克隆抗体)的治疗功效得到最有说服力的支持。

[0260] 尽管在aHUS中补体作为效应器机制的中心作用为广泛公认的,但起始补体活化的触发剂和涉及的分子途径尚未确定。并非带有上述突变的所有个体都发生aHUS。事实上,家族性研究已经表明,aHUS的外显率仅为约50%(Ann Hum Genet 74(1):17-26(2010))。疾病的自然史表明,在启动事件(例如感染性发作或损伤)后aHUS最经常发生。激活补体系统的感染试剂是众所周知的。在缺少预存在的适应性免疫的情况下,通过感染试剂的补体活化可主要通过凝集素途径开始。因此,感染触发的凝集素途径活化可代表用于在aHUS-易感个体中补体活化的后续病理性放大的起始触发剂,这最终可导致疾病进展。因此,本发明的另一方面包括通过给予有效量的MASP-2抑制剂,治疗患有感染继发的aHUS的患者。

[0261] 其它形式的宿主组织损伤将通过凝集素途径激活补体,特别是对血管内皮的损伤。易受氧化应激的人血管内皮细胞例如通过表达结合凝集素和激活补体的凝集素途径的表面部分而应答(Am J.Pathol156(6):1549-56(2000))。缺血/再灌注后的血管损伤也通过体内凝集素途径激活补体(Scand J Immunol 61(5):426-34(2005))。在该背景中凝集素途径活化对宿主具有病理结果,和通过阻断MASP-2抑制凝集素途径防止进一步的宿主组织损伤和不良结果(Schwaebler PNAS 2011)。

[0262] 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,很可能的是,凝集素途径可代表起始补体活化机制,其在遗传上对aHUS易感的个体中以解除控制的方式被不适当地放大,因此起始aHUS发病机理。通过推论,阻断通过凝集素途径的补体活化的试剂,包括抗-MASP-2抗体,预期可在aHUS易感个体中预防疾病进展或减少加重。

[0263] 在该概念的另一支持中,最近的研究已经在儿科aHUS病例中鉴定肺炎链球菌(*S.pneumonia*)作为重要的病原体(Nephrology (Carlton),17:48-52(2012);Pediatr Infect Dis J.30(9):736-9(2011))。该特定的病因学显示具有不利的预后,具有显著的死亡率和长期发病率。特别是,这些病例涉及非肠道感染,导致表现微血管病、尿毒症和溶血,没有证据表明同时存在的已知是aHUS病因的补体基因突变。重要的是应注意,肺炎链球菌在活化补体中特别有效,和其主要是通过凝集素途径进行。因此,在与肺炎球菌感染有关的非肠道HUS的情况下,微血管病、尿毒症和溶血的表现预期主要通过凝集素途径的活化来驱

动,并且阻断凝集素途径的试剂,包括抗-MASP-2抗体,预期预防aHUS的进展或减少在这些患者中的疾病严重性。因此,本发明的另一方面包括通过给予有效量的MASP-2抑制剂,治疗患有与肺炎链球菌感染有关的非肠道aHUS的患者。

[0264] 根据前述内容,在一些实施方案中,在有风险发生与aHUS有关的肾衰竭的受试者的背景下,提供用于减少发生aHUS或发生与aHUS有关的肾衰竭的可能性的方法,包括给予一定量的MASP-2抑制剂一段时间,其有效改善或预防所述受试者的肾衰竭。在一些实施方案中,方法还包括在发生与aHUS有关的任何症状之前确定受试者是否有发生aHUS的风险的步骤。在其它实施方案中,方法包括在发生指示aHUS的至少一个或多个症状(例如,存在贫血、血小板减少症和/或肾功能不全)和/或在获自所述受试者的活组织检查中存在血栓性微血管病时,确定受试者是否有发生aHUS的风险。确定受试者是否有发生aHUS的风险包括确定所述受试者是否具有发生aHUS的遗传素因,其可通过基因组测序或基因-特异性分析(例如,PCR分析),评价遗传信息(例如自包含所述受试者的基因型的数据库)或对所述受试者进行至少一种遗传筛查检验以确定存在或不存在与aHUS有关的遗传标记(即,确定在编码补体因子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(编码抗凝血蛋白凝血调节蛋白)或补体因子H-相关蛋白3(CFHR3)或补体因子H-相关蛋白4(CFHR4)的基因中存在或不存在与aHUS有关的遗传突变)来进行;和/或确定所述受试者是否具有aHUS家族史。对存在或不存在与aHUS有关的基因突变进行遗传筛查的方法已经充分建立,例如参见Noris M等“*Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome*,” 2007Nov 16[2011Mar 10更新],在:Pagon RA,Bird TD,Dolan CR等编辑,GeneReviews™, Seattle(WA):University of Washington,Seattle。

[0265] 例如,总的来说,在具有补体因子H(CFH)的突变的那些个体中疾病的外显率是48%,和对于CD46突变的外显率是53%,对于CFI的突变是50%,对于C3的突变是56%和对于THBD的突变是64%(Caprioli J.等,Blood,108:1267-79(2006);Noris等,Clin J Am Soc Nephrol 5:1844-59(2010))。如Caprioli等,(2006),同上,所述,大量具有补体因子H(CFH)突变的个体从未发生aHUS,并且假定在这些个体中在生理学条件下亚最佳CFH活性足以保护宿主免于补体活化的影响,然而,当对激活补体的试剂的暴露产生高于正常量的C3b时,亚最佳CFH活性不足以阻止C3b沉积在血管内皮细胞上。

[0266] 因此,在一个实施方案中,提供用于在患有或有风险发生非-因子H-依赖性非典型溶血性尿毒综合征的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法,包括给予受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物。在另一实施方案中,提供用于在有风险发生因子H-依赖性非典型溶血性尿毒综合征的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法,包括周期性地监测所述受试者,以确定存在或不存在贫血、血小板减少症或肌酐上升,和在确定存在贫血、血小板减少症或肌酐上升时用MASP-2抑制剂进行治疗。在另一实施方案中,提供用于减少有风险发生因子H-依赖性aHUS的受试者将遭受与aHUS有关的临床症状的可能性的方法,包括在已知与触发aHUS临床症状有关的事件(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)之前或期间或之后给予MASP-2抑制剂。

[0267] 在一个实施方案中,提供用于减少有风险发生aHUS的受试者将遭受与aHUS有关的临床症状的可能性的方法,包括周期性地监测所述受试者,以确定存在或不存在贫血、血小

板减少症或肌酐升高,和在确定存在贫血、血小板减少症或肌酐升高时用MASP-2抑制剂进行治疗。

[0268] 在另一实施方案中,提供用于减少有风险发生aHUS的受试者将遭受与aHUS有关的临床症状的可能性的方法,包括在已知与触发aHUS临床症状有关的事件(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)之前或期间或之后给予MASP-2抑制剂。

[0269] 在一些实施方案中,在与触发aHUS临床症状有关的事件之前、期间或之后,给予MASP-2抑制剂至少1天、2天、3天、4天或更长的一段时间,和可以由医生确定重复进行,直到病况得到解决或被控制。在前-aHUS背景中,MASP-2抑制剂可经系统地给予至所述受试者性,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、皮下或其它胃肠外给予。

[0270] 在一些实施方案中,在初始诊断aHUS的背景中或在显示与aHUS的诊断一致的一个或多个症状(例如,存在贫血、血小板减少症和/或肾功能不全)的受试者中,所述受试者用有效量的MASP-2抑制剂(例如,抗-MASP-2抗体)作为第一线疗法在不存在血浆去除术时或与血浆去除术组合进行治疗。作为第一线疗法,MASP-2抑制剂可经系统地给予至所述受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、皮下或其它胃肠外给予。在一些实施方案中,在不存在血浆去除术以避免潜在的血浆去除术并发症包括出血、感染和暴露于血浆供体固有的病症和/或过敏反应时,或在另外不愿意接受血浆去除术的受试者中,或在其中无法利用血浆去除术的背景中,将MASP-2抑制剂作为第一线疗法给予至受试者。

[0271] 在一些实施方案中,方法包括经过导管(例如,静脉内)给予MASP-2抑制剂至患有aHUS的受试者持续第一时间段(例如,至少1天至1周或2周),接着给予MASP-2抑制剂经皮下至所述受试者持续第二时间段(例如,至少2周或更长的慢性期)。在一些实施方案中,在第一和/或第二时间段的给药在不存在血浆去除术时发生。在一些实施方案中,方法还包括在治疗之前和任选在治疗期间确定在所述受试者中至少1种补体因子(例如,C3、C5)的水平,其中确定与标准值或健康对照受试者相比至少1种补体因子的水平降低表明需要继续用MASP-2抑制剂治疗。

[0272] 在一些实施方案中,方法包括静脉内、肌内或优选皮下给予MASP-2抑制剂,例如抗-MASP-2抗体至患有或有风险发生aHUS的受试者。治疗可以是长期的,和每日至每月给予,但优选每两周给予。抗-MASP-2抗体可单独或与C5抑制剂例如艾库组单抗组合给予。

[0273] HUS

[0274] 与非典型HUS一样,典型形式的HUS显示TMA的所有临床和实验室结果。然而,典型HUS经常是儿科疾病,通常没有家族性要素或与补体基因突变的直接关联。典型HUS的病因与某些肠道病原体的感染紧密有关。患者通常呈现为急性肾衰竭、血红蛋白尿和血小板减少症,通常接着发生血性腹泻。该病况通过肠道感染痢疾志贺氏菌(*Shigella* *dysenteriae*)、沙门氏菌或产生志贺菌毒素-样的肠道出血大肠杆菌菌株例如大肠杆菌0157:H7而引起。所述病原体从污染的食物或供水获得。HUS是医学急症,具有5-10%死亡率。相当一部分的存活者发生慢性肾病(Corrigan和Boineau, *Pediatr Rev* 22(11):365-9 (2011))并可能需要肾移植。

[0275] 在典型HUS中微血管凝血主要但不是唯一地发生在肾微血管系统。基础病理生理学通过志贺菌毒素(STX)介导。通过肠病微生物分泌进入肠腔,STX穿过肠屏障,进入血流和

通过blobotriaosyl神经酰胺受体CD77结合至血管内皮细胞(Boyd和Lingwood Nephron 51:207(1989)),所述受体优选在肾小球内皮上表达和介导STX的毒性作用。一旦与内皮结合,STX诱导破坏血管内皮的一系列事件,激活白细胞和引起vWF-依赖性血栓形成(Forsyth等,Lancet 2:411-414(1989);Zoja等,KidneyInt.62:846-856(2002);Zanchi等,J.Immunol.181:1460-1469(2008);Morigi等,Blood98:1828-1835(2001);

[0276] Guessou等,Infect.Immun.,73:8306-8316(2005))。这些小血栓阻塞或闭塞肾和其它器官的小动脉和毛细血管。小动脉和毛细血管中通过小血栓的血流阻塞增加施用至RBC的剪切力,因为它们挤压通过狭窄的血管。这可导致通过剪切力造成的RBC的破坏和形成称为裂红细胞的RBC碎片。裂红细胞的存在是HUS的特征性发现。这一机制已知为微血管病性溶血。另外,血流的阻塞导致缺血,引发补体-介导的炎症反应,这引起对受累的器官的另外损伤。

[0277] 补体的凝集素途径通过两个原理机制促进HUS的发病机理:1)由内皮损伤引起的MASP-2-介导的凝固级联直接活化;和2)由缺血引起的凝集素-介导的后续补体活化,所述缺血由微血管血流的初始阻塞引起。

[0278] STX损伤微血管内皮细胞,和已知损伤的内皮细胞激活补体系统。如上文详述的,内皮细胞损伤后的补体活化主要通过凝集素途径驱动。易受氧化应激的人血管内皮细胞通过表达结合凝集素和激活补体的凝集素途径的表面部分而应答(Collard等,Am JPathol.

[0279] 156(5):1549-56(2000))。缺血再灌注后的血管损伤还通过体内凝集素途径激活补体(Scand J Immunol 61(5):426-34(2005))。在该背景中凝集素途径活化具有对宿主的病理后果,和通过阻断MASP-2抑制凝集素途径防止进一步的宿主组织损伤和不良结果(Schwaeble等,PNAS(2011))。除了补体活化之外,MASP-2的凝集素-依赖性活化已经表明导致凝血酶原裂解形成凝血酶和促进凝血。因此,通过损伤的内皮细胞活化补体的凝集素途径可直接激活凝血系统。因此根据MASP-2-介导的凝血酶原活化,补体的凝集素途径可能是连接STX导致的初始内皮损伤与在HUS中发生的凝血和微血管血栓形成的主要分子途径。因此预期,凝集素途径抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将防止或减轻在患有HUS的患者中微血管凝血、血栓形成和溶血。事实上,给予抗-MASP-2抗体显著保护在典型HUS的模型中的小鼠。如实施例36所述和图45所示的,暴露于STX和LPS的所有对照小鼠发生严重HUS和在48小时内变得濒死或死亡。另一方面,如图45中进一步显示的,用抗-MASP-2抗体治疗和然后暴露于STX和LPS的所有小鼠存活(Fisher准确检验 $p < 0.01$; $N = 5$)。因此,抗-MASP-2疗法显著保护在该HUS模型中的小鼠。预期给予MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体将有效治疗HUS患者和提供对由肠病性大肠杆菌或其它产生STX的病原体感染引起的微血管凝血、血栓形成和溶血的保护。

[0280] 尽管此处显示了对于STX引起的HUS,但预期抗-MASP-2疗法也将有益于由于其它毒性剂引起的内皮损伤造成的HUS-样综合征。这包括试剂例如丝裂霉素、噻氯匹定、cycplatin、奎宁、环孢霉素、博来霉素以及其它化学疗法药物和免疫抑制药物。因此,预期抗-MASP-2抗体疗法或抑制MASP-2活性的其它药征将在HUS和其它TMA相关的疾病(即,aHUS和TTP)中有效预防或限制凝血、血栓形成和RBC破坏,和预防肾衰竭。

[0281] 患有HUS的患者经常表现为腹泻和呕吐,它们的血小板计数通常减少(血小板减少症)和RBC减少(贫血)。前-HUS腹泻期通常持续大约4天,在这期间有风险发生HUS的受试者

通常显示除了严重腹泻之外的1个或多个以下症状:血细胞比容水平低于30% (涂片表明血管内红细胞破坏)、血小板减少症(血小板计数 $<150 \times 10^3/\text{mm}^3$)和/或存在肾功能受损(血清肌酐浓度大于年龄参比范围的上限)。存在少无尿(尿排出 $\leq 0.5\text{mL/kg/h}$,达 >1 天)可用作向发生HUS进展的度量(参见C.Hickey等,Arch Pediatr Adolesc Med 165(10):884-889(2011))。通常对于存在大肠杆菌细菌(大肠杆菌0157:H7)或志贺氏菌或沙门氏菌物种感染进行测试。在对肠源性大肠杆菌(例如,大肠杆菌0157:H7)感染测试阳性的受试者中,禁忌使用抗生素,因为使用抗生素可通过STX产生增加而增加发生HUS的风险(参见Wong C.等,N Engl J. Med 342:1930-1936(2000))。对于志贺氏菌或沙门氏菌测试阳性的受试者,通常给予抗生素以清除感染。对HUS的其它充分建立的第一线疗法包括容积扩张、透析和血浆去除术。

[0282] 根据前述内容,在一些实施方案中,在患有与前-HUS期有关的1个或多个症状和有风险发生HUS的受试者(即,所述受试者显示1个或多个以下症状:腹泻、血细胞比容水平低于30% (涂片显示血管内红细胞破坏)、血小板减少症(血小板计数小于 $150 \times 10^3/\text{mm}^3$)和/或存在肾功能受损(血清肌酐浓度大于年龄参比范围的上限))的背景中,提供用于在所述受试者中降低发生HUS的风险或降低肾衰竭的可能性的方法,包括给予一定量的MASP-2抑制剂一段时间,其有效改善或预防肾功能受损。在一些实施方案中,给予MASP-2抑制剂至少1天、2天、3天、4天或更多天的一段时间,和可按医生确定重复进行直到病况已经解决或被控制。在前-HUS背景中,MASP-2抑制剂可经系统地给予至所述受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、口服、皮下或其它胃肠外给予。

[0283] 用杀菌性抗生素特别是 β -内酰胺治疗大肠杆菌0157:H7感染,伴随增加的发生HUS的风险(Smith等,Pediatr Infect Dis J 31(1):37-41(2012))。在一些实施方案中,在患有与前-HUS期有关的症状的受试者的背景中,其中所述受试者已知具有禁忌使用抗生素的肠源性大肠杆菌感染(例如,大肠杆菌0157:H7),提供用于在所述受试者中降低发生HUS的风险或降低肾衰竭的可能性的方法,包括给予一定量的MASP-2抑制剂持续第一时间段,其有效抑制或预防在所述受试者中存在少无尿(例如,至少1、2、3或4天),其中在第一时间段期间给予MASP-2抑制剂在不存在抗生素的情况下发生。在一些实施方案中,方法还包括与抗生素组合给予MASP-2抑制剂至所述受试者第二时间段(例如至少1-2个周)。

[0284] 在其它实施方案中,在遭受与前-HUS期有关的症状的受试者的背景中,其中所述受试者已知具有志贺氏菌或沙门氏菌感染,提供用于在所述受试者中降低发生HUS的风险或降低肾衰竭的可能性的方法,包括给予一定量的MASP-2抑制剂一段时间,其有效抑制或预防在所述受试者中存在少无尿,其中给予MASP-2抑制剂在存在或不存在合适的抗生素的情况下进行。

[0285] 在一些实施方案中,在初始诊断HUS的背景中或在显示与HUS的诊断一致的1个或多个症状(例如,存在肾衰竭、或在缺少低纤维蛋白原时的微血管病性溶血性贫血、或血小板减少症)的受试者中,所述受试者用有效量的MASP-2抑制剂(例如抗-MASP-2抗体)作为第一线疗法在不存在血浆去除术时或与血浆去除术组合进行治疗。作为第一线疗法,MASP-2抑制剂可经系统地给予所述受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、皮下或其它胃肠外给予。在一些实施方案中,在不存在血浆去除术以避免血浆去除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/或过敏反应时,或在另外不愿意接受血浆去

除术的受试者中,或在其中不可利用血浆去除术的背景中,将MASP-2抑制剂作为第一线疗法给予受试者。

[0286] 在一些实施方案中,方法包括通过导管(例如,静脉内)给予MASP-2抑制剂至患有HUS的受试者第一时间段(例如,持续至少1天至1周或2周的急性期),接着皮下给予MASP-2抑制剂至所述受试者第二时间段(例如,至少2周或更长的慢性期)。在一些实施方案中,在第一和/或第二时间段期间的给药在不存在血浆去除术时发生。在一些实施方案中,方法还包括在治疗之前和任选在治疗期间确定在所述受试者中至少一种补体因子(例如,C3、C5)的水平,其中确定与标准值或健康对照受试者相比至少一种补体因子的水平降低表明需要治疗,和其中正常水平的确定表明改善。

[0287] 在一些实施方案中,方法包括皮下或静脉内给予MASP-2抑制剂例如抗-MASP-2抗体至患有或有风险发生HUS的受试者。治疗优选每日进行,但频率可低至每周或每月进行。治疗将持续至少1周和多至3个月。抗-MASP-2抗体可单独或与C5抑制剂例如艾库组单抗组合给予。

[0288] TTP

[0289] 血栓性血小板减少性紫癜(TTP)是一种有生命危险的血液凝固系统病症,其由激活凝固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))。这导致在全身的小血管中许多微观血块或血栓。红细胞经受剪应力,其破坏它们的膜,导致血管内溶血。由此产生的血流减少和内皮损伤导致器官受损,包括脑、心脏和肾。TTP的临床特征为血小板减少症、微血管病性溶血性贫血、神经改变、肾衰竭和发烧。在血浆交换前的时期,在急性发作期间死亡率为90%。甚至经过血浆交换,6个月时的存活率大约为80%。

[0290] TTP可自酶ADAMTS-13(负责将血管假性血友病因子(vWF)的大的多聚体裂解为较小单元的金属蛋白酶)的遗传性或获得性抑制产生。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调节vWF的活性;在其缺乏时,vWF形成大的多聚体,其更可能结合血小板并使患者易于在微血管中造成血小板聚集和血栓形成。

[0291] Upshaw-Schulman综合征(USS,亦称为先天性TTP)为由于ADAMTS13基因突变造成的ADAMTS13活性的先天性缺陷(Schulman等, *Blood*, 16(1):943-57, 1960; Upshaw等, *New Engl. J. Med*, 298(24):1350-2, 1978)。在具有先天性TTP的个体中已经鉴定ADAMTS13的许多突变(Kinoshita等, *International Journal of Hematology*, 74:101-108 (2001); Levy等, *Nature*, 413(6855):488-494 (2001); Kokame等, *PNAS* 99(18):11902-11907 (2002); Savasan等, *Blood*, 101:4449-4451 (2003); Matsumoto等, *Blood*, 103:1305-1310 (2004) 和 Fujimura等, *Brit. J. Haemat* 144:742-754 (2008))。具有USS的受试者通常具有5-10%的正常ADAMTS13活性(Kokame等, *PNAS* 99(18):11902-11907, 2002)。尽管获得性TTP和USS具有某些类似性,但USS在临床特征上具有一些重要的不同。USS通常出现在婴儿或儿童中,特征为严重的血胆红素过多,在出生后不久具有阴性Coombs试验,对新鲜血浆输注有反应,和频繁复发(Savasan等, *Blood*, 101:4449-4451, 2003)。在一些病例中,具有该遗传性ADAMTS13缺陷的患者在出生时具有轻度的表型,并在具有增加的血管假性血友病因子水平的临床条件(例如感染或妊娠)下仅发生与TTP有关的症状。例如, Fujimura等报告来自具有遗传上确

认的USS的6个家庭的9名日本女性,在她们首次妊娠期间经诊断患有该病症。血小板减少症发生在她们15次妊娠的每次的第二至第三个三个月期间,之后经常有TTP。发现所有这些女性严重缺乏ADAMTS13活性(Fujimura等,Brit.J.Haemat 144:742-754,2008)。

[0292] 根据前述内容,在一些实施方案中,在具有Upshaw-Schulman综合征(USS)的受试者的背景中(即,所述受试者已知缺乏ADAMTS13活性和/或所述受试者已知具有1个或多个ADAMTS13基因突变),提供用于降低发生与先天性TTP有关的临床症状(例如,血小板减少症、贫血、发烧和/或肾衰竭)的可能性的方法,包括给予一定量的MASP-2抑制剂(例如,MASP-2抗体)一段时间,其有效改善或预防与TTP有关的一个或多个临床症状。在一些实施方案中,方法还包括在出现与TTP有关的任何症状之前或在出现至少1个或多个指示TTP的症状(例如,存在贫血、血小板减少症和/或肾功能不全)时测定受试者是否有风险发生与先天性TTP有关的症状的步骤。确定受试者是否有风险发生与先天性TTP有关的症状(即,所述受试者具有USS),包括确定所述受试者是否具有在编码ADAMTS13的基因中的突变和/或确定所述受试者是否缺乏ADAMTS13活性和/或确定所述受试者是否具有USS家族史。遗传筛查存在或不存在与USS有关的基因突变的方法已充分建立,例如参见Kinoshita等,International Journal of Hematology,74:101-108(2001);Levy等,Nature,413(6855):488-494(2001);Kokame等,PNAS 99(18):11902-11907(2002);Savasan等,Blood,101:4449-4451(2003);Matsumoto等,Blood,103:1305-1310(2004)和Fujimura等,Brit.J.Haemat 144:742-754(2008)。

[0293] 在一个实施方案中,提供用于减少诊断具有USS的受试者将遭受与TTP有关的临床症状的可能性的方法,包括周期性地监测所述受试者以确定存在或不存在贫血、血小板减少症或肌酐升高,和在确定存在贫血、血小板减少症或肌酐升高时或在存在已知与触发TTP临床症状有关的事件(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)时用MASP-2抑制剂(例如,MASP-2抗体)进行治疗。

[0294] 在另一实施方案中,提供用于治疗患有USS和遭受与TTP有关的临床症状的受试者的方法,包括给予一定量的MASP-2抑制剂(例如,MASP-2抗体)一段时间,其有效改善或预防与TTP有关的一个或多个临床症状。

[0295] TTP也可由于针对ADAMTS-13的自身-抗体而发生。另外,TTP可在乳腺癌、胃肠道癌或前列腺癌(George JN.,Oncology(Williston Park).25:908-14(2011))、妊娠(第二个三个月或产后)(George JN.,Curr Opin Hematol 10:339-344(2003))期间发生,或与疾病例如HIV或自身免疫疾病例如系统性红斑狼疮有关(Hamasaki K,等,Clin Rheumatol.22:355-8(2003))。TTP也可由某些药物疗法引起,包括肝素、奎宁、免疫介导的成分、癌症化学治疗剂(博来霉素、顺铂、阿糖胞苷、柔红霉素、吉西他滨、丝裂霉素C和他莫西芬)、环孢霉素A、口服避孕药、盘尼西林、利福平和抗-血小板药物,包括噻氯匹定和氯吡格雷(Azarm,T,等,JResMedSci.,16:353-357(2011))。与TTP有关的其它因素或条件是毒素例如蜂毒、脓毒症、脾隔离症、移植、血管炎、血管手术和感染例如肺炎链球菌和细胞巨化病毒(Moake JL.,N Engl J Med.,347:589-600(2002))。由于瞬时功能性ADAMTS-13缺乏导致的TTP可因为与肺炎链球菌感染有关的内皮细胞损伤而发生(Pediatr Nephrol.,26:631-5(2011))。

[0296] 血浆交换是TTP的标准治疗(Rock GA,等,N Engl J Med 325:393-397(1991))。血浆交换代替具有遗传缺陷的患者的ADAMTS-13活性和除去在具有获得性自身免疫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))。其它试剂例如免疫抑制药物常规添加到疗法中(George, JN, *N Engl J Med*, 354:1927-35 (2006))。然而, 血浆交换对于大约20%的患者并不成功, 在超过三分之一的患者中出现复发, 并且血浆去除术具有成本和技术上的要求。此外, 许多患者不能耐受血浆交换。因此, 对另外的和更好的TTP治疗仍有紧迫的需要。

[0297] 因为TTP是血液凝固级联的病症, 因此用补体系统的拮抗剂治疗可有助于稳定和纠正疾病。尽管替代补体途径的病理性活化与aHUS有关, 但补体活化在TTP中的作用不是很清楚。ADAMTS13的功能缺乏对于TTP的易感性是重要的, 然而其不足以引起急性发作。环境因素和/或其它遗传改变可促进TTP的表现。例如, 编码参与调节凝固级联、vWF、血小板功能、血管内皮表面的组分或补体系统的蛋白的基因可牵涉到急性血栓性微血管病的发生(Galbusera, M.等, *Haematologica*, 94:166-170 (2009))。具体而言, 补体活化已经显示起关键作用; 来自与ADAMTS-13缺乏有关的血栓性微血管病的血清已经显示引起C3和MAC沉积, 和随后的中性粒细胞活化, 其可被补体失活废除(Ruiz-Torres MP, 等, *Thromb Haemost*, 93:443-52 (2005))。另外, 最近显示在TTP急性发作期间存在增加水平的C4d、C3bBbP和C3a(M. Réti等, *J Thromb Haemost*. Feb 28. (2012) doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04674.x. [Epub ahead of print]), 与经典/凝集素和替代途径的活化一致。在急性发作中该增加量的补体活化可引起末端途径活化和导致进一步的TTP加重。

[0298] ADAMTS-13和vWF在TTP中的作用显然是血小板活化和聚集, 和它们随后在剪应力和微血管病的沉积中作用的原因。激活的血小板与补体的经典和替代途径相互作用, 并触发它们。血小板介导的补体活化增加炎性介质C3a和C5a (Peerschke E等, *Mol Immunol*, 47:2170-5 (2010))。因此, 血小板可在遗传性或自身免疫TTP中用作经典补体活化的靶标。

[0299] 如上文所述, 根据MASP-2介导的凝血酶原活化, 补体的凝集素途径是连接内皮损伤与HUS中发生的凝血和微血管血栓形成的主要分子途径。类似地, 补体的凝集素途径的活化可直接驱动TTP中的凝血系统。凝集素途径活化可响应由TTP中ADAMTS-13缺乏引起的初始内皮损伤而启动。因此预期凝集素途径抑制剂, 包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体, 将减轻在患有TTP的患者中与微血管凝血、血栓形成和溶血有关的微血管病。

[0300] 患有TTP的患者在急诊室中通常表现出1个或多个以下症状: 紫癜、肾衰竭、低血小板、贫血和/或血栓形成, 包括中风。当前的TTP护理标准包括导管内递送(例如, 静脉内或其它形式的导管) 替换血浆去除术达2周或更长的一段时间, 通常一周三次, 但至多每日一次。如果所述受试者对存在ADAMTS13抑制剂(即, ADAMTS13的内源性抗体) 测试阳性, 则血浆去除术可与免疫抑制疗法(例如, 皮质类固醇、rituxan或环孢霉素) 组合进行。具有难治性TTP的受试者(大约20%的TTP患者) 对至少2周的血浆去除术疗法没有响应。

[0301] 根据前述内容, 在一个实施方案中, 在初始诊断TTP的背景中或在显示与TTP的诊断一致的1个或多个症状(例如, 中枢神经系统受累、严重的血小板减少症(如果没有阿司匹林, 血小板计数低于或等于5000/ μ L; 如果存在阿司匹林, 低于或等于20,000/ μ L)、严重的心脏受累、严重的肺受累、胃肠梗塞或坏疽)的受试者中, 提供用有效量的MASP-2抑制剂(例如, 抗-MASP-2抗体) 作为第一线疗法在不存在血浆去除术时或与血浆去除术组合治疗所述受试者的方法。作为第一线疗法, MASP-2抑制剂可系统地给予所述受试者, 例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、皮下或其它胃肠外给予。在一些实施方案中, 在不存在血浆去

除术以避免血浆去除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/或过敏反应时,或在另外不愿意接受血浆去除术的受试者中,或在其中不可利用血浆去除术的背景中,将MASP-2抑制剂作为第一线疗法给予受试者。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、rituxan或环孢霉素)组合(包括共-给予)和/或与浓ADAMTS-13组合给予患有TTP的受试者。

[0302] 在一些实施方案中,方法包括通过导管(例如,静脉内)给予患有TTP的受试者MASP-2抑制剂第一时间段(例如,持续至少1天至1周或2周的急性期),接着皮下给予MASP-2抑制剂至所述受试者第二时间段(例如,至少2周或更长的慢性期)。在一些实施方案中,在第一和/或第二时间段期间的给药在不存在血浆去除术时发生。在一些实施方案中,方法用于维持所述受试者,以防止所述受试者患有与TTP有关的一个或多个症状。

[0303] 在另一实施方案中,提供通过给予有效减少一个或多个TTP症状的量的MASP-2抑制剂,治疗患有难治性TTP的受试者(即,没有响应至少2周的血浆除去疗法的受试者)的方法。在一个实施方案中,长期(经过至少2周或更长的一段时间)通过皮下或其它胃肠外给药,将MASP-2抑制剂(例如,抗-MASP-2抗体)给予具有难治性TTP的受试者。给药可按医生确定重复进行,直到病况已被解决或得到控制。

[0304] 在一些实施方案中,方法还包括在治疗之前和任选在治疗期间确定在所述受试者中至少一种补体因子(例如,C3、C5)的水平,其中确定与标准值或健康对照受试者相比至少一种补体因子的水平降低指示需要继续用MASP-2抑制剂治疗。

[0305] 在一些实施方案中,方法包括皮下或静脉内给予MASP-2抑制剂例如抗-MASP-2抗体至患有或有风险发生TTP的受试者。治疗优选每日进行,但频率可低至两周一次。继续治疗,直至所述受试者的血小板计数大于150,000/ml达至少连续两天。抗-MASP-2抗体可单独或与C5抑制剂例如艾库组单抗组合给予。

[0306] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体结合人MASP-2,KD为10nM或更小;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法中在1%人血清中抑制C3b沉积,IC₅₀为10nM或更小;所述抗体在90%人血清中抑制C3b沉积,IC₅₀为30nM或更小,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IgG4分子包括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,抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制替代途径。在一个实施方案中,抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径或替代途径(即,抑制凝集素途径,同时保留经典和替代补体途径完整)。

[0307] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体抑制在来自患有TTP的受试者的血清中血栓形成达至少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%直至99%。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体以比对血清中的C5b-9沉积的抑制作用高至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制在来自患有TTP的受试者的血清中血栓形成。

[0308] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体抑制在来自TTP患者的血清中血栓形成达至少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%直至99%。

[0309] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体通过静脉内导管或其它导管递送方法给予所述受试者。

[0310] 在一个实施方案中,本发明提供在患有TTP的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者包含一定量的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(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3;或(II) 其变体,包含与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)的重链可变区和与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。

[0311] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的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SEQ ID NO:67所示氨基酸序列的重链可变区。在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的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SEQ ID NO:70所示氨基酸序列的轻链可变区。

[0312] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性地识别由参考抗体OMS646识别的人MASP-2上的表位的至少一部分,所述参考抗体包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[0313] 德戈斯病

[0314] 德戈斯病,亦称为恶性萎缩性丘疹病,是一种非常罕见的TMA,其影响皮肤、胃肠道和CNS的小血管的内皮。这种血管病引起小静脉和小动脉的阻塞,导致皮肤损伤、肠缺血和CNS病症,包括中风、癫痫和认知障碍。在皮肤中,由于小动脉的血栓性阻塞导致结缔组织坏死。然而,德戈斯病的病因未知。牵涉到血管炎、凝血病或内皮细胞的基本功能障碍。德戈斯病具有仅2-3年的50%存活率。对德戈斯病没有有效治疗,尽管抗血小板药物、抗凝剂和免疫抑制剂用于减轻症状。

[0315] 尽管德戈斯病的机制未知,但牵涉到补体途径。Margo等鉴定了在四名德戈斯病末期患者的皮肤、胃肠道和脑血管中主要的C5b-9沉积(Margo等,Am J Clin Pathol 135(4): 599-610,2011)。用艾库组单抗的实验性治疗初始在治疗皮肤和肠损伤中有效,但不预防系统性疾病的发展(参见Garrett-Bakelman F.等,“在德戈斯病的病理生理学中C5b-9是潜在的效应器;用艾库组单抗治疗的病例报告”(摘要),Jerusalem:International Society of Hematology;2010,Poster#156;和Polito J.等,“系统性德戈斯病(DD)或恶性萎缩性丘疹病(MAP)的早期检测可增加存活率”(摘要),San Antonio,TX:American College of Gastroenterology;2010,Poster#1205)。

[0316] 许多患有德戈斯病的患者具有血液凝固缺陷。在皮肤中小动脉的血栓性阻塞是该

疾病的特征。因为该疾病中牵涉到补体途径,正如本文对于其它TMA所述的,预期凝集素途径抑制剂,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。

[0317] 因此,在另一实施方案中,本发明提供用于治疗德戈斯病的方法,通过将在药用载体中包含治疗有效量的MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体的组合物给予患有德戈斯病或由德戈斯病导致的病况的受试者。MASP-2抑制剂经系统性给予患有德戈斯病或由德戈斯病导致的病况的所述受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它胃肠外给予,或可能通过口服给予非-肽能药。抗-MASP-2抗体可单独或与C5抑制剂例如艾库组单抗组合给予。

[0318] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体结合人MASP-2,KD为10nM或更小;所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位;所述抗体抑制在体外测定法中在1%人血清中C3b沉积,IC₅₀为10nM或更小;所述抗体抑制在90%人血清中C3b沉积,IC₅₀为30nM或更小,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IgG4分子包括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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制替代途径。在一个实施方案中,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径或替代途径(即,抑制凝集素途径,同时保留经典和替代补体途径完整)。

[0319] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体抑制在来自患有德戈斯病的受试者的血清中血栓形成达至少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%直至99%。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体以比对血清中C5b-9沉积的抑制作用高至少20%或更高(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制在来自患有德戈斯病的受试者的血清中血栓形成。

[0320] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体抑制在来自德戈斯病患者的血清中血栓形成达至少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%直至99%。

[0321] 在一个实施方案中,通过静脉内导管或其它导管递送方法将MASP-2抑制性抗体给予所述受试者。

[0322] 在一个实施方案中,本发明提供在患有德戈斯病的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者包含一定量的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(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3;或(II) 其变体,包含与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)的重链可变区和与

[0323] 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。

[0324] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的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,方法包括给予受试者包含一定量的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SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0325] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性地识别由参考抗体OMS646识别的人MASP-2上的表位的至少一部分,所述参考抗体包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[0326] 灾难性抗磷脂综合征 (CAPS)

[0327] 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的特征是由于病原性抗体导致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。像其它TMA一样,在各种器官中小血管的阻塞是特征性的。在CAPS中存在大约50%的高死亡率,其往往与感染或创伤有关。患者具有抗磷脂抗体,通常为IgG。

[0328] 在临床上,CAPS累及具有小血管阻塞的组织病理学证据的至少三种器官或组织。周围血栓形成可累及CNS、心血管、肾或肺系统的静脉和动脉。患者用抗生素、抗凝剂、皮质类固醇、血浆交换和静脉内免疫球蛋白治疗。然而,死亡可由多器官衰竭导致。

[0329] 在CAPS中牵涉到补体途径。例如,在动物模型中的研究表明,补体抑制可能是预防与CAPS有关的血栓形成的有效方式(Shapira L.等,Arthritis Rheum 64(8):2719-23,2012)。此外,如Shapira等进一步报告的,以阻断补体途径的剂量给予患有CAPS的受试者艾库组单抗抑制急性进行性血栓事件和反转血小板减少症(亦参见LimW.,Curr Opin Hematol 18(5):361-5,2011)。因此,如本文对其它TMA所述的,预期凝集素途径抑制剂,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。

[0330] 因此,在另一实施方案中,本发明提供通过给予患有CAPS或由CAPS导致的病况的受试者在药用载体中包含治疗有效量的MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体的组合物,治疗CAPS的方法。MASP-2抑制剂经系统性给予患有CAPS或由CAPS导致的病况的所述受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它胃肠外给予,或可能通过口服给予非-肽能药。抗-MASP-2抗体可单独或与C5抑制剂例如艾库组单抗组合给予。

[0331] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体结合人MASP-2,KD为10nM或更小;所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域的表位;所述抗体在体外测定法中在1%人血清中抑制C3b沉积,IC50为10nM或更小;所述抗体在90%人血清中抑制C3b沉积,IC50为30nM或更小,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IgG4分子包括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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制替代途径。在一个实施方案中,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径或替代途径(即,抑制凝集素途径同时保留经典和替代补体途径完

整)。

[0332] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体在来自患有CAPS的受试者的血清中抑制血栓形成达至少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%直至99%。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体以比对血清中的C5b-9沉积的抑制作用高至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平在来自患有CAPS的受试者的血清中抑制血栓形成。

[0333] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体在来自CAPS患者的血清中抑制血栓形成达至少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%直至99%。

[0334] 在一个实施方案中,通过静脉内导管或其它导管递送方法将MASP-2抑制性抗体给予所述受试者。

[0335] 在一个实施方案中,本发明提供在患有CAPS的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者包含一定量的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(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3;或(II) 其变体,包含与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)的重链可变区和与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。

[0336] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的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,方法包括给予受试者包含一定量的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SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0337] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包括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特异性地识别由参考抗体OMS646识别的人MASP-2上的表位的至少一部分,包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[0338] 癌症继发性TMA

[0339] 任何类型的系统性恶性肿瘤可导致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,和显示与肿瘤栓子有关(Francis KK等, Commun Oncol 2:339-43, 2005)。肿瘤栓子可减少血流和因此导致受累小动脉和小静脉的低灌注状态。由此产生的组织应激和损伤预期以局部的方式激活补体的凝集素途径。激活的凝集素途径进而可通过MASP-2依赖性裂解凝血酶原为凝血酶而激活凝固级联,导致TMA特有的前-血栓性状态。预期在该背景中MASP-2

抑制减少凝血酶的局部活化和因此减轻前-血栓性状态。

[0340] 因此,如本文对其它TMA所述的,预期凝集素途径抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将有益于治疗患有癌症继发性TMA的患者。

[0341] 因此,在另一实施方案中,本发明提供通过给予患有或有风险发生癌症继发性TMA的受试者在药用载体中包含治疗有效量的MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体的组合物,治疗或预防癌症继发性TMA的方法。MASP-2抑制剂经系统性给予患有或有风险发生癌症继发性TMA的所述受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它胃肠外给予,或可能通过口服给予非-肽能药。抗-MASP-2抗体可单独或与C5抑制剂例如艾库组单抗组合给予。

[0342] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体结合人MASP-2,KD为10nM或更小;所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域的表位;所述抗体在体外测定法中在1%人血清中抑制C3b沉积,IC₅₀为10nM或更小;所述抗体在90%人血清中抑制C3b沉积,IC₅₀为30nM或更小,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IgG4分子包括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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制替代途径。在一个实施方案中,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径或替代途径(即,抑制凝集素途径同时保留经典和替代补体途径完整)。

[0343] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体在来自患有癌症继发性TMA的受试者的血清中抑制血栓形成达至少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%直至99%。

[0344] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体在来自患有癌症继发性TMA的患者的血清中抑制血栓形成达至少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%直至99%。

[0345] 在一个实施方案中,通过静脉内导管或其它导管递送方法将MASP-2抑制性抗体给予所述受试者。

[0346] 在一个实施方案中,本发明提供在患有癌症继发性TMA的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者包含一定量的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(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3;或(II) 其变体,包含与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)的重链可变区和与

[0347] 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。

[0348] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的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,方法包括给予受试者包含一定量的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SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0349] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包括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特异性地识别由参考抗体OMS646识别的人MASP-2上的表位的至少一部分,包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[0350] 癌症化学疗法继发性TMA

[0351] 化学疗法-相关的TMA是一种涉及血小板减少症、微血管病性溶血性贫血和肾功能不全的病况,其发生在2-10%的具有用化学治疗剂例如吉西他滨、丝裂霉素、奥沙利铂等治疗的恶性肿瘤历史的患者中。化学疗法-相关的TMA与高的死亡率、差的临床结果有关(参见例如,Blake-Haskins等,Clin Cancer Res 17(18):5858-5866,2011)。

[0352] 认为化学疗法-相关的TMA的病因包括对微血管内皮的非-特异性的毒性损伤。在丝裂霉素-诱导的TMA的动物模型中已经显示对内皮细胞的直接损伤(Dlott J.等,Ther Apher Dial 8:102-11,2004)。已经显示通过各种机制的内皮细胞损伤激活补体的凝集素途径。例如,Stahl等已经表明,暴露于氧化应激的内皮细胞在体内和体外激活补体的凝集素途径(Collard等,Am J Pathol.156(5):1549-56,2000;La Bonte等,JImmunol.15;188(2):885-91,2012)。在体内,该过程导致血栓形成,和已经表明凝集素途径的抑制预防血栓形成(La Bonte等J Immunol.15;188(2):885-91,2012)。此外,如本文实施例37-39所证实的,在其中FITC-Dex的局部光致激发用于诱导对微血管的局部损伤,随后发生TMA应答的TMA的小鼠模型中,本发明人已证明MASP-2的抑制可预防TMA。因此,通过化学治疗剂的微血管内皮损伤可激活补体的凝集素途径,其然后产生局部的前-血栓性状态和促进TMA应答。因为凝集素途径的活化和前-血栓性状态的产生是MASP-2-依赖性的,所以预期MASP-2抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体,将减轻TMA应答和降低癌症化学疗法-相关的TMA的风险。

[0353] 因此,在另一实施方案中,本发明提供通过给予患有或有风险发生化学疗法继发性TMA的受试者在药用载体中包含治疗有效量的MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体的组合物,治疗或预防化学疗法继发性TMA的方法。MASP-2抑制剂经系统性给予已经经历、正在经历或将经历化学疗法的受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它胃肠外给予,或可能通过口服给予非-肽能药。抗-MASP-2抗体可单独或与C5抑制剂例如艾库组单抗组合给予。

[0354] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体结合人MASP-2,KD为10nM或更小;所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域的表位;所述抗体在体外测定法中在1%人血清中抑制C3b沉积,IC50为10nM或更小;所述抗体在90%人血清中抑制C3b沉积,IC50为30nM或更小,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IgG4分子包括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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制替代途径。在一个实施方案中,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径或替代途径(即,抑制凝集素途径同时保留经典和替代补体途径完整)。

[0355] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体在来自患有癌症化学疗法继发性TMA的受试者的血清中抑制血栓形成达至少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%直至99%。

[0356] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体在来自患有癌症化学疗法继发性TMA的患者的血清中抑制血栓形成达至少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%直至99%。

[0357] 在一个实施方案中,通过静脉内导管或其它导管递送方法将MASP-2抑制性抗体给予所述受试者。

[0358] 在一个实施方案中,本发明提供在患有癌症化学疗法继发性TMA的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者包含一定量的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(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3;或(II) 其变体,包含与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)的重链可变区和与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。

[0359] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的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,方法包括给予受试者包含一定量的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SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0360] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包括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特异性地识别由参考抗体OMS646识别的人MASP-2上的表位的至少一部分,包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[0361] 移植继发性TMA

[0362] 移植-相关的TMA (TA-TMA) 是一种破坏性的综合征,其可发生在移植物患者中,例如同种异体造血干细胞移植物受体(参见例如,Batts和Lazarus, Bone Marrow Transplantation 40:709-719, 2007)。该病况的发病机理知之甚少,但可能涉及最终导致

内皮细胞损伤的反应汇合 (Laskin B.L.等, Blood 118(6):1452-62, 2011)。如上文所述, 内皮细胞损伤是对于凝集素途径活化和前-血栓性环境的产生的一种原型刺激。

[0363] 最近的数据进一步支持通过凝集素途径的补体活化在TA-TMA发病机理中的作用。Laskin等已经证实, 与对照相比 (8%), 肾小动脉C4d沉积在具有组织学TA-TMA的受试者中更加常见 (75%) (Laskin B.L.等, Transplantation, 27; 96(2):217-23, 2013)。因此, C4d可能是TA-TMA的病理标志物, 其牵涉到通过凝集素或经典途径的局部补体固定。

[0364] 因为凝集素途径的活化和前-血栓性状态的产生是MASP-2-依赖性的, 因此预期MASP-2抑制剂, 包括但不限于阻断MASP-2功能的抗体, 将减轻TMA反应和降低移植-相关的TMA (TA-TMA) 的风险。

[0365] 因此, 在另一实施方案中, 本发明提供通过给予患有或有风险发生移植继发性TMA的受试者在药用载体中包含治疗有效量的MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体的组合物, 治疗或预防移植继发性TMA的方法。MASP-2抑制剂经系统性给予已经经历、正在经历或将经历移植程序的受试者, 例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、皮下或其它胃肠外给予, 或可能通过口服给予非-肽能药。抗-MASP-2抗体可单独或与C5抑制剂例如艾库组单抗组合给予。在一些实施方案中, 本发明提供治疗或预防同种异体干细胞移植继发性TMA的方法, 包括在经历同种异体干细胞移植之前、期间或之后给予受试者包含一定量的MASP-2抑制剂例如MASP-2抑制性抗体的组合物。

[0366] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征: 所述抗体结合人MASP-2, KD为10nM或更小; 所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域的表位; 所述抗体在体外测定法中在1%人血清中抑制C3b沉积, IC50为10nM或更小; 所述抗体在90%人血清中抑制C3b沉积, IC50为30nM或更小, 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IgG4分子包括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, 所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制替代途径。在一个实施方案中, 所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径或替代途径 (即, 抑制凝集素途径同时保留经典和替代补体途径完整)。

[0367] 在一个实施方案中, 与未处理的血清相比, MASP-2抑制性抗体在来自患有移植继发性TMA的受试者的血清中抑制血栓形成达至少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%直至99%。

[0368] 在一个实施方案中, 与未处理的血清相比, MASP-2抑制性抗体在来自患有移植继发性TMA的患者的血清中抑制血栓形成达至少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%直至99%。

[0369] 在一个实施方案中, 通过静脉内导管或其它导管递送方法将MASP-2抑制性抗体给予所述受试者。

[0370] 在一个实施方案中, 本发明提供在患有移植继发性TMA的受试者中抑制血栓形成的方法, 包括给予受试者包含一定量的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(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3;或(II) 其变体,包含与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)的重链可变区和与

[0371] 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。

[0372] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的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,方法包括给予受试者包含一定量的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SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0373] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包括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特异性地识别由参考抗体OMS646识别的人MASP-2上的表位的至少一部分,包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[0374] IV.MASP-2在其它疾病和病况中的作用和使用masp-2抑制剂的治疗方法

[0375] 肾病况

[0376] 在各种肾疾病的发病机理中涉及到补体系统的活化;包括系膜增生性肾小球肾炎(IgA-肾病、贝格氏病)(Endo,M.等,Clin.Nephrology 55:185-191,2001)、膜肾小球肾炎(Kerjashki,D.,Arch BCellPathol.58:253-71,1990;Brenchley,P.E.等,KidneyInt.,41:933-7,1992;Salant,D.J.等,KidneyInt.35:976-84,1989)、膜增生性肾小球肾炎(系膜毛细管肾小球肾炎)(Bartlow,B.G.等,KidneyInt.15:294-300,1979;Meri,S.等,J.Exp.Med.175:939-50,1992)、急性感染后肾小球肾炎(链球菌后肾小球肾炎)、冷球蛋白血症性肾小球肾炎(Ohsawa,I.等,Clin Immunol.101:59-66,2001)、狼疮肾炎(Gatenby,P.A.,Autoimmunity 11:61-6,1991)和Henoch-Schonlein紫癜肾炎(Endo,M.等,Am.J.KidneyDis.35:401-407,2000)。已经意识到补体参与肾疾病数十年,但对其在肾疾病的发作、发展和消退期中的准确作用仍存在较多讨论。在正常条件下,补体的贡献有益于宿主,但补体的不适当活化和沉积可促进组织损伤。

[0377] 存在大量证据表明,肾小球肾炎,肾小球的炎症,经常通过免疫复合物沉积到肾小球或管结构上起始,其然后触发补体活化、炎症和组织损伤。Kahn和Sinniah证实在取自具有各种形式的肾小球肾炎的患者的活检中C5b-9在管基底膜上的沉积增加(Kahn,T.N.等,Histopath.26:351-6,1995)。在具有IgA肾病的患者的研究中(Alexopoulos,A.等,Nephrol.Dial.Transplant10:1166-1172,1995),C5b-9在管上皮/基底膜结构中的沉积与血浆肌酐水平相关。另一膜肾病的研究证实临床结果和尿sC5b-9水平之间的关系(Kon,S.P.等,KidneyInt.48:1953-58,1995)。sC5b-9水平升高与预后差正相关。Lehto等测量了

CD59(抑制质膜中的膜攻击复合物的补体调节因子)以及在来自具有膜肾小球肾炎的患者的尿中的C5b-9的升高水平(Lehto,T.等,KidneyInt.47:1403-11,1995)。取自这些相同的患者的活检样品的组织病理学分析证实在肾小球中C3和C9蛋白的沉积,而与正常的肾组织相比,CD59在这些组织中的表达减少。这些各种研究表明,进行性的补体-介导的肾小球肾炎导致补体蛋白的尿排泄,其与组织损伤的程度和疾病预后相关。

[0378] 在肾小球肾炎的各种动物模型中补体活化的抑制还证实了补体活化在疾病病因中的重要性。在膜增生性肾小球肾炎(MPGN)的模型中,与C6+正常大鼠相比,在C6-缺陷大鼠(其不能形成C5b-9)中输注抗-Thy1抗血清导致肾小球细胞增殖减少90%、血小板和巨噬细胞浸润减少80%、胶原IV型(肾小球系膜基质扩张的标志物)合成减少、和蛋白尿减少50%(Brandt,J.等,KidneyInt.49:335-343,1996)。这些结果暗示在该大鼠抗-胸腺细胞血清模型中C5b-9作为补体导致的组织损伤的主要介质。在另一肾小球肾炎模型中,输注分级剂量的兔抗-大鼠肾小球基底膜产生多形核白细胞(PMN)的剂量-依赖性流入,其被先前用眼镜蛇毒因子的治疗(以消耗补体)减弱(Scandrett,A.L.等,Am.J.Physiol.268:F256-F265,1995)。眼镜蛇毒因子-治疗的大鼠还显示相比对照大鼠,组织病理减少,长期蛋白尿降低,和更低的肌酐水平。使用三个大鼠GN模型(抗-胸腺细胞血清、Con A抗-Con A和被动Heymann肾炎),Couser等证实通过使用重组sCR1蛋白抑制补体的方法的潜在治疗功效(Couser,W.G.等,J.Am.Soc.Nephrol.5:1888-94,1995)。用sCR1治疗的大鼠显示相比对照大鼠,PMN、血小板和巨噬细胞流入显著减少,系膜溶解和蛋白质尿减少。对补体活化在肾小球肾炎中的重要性的进一步证据通过在NZB/W F1小鼠模型中使用抗-C5 MoAb提供。抗-C5 MoAb抑制C5的裂解,因此阻断C5a和C5b-9的产生。用抗-C5 MoAb继续治疗6个月导致肾小球肾炎的病程显著改善。人源化的抗-C5 MoAb单克隆抗体(5G1.1),其防止人补体组分C5裂解成其促-炎性组分,作为肾小球肾炎的潜在治疗,正处于Alexion Pharmaceuticals,Inc., New Haven,Connecticut的开发中。

[0379] 补体在肾损伤中的病理学作用的直接证据通过研究具有特定补体组分的遗传缺陷的患者来提供。许多报告记载了肾疾病与补体调节因子H的缺陷有关(Ault,B.H., Nephrol.14:1045-1053,2000;Levy,M.,等,Kidney Int.30:949-56,1986;Pickering,M.C.,等,Nat.Genet.31:424-8,2002)。因子H缺陷导致因子B和C3的低的血浆水平和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综合征(HUS)两者均与因子H缺陷有关。因子H缺陷型猪(Jansen,J.H.,等,Kidney Int.53:331-49,1998)和因子H敲除小鼠(Pickering,M.C.,2002)显示MPGN-样症状,证实因子H在补体调节中的重要性。其它补体组分的缺乏与系统性红斑狼疮(SLE)的发生继发的肾疾病有关(Walport,M.J., Davies,等,Ann.N.Y.Acad.Sci.815:267-81,1997)。通过涉及免疫复合物和细胞凋亡物质的不完全清除的机制,C1q、C4和C2的缺乏强烈易于发生SLE。在许多这些SLE患者中发生狼疮肾炎,其特征为免疫复合物的沉积在整个肾小球上。

[0380] 关联补体活化和肾疾病的进一步证据通过鉴定具有针对补体组分的自身抗体的患者来提供,所述补体组分的一些与肾疾病直接相关(Trouw,L.A.,等,Mol.Immunol.38:199-206,2001)。许多这些自身抗体显示与肾疾病的高度相关性,以致术语肾炎因子(NeF)被引入以表示该活性。在临床研究中大约50%的肾炎因子阳性的患者发生MPGN(Spitzer,R.E.,等,Clin.Immunol.Immunopathol.64:177-83,1992)。C3NeF是针对替代途径C3转化酶

(C3bBb)的自身抗体并且它稳定该转化酶,从而促进替代途径活化(Daha,M.R.,等,J.

[0381] Immunol.116:1-7,1976)。同样,对经典途径C3转化酶(C4b2a)具有特异性的自身抗体,称为C4NeF,稳定该转化酶,从而促进经典途径活化(Daha,M.R.等,J.Immunol.125:2051-2054,1980;Halbwachs,L.,等,J.Clin.Invest.65:1249-56,1980)。已经描述抗-C1q自身抗体与SLE患者的肾炎相关(Hovath,L.,等,Clin.Exp.Rheumatol.19:667-72,2001;Siegert,C.,等,J.Rheumatol.18:230-34,1991;Siegert,C.,等,Clin.Exp.Rheumatol.10:19-23,1992),并且这些抗-C1q自身抗体的滴度升高据报道预测肾炎发生(Coremans,I.E.等,Am.J.Kidney Dis.26:595-601,1995)。自SLE患者的尸检肾洗脱的免疫沉积物揭示,这些抗-C1q自身抗体的积聚(Mannick,M.,等,Arthritis Rheumatol.40:1504-11,1997)。所有这些事实指向这些自身抗体的病理学作用。然而,并非所有具有抗-C1q自身抗体的患者发生肾疾病,而且,一些健康个体具有低滴度的抗-C1q自身抗体(Siegert,C.E.,等,Clin.Immunol.Immunopathol.67:204-9,1993)。

[0382] 除了补体活化的替代和经典途径之外,凝集素途径也可在肾疾病中具有重要的病理学作用。MBL、MBL-相关的丝氨酸蛋白酶和补体活化产物的水平升高通过免疫组织化学技术对获自诊断具有几种不同肾疾病包括Henoch-Schonlein紫癜肾炎(Endo,M.,等,Am.J.KidneyDis.35:401-407,2000)、冷球蛋白血症性肾小球肾炎(Ohsawa,I.,等,Clin.Immunol.101:59-66,2001)和IgA肾病(Endo,M.,等,Clin.Nephrology 55:185-191,2001)的患者的肾活检材料进行检测。因此,尽管补体和肾疾病之间的相关性已经知道几十年的事实,但关于补体如何准确影响这些肾疾病的数据远不完善。

[0383] 血液病症

[0384] 脓毒症由患者对侵入的微生物的压倒性反应引起。补系统的主要功能是协调对侵入的细菌和其它病原体的炎性反应。与该生理学作用一致,许多研究中已经证明补体活化在脓毒症的发病机理中具有重要作用(Bone,R.C.,Annals.Internal.Med.115:457-469,1991)。脓毒症的临床表现的定义在不断地发展。脓毒症通常定义为对感染的系统性宿主反应。然而,在许多场合,在具有脓毒性症状的患者中没有发现感染的临床证据(例如,阳性细菌血液培养物)。这种偏差首次在1992年的Consensus Conference中当术语“系统性炎症反应综合征”(SIRS)建立时提出,并且对于该综合征无需确定存在细菌感染(Bone,R.C.,等,Crit.Care Med.20:724-726,1992)。现在广泛认同脓毒症和SIRS伴随不能调节炎性反应。为了简单论述的目的,我们考虑脓毒症的临床定义还包括严重脓毒症、感染性休克和SIRS。

[0385] 在20世纪80年代后期之前,在脓毒性患者中感染的主要来源是革兰氏阴性细菌。脂多糖(LPS),革兰氏阴性细菌细胞壁的主要组分,已知当注入动物时,刺激来自各种细胞类型的炎性介质释放和诱导急性感染性症状(Haeney,M.R.等,Antimicrobial Chemotherapy41(增刊A):41-6,1998)。引人关注的是,致病的微生物谱似乎从20世纪70年代后期和80年代主要的革兰氏阴性细菌变化至目前主要的革兰氏阳性细菌,原因目前尚不清楚(Martin,G.S.等,N.Eng.J.Med.348:1546-54,2003)。

[0386] 许多研究证明,补体活化在介导炎症和促进休克(特别是脓毒性和出血性休克)的特征中的重要性。革兰氏阴性和革兰氏阳性微生物通常都促进感染性休克。LPS是有效的补体活化剂,主要通过替代途径,尽管也出现抗体介导的经典途径活化(Fearon,D.T.等,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,

这两种组分是有效的替代补体途径活化剂,尽管在存在特异性抗体时它们也可激活经典补体途径(Joiner,K.A.等,Ann.Rev.Immunol.2:461-2,1984)。

[0387] 当研究者注意到过敏毒素C3a和C5a介导也可在脓毒症期间发生的各种炎性反应时,在脓毒症的发病机理中最初牵涉到补体系统。这些过敏毒素引起血管舒张和微血管通透性增加,这些事件在感染性休克中起重要作用(Schumacher,W.A.等,Agents Actions 34:345-349,1991)。另外,过敏毒素诱导支气管痉挛、组胺自肥大细胞释放和血小板聚集。此外,它们对粒细胞产生许多作用,例如溶酶体酶的趋化性、聚集、粘连、释放,毒性超氧化物阴离子的产生和白三烯的形成(Shin,H.S.等,Science 162:361-363,1968;Vogt,W.,complement3:177-86,1986)。这些生物学作用被认为在脓毒症的并发症例如休克或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发生中起作用(Hammerschmidt,D.E.等,Lancet 1:947-949,1980;Slotman,G.T.等,Surgery 99:744-50,1986)。此外,过敏毒素C3a的水平升高与脓毒症的致命结果有关(Hack,C.E.等,Am.J.Med.86:20-26,1989)。在一些休克动物模型中,某些补体-缺陷品系(例如,C5-缺陷品系)更耐受LPS输注的影响(Hseuh,W.等,Immunol.70:309-14,1990)。

[0388] 在啮齿动物中发生脓毒症期间用抗体阻断C5a产生已经显示极大改善存活率(Czermak,B.J.等,Nat.Med.5:788-792,1999)。当C5a受体(C5aR)被抗体或小分子抑制剂阻断时,得到类似的发现(Huber-Lang,M.S.等,FASEBJ.16:1567-74,2002;Riedemann,N.C.,等,J.Clin.Invest.110:101-8,2002)。早期在猴中的实验研究表明,C5a的抗体阻断减弱大肠杆菌诱导的感染性休克和成人呼吸窘迫综合征(Hangen,D.H.,等,J.Surg.Res.46:195-9,1989;Stevens,J.H.,等,J.Clin.Invest.77:1812-16,1986)。当与较不严重脓毒性患者和存活者相比,在具有脓毒症的人中,C5a提高并与显著降低的存活率以及多器官衰竭有关(Nakae,H.,等,Res.Commun.Chem.

[0389] Pathol.Pharmacol.84:189-95,1994;Nakae,等,Surg.Today 26:225-29,1996;Bengtson,A.,等,Arch.Surg.123:645-649,1988)。在脓毒症期间C5a产生其有害作用的机制已被较详细地研究,但最近的数据表明在脓毒症期间C5a的产生显著损害血液中性粒细胞的先天性免疫功能(Huber-Lang,M.S.,等,J.Immunol.169:3223-31,2002)、其表现呼吸爆发的能力和其产生细胞因子的能力(Riedemann,N.C.,等,Immunity 19:193-202,2003)。另外,在脓毒症期间C5a产生似乎具有促凝血作用(Laudes,I.J.,等,Am.J.Pathol.160:1867-75,2002)。补体-调节蛋白CI INH也已表明在脓毒症和ARDS动物模型中的功效(Dickneite,G.,BehringIns.Mitt.93:299-305,1993)。

[0390] 凝集素途径在脓毒症的发病机理中也具有作用。MBL已经表明结合许多临床上重要的微生物,包括革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌,和激活凝集素途径(Neth,O.,等,Infect.Immun.68:688,2000)。脂磷壁酸(LTA)越来越被认为是LPS的革兰氏阳性对应物。它是有效的免疫促进剂,其诱导细胞因子从单核吞噬细胞和全血释放(Morath,S.,等,J.Exp.Med.195:1635,2002;Morath,S.,等,Infect.Immun.70:938,2002)。最近证实,L-纤维胶凝蛋白特异性结合自许多革兰氏阳性细菌物种(包括金黄色葡萄球菌)分离的LTA,和激活凝集素途径(Lynch,N.J.,等,J.Immunol.172:1198-02,2004)。MBL还显示结合来自肠球菌的LTA(其中多甘油磷酸链被糖基取代),但不结合来自9个其它物种包括金黄色葡萄球菌的LTA(Polotsky,V.Y.,等,Infect.Immun.64:380,1996)。

[0391] 因此,本发明的一个方面提供通过给予患有脓毒症或由脓毒症产生的病况的受试者在药用载体中包含治疗有效量的MASP-2抑制剂的组合物,治疗脓毒症或由脓毒症产生的病况的方法,所述病况包括而但不限于由脓毒症造成的严重脓毒症、感染性休克、急性呼吸窘迫综合征,和系统性炎症反应综合征。提供治疗其它血液病症的相关方法,所述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)、溶血性尿毒综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)或其它骨髓/血液破坏性病况,即通过给予患有这样的病况的受试者在药用载体中包含治疗有效量的MASP-2抑制剂的组合物。将MASP-2抑制剂经系统性给予所述受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入(特别是在ARDS的情况下)、皮下或其它胃肠外给予,或可能通过口服给予非-肽能药。MASP-2抑制剂组合物可与一种或多种其它治疗剂组合,以抵抗脓毒症和/或休克的后遗症。对于晚期脓毒症或休克或从其中产生的窘迫病况,MASP-2抑制性组合物可合适地以速效剂型给予,例如通过静脉内或动脉内递送包含MASP-2抑制剂组合物的推注溶液。可按医生确定进行重复给予,直至病况得到解决。

[0392] 凝血病

[0393] 已有证据表明补体系统在弥散性血管内凝血("DIC")例如显著身体创伤继发的DIC中的作用。

[0394] 先前的研究表明,C4-/-小鼠不被保护免于肾再灌注损伤。(Zhou,W.,等,"C5b-9在肾缺血/再灌注损伤中的主要作用(Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury),"J Clin Invest 105:1363-1371(2000))。为了研究C4-/-小鼠是否仍可能通过经典或凝集素途径激活补体,在对经典或凝集素途径活化路线特异性的测定法中测量了在C4-/-血浆中的C3更新。尽管当通过经典途径触发活化时未能观察到C3裂解,但观察到在C4缺陷血清中C3的高度有效的凝集素途径-依赖性活化(图30)。可见在甘露聚糖和酵母聚糖上的C3b沉积在MASP-2-/-小鼠中严重受损,甚至在实验条件下,根据许多先前公开的关于替代途径活化的论文,所述条件应对所有三种途径都是允许的。当在用免疫球蛋白复合物代替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-/-血清中但不在C1q耗尽血清中见到C3b沉积和因子B裂解。这指示当初始C3b通过经典活性提供时,在MASP-2-/-血清中促进替代途径活化。令人惊讶的发现,即C3可在C4缺陷血浆中以凝集素途径-依赖性方式有效地被激活。

[0395] 通过用可溶性甘露聚糖或甘露糖预孵育血浆,该"C4旁路"通过抑制凝集素途径-活化而被废除。

[0396] 补体系统的异常的非-免疫活化可能对人是危险的,还可能在血液途径活化中起重要作用,特别是在严重创伤情况中,其中炎性和血液途径被激活。在正常的健康者中,C3转变为总血浆C3蛋白的<5%。在蔓延性感染中,包括败血病和免疫复合物疾病,C3转变以经常低于正常的补体水平的大约30%重建自身,这是由于在库分布中利用和变化增加导致。大于30%的直接C3途径活化通常产生血管舒张和对组织的流体损失的明显的临床证据。高于30%的C3转变,起始机制主要是非-免疫的,由此产生的临床表现有害于患者。补体C5水平在健康和受控制的疾病中显示比C3稳定得多。C5水平显著降低和/或转变与患者对异常多发性损伤(例如,道路交通事故)和可能发生休克性肺综合征的反应有关。因此,补体C3活化超过血管库的30%或任何C5参与,或两者的任何证据可被认为可能是患者中有害病理学

变化的预兆。

[0397] C3和C5两者均释放过敏毒素(C3a和C5a),其作用于肥大细胞和嗜碱粒细胞,释放血管舒张性化学物质。它们设定趋化梯度,以指导多形核细胞(PMN)至免疫扰乱的中心(一种有益的反应),但此处它们不同,因为C5a对这些吞噬细胞具有特异性凝聚(聚集)作用,防止它们随机移动远离反应位点。在感染的正常控制中,C3激活C5。然而,在多发性损伤中,C5似乎被广泛激活,系统性产生C5a过敏毒素。这种不受控制的活性在血管系统内引起多形体凝聚,然后这些凝块被带到肺的毛细血管中,在其中它们阻塞和因为超氧化物释放而产生局部损伤作用。尽管不希望受理论限制,但在急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发病机理中该机制可能是重要的,虽然该观点最近已受到挑战。C3a过敏毒素体外可证明是有效的血小板聚集剂,但它们的体内参与不太确定,并且在伤口修复中血小板物质和纤溶酶的释放可仅次要涉及补体C3。有可能的是,C3活化的延长升高是产生DIC所需要的。

[0398] 除了上述的激活的补体组分的细胞和血管作用(其可解释创伤和DIC之间的关联)外,最新的科学发现鉴定了在补体和凝血系统之间的直接分子关联和功能对话。支持数据获自在C3缺陷小鼠中的研究。因为C3是各补体途径的共有组分,预测C3缺陷小鼠缺少所有的补体功能。然而,令人惊讶的是,C3缺陷小鼠完全能够活化末端补体组分。(Huber-Lang, M.,等,"Generation of C5a in the absence of C3:a new complement activation pathway,"Nat.Med 12:682-687 (2006))。深度研究揭示了末端补体组分的C3-非依赖性活化由凝血酶(凝固级联的限速酶)介导。(Huber等,2006)。在初始补体活化后介导凝血酶活化的分子组分仍然难以理解。

[0399] 本发明人已经阐明了什么是在补体和凝固级联之间对话的分子基础和鉴定MASP-2作为连接这两个系统的重要控制点。对MASP-2的底物特异性的生物化学研究鉴定了除了众所周知的C2和C4补体蛋白之外,凝血酶原为可能的底物。MASP-2在功能相关位点上特异性裂解凝血酶原,产生凝血酶,其为凝固级联限速酶。(Krarup, A.,等,"Simultaneous Activation of Complement and Coagulation by MBL-Associated Serine Protease 2," PLoS. ONE. 2:e623 (2007))。MASP-2产生的凝血酶能够在确定重建的体外系统中促进纤维蛋白沉积,证明MASP-2裂解的功能相关性。(Krarup等,2007)。如下文实施例中所所述的,本发明人进一步通过记录在凝集素途径活化后在正常啮齿动物血清中凝血酶活化,确证了该发现的生理学意义,并证实了该过程通过中和MASP-2单克隆抗体而阻断。

[0400] MASP-2可代表凝集素途径中的重要分支点,能够促进补体和凝血系统二者的活化。因为凝集素途径活化是许多类型的创伤性损伤的生理反应,本发明人认为同时发生的系统性炎症(通过补体组分介导)和弥散性凝血(通过凝血途径介导)可通过MASP-2激活这两个途径的能力来解释。这些发现清楚地表明MASP-2在DIC产生中的作用和MASP-2抑制在治疗或预防DIC中的治疗益处。MASP-2可提供补体和凝血系统之间的分子关联,和凝集素途径的活化,在其在创伤的背景中发生时,可通过MASP-2-凝血酶轴心直接引发凝血系统的活化,提供创伤和DIC之间的机制关联。根据本发明的一个方面,MASP-2的抑制将抑制凝集素途径活化和减少过敏毒素C3a和C5a二者的产生。认为C3活化的延长升高是产生DIC所需要的。

[0401] 微循环凝血(毛细血管和小血管中的斑点血块)在背景例如感染性休克中出现。确定凝集素途径在感染性休克中的作用,如通过实施例17和图18和19中所述的MASP-2(-/-)

脓毒症小鼠模型的受保护表型所证明的。此外,如实施例15和图16A和16B中所证实的, MASP-2 (-/-) 小鼠在弥散性血管内凝血 (DIC) 的局部Schwartzman反应模型 (一种微血管的局部凝血模型) 中得到保护。

[0402] V. MASP-2抑制剂

[0403] 在一个方面中,本发明提供在患有或有风险发生血栓性微血管病的受试者中抑制 MASP-2-依赖性补体活化的方法。MASP-2抑制剂以在活的受试者中有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量给予。在本发明的该方面的实践中,代表性的MASP-2抑制剂包括:抑制MASP-2的生物学活性的分子 (例如小分子抑制剂、抗-MASP-2抗体或与MASP-2相互作用或干扰蛋白-蛋白质相互作用的阻断肽), 和降低MASP-2表达的分子 (例如MASP-2反义核酸分子、MASP-2特异性RNAi分子和MASP-2核酶), 从而防止MASP-2激活凝集素补体途径。MASP-2抑制剂可单独用作主要疗法,或作为辅助疗法与其它治疗剂组合使用以增强其它医学治疗的治疗益处。

[0404] MASP-2-依赖性补体活化的抑制的特征为由于根据本发明的方法给予MASP-2抑制剂而出现的在补体系统的组分中的以下变化的至少一个:MASP-2-依赖性补体活化系统产物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9 (MAC) 的形成或产生的抑制 (例如按实施例2中所述测量); 在溶血测定法中使用未致敏的兔或豚鼠红细胞评价的补体活化减少 (例如按实施例33中所述测量); C4裂解和C4b沉积的减少 (例如按实施例2中所述测量); 或C3裂解和C3b沉积的减少 (例如按实施例2中所述测量)。

[0405] 根据本发明,使用有效抑制MASP-2-依赖性补体活化系统的MASP-2抑制剂。可用于实施本发明的该方面的MASP-2抑制剂包括例如,抗-MASP-2抗体和其片段、MASP-2抑制性肽、小分子、MASP-2可溶性受体和表达抑制剂。MASP-2抑制剂可通过阻断MASP-2的生物功能抑制MASP-2-依赖性补体活化系统。例如,抑制剂可有效阻断MASP-2的蛋白质与蛋白质相互作用,干扰MASP-2二聚化或装配,阻断Ca²⁺结合,干扰MASP-2丝氨酸蛋白酶活性位点或可减少MASP-2蛋白表达。

[0406] 在一些实施方案中, MASP-2抑制剂选择性抑制MASP-2补体活化,保留C1q-依赖性补体活化系统功能完整。

[0407] 在一个实施方案中,用于本发明方法的MASP-2抑制剂是特异性MASP-2抑制剂,其特异性结合包括SEQ ID NO:6的多肽,其亲和力为对补体系统的其它抗原的至少10倍。在另一实施方案中, MASP-2抑制剂特异性结合包括SEQ ID NO:6的多肽,其结合亲和力为对补体系统的其它抗原的至少100倍。MASP-2抑制剂的结合亲和力可使用合适的结合测定法测定。

[0408] MASP-2多肽显示类似于MASP-1、MASP-3和C1r和C1s (C1补体系统的蛋白酶) 的分子结构。SEQ ID NO:4所示的cDNA分子编码MASP-2的一个代表性实例 (由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成) 和提供具有前导序列 (aa 1-15) 的人MASP-2多肽,其在分泌后裂解,产生成熟形式的人MASP-2 (SEQ ID NO:6)。如图2中所示,人MASP2基因包括12个外显子。人MASP-2cDNA由外显子B、C、D、F、G、H、I、J、K和L编码。可变剪接产生20kDa蛋白,称为MBL-相关蛋白19 (“Map19”, 亦称为“sMAP”) (SEQ ID NO:2), 其由自外显子B、C、D和E产生的 (SEQ ID NO:1) 编码,如图2中所示。SEQ ID NO:50所示的cDNA分子编码鼠MASP-2 (由SEQ ID NO:51所示的氨基酸序列组成) 和提供具有前导序列的鼠MASP-2多肽,其在分泌后裂解,产生成熟形式的鼠MASP-2 (SEQ ID NO:52)。SEQ ID NO:53所示的cDNA分子编码大鼠MASP-2 (由SEQ ID NO:

54所示的氨基酸序列组成)和提供具有前导序列的大鼠MASP-2多肽,其在分泌后裂解,产生成熟形式的大鼠MASP-2(SEQ ID NO:55)。

[0409] 本领域技术人员将认识到,SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50和

[0410] SEQ ID NO:53中公开的序列分别表示人、鼠和大鼠MASP-2的单个等位基因,和预期存在等位基因改变和可变剪接。SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:53所示的核苷酸序列的等位基因变体,包括包含沉默突变的那些和其中突变导致氨基酸序列改变的那些,在本发明的范围内。MASP-2序列的等位基因变体可根据标准程序通过探查来自不同个体的cDNA或基因组文库进行克隆。

[0411] 人MASP-2蛋白(SEQ ID NO:6)的结构域显示在图1和2A中,包括N-末端C1r/C1s/海胆Vegf/骨形态发生蛋白(CUBI)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CUBI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。MASP2基因的可变剪接产生图1中所示的MAp19。MAp19是一种非酶蛋白,包含MASP-2的N-末端CUB1-EGF区以及源自外显子E的四个另外的残基(EQSL),如图1中所示。

[0412] 数种蛋白已经显示通过蛋白与蛋白相互作用,与MASP-2结合或相互作用。例如,MASP-2已知与凝集素蛋白MBL、H-纤维胶凝蛋白和L-纤维胶凝蛋白结合和与其形成Ca²⁺依赖性复合物。各MASP-2/凝集素复合物已经显示通过蛋白C4和C2的MASP-2-依赖性裂解激活补体(Ikeda, K.等, J. Biol. Chem. 262:7451-7454, 1987; Matsushita, M., 等, J. Exp. Med. 176:1497-2284, 2000; Matsushita, M., 等, J. Immunol. 168:3502-3506, 2002)。研究表明,MASP-2的CUB1-EGF结构域是MASP-2与MBL缔合所必需的(Thielens, N.M.等, J. Immunol. 166:5068, 2001)。还表明,CUB1EGFCUBII结构域介导MASP-2的二聚化,其是形成活性MBL复合物所需要的(Wallis, R.等, J. Biol. Chem. 275:30962-30969, 2000)。因此,可鉴定结合或干扰已知对MASP-2-依赖性补体活化是重要的MASP-2靶标区的MASP-2抑制剂。

[0413] 抗-MASP-2抗体

[0414] 在本发明的该方面的一些实施方案中,MASP-2抑制剂包括抑制MASP-2-依赖性补体活化系统的抗-MASP-2抗体。用于本发明的该方面的抗-MASP-2抗体包括源自任何产生抗体的哺乳动物的多克隆、单克隆或重组抗体,和可以是多特异性、嵌合的、人源化的、抗-个体型,和抗体片段。抗体片段包括Fab、Fab'、F(ab)2、F(ab')2、Fv片段、scFv片段和单链抗体,如本文进一步描述的。

[0415] 文献中已经描述了数种抗-MASP-2抗体,其中的一些列于下表1中。针对抑制MASP-2-依赖性补体活化系统的能力,可使用本文描述的测定法筛选这些先前描述的抗-MASP-2抗体。例如,已经鉴定了阻断MASP-2依赖性补体活化的抗大鼠MASP-2Fab2抗体,如本文实施例10和11中更详细描述。一旦鉴定起MASP-2抑制剂作用的抗-MASP-2抗体,它可用于产生抗-个体型抗体和用于鉴定其它MASP-2结合分子,如下文进一步描述的。

[0416] 表1:来自文献的MASP-2特异性抗体

[0417]	抗原	抗体类型	参考文献
	重组 MASP-2	大鼠多克隆	Peterson, S.V., 等, <i>Mol. Immunol.</i> 37:803-811, 2000
	重组人 CCP1/2-SP 片段(MoAb 8B5)	大鼠 MoAb (亚型 IgG1)	Moller-Kristensen, M., 等, <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 (亚型 IgG1)	Moller-Kristensen, M., 等, <i>J. of Immunol. Methods</i> 282:159-167, 2003
	hMASP-2	小鼠 MoAb (S/P) 小鼠 MoAb (N-端)	Peterson, S.V., 等, <i>Mol. Immunol.</i> 35:409, April 1998
	hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP 结构域)	大鼠 MoAb: Nimoab101, 通过杂交瘤细胞系 03050904 (ECACC)产生	WO 2004/106384
	hMASP-2 (全长-his 标签)	鼠 MoAbs: 通过杂交瘤细胞系 M0545YM035 (DSMZ) 产生的 NimoAb104 通过杂交瘤细胞系 M0545YM029 (DSMZ) 产生的 NimoAb108 通过杂交瘤细胞系 M0545YM046 (DSMZ) 产生的 NimoAb109 通过杂交瘤细胞系 M0545YM048 (DSMZ) 产生的 NimoAb110	WO 2004/106384

[0418] 具有降低的效应器功能的抗-MASP-2抗体

[0419] 在本发明的该方面的一些实施方案中,抗-MASP-2抗体具有降低的效应器功能,以减少可自经典补体途径的活化产生的炎症。已经显示IgG分子触发经典补体途径的能力位于该分子的Fc部分内(Duncan,A.R.等,Nature332:738-7401988)。其中分子的Fc部分已通过酶裂解被除去的IgG分子没有该效应器功能(参见Harlow,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1988)。因此,具有降低的效应器功能的抗体可因为通过具有使效应器功能最小化的基因工程改造的Fc序列而缺少分子的Fc部分,或属于人IgG2或IgG4同种型而产生。

[0420] 具有降低的效应器功能的抗体可通过IgG重链的Fc部分的标准分子生物学操作产生,如本文实施例9中所述,亦描述于Jolliffe等,Int'lRev.Immunol.10:241-250,1993和Rodrigues等,J.

[0421] Immunol.151:6954-6961,1998。具有降低的效应器功能的抗体还包括人IgG2和IgG4同种型,其激活补体和/或与Fc受体相互作用的能力降低(Ravetch,J.V.等,Annu.Rev.Immunol.9:457-492,1991;Isaacs,J.D.等,J.Immunol.148:3062-3071,1992;van de Winkel,J.G.等,Immunol.Today 14:215-221,1993)。对人MASP-2具有特异性的人源化的或全人抗体,包括IgG2或IgG4同种型,可通过本领域普通技术人员已知的数种方法

之一产生,如描述于Vaughan,T.J.等,Nature Biotechnical 16:535-539,1998。

[0422] 抗-MASP-2抗体的制备

[0423] 抗-MASP-2抗体可使用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)制备。免疫原性肽可以小至5个氨基酸残基。例如,包括SEQ ID NO:6的全部氨基酸序列的MASP-2多肽可用于诱导用于本发明方法的抗-MASP-2抗体。已知参与蛋白-蛋白相互作用的特定MASP-2结构域,例如CUBI和CUBIEGF结构域,以及包括丝氨酸-蛋白酶活性位点的区域,可如实施例3中所述作为重组多肽表达并用作抗原。另外,包括MASP-2多肽(SEQ ID NO:6)的至少6个氨基酸的部分的肽亦可用于诱导MASP-2抗体。用于诱导MASP-2抗体的MASP-2来源的抗原的其它实例提供在下表2中。用于产生抗体的MASP-2肽和多肽可作为天然多肽、或重组或合成肽和催化失活的重组多肽分离,例如MASP-2A,如实施例5-7进一步描述的。在本发明该方面的一些实施方案中,抗-MASP-2抗体使用转基因小鼠品系获得,如实施例8和9中所述和下文进一步描述的。

[0424] 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与麦芽糖-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,所述部分可有利地与大分子载体(例如匙孔**虫**血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或破伤风类毒素)结合或连接用于免疫。

[0425] 表2:MASP-2来源的抗原

[0426]	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	呈失活的突变体形式的丝氨酸-蛋白酶 (SEQ ID NO:6 的 aa 610-625, 具有突变的 Ser 618)
	SEQ ID NO:14 TPLGPKWPEPVFGRL	人 CUBI 肽
	SEQ ID NO:15: TAPPGYRLRLYFTHFDLEL SHLCEYDFVKLSSGAKVL ATLCGQ	人 CUBI 肽
	SEQ ID NO:16: TFRSDYSN	人 CUBI 结构域的 MBL 结合区
	SEQ ID NO:17: FYSLGSSLDITFRSDYSNEK PFTGF	人 CUBI 结构域的 MBL 结合区
	SEQ ID NO:18 IDECQVAPG	EGF 肽
	SEQ ID NO:19 ANMLCAGLES GGKDSCRG DSGGALV	来自丝氨酸-蛋白酶活性位点的肽

[0427] 多克隆抗体

[0428] 针对MASP-2的多克隆抗体可通过使用本领域普通技术人员众所周知的方法用MASP-2多肽或其免疫原部分免疫动物制备。参见例如,Green等,“Production of Polyclonal Antisera,”in Immunochemical Protocols(Manson编辑),第105页,和如实施例6中进一步描述的。MASP-2多肽的免疫原性可通过使用佐剂,包括无机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、普卢兰尼克多元醇、多聚阴离子、油乳剂、匙孔血蓝蛋白和二硝基苯酚而增加。多克隆抗体通常在动物例如马、牛、狗、鸡、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、山羊或绵羊中产生。或者,用于本发明的抗-MASP-2抗体也可源自低于人类的灵长类动物。用于在狒狒中产生诊断和治疗上有用的抗体的一般性技术可见于例如,Goldenberg等,International Patent Publication No.WO 91/11465和Losman, M.J.等,Int.J.Cancer 46:310,1990。然后使用本领域众所周知的标准程序自这样免疫的动物的血液中产生包含免疫活性抗体的血清。

[0429] 单克隆抗体

[0430] 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单克隆抗体具有高度的特异性,针对单一MASP-2表位。如本文所用的,修饰词“单克隆”表示获自基本上均质抗体群的抗体的特征,和不应解释为要求通过任何特定的方法制备抗体。单克隆抗体可使用提供通过连续细胞系培养产生抗体分子的任何技术获得,例如描述于Kohler,G.等,Nature 256:495,1975中的杂交瘤方法,或它们可通过重组DNA方法制备(参见例如,Cabilly的美国专利号4,816,567)。单克隆抗体也可使用描述于Clackson,T.等,Nature 352:624-628,1991和Marks,J.D.等,J.Mol.Biol.222:581-597,1991中的技术自噬菌体抗体库分离。这样的抗体可属于任何免疫球蛋白类型,包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD和其任何亚型。

[0431] 例如,单克隆抗体可通过用包括MASP-2多肽或其部分的组合物注射合适的哺乳动物(例如,BALB/c小鼠)获得。在预定一段时间后,从小鼠取出脾细胞和悬浮在细胞培养基中。然后将脾细胞与永生细胞系融合,形成杂交瘤。将形成的杂交瘤在细胞培养中生长,并筛选它们产生针对MASP-2的单克隆抗体的能力。进一步描述生产抗-MASP-2单克隆抗体的实例提供在实施例7中。(亦参见Current Protocols in Immunology,Vol.1.,John Wiley& Sons,第2.5.1-2.6.7页,1991)。

[0432] 人单克隆抗体可通过使用转基因小鼠获得,所述小鼠已被工程改造以在响应抗原攻击时产生特异性人抗体。在该技术中,将人免疫球蛋白重链和轻链基因座的元件引入源自胚胎干细胞系的小鼠品系中,所述干细胞系包含内源免疫球蛋白重链和轻链基因座的靶向破坏。转基因小鼠可合成对人抗原具有特异性的人抗体,所述抗原例如本文描述的MASP-2抗原,和所述小鼠可用于使用常规的Kohler-Milstein技术,通过融合来自所述动物的B-细胞与合适的骨髓瘤细胞系,产生分泌人MASP-2抗体的杂交瘤,如实施例7中进一步描述的。具有人免疫球蛋白基因组的转基因小鼠是市售可得的(例如,来自Abgenix,Inc.,Fremont,CA和Medarex,Inc.,Annandale,N.J.)。用于自转基因小鼠获得人抗体的方法描述于例如,Green,L.L.等,Nature Genet.7:13,1994;Lonberg,N.等,Nature 368:856,1994;和Taylor,L.D.等,Int.Immun.6:579,1994。

[0433] 单克隆抗体可通过各种充分建立的技术自杂交瘤培养物分离和纯化。这样的分离技术包括用蛋白-A Sepharose的亲色谱、大小排阻色谱和离子交换色谱(参见例如,Coligan第2.7.1-2.7.12页和第2.9.1-2.9.3页;Baines等,“Purification of Immunoglobulin G(IgG)”,于Methods in Molecular Biology,The Humana Press,Inc.,Vol.10,第79-104页,1992)。

[0434] 一旦产生,首先测试多克隆、单克隆或噬菌体来源的抗体的特异性MASP-2结合。本领域技术人员已知的多种测定法可用于检测特异性结合MASP-2的抗体。示例性的测定法包括通过标准方法(例如,描述于Ausubel等)的蛋白质印迹或免疫沉淀分析、免疫电泳、酶联免疫吸附测定法、斑点印迹、抑制或竞争测定法和夹心测定法(如描述于Harlow和Land,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1988)。一旦鉴定特异性结合MASP-2的抗体,用数种测定法例如,凝集素-特异性C4裂解测定法(描述于实施例2)、C3b沉积测定法(描述于实施例2)或C4b沉积测定法(描述于实施例2)中的一种测试抗-MASP-2抗体作为MASP-2抑制剂的能力。

[0435] 抗-MASP-2单克隆抗体的亲和力可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,用于本发明方法的抗-MASP-2单克隆抗体结合MASP-2,其结合亲和力为<100nM,优选地<10nM和最优选地<2nM。在一些实施方案中,用于本发明方法的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,包括(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包括SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包括SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包括SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包括SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包括SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包括SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3;或(II) 其变体,包括与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)的重链可变区和与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。

[0436] 嵌合/人源化抗体

[0437] 用于本发明方法的单克隆抗体包括嵌合抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类型或亚型的抗体的相应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类型或亚型的抗体的相应序列相同或同源;以及这样的抗体的片段(Cabilly的美国专利号4,816,567;和Morrison,S.L.等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 81:6851-6855,1984)。

[0438] 用于本发明的一种形式的嵌合抗体是人源化的单克隆抗-MASP-2抗体。人源化形式的非-人(例如,鼠)抗体是嵌合抗体,其包含源自非-人免疫球蛋白的最小序列。人源化的单克隆抗体通过转移来自小鼠免疫球蛋白的重和轻可变链的非-人(例如,小鼠)互补决定区(CDR)至人可变结构域产生。通常,然后将人抗体的残基置换到非-人对应物的框架区。此外,人源化的抗体可包括在受体抗体或供体抗体中不存在的残基。可进行这些修饰以进一步精修抗体性能。通常,人源化的抗体将包括基本上所有的至少一个和通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环对应于非-人免疫球蛋白的那些,并且所有或基本上所有的Fv框架区为人免疫球蛋白序列的那些。人源化的抗体任选还将包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常为人免疫球蛋白的恒定区。对于进一步的细节,参见Jones,P.T.等,Nature 321:522-525,1986;Reichmann,L.,等,Nature 332:323-329,1988;和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596,1992。

[0439] 用于本发明的人源化抗体包括包含至少MASP-2结合CDR3区的人单克隆抗体。另外,Fc部分可经替换以产生IgA或IgM以及人IgG抗体。这样的人源化抗体将具有特定的临床用处,因为它们将特异性识别人MASP-2,但在人中不针对抗体本身引发免疫反应。因此,它们更好地适合于在人中体内给予,尤其是当需要重复或长期给予时。

[0440] 自鼠抗-MASP-2单克隆抗体产生人源化的抗-MASP-2抗体的实例提供在本文的实施例6中。用于产生人源化的单克隆抗体的技术还描述于例如,Jones,P.T.等,Nature 321:522,1986;Carter,P.,等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 89:4285,1992;Sandhu,J.S.,Crit.Rev.Biotech.12:437,1992;Singer,I.I.等,J.Immun.150:2844,1993;Sudhir(编辑),Antibody Engineering Protocols,Humana Press,Inc.,1995;Kelley,"Engineering

Therapeutic Antibodies”,于Protein Engineering:Principles and Practice,Cleland等(编辑),John Wiley&Sons,Inc.,第399-434页,1996;和Queen的美国专利号5,693,762,1997。另外,存在从特异性鼠抗体区合成人源化抗体的商业机构,例如Protein Design Labs(Mountain View,CA)。

[0441] 重组抗体

[0442] 抗-MASP-2抗体还可使用重组方法制备。例如,人抗体可使用人免疫球蛋白表达文库(可获自例如,Stratagene,Corp.,La Jolla,CA)制备,以产生人抗体的片段(VH、VL、Fv、Fd、Fab或F(ab')₂)。这些片段然后用于使用类似于用于产生嵌合抗体的技术,构建完整的人抗体。

[0443] 抗-个体型抗体

[0444] 一旦抗-MASP-2抗体经鉴定具有所需的抑制活性,这些抗体可用于使用本领域众所周知的技术产生抗-个体型抗体,其模拟MASP-2的一部分。参见例如,Greenspan,N.S.等,FASEBJ.7:437,1993。例如,结合MASP-2和竞争抑制补体活化所需的MASP-2蛋白相互作用的抗体可用于产生抗-个体型,其模拟在MASP-2蛋白上的MBL结合位点,因此结合并中和MASP-2的结合配体,例如MBL。

[0445] 免疫球蛋白片段

[0446] 用于本发明方法的MASP-2抑制剂不仅包括完整的免疫球蛋白分子,而且包括众所周知的片段,包括Fab、Fab'、F(ab)₂、F(ab')₂和Fv片段、scFv片段、双抗体、线性抗体、单链抗体分子和从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0447] 本领域众所周知,仅抗体分子的一小部分(互补位)参与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器,但不参与抗原结合。pFc'区从其经过酶裂解的抗体或没有pFc'区而产生的抗体,被称为F(ab')₂片段和保留完整抗体的两个抗原结合位点。分离的F(ab')₂片段因为其两个抗原结合位点而被称为二价单克隆片段。类似地,Fc区从其经过酶裂解的抗体或没有Fc区而产生的抗体,被称为Fab片段和保留完整抗体分子的一个抗原结合位点。

[0448] 抗体片段可通过蛋白水解获得,例如通过常规方法用胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体。例如,抗体片段可通过用胃蛋白酶经酶裂解抗体得到称为F(ab')₂的5S片段产生。该片段可使用巯基还原剂进一步裂解以产生3.5S Fab'单价片段。任选地,裂解反应可使用二硫键裂解产生的巯基的封闭基团进行。或者,使用胃蛋白酶经酶裂解直接产生两个单价Fab片段和Fc片段。这些方法描述于例如,Goldenberg的美国专利号4,331,647;Nisonoff,A.等,Arch.Biochem.Biophys.89:230,1960;Porter,R.R.,Biochem.J.73:119,1959;Edelman等,于Methods in Enzymology 1:422,Academic Press,1967;和Coligan第2.8.1-2.8.10和2.10.-2.10.4页。

[0449] 在一些实施方案中,优选使用缺少Fc区的抗体片段,以避免经典补体途径的活化,经典补体途径在Fc与Fc γ 受体结合时起始。存在数种可产生避免Fc γ 受体相互作用的MoAb的方法。例如,单克隆抗体的Fc区可使用蛋白水解酶部分消化(例如无花果蛋白酶消化)经化学除去,从而产生例如,抗原-结合抗体片段例如Fab或F(ab)₂片段(Mariani,M.等,Mol.Immunol.28:69-71,1991)。或者,人 γ 4IgG同种型,其不结合Fc γ 受体,可在构建人源

化抗体期间使用,如本文所述。缺少Fc结构域的抗体、单链抗体和抗原-结合结构域也可使用本文描述的重组技术经工程改造。

[0450] 单链抗体片段

[0451] 或者,可创建对MASP-2具有特异性的单一肽链结合分子,其中连接重链和轻链Fv区。Fv片段可通过肽接头连接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括通过寡核苷酸连接的编码VH和VL结构域的DNA序列的结构基因制备。结构基因插入到表达载体,其随后引入至宿主细胞,例如大肠杆菌。重组宿主细胞合成具有桥接两个V结构域的接头肽的单一多肽链。用于产生scFvs的方法描述于例如,Whitlow等,"Methods: A Companion to Methods in Enzymology"2:97,1991;Bird等,Science 242:423,1988;Ladner的美国专利号4,946,778;Pack,P.,等,Bio/Technology 11:1271,1993。

[0452] 作为说明性的实例,MASP-2特异性scFv可通过将淋巴细胞体外暴露于MASP-2多肽,和在噬菌体或类似的载体中选择抗体展示文库获得(例如,通过使用固定的或标记的MASP-2蛋白或肽)。编码具有潜在的MASP-2多肽结合结构域的多肽的基因可通过筛选展示在噬菌体或细菌例如大肠杆菌上的随机肽文库获得。这些随机肽展示文库可用于筛选与MASP-2相互作用的肽。用于产生和筛选这样的随机肽展示文库的技术是本领域众所周知的(Lardner的美国专利号5,223,409;Ladner的美国专利号4,946,778;Lardner的美国专利号5,403,484;Lardner的美国专利号5,571,698;和Kay等,Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press,Inc.,1996),随机肽展示文库和用于筛选这样的文库的试剂盒可市售获得,例如得自CLONTECH Laboratories,Inc.(Palo Alto,Calif.)、Invitrogen Inc.(San Diego,Calif.)、New England Biolabs,Inc.(Beverly,Mass.)和Pharmacia LKB Biotechnology Inc.(Piscataway,N.J.)。

[0453] 用于本发明的该方面的另一种形式的抗-MASP-2抗体片段是编码结合MASP-2抗原上的表位和抑制MASP-2-依赖性补体活化的单一互补决定区(CDR)的肽。CDR肽("最小识别单位")可通过构建编码目的抗体的CDR的基因获得。这样的基因,例如,通过使用聚合酶链反应从产生抗体的细胞的RNA合成可变区制备(参见例如,Larrick等,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(编辑),第166页,Cambridge University Press,1995;和Ward等"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies",于Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birch等(编辑),第137页,Wiley-Liss, Inc.,1995)。

[0454] 将本文描述的MASP-2抗体给予有需要的受试者以抑制MASP-2-依赖性补体活化。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂是高-亲和力人或人源化的单克隆抗-MASP-2抗体,具有降低的效应器功能。

[0455] 肽抑制剂

[0456] 在本发明的该方面的一些实施方案中,MASP-2抑制剂包括分离的MASP-2肽抑制剂,其包括抑制MASP-2-依赖性补体活化系统的分离的天然肽抑制剂和合成的肽抑制剂。如本文所用的,术语"分离的MASP-2肽抑制剂"是指抑制MASP-2依赖性补体活化的肽,其通过与凝集素途径的另一识别分子结合、与MASP-2竞争结合凝集素途径的另一识别分子(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/或直接与MASP-2相互作用以抑制MASP-2-依赖性补体活化,其是基本上纯的,并且基本上不含它们在自然界中可能一起存在的其它物质至对其预期应用实际和合适的程度。

[0457] 肽抑制剂已经在体内成功用于干扰蛋白-蛋白相互作用和催化位点。例如,结构上涉及LFA-1的粘连分子的肽抑制剂最近已获批准用于凝血病的临床应用(Ohman,E.M.,等,European Heart J.16:50-55,1995)。已经描述了防止或干扰整联蛋白-依赖性粘连的短的线性肽(<30个氨基酸)(Murayama,O.等,J.Biochem.120:445-51,1996)。较长的肽,长度范围为25-200个氨基酸残基,已经成功用于阻断整联蛋白-依赖性粘连(Zhang,L.等,J.Biol.Chem.271(47):29953-57,1996)。通常,较长的肽抑制剂具有比短肽更高的亲和力和/或更慢的解离速率,因此可能是更有效的抑制剂。已经显示环状肽抑制剂是用于治疗人炎症疾病的整联蛋白的体内有效抑制剂(Jackson,D.Y.等,J.Med.Chem.40:3359-68,1997)。产生环状肽的一种方法包括合成其中肽的末端氨基酸是半胱氨酸的肽,从而允许肽通过在末端氨基酸之间的二硫键以环状形式存在,这已经表明改进亲和力和体内半寿期用于治疗生血肿瘤(例如,Larson的美国专利号6,649,592)。

[0458] 合成的MASP-2肽抑制剂

[0459] 用于本发明的该方面的方法的MASP-2抑制性肽通过模拟对MASP-2功能重要的靶标区的氨基酸序列举例说明。用于本发明的方法的实践的抑制性肽的大小范围是约5个氨基酸至约300个氨基酸。表3提供示例性的抑制性肽的列表,其可用于实践本发明的该方面。可在数种测定法之一中,包括例如,凝集素特异性C4裂解测定法(描述于实施例2)和C3b沉积测定法(描述于实施例2),测试候选的MASP-2抑制性肽起MASP-2抑制剂作用的能力。

[0460] 在一些实施方案中,MASP-2抑制性肽源自MASP-2多肽和选自全长成熟MASP-2蛋白(SEQ ID NO:6),或选自MASP-2蛋白的特定的结构域,例如CUBI结构域(SEQ ID NO:8)、CUBIEGF结构域

[0461] (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)。如之前描述的,CUBIEGFCUBII区已经表明对于二聚化和与MBL结合是必需的(Thielens等,同上)。具体而言,在鉴定带有在Asp105处纯合突变为Gly105的人的研究中,MASP-2的CUBI结构域中的肽序列TFRSDYN(SEQ ID NO:16)已经表明参与结合MBL,导致MASP-2从MBL复合物丢失(Stengaard-Pedersen,K.等,New England J. Med. 349:554-560,2003)。

[0462] 在一些实施方案中,MASP-2抑制性肽源自结合MASP-2和参与凝集素补体途径的凝集素蛋白。已经鉴定了参与该途径的数种不同的凝集素,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,J.Biol.Chem.262:7451-7454,1987;Matsushita,M.,等,J.Exp.Med.176:1497-2284,2000;Matsushita,M.,等,J.Immunol.168:3502-3506,2002)。这些凝集素作为同型三聚亚基的寡聚体存在于血清中,各自具有N-末端胶原-样纤维,其具有碳水化合物识别结构域。这些不同的凝集素已经显示结合MASP-2,和凝集素/MASP-2复合物通过蛋白C4和C2的裂解激活补体。H-纤维胶凝蛋白具有24个氨基酸的氨基-末端区、具有11个Gly-Xaa-Yaa重复的胶原-样结构域、12个氨基酸的颈结构域和207个氨基酸的纤维蛋白原-样结构域(Matsushita,M.等,J.Immunol.168:3502-3506,2002)。H-纤维胶凝蛋白结合GlcNAc和凝集用源自鼠伤寒沙门氏菌(S.Typhimurium)、明尼苏达沙门氏菌(S.Minnesota)和大肠杆菌的LPS包被的人红细胞。H-

纤维胶凝蛋白已经显示与MASP-2和MAp19缔合,激活凝集素途径(同前)。L-纤维胶凝蛋白/P35还结合GlcNAc和已经显示与人血清中的MASP-2和MAp19缔合,和该复合物已经显示激活凝集素途径(Matsushita,M.等,J.Immunol.164:2281,2000)。因此,用于本发明的MASP-2抑制性肽可包括选自MBL蛋白(SEQ ID NO:21)、H-纤维胶凝蛋白(Genbank检索号NM_173452)、M-纤维胶凝蛋白(Genbank检索号000602)和L-纤维胶凝蛋白(Genbank检索号NM_015838)的至少5个氨基酸的区。

[0463] 更特别地,科学家已经鉴定在MBL上的MASP-2结合位点,其在12个Gly-X-Y三联体“GKD GRD GTK GEK GEP GQG LRG LQG POG KLG POGNOGPSG SOG PKG QKG DOG KS”(SEQ ID NO:26)内,位于MBP的胶原-样结构域的C-末端部分的铰链和颈区之间(Wallis,R.等,J.Biol.Chem.279:14065,2004)。该MASP-2结合位点区在人H-纤维胶凝蛋白和人L-纤维胶凝蛋白中亦是高度保守的。已经描述了存在于所有三种凝集素蛋白中的共有结合位点,包括氨基酸序列“OGK-X-GP”(SEQ ID NO:22),其中字母“O”表示羟基脯氨酸和字母“X”是疏水残基(Wallis等,2004,同上)。因此,在一些实施方案中,用于本发明的该方面的MASP-2抑制性肽为至少6个氨基酸长,并包括SEQ ID NO:22。源自MBL的肽,其包括氨基酸序列“GLR GLQ GPQ GKL GPQ G”(SEQ ID NO:24),已经显示体外结合MASP-2(Wallis等,2004,同上)。为增强与MASP-2的结合,可合成在各末端上侧连两个GPQ三联体的肽(“GPQ GPQ GLR GLQ GPQ GKL GPQ GGP OGP O”(SEQ ID NO:25),以提高三重螺旋的形成,如天然MBL蛋白中发现的那样(进一步描述于Wallis,R.等,J.Biol.Chem.279:14065,2004)。

[0464] MASP-2抑制性肽还可源自人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 GPQ GPQ GKM GPK GEO GDO”(SEQ ID NO:27)。还包括源自人L-纤维胶凝蛋白的肽,其包括来自在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 GPQ GPQ GKA GPQ GPN GAO GEO”(SEQ ID NO:28)。

[0465] MASP-2抑制性肽还可源自C4裂解位点,例如“LQRALEILPNRVTIKANRPFLVFI”(SEQ ID NO:29),其是与抗凝血酶III的C-末端部分连接的C4裂解位点(Glover,G.I.等,Mol.Immunol.25:1261(1988))。

[0466] 表3:示例性的MASP-2抑制性肽

[0467]	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)

[0468]

SEQ ID NO	来源
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 M _{Ap} 19
SEQ ID NO:21	人 MBL 蛋白
SEQ ID NO:22 OGK-X-GP, 其中"O" = 羟基脯氨酸 和"X"是疏水氨基酸残基	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	证实与 MASP-2 结合的人 MBP 三联体 6-10-
SEQ ID NO:25 GPOGPOGLRGLQGPO GKLGPOGGPOGPO	人 MBP 三联体, 加入 GPO 以提高三重螺旋的形成
SEQ ID NO:26 GKDGRDGTKGEKGEP GQGLRGLQGPOGKLG POGNOGPSGSOGPKG QKGDOGKS	人 MBP 三联体 1-17
SEQ ID NO:27 GAOGSOGKEKGAOGPQ GPOGPOGKMGPKGEO GDO	人 H-纤维胶凝蛋白(Hataka)
SEQ ID NO:28 GCOGLOGAOGDKGE AGTNGKRGERGPOGP OGKAGPOGPNGAOGEO O	人 L-纤维胶凝蛋白 P35
SEQ ID NO:29 LQRALEILPNRVTIKA NRPFLVFI	人 C4 裂解位点

[0469] 注意:字母"O"表示羟基脯氨酸。字母"X"是疏水残基。

[0470] 源自C4裂解位点的肽以及抑制MASP-2丝氨酸蛋白酶位点的其它肽可经化学修饰,以致它们是不可逆的蛋白酶抑制剂。例如,合适的修饰可包括但不限于在C-末端、Asp或Glu或附加到官能侧链上的卤代甲基酮(Br、Cl、I、F);在氨基或其它官能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在官能侧链上包含环氧化物或亚胺的基团;或在氨基或羧基末端上或在官能侧链上的亚胺酸酯。这样的修饰将提供通过肽的共价连接而永久抑制酶的益处。这可导致较低的有效剂量和/或需要较低频率给予肽抑制剂。

[0471] 除了上文所述的抑制性肽之外,用于本发明方法的MASP-2抑制性肽包括包含如本文所述获得的抗-MASP-2MoAb的MASP-2-结合CDR3区的肽。用于合成肽的CDR区的序列可通

过本领域已知的方法确定。重链可变区是通常范围为100-150个氨基酸长的肽。轻链可变区是通常范围为80-130个氨基酸长的肽。在重链和轻链可变区内的CDR序列仅包括大约3-25个氨基酸的序列,其可容易地由本领域普通技术人员测序。

[0472] 本领域技术人员将认识到,上述的MASP-2抑制性肽的基本上同源变体也将显示MASP-2抑制活性。示例性的变体包括但不必然限于在所述主题肽的羧基末端或氨基末端部分上具有插入、缺失、置换和/或另外的氨基酸的肽和其混合物。因此,具有MASP-2抑制活性的那些同源肽被认为可用于本发明的方法。所述的肽还可包括重复基序和具有保守置换的其它修饰。保守变体在本文他处有所描述,包括氨基酸交换为具有类似电荷、大小或疏水性等的另一氨基酸。

[0473] MASP-2抑制性肽可经修饰以增加溶解度和/或使正电荷或负电荷最大化,以更接近地模拟完整蛋白中的区段。衍生物可以具有或不具有确切的本文公开的肽的一级氨基酸结构,只要衍生物在功能上保留所需的MASP-2抑制性质。修饰可包括用通常已知的20种氨基酸之一或用另一种氨基酸、用具有辅助需要特性(例如抵抗酶降解)的衍生的或取代的氨基酸或用D-氨基酸的氨基酸置换,或用另一种模拟一个氨基酸、多个氨基酸或肽的天然构象和功能的分子或化合物例如碳水化合物置换;氨基酸缺失;用通常已知的20种氨基酸之一或用另一种氨基酸、用具有辅助需要特性(例如抵抗酶降解)的衍生的或取代的氨基酸或用D-氨基酸的氨基酸插入,或用另一种模拟一个氨基酸、多个氨基酸或肽的天然构象和功能的分子或化合物例如碳水化合物置换;或用另一种模拟母体肽的天然构象、电荷分布和功能的分子或化合物例如碳水化合物或核酸单体置换。肽还可通过乙酰化或酰胺化修饰。

[0474] 衍生物抑制性肽的合成可依赖于已知的肽生物合成、碳水化合物生物合成等技术。作为起点,技术人员可依赖于合适的计算机程序以确定目的肽的构象。一旦获知本文公开的肽的构象,则技术人员可以合理的设计方式确定可在一个或多个位点上进行什么类型的置换,以形成保留母体肽的基本构象和荷电分布但可具有母体肽中不存在或比母体肽中存在的那些提高的特性的衍生物。一旦候选衍生分子被鉴定,所述衍生物可使用本文描述的测定法经测试以确定它们是否作为MASP-2抑制剂起作用。

[0475] 筛选MASP-2抑制性肽

[0476] 还可使用分子建模和合理分子设计以产生和筛选模拟MASP-2的关键结合区的分子结构和抑制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,以及已知对MASP-2功能是重要的靶标区,包括二聚化所需要的区、参与结合MBL的区和丝氨酸蛋白酶活性位点,如先前所述。用于鉴定结合特定靶标的肽的方法是本领域众所周知的。例如,分子印迹可用于从头构建大分子结构,例如结合特定分子的肽。参见例如,Shea,K.J.,*"Molecular Imprinting of Synthetic Network Polymers: The De Novo synthesis of Macromolecular Binding and Catalytic Sites,"*TRIP2(5)1994。

[0477] 作为说明性的实例,一种制备MASP-2结合肽的模拟物的方法如下。将显示MASP-2抑制的已知的MASP-2结合肽或抗-MASP-2抗体的结合区的功能单体(模板)聚合。然后除去模板,接着在模板留下的空隙中聚合第二类单体,以提供显示类似于模板的一个或多个所需性质的新分子。除了以这种方式制备肽之外,也可制备作为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、脂质和其它

生物活性物质。该方法可用于设计比它们的天然对应物更稳定的各种生物模拟物,因为它们通常通过功能单体的自由基聚合制备,产生具有不可生物降解的主链的化合物。

[0478] 肽合成

[0479] MASP-2抑制性肽可使用本领域众所周知的技术制备,例如固相合成技术,其最初由Merrifield在J.Amer.Chem.Soc.85:2149-2154,1963中描述。自动合成可例如,按照制造商提供的说明书使用Applied Biosystems 431A肽合成仪(Foster City,Calif.)实现。其它技术可见于例如,Bodanszky,M.等,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文献。

[0480] 肽还可使用本领域技术人员已知的标准基因工程改造技术制备。例如,肽可经酶促产生:将编码肽的核酸插入表达载体,表达DNA和在存在需要的氨基酸的情况下翻译DNA成肽。然后使用色谱或电泳技术,或借助可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与肽融合和随后从肽裂解的载体蛋白将肽纯化。融合蛋白-肽可使用色谱、电泳或免疫学技术(例如通过载体蛋白的抗体与树脂结合)分离。肽可使用化学方法或经酶,例如水解酶裂解。

[0481] 可用于本发明方法的MASP-2抑制性肽还可在重组宿主细胞中按常规技术产生。为了表达MASP-2抑制性肽编码序列,编码所述肽的核酸分子必须与在表达载体中控制转录表达的调节序列可操作连接,然后引入至宿主细胞。除了转录调节序列例如启动子和增强子之外,表达载体可包括翻译调节序列和标记物基因,其适合于选择带有表达载体的细胞。

[0482] 编码MASP-2抑制性肽的核酸分子可用“基因机器”使用方案例如磷酸亚胺酸酯方法合成。如果化学合成的双链是应用例如合成基因或基因片段需要的,则各互补链单独制备。短基因(60-80个碱基对)的产生在技术上是简单的,可通过合成互补的链然后将它们退火实现。对于产生较长的基因,将合成的基因(双链)以模块形式从20-100个核苷酸长的单链片段装配。对于有关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,Annu.Rev.Biochem.53:323,1984;和Climie,S.等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 87:633,1990。

[0483] 小分子抑制剂

[0484] 在一些实施方案中,MASP-2抑制剂是具有低分子量的小分子抑制剂,包括天然和合成物质,例如肽、拟肽和非肽抑制剂(包括寡核苷酸和有机化合物)。MASP-2的小分子抑制剂可基于抗-MASP-2抗体的可变区的分子结构产生。

[0485] 小分子抑制剂还可根据MASP-2晶体结构使用计算机药物设计而设计和产生(Kuntz I.D.等,Science 257:1078,1992)。已经描述了大鼠MASP-2的晶体结构(Feinberg,H.,等,EMBOJ.22:2348-2359,2003)。使用Kuntz等描述的方法,MASP-2晶体结构坐标用作计算机程序例如DOCK的输入,其输出预期结合MASP-2的小分子结构的列表。这样的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评价在Cambridge Crystallographic数据库中存在的化合物与酶的结合位点的配合度,HIV-1蛋白酶抑制剂的晶体结构用于鉴定作为HIV-1蛋白酶抑制剂的独特的非肽配体(Kuntz,I.D.等,J.Mol.Biol.161:269-288,1982;DesJarlais,R.L.,等,PNAS 87:6644-6648,1990)。

[0486] 通过计算机方法鉴定为潜在的MASP-2抑制剂的小分子结构的列表使用MASP-2结

合测定法,例如实施例10中描述的测定法进行筛选。然后在功能测定法例如实施例2中描述的测定法中测定发现结合MASP-2的小分子,以确定它们是否抑制MASP-2-依赖性补体活化。

[0487] MASP-2可溶性受体

[0488] 认为其它合适的MASP-2抑制剂包括MASP-2可溶性受体,其可使用本领域普通技术人员已知的技术产生。

[0489] MASP-2的表达抑制剂

[0490] 在本发明的该方面的另一实施方案中,MASP-2抑制剂是MASP-2表达抑制剂,其能够抑制MASP-2-依赖性补体活化。在本发明的该方面的实施中,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-2RNAi分子。

[0491] 反义RNA和DNA分子用于通过与MASP-2mRNA杂交和阻止MASP-2蛋白的翻译直接阻断MASP-2mRNA的翻译。反义核酸分子可以许多不同的方式构建,条件是它能够干扰MASP-2的表达。例如,反义核酸分子可通过相对于其正常转录取向,使MASP-2cDNA(SEQ ID NO:4)的编码区(或其一部分)反转来构建,以允许转录其互补物。

[0492] 反义核酸分子通常与一个或多个靶基因的至少一部分基本上相同。然而,核酸不需要完全相同以抑制表达。通常,较高的同源性可用于补偿较短的反义核酸分子的使用。最小的百分比同一性通常大于约65%,但较高的百分比同一性可对内源序列的表达产生更有效阻遏。超过约80%的显著较大的百分比同一性通常是优选的,尽管约95%的绝对同一性通常是最优选的。

[0493] 反义核酸分子不需要具有与靶基因相同的内含子或外显子模式,和靶基因的非编码区段可与编码区段同样在实现靶基因表达的反义阻遏中有效。至少约8个左右的核苷酸的DNA序列可用作反义核酸分子,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与由SEQ ID NO:4所示的核酸序列组成的MASP-2cDNA的互补序列具有至少90%同一性的反义MASP-2核酸分子。SEQ ID NO:4所示的核酸序列编码由SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列组成的MASP-2蛋白。

[0494] 反义寡核苷酸靶向结合MASP-2mRNA是可用于降低MASP-2蛋白合成水平的另一机制。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被针对它们各自的mRNA序列的反义寡核苷酸抑制(Cheng的美国专利号5,739,119和Shewmaker的美国专利号5,759,829)。此外,反义抑制的实例用核蛋白细胞周期蛋白、多药抗性基因(MDG1)、ICAM-1、E-选择蛋白、STK-1、纹状体GABA_A受体和人EGF得到证实(参见例如,Baracchini的美国专利号5,801,154;Baker的美国专利号5,789,573;Considine的美国专利号5,718,709;和Reubenstein的美国专利号5,610,288)。

[0495] 已经描述了允许普通技术人员确定哪些寡核苷酸可用于本发明的系统,其包括使用Rnase H裂解作为转录物内的序列的可及性的指示剂,探查在靶标mRNA中的合适位点。Scherr,M.等,NucleicAcids Res.26:5079-5085,1998;Lloyd,等,NucleicAcidsRes.29:3665-3673,2001。将与MASP-2转录物的某些区互补的反义寡核苷酸的混合物加入至表达MASP-2的细胞提取物中,例如肝细胞,和杂交以产生RNaseH易感位点。该方法可与计算机辅助的序列选择组合,所述计算机辅助的序列选择可根据它们形成二聚体、发夹结构或其它二级结构的相对能力预测反义组合物的最佳序列选择,所述二级结构将降低或抑制与在宿

主细胞中的靶标mRNA特异性结合。这些二级结构分析和靶标位点选择考虑可使用OLIGO引物分析软件 (Rychlik, I., 1997) 和BLASTN 2.0.5算法软件 (Altschul, S.F., 等, Nucl. Acids Res. 25:3389-3402, 1997) 进行。针对靶标序列的反义化合物优选地包括约8-约50个核苷酸长度。包括约9-约35个左右核苷酸的反义寡核苷酸是特别优选的。本发明人考虑了对于实施本发明的基于反义寡核苷酸的方法, 范围为9-35个核苷酸 (即, 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个左右碱基长的那些) 的所有寡核苷酸组合物是高度优选的。MASP-2mRNA的高度优选的靶标区是在AUG翻译起始密码子处或其附近的那些, 和与mRNA的5'区基本上互补的那些序列, 例如, 在MASP-2基因核苷酸序列 (SEQ ID NO:4) 的-10和+10区之间。示例性的MASP-2表达抑制剂提供在表4中。

[0496] 表4:MASP-2的示例性的表达抑制剂

[0497]	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'CGGGCACACCATGAGGCTGCTG ACCCTCCTGGGC3	SEQ ID NO:4 的核苷酸 12-45, 包括 MASP-2 翻译起始位点(有义)
	SEQ ID NO:32 5'GACATTACCTTCCGCTCCGACTC CAACGAGAAG3'	SEQ ID NO:4 的核苷酸 361-396, 编码包 括 MASP-2 MBL 结合位点的区(有义)
[0498]	SEQ ID NO:33 5'AGCAGCCCTGAATACCCACGGCC GTATCCCAA3'	SEQ ID NO:4 的核苷酸 610-642, 编码包 括 CUBII 结构域的区域

[0499] 如上文所述, 如本文所用的术语“寡核苷酸”是指核糖核酸 (RNA) 或脱氧核糖核酸 (DNA) 或其模拟物的寡聚体或聚合物。该术语还涵盖那些寡核苷碱基, 包含天然存在的核苷酸、糖和共价核苷间 (主链) 键以及具有非-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不能提供的某些需要的性质, 例如毒性降低、针对核酸酶降解的稳定性增加和细胞摄取增加。在说明性的实施方案中, 本发明的反义化合物不同于天然DNA之处在于修饰磷酸二酯主链以延长反义寡核苷酸的寿命, 所述反义寡核苷酸中的磷酸酯取代基被置换为硫代磷酸酯。同样, 寡核苷酸的一个或两个末端可被一个或多个吡啶衍生物取代, 其嵌入在核酸链内的邻近的碱基对之间。

[0500] 反义的另一选择方案是使用“RNA干扰”(RNAi)。双链RNA(dsRNA)可在哺乳动物体内引起基因沉默。RNAi的天然功能和共阻遏似乎是基因组针对移动性遗传元件例如反转座子和病毒入侵的保护, 所述遗传元件当变得具有活性时在宿主细胞中产生异常RNA或dsRNA (参见例如, Jensen, J., 等, Nat. Genet. 21:209-12, 1999)。双链RNA分子可通过合成能够形成双链RNA分子的两条RNA链制备, 每条链具有约19至25 (例如, 19-23个核苷酸) 的长度。例如, 用于本发明方法的dsRNA分子可包括对应于表4中所列的序列和其互补序列的RNA。优选地, RNA的至少一条链具有1-5个核苷酸的3'突出。合成的RNA链在形成双链分子的条件下载并。RNA序列可包括SEQ ID NO:4的至少8个核苷酸的部分, 其总长度为25个核苷酸或更小。设计给定靶标的siRNA序列在本领域普通技术的范围内。可使用设计siRNA序列和保证表达至少70%敲减的商业化服务 (Qiagen, Valencia, Calif)。

[0501] dsRNA可作为药物组合物给予和通过已知方法进行, 其中将核酸引入至所需的靶

细胞中。通常使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。这样的方法在Ausubel等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1993中教导。

[0502] 核酶也可用于降低MASP-2的量和/或生物活性,例如靶向MASP-2mRNA的核酶。核酶是催化性RNA分子,其可裂解具有完全或部分与核酶序列同源的序列的核酸分子。有可能设计编码RNA核酶的核酶转基因,其特异性地与靶标RNA配对和在特定位置上裂解磷酸二酯主链,从而在功能上灭活靶标RNA。在进行这种裂解时,核酶本身不改变,因此能够循环和裂解其它分子。在反义RNA内包含核酶序列,赋予它们RNA-裂解活性,从而增加反义构建体的活性。

[0503] 用于实施本发明的核酶通常包括至少约9个核苷酸的杂交区,其在核苷酸序列上与靶标MASP-2mRNA的至少一部分互补;和催化区,其适合裂解靶标MASP-2mRNA(通常参见EPA No.0321 201;W088/04300;Haseloff, J.等, *Nature* 334:585-591, 1988;Fedor, M.J., 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1668-1672, 1990;Cech, T.R., 等, *Ann. Rev. Biochem.* 55:599-629, 1986)。

[0504] 核酶可以掺有核酶序列的RNA寡核苷酸的形式直接靶向细胞,或作为编码所需核酶RNA的表达载体引入至细胞。核酶可以与对于反义多核苷酸所述的几乎相同的方式使用和应用。

[0505] 用于本发明方法的反义RNA和DNA、核酶和RNAi分子可通过本领域已知用于合成DNA和RNA分子的任何方法制备。这些方法包括用于化学合成本领域众所周知的寡聚脱氧核糖核苷酸和寡聚核糖核苷酸的技术,例如固相磷酸亚胺酯化学合成。或者, RNA分子可通过编码反义RNA分子的DNA序列的体外和体内转录产生。这样的DNA序列可掺入至包含合适RNA聚合酶启动子例如T7或SP6聚合酶启动子的各种载体中。或者,组成地或诱导地(取决于使用的启动子)合成反义RNA的反义cDNA构建体可稳定地引入至细胞系。

[0506] DNA分子的各种众所周知的修饰可作为增加稳定性和半寿期的工具引入。有用的修饰包括但不限于添加核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸的侧翼序列至分子的5'和/或3'端或在寡聚脱氧核糖核苷酸主链内使用硫代磷酸酯或2'-O-甲基而非磷酸二酯酶键。

[0507] VI. 药物组合物和递送方法

[0508] 给药

[0509] 在另一方面,本发明提供用于在患有本文公开的疾病或病况的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的不良作用的组合物,包括给予受试者包含治疗有效量的MASP-2抑制剂和药学上可接受的载体的组合物。MASP-2抑制剂可以治疗有效剂量给予有需要的受试者以治疗或改善与MASP-2-依赖性补体活化有关的病况。治疗有效剂量是指足以导致与所述疾病或病况有关的症状改善的MASP-2抑制剂的量。

[0510] MASP-2抑制剂的毒性和治疗功效可通过标准药理学程序,使用实验动物模型,例如实施例1中描述的表达人MASP-2转基因的鼠MASP-2^{-/-}小鼠模型测定。使用这样的动物模型,NOAEL(未观察到不良作用水平)和MED(最小有效剂量)可使用标准方法测定。

[0511] NOAEL和MED效果之间的剂量比率是治疗比,其表示为比率NOAEL/MED。显示大的治疗比或指数的MASP-2抑制剂是最优选的。获自细胞培养测定法和动物研究的数据可用于配制人用剂量范围。MASP-2抑制剂的剂量优选地在循环浓度的范围内,其包括几乎没有或没

有毒性的MED。剂量可在该范围内改变,取决于使用的剂型和使用的给药途径。

[0512] 对于任何化合物制剂,治疗有效剂量可使用动物模型进行评估。例如,剂量可在动物模型中配制以实现包括MED的循环血浆浓度范围。MASP-2抑制剂在血浆中的定量水平还可例如通过高效液相色谱测量。

[0513] 除了毒性研究之外,有效剂量还可基于存在于活的受试者中的MASP-2蛋白的量和MASP-2抑制剂的结合亲和力估算。已经显示,在正常人受试者中MASP-2水平以范围为500ng/ml的低水平存在于血清中,和在具体的受试者中的MASP-2水平可使用用于MASP-2的定量测定法测定,其描述于Moller-Kristensen M.等,J.Immunol.Methods 282:159-167, 2003。

[0514] 通常,给予的包括MASP-2抑制剂的组合物的剂量根据以下因素而改变,例如所述受试者的年龄、体重、身高、性别、一般医学状况和之前的病史。作为示例,MASP-2抑制剂,例如抗-MASP-2抗体,可以约0.010至10.0mg/kg、优选地0.010至1.0mg/kg、更优选地0.010至0.1mg/kg的受试者体重的剂量范围给予。在一些实施方案中,组合物包括抗-MASP-2抗体和MASP-2抑制性肽的组合。

[0515] 本发明的MASP-2抑制性组合物和方法在给定受试者中的治疗功效和合适的剂量可根据本领域技术人员众所周知的补体测定法测定。补体产生许多特异性产物。在近十年来,已经开发了灵敏和特异的测定法,并且对于大多数这些活化产物,包括小活化片段C3a、C4a和C5a和大活化片段iC3b、C4d、Bb和sC5b-9,这些测定法为市售可得的。大多数这些测定法利用与在所述片段上,而不是在它们从其中形成的天然蛋白上暴露的新抗原(neoantigen)反应的单克隆抗体,这使得这些测定法非常简单和特异。大多数依赖于ELISA技术,尽管放射免疫测定法有时仍用于C3a和C5a。这些后来的测定法测量未处理的片段和它们的“脱Arg”片段,其是循环中存在的主要形式。未处理的片段和C5a_{脱Arg}通过结合细胞表面受体被快速清除,因此以非常低的浓度存在,而C3a_{脱Arg}不结合细胞和在血浆中积聚。C3a的测量提供补体活化的灵敏的、途径-非依赖性的指示剂。替代途径活化可通过测量Bb片段进行评价。膜攻击途径活化的液相产物sC5b-9的检测,提供补体被激活至完成的证据。因为凝集素和经典途径两者均产生相同的活化产物C4a和C4d,因此这两个片段的测量不提供关于这两个途径中哪一个产生所述活化产物的任何信息。

[0516] MASP-2-依赖性补体活化的抑制的特征为由于根据本发明的方法给予MASP-2抑制剂而出现的在补体系统的组分中的以下变化的至少一个:MASP-2-依赖性补体活化系统产物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9(MAC)的形成或产生的抑制(例如按实施例2中所述测量)、C4裂解和C4b沉积减少(例如按实施例10中所述测量)或C3裂解和C3b沉积减少(例如按实施例10中所述测量)。

[0517] 其它试剂

[0518] 包括MASP-2抑制剂的组合物和方法可任选地包括一种或多种其它治疗剂,其可增加MASP-2抑制剂的活性或以累加或协同的方式提供相关的治疗功能。例如,在治疗患有TTP的受试者的情况下,其中所述受试者对于ADAM-TS13抑制剂为阳性,一种或多种MASP-2抑制剂可与一种或多种免疫抑制剂组合给予(包括共-给予)。合适的免疫抑制剂包括:皮质类固醇、rituxan、环孢霉素等。在治疗患有或有风险发生HUS或aHUS的受试者的情况下,一种或多种MASP-2抑制剂可与合适的抗生素组合给予(包括共-给予)。在治疗患有或有风险发生

aHUS的受试者的情况下,一种或多种MASP-2抑制剂可与其它补体抑制剂例如艾库组单抗(Soliris)、TT-30、因子B的抗体或抑制末端补体组分或替代途径放大的其它试剂组合给予(包括共-给予)。

[0519] 将确定其它试剂的包含和选择以实现需要的治疗结果。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂可与一种或多种抗-炎药和/或止痛药组合给予。合适的抗-炎药和/或止痛药包括:血清素受体拮抗剂;血清素受体激动剂;组胺受体拮抗剂;缓激肽受体拮抗剂;血管舒缓素抑制剂;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;白介素受体拮抗剂;花生四烯酸代谢物合成途径中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(其可以是COX-1、COX-2或非选择性COX-1和-2抑制剂)、脂加氧酶抑制剂;类前列腺素受体拮抗剂,包括类花生酸EP-1和EP-4受体亚型拮抗剂和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;阿片样物质受体激动剂,包括 μ -阿片样物质、 δ -阿片样物质和 κ -阿片样物质受体亚型激动剂;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;腺苷三磷酸(ATP)-敏感性钾通道开放剂;MAP激酶抑制剂;烟碱乙酰胆碱抑制剂;和 α 肾上腺素能受体激动剂(包括 α -1、 α -2和非选择性 α -1和2激动剂)。

[0520] 本发明的MASP-2抑制剂还可与一种或多种其它补体抑制剂,例如C5的抑制剂组合给予。迄今为止,艾库组单抗(**Solaris®**),一种针对C5的抗体,是唯一的补体-靶向药物,其已被批准人用。然而,一些药剂已经显示在体内阻断补体。K76C00H和甲磺酸萘莫司他(nafamstat mesilate)是已经在移植的动物模型中显示一些有效性的两种试剂(Miyagawa,S.等,Transplant Proc.24:483-484,1992)。低分子量肝素也已经显示在调节补体活性中有效(Edens,R.E.等,Complement Today,pp.96-120,Basel:Karger,1993)。认为这些小分子抑制剂可用作与本发明的MASP-2抑制剂组合使用的试剂。

[0521] 其它天然存在的补体抑制剂可与本发明的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)。这是一种天然存在的抑制剂,其可在人细胞的外膜上发现。其它膜抑制剂包括DAF、MCP和CD59。已经对于重组形式的体外和体内抗-补体活性,测试了重组形式。sCR1已经显示在异种移植中有效,其中在灌注血液通过新移植的器官的几分钟内,补体系统(替代和经典两者)提供活动过度排斥综合征的触发剂(Platt,J.L.等,Immunol.Today 11:450-6,1990;Marino,I.R.等,TransplantProc.1071:6,1990;Johnstone,P.S.等,Transplantation 54:573-6,1992)。sCR1的使用保护和延长移植的器官的存活时间,在器官存活的发病机理中牵涉到补体途径(Leventhal,J.R.等,Transplantation 55:857-66,1993;Pruitt,S.K.等,Transplantation 57:363-70,1994)。

[0522] 以实例的方式,与本发明的组合物组合使用的合适的其它补体抑制剂还包括MoAbs,例如由Alexion Pharmaceuticals,Inc.,New Haven,Connecticut开发的抗-C5抗体(例如,艾库组单抗)和抗-备解素MoAbs。

[0523] 药用载体和递送媒介

[0524] 通常,本发明的MASP-2抑制剂组合物,与任何其它选择的治疗剂组合,合适地包含在药学上可接受的载体中。所述载体是无毒的、生物相容的和经选择使得不会有害地影响MASP-2抑制剂(和与其组合的任何其它治疗剂)的生物活性。对于肽的示例性的药学上可接

受的载体描述于Yamada的美国专利号5,211,657。用于本发明的抗-MASP-2抗体和抑制性肽可配制成呈固体、半固体、凝胶、液体或气体形式的制剂,例如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、贮库制剂、吸入剂和注射剂,其允许口服、胃肠外或手术给予。本发明还考虑了通过包覆医学装置等局部给予组合物。

[0525] 用于通过注射、输注或灌洗的胃肠外递送和局部递送的合适载体包括蒸馏水、生理学磷酸缓冲盐水、正常或乳酸林格溶液、葡萄糖溶液、Hank溶液或丙二醇。另外,无菌的固定油可用作溶剂或悬浮介质。对于该目的,可使用任何生物相容的油,包括合成的甘油一酯或甘油二酯。另外,脂肪酸例如油酸可用于制备注射剂。可将载体和试剂混合为液体、混悬液、聚合或非聚合凝胶、糊剂或油膏。

[0526] 载体还可包括递送媒介以维持(即,延长、延迟或调节)试剂的递送或增强治疗剂的递送、摄取、稳定性或药代动力学。通过非限制性实例的方式,这样的递送介质可包括包含蛋白的微粒、微球、纳米球或纳米粒;脂质体、碳水化合物、合成的有机化合物、无机化合物、聚合或共聚水凝胶和聚合胶束。合适的水凝胶和胶束递送系统包括WO 2004/009664 A2中公开的PEO:PHB:PEO共聚物和共聚物/环糊精复合物,和美国专利申请号2002/0019369A1中公开的PEO和PEO/环糊精复合物。这样的水凝胶可局部注射在预期作用的部位处,或经皮下或肌肉注射形成延迟释放贮库。

[0527] 对于关节内递送,MASP-2抑制剂可包含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或透明质酸或透明质酸衍生物中。

[0528] 对于口服给予非-肽能药,MASP-2抑制剂可包含在惰性填充剂或稀释剂中,例如蔗糖、玉米淀粉或纤维素。

[0529] 对于局部给予,MASP-2抑制剂可保持在软膏剂、洗剂、霜剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体或粉剂中,或通过经皮贴剂在凝胶或微胶囊递送系统中。

[0530] 各种经鼻和肺递送系统,包括气雾剂、计量吸入器、干粉吸入器和喷雾器,正在开发和可经合适改变用于分别在气雾剂、吸入剂或喷雾递送媒介中进行本发明的递送。

[0531] 对于鞘内(IT)或脑室内(ICV)递送,合适的无菌递送系统(例如,液体、凝胶、混悬剂等)可用于给予本发明。

[0532] 本发明的组合物还可包括生物相容的赋形剂,例如分散剂或湿润剂、助悬剂、稀释剂、缓冲剂、渗透促进剂、乳化剂、粘合剂、增稠剂、矫味剂(用于口服给予)。

[0533] 用于抗体和肽的药用载体

[0534] 关于抗-MASP-2抗体和抑制性肽更特别的是,示例性的制剂可在含有药用载体的生理学可接受的稀释剂中作为注射剂量的化合物溶液或混悬液经胃肠外给予,所述载体可以是无菌液体,例如水、油、盐水、甘油或乙醇。此外,辅助物质例如湿润剂或乳化剂、表面活性剂、pH缓冲物质等可存在于包括抗-MASP-2抗体和抑制性肽的组合物中。药物组合物的其它组分包括油(例如动物、植物或合成来源),例如,大豆油和矿物油。通常,二醇例如丙二醇或聚乙二醇是用于注射溶液的优选的液体载体。

[0535] 抗-MASP-2抗体和抑制性肽还可以贮库注射剂或植入制剂的形式给予,其可以允许活性剂的持续或脉动释放的方式配制。

[0536] 用于表达抑制剂的药学上可接受的载体

[0537] 关于用于本发明方法的表达抑制剂更特别的是,提供包括上述表达抑制剂和药学

上可接受的载体或稀释剂的组合物。组合物还可包括胶体分散系统。

[0538] 包含表达抑制剂的药物组合物可包括但不限于溶液剂、乳剂和包含脂质体的制剂。这些组合物可自各种组分产生,包括但不限于预形成的液体、自乳化固体和自乳化半固体。这样的组合物的制备通常包括混合表达抑制剂与以下的一种或多种:缓冲剂、抗氧化剂、低分子量多肽、蛋白、氨基酸、碳水化合物包括葡萄糖、蔗糖或糊精;螯合剂例如EDTA、谷胱甘肽和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的稀释剂的实例。

[0539] 在一些实施方案中,组合物可制备和配制为乳剂,其通常是一种液体以微滴形式分散在另一种液体中的异质系统(参见Idson,于Pharmaceutical Dosage Forms,Vol.1, Rieger和Banker(编辑),Marcek Dekker,Inc.,N.Y.,1988)。用于乳剂配制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。

[0540] 在一个实施方案中,包含核酸的组合物可配制为微乳剂。如本文所用的微乳剂是指水、油和两亲化化合物的系统,其是单一的光学各向同性的和热力学稳定的液体溶液(参见Rosoff于Pharmaceutical Dosage Forms,Vol.1)。本发明的方法还可使用脂质体用于传递和递送反义寡核苷酸至所需部位。

[0541] 用于局部给予的表达抑制剂的药物组合物和制剂可包括经皮贴剂、软膏剂、洗剂、霜剂、凝胶、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体和粉剂。可使用常规的药用载体以及水、粉或油性基质和增稠剂等。

[0542] 给药方式

[0543] 可以多种方式给予包含MASP-2抑制剂的药物组合物,这取决于局部还是全身性给药方式最适于待治疗的病况。此外,如上文关于体外再灌程序所述,MASP-2抑制剂可通过引入本发明的组合物至再循环血液或血浆而给予。此外,本发明的组合物可通过将组合物涂布或掺入可植入的医疗装置上面或里面而递送。

[0544] 系统递送

[0545] 如本文所用,术语“系统递送”和“系统给药”意图包括但不限于口服和胃肠外途径,包括肌内(IM)、皮下、静脉内(IV)、动脉内、吸入、舌下、含服、局部、经皮、经鼻、直肠、阴道和其它给药途径,这将所递送的药物有效地分散到预期治疗作用的一个或多个部位。用于本发明组合物的系统递送的优选途径包括静脉内、肌内、皮下和吸入。应当理解,对于用于本发明具体组合物中所选用的药物,确切的系统给药途径将部分地考虑药物对与指定给药途径相关的代谢转化途径的敏感性加以确定。例如,肽能药物可能最适于通过口服以外的途径给药。

[0546] 可通过任何合适的方法将MASP-2抑制性抗体和多肽递送到有需要的受试者中。递送MASP-2抗体和多肽的方法包括经口服、肺部、胃肠外(例如肌内、腹膜内、静脉内(IV)或皮下注射)、吸入(例如经由微细粉制剂)、经皮、经鼻、阴道、直肠或者舌下给药途径给予,并且可将其配制成适于各种给药途径的剂型。

[0547] 通过代表性实例的方式,可以通过将MASP-2抑制性抗体和肽应用到能够吸收多肽的身体膜上,例如鼻膜、胃肠膜和直肠膜,而将其引入活体内。通常将多肽和渗透促进剂一起应用到可吸收膜上(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.主编,Peptide

and Protein Drug Delivery, Marcel Dekker, New York (1991); DeBoer, A.G., 等人, J. Controlled Release 13:241, (1990)。例如, STDHF 是梭链孢酸的合成衍生物, 是结构上类似于胆盐的甾类表面活性剂, 已被用作经鼻递送的渗透促进剂 (Lee, W.A., Biopharm. 22, 1990年11/12月)。

[0548] 可以引入与其它分子 (例如脂质) 缔合的 MASP-2 抑制性抗体和多肽, 以保护多肽不被酶降解。例如, 共价连接聚合物、尤其是聚乙二醇 (PEG) 已被用来保护某些蛋白质不被体内的酶水解, 从而延长半寿期 (Fuertges, F., 等人, J. Controlled Release 11:139, (1990))。已经报道了许多用于蛋白质递送的聚合物系统 (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))。

[0549] 最近, 开发出血清稳定性和循环半寿期得到改进的脂质体 (参见例如 Webb 的美国专利号 5,741,516)。而且, 对脂质体和脂质体样制备物作为可能的药物载体的各种方法进行了综述 (参见例如 Szoka 的美国专利号 5,567,434; Yagi 的美国专利号 5,552,157; Nakamori 的美国专利号 5,565,213; Shinkarenko 的美国专利号 5,738,868 以及 Gao 的美国专利号 5,795,587)。

[0550] 对于经皮应用, 可将 MASP-2 抑制性抗体和多肽与其它合适的成分 (例如载体和/或佐剂) 混合。对这些其它成分的性质没有限制, 只是对于其预期给药来说必须是药学上可接受的, 并且不能降低组合中活性成分的活性。合适媒介的实例包括含或不含纯化胶原的软膏、乳膏、凝胶或混悬液。MASP-2 抑制性抗体和多肽还可被浸渍到经皮贴剂、膏药和绷带中, 优选以液体或半液体形式。

[0551] 可以在为维持治疗效果所需水平而确定的间隔的周期性基础上, 系统给予本发明的组合物。例如, 可按每 2-4 周或者以更低频率的间隔给予组合物 (例如经皮下注射)。给药方案将由医师考虑可能影响药物联用的作用的各种因素来确定。这些因素包括待治疗疾病的进展程度、患者的年龄、性别和体重和其它临床因素。各独立药物的剂量将随组合物中所包含的 MASP-2 抑制剂以及任何递送媒介 (例如缓释递送媒介) 的存在和性质而变化。此外, 可在考虑给药频率和所递送药物的药代动力学行为的变化后对剂量进行调整。

[0552] 局部递送

[0553] 本文所用术语“局部”包括药物在预期局部化作用部位上或其周围的应用, 可包括例如局部递送到皮肤或其它受累组织; 眼部递药; 鞘内 (IT)、脑室内 (ICV)、关节内、腔内、颅内或肺泡内给药、安置或冲洗。可优选能够给予较低剂量的局部给药以避免全身性不良作用, 以及更精确地控制递药时间和局部递药部位的活性剂浓度。不论患者之间在新陈代谢、血流等方面的变化, 局部给药都在目标部位提供已知的浓度。通过直接递药方式亦提供改进的剂量控制。

[0554] MASP-2 抑制剂的局部递送可在手术方法的情况下实现以治疗疾病或病况, 例如在动脉旁路术、经皮腔内斑块旋切术、激光手术、超声波手术、气囊血管成形术以及支架安置

等手术期间。例如,可将MASP-2抑制剂与气囊血管成形手术结合起来给予受试者。气囊血管成形手术包括将带有已排气的气囊的导管插入动脉内。将已排气的气囊置于动脉粥样硬化斑块附近,给气囊充气使得斑块向血管壁挤压。结果,气囊表面与血管表面的血管内皮细胞层接触。可以按允许药物在动脉粥样硬化斑块部位释放的方式,将MASP-2抑制剂附着到气囊血管成形术导管上。可按照本领域已知标准程序将药物附着在气囊导管上。例如,可将药物保存在气囊导管的隔室中直到气囊充气,此时药物被释放到局部环境中。或者,可将药物浸渍在气囊表面,使得当气囊充气时,药物就接触到动脉壁的细胞。还可在多孔气囊导管中递送药物,例如Flugelman, M.Y., 等人, *Circulation* 85:1110-1117, (1992) 中公开的那些。另见已公开的PCT申请W0 95/23161中对于将治疗性蛋白附着到气囊血管成形术导管上的示例性程序。同样地,可将MASP-2抑制剂包括在应用于支架上的凝胶或聚合涂层中,或者可将其掺入支架材料中,使得支架在血管安置之后将MASP-2抑制剂洗脱出来。

[0555] 用于治疗关节炎和其它肌肉骨骼疾病的MASP-2抑制性组合物可通过关节内注射来局部递送。这样的组合物可适当地包括缓释递送媒介。作为其中可能需要局部递送的另一个实例,用于治疗泌尿生殖病况的MASP-2抑制性组合物可适当地滴入膀胱内或者其它泌尿生殖结构中。

[0556] 在医学装置上的涂料

[0557] MASP-2抑制剂例如抗体和抑制性肽可固定到可植入或可连接的医学装置的表面上(或之内)。改性表面在植入至动物体内后通常将与活组织接触。“可植入或可连接的医学装置”意指任何装置,其在装置(例如,支架和可植入递药装置)的正常操作期间植入或连接动物身体组织。这样的可植入或可连接医学装置可由例如,硝酸纤维素、重氮基纤维素、玻璃、聚苯乙烯、聚乙烯氯、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/或生物相容聚合物组成。蛋白与装置的连接可通过不破坏连接的蛋白的生物活性的任何技术,例如通过连接蛋白的一个或两个N-C-末端残基至装置进行。连接还可在蛋白的一个或多个内部位点上进行。可使用多个连接(蛋白的内部和末端)。对于其上的蛋白固定,可植入或可连接医学装置的表面可经改性以包括官能团(例如,羧基、酰胺、氨基、醚、羟基、氰基、次氨基、磺酰胺基、炔基(acetylinic)、环氧化物、硅烷基(silanic)、酸酐、琥珀酰亚胺基(succinimic)、叠氮基)。偶联化学包括但不限于与MASP-2抗体或抑制性肽上可用的官能团形成酯、醚、酰胺、叠氮基和磺酰胺基衍生物、氰酸酯和其它键。MASP-2抗体或抑制性片段还可通过添加亲和和标签序列至蛋白非-共价地连接,例如GST(D.B.Smith和K.S.Johnson, *Gene* 67:31, 1988)、多组氨酸(E.Hochuli等, *J.Chromatog.* 411:77, 1987)或生物素。这样的亲和和标签可用于将蛋白可逆连接至装置。

[0558] 蛋白质还可共价地连接至装置体的表面,例如通过医学装置的表面的共价活化。通过代表性实例的方式,基质细胞蛋白可通过任何以下活性基团对连接至装置体(配对的一个成员存在于装置体的表面上,而配对的另一个成员位于基质细胞蛋白上):羟基/羧酸以得到酯键;羟基/酸酐以得到酯键;羟基/异氰酸酯以得到氨基甲酸乙酯键。没有可用的活性基团的装置体的表面可用射频放电等离子体(RFGD)蚀刻处理,以产生活性基团,以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团)。

[0559] 包含核酸分子的MASP-2抑制剂,例如反义、RNAi-或DNA-编码肽抑制剂,可埋入与

装置体附接的多孔基质中。用于制备表面层的代表性的多孔基质是自腱或真皮胶原制备的那些,例如可获自各种市售来源(例如,Sigma和Collagen Corporation),或按Jefferies的美国专利号4,394,370和Koezuka的4,975,527所述制备的胶原基质。一种胶原材料称为UltraFiber™和可获自Norian Corp. (Mountain View, California)。

[0560] 如果需要的话,某些聚合基质也可使用,和包括丙烯酸酯聚合物和乳酸聚合物,如公开于例如Urist的美国专利号4,526,909和4,563,489。有用的聚合物的具体实例是那些原酸酯、酸酐、丙烯-共聚延胡索酸酯或一个或多个 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。

[0561] 治疗方案

[0562] 在预防性应用中,将药物组合物给予对与MASP-2-依赖性补体活化有关的病况易感或另外处于与MASP-2-依赖性补体活化有关的病况的风险中的受试者,其量足以消除或降低发生所述病况的症状的风险。在治疗性应用中,将药物组合物给予疑似或已经患有与MASP-2-依赖性补体活化有关的病况的受试者,其治疗有效量足以缓解或至少部分地减轻所述病况的症状。在预防性和治疗性方案两者中,包含MASP-2抑制剂的组合物可以数个剂量给予,直到在所述受试者中实现足够的治疗结果。本发明的MASP-2抑制性组合物的施用可通过单次给予所述组合物或有限的给予顺序进行,用于治疗急性病况,例如,再灌注损伤或其它创伤性损伤。或者,可在长期的一段时间内以定期间隔给予组合物用于治疗慢性病况,例如,关节炎或银屑病。

[0563] 本发明的方法和组合物可用于抑制通常由诊断和治疗医学和手术程序产生的炎症和相关过程。为抑制这样的过程,本发明的MASP-2抑制性组合物可围绕程序(periprocedurally)施用。如本文所用的,“围绕程序”是指在程序前和/或程序中和/或程序后给予抑制性组合物,即,在程序之前;在程序之前和其中;在程序之前和之后;在程序之前、期间和之后;在程序期间;在程序期间和之后;或在程序之后。围绕程序施用可通过局部给予组合物至手术或程序部位进行,例如通过注射或连续或间断冲洗部位或通过系统性给予。局部的手术期间递送MASP-2抑制剂溶液的合适方法公开于Demopoulos的美国专利号6,420,432和Demopoulos的6,645,168。局部递送包括MASP-2抑制剂的软骨保护性组合物的合适方法公开于国际PCT专利申请W0 01/07067 A2。用于靶向系统递送包括MASP-2抑制剂的软骨保护性组合物的合适方法和组合物公开于国际PCT专利申请W0 03/063799 A2。

[0564] 在本发明的一个方面,将药物组合物给予患有或有风险发生血栓性微血管病(TMA)的受试者。在一个实施方案中,TMA选自溶血性尿毒综合征(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,将组合物给予在疾病的急性期的aHUS患者。在一个实施方案中,将组合物给予在缓解期的aHUS患者(即,在已经从急性期aHUS的发作中恢复或部分恢复的受试者中,这样的缓解通过例如血小板计数增加和/或血清LDH浓度降低证明,例如描述于Loirat C等, Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60,2011,其通过引用结合到本文中)。在一个实施方案中,所述受试者患有或有风险发生TMA,其是(i) 癌症继发性TMA;(ii) 化学疗法继发性TMA;或(iii) 移植继发性TMA(例如,器官移植,例如肾移植或同种异体造血干细胞移植)。在一个实施方案中,所述受试者患有或有风险发生Upshaw-Schulman综合征(USS)。在一个实施方案中,所述受试者患有或有风险发生德戈斯病。在一个实施方案中,所述受试者患有

或有风险发生灾难性抗磷脂综合征 (CAPS)。在治疗性应用中,将药物组合物给予患有或有风险发生TMA的受试者,其治疗有效量足以抑制血栓形成,减轻或至少部分地减轻所述病况的症状。

[0565] 在预防性和治疗性方案两者中,包含MASP-2抑制剂的组合物可以数个剂量给予,直到已经在所述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抑制剂包括抗-MASP-2抗体,其可以0.1mg至10,000mg、更合适1.0mg至5,000mg、更合适10.0mg至2,000mg、更合适10.0mg至1,000mg和还更合适50.0mg至500mg的剂量合适地给予成年患者(例如,平均成人体重70kg)。对于儿科患者,可按患者体重的比例调整剂量。本发明的MASP-2抑制性组合物的施用可进行通过单次给予组合物,或有限顺序给予,以治疗TMA。或者,组合物可在长期的一段时间内以定期间隔例如每日一次、每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次或每月两次给予,用于治疗TMA。

[0566] 在一些实施方案中,患有或有风险发生TMA的受试者先前已经经历或目前正在经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂治疗。在一些实施方案中,方法包括给予受试者包括MASP-2抑制剂的本发明的组合物和进一步给予受试者抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂。在一些实施方案中,末端补体抑制剂是人源化的抗-C5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,末端补体抑制剂是艾库组单抗。

[0567] 在本发明的一个方面,将药物组合物给予对aHUS易感或另外处于aHUS的风险中的受试者,其量足以消除或降低发生所述病况的症状的风险。在治疗性应用中,将药物组合物给予疑似或已经患有aHUS的受试者,其治疗有效量足以减轻或至少部分地减轻所述病况的症状。在本发明的一个方面,在给药之前,可检查所述受试者以确定所述受试者是否显示aHUS的一个或多个症状,包括(i)贫血;(ii)血小板减少症;(iii)肾功能不全;和(iv)肌酐升高,然后以有效量给予本发明的组合物持续一段足够的时间,以改善这些症状。

[0568] 在本发明的另一方面,本发明的MASP-2抑制性组合物可用于预防性治疗具有升高的发生aHUS的风险的受试者和从而降低所述受试者将呈现aHUS的可能性。首先通过对获自受试者的样品进行遗传筛选测试和鉴定与aHUS有关的至少一种遗传标记(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)、抗凝血蛋白凝血调节蛋白(THBD)、补体因子H-相关蛋白3(CFHR3)或补体因子H-相关蛋白4(CFHR4))的存在来测定受试者中已知与aHUS有关的遗传标记的存在。然后所述受试者周期性地监测(例如,每月一次、每季度一次、每年两次或每年一次)以测定aHUS的至少一个症状的存在或不存在,例如贫血、血小板减少症、肾功能不全和肌酐升高。在测定这些症状的至少一种存在后,可将有效抑制MASP-2依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂给予所述受试者,以有效量并给予足够的一段时间,以改进所述一个或多个症状。在本发明的又一方面,由于已经筛选和测定具有一种与aHUS有关的遗传标记而有增加的发生aHUS的风险的受试者,可监测其触发aHUS临床症状有关的事件的发生,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。

[0569] 在本发明的又一方面,可将包括有效抑制MASP-2依赖性补体活化的量的MASP-2抑制剂的组合物给予患有或有风险发生感染继发性非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的患者。例如,患有或有风险发生与肺炎链球菌感染有关的非肠道aHUS的患者可用本发明的组合物治疗。

[0570] 在本发明的又一方面,患有aHUS的受试者可最初用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗,其通过导管线,例如静脉内导管线或皮下导管线给予第一时间段,例如1小时、12小时、1天、2天或3天。所述受试者然后可用MASP-2抑制性组合物治疗第二时间段,其通过常规皮下注射给予,例如每日一次、每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次或每两月一次注射。

[0571] 在本发明的又一方面,本发明的MASP-2抑制性组合物可在不存在血浆去除术以避免血浆去除术的潜在并发症,包括出血、感染和暴露于血浆供体固有的病症和/或过敏反应的情况下(即,其aHUS症状未用血浆去除术治疗过和在用MASP-2抑制性组合物治疗时未用血浆去除术治疗的受试者),或在另外不愿意血浆去除术的受试者中,或在其中不可利用血浆去除术的背景中,给予患有aHUS的受试者。

[0572] 在本发明的又一方面,可将本发明的MASP-2抑制性组合物给予患有aHUS的受试者,同时用血浆去除术治疗患者。例如,接受血浆去除术治疗的受试者然后可在血浆交换后给予MASP-2抑制性组合物或与血浆交换交替进行。

[0573] 在本发明的又一方面,患有或有风险发生aHUS和正用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗的受试者可通过周期性地(例如每12小时或按每日基础)检测至少一种补体因子的水平而监测,其中确定与标准值或健康受试者相比至少一种补体因子的水平降低表示需要继续用组合物治疗。

[0574] 在预防性和治疗性方案两者中,包含MASP-2抑制剂的组合物可以数个剂量给予,直到在所述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抑制剂包括抗-MASP-2抗体,其可适合以0.1mg至10,000mg、更合适1.0mg至5,000mg、更合适10.0mg至2,000mg、更合适10.0mg至1,000mg和还更合适50.0mg至500mg的剂量给予成年患者(例如,平均成人体重70kg)。对于儿科患者,可按患者体重比例调整剂量。本发明的MASP-2抑制性组合物的施用可通过单次给予组合物,或有限顺序给予进行,用于治疗aHUS。或者,组合物可在长期的一段时间内以定期间隔给予,例如每日一次、每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次或每两月一次,用于治疗aHUS。

[0575] 在一些实施方案中,患有aHUS的受试者先前已经经历或目前正在经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂的治疗。在一些实施方案中,方法包括给予受试者包括MASP-2抑制剂的本发明的组合物和进一步给予受试者抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂。在一些实施方案中,末端补体抑制剂是人源化的抗-C5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,末端补体抑制剂是艾库组单抗。

[0576] 在本发明的一个方面,将药物组合物给予对HUS易感或另外有HUS风险的受试者,其量足以消除或降低发生所述病况的症状的风险。在治疗性应用中,将药物组合物给予疑似或已经患有HUS的受试者,其治疗有效量足以减轻或至少部分地减轻所述病况的症状。

[0577] 在本发明的另一方面,在有风险发生HUS的受试者中发生肾功能受损的可能性可通过给予受试者有效抑制MASP-2依赖性补体活化的量的本发明的MASP-2抑制性组合物而降低。例如,有风险发生HUS和待用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗的受试者可显示与HUS有关的一个或多个症状,包括腹泻;血细胞比容水平低于30%,涂片证明血管内红细胞破坏;血小板减少症和肌酐升高水平。作为进一步的实例,有风险发生HUS和待用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗的受试者可感染有大肠杆菌、志贺氏菌或沙门氏菌。感染有大肠

杆菌、志贺氏菌或沙门氏菌的这样的受试者可用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗,同时用抗生素治疗;或者可用MASP-2抑制性组合物治疗,未同时用抗生素治疗,特别是对于肠源性大肠杆菌,对其禁忌用抗生素治疗。感染有肠源性大肠杆菌的已经用抗生素治疗的受试者可具有升高的发生HUS的风险,和可合适地用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗以降低风险。感染有肠源性大肠杆菌的受试者可在缺少抗生素的情况下用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗第一时间段,然后用本发明的MASP-2抑制性组合物和抗生素治疗第二时间段。

[0578] 在本发明的又一方面,患有HUS的受试者可最初用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗,其通过导管线例如静脉内导管线或皮下导管线给予第一时间段,例如1小时、12小时、1天、2天或3天。所述受试者然后可用MASP-2抑制性组合物治疗第二时间段,其通过常规皮下注射给予,例如每日一次、每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次或每两月一次注射。

[0579] 在本发明的又一方面,本发明的MASP-2抑制性组合物可在不存在血浆去除术以避免血浆去除术的潜在并发症,包括出血、感染和暴露于血浆供体固有的病症和/或过敏反应的情况下(即,其HUS症状未用血浆去除术治疗过和在用MASP-2抑制性组合物治疗时未用血浆去除术治疗的受试者),或在另外不愿意血浆去除术的受试者中,或在其中不可利用血浆去除术的背景中,给予患有HUS的受试者。

[0580] 在本发明的又一方面,本发明的MASP-2抑制性组合物可给予患有HUS的受试者,同时用血浆去除术治疗患者。例如,接受血浆去除术治疗的受试者然后可在血浆交换后给予MASP-2抑制性组合物或与血浆交换交替进行。

[0581] 在本发明的又一方面,患有或有风险发生HUS和正用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗的受试者可通过周期性地(例如每12小时或按每日基础)测定至少一种补体因子的水平而监测,其中测定与标准值或健康受试者相比至少一种补体因子的水平降低表示需要继续用组合物治疗。

[0582] 在预防性和治疗性方案中,包括MASP-2抑制剂的组合物可以数个剂量给予,直到在所述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抑制剂包括抗-MASP-2抗体,其可适合以0.1mg至10,000mg、更合适1.0mg至5,000mg、更合适10.0mg至2,000mg、更合适10.0mg至1,000mg和更合适50.0mg至500mg的剂量给予成年患者(例如,平均成人体重70kg)。对于儿科患者,可按患者体重比例调整剂量。本发明的MASP-2抑制性组合物的施用可通过单次给予组合物,或有限顺序给予进行,用于治疗HUS。或者,组合物可在长期的一段时间内以定期间隔给予,例如每日一次、每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次或每两月一次,用于治疗HUS。

[0583] 在一些实施方案中,患有HUS的受试者先前已经经历或目前正在经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂的治疗。在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含MASP-2抑制剂的本发明的组合物和进一步给予受试者抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂。在一些实施方案中,末端补体抑制剂是人源化的抗-C5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,末端补体抑制剂是艾库组单抗。

[0584] 在本发明的一个方面,将药物组合物给予对TTP易感或另外有TTP风险的受试者,其量足以消除或降低发生所述病况的症状的风险。在治疗性应用中,将药物组合物给予疑似或已经患有TTP的受试者,其治疗有效量足以减轻或至少部分地减轻所述病况的症状。

[0585] 在本发明的另一方面,显示TTP的一个或多个症状,包括中枢神经系统累及、血小板减少症、严重心脏累及、严重肺累及、胃肠梗塞和坏疽的受试者,可用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗。在本发明的另一方面,确定具有降低水平的ADAMTS13和还对存在ADAMTS13的抑制剂(即,抗体)测试阳性的受试者可用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗。在本发明的又一方面,对ADAMTS13的抑制剂的存在测试阳性的受试者可用免疫抑制剂(例如,皮质类固醇、rituxan或环孢霉素)治疗,同时用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗。在本发明的又一方面,确定具有降低水平的ADAMTS13和对存在ADAMTS13的抑制剂测试阳性的受试者可用ADAMTS13治疗,同时用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗。

[0586] 在本发明的又一方面,患有TTP的受试者可最初用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗,其通过导管线例如静脉内导管线或皮下导管线给予第一时间段,例如1小时、12小时、1天、2天或3天。所述受试者然后可用MASP-2抑制性组合物治疗第二时间段,其通过常规皮下注射给予,例如每日一次、每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次或每两月一次注射。

[0587] 在本发明的又一方面,本发明的MASP-2抑制性组合物可在不存在血浆去除术以避免血浆去除术的潜在并发症,包括出血、感染和暴露于血浆供体固有的病症和/或过敏反应的情况下(即,其TTP症状未用血浆去除术治疗过和在用MASP-2抑制性组合物治疗时未用血浆去除术治疗的受试者),或在另外不愿意血浆去除术的受试者中,或在其中不可利用血浆去除术的背景中,给予患有HUS的受试者。

[0588] 在本发明的又一方面,本发明的MASP-2抑制性组合物可给予患有TTP的受试者,同时用血浆去除术治疗患者。例如,接受血浆去除术治疗的受试者然后可在血浆交换后给予MASP-2抑制性组合物或与血浆交换交替进行。

[0589] 在本发明的又一方面,患有难治性TTP的受试者,即,TTP的症状不充分响应其它治疗例如血浆去除术的受试者,可用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗,用或不用另外的血浆去除术。

[0590] 在本发明的又一方面,患有或有风险发生TTP和正用本发明的MASP-2抑制性组合物治疗的受试者可通过周期性地(例如每12小时或按每日基础)检测至少一种补体因子的水平而监测,其中确定与标准值或健康受试者相比至少一种补体因子的水平降低表示需要继续用组合物治疗。

[0591] 在预防性和治疗性方案两者中,包含MASP-2抑制剂的组合物可以数个剂量给予,直到在所述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抑制剂包括抗-MASP-2抗体,其可合适以0.1mg至10,000mg、更合适1.0mg至5,000mg、更合适10.0mg至2,000mg、更合适10.0mg至1,000mg和还更合适50.0mg至500mg的剂量给予成年患者(例如,平均成人体重70kg)。对于儿科患者,可按患者体重比例调整剂量。本发明的MASP-2抑制性组合物的施用可通过单次给予组合物,或有限顺序给予进行,用于治疗TTP。或者,组合物可在长期的一段时间内以定期间隔给予,例如每日一次、每周两次、每周一次、每两周一次、每月一次或每两月一次,用于治疗TTP。

[0592] 在一些实施方案中,患有TTP的受试者先前已经经历或目前正在经历用抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体抑制剂的治疗。在一些实施方案中,方法包括给予受试者包括MASP-2抑制剂的本发明的组合物和进一步给予受试者抑制补体蛋白C5的裂解的末端补体

抑制剂。在一些实施方案中,末端补体抑制剂是人源化的抗-C5抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,末端补体抑制剂是艾库组单抗。

VI. 实施例

[0593] 以下实施例仅说明目前预期实施本发明的最佳模式,而不应解释为限制本发明。本文的所有文献引述通过引用明确地予以结合。

[0594] 实施例1

[0595] 本实施例描述MASP-2缺陷(MASP-2^{-/-})但MAp19充足(MAp19^{+/+})的小鼠品系的产生。

[0596] 材料和方法:设计靶向载体pKO-NTKV 1901以破坏编码鼠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(SV129 01a)。选择新霉素-抗性和胸苷激酶-敏感性克隆。筛选600个ES克隆,和在这些克隆中,通过DNA印迹鉴定和验证4个不同的克隆,以包含预期的选择性靶向和重组事件,如图3中所示。从这4个阳性克隆中通过胚胎转移产生嵌合体。然后将嵌合体在遗传背景C57/BL6中回交,以产生转基因雄性。转基因雄性与雌性杂交,产生F1,其中50%的后代对于破坏的MASP-2基因显示杂合性。杂合小鼠互交,产生纯合MASP-2缺陷后代,以1:2:1的比率分别得到杂合和野生型小鼠。

[0597] 结果和表型:发现得到的纯合MASP-2^{-/-}缺陷小鼠能存活并且可繁殖,并且通过DNA印迹证实正确的靶向事件,通过RNA印迹证实缺少MASP-2mRNA,和通过蛋白质印迹证实缺少MASP-2蛋白(数据未显示),验证是MASP-2缺陷的。使用时间解析RT-PCR在LightCycler仪器上进一步证实存在MAp19 mRNA和缺少MASP-2mRNA。MASP-2^{-/-}小鼠的确按期望地继续表达MAp19、MASP-1和MASP-3mRNA和蛋白质(数据未显示)。在MASP-2^{-/-}小鼠中备解素、因子B、因子D、C4、C2和C3的mRNA的存在和丰度通过LightCycler分析评价,和发现与野生型同窝对照相同(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-介导的补体活化,如实施例2中进一步描述的。

[0598] 在纯C57BL6背景上MASP-2^{-/-}品系的产生:在使用MASP-2^{-/-}品系作为实验动物模型之前,将MASP-2^{-/-}小鼠与纯C57BL6系回交九代。

[0599] 还如下产生转基因小鼠品系,其是鼠MASP-2^{-/-}、MAp19^{+/+}和表达人MASP-2转基因(鼠MASP-2敲除和人MASP-2敲入):

[0600] 材料和方法:构建编码称为“微小hMASP-2”的人MASP-2的微基因(SEQ ID NO:49),如图4中所示,其包括人MASP2基因的启动子区,所述基因包括前3个外显子(外显子1至外显子3),接着是表示随后8个外显子的编码序列的cDNA序列,从而编码通过其内源启动子驱动的全长MASP-2蛋白。将微小hMASP-2构建体注入MASP-2^{-/-}的受精卵以通过转基因表达人MASP-2,替换缺陷的鼠MASP2基因。

[0601] 实施例2

[0602] 本实施例证实MASP-2是通过凝集素途径的补体活化所需要的。

[0603] 方法和材料:

[0604] 凝集素途径特异性C4裂解测定法:C4裂解测定法描述于Petersen等,J.Immunol.Methods 257:107(2001),其测量由结合L-纤维胶凝蛋白的金黄色葡萄球菌的脂磷壁酸(LTA)导致的凝集素途径活化。Petersen等(2001)描述的该测定法通过用LPS和甘

露聚糖或酵母聚糖包被板,然后加入来自MASP-2^{-/-}小鼠的血清,经改良以测量经过MBL的凝集素途径活化,如下文所述。该测定法还经改良,以除去由于经典途径导致的C4裂解的可能性。这通过使用包含1M NaCl的样品稀释缓冲液实现,其允许凝集素途径识别组分与它们的配体高亲和力结合,但阻止内源C4的活化,从而通过解离C1复合物排除经典途径的参与。简言之,在改良的测定法中,将血清样品(在高盐(1M NaCl)缓冲液中稀释)加入配体包被的板,接着加入在具有生理学浓度的盐的缓冲液中的恒定量的纯化的C4。包含MASP-2的结合的识别复合物裂解C4,导致C4b沉积。

[0605] 测定方法:

[0606] 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,下文列举的那些)包被。

[0607] 测定法中使用以下试剂:

[0608] a. 甘露聚糖(1μg/孔甘露聚糖(M7504 Sigma),在100μl包被缓冲液中);

[0609] b. 酵母聚糖(1μg/孔酵母聚糖(Sigma),在100μl包被缓冲液中);

[0610] c. LTA(1μg/孔,在100μl包被缓冲液中;或2μg/孔,在20μl甲醇中);

[0611] d. 1μg的H-纤维胶凝蛋白特异性Mab 4H5,在包被缓冲液中;

[0612] e. 来自绿色气球菌(*Aerococcus viridans*)的PSA(2μg/孔,在100μl包被缓冲液);

[0613] f. 100μl/孔的福尔马林固定的金黄色葡萄球菌DSM20233 (OD₅₅₀=0.5),在包被缓冲液中。

[0614] 2) 将板在4℃孵育过夜。

[0615] 3) 在孵育过夜后,残余的蛋白结合位点通过用0.1%

[0616] HSA-TBS封闭缓冲液(0.1% (w/v) HAS,在10mM Tris-CL, 140mM NaCl, 1.5mM NaN₃中, pH 7.4)孵育板1-3小时来饱和,然后用TBS/tween/Ca²⁺ (TBS, 含0.05% Tween 20和5mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, pH 7.4)洗涤板3X。

[0617] 4) 待测试的血清样品在MBL-结合缓冲液(1M NaCl)中稀释和将稀释的样品加入至板中,在4℃孵育过夜。仅接受缓冲液的孔用作阴性对照。

[0618] 5) 在4℃孵育过夜后,用TBS/tween/Ca²⁺将板洗涤3X。然后将人C4(100μl/孔的1μg/ml,在BBS(4mM巴比妥, 145mM NaCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, pH 7.4)中稀释)加入板中,和在37℃孵育90分钟。用TBS/tween/Ca²⁺将板再次洗涤3X。

[0619] 6) C4b沉积用碱性磷酸酶-缀合的鸡抗-人C4c(在TBS/tween/Ca²⁺中1:1000稀释)检测,将其加入板中,和在室温下孵育90分钟。然后用TBS/tween/Ca²⁺将板再次洗涤3X。

[0620] 7) 碱性磷酸酶通过加入100μl的对硝基苯基磷酸酯底物溶液,在室温下孵育20分钟和在微量滴定板阅读器中读出OD₄₀₅进行检测。

[0621] 结果:图5A-B显示在来自MASP-2^{+/+}(十字),MASP-2^{+/-}(实心圆)和MASP-2^{-/-}(实心三角)的血清稀释液中,在甘露聚糖(图5A)和酵母聚糖(图5B)上C4b沉积的量。图5C显示根据测量标准化至野生型血清的C4b沉积的量,在来自MASP-2^{-/+}小鼠(n=5)和MASP-2^{-/-}小鼠(n=4)的酵母聚糖(白色条)或甘露聚糖(阴影条)包被的板上,相对于野生型小鼠(n=5)的相对C4转化酶活性。误差棒表示标准偏差。如图5A-C中所示,在甘露聚糖和酵母聚糖包被的板上,来自MASP-2^{-/-}小鼠的血浆完全缺乏凝集素-途径-介导的补体活化。这些结

果清楚证实,MASP-2是凝集素途径的效应器组分。

[0622] 在来自MASP-2-/-小鼠的血清中重组MASP-2重建凝集素途径-依赖性C4活化

[0623] 为了确定MASP-2的缺乏是MASP-2-/-小鼠中凝集素途径-依赖性C4活化丧失的直接原因,用上述的C4裂解测定法检查添加重组MASP-2蛋白至血清样品中的作用。按下文实施例3所述,产生和纯化在功能上有活性的鼠MASP-2和催化失活的鼠MASP-2A(其中丝氨酸蛋白酶结构域中的活性位点丝氨酸残基被置换为丙氨酸残基)重组蛋白。用递增蛋白浓度的重组鼠MASP-2或失活的重组鼠MASP-2A预孵育来自4MASP-2-/-小鼠的合并的血清,按上文所述测定C4转化酶活性。

[0624] 结果:如图6中所示,添加功能上有活性的鼠重组MASP-2蛋白(以空心三角形表示)至获自MASP-2-/-小鼠的血清以蛋白浓度依赖性方式恢复凝集素途径-依赖性C4活化,而催化失活的鼠MASP-2A蛋白(以星号表示)未恢复C4活化。图6中显示的结果标准化至用合并的野生型小鼠血清观察到的C4活化(以虚线表示)。

[0625] 实施例3

[0626] 本实施例描述重组全长人、大鼠和鼠MASP-2、MASP-2衍生的多肽和MASP-2的催化失活的突变形式的重组表达和蛋白质产生。

[0627] 全长人、鼠和大鼠MASP-2的表达:

[0628] 将人MASP-2的全长cDNA序列(SEQ ID NO:4)也亚克隆至哺乳动物表达载体pCI-Neo(Promega),其在CMV增强子/启动子区的控制下驱动真核表达(描述于Kaufman R.J.等, Nucleic Acids Research 19:4485-90,1991;Kaufman,Methods in Enzymology,185:537-66(1991))。将全长小鼠cDNA(SEQ ID NO:50)和大鼠MASP-2cDNA(SEQ ID NO:53)各自亚克隆至pED表达载体。然后使用Maniatis等,1989中描述的标准磷酸钙转染程序,将MASP-2表达载体转染至粘附的中国仓鼠卵巢细胞系DXB1。用这些构建体转染的细胞生长极慢,意味着编码的蛋白酶是细胞毒性的。

[0629] 在另一方法中,将包含MASP-2的人cDNA的微基因构建体(SEQ ID NO:49)(通过其内源启动子驱动)瞬时转染至中国仓鼠卵巢细胞(CHO)。人MASP-2蛋白分泌至培养基,如下文所述分离。

[0630] 全长的催化失活的MASP-2的表达:

[0631] 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)结合它们各自的碳水化合物模式后,MASP-2通过自身催化裂解来激活。导致MASP-2活化的自身催化裂解经常发生在自血清分离MASP-2的过程期间,或在重组表达后的纯化期间。为了获得较稳定的蛋白制备物用作抗原,催化失活形式的MASP-2,被称为MASP-2A,通过替代存在于蛋白酶结构域的催化三联体中的丝氨酸残基为大鼠(SEQ ID NO:55Ser617至

[0632] Ala617)、小鼠(SEQ ID NO:52Ser617至Ala617)或人(SEQ ID NO:3Ser618至Ala618)中的丙氨酸残基产生。

[0633] 为了产生催化失活的人和鼠MASP-2A蛋白,使用表5中显示的寡核苷酸进行定点诱变。表5中的寡核苷酸经设计以退火至编码有酶活性的丝氨酸的人和鼠cDNA区,和所述寡核苷酸包含错配以改变丝氨酸密码子为丙氨酸密码子。例如,PCR寡核苷酸SEQ ID NOS:56-59与人MASP-2cDNA(SEQ ID NO:4)组合使用,以扩增自起始密码子至有酶活性的丝氨酸和自

丝氨酸至终止密码子的区域,以产生包含Ser618至Ala618突变的突变MASP-2A的完整开放阅读形式。PCR产物在琼脂糖凝胶电泳和条带制备后纯化,和单一腺苷重叠使用标准加尾程序产生。然后将腺苷加尾的MASP-2A克隆至pGEM-T easy载体,转化至大肠杆菌。

[0634] 催化失活的大鼠MASP-2A蛋白如下产生:以等摩尔量组合SEQ ID NO:64和SEQ ID NO:65、在100℃加热2分钟和缓慢冷却至室温,使这两种寡核苷酸经激酶激活(kinasing)和退火。得到的退火片段具有Pst1和Xba1相容末端,和将其插入,代替野生型大鼠

[0635] MASP-2cDNA (SEQ ID NO:53)的Pst1-Xba1片段,以产生大鼠MASP-2A。

[0636] 5'GAGGTGACGCAGGAGGGGCATTAGTGTTT 3' (SEQ ID NO:64)

[0637] 5'CTAGAAACACTAATGCCCTCCTGCGTCACCTCTGCA 3' (SEQ ID NO:65)

[0638] 将人、鼠和大鼠MASP-2A各自进一步亚克隆至哺乳动物表达载体pED或pCI-Neo的任一个中,和转染至中国仓鼠卵巢细胞系DXB1,如下文所述。

[0639] 在另一方法中,催化失活形式的MASP-2使用描述于Chen等,J.Biol.Chem.,276(28):25894-25902,2001中的方法构建。简言之,包含全长人MASP-2cDNA的质粒(描述于Thiel等,Nature 386:506,1997)用Xho1和EcoR1消化,将MASP-2cDNA(本文称为SEQ ID NO:4)克隆至pFastBac1杆状病毒转移载体(Life Technologies,NY)的相应的限制位点。然后通过用编码肽区域氨基酸610-625 (SEQ ID NO:13)的双链寡核苷酸置换天然区域氨基酸610-625,将在Ser618处的MASP-2丝氨酸蛋白酶活性位点改变为Ala618,以产生具有失活的蛋白酶结构域的MASP-2全长多肽。

[0640] 包含源自人Masp-2的多肽区域的表达质粒的构建

[0641] 以下构建体使用MASP-2信号肽 (SEQ ID NO:5的残基1-15)产生以分泌MASP-2的各种结构域。表达人MASP-2CUBI结构域 (SEQ ID NO:8)的构建体通过PCR扩增编码MASP-2的残基1-121 (SEQ ID NO:6)的区域(对应于N-末端CUBI结构域)制备。表达人MASP-2CUBIEGF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1-166的区域(对应于N-末端CUBIEGF结构域)制备。表达人MASP-2CUBIEGFCUBII结构域 (SEQ ID NO:10)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CUBIEGFCUBII结构域)扩增。上述的结构域使用Vent_r聚合酶和pBS-MASP-2作为模板,按照已建立的PCR方法,通过PCR进行扩增。有义引物的5'引物序列(5'-CGGGATCCATGAGGCTGCTGACCCTC-3' SEQ ID NO:34)在PCR产物的5'末端引入BamHI限制位点(下划线)。下表5中显示的用于各MASP-2结构域的反义引物,经设计以在各PCR产物末端在EcoRI位点(下划线)之前引入终止密码子(粗体)。一旦扩增,DNA片段用BamHI和EcoRI消化,和克隆至pFastBac1载体的相应位点。得到的构建体通过限制性作图表征和通过dsDNA测序证实。

[0642] 表5:MASP-2PCR引物

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'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGGCTGCAT A (SEQ ID NO:35)
SEQ ID NO:9 CUBIEGF (SEQ ID NO:6 的 aa 1-166)	5'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCCT C-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTACAGGGCGC T-3' (SEQ ID NO:36)

[0644]	MASP-2 结构域	5' PCR 引物	3' PCR 引物
	SEQ ID NO:10 CUBIEGFCUBII (SEQ ID NO:6 的 aa 1-293)	5'CGGGATCCATGA GGCTGCTGACCT C-3' (SEQ ID NO:34)	5'GGAATTCCTAGTAGTGGA T 3' (SEQ ID NO:37)
	SEQ ID NO:4 人 MASP-2	5'ATGAGGCTGCTG ACCCTCCTGGGCC TTC 3' (SEQ ID NO: 56) hMASP-2_正向	5'TTAAAATCACTAATTATG TTCTCGATC 3' (SEQ ID NO: 59) hMASP-2_反向
	SEQ ID NO:4 人 MASP-2 cDNA	5'CAGAGGTGACGC AGGAGGGGCAC 3' (SEQ ID NO: 58) hMASP-2_ala_正向	5'GTGCCCCCTCCTGCGTCAC CTCTG 3' (SEQ ID NO: 57) hMASP-2_ala_反向
	SEQ ID NO:50 鼠 MASP-2 cDNA	5'ATGAGGCTACTC ATCTTCCTGG3' (SEQ ID NO: 60) mMASP-2_正向	5'TTAGAAATTACTTATTAT GTTCTCAATCC3' (SEQ ID NO: 63) mMASP-2_反向
	SEQ ID NO:50 鼠 MASP-2 cDNA	5'CCCCCCTGCGT CACCTCTGCAG3' (SEQ ID NO: 62) mMASP-2_ala_正向	5'CTGCAGAGGTGACGCAG GGGGGG 3' (SEQ ID NO: 61) mMASP-2_ala_反向

[0645] MASP-2的重组真核表达和酶失活小鼠、大鼠和人MASP-2A的蛋白质产生

[0646] 使用标准磷酸钙转染程序将上述的MASP-2和MASP-2A表达构建体转染至DXB1细胞 (Maniatis等,1989)。MASP-2A在无血清培养基中产生,以确保制备物未被其它血清蛋白污染。每2天自汇合的细胞收获培养基(总共四次)。对于三个物种的每一个,重组MASP-2A的水平平均为大约1.5 mg/升培养基。

[0647] MASP-2A蛋白纯化:MASP-2A(上述的Ser-Ala突变体)通过亲和色谱在MBP-A-琼脂糖柱上纯化。该策略能够快速纯化而不使用外源标签。将MASP-2A(100-200 ml的用等体积的上样缓冲液(50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 包含150 mM NaCl和25 mM CaCl₂)稀释的培养基)上样到用10 ml的上样缓冲液预平衡的MBP-琼脂糖亲和柱(4 ml)上。在用另外10 ml的上样缓冲液洗涤后,蛋白用包含1.25 M NaCl和10 mM EDTA的50 mM Tris-Cl, pH 7.5以1 ml流分洗脱。包含MASP-2A的流分通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定。在必要时,MASP-2A通过在MonoQ柱(HR 5/5)上离子交换色谱进一步纯化。蛋白质用包含50 mM NaCl的50 mM Tris-Cl pH 7.5透析,和上样到用相同缓冲液平衡的柱上。在洗涤后,结合的MASP-2A用经10 ml的0.05-1M NaCl梯度洗脱。

[0648] 结果:自200ml培养基获得产量为0.25-0.5mg的MASP-2A蛋白。由于糖基化,通过MALDI-MS测定的分子量77.5kDa大于未修饰多肽的计算值(73.5kDa)。在各个N-糖基化位点处聚糖的连接是观测的质量的原因。MASP-2A在SDS-聚丙烯酰胺凝胶上作为单一条带迁移,证明在生物合成期间其未被蛋白水解加工。对于糖基化多肽的同二聚体,通过平衡超速离心测定的重均分子量与计算值一致。

[0649] 重组人Masp-2多肽的产生

[0650] 用于产生重组MASP-2和MASP2A衍生的多肽的另一方法描述于Thielens,N.M.,等, J.Immunol.166:5068-5077,2001。简言之,Spodopterafrugiperda昆虫细胞(获自Novagen, Madison,WI的Ready-Plaque Sf9细胞)在添加有50IU/ml青霉素和50mg/ml链霉素(Life

Technologies)的Sf900II无血清培养基(Life Technologies)中生长和维持。Trichoplusia ni(High Five)昆虫细胞(由Jadwiga Chroboczek,Institut de Biologie Structurale,Grenoble,France提供)在添加有50IU/ml青霉素和50mg/ml链霉素的包含10%FCS(Dominique Dutscher,Brumath,France)的TC100培养基(Life Technologies)中维持。重组杆状病毒使用Bac-to-Bac系统(Life Technologies)产生。使用Qiagen midiprep纯化系统(Qiagen)纯化杆粒DNA,并且使用cellfectin/Sf900 II SFM培养基(Life Technologies)按制造商的方案所述,将杆粒DNA用于转染Sf9昆虫细胞。4天后收集重组病毒颗粒,通过病毒斑测定法滴定,和按King和Possee在The Baculovirus Expression System:A Laboratory Guide,Chapman and Hall Ltd.,London,第111-114页,1992中描述进行扩增。

[0651] High Five细胞(1.75×10^7 个细胞/175-cm²组织培养瓶)用包含MASP-2多肽的重组病毒以2的多重性感染在Sf900 II SFM培养基中在28℃感染96h。上清液通过离心收集,加入二异丙基氟代磷酸酯至终浓度1mM。

[0652] MASP-2多肽分泌在培养基中。培养上清液针对50mM NaCl,1mM CaCl₂,50mM三乙醇胺盐酸盐,pH 8.1透析,和以1.5ml/min上样到用相同缓冲液平衡的Q-Sepharose Fast Flow柱(Amersham Pharmacia Biotech)(2.8x 12cm)上。通过应用在相同缓冲液中至350mM NaCl的1.2升线性梯度进行洗脱。包含重组MASP-2多肽的流分通过蛋白质印迹分析鉴定,通过加入(NH₄)₂SO₄至60%(w/v)进行沉淀,和在4℃放置过夜。将沉淀重悬浮于145mM NaCl,1mM CaCl₂,50mM三乙醇胺盐酸盐,pH 7.4中,并施加到用相同缓冲液平衡的TSK G3000 SWG柱(7.5x 600mm)(Tosohaas,Montgomeryville,PA)上。然后通过Microsep微量浓缩器(m.w.截止=10,000)(Filtron,Karlstein,Germany)上超滤将纯化的多肽浓缩至0.3mg/ml。

[0653] 实施例4

[0654] 本实施例描述了产生针对MASP-2多肽的多克隆抗体的方法。

[0655] 材料和方法:

[0656] MASP-2抗原:多克隆抗-人MASP-2抗血清通过用以下分离的MASP-2多肽免疫产生:分离自血清的人MASP-2(SEQ ID NO:6);重组人MASP-2(SEQ ID NO:6)、包含无活性蛋白酶结构域的MASP-2A(SEQ ID NO:13),如实施例3中所述;和如上文实施例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)。

[0657] 多克隆抗体:6周龄兔,用BCG(杆菌Calmette-Guerin疫苗)引发,通过注射100μg在无菌盐水溶液中的100μg/ml的MASP-2多肽进行免疫。每4周进行注射,通过ELISA测定法监测抗体滴度,如实施例5中所述。收集培养上清液用于通过蛋白A亲和色谱进行抗体纯化。

[0658] 实施例5

[0659] 本实施例描述用于产生针对大鼠或人MASP-2多肽的鼠单克隆抗体的方法。

[0660] 材料和方法:

[0661] 雄性A/J小鼠(Harlan,Houston,Tex.),8-12周龄,用在200μl的磷酸缓冲盐水(PBS)pH 7.4中在完全弗氏佐剂(Difco Laboratories,Detroit,Mich)中100μg人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽(按实施例3中所述制备)皮下注射。以两周间隔,小鼠用在不完全弗氏佐剂中的50μg的人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽两次皮下注射。在第四周,小鼠用在

PBS中的50 μ g的人或大鼠rMASP-2或rMASP-2A多肽注射和4天后融合。

[0662] 对于各融合,自免疫小鼠的脾制备单细胞悬浮液和用于与Sp2/0骨髓瘤细胞融合。5x10⁸个Sp2/0和5x10⁸个脾细胞在包含50%聚乙二醇(M.W.1450)(Kodak,Rochester,N.Y.)和5%二甲基亚砷(Sigma Chemical Co.,St.Louis,Mo.)的培养基中融合。然后在添加有10%胎牛血清、100个单位/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胸苷的Iscove培养基(Gibco,Grand Island,N.Y.)中将细胞调整至1.5x10⁵个脾细胞/200 μ l悬浮液的浓度。将200微升的细胞悬浮液加入至大约20个96-孔微量培养板的各孔。在大约10天后,吸出培养上清液用于在ELISA测定法中筛选与纯化的因子MASP-2的反应性。

[0663] ELISA测定法:Immulon 2(Dynatech Laboratories,Chantilly,Va.)微量测试板的各孔通过加入50 μ l的50ng/ml的纯化hMASP-2或大鼠rMASP-2(或rMASP-2A)在室温下包被过夜。用于包被的低浓度的MASP-2能够选择高-亲和力和抗体。在包被溶液通过轻弹板除去后,将200 μ l含BLOTTO(脱脂奶粉)的PBS加入至各孔中1小时,以封闭非-特异性位点。在1小时后,然后用缓冲液PBST(包含0.05%Tween 20的PBS)洗涤各孔。自各融合孔的50微升的培养上清液经收集和与50 μ l的BLOTTO混合,然后加入至微量测试板的各个孔中。在1小时孵育后,各孔用PBST洗涤。然后,结合的鼠抗体通过与辣根过氧化物酶(HRP)缀合和以1:2,000稀释在BLOTTO中的山羊抗-小鼠IgG(Fc特异性)(Jackson ImmunoResearch Laboratories,West Grove,Pa.)反应而检测。将包含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至各孔用于显色30分钟。通过每孔加入50 μ l的2M H₂SO₄终止反应。反应混合物在450nm的光密度用BioTek ELISA Reader(BioTek Instruments,Winooski,Vt.)读出。

[0664] MASP-2结合测定法:

[0665] 在上述的MASP-2ELISA测定法中测试阳性的培养上清液可在结合测定法中测试,以测定MASP-2抑制剂对MASP-2具有的结合亲和力。类似的测定法也可用于测定抑制剂是否结合在补系统中的其它抗原。

[0666] 聚苯乙烯微量滴定板的各孔(96-孔培养基结合板,Corning Costar,Cambridge,MA)用在磷酸缓冲盐水(PBS)pH 7.4中的MASP-2(20ng/100 μ l/孔,Advanced Research Technology,San Diego,CA)在4℃包被过夜。在吸出MASP-2溶液后,各孔用包含1%牛血清白蛋白(BSA;Sigma Chemical)的PBS在室温下封闭2小时。没有MASP-2包被的各孔用作背景对照。将在封闭溶液中各种浓度的等份的杂交瘤上清液或纯化的抗-MASP-2MoAb加入至各孔。在室温孵育2h后,各孔用PBS充分漂洗。MASP-2-结合的抗-MASP-2MoAb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),使其在室温下孵育1h而检测。再次用PBS充分漂洗板,和加入100 μ l的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物(Kirkegaard and Perry Laboratories,Gaithersburg,MD)。TMB的反应通过加入100 μ l的1M磷酸淬灭,和在微板阅读器(SPECTRA MAX 250,Molecular Devices,Sunnyvale,CA)中在450nm读出板。

[0667] 然后在功能测定法例如实施例2所述的C4裂解测定法中测试来自阳性孔的培养上清液抑制补体活化的能力。然后通过有限稀释而克隆阳性孔中的细胞。在上述ELISA测定法中再次测试MoAb与hMASP-2的反应性。将选择的杂交瘤在旋转瓶中生长,和收集耗尽的培养上清液用于通过蛋白A亲和色谱进行抗体纯化。

[0668] 实施例6

[0669] 本实施例描述人源化的鼠抗-MASP-2抗体和抗体片段的形成和制备。

[0670] 鼠抗-MASP-2单克隆抗体在雄性A/J小鼠中产生,如实施例5中所述。然后将鼠抗体按下文所述人源化,以通过替代鼠恒定区为它们的人对应物以产生抗体的嵌合IgG和Fab片段,降低其免疫原性,其根据本发明可用于抑制在人受试者中MASP-2-依赖性补体活化的不良作用。

[0671] 1.从鼠杂交瘤细胞克隆抗-MASP-2可变区基因。使用RNAzol1按制造商的方案(Biotech,Houston,Tex.),将总RNA自分泌抗-MASP-2MoAb的杂交瘤细胞(如实施例7中所述获得)分离。第一链cDNA使用寡聚dT作为引物自总RNA合成。使用免疫球蛋白恒定C区衍生的3'引物和源自前导肽或鼠VH或VK基因的第一框架区的简并引物组作为5'引物进行PCR。锚定PCR按Chen和Platsucas(Chen,P.F.,Scand.J.Immunol.35:539-549,1992)所述进行。对于克隆VK基因,双链cDNA使用Not1-MAK1引物(5'-TGCGGCCGCTGTAGGTGCTGTCTTT-3' SEQ ID NO:38)制备。将退火的接头AD1(5'-GGAATTCCTCGTTATTCTCGGA-3' SEQ ID NO:39)和AD2(5'-TCCGAGAATAACGAGTG-3' SEQ ID NO:40)连接至双链cDNA的5'和3'末端。在3'末端的接头通过Not1消化除去。然后消化的产物用作PCR模板,用AD1寡核苷酸作为5'引物和MAK2(5'-CATTGAAAGCTTTGGGGTAGAAGTTGTTC-3' SEQ ID NO:41)作为3'引物。将大约500bp的DNA片段克隆至pUC19。选择数个克隆用于序列分析以验证克隆的序列包括预期的鼠免疫球蛋白恒定区。Not1-MAK1和MAK2寡核苷酸源自VK区和分别为在C κ 基因的第一碱基对下游182和84bp。选择包括完整VK和前导肽的克隆。

[0672] 对于克隆VH基因,使用Not1 MAG1引物(5'-CGCGGCCGCTGCTCAGAGTGTAGA-3' SEQ ID NO:42)制备双链cDNA。将退火的接头AD1和AD2连接至双链cDNA的5'和3'末端。3'末端的接头通过Not1消化除去。消化的产物用作PCR模板,其中AD1寡核苷酸和MAG2

[0673] (5'-CGGTAAGCTTCACTGGCTCAGGGAAATA-3' SEQ ID NO:43)作为引物。将500-600bp长度的DNA片段克隆至pUC19。Not1-MAG1和MAG2寡核苷酸源自鼠C γ .7.1区,和分别为在鼠C γ .7.1基因的第一碱基对的下游180和93bp。选择包含完整VH和前导肽的克隆。

[0674] 2.用于嵌合MASP-2IgG和Fab表达载体的构建。上文描述的克隆的VH和VK基因用作PCR反应的模板,以添加Kozak共有序列至核苷酸序列的5'末端和添加剪接供体至3'末端。在分析序列以证实PCR错误不存在后,将VH和VK基因插入分别包含人C γ 1和C κ 的表达载体盒,得到pSV2neoVH-huC γ 1和pSV2neoV-huC γ 。CsCl1梯度纯化的重链和轻链载体的质粒DNA用于通过电穿孔转染COS细胞。在48小时后,培养上清液通过ELISA测试以证实存在大约200ng/ml的嵌合IgG。收获细胞和制备总RNA。第一链cDNA自总RNA使用寡聚dT作为引物合成。该cDNA用作PCR模板以产生Fd和 κ DNA片段。对于Fd基因,使用5'-AAGAAGCTTGCCGCCACCATGGATTGGCTGTGGAAGT-3' (SEQ ID NO:44)作为5'引物和CH1-衍生的3'引物(5'-CGGGATCCTCAAACCTTTCTTGTCACCTTGG-3' SEQ ID NO:45)进行PCR。DNA序列经证实包含人IgG1的完整的VH和CH1结构域。在用合适的酶消化后,将FdDNA片段插入在表达载体盒pSV2dhfr-TUS的HindIII和BamHI限制位点,得到pSV2dhfrFd。pSV2质粒为市售可得的,并由来自各种来源的DNA区段组成:pBR322 DNA(细线)包含pBR322 DNA复制起点(pBR ori)和内酰胺酶氨苄青霉素抗性基因(Amp);SV40 DNA,通过较宽阴影表示和标注,包含SV40 DNA复制起点(SV40 ori)、早期启动子(5'至dhfr和neo基因)和多腺苷酸化信号(3'至dhfr

和neo基因)。SV40-来源的多腺苷酸化信号(pA)还位于Fd基因的3'末端。

[0675] 对于κ基因,使用5'-AAGAAAGCTTGCCGCCACCATGTTCTCACTAGCTCT-3'(SEQ ID NO:46)作为5'引物和CK-衍生的3'引物(5'-CGGGATCCTTCTCCCTCTAACACTCT-3' SEQ ID NO:47)进行PCR。DNA序列证实包含完整的VK和人CK区。在用合适的限制酶消化后,将κDNA片段插入表达载体盒pSV2neo-TUS的HindIII和BamHI限制位点以得到pSV2neoK。Fd和κ基因的表达受HCMV-衍生的增强子和启动子元件驱动。因为Fd基因不包括参与链间二硫键的半胱氨酸氨基酸残基,该重组嵌合Fab包含非-共价地连接的重链和轻链。该嵌合Fab被称为cFab。

[0676] 为了获得具有重链和轻链间二硫键的重组Fab,可延长上述的Fd基因以包括来自人IgG1的铰链区的另外9个氨基酸(EPKSCDKTH SEQ ID NO:48)的编码序列。编码Fd基因的3'末端的30个氨基酸的BstEII-BamHIDNA区段可置换为编码延长的Fd的DNA区段,产生pSV2dhfrFd/9aa。

[0677] 3. 嵌合抗-MASP-2IgG的表达和纯化

[0678] 为了产生分泌嵌合抗-MASP-2IgG的细胞系,NS0细胞用纯化的pSV2neoVH-huC. γ1和pSV2neoV-huCK质粒DNA通过电穿孔转染。在存在0.7mg/ml G418的情况下选择转染的细胞。使用包含血清的培养基在250ml旋转瓶中培养细胞。

[0679] 将100ml旋转培养物的培养上清液上样到10-ml PROSEP-A柱(Bioprocessing, Inc., Princeton, N.J.)上。柱用10床体积的PBS洗涤。结合的抗体用50mM柠檬酸盐缓冲液pH 3.0洗脱。将等体积的1MHepes, pH 8.0加入至包含纯化抗体的流分中,以调整pH至7.0。残留的盐通过用PBS通过Millipore膜超滤(M.W.截止:3,000)进行缓冲液交换而除去。纯化的抗体的蛋白浓度通过BCA方法(Pierce)测定。

[0680] 4. 嵌合抗-MASP-2Fab的表达和纯化

[0681] 为了产生分泌嵌合抗-MASP-2Fab的细胞系,CHO细胞用纯化的pSV2dhfrFd(或pSV2dhfrFd/9aa)和pSV2neokappa质粒DNA通过电穿孔转染。在存在G418和甲氨蝶呤的情况下选择转染的细胞。选择的细胞系在递增浓度的甲氨蝶呤中扩增。细胞是通过有限稀释亚克隆的单细胞。高产量的单细胞亚克隆细胞系然后在100ml旋转培养物中使用无血清培养基进行培养。

[0682] 嵌合抗-MASP-2Fab通过亲和色谱使用小鼠抗-个体型MoAb纯化成MASP-2MoAb。抗-个体型MASP-2MoAb可通过用与匙孔血蓝蛋白(KLH)缀合的鼠抗-MASP-2MoAb免疫小鼠和筛选可与人MASP-2竞争的特异性MoAb结合来制备。对于纯化,将来自产生cFab或cFab/9aa的CHO细胞的旋转培养物的100ml上清液上样到与抗-个体型MASP-2MoAb偶联的亲和柱上。然后用PBS充分洗涤柱,之后用50mM二乙胺pH 11.5洗脱结合的Fab。残留的盐按上述通过缓冲液交换除去。纯化Fab的蛋白浓度通过BCA方法(Pierce)测定。

[0683] 嵌合MASP-2IgG、cFab和cFAB/9aa抑制MASP-2-依赖性补体途径的能力可通过使用实施例2或实施例7中描述的抑制性测定法测定。

[0684] 实施例7

[0685] 本实施例描述了体外C4裂解测定,用作功能性筛选,以鉴定能够经由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而阻断MASP-2-依赖性补体活化的MASP-2抑制剂。

[0686] C4裂解测定:C4裂解测定已经描述于Petersen, S.V., 等人, J. Immunol. Methods

257:107,2001,其检测了由结合L-纤维胶凝蛋白的来自金黄色葡萄球菌的脂磷壁酸(LTA)所致的凝集素途径活化。

[0687] 试剂:福尔马林固定的金黄色葡萄球菌(DSM20233)制备如下:将细菌在胰酪大豆血培养基(tryptic Soybloodmedium)中于37℃培养过夜,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,再用PBS洗涤3次后,重悬浮于包被缓冲液(15mM Na₂CO₃、35mM NaHCO₃,pH 9.6)中。

[0688] 测定:Nunc MaxiSorb微量滴定板(Nalgene Nunc International,Rochester,NY)的各孔用以下成分包被:100μl福尔马林固定的金黄色葡萄球菌DSM20233(OD₅₅₀=0.5)的包被缓冲液与1μg L-纤维胶凝蛋白的包被缓冲液。孵育过夜后,各孔用0.1%人血清白蛋白(HSA)的TBS溶液(10mM Tris-HCl,140mM NaCl,pH 7.4)封闭,然后用含有0.05%Tween 20和5mM CaCl₂的TBS溶液(洗涤缓冲液)洗涤。将人血清样品稀释于20mM Tris-HCl,1M NaCl,10mM CaCl₂,0.05%Triton X-100,0.1%HSA,pH 7.4中,这防止了内源C4的活化,并使C1复合物(由C1q、C1r和C1s组成)解离。将不同浓度的MASP-2抑制剂(包括抗-MASP-2MoAb和抑制性肽)加到血清样品中。将稀释的样品加到板中,在4℃下孵育过夜。24小时后,各板用洗涤缓冲液充分洗涤,然后向各孔中加入0.1μg经纯化的人C4(按照Dodds,A.W.,Methods Enzymol.223:46,1993所述获得)/100μl 4mM巴比妥、145mM NaCl,2mM CaCl₂,1mM MgCl₂,pH 7.4。在37℃1.5小时后,各板再次经洗涤,使用碱性磷酸酶-缀合的鸡抗人C4c(获自Immunsystem,Uppsala,Sweden),检测C4b沉积,并使用比色底物磷酸对硝基苯酯进行测定。

[0689] 在甘露聚糖上的C4测定:在加入与各种MASP-2抑制剂混合的血清之前,通过用LSP和甘露聚糖包被测定板,修改上述测定法以测定经由MBL的凝集素途径活化。

[0690] 在H-纤维胶凝蛋白(Hakata Ag)上的C4测定:在加入与各种MASP-2抑制剂混合的血清之前,通过用LSP和H-纤维胶凝蛋白包被测定板,修改上述测定法以测定经由H-纤维胶凝蛋白的凝集素途径活化。

[0691] 实施例8

[0692] 以下测定法证实在野生型和MASP-2^{-/-}小鼠中存在经典途径活化。

[0693] 方法:免疫复合物通过在室温下用在10mM Tris,140mM NaCl,pH 7.4中的0.1%人血清白蛋白包被微量滴定板(Maxisorb,Nunc,cat.No.442404,Fisher Scientific)1小时,接着在4℃用以1:1000在TBS/tween/Ca²⁺中稀释的绵羊抗全血清抗血清(Scottish Antibody Production Unit,Carluk,Scotland)孵育过夜来原位产生。血清样品获自野生型和MASP-2^{-/-}小鼠和加入至包被的板中。制备对照样品,其中C1q从野生型和MASP-2^{-/-}血清样品中耗尽。C1q-耗尽的小鼠血清使用包被有兔抗-人C1q IgG(Dako,Glostrup,Denmark)的蛋白-A-偶联的Dynabeads(Dynal Biotech,Oslo,Norway)根据供应商的说明书制备。板在37℃孵育90分钟。结合的C3b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。第二抗体是山羊抗-兔IgG。

[0694] 结果:图7显示在包被有野生型血清、MASP-2^{-/-}血清、C1q-耗尽的野生型和C1q-耗尽的MASP-2^{-/-}血清的IgG的板上的相对C3b沉积水平。这些结果证实,在MASP-2^{-/-}小鼠品系中经典途径是完整的。

[0695] 实施例9

[0696] 下面的测定法用来通过在经典途径被免疫复合物启动的条件下分析MASP-2抑制

剂的作用,从而检测MASP-2抑制剂是否阻断了经典途径。

[0697] 方法:为了测试MASP-2抑制剂对补体活化条件(其中经典途径被免疫复合物启动)的影响,在10 μ g/mL免疫复合物(IC)或PBS存在时,将一式三份的含有90%NHS的50 μ l样品在37 $^{\circ}$ C孵育,并且还包括平行的一式三份的样品(+/-IC),其在37 $^{\circ}$ C孵育期间含有200nM抗备解素单克隆抗体。在37 $^{\circ}$ C孵育2小时后,将13mM EDTA加到所有样品中以终止进一步的补体活化,并立即将样品冷却到5 $^{\circ}$ C。再将样品保存于-70 $^{\circ}$ C,然后按照生产商的说明书,使用ELISA试剂盒(Quidel,目录号A015和A009)进行补体活化产物(C3a和sC5b-9)的测定。

[0698] 实施例10

[0699] 本实施例描述了阻断MASP-2活性的高亲和性抗-MASP-2Fab2抗体片段的鉴定。

[0700] 背景和原理:MASP-2是具有许多独立功能结构域的复杂蛋白质,包括:MBL和纤维胶凝蛋白的结合位点、丝氨酸蛋白酶催化位点、蛋白水解底物C2的结合位点、蛋白水解底物C4的结合位点、MASP-2酶原自身活化的MASP-2裂解位点和两个Ca⁺⁺结合位点。鉴定出与MASP-2高亲和性结合的Fab2抗体片段,并在功能测定法中测定所鉴定的Fab2片段,以确定它们是否能够阻断MASP-2功能活性。

[0701] 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功能活性所需要的MASP-2上的结构表位。因此,许多或所有的高亲和性结合抗-MASP-2Fab2可能不能抑制MASP-2功能活性,除非它们结合直接参与MASP-2功能活性的MASP-2上的结构表位。

[0702] 测定抑制凝集素途径C3转化酶形成的功能测定法被用来评价抗-MASP-2Fab2的“阻断活性”。已知MASP-2在凝集素途径中的主要生理作用是产生凝集素介导的补体途径的下一个功能成分,即凝集素途径C3转化酶。凝集素途径C3转化酶是蛋白水解裂解C3成为C3a和C3b的关键酶复合物(C4bC2a)。MASP-2不是凝集素途径C3转化酶(C4bC2a)的结构成分;然而,需要MASP-2功能活性以产生组成凝集素途径C3转化酶的两个蛋白质成分(C4b、C2a)。此外,为了使MASP-2产生凝集素途径C3转化酶,似乎需要所有上述MASP-2的独立功能活性。出于这些原因,认为用于评价抗-MASP-2Fab2的“阻断活性”优选的测定法是测定抑制凝集素途径C3转化酶形成的功能测定法。

[0703] 高亲和性Fab2的产生:应用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出的目标配体反应的Fab2的自动抗体筛选技术,来产生抗大鼠MASP-2蛋白(SEQ ID NO:55)的高亲和性Fab2。利用已知量的大鼠MASP-2(~1mg,纯度>85%)蛋白进行抗体筛选。利用三轮扩增以选出具有最高亲和性的抗体。挑选约250个不同的表达抗体片段的目标(hit)用于ELISA筛选。随后对高亲和性目标进行测序以确定不同抗体的独特性。

[0704] 将50个独特的抗-MASP-2抗体纯化,将250 μ g各经纯化的Fab2抗体用于表征MASP-2结合亲和性和补体途径功能测定,更详述如下。

[0705] 用于评价抗-MASP-2Fab2的抑制(阻断)活性的测定法

[0706] 1.测定抑制凝集素途径C3转化酶形成的测定法:

[0707] 背景:凝集素途径C3转化酶是蛋白水解裂解C3成为两个有效促炎片段过敏毒素C3a和调理素C3b的酶复合物(C4bC2a)。C3转化酶的形成似乎是在介导炎症方面的凝集素途径中的关键步骤。

[0708] MASP-2不是凝集素途径C3转化酶(C4bC2a)的结构成分;因此,抗-MASP-2抗体(或Fab2)不会直接抑制之前已存在的C3转化酶的活性。然而,为了产生组成凝集素途径C3转化

酶的两个蛋白质成分(C4b、C2a),MASP-2丝氨酸蛋白酶活性是必需的。因此,抑制MASP-2功能活性的抗-MASP-2Fab2(即阻断性抗-MASP-2Fab2)抑制凝集素途径C3转化酶从头形成。C3含有独特的高反应性硫酯基团作为其结构的部分。在该测定法中当C3转化酶裂解C3时,C3b上的硫酯基团可与通过酯键或酰胺键固定在塑料孔底部的大分子上的羟基或氨基形成共价键,从而有利于在ELISA测定法中检测出C3b。

[0709] 酵母甘露聚糖是凝集素途径的已知激活剂。在测定C3转化酶形成的下列方法中,将用甘露聚糖包被的塑料孔与稀释的大鼠血清在37℃下孵育30分钟以激活凝集素途径。然后洗涤各孔,并采用标准ELISA方法测定固定在孔中的C3b。在该测定法中所产生的C3b的量直接反映了从头形成的凝集素途径C3转化酶。在该测定法中测定选定浓度的抗-MASP-2Fab2抑制C3转化酶形成和随后C3b产生的能力。

[0710] 方法:

[0711] 将96孔Costar培养基结合板与稀释于50mM碳酸盐缓冲液(pH9.5)的甘露聚糖以1μg/50μl/孔在5℃下孵育过夜。过夜孵育后,各孔用200μl PBS洗涤3次。然后各孔用100μl/孔的1%牛血清白蛋白的PBS溶液封闭,在室温下孵育1小时并温和搅动。然后各孔用200μl PBS洗涤3次。在5℃,将抗-MASP-2Fab2样品稀释于含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)至选定浓度。在5℃,将0.5%大鼠血清加到上述样品中,将100μl转移到各孔。将板盖上,在37℃水浴中孵育30分钟以允许补体活化。将板从37℃水浴转移至装有冰-水混合物的容器中终止反应。各孔用200μl PBS-Tween 20(0.05%Tween 20的PBS溶液)洗涤5次,再用200μl PBS洗涤2次。加入100μl/孔的1:10,000稀释的第一抗体(兔抗人C3c,DAKO A0062),该抗体溶于含有2.0mg/ml牛血清白蛋白的PBS中,在室温下轻轻搅动孵育1小时。各孔用200μl PBS洗涤5次。加入100μl/孔的1:10,000稀释的第二抗体(过氧化物酶-缀合的山羊抗兔IgG,American Qualex A102PU),该抗体溶于含有2.0mg/ml牛血清白蛋白的PBS中,在室温下在振荡器中轻轻搅动孵育1小时。各孔用200μl PBS洗涤5次。加入100μl/孔的过氧化物酶底物TMB(Kirkegaard&Perry Laboratories),在室温下孵育10分钟。通过加入100μl/孔1.0M H₃PO₄终止过氧化物酶反应,测定OD₄₅₀。

[0712] 2. 测量抑制MASP-2-依赖性C4裂解的测定法

[0713] 背景:MASP-2的丝氨酸蛋白酶活性是高度特异性的,仅鉴定出用于MASP-2的两种蛋白质底物:C2和C4。C4裂解产生C4a和C4b。抗-MASP-2Fab2可结合直接参与C4裂解的MASP-2的结构表位(例如C4的MASP-2结合位点;MASP-2丝氨酸蛋白酶催化位点),从而抑制MASP-2的C4裂解功能活性。

[0714] 酵母甘露聚糖是凝集素途径的已知激活剂。在测定MASP-2的C4裂解活性的下列方法中,将用甘露聚糖包被的塑料孔与稀释的大鼠血清在37℃下孵育30分钟以激活凝集素途径。因为用于该ELISA测定法中的第一抗体仅识别人C4,所以稀释的大鼠血清还补充了人C4(1.0μg/mL)。然后洗涤各孔,采用标准ELISA方法测定固定到孔中的人C4b。在该测定法中所产生的C4b的量可衡量MASP-2-依赖性C4裂解活性。在该测定法中,测定选定浓度的抗-MASP-2Fab2抑制C4裂解的能力。

[0715] 方法:将96孔Costar培养基结合板与稀释于50mM碳酸盐缓冲液(pH9.5)的甘露聚糖以1μg/50μl/孔在5℃下孵育过夜。各孔用200μl PBS洗涤3次。然后各孔用100μl/孔的1%

牛血清白蛋白的PBS溶液封闭,并在室温下孵育1小时并温和搅动。各孔用200 μ l PBS洗涤3次。在5 $^{\circ}$ C,将抗-MASP-2Fab2样品稀释于含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)至选定浓度。1.0 μ g/mL人C4(Quidel)也包括在这些样品中。在5 $^{\circ}$ C,将0.5%大鼠血清加到上述样品中,将100 μ l转移到各孔。将板盖上,在37 $^{\circ}$ C水浴中孵育30分钟以允许补体活化。将板从37 $^{\circ}$ C水浴转移至装有冰-水混合物的容器中终止反应。各孔用200 μ l PBS-Tween 20(0.05% Tween 20的PBS溶液)洗涤5次,然后各孔再用200 μ l PBS洗涤2次。加入100 μ l/孔的1:700稀释的生物素-缀合的鸡抗人C4c(Immunosystem AB,Uppsala,Sweden),该抗体溶于含有2.0mg/ml牛血清白蛋白的PBS中,在室温下轻轻搅动孵育1小时。各孔用200 μ l PBS洗涤5次。加入100 μ l/孔的0.1 μ g/mL过氧化物酶-缀合的链霉抗生物素(Pierce Chemical#21126),其溶于含有2.0mg/ml BSA的PBS中,在室温下在振荡器中轻轻搅动孵育1小时。各孔用200 μ l PBS洗涤5次。加入100 μ l/孔的过氧化物酶底物TMB(Kirkegaard&Perry Laboratories),在室温下孵育16分钟。通过加入100 μ l/孔1.0M H₃PO₄终止过氧化物酶反应,并测定OD₄₅₀。

[0716] 3. 抗大鼠MASP-2Fab2与“天然”大鼠MASP-2的结合测定法

[0717] 背景:MASP-2通常作为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)的MASP-2二聚体复合物存在于血浆中。因此,如果有兴趣研究抗-MASP-2Fab2与MASP-2生理学相关形式的结合,则重要的是开发出结合测定法,其中利用Fab2与血浆中的“天然”MASP-2之间,而不是与纯化的重组MASP-2之间的相互作用。在该结合测定法中,先将得自10%大鼠血清的“天然”MASP-2-MBL复合物固定在甘露聚糖包被的孔内。然后采用标准ELISA方法,对各种抗-MASP-2Fab2与固定化“天然”MASP-2的结合亲和性进行了研究。

[0718] 方法:将96孔Costar高结合板与稀释于50mM碳酸盐缓冲液(pH9.5)的甘露聚糖以1 μ g/50 μ l/孔在5 $^{\circ}$ C下孵育过夜。各孔用200 μ l PBS洗涤3次。然后各孔用100 μ l/孔的含0.5%脱脂奶粉的PBST(含0.05% Tween 20的PBS)封闭,并在室温下孵育1小时并温和搅动。各孔用200 μ l 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3次。在冰上制备含10%大鼠血清的高盐结合缓冲液(20mM Tris,1.0M NaCl,10mM CaCl₂,0.05% Triton-X100,0.1% (w/v)牛血清白蛋白,pH 7.4)。加入100 μ l/孔并在5 $^{\circ}$ C孵育过夜。各孔用200 μ l TBS/Tween/Ca⁺⁺洗涤缓冲液洗涤3次。然后,各孔用200 μ l PBS洗涤2次。加入100 μ l/孔的稀释于含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)的选定浓度的抗-MASP-2Fab2,并在室温下孵育1小时并温和搅动。各孔用200 μ l PBS洗涤5次。加入在2.0mg/mL牛血清白蛋白的PBS中1:5000稀释的100 μ l/孔的HRP-缀合的山羊抗Fab2(Biogenesis Cat No 0500-0099),并在室温下孵育1小时并温和搅动。各孔用200 μ l PBS洗涤5次。加入100 μ l/孔的过氧化物酶底物TMB(Kirkegaard&Perry Laboratories)并在室温下孵育70分钟。通过加入100 μ l/孔1.0M H₃PO₄终止过氧化物酶反应,并测定OD₄₅₀。

[0719] 结果:

[0720] 挑选了与大鼠MASP-2蛋白进行高亲和性反应的约250个不同的Fab2用于ELISA筛选。对这些高亲和性Fab2进行了测序以确定不同抗体的独特性,对50个独特的抗-MASP-2抗体进行纯化,用于进一步分析。250 μ g各经纯化的Fab2抗体用来表征MASP-2结合亲和性及补体途径功能测定。该分析的结果见下表6。

[0721] 表6:阻断凝集素途径补体活化的抗-MASP-2FAB2

Fab2 抗体#	C3 转化酶(IC50 (nM))	Kd	C4 裂解 IC50 (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
[0722] 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

[0723] 如上表6所示,在所测的50个抗-MASP-2Fab2中,17个Fab2被鉴定为MASP-2-阻断性Fab2,其有效抑制C3转化酶形成,IC50等于或小于10nM Fab2 (34%阳性命中率)。所鉴定的17个Fab2中有8个的IC50范围为纳摩尔以下。此外,表6中所示的所有17个MASP-2阻断性Fab2在凝集素途径C3转化酶测定法中基本上完全抑制C3转化酶形成。图8A图示了对于Fab2抗体#11的C3转化酶形成测定法的结果,其代表了测试的其它Fab2抗体,结果显示在表6。这是重要的考虑因素,因为理论上可能的是,甚至当各MASP-2分子被Fab2结合时,“阻断性”Fab2可能仅微弱地抑制MASP-2功能。

[0724] 尽管甘露聚糖是凝集素途径的已知激活剂,但是在大鼠血清中存在的抗甘露聚糖抗体也可能激活经典途径,并且通过经典途径C3转化酶产生C3b,这在理论上是可能的。然而,在本实施例所列的17个阻断性抗-MASP-2Fab2中的每一个都有效地抑制了C3b产生(>95%),因此证明了该测定法对于凝集素途径C3转化酶的特异性。

[0725] 为了计算各个Fab2的表观Kd,对所有17个阻断性Fab2都进行结合测定。对于6个阻断性Fab2,抗大鼠MASP-2Fab2与天然大鼠MASP-2的结合测定的结果也见表6。图8B图示了用Fab2抗体#11的结合测定法的结果。对于其它Fab2也进行了类似的结合测定,其结果见表6。一般而言,对于6个Fab2的每一个结合“天然”MASP-2所获得的表观Kd与在C3转化酶功能测定中Fab2的IC50恰好适当对应。有证据表明,在激活其蛋白酶活性时,MASP-2经历了从“无活性”到“活性”形式的构象变化(Feinberg等人,EMBOJ 22:2348-59 (2003);Gal等人,J.Biol.Chem.280:33435-44 (2005))。在用于C3转化酶形成测定法的正常大鼠血浆中,MASP-2主要以“无活性”酶原构象存在。相比之下,在结合测定法中,MASP-2作为与MBL(其结合到固定化甘露聚糖)的复合物的部分而存在;因此,MASP-2可能为“活性”构象(Petersen等人,J.Immunol Methods 257:107-16,2001)。因此,对于这两个功能测定法中所测定的17个阻断性Fab2的每一个,不必预期IC50和Kd之间确切的对应性,因为在各个测定法中,Fab2

可结合不同构象形式的MASP-2。尽管如此,除了Fab2#88以外,对于两种测定法中所测的其它16个Fab2的每一个,IC₅₀和表观K_d之间显示出相当密切的对应性(参见表6)。

[0726] 评价若干阻断性Fab2对于MASP-2-介导的C4裂解的抑制。图8C图示了C4裂解测定法的结果,显示用Fab2#41的抑制,IC₅₀为0.81nM(见表6)。如图9所示,发现所有测试的Fab2都抑制C4裂解,IC₅₀类似于C3转化酶测定法中所获得的IC₅₀(见表6)。

[0727] 尽管甘露聚糖是凝集素途径的已知激活剂,但是大鼠血清中抗甘露聚糖抗体的存在理论上也可能激活经典途径,从而通过C1s介导的C4裂解而产生C4b。然而,已经鉴定出有效抑制C4b产生(>95%)的若干抗-MASP-2Fab2,因此证明了该测定法对于MASP-2-介导的C4裂解的特异性。C4,如同C3一样,含有独特的高反应性硫酯基团作为其结构部分。在该测定法中当通过MASP-2裂解C4时,C4b上的硫酯基团可与通过酯键或酰胺键固定在塑料孔底部的大分子上羟基或氨基形成共价键,因此有利于在ELISA测定法中检测C4b。

[0728] 这些研究清楚表明,大鼠MASP-2蛋白的高亲和性FAB2的产生,功能性地阻断C4和C3转化酶活性,从而防止了凝集素途径活化。

[0729] 实施例11

[0730] 本实施例描述了对若干按照实施例10所述方法产生的阻断性抗大鼠MASP-2Fab2抗体进行的表位作图。

[0731] 方法:

[0732] 如图10所示,使用pED4载体,在CHO细胞中表达下列所有具有N端6个His标签的蛋白质:

[0733] 大鼠MASP-2A,一种全长MASP-2蛋白,通过活性中心上的丝氨酸改变为丙氨酸(S613A)而失活;

[0734] 大鼠MASP-2K,经改变降低了自身活化的全长MASP-2蛋白(R424K);

[0735] CUBI-II,一种仅含有CUB1、EGF样和CUBII结构域的大鼠MASP-2的N端片段;和

[0736] CUBI/EGF样,一种仅含有CUBI和EGF样结构域的大鼠MASP-2的N端片段。

[0737] 如前所述,将这些蛋白质通过镍-亲和层析从培养上清液中纯化(Chen等人, J.Biol.Chem.276:25894-02(2001))。

[0738] 采用pTrxFus(Invitrogen),使含有CCPII和大鼠MASP-2丝氨酸蛋白酶结构域的C端多肽(CCPII-SP),在大肠杆菌中表达成为硫氧还蛋白融合蛋白。用Thiobond亲和树脂将蛋白质从细胞裂解物中纯化。硫氧还蛋白融合配偶体由pTrxFus空载体表达作为阴性对照。

[0739] 将所有重组蛋白透析到TBS缓冲液中,通过测量OD(280nm),测得其浓度。

[0740] 斑点印迹分析:

[0741] 将上述和图10中所示的连续稀释的5种重组MASP-2多肽(以及硫氧还蛋白多肽作为CCPII-丝氨酸蛋白酶多肽的阴性对照)点在硝酸纤维素膜上。蛋白质的点样量在5重步骤中的范围为100ng至6.4pg。在稍后的实验中,蛋白质的点样量再次在5重步骤中的范围由50ng降至16pg。该膜用含5%脱脂奶粉的TBS溶液(封闭缓冲液)封闭,然后与含1.0μg/mL抗-MASP-2Fab2的封闭缓冲液(含有5.0mM Ca⁺⁺)一起温育。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。一块膜与作为阳性对照的多克隆兔抗人MASP-2Ab(参见Stover等人, JImmunol163:6848-59(1999))一起温育。在这种情况下,用HRP-缀合的山羊抗兔IgG(Dako;1/2,000稀释),检测结合的Ab。

[0742] MASP-2结合测定法:

[0743] ELISA板用含1.0 μ g/孔的重组MASP-2A或CUBI-II多肽的碳酸盐缓冲液(pH9.0)在4℃下包被过夜。各孔用含1%BSA的TBS溶液封闭,然后加入含连续稀释的抗-MASP-2Fab2的TBS溶液(含有5.0mM Ca^{2+})。将各板在室温下孵育1小时。用TBS/Tween/ Ca^{2+} 洗涤3次后,加入按1/10,000稀释于TBS/ Ca^{2+} 的HRP-缀合的抗人Fab(AbD/Serotec),将各板再次在室温下孵育1小时。用TMB过氧化物酶底物试剂盒(Biorad)检测结合的抗体。

[0744] 结果:

[0745] 斑点印迹法分析的结果表明了Fab2与下表7中提供的各种MASP-2多肽的反应性。表7提供的数值表明,所需要的蛋白质点样量提供大约最大信号强度的一半。如表所示,所有多肽(仅硫氧还蛋白融合配偶体除外)均被阳性对照Ab(多克隆抗人MASP-2血清,在兔中产生)识别。

[0746] 表7:斑点印迹法中与不同重组大鼠MASP-2多肽的反应性

Fab2 抗体#	MASP-2A	CUBI-II	CUBI/EGF-样	CCPII-SP	硫氧还蛋白
40	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
41	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
11	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
49	0.16 ng	NR	NR	>20 ng	NR
52	0.16 ng	NR	NR	0.8 ng	NR
57	0.032 ng	NR	NR	NR	NR
58	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
60	0.4 ng	0.4 ng	NR	NR	NR
63	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
66	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
67	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
71	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
81	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
86	0.4 ng	NR	NR	10 ng	NR
87	0.4 ng	NR	NR	2.0 ng	NR
阳性对照	<0.032 ng	0.16 ng	0.16 ng	<0.032 ng	NR

[0748] 在第二和第三周期间观察到途径活性,并且到给予抗-MASP-2MoAb后17天时在小鼠中凝集素途径完全恢复。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。

[0749] 所有Fab2均与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端片段。Fab2#60和Fab2#57是两个例外。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,提示它结合CUBII的表位,或者跨越CUBII和EGF样结构域。Fab2#57识别MASP-2A但不识别任何所测试的MASP-2片段,表明该Fab2识别CCP1的表位。Fab2#40和#49仅结合完整的MASP-2A。在图11所示的ELISA结合测定法中,

Fab2#60还结合CUBI-II多肽,虽然只具有略微较低的表现亲和性。

[0750] 这些发现表明对于MASP-2蛋白多个区域的独特阻断性Fab2的鉴定。

[0751] 实施例12

[0752] 本实施例描述在鼠肾缺血/再灌注模型中MASP-2^{-/-}小鼠的分析。

[0753] 背景/原理:体温下在肾中的缺血-再灌注(I/R)损伤具有许多临床病况的相关性,包括低血容量休克、肾动脉阻塞和钳闭过程。

[0754] 肾缺血-再灌注(I/R)是急性肾衰竭的重要原因,与高达50%的死亡率有关(Levy等,JAMA 275:1489-94,1996;Thadhani等,N.Engl.J.Med.334:1448-60,1996)。移植后肾衰竭是在肾移植后常见和危险的并发症(Nicholson等,KidneyInt.58:2585-91,2000)。目前没有肾I/R损伤的有效治疗,和血液透析是唯一的可用治疗。肾I/R损伤的生理病理学是复杂的。最近研究表明,补体活化的凝集素途径可在肾I/R损伤的发病机理中具有重要作用(deVries等,Am.J.Path.165:1677-88,2004)。

[0755] 方法:

[0756] MASP-2^(-/-)小鼠按实施例1中所述产生,和与C57B1/6回交至少10代。将Hypnovel (6.64mg/kg;Roche products Ltd,Welwyn Garden City,UK)经腹膜内注射给予6只雄性MASP-2^(-/-)和6只野生型(+/-)小鼠,体重为22-25g,和随后通过吸入异氟烷(Abbott Laboratories Ltd.,Kent,UK)麻醉。选择异氟烷,因为它是温和的吸入麻醉剂,具有最小的肝毒性;准确产生浓度和动物快速恢复,甚至在延长的麻醉后。给予Hypnovel是因为它在动物中产生安定镇痛的条件和意味着需要给予较少的异氟烷。将加温垫置于动物之下以保持恒定体温。接着,进行腹部中线切开,使用一对牵开器保持体腔打开。在右肾和左肾的肾静脉和动脉之上和之下清除结缔组织,和通过施用小动脉瘤钳,将肾蒂钳住55分钟的时间。该缺血时间最初基于在该实验室进行的之前研究(Zhou等,J.Clin.Invest.105:1363-71 (2000))。另外,在缺血性滴定后选择55分钟的标准缺血时间,发现55分钟产生一致的损伤,其也是可逆的,具有低于5%的低死亡率。在阻塞后,将0.4ml的温热盐水(37℃)置于腹腔中,然后在缺血期间闭合腹部。在除去小动脉瘤钳后,观察肾,直到颜色改变,即指示血液重新流到肾。将另外的0.4ml温热盐水置于腹腔中,和缝合开口,随之将动物放回它们的笼子。在除去钳后24小时收集尾血样品,和在48小时将小鼠处死,和收集另外的血样。

[0757] 评价肾损伤:在再灌注后24和48小时在6只雄性MASP-2^(-/-)和6只WT(+/-)小鼠中评价肾功能。血液肌酐测量通过质谱测定,其提供可再现的肾功能指数(敏感性<1.0μmol/L)。图12图示说明了野生型C57B1/6对照和MASP-2^(-/-)在再灌注后24小时和48小时的血尿素氮清除率。如图12中所示,MASP-2^(-/-)小鼠显示与野生型对照小鼠相比,在24和48小时血液尿素的量显著降低,指示在缺血再灌注损伤模型中免于肾损伤的保护功能作用。

[0758] 总体上,在手术程序和缺血性创伤后24和48小时在WT(+/-)和MASP-2^(-/-)小鼠中均可见血液尿素增加。在非缺血性WT(+/-)手术动物中血液尿素的水平单独测定为5.8mmol/L。除了图12提供的数据之外,一只MASP-2^(-/-)动物显示几乎完全保护免于缺血性损伤,在24和48小时分别具有6.8和9.6mmol/L的值。该动物作为可能的异常值从组分析中排除,其中可能不存在缺血性损伤。因此,图12所示的最终分析包括5只MASP-2^(-/-)小鼠和6只WT(+/-)小鼠,和在24和48小时在MASP-2^(-/-)小鼠中见到血液尿素统计显著降低(Student t-检验p<0.05)。这些发现表明,MASP-2活性的抑制预期对由于缺血性损伤导致

的肾损伤具有保护或治疗作用。

[0759] 实施例13

[0760] 本实施例描述了鼠黄斑变性模型中MASP-2-/-的结果。

[0761] 背景/原理:在工业化国家,年龄相关性黄斑变性(AMD)是55岁之后失明的首要原因。AMD以两种主要形式发生:新生血管(湿性)AMD和萎缩性(干性)AMD。新生血管(湿性)形式占与AMD相关的严重视力丧失的90%,即使仅约20%的AMD个体发展湿形式。AMD的临床特点包括多个玻璃疣、地图样萎缩和脉络膜新生血管形成(CNV)。在2004年12月,FDA批准Macugen药物(哌加他尼(pegaptanib)),一类新的特异性靶向并阻断血管内皮生长因子(VEGF)作用的眼科药物,以治疗湿性(新生血管)形式的AMD(Ng等,Nat Rev.Drug Discov 5:123-32(2006))。虽然Macugen药物对于AMD患者亚群代表了有前景的新的治疗选择,但对于这种复杂疾病仍迫切需要开发其他治疗。多个独立系列的调查暗示了补体活化在AMD发病机制中的中心作用。最严重形式的AMD,脉络膜新生血管形成(CNV)的发病机制可涉及补体途径激活。

[0762] 二十五年来,Ryan描述了CNV的激光诱导损伤的动物模型(Ryan,S.J.,Tr.Am.Opth.Soc.LXXVII:707-745,1979)。最初使用恒河猴开发该模型,然而,同样的技术此后已被用于在各种研究动物包括小鼠中开发CNV的类似模型(Tobe等,Am.J.Pathol.153:1641-46,1998)。在该模型中,激光光凝用来破坏布鲁赫膜,该行为导致形成CNV样膜。激光诱导的模型包括人类病况的许多重要特征(最近的综述,参见Ambati等,Survey Ophthalmology 48:257-293,2003)。激光诱导的小鼠模型现已确立,并且在一个大的且数目不断增加的研究项目中被用作试验基础。普遍认为,激光诱导的模型与人类CNV享有足够的生物相似性,以致使用这种模型进行发病机制和药物抑制的临床前研究与人类CNV相关。

[0763] 方法:

[0764] 如实施例1中所述生成MASP-2-/-小鼠,用C57B1/6回交10代。目前的研究比较了当在激光诱导的CNV过程中评价MASP-2(-/-)和MASP-2(+/-)雄性小鼠时的结果,激光诱导的CNV是新生血管性AMD的加速模型,通过扫描激光共聚焦显微术集中于激光诱导的CNV的体积作为组织损伤的量度,并通过ELISA测定激光损伤后视网膜色素上皮细胞(RPE)/脉络膜中的VEGF水平,VEGF是CNV中涉及的强效血管生成因子,

[0765] 诱导脉络膜新生血管生成(CNV):激光光凝(532nm,200mW,100ms,75 μ m;Oculight GL,Iridex,Mountain View,CA)由对药物组分配掩盖的单个人在第0天对各动物的双眼进行。使用裂隙灯递送系统和盖玻片作为接触透镜,以标准化方式围绕视神经施加激光点。激光损伤的形态学终点是空化气泡的出现,认为该迹象与布鲁赫膜的破坏关联。进行评价的具体方法和终点如下。

[0766] 荧光素血管造影:激光光凝后1周,用相机和成像系统进行荧光素血管造影(TRC 501A camera;ImageNet 2.01system;Topcon,Paramus,NJ)。在腹膜内注射0.1毫升的2.5%荧光素钠后,用与眼底照相机透镜接触的20-D透镜捕获照片。没有参与激光光凝或血管造影的视网膜专家以蒙面方式在单个位置评估了荧光素血管造影。

[0767] 脉络膜新生血管形成(CNV)的体积:激光损伤后一周,摘出眼睛,并在4℃用4%多聚甲醛固定30分钟。通过去除前段获得眼杯,在PBS中洗涤三次,接着通过甲醇系列脱水和再水合。在室温下用缓冲液(含有1%牛血清白蛋白和0.5%的Triton X-100的PBS)封闭两

次达30分钟后,在4℃用含有0.2%BSA和0.1%的Triton X-100的PBS稀释的0.5%的FITC-异凝集素B4(Vector laboratories,Burlingame,CA)孵育眼杯过夜,其结合内皮细胞表面上的末端 β -D-半乳糖残基并选择性标记鼠血管。经过两次用含有0.1%Triton X-100的PBS洗涤后,感觉神经视网膜被轻轻剥离,从视神经切断。产生四个松弛的放射状切口,其余RPE-脉络膜巩膜复合物平展安放在防褪色介质中(Immu-Mount Vectashield Mounting Medium;Vector Laboratories)并用盖玻片盖上。

[0768] 用扫描激光共聚焦显微镜(TCS SP;Leica,Heidelberg,Germany)检查了平展安放(flat-mount)。通过用蓝色氩波长(488纳米)激发并捕捉515和545纳米之间的发射,使血管可视化。40X油浸物镜被用于所有的成像研究。水平光学切片(1 μ m步长)获自RPE脉络膜巩膜复合物的表面。其中可识别连接到病变的周边脉络膜血管网的最深焦平面判定为病变层。在激光靶向区域和该基准面表面的任何血管判断为CNV。各切片的图像进行数字存储。CNV相关荧光面积通过计算机化图像分析与显微镜软件(TCS SP;Leica)进行测量。各水平切片中整个荧光区域的总和被用作CNV体积指数。成像通过对治疗组分配掩盖的操作员执行。

[0769] 因为每个发展CNV的激光病变概率受到其所属的组(小鼠、眼和激光点)影响,利用具有裂区重复测量设计的线性混合模型比较平均病变体积。整个区划因子是该动物所属的遗传组,而裂区因子是眼睛。统计显著性以0.05的水平来确定。用Bonferroni调整构建Post hoc均值比较,以供多重比较。

[0770] VEGF ELISA。在12个激光点损伤后三天,将RPE脉络膜复合物在裂解缓冲液(20mM咪唑HCl、10mM KCl、1mM MgCl₂、10mM EGTA、1%Triton X-100、10mM NaF、1mM钼酸钠和1mM含蛋白酶抑制剂的EDTA)在冰上超声处理15分钟。通过识别所有剪接变体的ELISA试剂盒(Emax;Molecular Devices,Sunnyvale,CA)在450至570纳米(R&D Systems,Minneapolis,MN)测定上清液中的VEGF蛋白水平,并标准化至总蛋白。以蒙面的方式,由不参与光凝、成像或血管造影的操作员执行重复测量。VEGF数字被表示为至少三个独立实验的平均值 $\pm$ SEM并使用Mann Whitney U检验比较。零假设在P<0.05拒绝。

[0771] 结果:

[0772] VEGF水平的评估:

[0773] 图13A图示了在第0天分离自C57B16野生型和MASP-2(-/-)小鼠的RPE脉络膜复合物的VEGF蛋白水平。如图13A所示,VEGF水平的评估表明相对于C57B1野生型对照小鼠,MASP-2(-/-)小鼠中基线水平的VEGF降低。图13B图示了激光诱导损伤后第三天测得的VEGF蛋白水平。如图13B所示,激光诱导损伤后第三天,在野生型(+/+)小鼠中,VEGF水平显著增加,这与已发表的研究一致(Nozaki等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:232833(2006))。然而,在MASP-2(-/-)小鼠中,观察到VEGF的令人惊讶的非常低的水平。

[0774] 脉络膜新生血管形成(CNV)的评估:

[0775] 除了激光诱导性黄斑变性后VEGF水平降低外,在激光损伤前和后测定CNV区域。图14图示了激光诱导损伤后第7天在C57b1野生型小鼠和MASP-2(-/-)小鼠中测得的CNV体积。如图14所示,相比于野生型对照小鼠,在激光诱导损伤后第7天MASP-2(-/-)小鼠的CNV区域显示减少约30%。

[0776] 这些结果表明与野生型(+/+)对照相比MASP(-/-)小鼠所见的VEGF和CNV减少,并且在黄斑变性的治疗中用抑制剂阻断MASP-2具有预防或治疗性效果。

[0777] 实施例14

[0778] 本实施例表明,凝血酶活化可在凝集素途径活化后在下列生理条件下发生,并表明MASP-2参与的程度。在正常大鼠血清中,凝集素途径活化导致与补体活化(评估为C4沉积)并发的凝血酶活化(评估为凝血酶沉积)。如从图15A和15B可看到,本系统中凝血酶活化由MASP-2阻断抗体(Fab2形式)抑制,表现出抑制浓度-反应曲线(图15B),这与对于补体活化的抑制类似(图15A)。这些数据表明,凝集素途径的活化,当它发生在创伤中时,将导致在完全依赖于MASP-2的过程中补体和凝血系统两者活化。由此推断,MASP-2阻断抗体可证明有效减轻过度的全身凝血例如弥散性血管内凝血的情况,弥散性血管内凝血是严重创伤病例中导致死亡的标志之一。

[0779] 实施例15

[0780] 本实施例提供了在MASP-2^{-/-}缺陷和MASP-2^{+/+}充足小鼠中使用评估DIC中凝集素途径作用的弥散性血管内凝血(“DIC”)的局部Schwarzman反应模型产生的结果。

[0781] 背景/原理:

[0782] 如上文所述,阻断MASP-2抑制了凝集素途径激活和减少了过敏毒素C3a和C5a两者的产生。C3a过敏毒素可以显示是体外有效的血小板聚合剂,但它们的体内参与还不太明确,在伤口修复中血小板物质和纤溶酶的释放可能仅次要涉及补体C3。在本实施例中,在MASP-2^(-/-)和WT^(+/+)小鼠中分析凝集素途径的作用以解决以下问题:是否需要C3活化的延长升高而产生弥散性血管内凝血。

[0783] 方法:

[0784] 如实施例1所述产生本研究中使用的MASP-2^(-/-)小鼠,并与C57B1/6回交至少10代。

[0785] 在此实验中采用局部Schwarzman反应模型。局部Schwarzman反应(LSR)是脂多糖(LPS)诱导的反应,其具有来自先天免疫系统的细胞和体液成分的充分表征的作用。LSR对补体的依赖已经充分确立(Polak, L.等, *Nature* 223:738-739(1969); Fong J.S.等, *JExp Med* 134:642-655(1971))。在LSR模型中,提供TNF α 给小鼠4小时(500ng, 阴囊内),然后将小鼠麻醉,并准备用于提睾肌的活体显微术。选定具有良好血流量(1-4mm/s)的毛细血管后静脉(15-60 μ m直径)网络用于观察。动物用荧光抗体处理以选择性标记中性粒细胞或血小板。依次扫描血管网络并数字记录所有血管图像供以后分析。记录微循环的基础状态后,小鼠接受单次静脉内注射LPS(100 μ g),无论是单独还是与以下列出的药剂一起。然后每10分钟扫描同一血管网络达1小时。通过减去背景荧光而确定荧光团的具体累积,并通过使图像阈值化而增强。反应幅度根据记录的图像进行测定。

[0786] Schwarzman反应的主要量度是聚集数据。

[0787] 该研究比较了暴露于已知补体途径耗尽剂、眼镜蛇毒因子(CVF)或终端途径抑制剂(C5aR拮抗剂)的MASP-2^{+/+}充足或野生型小鼠。结果(图16A)表明,CVF以及C5aR拮抗剂均防止聚集体在脉管中出现。另外,MASP-2^{-/-}缺陷小鼠(图16B)还表现出局部Schwarzman反应的完全抑制,支持凝集素途径的参与。这些结果清楚地表明MASP-2在DIC生成的作用,并支持使用MASP-2抑制剂治疗和预防DIC。

[0788] 实施例16

[0789] 本实施例描述在鼠肾移植模型中MASP-2^(-/-)小鼠的分析。

[0790] 背景/原理:

[0791] MASP-2在肾移植的功能结果中的作用使用小鼠模型评价。

[0792] 方法:

[0793] 肾移植的功能结果使用单肾同基因移植至单侧肾切除后的受体小鼠来评价,包括6只WT(+/-) 移植受体(B6)和6只MASP-2(-/-) 移植受体。为了评价移植的肾的功能,剩余的天然肾在移植后5天从受体中除去,之后24小时通过测量血尿素氮(BUN)水平评价肾功能。

[0794] 结果:

[0795] 图17图示说明了在肾移植后6天时在WT(+/-) 受体和MASP-2(-/-) 受体中肾的血尿素氮(BUN)水平。如图17所示,在WT(+/-) (B6) 移植受体中观察到强升高的BUN水平(小鼠中的正常BUN水平为<5mM),表明肾衰竭。相比之下,MASP-2(-/-) 同基因移植受体小鼠显示显著更低的BUN水平,表明肾功能改善。注意,这些结果使用来自WT(+/-) 肾供体的移植物获得,表明在移植受体中仅缺少功能性凝集素途径足以实现治疗益处。

[0796] 总之,这些结果表明,通过MASP-2抑制暂时抑制凝集素途径提供了降低在肾移植中的发病率和延迟移植物功能的方法,该方法可能用于其它移植背景中。

[0797] 实施例17

[0798] 该实施例证实在鼠多微生物脓毒性腹膜炎模型中MASP-2(-/-) 小鼠抵抗感染性休克。

[0799] 背景/原理:

[0800] 为了评价MASP-2(-/-) 在感染中的可能作用,评价了盲肠结扎和穿刺(CLP)模型,一个多微生物脓毒性腹膜炎的模型。该模型被认为最准确地模拟人脓毒性腹膜炎的过程。盲肠结扎和穿刺(CLP)模型是其中盲肠被结扎和被针穿刺的模型,导致细菌持续泄露至腹腔,其通过淋巴引流到达血液,然后分布于所有腹部器官,导致多器官衰竭和感染性休克(Eskandari等,J Immunol 148(9):2724-2730(1992))。CLP模型模拟患者中观察到的脓毒症的过程和诱导早期过多炎症反应,之后是显著的低-炎症阶段。在该阶段,动物对细菌攻击高度敏感(Wichterman等,J.Surg.Res.29(2):189-201(1980))。

[0801] 方法:

[0802] 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)小鼠中测定。简言之,将MASP-2缺陷小鼠和它们的野生型同窝仔麻醉,将盲肠外置和在远端以上30%处结扎。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,和用钳闭合皮肤。经过CLP的小鼠的存活在CLP后14天的时间内监测。CLP后16小时在小鼠中收集腹膜灌洗液以测量细菌载量。在PBS中制备连续稀释的腹膜灌洗液和接种到Mueller Hinton板中,之后在37℃在厌氧条件下孵育24小时,之后测量细菌载量。

[0803] 还在WT(+/-) 和MASP-2(-/-) 小鼠中CLP后16小时在肺和脾中通过定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)监测对细菌感染的TNF- α 细胞因子反应。CLP后16小时在WT(+/-) 和MASP-2(-/-) 小鼠中TNF- α 的血清水平还通过夹心ELISA定量。

[0804] 结果:

[0805] 图18图示说明了CLP处理的动物的百分比存活,其作为CLP程序后天数的函数。如图18中所示,与WT(+/-) 小鼠相比,在使用盲肠结扎和穿刺模型的多微生物感染后在MASP-2(-/-) 小鼠中缺乏凝集素途径不增加小鼠的死亡率。然而,如图19中所示,当与它们的WT(+/-)

+)同窝仔相比,MASP-2(-/-)小鼠显示在CLP后的腹膜灌洗液中显著更高的细菌载量(细菌数大约1000倍增加)。这些结果表明,MASP-2(-/-)缺陷小鼠抵抗感染性休克。在该模型中在MASP-2缺陷小鼠中降低的细菌清除率可能归因于C3b介导的吞噬作用受损,因为已经证实C3沉积是MASP-2依赖性的。

[0806] 已确定与WT(+/+)对照(数据未显示)相比,对细菌感染的TNF- α 细胞因子反应在MASP-2(-/-)小鼠中不升高。还确定,CLP后16小时在WT(+/+)小鼠中存在显著更高血清浓度的TNF- α ,这与MASP-2(-/-)小鼠相反,其中TNF- α 的血清水平保持几乎未改变。这些结果表明,对脓毒性病况的强烈炎性反应在MASP-2(-/-)小鼠中减轻和在存在较高细菌计数的情况下允许这些动物存活。

[0807] 总之,这些结果证实凝集素途径补体活化在败血症的情况下的潜在有害作用和在有严重脓毒症患者中增加的死亡率。这些结果还证实,在脓毒症期间MASP-2缺乏调节炎性免疫反应和降低炎性介质的表达水平。因此,认为通过给予针对MASP-2的抑制性单克隆抗体的MASP-2(-/-)的抑制将有效降低在患有感染性休克的受试者中的炎性反应。

[0808] 实施例18

[0809] 本实施例描述在鼠鼻内感染性模型中MASP-2(-/-)小鼠的分析。

[0810] 背景/原理:

[0811] 铜绿假单胞菌是革兰氏阴性条件性人细菌病原体,其引起广泛的感染,特别是在缺乏免疫力的个体中。它是获得性医院感染的主要来源,特别是医院获得性肺炎。它也是在囊性纤维化(CF)患者中显著的发病率和死亡率的原因。铜绿假单胞菌肺部感染的特征为强中性粒细胞募集和显著的肺炎症,导致广泛的组织损伤(Palanki M.S.等,J.Med.Chem 51: 1546-1559(2008))。

[0812] 在本实施例中,进行研究以确定在MASP-2(-/-)小鼠中除去凝集素途径是否增加小鼠对细菌感染的易感性。

[0813] 方法:

[0814] 22只WT(+/+)小鼠、22只MASP-2(-/-)小鼠和11只C3(-/-)小鼠用鼻内给予铜绿假单胞菌细菌菌株攻击。在感染后6天内监测小鼠和构建Kaplan-Mayer曲线,显示百分比存活率。

[0815] 结果:

[0816] 图20是感染后6天WT(+/+)、MASP-2(-/-)或C3(-/-)小鼠的百分比存活率的Kaplan-Mayer曲线。如图20中所示,在MASP-2(-/-)小鼠对比WT(+/+)小鼠中未观察到差异。然而,在C3(-/-)小鼠中除去经典(C1q)途径导致对细菌感染的严重易感性。这些结果证实,MASP-2抑制不增加对细菌感染的易感性,表明通过抑制MASP-2有可能减少在创伤患者中不需要的炎性并发症,而不损害患者使用经典补体途径对抗感染的能力。

[0817] 实施例19

[0818] 本实施例描述了如实施例10所述而鉴定的代表性的具有高亲和性抗-MASP-2Fab2抗体的药效动力学分析。

[0819] 背景/原理:

[0820] 如实施例10所述,为了鉴定阻断大鼠凝集素途径的高亲和性抗体,大鼠MASP-2蛋白用于淘选噬菌体展示文库。该文库经设计以提供高免疫多样化,并使用完整人免疫球蛋白

白基因序列来构建。如实施例10所述,通过ELISA筛选鉴定了大约250个单个噬菌体克隆,其以高亲和性与大鼠MASP-2蛋白结合。对这些克隆测序,鉴定了50个编码独特MASP-2抗体的噬菌体。从这些克隆中表达Fab2蛋白,纯化并分析MASP-2结合亲和性和凝集素补体途径功能性抑制。

[0821] 如实施例10表6所示,该分析的结果是鉴定了17个具有功能阻断活性的抗-MASP-2Fab2(34%命中率,对于阻断性抗体)。Fab2对凝集素补体途径的功能性抑制在C4沉积水平上是明显的,其是MASP-2对C4裂解的直接度量。重要的是,当评价C3转化酶活性时,抑制同样明显,表明凝集素补体途径的功能性阻断。如实施例10所述鉴定的17个MASP-2封闭性Fab2有效抑制C3转化酶形成,IC₅₀等于或小于10nM。所鉴定的17个Fab2中有8个的IC₅₀值的范围为纳摩尔以下。此外,如图8A-C所示和实施例10表6所概述,所有17个MASP-2阻断性Fab2在凝集素途径C3转化酶测定法中基本上完全抑制C3转化酶形成。此外,表6所示的17个阻断性抗-MASP-2Fab2的每一个有效抑制C3b产生(>95%),因此证明了该测定法对凝集素途径C3转化酶的特异性。

[0822] 大鼠IgG2c和小鼠IgG2a全长抗体同种型变体衍生自Fab2

[0823] #11。本实施例描述了在体内对这些同种型的药效动力学参数的表征。

[0824] 方法:

[0825] 如实施例10所述,大鼠MASP-2蛋白用于淘选Fab噬菌体展示文库,从中鉴定出Fab2#11。大鼠IgG2c和小鼠IgG2a全长抗体同种型变体衍生自Fab2#11。如下在体内表征了大鼠IgG2c和小鼠IgG2a两者全长抗体同种型的药效动力学参数。

[0826] 在小鼠中的体内研究:

[0827] 在小鼠中进行药效动力学研究,以研究抗-MASP-2抗体剂量在体内对血浆凝集素途径活性的作用。在本研究中,在凝集素途径测定法中,在经皮下(sc)和腹膜内(ip)给予0.3mg/kg或1.0mg/kg小鼠抗-MASP-2MoAb(衍生自Fab2#11的小鼠IgG2a全长抗体同种型)之后的不同时间点,离体测定C4沉积。

[0828] 图21图示了在经皮下给予0.3mg/kg或1.0mg/kg小鼠抗-MASP-2MoAb后的不同时间点,采自小鼠(n=3小鼠/组)的未稀释的血清样品中离体测定的凝集素途径特异性C4b沉积。在给予抗体前采自小鼠的血清样品作为阴性对照(100%活性),在体外补充100nM所述阻断性抗-MASP-2抗体的血清用作阳性对照(0%活性)。

[0829] 图21所示的结果表明在经皮下给予1.0mg/kg剂量的小鼠抗-MASP-2MoAb后对C4b沉积的快速和完全的抑制。在经皮下给予0.3mg/kg剂量的小鼠抗-MASP-2MoAb后,见到对C4b沉积的部分抑制。

[0830] 在小鼠中,在单次ip给予0.6mg/kg小鼠抗-MASP-2MoAb后,追踪检查了3周内的凝集素途径恢复的时间进程。如图22所示,在给予抗体后,发生凝集素途径活性的急剧下降,接着是在i.p.给予后持续大约7天的完全的凝集素途径抑制。缓慢凝集素恢复。

[0831] 这些结果证明当系统性递送时,衍生自Fab2#11的小鼠抗-MASP-2Moab以剂量-反应方式抑制小鼠的凝集素途径。

[0832] 实施例20

[0833] 本实施例描述了在年龄相关性黄斑变性的小鼠模型中,分析源自Fab2#11的小鼠抗-MASP-2Moab的功效。

[0834] 背景/原理:

[0835] 如在实施例10中所述,大鼠MASP-2蛋白用于淘选Fab噬菌体展示文库,从中鉴定出Fab2#11为功能活性抗体。从Fab2#11产生大鼠IgG2c和小鼠IgG2a同种型的全长抗体。表征了小鼠IgG2a同种型的全长抗-MASP-2抗体的药效动力学参数(如实施例19所述)。在该实施例中,在年龄相关性黄斑变性(AMD)的小鼠模型中,分析源自Fab2#11的小鼠抗-MASP-2全长抗体,如Bora P.S.等,JImmunol 174:491-497(2005)所述。

[0836] 方法:

[0837] 在如实施例13所述的年龄相关性黄斑变性(AMD)的小鼠模型中,测试如实施例19所述源自Fab2#11的小鼠IgG2a全长抗-MASP-2抗体同种型,其中改动如下。

[0838] 小鼠抗-MASP-2MoAb的给药

[0839] CNV诱导前16小时,将两个不同剂量(0.3mg/kg和1.0mg/kg)的小鼠抗-MASP-2MoAb以及同种型对照MoAb处理ip注射入WT(+/+)小鼠(每组N=8只小鼠)。

[0840] 诱导脉络膜新生血管形成(CNV)

[0841] 如实施例13中所述,使用激光光凝进行脉络膜新生血管形成(CNV)的诱导和CNV体积的测量。

[0842] 结果:

[0843] 图23图示了在用同种型对照MoAb或小鼠抗-MASP-2MoAb(0.3mg/kg和1.0mg/kg)处理的小鼠中,在激光损伤后7天测量CNV面积。如图23所示,在预先用1.0mg/kg抗-MASP-2MoAb处理的小鼠中,在激光处理后7天观察到CNV约50%的统计学显著(P

[0844] <0.01)减少。如在图23中进一步示出,观察到0.3mg/kg剂量的抗-MASP-2MoAb不能有效减少CNV。应该注意的是,0.3mg/kg剂量的抗-MASP-2MoAb显示出部分和瞬时抑制皮下给药后的C4b沉积,如实施例19中描述并在图21示出的。

[0845] 本实施例中所述的结果证明用抑制剂例如抗-MASP-2MoAb阻断MASP-2,在黄斑变性的治疗中具有预防和/或治疗性效果。应该注意的是,这些结果与实施例13中描述的在MASP-2(-/-)小鼠中进行的研究所观察到的结果一致,在实施例13中,相比于野生型对照小鼠,在激光处理后7天观察到MASP-2(-/-)小鼠的CNV减少30%。此外,本实施例结果进一步证明,全身性递送抗-MASP-2抗体提供眼睛的局部治疗益处,从而突出表明全身性给药途径治疗AMD患者的潜力。总之,这些结果提供了证据,支持在AMD的治疗中采用MASP-2MoAb。

[0846] 实施例21

[0847] 本实施例证实,在用脑膜炎奈瑟菌感染后,MASP-2缺陷小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟菌诱导的死亡率,和与野生型对照小鼠相比具有提高的菌血症清除率。

[0848] 原理:脑膜炎奈瑟菌是一种异养的革兰氏阴性双球菌,已知其在脑膜炎和其它形式的脑膜炎球菌疾病例如脑膜炎球菌血症中的作用。脑膜炎奈瑟菌是在儿童期间发病率和死亡率的主要原因。严重的并发症包括败血症、Waterhouse-Friderichsen综合征、肾上腺功能不全和弥散性血管内凝血(DIC)。参见例如,Rintala E等,Critical Care Medicine28(7):2373-2378(2000)。在本实施例中,在MASP-2(-/-)和WT(+/+)小鼠中分析凝集素途径的作用,以解决MASP-2缺陷小鼠是否对脑膜炎奈瑟菌诱导的死亡率敏感。

[0849] 方法:

[0850] MASP-2敲除小鼠如实施例1所述产生,并与C57B1/6回交至少10代。10周龄的MASP-

2K0小鼠 (n=10) 和野生型C57/B6小鼠 (n=10) 通过静脉内注射接种在400mg/kg铁葡聚糖中的 5×10^8 cfu/100 μ l、 2×10^8 cfu/100 μ l或 3×10^7 cfu/100 μ l的剂量的脑膜炎奈瑟菌血清型A Z2491。在72小时时间段内监测感染后小鼠的存活。感染后以每小时的间隔自小鼠获取血液样品,分析以确定脑膜炎奈瑟菌的血清水平(log cfu/ml),以证实感染和确定细菌自血清的清除率。

[0851] 结果:

[0852] 图24A图示说明了给予感染剂量的 5×10^8 /100 μ l cfu脑膜炎奈瑟菌后MASP-2K0和WT小鼠的百分比存活率。如图24A中所示,在用最高剂量的 5×10^8 /100 μ l cfu脑膜炎奈瑟菌感染后,100%的MASP-2K0小鼠在感染后的整个72小时期间存活。相比之下,仅20%的WT小鼠在感染后24小时仍存活。这些结果证实,MASP-2缺陷小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟菌诱导的死亡率。

[0853] 图24B图示说明了在不同的时间点在取自用 5×10^8 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟菌感染的MASP-2K0和WT小鼠的血液样品中回收的脑膜炎奈瑟菌的log cfu/ml。如图24B中所示,在WT小鼠中在感染后24小时在血液中脑膜炎奈瑟菌的水平达到约6.5log cfu/ml的峰值,和到感染后48小时下降到零。相比之下,在MASP-2K0小鼠中,在感染后6小时脑膜炎奈瑟菌的水平达到约3.5log cfu/ml的峰值和到感染后36小时下降到零。

[0854] 图25A图示说明了在用 2×10^8 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟菌感染后MASP-2K0和WT小鼠的百分比存活率。如图25A中所示,在用 2×10^8 cfu/100 μ l剂量的脑膜炎奈瑟菌感染后,在感染后整个72小时期间100%的MASP-2K0小鼠存活。相比之下,仅80%的WT小鼠在感染后24小时仍存活。与图24A所示的结果一致,这些结果还证实MASP-2缺陷小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟菌诱导的死亡率。

[0855] 图25B图示说明了在不同的时间点在取自用 2×10^8 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟菌感染的WT小鼠的血液样品中回收的脑膜炎奈瑟菌的log cfu/ml。如图25B中所示,在用 2×10^8 cfu感染的WT小鼠的血液中脑膜炎奈瑟菌的水平在感染后12小时达到约4log cfu/ml的峰值和到感染后24小时下降到零。图25C图示说明了在不同的时间点在取自用 2×10^8 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟菌感染的MASP-2K0小鼠的血液样品中回收的脑膜炎奈瑟菌的log cfu/ml。如图25C中所示,在用 2×10^8 cfu感染的MASP-2K0小鼠的血液中脑膜炎奈瑟菌的水平在感染后2小时达到约3.5log cfu/ml的峰值和在感染后3小时下降到零。与图24B中显示的结果一致,这些结果证实尽管MASP-2K0小鼠用与WT小鼠相同剂量的脑膜炎奈瑟菌感染,但MASP-2K0小鼠具有与WT相比提高的菌血症清除率。

[0856] 用最低剂量的 3×10^7 cfu/100 μ l脑膜炎奈瑟菌感染后在72小时的时间内MASP-2K0和WT小鼠的百分比存活率为100% (数据未显示)。

[0857] 讨论

[0858] 这些结果表明,MASP-2缺陷小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟菌诱导的死亡率和与WT小鼠相比具有提高的菌血症清除率。因此,鉴于这些结果,预期MASP-2抑制剂(例如MASP-2MoAb)的治疗应用,将预期有效治疗、预防或减轻被脑膜炎奈瑟菌细菌感染(即,脓毒症和DIC)的影响。此外,这些结果显示MASP-2抑制剂例如MASP-2MoAb的治疗应用不会使受试者遭受脑膜炎奈瑟菌感染的风险增加。

[0859] 实施例22

[0860] 该实施例描述了新的凝集素途径介导的和MASP-2依赖性的补体C3的C4-旁路激活的发现。

[0861] 原理:

[0862] 二十年前,利用补体活化的抑制剂,以限制心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)的主要治疗益处令人信服地在心肌梗死的实验性大鼠模型中证实:静脉内给予重组sCR1,一种细胞表面补体受体1型的可溶性截短衍生物(CR1),并在MIRI的大鼠体内模型中评估其效果。用sCR1治疗减少梗死体积超过40%(Weisman,H.F.等,Science249:146-151(1990))。该重组抑制剂的治疗潜力随后在临床试验中证实,显示给予MI患者sCR1在缺血后心脏中防止了收缩失败(Shandelya,S.等,Circulation 87:536-546(1993))。但是还没有最终确定导致补体在缺血组织中激活的主要机制,主要是由于缺乏合适的实验模型,对导致氧气剥夺细胞中补体活化的分子过程了解有限,并且不同补体活化途径之间的交叉对话和协同作用。

[0863] 作为免疫应答的基本组分,补体系统通过抗体依赖性和非依赖性机制两者提供保护,防止入侵微生物。它主导免疫应答中的许多细胞和体液相互作用,包括趋化、吞噬作用、细胞粘附和B细胞分化。三种不同的途径引发补体级联:经典途径、替代途径和凝集素途径。经典途径识别亚组分C1q结合到各种靶标-最显著的是免疫复合物-以启动相关丝氨酸蛋白酶C1r和C1s的逐步激活,为被适应性免疫系统衔接后的病原体和免疫复合物清除提供了主要机制。C1q结合免疫复合物使C1r酶原二聚体转化成其活性形式以裂解并从而激活C1s。C1s将C1q结合以两个裂解步骤转化成补体活化:它首先将C4转化成C4a和C4b,然后裂解C4b结合的C2,以形成C3转化酶C4b2a。这种复合物将丰富的血浆组分C3转化成C3a和C3b。与C4b2a复合物紧邻的C3b积累将对C3的底物特异性转移至C5,以形成C5转化酶C4b2a(C3b)_n。通过经典途径激活产生的C3和C5转化酶复合物与通过凝集素途径激活路线生成的那些是相同的。在替代途径中,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,引发对外源细胞的补体活化,而宿主组织中的细胞相关调节蛋白避免激活,从而防止自破坏。如同替代途径,凝集素途径可能在缺乏免疫复合物时激活。活化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)结合而启动,PAMP主要是细菌、真菌或病毒性病原体上存在的碳水化合物结构或细胞凋亡、坏死、恶性或氧气剥夺细胞中的异常糖基化模式(Collard,C.D.等,Am.J.Pathol.156:1549-1556(2000);Walport,M.J.,N.Engl.J.Med.344:1058-1066(2001);Schwaebler,W.等,Immunobiology 205:455-466(2002);和Fujita,T.,Nat.Rev.Immunol.2:346-353(2002))。

[0864] 甘露聚糖结合凝集素(MBL)是显示出与一组新的丝氨酸蛋白酶形成复合物的第一碳水化合物识别亚组分,所述丝氨酸蛋白酶称为MBL相关丝氨酸蛋白酶(MASP)并根据其发现的顺序编号(即,MASP-1、MASP-2和MASP-3)。在人中,凝集素途径激活复合物可与具有不同碳水化合物结合特异性的四个替代碳水化合物识别亚组分形成,即,MBL2和三种不同的纤维胶凝蛋白家族成员,即L-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白和M-纤维胶凝蛋白与MASP。在小鼠和大鼠血浆中,两种形式的MBL,MBL A和MBL C以及纤维胶凝蛋白-A与MASP形成凝集素激活途径复合物。我们先前克隆和表征了MASP-2和19kDa的额外的截短MASP-2基因产物,在人类、小鼠和大鼠中称为MAp19或sMAP(Thiel,S.等,Nature 386:506-510(1997);Stover,C.M.等,J.Immunol.162:3481-3490(1999);Takahashi,M.等,Int.Immunol.11:859-863(1999);和Stover,C.M.等,J.Immunol.163:6848-6859(1999))。MAp19/sMAP缺乏蛋白酶活

性,但可通过竞争MASP与碳水化合物识别复合物的结合而调节凝集素途径激活(Iwaki,D.等,J.Immunol.177:8626-8632(2006))。

[0865] 有证据表明,在三种MASP中,仅需要MASP-2将凝集素途径识别复合物的结合转化为补体活化(Thiel,S.等(1997);Vorup-Jensen,T.等,J.Immunol.165:2093-2100(2000);Thiel,S.等,J.Immunol.165:878-887(2000);Rossi,V.等,J.Biol.Chem.276:40880-40887(2001))。最近描述的MASP-1和MASP-3缺陷的小鼠品系的表型突出表明了这个结论。除了在体外凝集素途径介导的补体活化的启动延迟外,MASP-1/3缺陷的小鼠保留凝集素途径的功能活性。用重组MASP-1重构MASP-1和MASP-3缺陷型血清克服了凝集素途径激活的这种延迟,暗示MASP-1可促进MASP-2活化(Takahashi,M.等,J.Immunol.180:6132-6138(2008))。最近的一项研究表明,需要MASP-1(以及可能还有MASP-3)将替代途径激活酶因子D自其酶原形式转化成其酶促活性形式(Takahashi,M.等,J.Exp.Med.207:29-37(2010))。在MASP-1/3缺陷小鼠的血浆中缺乏替代途径的功能活性突出表明了这一过程的生理重要性。

[0866] 最近产生的小鼠品系与凝集素途径碳水化合物识别亚组分MBL A和MBL C的组合靶向缺陷仍然可以经由剩余的鼠凝集素途径识别亚组分纤维胶凝蛋白A而启动凝集素途径激活(Takahashi,K.等,Microbes Infect.4:773-784(2002))。在MASP-2缺陷型小鼠中没有任何残余凝集素途径的功能活性,这提供了一个明确的模型以研究先天体液免疫的该效应器分支在健康和疾病中的作用。

[0867] C4-和MASP-2缺陷型小鼠品系的可用性允许我们定义新的凝集素途径特异性的、但MASP-2依赖性的补体C3的C4-旁路激活途径。MIRI中MASP-2缺乏的显著保护性表型突出表明了该新的凝集素途径介导的C4旁路激活途径对缺血后组织损失的重要贡献,而在同一个模型中测试的C4缺陷型小鼠没有显示保护作用。

[0868] 在本实施例中,我们描述了新的凝集素途径介导的和MASP-2依赖性的补体C3的C4-旁路活化。在心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)实验模型中,这个新的激活途径的生理相关性是由MASP-2缺乏的保护性表型建立的,在该模型中C4缺陷型动物未受到保护。

[0869] 方法:

[0870] MASP-2缺陷型小鼠没有表现出肉眼可见的异常。如实施例1所述生成MASP-2缺陷型小鼠。杂合^(+/-)和纯合^(-/-)MASP-2缺陷型小鼠两者是健康和可育的,没有表现出肉眼可见的异常。其平均寿命类似于其WT同窝小鼠(>18个月)。在实验性疾病模型中研究这些小鼠的表型前,我们的MASP-2^{-/-}系经回交11代为C57BL/6背景。完全没有MASP-2mRNA通过聚A+选择的肝RNA制备物的RNA印迹证实,而编码MAp19或sMAP的1.2kb mRNA(MASP-2基因的截短可变剪接产物)大量表达。

[0871] 使用特异于MASP-2的丝氨酸蛋白酶结构域的编码序列(B链)或A链的其余编码序列的引物对进行qRT-PCR分析,表明在MASP-2^{-/-}小鼠中没有可检测的B链编码RNA,而扰乱的A链mRNA转录物的丰度显著增加。同样地,MASP-2^{+/-}和MASP-2^{-/-}小鼠中MAp19/sMAP编码mRNA的丰度增加。通过ELISA对每种基因型的五只动物测定的血浆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),而在MASP-2^{-/-}小鼠中不可检测。使用qRT-PCR,建立mRNA表达谱,表明MASP-2^{-/-}小鼠表达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,其丰度类似于其MASP-2足够的同窝小鼠(数据未示出)。

[0872] MASP-2^{-/-} (n=8) 和MASP-2^{+/+} (n=7) 同窝小鼠的血浆C3水平使用市售小鼠C3 ELISA试剂盒 (Kamiya, Biomedical, Seattle, WA) 测定。MASP-2缺陷型小鼠的C3水平 (平均0.84mg/ml, +/-0.34) 类似于WT对照的水平 (平均0.92, +/-0.37)。

[0873] 结果:

[0874] MASP-2对于凝集素途径的功能活性必不可少。

[0875] 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出在活化性甘露聚糖和酵母聚糖包被的表面上完全不存在凝集素途径的功能活性用于激活C4。同样, 在包被有N-乙酰葡萄糖胺的表面上MASP-2^{-/-}血浆中, 凝集素途径依赖性的C4和C3裂解两者都不可检测, N-乙酰葡萄糖胺结合并经由MBL A、MBL C和纤维胶凝蛋白A而触发激活 (数据未示出)。

[0876] MASP-2^{-/-}小鼠的血浆和血清分析清楚地表明, 基本上需要MASP-2以通过凝集素途径来激活补体。然而, 凝集素途径功能活性的总缺乏使得其它补体活化途径完整: MASP-2^{-/-}血浆仍可通过经典 (图26A) 和替代途径 (图26B) 而激活补体。在图26A和26B中, 符号“*”表示来自WT (MASP-2^{+/+}) 的血清; 符号“●”表示WT的血清 (C1q耗尽); 符号“□”表示MASP-2^{-/-}的血清; 和符号“Δ”表示MASP-2^{-/-}的血清 (C1q耗尽)。

[0877] 图26A图示了MASP-2^{-/-}小鼠保留功能性经典途径: C3b沉积在包被有免疫复合物的微量滴定板 (通过用BSA包被然后加入山羊抗-BSA IgG而原位产生) 上测定。图26B图示了MASP-2缺陷型小鼠保留功能性替代途径: 在仅允许替代途径激活 (含有Mg²⁺和EGTA的缓冲液) 的条件下在酵母聚糖包被的微量滴定板上测定C3b沉积。图26A和图26B示出的结果是重复的均值, 并且代表三个独立实验。从始至终使用相同的符号表示血浆来源。这些结果表明, 功能性替代途径存在于MASP-2缺陷型小鼠, 如在设计成直接触发替代途径的实验条件下如图26B所示结果证明的, 而使经典途径和凝集素途径均失活。

[0878] 补体活化的凝集素途径关键性地促成心肌缺血/再灌注损伤 (MIRI) 中的炎症组织损失。

[0879] 为了研究凝集素途径功能活性对MIRI的作用, 我们在MIRI模型中, 在冠状动脉左前降支 (LAD) 瞬时结扎和再灌注后, 比较了MASP-2^{-/-}小鼠和WT同窝对照。补体C4的存在或不存在对MIRI的缺血组织损失程度没有影响。我们评估了在实验性MIRI后C4缺乏对梗塞面积的影响。如图27A和图27B所示, 在C4缺陷型小鼠及其WT同窝小鼠两者中观察到几乎相同的梗塞面积。图27A图示了在C4^{-/-}小鼠 (n=6) 和匹配的WT同窝对照 (n=7) 中, 在LAD结扎和再灌注后MIRI诱导的组织损失。图27B图示了INF作为AAR的函数, 清楚地表明C4^{-/-}小鼠与其WT对照 (虚线) 同样易受MIRI。

[0880] 这些结果表明, C4缺陷型小鼠未受保护而免于MIRI。该结果是出乎意料的, 因为它与广泛接受的观点冲突, 广泛接受的观点即主要C4激活片段C4b是经典和凝集素途径C3转化酶C4b2a的基本组分。因此, 我们评估了在C4-缺陷型小鼠和人血浆中是否可检测到补体C3的残留凝集素途径的特异性激活。

[0881] 凝集素途径可通过新的MASP-2依赖性C4-旁路激活途径在不存在C4时激活补体C3。

[0882] 历史报告表明在C4缺陷型豚鼠血清中C4旁路激活途径的存在 (May, J. E. 和 M. Frank, J. Immunol. 111:1671-1677 (1973)), 受此激励, 我们分析了C4缺陷型小鼠是否具有残余经典或凝集素途径的功能活性, 并且在排除替代途径作用的途径特异性测定条件

下监测C3活化。

[0883] 以抑制替代途径激活的血浆浓度(1.25%和以下)使用再钙化的血浆,在甘露聚糖包被的微量滴定板上测定C3b沉积。尽管在测试经典途径激活的C4缺陷的血浆中没有检测到C3裂解(数据未示出),但当通过凝集素途径引发补体活化时,在C4缺陷的小鼠血浆中观察到强烈的残留C3裂解活性。凝集素途径依赖性通过将C4缺陷的血浆稀释液与可溶性甘露聚糖预孵育后C3裂解的竞争性抑制而证明(参见图28A)。如图28A-D所示,在不存在C4时观察到C3的MASP-2依赖性激活。图28A图示了通过C4+/+(十字)和C4-/- (空心圆)小鼠血浆的C3b沉积。在测定前将C4-/-血浆与过量的(1 μ g/ml)流体相甘露聚糖预孵育,完全抑制了C3沉积(实心圆)。结果代表3个独立实验。图28B图解说明了实验结果,其中野生型、MASP-2缺陷型(空心方块)和C4-/-小鼠血浆(1%)与不同浓度的抗-大鼠MASP-2mAbM11(横坐标)混合,并在甘露聚糖包被的平板上测定C3b沉积。结果是4个测定(每种类型血浆中的2个的重复)的均值($\pm$ SD)。图28C图示了实验结果,其中人血浆:合并的NHS(十字)、C4-/-血浆(空心圆)和与1 μ g/ml甘露聚糖预孵育的C4-/-血浆(实心圆)。结果代表三个独立实验。图28D图示了在C4-足够和C4缺陷的人血浆(1%)中通过抗-人MASP-2mAbH3(均值 $\pm$ 一式三份的SD)抑制C3b沉积。如图28B所示,在平行测定的MASP-2-/-血浆中没有检测到凝集素途径依赖性C3激活,暗示C3的该C4-旁路活化途径是MASP-2依赖性的。

[0884] 为了进一步证实这些发现,我们建立了一系列重组抑制性mAb,所述mAb通过针对重组人和大鼠MASP-2A(其中活性蛋白酶结构域的丝氨酸残基通过定点诱变被替换为丙氨酸残基,以防止抗原的自溶降解)的亲和力筛选,分离自噬菌体展示抗体文库。利用重组人和大鼠MASP-2A作为抗原(Chen,C.B.和Wallis,J.Biol.Chem.276:25894-25902(2001)),针对MASP-2的重组抗体(AbH3和AbM11)从组合抗体文库(Knappik,A.等,J.Mol.Biol.296:57-86(2000))中分离。在小鼠血浆中有效抑制凝集素途径介导的C4和C3激活的抗大鼠Fab2片段(IC₅₀~1nM)被转化为全长IgG2a抗体。多克隆抗鼠MASP-2A抗血清在大鼠中产生。这些工具使我们证实C3的这种新的凝集素途径特异性C4-旁路活化途径的MASP-2依赖性,如下面进一步描述。

[0885] 如图28B所示,选择性结合小鼠和大鼠MASP-2的抑制性单克隆抗体M211通过凝集素途径以浓度依赖性的方式以相似的IC₅₀值抑制C4缺陷型小鼠的C3的C4-旁路活化以及WT小鼠血浆的C3活化。所有测定均在高血浆稀释度下进行,使得替代途径激活路线功能障碍(最高血浆浓度为1.25%)。

[0886] 为了研究人类中C3的类似凝集素途径特异性C4-旁路激活的存在,我们分析了两个人类C4基因(即,C4A和C4B)遗传缺陷(导致C4完全缺失)的供体血浆(Yang,Y.等,J.Immunol.173:2803-2814(2004))。图28C显示,该患者的血浆在高血浆稀释度下有效激活C3(使得替代激活途径功能障碍)。在甘露聚糖包被的平板中C3激活的凝集素途径特定模式在鼠C4缺陷血浆(图28A)和人C4缺陷血浆(图28C)中通过加入过量浓度的流体相甘露聚糖而证明。使用特异性结合人MASP-2和除去MASP-2功能活性的单克隆抗体AbH3,在人C4缺陷血浆中评估了这种C3激活机制对MASP-2的依赖。如图28D所示,在C4-足够和C4-缺乏的人血浆两者中AbH3以相当效力抑制C3b(和C3dg)沉积。

[0887] 为了评估其它补体成分在C3的C4-旁路活化中可能发挥的作用,我们在凝集素途径特异性和经典途径特异性的测定条件下测试了MASP-1/3-/-和Bf/C2-/-小鼠血浆以及

MASP-2^{-/-}、C4^{-/-}和C1q^{-/-}血浆(作为对照)。C3裂解的相对量针对使用WT血浆时沉积的C3量作图。

[0888] 图29A图示了在凝集素激活途径或经典激活途径特异性测定条件下测试的各种补体缺陷小鼠品系中血浆的C3转化酶活性的比较分析。平行测试了WT小鼠(1%)(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。用2.5μg/ml重组大鼠C2(Bf/C2^{-/-}+C2)重构Bf/C2^{-/-}血浆恢复了C3b沉积。结果是均值(±SD)。**P<0.01(与WT血浆相比)。如图29A所示,在凝集素途径特异性测定条件下而不是在经典途径特异性条件下测试的C4^{-/-}血浆中观察到显著C3沉积。再次,在MASP-2缺陷的血浆中没有观察到通过凝集素途径激活路线的C3沉积,而同样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下均发生。无论是使用凝集素途径还是经典途径特异性条件,在C4和MASP-1/3组合缺乏时没有观察到血浆中C3沉积。在C2/Bf^{-/-}血浆中没有可检测的C3沉积,无论是通过凝集素途径还是通过经典途径。但是,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介导的C3裂解。使用C1q^{-/-}血浆验证了测定条件。

[0889] 图29B图示了在凝集素激活途径特异性测定条件下测试的各种补体缺陷的小鼠品系WT、fB^{-/-}、C4^{-/-}、MASP-1/3^{-/-}和MASP-2^{-/-}血浆(1%血浆,结果代表三个独立的实验)中血浆的C3转化酶活性的时间分辨动力学。如图29B所示,虽然在MASP-2^{-/-}血浆中没有观察到C3裂解,但fB^{-/-}血浆以与WT血浆相似的动力学裂解C3。在C4^{-/-}以及在MASP-1/3缺乏的血浆中,观察到C3经凝集素途径依赖性转化为C3b(和C3dg)的显著延迟。C3活化在MASP-1/3^{-/-}血浆中的这种延迟最近证明是MASP-1依赖性的,而不是MASP-3依赖性的(Takahashi, M.等, J. Immunol. 180:6132-6138(2008))。

[0890] 讨论:

[0891] 在本实施例中描述的结果有力地表明,MASP-2的功能活性是C4存在和不存时C3通过凝集素途径活化所必需的。此外,C3的该新的凝集素途径特异性C4-旁路激活途径需要C2和MASP-1起作用。MASP-2^{-/-}以及C4^{-/-}血浆中凝集素途径功能活性的比较分析显示存在补体C3的先前未认识的C4-非依赖性的、但MASP-2依赖性的活化途径,并且表明C3可以在完全不存在C4时以凝集素途径依赖性模式被激活。尽管这种新的MASP-2依赖性C3转化酶的详细分子组成和激活事件的顺序尚待阐明,但我们的结果暗示该C4-旁路激活途径还需要补体C2以及MASP-1的存在。C4和MASP-1/3合并缺乏的小鼠血浆中凝集素途径介导的C3裂解活性的损失可通过最近描述的MASP-1作用进行说明,该作用即通过直接裂解和活化MASP-2而提高MASP-2依赖性补体活化(Takahashi, M.等, J. Immunol.

[0892] 180:6132-6138(2008))。同样地,MASP-1可以通过其裂解C2的能力而有助于MASP-2功能活性(Moller-Kristensen等, Int. Immunol.

[0893] 19:141-149(2007))。两种活性可以解释降低的速率,由此MASP-1/3缺陷的血浆经由凝集素激活途径裂解C3,并解释可能需要MASP-1经由C4-旁路激活途径来维持C3转化的原因。

[0894] C2/fB^{-/-}血浆不能通过凝集素途径激活C3被证明是C2依赖性的,由于在甘露聚糖包被的平板上将重组大鼠C2加入C2/fB^{-/-}血浆恢复了重构血浆激活C3的能力。

[0895] 以下发现需要对各种疾病模型(包括实验性肺炎链球菌感染(Brown, J. S. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:16969-16974 (2002)); 实验性变应性脑脊髓炎(Boos, L. A. 等, *Glia* 49:158-160 (2005)) 和C3依赖性鼠肝再生模型(Clark, A. 等, *Mol. Immunol.* 45:3125-3132 (2008))) 中凝集素途径的作用进行重新评估:C4缺乏特异性破坏经典补体活化途径而凝集素途径通过MASP-2依赖性C4-旁路激活途径保留生理学临界水平的C3转化酶活性。后一组证明,C4缺陷小鼠可以替代途径非依赖性的方式激活C3, 由于在C4^{-/-}小鼠中通过抗体介导的因子B功能活性耗尽而体内抑制替代途径并没有影响C3裂解依赖性肝再生(Clark, A. 等 (2008))。在我们的MIRI模型以及在先前描述的肾同种异体移植排斥模型中(Lin, T. 等, *Am. J. Pathol.* 168:1241-1248 (2006)), C3的这种凝集素途径介导的C4-旁路激活途径还可以解释C4缺乏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明在肾移植模型中MASP-2^{-/-}小鼠的显著保护性表型(Farrar, C. A. 等, *Mol. Immunol.* 46:2832 (2009))。

[0896] 总之, 本实施例的结果支持这样的观点:C3的MASP-2依赖性C4-旁路激活是生理学相关机制, 该机制在C4可用性限制C3激活的条件下可能是重要的。

[0897] 实施例23

[0898] 本实施例描述了在WT (+/+), MASP-2 (-/-), F11 (-/-), F11/C4 (-/-) 和C4 (-/-) 小鼠中通过凝血酶底物活化C3和在甘露聚糖上的C3沉积。

[0899] 原理:

[0900] 如实施例14中描述的, 确定凝血酶活化可在生理条件下在凝集素途径活化后发生, 并表明了MASP-2参与的程度。C3在补体系统的活化中起中心作用。经典和替代补体活化途径均需要C3活化。进行实验, 以确定C3是否由凝血酶底物活化。

[0901] 方法:

[0902] 通过凝血酶底物活化C3

[0903] 在下列活化形式的凝血酶底物存在的情况下测定C3活化: 人FCXIIa, 人FVIIa, 牛FXa, 人FXa, 人活化蛋白C和人凝血酶。将C3与各种凝血酶底物孵育, 然后在10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上在还原条件下分离。使用纤维素膜的电泳转移后, 将膜与单克隆生物素-偶联的大鼠抗小鼠C3孵育, 用链霉抗生物素-HRP试剂盒检测和使用ECL试剂显影。

[0904] 结果:

[0905] C3的活化涉及完整 α -链裂解成截短 α' 链和可溶的C3a (未显示在图30中)。图30示出了对凝血酶底物活化人C3的蛋白质印迹分析的结果, 其中未裂解的C3 α 链和活化产物 α' 链用箭头示出。如图30所示, 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孵育, 可以在没有任何补体蛋白酶的情况下在体外裂解C3。

[0906] 在甘露聚糖上的C3沉积

[0907] 对获自WT、MASP-2 (-/-)、F11 (-/-)、F11 (-/-)/C4 (-/-) 和C4 (-/-) 的血清样品进行了C3沉积测定。F11是编码凝血因子XI的基因。为了测量C3活化, 微量滴定板用甘露聚糖 (1 μ g/孔) 包被, 然后加入在TBS/Tween/Ca²⁺中的山羊抗HSA血清 (2 μ g/ml)。板用0.1% HSA/TBS封闭并如上所述洗涤。将血浆样品在4mM 巴比妥, 145mM NaCl, 2mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, pH 7.4中稀释, 加入板中, 并在37°C孵育1.5小时。洗涤后, 使用兔抗人C3c (Dako), 然后用碱性磷酸酶缀合的山羊抗兔IgG和pNPP检测结合的C3b。

[0908] 结果:

[0909] 图31示出了对获自WT、MASP-2(-/-)、F11(-/-)、F11(-/-)/C4(-/-)和C4(-/-)的血清样品的C3沉积测定结果。如图31所示,即使在完全不存在C4时,也存在功能性凝集素途径。如在图31中进一步示出的,这种新的凝集素途径依赖性补体活化需要凝血因子XI。

[0910] 讨论:

[0911] 在这个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的活性需要C4。因此,C4敲除小鼠(和C4缺陷型人)的数据用这样的假设来解释:这样的生物是凝集素途径缺陷的(除了经典途径缺陷外)。目前的结果表明,这种观点是错误的。因此,基于C4-缺陷动物的表型表明凝集素途径在某些疾病情况下不重要的过去研究结论可能是错误的。在本实施例中描述的数据还表明,在全血清的生理情况下,凝集素途径可以激活凝血级联的组分。因此证明存在涉及MASP-2的补体和凝血之间的交叉对话。

[0912] 实施例24

[0913] 本实施例描述评价抗-MASP-2抗体对获自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)患者的血液样品的红细胞溶解的作用的方法。

[0914] 背景/原理:

[0915] 阵发性夜间血红蛋白尿(PNH),亦称为Marchiafava-Micheli综合征,是一种获得性的潜在生命威胁的血液疾病,特征为补体-诱导的血管内溶血性贫血。PNH的标志是慢性血管内溶血,其是补体的替代途径的活化不受调节的结果。Lindorfer, M.A.等, Blood 115(11)(2010)。PNH中的贫血归因于血流中红细胞的破坏。PNH的症状包括红色尿,其归因于在尿液中出现血红蛋白和血栓形成。PNH可自身发生,称为“原发性PNH”或在其它骨髓病症例如再生障碍性贫血的背景中发生,称为“继发性PNH”。PNH的治疗包括输血(对于贫血)、抗凝血(对于血栓形成)和使用单克隆抗体艾库组单抗(Soliris),其通过抑制补体系统保护血细胞免于免疫破坏(Hillmen P.等, N.Engl. J. Med. 350(6):552-9(2004))。然而,相当大一部分的用艾库组单抗治疗的PNH患者具有临床上显著的免疫-介导的溶血性贫血,这是因为所述抗体不阻断补体的替代途径的活化。

[0916] 本实施例描述评价抗-MASP-2抗体对来自获自PNH患者(未用Soliris治疗)的血液样品的红细胞的溶解的作用的方法,所述红细胞用ABO-匹配的酸化正常人血清孵育。

[0917] 方法:

[0918] 试剂:

[0919] 来自正常供体和来自患有PNH的患者(未用Soliris治疗)的红细胞通过静脉穿刺获得,和按Wilcox, L.A.,等, Blood 78:820-829(1991)中所述制备,其通过引用结合到本文中。具有凝集素途径的功能阻断活性的抗-MASP-2抗体可如实施例10中所述的产生。

[0920] 溶血分析:

[0921] 使用描述于Lindorfer, M.A.,等, Blood 15(11):2283-91(2010)和Wilcox, L.A.,等, Blood 78:820-829(1991)中的方法,实施用于测定抗-MASP-2抗体在阻断来自PNH患者的红细胞的溶血的能力上的作用的方法,这两篇文献通过引用结合到本文中。如Lindorfer等所述,将来自PNH患者样品的红细胞离心,吸出血沉棕黄层和细胞用明胶佛罗拿缓冲液(GVB)洗涤,然后进行各实验。按下测试红细胞对APC-介导的溶解的易感性。ABO-匹配的正常人血清用包含0.15mM CaCl₂和0.5mM MgCl₂的GVB(GVB+2)稀释和酸化至pH 6.4(酸化

NHS、aNHS)和用于重构红细胞为在50%aNHS中1.6%的血细胞比容。然后在37℃孵育混合物,和在1小时后,通过离心使红细胞沉淀。等份的回收上清液的光密度在405nm测量和用于计算百分比溶解。在酸化血清-EDTA中重构的样品进行类似地处理和用于定义背景非补体-介导的溶解(通常少于3%)。在蒸馏水中孵育红细胞后测定完全溶解(100%)。

[0922] 为了测定抗-MASP-2抗体对PNH红细胞的溶血的作用,将来自PNH患者的红细胞在aNHS中在缺少增加浓度的抗-MASP-2抗体的情况下孵育,和随后定量测定溶血的存在/量。

[0923] 考虑抗-MASP-2抗体已经显示阻断随后替代补体途径的活化的事实,预期抗-MASP-2抗体将有效阻断替代途径-介导的PNH红细胞溶血,和将用作治疗患有PNH的患者的疗法。

[0924] 实施例25

[0925] 本实施例描述评价抗-MASP-2阻断抗体对通过在获自患有冷球蛋白血症的患者的血液样品中的冷球蛋白的补体活化的作用的方法。

[0926] 背景/原理:

[0927] 冷球蛋白血症的特征为在血清中存在冷球蛋白。冷球蛋白为单一或混合的免疫球蛋白(通常是IgM抗体),其在低温下经过可逆聚集。聚集导致经典途径补体活化和血管床中的炎症,特别是在外周。冷球蛋白血症的临床表现包括血管炎和肾小球肾炎。

[0928] 冷球蛋白血症可基于冷球蛋白组成如下分类:I型冷球蛋白血症或简单冷球蛋白血症,为单克隆免疫球蛋白(通常是免疫球蛋白M(IgM))的结果;II和III型冷球蛋白血症(混合性冷球蛋白血症)包含类风湿因子(RF),其通常为与多克隆IgG的Fc部分复合的IgM。

[0929] 与冷球蛋白血症有关的病况包括丙型肝炎感染、淋巴增生性病征和其它自身免疫疾病。包含冷球蛋白的免疫复合物导致系统性炎症的临床综合征,可能归因于它们激活补体的能力。尽管IgG免疫复合物通常激活补体的经典途径,但包含IgM的复合物还可通过凝集素途径激活补体(Zhang, M., 等, Mol Immunol 44 (1-3): 103-110 (2007) 和 Zhang, M., 等, J. Immunol. 177 (7): 4727-34 (2006))。

[0930] 免疫组织化学研究进一步证实了冷球蛋白免疫复合物包含凝集素途径的组分,和冷球蛋白血症性肾小球肾炎患者的活检显示凝集素途径原位活化的免疫组织化学证据(Ohsawa, I., 等, Clin Immunol 101 (1): 59-66 (2001))。这些结果表明凝集素途径可促进炎症和冷球蛋白疾病中的不利结果。

[0931] 方法:

[0932] 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用于液相C3转化的测定法进行,如Ng Y.C.等, Arthritis and Rheumatism 31 (1): 99-107 (1988) 中所述,其通过引用结合到本文中。如Ng等所述,在特发性混合性冷球蛋白血症(EMC)中,单克隆类风湿因子(mRF),通常IgM,与多克隆IgG复合以形成特征性冷沉淀物免疫复合物(IC) (II型冷球蛋白)。免疫球蛋白和C3已经在受累组织例如皮肤、神经和肾的血管壁中得到证实。如Ng等中所述,将¹²⁵I-标记的mRF加入至血清(正常人血清和获自患有冷球蛋白血症的患者的血清),在37℃孵育和测量与红细胞的结合。

[0933] 在血清(正常人血清和获自患有冷球蛋白血症的患者的血清)中在存在或不存在以下IC的情况下测定液相C3转化:BSA-抗BSA、mRF、mRF加IgG、或冷球蛋白,在存在或不存在抗-MASP-2抗体的情况下。C3和C4固定至IC使用共沉淀测定法用F(ab')₂抗-C3和F(ab')₂

抗-C4测量。

[0934] 考虑抗-MASP-2抗体已显示阻断凝集素途径活化的事实,预期抗-MASP-2抗体将有效阻断与冷球蛋白血症有关的补体介导的不良作用,和可用作治疗患有冷球蛋白血症的患者的疗法。

[0935] 实施例26

[0936] 本实施例描述评价抗-MASP-2抗体对获自冷凝集素疾病(其表现为贫血)的患者的血液样品的作用的方法。

[0937] 背景/原理:

[0938] 冷凝集素疾病(CAD)是一类自身免疫性溶血性贫血。冷凝集素抗体(通常IgM)被低温激活并结合红细胞和使其凝集。冷凝集素抗体与补体结合并攻击红细胞表面上的抗原。这导致红细胞的调理素作用(溶血),其触发它们通过网状细胞内皮系统清除。凝集发生的温度在患者之间不同。

[0939] CAD表现为贫血。当红细胞破坏的破坏率超过骨髓产生足够数量的携氧细胞的能力时,则发生贫血。CAD可由基础性疾病或病症引起,称为“继发性CAD”,例如感染性疾病(支原体肺炎、腮腺炎、单核细胞增多症)、淋巴增生性疾病(淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病)或结缔组织病症。原发性CAD患者被认为具有低程度的淋巴增生性骨髓病症。原发性和继发性CAD是获得性病况。

[0940] 方法:

[0941] 试剂:

[0942] 来自正常供体和来自患有CAD的患者的红细胞通过静脉穿刺获得。具有凝集素途径的功能阻断活性的抗-MASP-2抗体可如实施例10中所述的产生。

[0943] 抗-MASP-2抗体阻断凝集素-介导的凝集素途径活化的作用可如下测定。在存在或不存在抗-MASP-2抗体的情况下将来自血液组I阳性患者的红细胞用冷凝集素(即,IgM抗体)敏化。然后通过测量C3结合,测试红细胞激活凝集素途径的能力。

[0944] 考虑抗-MASP-2抗体已显示阻断凝集素途径活化的事实,预期抗-MASP-2抗体将有效阻断与冷凝集素疾病有关的补体介导的不良作用,和可用作治疗患有冷凝集素疾病的患者的疗法。

[0945] 实施例27

[0946] 本实施例描述评价抗-MASP-2抗体对在获自非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的小鼠的血液样品中的红细胞溶解的作用的方法。

[0947] 背景/原理:

[0948] 非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)的特征为溶血性贫血、血小板减少症和在肾和其它器官的微循环中的血小板血栓引起的肾衰竭。aHUS与不完全的补体调节有关,和可以是散发性或家族性的。aHUS与编码补体活化的基因的突变有关,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,PloS Genetics 3(3):e41(2007)。本实施例描述评价抗-MASP-2抗体对来自获自aHUS小鼠的血液样品的红细胞溶解的作用的方法。

[0949] 方法:

[0950] 抗-MASP-2抗体治疗aHUS的作用可在该疾病的小鼠模型中测定,其中内源小鼠fH

基因已被置换为编码通常在aHUS患者中发现的突变形式的fH的人同源物。参见Pickering M.C.等, J.Exp.Med. 204(6):1249-1256(2007),通过引用结合到本文中。如在Pickering等中所述,这样的小鼠出现aHUS样病理。为了评价抗-MASP-2抗体用于治疗aHUS的作用,将抗-MASP-2抗体给予突变体aHUS小鼠,并比较获自抗-MASP-2ab治疗和未治疗的对照的红细胞的溶解。考虑抗-MASP-2抗体已显示阻断凝集素途径活化的事实,预期抗-MASP-2抗体将有效阻断在患有aHUS的哺乳动物受试者中红细胞的溶解。

[0951] 实施例28

[0952] 本实施例描述评价抗-MASP-2抗体用于治疗青光眼的的作用的方法。

[0953] 原理/背景:

[0954] 已经表明不受控制的补体活化促进青光眼中视网膜神经节细胞(RGC)、它们的突触和轴突的变性损伤的进展。参见Tezel G.等, Invest Ophthalmol Vis Sci 51:5071-5082(2010)。例如,人组织的组织病理研究和使用不同动物模型的体内研究已经证实,在青光眼视网膜中合成补体组分包括C1q和C3,并形成末端补体复合物(参见Stasi K.等, Invest Ophthalmol Vis Sci 47:1024-1029(2006),Kuehn M.H.等, Exp Eye Res 83:620-628(2006))。如在Kuehn M.H.等, 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,和补体级联的破坏延迟RGC变性。在该研究中,当与正常动物相比,发现带有补体组分C3的靶向破坏的小鼠在暂时视网膜I/R后显示延迟的RGC变性。

[0955] 方法:

[0956] 用于测定抗-MASP-2抗体对RGC变性的作用的方法在视网膜I/R的动物模型中进行,如在Kuehn M.H.等, Experimental Eye Research 87:89-95(2008)中所述的,通过引用结合到本文中。如Kuehn等所述的,通过麻醉动物,然后通过角膜插入与包含磷酸缓冲盐水的储器连接的30-规针头至眼的前室中,诱导视网膜缺血。然后升高盐水储器,以获得眼内压104mmHg,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漂白虹膜和视网膜来证实,和仅在左眼中保持缺血45分钟;右眼用作对照和不接受导管插入术。然后在缺血损伤后1或3周将小鼠安乐死。将抗-MASP-2抗体局部给予小鼠至眼或系统性给予,以评价在缺血损伤之前给予的抗-MASP抗体的作用。

[0957] 眼的免疫组织化学使用针对C1q和C3的抗体进行,以检测补体沉积。眼神经损伤还可使用标准电子显微镜检查方法而评价。存活的视网膜RGC的定量测定使用 γ 突触核蛋白标记进行。

[0958] 结果:

[0959] 如Kuehn等描述的,在正常对照小鼠中,短暂视网膜缺血导致视神经的变性变化以及C1q和C3的视网膜沉积,其可通过免疫组织化学检测。相比之下,在诱导后1周,C3缺陷小鼠显示轴突变性的显著降低,显示仅较小水平的视神经损伤。根据这些结果,预期当在MASP-2敲除小鼠中进行该测定法和当在缺血损伤之前将抗-MASP-2抗体给予正常小鼠时,将观察到类似结果。

[0960] 实施例29

[0961] 本实施例证实MASP-2抑制剂,例如抗-MASP-2抗体,有效治疗辐射暴露和/或治疗、改善或预防急性辐射综合征。

[0962] 原理:

[0963] 暴露于高剂量的电离辐射通过两个主要机制引起死亡:对骨髓的毒性和胃肠综合征。骨髓毒性导致所有血液细胞下降,通过感染和出血诱发生物体死亡。胃肠综合征更为严重,且通过由于肠上皮层分解导致的肠屏障功能损失和肠内分泌功能损失驱动。这导致脓毒症和相关的系统性炎症反应综合征,其可导致死亡。

[0964] 补体的凝集素途径是先天免疫机制,其在响应组织损伤和暴露于外来表面(即,细菌)时引发炎症。该途径的阻断在缺血性肠组织损伤或感染性休克的小鼠模型中导致较好的结果。假定凝集素途径在响应辐射诱导的组织损伤时可触发过度和有害的炎症。凝集素途径的阻断因此可减少继发性损伤和增加在急性辐射暴露后的存活率。

[0965] 按本实施例所述进行的研究的目标是在辐射损伤的小鼠模型中通过给予抗-鼠MASP-2抗体评价凝集素途径阻断对存活率的作用。

[0966] 方法和材料:

[0967] 材料。用于本研究的试验物是(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蛋白组分。剂量浓度为1mg/kg的抗-鼠MASP-2抗体(mAbM11)、5mg/kg的抗-人MASP-2抗体(mAbH6)或无菌盐水。对于各给药期间,制备适当体积的新鲜给药溶液。

[0968] 动物。幼小成体雄性Swiss-Webster小鼠获自Harlan Laboratories(Houston, TX)。将动物饲养在具有Alpha-Dri垫料的实底笼中,自由提供经检验的PMI 5002啮齿动物饲料(Animal Specialties, Inc., Hubbard OR)和水。监测温度,动物饲养室以12小时光照/12小时黑暗的光周期运行。

[0969] 辐射。在设施中2-周适应后,以各组10只以剂量速率0.78Gy/min使用配备有320-kV高稳定性X-射线发生器、金属陶瓷X-射线管、可变x-射线束准直仪和滤波器的Therapax X-RAD 320系统(Precision X-ray Incorporated, East Haven, CT),通过全身暴露以6.5和7.0Gy辐射小鼠。剂量水平根据用相同的小鼠品系进行的先前研究进行选择,表明LD_{50/30}介于6.5和7.0Gy之间(数据未显示)。

[0970] 药物配制和给药。根据方案,合适体积的浓缩储液用冰冷盐水稀释,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。根据动物体重使用25-规针头通过IP注射给予抗-MASP-2抗体mAbM11和mAbH6,以递送1mg/kg mAbM11、5mg/kg mAbH6或盐水溶媒。

[0971] 研究设计。将小鼠随机分组,如表8中所述。每日测量和记录体重和温度。组7、11和13中的小鼠在辐射后第7天处死和在深度麻醉下通过心脏穿刺收集血液。在辐射后第30天存活的动物以相同的方式处死和收集血液。根据方案,血浆从收集的血液样品制备和返回到Sponsor用于分析。

[0972] 表8:研究组

[0973]

组 ID	N	辐射水平 (Gy)	治疗	剂量方案
1	20	6.5	溶媒	辐射前 18 小时, 辐射后 2 小时, 每周加强
2	20	6.5	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	仅辐射前 18 小时
3	20	6.5	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	辐射前 18 小时, 辐射后 2 小时, 每周加强
4	20	6.5	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	辐射后 2 小时, 每周加强
5	20	6.5	抗-人 MASP-2 ab (mAbH6)	辐射前 18 小时, 辐射后 2 小时, 每周加强
6	20	7.0	溶媒	辐射前 18 小时, 辐射后 2 小时, 每周加强
7	5	7.0	溶媒	仅辐射后 2 小时
8	20	7.0	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	仅辐射前 18 小时
9	20	7.0	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	辐射前 18 小时, 辐射后 2 小时, 每周加强
10	20	7.0	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	辐射后 2 小时, 每周加强
11	5	7.0	抗-鼠 MASP-2 ab (mAbM11)	仅辐射后 2 小时
12	20	7.0	抗-人 MASP-2 ab (mAbH6)	辐射前 18 小时, 辐射后 2 小时, 每周加强
13	5	无	无	无

[0974] 统计学分析。产生Kaplan-Meier存活曲线和使用log-Rank和Wilcoxon方法用于比较在治疗组之间的平均存活时间。报告具有标准偏差的平均值或具有平均值标准误差的平均值。使用双尾非配对t-检验在对照辐射动物和各个治疗组之间进行统计学比较。

[0975] 结果

[0976] 对于7.0和6.5Gy暴露组的Kaplan-Meier存活曲线分别提供在图32A和32B,和在下表9中概述。总体上,与溶媒治疗的辐射对照动物相比,在6.5 (20%增加) 和7.0Gy (30%增加) 暴露水平上,辐射前用抗-鼠MASP-2ab (mAbM11) 治疗增加辐射小鼠的存活率。与溶媒对照辐射动物比较,在6.5Gy暴露水平,辐射后用抗-鼠MASP-2ab治疗导致存活率适度增加 (15%)。

[0977] 相比之下,与溶媒治疗的辐射对照动物相比,在7.0Gy暴露水平所有治疗的动物显示存活率增加。存活率的最大变化出现在接受mAbH6的动物中,与对照动物相比具有45 %增加。此外,在7.0Gy暴露水平,与对于溶媒治疗的辐射对照动物的辐射后第8天相比,在mAbH6治疗组中死亡首次出现在辐射后第15天,比对照动物增加了7天。在7.0Gy暴露水平下,与对照动物(20.7±2.0天)相比,对于接受mAbH6的小鼠,平均死亡时间(27.3±1.3天)显著增加(p=0.0087)。

[0978] 在整个研究中记录与辐射前当天(第-1天)相比体重的百分比改变。暂时的体重损失出现在所有辐射的动物中,没有证据表明与对照相比因mAbM11或mAbH6治疗导致的不同变化(数据未显示)。在研究结束时,所有存活的动物显示自起始(第-1天)体重的体重增加。

[0979] 表9:暴露于辐射的试验动物的存活率

[0980]	试验组	暴露水平	存活率(%)	死亡时间(平均值± SEM, 天)	首次/最后死亡(天)
	对照辐射	6.5 Gy	65 %	24.0 ± 2.0	9/16
	mAbM11暴露前	6.5 Gy	85 %	27.7 ± 1.5	13/17
	mAbM11暴露前+后	6.5 Gy	65 %	24.0 ± 2.0	9/15
	mAbM11暴露后	6.5 Gy	80 %	26.3 ± 1.9	9/13
	mAbH6暴露前+后	6.5 Gy	65 %	24.6 ± 1.9	9/19
	对照辐射	7.0 Gy	35 %	20.7 ± 2.0	8/17
	mAbM11暴露前	7.0 Gy	65 %	23.0 ± 2.3	7/13
	mAbM11暴露前+后	7.0 Gy	55 %	21.6 ± 2.2	7/16
	mAbM11暴露后	7.0 Gy	70 %	24.3 ± 2.1	9/14
[0981]	mAbH6暴露前+后	7.0 Gy	80 %	27.3 ± 1.3*	15/20
	试验组	暴露水平	存活率(%)	死亡时间(平均值± SEM, 天)	首次/最后死亡(天)
	后				

[0982] *p=0.0087,以相同的辐射暴露水平在对照辐射动物和治疗组之间通过双尾非配对t-检验。

[0983] 讨论

[0984] 急性辐射综合征由三个确定的亚综合征组成:生血性、胃肠性和脑血管性。观察到的综合征依赖于辐射剂量,用超过1Gy的显著的部分或全身辐射暴露,在人中观察到生血作用。生血性综合征的特征为严重抑制骨髓功能,导致血计数(红细胞和白细胞以及血小板)改变的各类血细胞减少,同时发生对免疫系统的损伤。在最坏的情况发生时,在外周血中几乎不存在中性粒细胞和血小板,中性粒细胞减少、发烧、脓毒症的并发症和不受控制的出血导致死亡。

[0985] 在本研究中,发现在以7.0Gy辐射的Swiss-Webster雄性小鼠中给予mAbH6增加全

身x-射线辐射的存活性。值得注意的是,在7.0Gy暴露水平,与35%的溶媒治疗的对照辐射动物相比,80%的接受mAbH6的动物存活至30天。重要的是,在该治疗组中死亡第一天在辐射后第15天才出现,比在溶媒治疗的对照辐射动物中观察到的增加7天。奇怪的是,在较低的X-射线暴露(6.5Gy)时,与溶媒治疗的对照辐射动物相比,给予mAbH6未显示影响存活性或延迟死亡。对于在暴露水平之间的该响应差异,可能存在多个原因,尽管任何假设的验证可能需要另外的研究,包括中间样品采集用于微生物培养和血液学参数。一种解释可简单为分配到各组的动物数可能已经使得不能见到任何细微的治疗-相关的差异。例如,对于n=20的组大小,在65% (mAbH6,以6.5Gy暴露)和80% (mAbH6,以7.0Gy暴露)之间的存活率差异为3只动物。另一方面,在35% (溶媒对照,以7.0Gy暴露)和80% (mAbH6,以7.0Gy暴露)之间的差异为9只动物,并提供了治疗-相关差异的合理证据。

[0986] 这些结果证实,抗-MASP-2抗体有效治疗处于急性辐射综合征的有害影响的风险中或遭受急性辐射综合征的有害影响的哺乳动物受试者。

[0987] 实施例30

[0988] 本实施例证实在用脑膜炎奈瑟菌血清型A或脑膜炎奈瑟菌血清型B感染后,MASP-2缺陷小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟菌诱导的死亡。

[0989] 方法:

[0990] MASP-2敲除小鼠(MASP-2KO小鼠)按实施例1中所述产生。10周龄的MASP-2KO小鼠(n=10)和野生型(WT)C57/BL6小鼠(n=10)通过腹膜内(i.p.)注射100 μ l体积而接种2.6x 10⁷CFU剂量的脑膜炎奈瑟菌血清型A Z2491。将感染剂量联合终浓度400mg/kg的铁葡聚糖给予小鼠。在72小时时间内监测感染后的小鼠存活。

[0991] 在另一实验中,10周龄的MASP-2KO小鼠(n=10)和野生型C57/BL6小鼠(n=10)通过i.p.注射100 μ l体积而接种6x 10⁶CFU剂量的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58。将感染剂量联合最终剂量为400mg/kg的铁葡聚糖给予小鼠。在72小时时间内监测感染后的小鼠存活。对于WT和MASP-2KO小鼠,在感染后72小时时间期间还根据下文描述于表10的疾病评分参数(其基于Fransen等(2010)的方案,略微改变),确定疾病评分。

[0992] 表10:与感染小鼠的临床体征有关的疾病评分

[0993]

体征	评分
正常	0
毛略微皱起	1
毛皱起,迟缓和粘滞眼睛	2
毛皱起,昏睡和闭眼	3
重病和在刺激后不移动	4
死亡	5

[0994] 为了证实感染和确定细菌从血清的清除率,感染后以每小时的间隔自小鼠获取血液样品和分析,以确定脑膜炎奈瑟菌的血清水平(log cfu/mL)。

[0995] 结果:

[0996] 图33是Kaplan-Meyer曲线,图示说明给予感染剂量2.6x 10⁷cfu的脑膜炎奈瑟菌血清型A Z2491后MASP-2KO和WT小鼠的百分比存活率。如图33中所示,在感染后整个72小时期间100%的MASP-2KO小鼠存活。相比之下,仅80%的WT小鼠(p=0.012)在感染后24小时仍

存活,和仅50%的WT小鼠在感染后72小时仍存活。这些结果证实,MASP-2-缺陷小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟菌血清型A Z2491-诱导的死亡。

[0997] 图34是Kaplan-Meyer曲线,图示说明给予感染剂量 6×10^6 cfu的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58后MASP-2KO和WT小鼠的百分比存活率。如图34中所示,在感染后整个72小时期间90%的MASP-2KO小鼠存活。相比之下,仅20%的WT小鼠 ($p=0.0022$) 在感染后24小时仍存活。这些结果证实MASP-2-缺陷小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58-诱导的死亡。

[0998] 图35图示说明了在用 6×10^6 cfu的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58 i.p.感染(在不同的时间点对于两组小鼠, $n=3$)后,在不同的时间点在取自MASP-2KO和WT小鼠的血液样品中回收的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58的log cfu/mL。结果表示为平均值 $\pm$ SEM。如图35中所示,在感染后24小时在WT小鼠中在血液中脑膜炎奈瑟菌的水平达到大约 $6.01 \log$ cfu/mL的峰值和到感染后36小时下降至大约 $4.01 \log$ cfu/mL。相比之下,在MASP-2KO小鼠中,在感染后12小时脑膜炎奈瑟菌的水平达到大约 $4.01 \log$ cfu/mL的峰值和到感染后36小时下降至大约 $1.01 \log$ cfu/mL(符号“*”表示 $p<0.05$;符号“**”表示 $p=0.0043$)。这些结果证实尽管MASP-2KO小鼠用与WT小鼠相同剂量的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58感染,但与WT相比MASP-2KO小鼠具有提高的菌血症清除率。

[0999] 图36图示说明了在用 6×10^6 cfu的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58感染后3、6、12和24小时MASP-2KO和WT小鼠的平均疾病评分。如图36所示,MASP-2-缺陷小鼠显示对感染高抵抗,与WT小鼠相比低得多的疾病评分在感染后6小时(符号“*”表示 $p=0.0411$)、12小时(符号“**”表示 $p=0.0049$)和24小时(符号“***”表示 $p=0.0049$)。图36中的结果表示为平均值 $\pm$ SEM。

[1000] 简言之,本实施例的结果证实用脑膜炎奈瑟菌血清型A或脑膜炎奈瑟菌血清型B感染后,MASP-2-缺陷小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟菌诱导的死亡。

[1001] 实施例31

[1002] 本实施例证实,用脑膜炎奈瑟菌感染后给予抗-MASP-2抗体增加用脑膜炎奈瑟菌感染的小鼠的存活率。

[1003] 背景/原理:

[1004] 如实施例10中所述的,大鼠MASP-2蛋白用于淘选Fab噬菌体展示文库,从其中鉴定Fab2#11为功能活性抗体。大鼠IgG2c和小鼠IgG2a同种型的全长抗体自Fab2#11产生。小鼠IgG2a同种型的全长抗-MASP-2抗体用药效学参数表征(如实施例19中所述)。

[1005] 在本实施例中,在脑膜炎奈瑟菌感染的小鼠模型中分析源自Fab2#11的小鼠抗-MASP-2全长抗体。

[1006] 方法:

[1007] 如上文所述产生的源自Fab2#11的小鼠IgG2a全长抗-MASP-2抗体同种型,在脑膜炎奈瑟菌感染的小鼠模型中如下进行测试。

[1008] 感染后给予小鼠-抗-MASP-2单克隆抗体(MoAb)

[1009] 在i.p.注射高剂量(4×10^6 cfu)的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC583小时后,9周龄的C57/BL6 Charles River小鼠用抑制性小鼠抗-MASP-2抗体(1.0mg/kg) ($n=12$) 或对照同种型抗体 ($n=10$) 治疗。

[1010] 结果:

[1011] 图37是Kaplan-Meyer曲线,图示说明在给予感染剂量 4×10^6 cfu的脑膜炎奈瑟菌血清型B品系MC58,接着感染后3小时给予抑制性抗-MASP-2抗体(1.0mg/kg)或对照同种型抗体后,小鼠的百分比存活率。如图37中所示,90%的用抗-MASP-2抗体治疗的小鼠在感染后整个72小时期间存活。相比之下,仅50%的用同种型对照抗体治疗的小鼠在感染后整个72小时期间存活。符号“*”表示 $p=0.0301$,如通过比较两个存活曲线测定的。

[1012] 这些结果证实,给予抗-MASP-2抗体有效治疗和改善用脑膜炎奈瑟菌感染的受试者的存活率。

[1013] 如本文所证实的,当在感染后3小时内给予时,在治疗用脑膜炎奈瑟菌感染的受试者中使用抗-MASP-2抗体是有效的,预期在感染后24小时至48小时内是有效的。脑膜炎球菌疾病(脑膜炎球菌血症或脑膜炎)是医学急症,如果怀疑是脑膜炎球菌疾病的话,疗法通常立即开始(即,在脑膜炎奈瑟菌作为病原体被鉴定阳性之前)。

[1014] 考虑实施例30证实的在MASP-2KO小鼠中的结果,认为在用脑膜炎奈瑟菌感染之前给予抗-MASP-2抗体也将有效预防或改善感染的严重性。

[1015] 实施例32

[1016] 本实施例证实给予抗-MASP-2抗体有效治疗人血清中的脑膜炎奈瑟菌感染。

[1017] 原理:

[1018] 功能性MBL血清水平降低的患者对复发性细菌和真菌感染的敏感性增加(Kilpatrick等人,Biochim BiophysActa 1572:401-413(2002))。已知脑膜炎奈瑟菌被MBL识别,已经证实MBL-缺乏的血清不溶解奈瑟菌。

[1019] 考虑到实施例30和31中所述的结果,进行了一系列实验以确定在补体-缺乏的和对照人血清中给予抗-MASP-2抗体治疗脑膜炎奈瑟菌感染的功效。在高浓度血清(20%)中进行实验以保护补体途径。

[1020] 方法:

[1021] 1.在不同补体-缺乏的人血清和在用人抗-MASP-2抗体处理的人血清中的血清杀菌活性

[1022] 以下补体-缺乏的人血清和对照人血清用于本实验:

[1023] 表11:所测试的人血清样品(如图38所示)

[1024]

样品	血清类型
A	正常人血清(NHS)+人抗-MASP-2Ab
B	NHS+同种型对照Ab
C	MBL-/-人血清
D	NHS
E	热灭活的(HI)NHS

[1025] 针对人MASP-2的重组抗体分离自组合抗体文库(Knappik,A.,等人,J.Mol.Biol.296:57-86(2000)),使用重组人MASP-2A作为抗原(Chen,C.B.和Wallis,J.Biol.Chem.276:25894-25902(2001))。在人血浆中强力抑制C4和C3的凝集素途径-介导的活化(IC₅₀~20nM)的抗人scFv片段被鉴定并转化为全长人IgG4抗体。

[1026] 在37℃并伴随振荡,将脑膜炎奈瑟菌血清型B-MC58与表11所示的不同血清(各自

的血清浓度为20%)一起孵育,加或不加抑制性人抗-MASP-2抗体(3 μ g在100 μ l总体积中)。在以下时间点采集样品:0-、30-、60-和90-分钟间隔,倒平板(plated out),然后测定活菌计数。热灭活的人血清用作阴性对照。

[1027] 结果:

[1028] 图38图示了在表11所示的人血清样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟菌血清型B菌株MC58的活菌计数的log cfu/mL。表12提供图38的Student's t-检验结果。

[1029] 表12:图38的Student's t-检验结果(时间点60分钟)

[1030]

	平均差(Log)	显著性?P<0.05?	P值概述
AvsB	-0.3678	是	*** (0.0002)
AvsC	-1.1053	是	*** (p<0.0001)
AvsD	-0.2111	是	** (0.0012)
CvsD	1.9	是	*** (p<0.0001)

[1031] 如图38和表12所示,通过加入人抗-MASP-2抑制性抗体而显著增强了在人20%血清中的脑膜炎奈瑟菌的补体-依赖性杀伤。

[1032] 2.在缺乏MASP-2的20% (v/v)小鼠血清中,脑膜炎奈瑟菌的补体-依赖性杀伤。

[1033] 以下补体-缺乏的小鼠血清和对照小鼠血清用于本实验:

[1034] 表13:所测试的小鼠血清样品(如图39所示)

[1035]

样品	血清类型
A	WT
B	MASP-2-/-
C	MBLA/C-/-
D	WT热灭活的(HIS)

[1036] 在37℃并伴随振荡,脑膜炎奈瑟菌血清型B-MC58与不同的补体-缺乏的小鼠血清(各自的血清浓度为20%)一起孵育。在以下时间点采集样品:0-、15-、30-、60-、90-和120-分钟间隔,倒平板,然后测定活菌计数。热灭活的人血清用作阴性对照。

[1037] 结果:

[1038] 图39图示了在表13所示的小鼠血清样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟菌血清型B-MC58的活菌计数的log cfu/mL。如图39所示,MASP-2-/-小鼠血清与WT小鼠血清相比,对脑膜炎奈瑟菌具有更高水平的杀菌活性。符号“**”表示p=0.0058,符号“***”表示p=0.001。表14提供图39的Student's t-检验结果。

[1039] 表14:图39的Student's t-检验结果

[1040]

比较	时间点	平均差 (LOG)	显著性? (p<0.05)?	P值概述
A vs. B	60 min.	0.39	是	** (0.0058)
A vs. B	90 min.	0.6741	是	*** (0.001)

[1041] 总之,本实施例的结果证明与WT血清相比,MASP-2-/-血清对脑膜炎奈瑟菌具有更高水平的杀菌活性。

[1042] 实施例33

[1043] 本实施例表明MASP-2缺乏对得自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)小鼠模型的血液样

品的红细胞溶解的抑制性作用。

[1044] 背景/原理:

[1045] 阵发性夜间血红蛋白尿 (PNH), 也称为Marchiafava-Micheli综合征, 是一种获得性的、可能危及生命的血液病, 特征在于补体-诱导的血管内容血性贫血。PNH的标志是慢性补体-介导的血管内容血, 这是PNH红细胞上缺乏补体调节剂CD55和CD59所致的补体替代途径的未经调节的活化的结果, 随后是血红蛋白尿和贫血。Lindorfer, M.A., 等人, Blood 115 (11) (2010), Risitano, A.M, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 11:528-535 (2011)。PNH中的贫血是因为血流中的红细胞破坏所致。PNH的症状包括血尿 (因尿中可见血红蛋白)、背痛、疲劳、呼吸短促和血栓形成。PNH可以自发产生, 称为“原发性PNH”或在其它骨髓病症例如再生障碍性贫血的情况下发生, 称为“继发性PNH”。PNH的治疗包括针对贫血的输血, 针对血栓形成的抗凝, 和使用单克隆抗体艾库组单抗(**Soliris®**), 该抗体保护血细胞免于因抑制补体系统所致的免疫破坏 (Hillmen P. 等人, N. Engl. J. Med. 350 (6): 552-9 (2004))。艾库组单抗(**Soliris®**)是人源化单克隆抗体, 其靶向补体成分C5, 封闭其被C5转化酶裂解, 从而阻止C5a的产生和MAC的装配。用艾库组单抗治疗PNH患者, 在大约半数患者中导致血管内容血减少 (经乳酸脱氢酶 (LDH) 测定), 导致血红蛋白稳定化和输血非依赖性 (Hillmen P, 等人, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, vol 11 (6) (2011))。尽管经历艾库组单抗治疗的几乎所有患者都达到正常或几乎正常的LDH水平 (因为控制了血管内容血), 但仅有大约三分之一的患者的血红蛋白值达到高于11gr/dL, 接受艾库组单抗的其余患者以大约相同比例继续表现出中度至严重 (即输血-依赖性的) 贫血 (Risitano A.M. 等人, Blood 113:4094-100 (2009))。正如Risitano等人, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11:528-535 (2011) 所述, 已经证明接受艾库组单抗的PNH患者含有与他们的大部分PNH红细胞结合的C3片段 (而未经治疗的患者则没有), 得到以下结论: 膜-结合的C3片段作为调理素对PNH红细胞起作用, 导致它们通过特异性C3受体而被俘获到网状内皮细胞中并且随后导致血管外溶血。因此, 对于发生C3-片段-介导的血管外溶血的那些患者, 需要除了使用艾库组单抗之外的治疗策略, 因为他们继续需要输入红细胞。

[1046] 本实施例描述了评价MASP-2-缺乏的血清和用MASP-2抑制剂处理的血清对得自PNH小鼠模型的血液样品的红细胞溶解的作用的方法, 并且证明了MASP-2抑制对治疗患有PNH的受试者的功效, 并且还支持在经历C5抑制剂例如艾库组单抗治疗的PNH受试者中使用MASP-2抑制剂以改善C3片段-介导的血管外溶血的作用。

[1047] 方法:

[1048] PNH动物模型:

[1049] 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-缺陷型小鼠。这些小鼠丢失了各自的表面补体调节剂, 因此它们的红细胞易于发生自发补体自溶, 如同PNH人红细胞那样。

[1050] 为了进一步敏化这些红细胞, 使用这些细胞, 用或不用甘露聚糖包被, 然后在WT C56/BL6血浆、无MBL血浆、MASP-2-/-血浆、人NHS、人MBL-/-血浆和用人抗-MASP-2抗体处理的NHS中测试其溶血。

[1051] 1. 在MASP-2-缺乏的/耗尽的血清和对照中, Crry/C3和CD55/CD59双重-缺陷型鼠红细胞的溶血测定

[1052] 第一天.鼠RBC的制备(±甘露聚糖包被)。

[1053] 材料包括: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(0.5mg/mL在BBS/Mg²⁺/Ca²⁺中)和甘露聚糖,100μg/mL在BBS/Mg²⁺/Ca²⁺中。

[1054] 在4℃冷冻离心机中以2000xg将全血(2mL)离心1-2min。吸去血浆和血沉棕黄层。然后将RBC沉淀物重悬于2mL冰冷的BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺中并重复离心步骤,将样品洗涤3次。第3次洗涤后,将沉淀物重悬于4mL BBS/Mg²⁺/Ca²⁺中。将2mL等分试样的RBC留出,作为未包被对照。向剩余的2mL中加入2mL CrCl₃和2mL甘露聚糖,并将样品在室温下孵育同时温和搅拌5分钟。通过加入7.5mL BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺而终止反应。将样品如上所述地离心,重悬于2mL BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺和如上所述地再洗涤2次,然后贮存于4℃。

[1055] 第二天.溶血测定

[1056] 材料包括BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺(如上)、测试血清、96-孔圆底和平底板和分光光度计,其在410-414nm处阅读96孔板。

[1057] 首先测定RBC浓度并将细胞调整至10⁹/mL,并在此浓度下贮存。使用前,将测定缓冲液稀释至10⁸/mL,然后采用100μl每孔。在410-414nm处(允许比541nm更高的灵敏度)测定溶血。在冰冷的BBS/明胶/Mg²⁺/Ca²⁺中制备测试血清稀释液。将100μl每种血清稀释液移入圆底板中(参见板布置)。加入100μl适当稀释的RBC制备物(即10⁸/mL)(参见板布置),在37℃孵育大约1小时,并观察溶血。(此时可对各板拍照)。然后将板在最大速率离心5分钟。吸出100μl液相,转移至平板中,并在410-414nm处记录OD。保留RBC沉淀物(这些可以在随后用水溶解,以得到相反结果)。

[1058] 实验#1:

[1059] 新鲜血液得自CD55/CD59双重-缺陷型小鼠,并且如以上方案详述,制备Crry/C3双重-缺陷型小鼠的血液和红细胞。将细胞分开,一半细胞用甘露聚糖包被,另一半不处理,调节终浓度至1x10⁸/mL,其中100μl用于溶血测定,所述测定如上所述地进行。

[1060] 实验#1的结果:在PNH动物模型中,凝集素途径参与红细胞溶解

[1061] 在初步实验中,已经确定非-包被的WT小鼠红细胞在任何小鼠血清中都不溶解。进一步确定了甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠红细胞在WT小鼠血清中缓慢溶解(在37度时超过3小时),但它们在无MBL血清中不溶解(数据未显示)。

[1062] 已经确定甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠红细胞在人血清中快速溶解,但在热灭活的NHS中不溶解。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中溶解(即1/40、1/80、1/160、1/320和1/640稀释度中全都溶解)(数据未显示)。在这一稀释度中,替代途径不起作用(AP功能活性在低于8%血清浓度中显著降低)。

[1063] 实验#1的结论

[1064] 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溶解得非常好,但在无MBL的高度稀释的人血清中不溶解。在所测的各个血清浓度中的有效溶解暗示替代途径不参与这种溶解或这种溶解无需替代途径。MBL-缺乏的小鼠血清和人血清不能溶解甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠红细胞,表明经典途径亦与所观察的溶解无关。因为需要凝集素途径识别分子(即MBL),所以这种溶解由凝集素途径介导。

[1065] 实验#2:

[1066] 新鲜血液得自Crry/C3和CD55/CD59双重-缺陷型小鼠,并且在如上所述的溶血测定中,在以下人血清存在时,分析甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠红细胞:无MBL;WT;用人抗-MASP-2抗体预处理的NHS;和热灭活的NHS作为对照。

[1067] 实验#2的结果:在PNH动物模型中, MASP-2抑制剂阻止红细胞溶解

[1068] 将甘露聚糖-包被的Crry-/-小鼠红细胞与以下一起孵育:在稀释至1/640的NHS稀释液中(即1/40、1/80、1/160、1/320和1/640)、人MBL-/-血清、用抗-MASP-2mAb预处理的NHS、和热灭活的NHS作为对照。

[1069] 将ELISA微量滴定板离心并在圆孔板底部收集非-溶解的红细胞。收集各孔的上清液,并通过在ELISA读板器中读取OD415 nm而测定从溶解的红细胞中释放的血红蛋白量。

[1070] 在对照热灭活的NHS(阴性对照)中,正如所料,未见溶解。MBL-/-人血清在1/8和1/16稀释度溶解甘露聚糖-包被的小鼠红细胞。抗-MASP-2-抗体-预处理的NHS在1/8和1/16稀释度溶解甘露聚糖-包被的小鼠红细胞,而WT人血清在低至1/32稀释度溶解甘露聚糖-包被的小鼠红细胞。

[1071] 图40图示了在来自热灭活的(HI) NHS、MBL-/-、用抗-MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的血清中,一系列血清浓度的人血清使甘露聚糖-包被的鼠红细胞溶血(通过溶解的小鼠红细胞(Crry/C3-/-)的血红蛋白释放至上清液中来测量,所述上清液按照光度测定法测定)。

[1072] 根据图40所示的结果,显示用抗-MASP-2抗体的MASP-2抑制显著改变CH₅₀和抑制补体-介导的缺乏免于自身补体活化的保护的致敏红细胞溶解。

[1073] 实验#3

[1074] 在存在以下血清的情况下,在如上文描述的溶血测定法中分析在未包被的Crry-/-小鼠红细胞中的获自Crry/C3和CD55/CD59双缺陷小鼠的新鲜血液:MBL-/-;WT血清;用人抗-MASP-2抗体预处理的NHS和热灭活的NHS作为对照。

[1075] 结果:

[1076] 图41图示了在来自热灭活的(HI) NHS、MBL-/-、用抗-MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的血清中,通过一系列血清浓度的人血清,非-包被的鼠红细胞的溶血(通过溶解的WT小鼠红细胞的血红蛋白释放至上清液中来测量,所述上清液按照光度测定法测定)。如图41所示的,证明了抑制MASP-2抑制补体-介导的非-敏化的WT小鼠红细胞的溶解。

[1077] 图42图示了在来自热灭活的(HI) NHS、MBL-/-、用抗-MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的血清中,通过一系列血清浓度的人血清使非-包被的鼠红细胞溶血(通过溶解的小鼠红细胞(CD55/59-/-)的血红蛋白释放至上清液中来测量,所述上清液按照光度测定法测定)。

[1078] 表12:表示为血清浓度的CH₅₀值

血清	WT	CD55/59 -/-
热灭活的 NHS	不溶解	不溶解
MBL AO/XX 供体(MBL 缺陷型)	7.2%	2.1%
NHS + 抗-MASP-2 抗体	5.4%	1.5%
NHS	3.1%	0.73%

[1079]

[1080] 注意：“CH₅₀”是补体-介导的溶血达到50%的点。

[1081] 总之,本实施例的结果证明了抑制MASP-2抑制敏化和非-敏化红细胞的补体介导的溶解,所述红细胞缺乏免于自体补体活化的保护。因此,MASP-2抑制剂可以用于治疗患有PNH的个体,并且还可用于在经历用C5抑制剂例如艾库组单抗(Soliris®)的治疗的PNH患者中改善(即抑制、阻止或降低其严重程度)血管外溶血。

[1082] 实施例34

[1083] 本实施例描述上文实施例29中描述的研究的跟踪研究,提供进一步的证据证实MASP-2抑制剂例如MASP-2抗体有效治疗辐射暴露和/或治疗、改善或预防急性辐射综合征。

[1084] 原理:在实施例29中描述的起始研究中,证实与溶媒治疗的辐射对照动物相比以6.5Gy和7.0Gy暴露水平,在小鼠中辐射前用抗-MASP-2抗体治疗增加辐射小鼠的存活率。在实施例29中还证实,与溶媒对照辐射动物相比,以6.5Gy暴露水平,辐射后用抗-MASP-2抗体治疗导致存活率的适度增加。本实施例描述进行的第二个辐射研究,以证实第一个研究的结果。

[1085] 方法:

[1086] 研究A的设计:

[1087] Swiss Webster小鼠(n=50)暴露于电离辐射(8.0Gy)。评价了辐射暴露之前18小时和辐射暴露之后2小时以及之后每周给予的抗-MASP-2抗体疗法(mAbH65mg/kg)对死亡率的影响。

[1088] 研究A的结果:

[1089] 如图43中所示,确定在暴露于8.0Gy的小鼠中给予抗-MASP-2抗体mAbH6增加存活率,与接受溶媒对照的小鼠相比,调整的中位数存活率增加4-6天,和当与接受溶媒对照的小鼠相比死亡率降低12%(log-rank检验,p=0.040)。

[1090] 研究B的设计:

[1091] 按以下组,将Swiss Webster小鼠(n=50)暴露于电离辐射(8.0Gy):(I:溶媒)盐水对照;(II:低)抗-MASP-2抗体mAbH6(5mg/kg),辐射之前18小时和辐射之后2小时给予;(III:高)mAbH6(10mg/kg),辐射之前18小时和辐射之后2小时给予;和(IV:后高)mAbH6(10mg/kg),仅辐射之后2小时给予。

[1092] 研究B的结果:

[1093] 与接受溶媒对照的动物相比,辐射之前和之后给予抗-MASP-2抗体调整平均存活率4-5天。与溶媒对照小鼠相比,抗-MASP-2抗体-治疗的小鼠的死亡率降低6-12%。还注意到,没有观察到显著的有害治疗作用(数据未显示)。

[1094] 总之,本实施例中显示的结果与实施例29中显示的结果一致,进一步证实了抗-MASP-2抗体有效治疗处于急性辐射综合征的有害作用的风险中或遭受急性辐射综合征的有害作用的哺乳动物受试者。

[1095] 实施例35

[1096] 本研究探讨MASP-2-缺乏在LPS(脂多糖)诱导的血栓形成的小鼠模型中的作用。

[1097] 原理:

[1098] 由产志贺毒素的大肠杆菌感染引起的溶血性尿毒综合征(HUS)是儿童中急性肾衰竭的首要原因。在此实施例中,在MASP-2-/- (KO)小鼠中进行LPS诱导的血栓形成(微血管凝

血)的Schwarztman模型,以确定MASP-2抑制是否有效抑制或阻止血管内血栓的形成。

[1099] 方法:

[1100] 在LPS诱导的血栓形成(微血管凝血)的Schwarztman模型中分析了MASP-2^{-/-} (n=9)和WT (n=10)小鼠。将沙雷氏菌LPS给予小鼠并监测随时间的血栓形成。对微血栓和LPS诱导的微血管凝血的发生率进行比较。

[1101] 结果:

[1102] 值得注意的是,在沙雷氏菌LPS给药后,所有受试MASP-2^{-/-}小鼠(9/9)没有形成血管内血栓。相比之下,在平行测试的10只WT小鼠中,在7只中检测到微血栓($P=0.0031$, Fischer's exact)。如图44所示,在MASP-2^{-/-}和WT小鼠中测定至LPS感染后微血管闭塞发作的时间,显示了经60分钟测定的具有血栓形成的WT小鼠的百分比,其中早在约15分钟时检测到血栓形成。高达80%的WT小鼠在60分钟时出现血栓形成。相比之下,如图44所示,在60分钟时,MASP-2^{-/-}无一具有血栓形成(对数秩: $P=0.0005$)。

[1103] 这些结果表明,在HUS模型中,MASP-2的抑制针对血管内血栓的发生具有保护作用。

[1104] 实施例36

[1105] 本实施例描述了使用腹膜内共注射纯化的志贺毒素2(STX2)加LPS,在HUS的小鼠模型中抗-MASP-2抗体的作用。

[1106] 背景:

[1107] 使用腹膜内共注射纯化的志贺毒素2(STX2)加LPS,开发HUS的小鼠模型。小鼠肾脏的生化和微阵列分析揭示了STX2加LPS攻击与任一单独药剂的效果截然不同。这些小鼠的血液和血清分析表明,中性粒细胞增多,血小板减少,红细胞溶血,并且血清肌酐和血液尿素氮增加。此外,小鼠肾的组织学分析和电子显微术显示出肾小球纤维蛋白沉积,红细胞充血,微血栓形成,和肾小球超微结构改变。确定该HUS模型在C57BL/6小鼠中诱导人HUS病理学的所有临床症状,包括定义人类疾病的血小板减少,溶血性贫血,和肾衰竭。(J. Immunol 187(1):172-80(2011))。

[1108] 方法:

[1109] 经称量在18至20g的C57BL/6雌性小鼠购自Charles River实验室并分成两组(每组五只小鼠)。一组小鼠通过腹膜内(i.p.)注射在150 μ l盐水的总体积中稀释的重组抗-MASP-2抗体mAbM11(每只小鼠100 μ g;对应于5mg/kg体重的终浓度)而预处理。对照组接受盐水,没有任何抗体。在i.p.注射抗-MASP-2抗体mAbM11后6小时,所有小鼠接受在150 μ l总体积中组合的i.p.注射亚致死剂量(3 μ g/动物;对应于150 μ g/kg体重)的粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*) LPS(L6136;Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)和4.5ng/动物剂量(相当于225ng/kg)STX2(LD50剂量的2倍)。盐水注射被用于对照。

[1110] 给药后每6小时监测小鼠的存活。当小鼠达到了HUS病理的昏睡阶段,就将其处死。36小时后,处死所有小鼠,取出双肾用于免疫组织化学和扫描电子显微术。在实验结束时通过心脏穿刺取血样。分离血清并将其冷冻保存于-80 $^{\circ}$ C,用于在治疗组和对照组中测定BUN和血清肌酐水平。

[1111] 免疫组织化学

[1112] 将各小鼠肾脏的三分之一固定在4%多聚甲醛中24小时,处理和石蜡包埋。切成三

微米厚的切片,并置于装载的载玻片上,用于后续H&E染料染色。

[1113] 电子显微术

[1114] 将肾脏的中间部分切成约1至2mm³的块,并在4℃在2.5%戊二醛/1×PBS中固定过夜。固定的组织随后由莱斯特大学的电子显微镜设备处理。

[1115] 冰冻切片

[1116] 将肾脏的另一三分之一切成约1至2mm³的块并在液氮中快速冷冻并保持在-80℃,用于冷冻切片和mRNA分析。

[1117] 结果:

[1118] 图45图示了在STX/LPS诱导的模型中,盐水处理的对照小鼠(n=5)和抗-MASP-2抗体治疗的小鼠(n=5)随时间(小时)的存活百分率。值得注意的是,如图45所示,对照小鼠到42小时为止全部死亡。形成鲜明对比的是,100%的抗-MASP-2抗体治疗的小鼠在整个实验的时间过程中存活。与图45所示结果一致的是,观察到所有死亡或因严重疾病迹象而必须处死的未经处理小鼠具有显著肾小球损伤,而所有抗-MASP-2-抗体治疗的小鼠的肾小球看起来正常(数据未显示)。这些结果表明,MASP-2抑制剂例如抗-MASP-2抗体可用于治疗患有或有风险发展血栓性微血管病(TMA)例如溶血性尿毒综合征(HUS)、非典型HUS(aHUS)或血栓性血小板减少性紫癜(TTP)的受试者。

[1119] 实施例37

[1120] 该实施例描述了MASP-2缺乏和MASP-2抑制在鼠FITC-葡聚糖/光诱导的内皮细胞损伤的血栓形成模型中的作用。

[1121] 背景/原理:如实施例35和36所示,在典型HUS模型中,MASP-2缺乏(MASP-2KO)和MASP-2抑制(通过给予抑制性MASP-2抗体)保护小鼠,而所有暴露于STX和LPS的对照小鼠出现严重的HUS,变得垂死或48小时内死亡。例如,如图54所示,用MASP-2抑制性抗体处理,然后暴露于STX和LPS的所有小鼠均存活(Fisher's exact $P < 0.01$; $N = 5$)。因此,在该HUS模型中,抗MASP-2疗法保护小鼠。

[1122] 进行下面的实验以分析血栓性微血管病(TMA)的异硫氰酸荧光素(FITC)葡聚糖诱导的内皮细胞损伤模型中MASP-2缺乏和MASP-2抑制的作用,以进一步证明MASP-2抑制剂治疗HUS、aHUS、TTP和具有其他病因的TMA的益处。

[1123] 方法:

[1124] 活体内显微术

[1125] 如Frommhold等,BMC Immunology 12:56-68,2011所述,制备用于活体内显微术的小鼠。简言之,将小鼠用腹膜内(i.p.)注射氯胺酮(125mg/kg体重,Ketanest,Pfizer GmbH,Karlsruhe,Germany)和赛拉嗪(12.5mg/kg体重;Rompun,Bayer,Leverkusen,Germany)而麻醉,并放置在加热垫上以保持体温在37℃。用盐水浸泡目镜(SW 40/0.75数值孔径,Zeiss,Jena,Germany)在直立显微镜(Leica,Wetzlar,Germany)上进行活体内显微术。为了缓解呼吸,小鼠采用PE 90管(Becton Dickinson和Company,Sparks,MD,USA)插管。左颈动脉用PE10管(Becton Dickinson和Company,Sparks,MD,USA)插管进行血液取样和系统性单克隆抗体(mAb)给药。

[1126] 提睾肌的准备

[1127] 如Sperandio等,Blood,97:3812-3819,2001所述进行提睾肌手术准备,用于活体

内显微术。简言之,打开阴囊和使提睾肌松动。在纵行切开肌肉并将其伸展在盖玻片上后,移动附睾和睾丸并将其固定到一边,充分显微观察提睾肌微循环。在Panasonic S-VHS录像机上通过CCD摄像机(CF8/1;Kappa,Gleichen,Germany)记录提睾肌小静脉。如先前由Frommhold等,BMC Immunology 12:56-68,2011所述,用热控制的(35℃碳酸氢盐缓冲盐水)表面灌注提睾肌。

[1128] 光激发FITC葡聚糖损伤模型

[1129] 通过光毒性(FITC)-葡聚糖的光激发诱导提睾肌小静脉和小动脉内皮中受控的光剂量依赖性血管损伤(Cat.No.FD150S,Sigma Aldrich,Poole,U.K.)。该程序启动局部血栓形成。作为光毒性试剂,将60 μ L 10% w/v FITC-葡聚糖溶液通过左颈动脉入口注入并使其均匀分布在循环血液10分钟。在选定良好灌注的小静脉后,将低到中范围强度(800-1500)卤素光聚焦于目的血管以对内皮表面诱导FITC-葡聚糖荧光和轻度至中度光毒性,以便以可再现的受控方式刺激血栓形成。使用卤素灯(12V,100W,Zeiss,Oberkochen,Germany)产生激发FITC-葡聚糖必需的光毒性光强度。由荧光的光致激发而产生的光毒性需要光强度阈值和/或照明持续时间,并且通过内皮表面直接加热或通过产生活性氧自由基引起,如Steinbauer等,Langenbecks Arch Surg 385:290-298,2000所述。

[1130] 施加到各血管的光强度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)测量,以便调节。视频扫描的离线分析借助计算机辅助微循环分析系统(CAMAS,Dr.Zeintl,Heidelberg)进行,并如Zeintl等,Int J Microcirc Clin Exp,8(3):293-302,2000所述,测定红细胞速度。

[1131] 在诱导血栓形成前,施用单克隆抗人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)和溶媒对照

[1132] 采用盲法研究设计,在活体内显微术的提睾肌模型中,在光毒性诱导血栓形成前16小时,将MASP-2功能活性的抑制剂即重组单克隆人MASP-2抗体(mAbH6)(以10mg/kg体重的终浓度给予)或等量的同种型对照抗体(无MASP-2抑制活性) i.p.注射给予9周龄雄性C57BL/6WT同窝小鼠。在诱导血栓形成前1小时,给予第二剂量的mAbH6或对照抗体。也在该模型中评价MASP-2敲除(KO)小鼠。

[1133] mAbH6(针对重组人MASP-2建立)是人MASP-2功能活性的有效抑制剂,其与小鼠MASP-2交叉反应,与之结合并抑制小鼠MASP-2,但由于物种特异性,亲和力较低(数据未示出)。为了弥补mAbH6对于小鼠MASP-2的较低亲和力,以高浓度(10mg/kg体重)给予mAbH6,以克服物种特异性变化和对于小鼠MASP-2的较低亲和力,从而在体内条件下提供鼠MASP-2功能活性的有效阻断。

[1134] 在该盲法研究中,记录各个受试小静脉完全闭塞所需要的时间(选择标准是通过可比的直径和血流速度)。

[1135] 经60分钟观察期,使用活体内显微术录像记录,评价具有微血管闭塞的小鼠百分比、发病时间和至闭塞的时间。

[1136] 结果:

[1137] 图46图示了,作为损伤诱导后时间的函数,在FITC/葡聚糖UV模型中,在注射FITC/葡聚糖之前16小时和1小时给予同种型对照或人MASP-2抗体mAbH6(10mg/kg)处理后,具有微血管闭塞的小鼠的百分比。如图46所示,85%的接受同种型对照抗体的野生型小鼠在30分钟或更短时间内闭塞,而只有19%的经人MASP-2抗体(mAbH6)预处理的野生型小鼠在同

一时间内闭塞,并且在人MASP-2抗体处理组中的确最终闭塞的小鼠中至闭塞的时间延迟。进一步注意的是,3只经MASP-2mAbH6处理的小鼠在60分钟观察期间内完全没有闭塞(即,被保护免于血栓闭塞)。

[1138] 图47图示了对于经人MASP-2抗体(mAbH6)和同种型对照抗体处理的小鼠以分钟计的闭塞时间。数据报告为散点图,具有平均值(水平条)和标准误差条(垂直条)。该图示出了可观察到闭塞的小鼠中的闭塞时间。因此,在60分钟观察期间没有闭塞的3只MASP-2抗体处理的小鼠并没有包括在本分析(没有未闭塞的对照处理的小鼠)。用于分析的统计检验是非配对t检验;其中符号“*”表示p值

[1139] =0.0129。如示于图47中,在采用低光强度(800-1500)的FITC-葡聚糖/光诱导的内皮细胞损伤的血栓形成模型中,在闭塞的4只MASP-2抗体(mAbH6)处理的小鼠中,与同种型对照抗体处理的小鼠相比,用MASP-2抗体处理显著增加了静脉闭塞时间。同种型对照的完全闭塞时间平均为19.75分钟,而MASP-2抗体处理组的完全闭塞时间平均为32.5分钟。

[1140] 图48图示了在采用低光强度(800-1500)的FITC-葡聚糖/光诱导的内皮细胞损伤的血栓形成模型中,对于野生型小鼠、MASP-2KO小鼠和用人MASP-2抗体(mAbH6)预处理(在诱导血栓形成前16小时以10mg/kg i.p.给药,然后在诱导血栓形成前1小时再次i.v给药)的野生型小鼠,以分钟计的闭塞时间。仅闭塞的动物被包括在图48中;对于接受同种型对照抗体的野生型小鼠,n=2;对于MASP-2KO,n=2;和对于接受人MASP-2抗体(mAbH6)的野生型小鼠,n=4。符号“*”表示P<0.01。如示于图48,在采用低光强度(800-1500)的FITC-葡聚糖/光诱导的内皮细胞损伤的血栓形成模型中,MASP-2缺乏和MASP-2抑制(10mg/kg的mAbH6)增加静脉闭塞时间。

[1141] 结论:

[1142] 本实施例的结果进一步证明,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,微血管凝血和血栓形成是多种微血管病症的标志。因此,预期在患有HUS、aHUS、TTP或其他微血管病症的患者中,给予MASP-2抑制剂例如MASP-2抑制性抗体将是一种有效疗法,并提供保护而免于微血管凝血和血栓形成。

[1143] 实施例38

[1144] 本实施例描述了一项研究,表明人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)在富含血小板的人血浆中对血小板功能没有影响。

[1145] 背景/原理:如实施例37中描述的,证明在FITC-葡聚糖/光诱导的内皮细胞损伤的血栓形成模型中,用人MASP-2抑制性抗体(mAbH6)抑制MASP-2增加了静脉闭塞时间。进行以下实验,以确定MASP-2抑制性抗体(mAbH6)是否对血小板功能具有影响。

[1146] 方法:如下对血小板的ADP诱导的聚集测试人mAbH6 MASP-2抗体的作用。将40μL溶液中1μg/ml或0.1μg/ml浓度的人MASP-2mAbH6加入360μL新鲜制备的富血小板的人血浆中。同种型对照抗体被用作阴性对照。在将抗体加入血浆中后,血小板活化通过添加2μM终浓度的ADP而诱导。该测定通过用小磁体在1mL反应杯中搅拌溶液而开始。血小板聚集在双通道Chrono-log Platelet Aggregometer Model 700Whole Blood/Optical Lumi-Aggregometer中测定。

[1147] 结果:

[1148] 在5分钟时间段内测定溶液中的聚集百分比。其结果示于下表13。

[1149] 表13:在5分钟时间段内的血小板聚集。

[1150]	抗体	幅度(聚集百分比)	斜率(随时间变化的聚集百分比)
	MASP-2抗体(mAbH6) (1 µg/ml)	46%	59
	同种型对照抗体(1 µg/ml)	49%	64
	MASP-2抗体(mAbH6) (0.1 µg/ml)	52%	63
	同种型对照抗体(0.1 µg/ml)	46%	59

[1151] 如上表13所示,用对照抗体或MASP-2mAbH6抗体处理的ADP诱发的血小板聚集之间没有观察到显著差异。这些结果表明,人MASP-2抗体 (mAbH6) 对血小板功能没有影响。因此,实施例37中描述的结果表明在FITC-葡聚糖/光诱导的内皮细胞损伤的血栓形成模型中,用人MASP-2抑制性抗体 (mAbH6) 抑制MASP-2增加了静脉闭塞时间,该结果并非由于mAbH6对血小板功能的影响。因此,MASP-2抑制防止血栓形成,而不直接影响血小板功能,揭示出与现有抗血栓形成剂不同的治疗机制。

[1152] 实施例39

[1153] 本实施例描述在TMA的鼠模型中MASP-2抑制对血栓形成和血管阻塞的影响。

[1154] 背景/原理:在内皮细胞应激或损伤的背景中凝集素途径在活化补体系统中起主要作用。该活化通过替代途径被快速放大,替代途径在呈现具有aHUS的许多患者中失调。因此预期防止MASP-2和凝集素途径的活化将终止连续的酶反应,所述酶反应导致形成膜攻击复合物、血小板活化和白细胞募集。该作用限制组织损伤。

[1155] 另外,MASP-2具有因子Xa-样活性,并裂解凝血酶原以形成凝血酶。该MASP-2-驱动的凝血系统活化可使止血失调,导致TMA病理。因此,使用MASP-2抑制剂例如阻断补体活化和凝血系统的MASP-2抑制性抗体抑制MASP-2预期改善aHUS和其它TMA-相关病况的结果。

[1156] 如实施例37中所述的,证实在血栓形成的FITC-葡聚糖/光诱导的内皮细胞损伤模型中,用人MASP-2抑制性抗体 (mAbH6) 的MASP-2抑制增加静脉阻塞时间。在该TMA模型中,小鼠通过IV注射FITC-葡聚糖敏化,接着在小鼠提睾肌的微血管中局部光活化FITC-葡聚糖 (Thorlacius H等,EurJ Clin. Invest 30(9):804-10,2000;Agero等,Toxicon 50(5):698-706,2007)。

[1157] 进行以下实验以确定在TMA鼠模型中,MASP-2抑制性抗体 (mAbH6) 对血栓形成和血管阻塞是否具有剂量反应作用。

[1158] 方法:在C57 B1/6小鼠的提睾肌的微血管中通过光活化异硫氰酸荧光素标记的葡聚糖 (FITC-葡聚糖) 诱导局部血栓形成,和使用具有以下修改的描述于实施例37中的方法,使用活体显微镜检查测量血栓形成和血管阻塞的起始。在TMA诱导前1小时通过静脉内 (iv) 注射,将mAbH6 (2mg/kg、10mg/kg或20mg/kg) 或同种型对照抗体 (20mg/kg) 给予各组小鼠。记录发生血栓形成的时间和完全血管阻塞的时间。在30-60分钟记录的活体显微镜检查图像的视频再现分析用于评价血管大小、血流速度、光强度、发生血栓形成 (相当于血小板粘附) 的速度、发生血栓形成的时间、总血管阻塞速度和直到总血管阻塞的时间。使用SigmaPlot v12.0进行统计学分析。

[1159] 结果:

[1160] 开始血栓形成

[1161] 图49是Kaplan-Meier曲线,显示在用增加剂量的人MASP-2抑制性抗体 (mAbH6, 2mg/kg、10mg/kg或20mg/kg) 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,具有血栓的小鼠的百分比作为时间的函数。如图49中所示,相对于对照治疗的小鼠,在mAbH6-治疗的小鼠中以剂量-依赖性方式,血栓形成的开始被延迟。

[1162] 图50图示说明了至发生血栓形成的中位数时间(分钟),其为mAbH6剂量的函数(与对照相比 $p < 0.01$)。如图50中所示,用增加剂量的mAbH6,至发生血栓形成的中位数时间从对照组的6.8分钟增加至20mg/kg mAbH6治疗组的17.7分钟 ($p < 0.01$)。基础实验数据和统计学分析提供在表14和15中。

[1163] 基于图像记录评价,在单个小鼠中记录的至发生血栓形成的时间详述于下表14中。

[1164] 表14:在光染料诱导的损伤后至发生血栓形成的时间

对照治疗		mAbH6治疗		
至发病的时间 (分钟)	对照	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
[1165]	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			

[1166] *在指定的观察期间血管未显示发病。

[1167] 比较在对照和mAbH6治疗的动物之间至发生阻塞的时间的统计学分析显示在下表15中。

[1168] 表15:至发病的时间:数据来自FITC Dex剂量反应研究

统计学	对照	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
事件数/动物数(%)	11/11 (100%)	6/6 (100%)	9/9 (100%)	8/10 (80.0%)
中位数时间(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)
Wilcoxon p-值*		0.2364	0.1963	0.0016
事件=至观察到发病的时间 中位数(分钟)和其95% CI基于Kaplan-Meier评估 NE=不可估计 *p-值通过Dunnett-Hsu多重比较进行调整				

[1170] 微血管阻塞

[1171] 图51是Kaplan-Meier曲线,显示在用增加剂量的人MASP-2抑制性抗体(mAbH6, 2mg/kg、10mg/kg或20mg/kg)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,具有微血管阻塞的小鼠的百分比,其为时间的函数。如图51中所示,与对照小鼠相比,在mAbH6治疗组中完全微血管阻塞被延迟。

[1172] 图52图示说明了至微血管阻塞的中位数时间,其为mAbH6剂量的函数(与对照相比 $p < 0.05$)。如图52中所示,至完全微血管阻塞的中位数时间从对照组的23.3分钟增加至2mg/kg mAbH6治疗组的38.6分钟($p < 0.05$)。10mg/kg或20mg/kg剂量的mAbH6与2mg/kg mAbH6治疗组表现类似(完全微血管阻塞的中位数时间分别是40.3和38分钟)。基础实验数据和统计学分析提供在表16和17中。

[1173] 基于图像记录的原始评价,在单个小鼠中记录的至完全血管阻塞的时间详细描述于表16中。

[1174] 表16:在光染料诱导的损伤后至完全阻塞的时间

对照治疗	mAbH6治疗			
	对照	2 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
至阻塞的时间 (分钟)	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*
[1175]	30*			33.17*
	61.8*			

[1177] *在指示的观察期间血管未完全阻塞。

[1178] 在对照和mAbH6治疗的动物之间比较至完全阻塞的时间统计学分析显示在下表17中。

[1179] 表17:至完全微血管阻塞的时间:来自FITC Dex剂量反应研究的数据

统计学	对照	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
事件数/动物数(%)	9/11 (81.8%)	4/6 (66.7%)	7/9 (77.8%)	7/10 (70.0%)
中位数时间(分钟) (95% CI)	23.3 (16.5, 37.5)	36.8 (21.9, NE)	40.3 (17.5, NE)	38.0 (28.0, 40.6)
Wilcoxon p-值*		0.0456	0.0285	0.0260
事件=至观察到阻塞的时间 中位数(分钟)和其95% CI基于Kaplan-Meier估计 NE=不可估计 *p-值通过Dunnnett-Hsu多重比较进行调整				

[1181] 概述

[1182] 如表18中所概述的,相对于对照治疗的小鼠,在mAbH6治疗的小鼠中血栓形成的起始以剂量-依赖性方式被延迟(至发病的中位数时间为10.4-17.7分钟,相对于6.8分钟)。相对于对照治疗组,在所有mAbH6-治疗组中,至完全阻塞的中位数时间被显著延迟(表18)。

[1183] 表18:至发生血栓形成和完全阻塞的中位数时间

	对照	mAbH6 (2 mg/kg)	mAbH6 (10 mg/kg)	mAbH6 (20 mg/kg)
[1184] 至发生血栓形成的中位数#时间(分钟)	6.8	10.4	11.7	17.7*
至完全微血管阻塞的中位数#时间(分钟)	23.3	36.8*	40.3*	38.0*

[1185] #中位数值基于Kaplan-Meier估计

[1186] *与对照相比 $p < 0.05$ (通过用于多重比较的Dunnett-Hsu调整的Wilcoxon)

[1187] 这些结果证实,mAbH6,一种结合MASP-2和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,预期给予MASP-2抑制剂例如MASP-2抑制性抗体,将是患有HUS、aHUS、TTP或其它微血管病性病症,例如其它TMA,包括灾难性抗磷脂综合征(CAPS)、系统性德克斯病;和癌症、癌症化学疗法和移植继发性TMA的患者的有效疗法和提供保护免于微血管凝血和血栓形成。

[1188] 实施例40

[1189] 本实施例描述使用噬菌体展示鉴定结合MASP-2和抑制凝集素-介导的补体活化,同时保留免疫系统的经典(C1q-依赖性)途径和替代途径组分完整的完全人scFv抗体。

[1190] 概述:

[1191] 完全人高-亲和力MASP-2抗体通过筛选噬菌体展示文库进行鉴定。抗体的可变轻链和重链片段以scFv形式和全长IgG形式分离。人MASP-2抗体可用于抑制与凝集素途径-介导的替代补体途径活化有关的细胞损伤,同时保留免疫系统的经典(C1q-依赖性)途径组分完整。在一些实施方案中,本发明的MASP-2抑制性抗体具有以下特征:(a) 对人MASP-2的高亲和力(例如,KD为10nM或更小);和(b) 在90%人血清中抑制MASP-2-依赖性补体活性,其IC50为30nM或更小。

[1192] 方法:

[1193] 全长催化失活的MASP-2的表达:

[1194] 人MASP-2的全长cDNA序列(SEQ ID NO:4),其编码具有前导序列的人MASP-2多肽(SEQ ID NO:5),被亚克隆至哺乳动物表达载体pCI-Neo(Promega),其在CMV增强子/启动子区的控制下驱动真核表达(描述于Kaufman R.J.等,Nucleic Acids Research19:4485-90,

1991;Kaufman,Methods in Enzymology,185:537-66(1991))。

[1195] 为了产生催化失活的人MASP-2A蛋白,按US2007/0172483中所述进行定点诱变,其通过引用结合到本文中。PCR产物在琼脂糖凝胶电泳和条带制备后纯化,和使用标准加尾程序产生单个腺苷重叠。然后将腺苷加尾的MASP-2A克隆至pGEM-T easy载体中和转化到大肠杆菌。将人MASP-2A进一步亚克隆至哺乳动物表达载体pED或pCI-Neo。

[1196] 将上述MASP-2A表达构建体转染到DXB1细胞,使用标准磷酸钙转染程序(Maniatis等人,1989)。在无血清培养基中产生MASP-2A,以确保制备物不被其它血清蛋白污染。每隔一天从汇集细胞中收获培养基(共4次)。重组MASP-2A水平平均为大约1.5mg/升培养基。MASP-2A(上述Ser-Ala突变体)通过亲和色谱在MBP-A-琼脂糖柱上纯化。

[1197] 在经淘选/scFv转化和过滤筛选而鉴定的ScFv候选克隆的MASP-2A ELISA

[1198] 对人免疫球蛋白轻链-和重链-可变区序列的噬菌体展示文库进行抗原淘选,接着经过自动化抗体筛选和选择,以鉴定针对人MASP-2蛋白的高亲和性scFv抗体。进行了针对HIS-标记的或生物素标记的MASP-2A的scFv噬菌体文库的三轮淘选。第三轮淘选先用MBL洗脱,再用TEA(碱性)洗脱。为了监测噬菌体展示scFv片段对靶MASP-2A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3轮淘选的scFv基因克隆到pHOG表达载体中并进行小规模过滤筛选,以寻找针对MASP-2A的特定克隆。

[1199] 挑出含有编码来自第三轮淘选的scFv片段的质粒的细菌菌落,点在硝基纤维素膜上并在非诱导性培养基中培养过夜以产生母板。从第三轮淘选中总共挑出并分析了18,000个菌落,半数来自竞争性洗脱,半数来自随后的TEA洗脱。淘选针对MASP-2A的scFv噬菌体文库,接着scFv转化和过滤筛选,得到137个阳性克隆。108/137克隆在ELISA测定法中对MASP-2结合呈阳性(数据未显示),其中进一步分析了其中的45个克隆在正常人血清中阻断MASP-2活性的能力。

[1200] 测定抑制凝集素途径C3转化酶形成的测定法

[1201] 测定抑制凝集素途径C3转化酶形成的功能测定法用于评价MASP-2scFv候选克隆的“阻断活性”。为了产生包含凝集素途径C3转化酶两种蛋白成分(C4b、C2a),需要MASP-2丝氨酸蛋白酶活性。因此,抑制MASP-2功能活性的MASP-2scFv(即阻断性MASP-2scFv)将抑制凝集素途径C3转化酶的形成。C3含有独特的高反应性硫酯基团作为其结构部分。在该测定法中当C3转化酶裂解C3时,C3b上的硫酯基团可与通过酯键或酰胺键固定在塑料孔底部的大分子上的羟基或氨基形成共价键,从而有利于在ELISA测定法中检测出C3b。

[1202] 酵母甘露聚糖是凝集素途径的已知激活剂。在测定C3转化酶形成的下列方法中,将用甘露聚糖包被的塑料孔与稀释的人血清孵育以激活凝集素途径。然后洗涤各孔,并采用标准ELISA方法测定固定在孔中的C3b。在该测定法中所产生的C3b的量直接反映了从头形成的凝集素途径C3转化酶。在该测定法中测定选定浓度的MASP-2scFv克隆抑制C3转化酶形成和随后C3b产生的能力。

[1203] 方法:

[1204] 将如上所述地鉴定的45个候选克隆表达、纯化并稀释至相同的储液浓度,再将其稀释在含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,以确保所有克隆都具有相同量的缓冲液。以一式三份,测定浓度为2 μg/mL的每个scFv克隆。阳性对照是OMS100 Fab2并以0.4 μg/mL测定。在有和没有scFv/IgG

克隆存在时监测C3c形成。

[1205] 将甘露聚糖在50mM碳酸盐缓冲液(15mM Na₂CO₃+35mM NaHCO₃+1.5mM NaN₃, pH 9.5)中稀释至浓度20μg/mL(1μg/孔)并包被在ELISA板上,在4℃过夜。次日,将甘露聚糖-包被的板用200μl PBS洗涤3次。再将100μl 1%HSA封闭溶液加入各孔并在室温下孵育1小时。将各板用200μl PBS洗涤3次,并贮存在冰上在200μl PBS中,直到加入样品。

[1206] 将正常人血清在CaMgGVB缓冲液中稀释至0.5%,并以一式三份,向该缓冲液中加入scFv克隆或OMS100 Fab2阳性对照,浓度为0.01μg/mL、1μg/mL(仅OMS100对照)和10μg/mL,并在冰上预孵育45分钟,然后加入到封闭的ELISA板上。通过在37℃孵育1小时启动反应,并通过将各板移至冰浴而终止反应。用兔α-小鼠C3c抗体,接着是山羊α-兔HRP来检测C3b沉积。阴性对照是无抗体缓冲液(无抗体=最大C3b沉积),阳性对照是含EDTA的缓冲液(无C3b沉积)。通过进行同样的测定法来检测背景,除了各孔中无甘露聚糖之外。将无甘露聚糖板的背景信号从含甘露聚糖的孔的信号中减去。截止标准设置为仅无关scFv克隆(VZV)和缓冲液的活性的一半。

[1207] 结果:基于截止标准,发现共13个克隆阻断MASP-2的活性。选择所有产生>50%途径抑制的13个克隆并测序,获得10个独特的克隆。发现所有10个克隆具有相同的轻链亚类λ3,但有三个不同的重链亚类VH2、VH3和VH6。在功能测定法中,使用0.5%人血清,10个候选scFv克隆中有5个的IC₅₀ nM值小于25nM目标标准。

[1208] 为了鉴定具有改善的效力的抗体,对如上所述鉴定的3个母scFv克隆进行轻链重排(shuffling)。此过程涉及由与源自六个健康供体的首次用于实验的人类λ轻链(VL)的文库配对的每个母克隆的VH组成的组合文库的生成。然后筛选此文库中具有改善的结合亲和性和/或功能性的scFv克隆。

[1209] 表19:前导子克隆和它们各自的母克隆(都以scFv形式)的IC₅₀(nM)的功能效力的比较

	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)
[1210]			
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

[1211] 以下给出的是上表19所示的母克隆和子克隆的重链可变区(VH)序列。

[1212] Kabat CDR(31-35(H1)、50-65(H2)和95-107(H3))以粗体表示;Chothia CDR(26-32(H1)、52-56(H2)和95-101(H3))以下划线表示。

[1213] 17D20_35VH-21N11VL重链可变区(VH)(SEQ ID NO:67,由SEQ ID NO:66编码)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLSRGKMGVSWIRQP

[1214] **PGKALEWLA****HIFSS****DEKSYRTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTM****TNM**
DPVDTAT**YYCARIR****RGGIDYWGQGT****LVTVSS**

[1215] d17N9重链可变区(VH)(SEQ ID NO:68)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSTSAAWNWRQSP

[1216] SRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNS
VTPEDTAVYYCARDPFGVPFDIWGQGTMTVTSS

[1217] 以下给出的是母克隆和子克隆的轻链可变区 (VL) 序列。

[1218] Kabat CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2); 和 89-97 (L3)) 以粗体表示; Chothia CDR (24-34 (L1); 50-56 (L2) 和 89-97 (L3)) 以下划线表示。这些区域是相同的, 无论按照 Kabat 还是 Chothia 系统编号。

[1219] 17D20m_d3521N11 轻链可变区 (VL) (SEQ ID NO: 70, 由 SEQ ID NO: 69 编码)

QPVLTPPPSLSVSPGQTASITCSGEKLGDKYAYWYQQKPGQS

[1220] PVLVMYQDKQRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC
QAWDSSTAVFGGGTKLTVL

[1221] 17N16m_d17N9 轻链可变区 (VL) (SEQ ID NO: 71)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCAGDNLGKKRVHWYQQRPGQ

[1222] APVLVIYDDSDRPSGIPDRFSASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYC
QVWDIATDHVVFVGGGTKLTVLAAAGSEQKLISE

[1223] 通过斑点印迹分析, 对于表位结合, 分析了 MASP-2 抗体 OMS100 和 MoAb_d3521N11VL (包括 SEQ ID NO: 67 所示的重链可变区和 SEQ ID NO: 70 所示的轻链可变区, 亦称为“OMS646”和“mAbH6”), 这两者已证明以高亲和力与人 MASP-2 结合并具有阻断功能性补体活性的能力。结果表明 OMS646 和 OMS100 抗体对 MASP-2 是高特异性, 而不与 MASP-1/3 结合。抗体既不与 MAP19 结合, 也不与不含 MASP-2 的 CCP1 结构域的 MASP-2 片段结合, 得到以下结论: 结合位点包含 CCP1。

[1224] MASP-2 抗体 OMS646 经测定强烈接合重组 MASP-2 (Kd 60-250pM), 与 C1s、C1r 或 MASP-1 相比具有 >5000 倍的选择性 (见下表 20):

[1225] 表 20: OMS646 MASP-2 抗体-MASP-2 相互作用的亲和力和特异性, 如通过固相 ELISA 研究所评价

[1226]	抗原	K _d (pM)
	MASP-1	>500,000
	MASP-2	62 ± 23*
	MASP-3	>500,000
	纯化的人 C1r	>500,000
	纯化的人 C1s	~ 500,000

[1227] *平均值 ± SD; n = 12

[1228] OMS646 特异性阻断末端补体组分的凝集素-依赖性活化

[1229] 方法:

[1230] OMS646 对膜攻击复合物 (MAC) 沉积的作用使用对于凝集素途径、经典途径和替代途径的途径-特异性条件进行分析。对于该目的, 按照制造商的说明书使用 Wieslab Comp300 补体筛选试剂盒 (Wieslab, Lund, Sweden)。

[1231] 结果:

[1232] 图53A图示说明了在存在或不存在抗-MASP-2抗体 (OMS646) 的情况下在凝集素途径-特异性测定条件下MAC沉积的水平。图53B图示说明了在存在或不存在抗-MASP-2抗体 (OMS646) 的情况下在经典途径-特异性测定条件下MAC沉积的水平。图53C图示说明了在存在或不存在抗-MASP-2抗体 (OMS646) 的情况下在替代途径-特异性测定条件下MAC沉积的水平。

[1233] 如图53A中所示,OMS646阻断MAC沉积的凝集素途径-介导的活化,其 IC_{50} 值为大约1nM。然而,OMS646对自经典途径-介导的活化(图53B)或自替代途径-介导的活化(图53C)产生的MAC沉积没有作用。

[1234] 在静脉内 (IV) 或皮下 (SC) 给予小鼠后OMS646的药代动力学和药效学

[1235] 在小鼠的28天单剂量PK/PD研究中评价OMS646的药代动力学 (PK) 和药效学 (PD)。研究测试皮下 (SC) 给予的5mg/kg和15mg/kg的OMS646的剂量水平,以及静脉内 (IV) 给予的5mg/kg OMS646的剂量水平。

[1236] 关于OMS646的PK概况,图54图示说明了OMS646浓度 ($n=3$ 只动物/组的平均值),其为给予指定剂量的OMS646后的时间的函数。如图54中所示,以5mg/kg SC,给药后大约1-2天,OMS646达到5-6ug/mL的最大血浆浓度。以5mg/kg SC,OMS646的生物利用度为大约60%。如图54中进一步显示的,以15mg/kg SC,给药后大约1-2天,OMS646达到10-12ug/mL的最大血浆浓度。对于所有组,OMS646从系统循环中被缓慢清除,具有大约8-10天的终末半寿期。OMS646的概况对于人抗体在小鼠中是典型的。

[1237] OMS646的PD活性图示在图55A和55B。图55A和55B显示对于5mg/kg IV (图55A) 和5mg/kg SC (图55B) 组的各小鼠的PD反应 (系统性凝集素途径活性下降)。虚线表示测定基线 (最大抑制;测定之前体外加入过量OMS646的幼稚小鼠血清)。如图55A中所示,在IV给予5mg/kg的OMS646后,系统性凝集素途径活性立刻下降至接近不可检测的水平,和经过28天的观察期凝集素途径活性显示仅适度恢复。如图55B中所示,在给予5mg/kg的OMS646 SC的小鼠中,观察到凝集素途径活性的时间-依赖性抑制。凝集素途径活性在给予药物24小时内下降至接近不可检测的水平和保持在低水平至少7天。凝集素途径活性随时间逐渐增加,但在28天观察期内未恢复至给药前水平。给予15mg/kg SC后观察到的凝集素途径活性vs时间曲线类似于5mg/kg SC剂量 (数据未显示),表明PD终点的饱和。数据还表明,IV或SC给予的每周剂量5mg/kg的OMS646足以在小鼠中实现系统性凝集素途径活性的持续抑制。

[1238] 实施例41

[1239] 本实施例证实在暴露于来自非典型溶血性尿毒综合征 (aHUS) 的患者的在疾病的急性期和缓解期获得的血清后,MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 抑制在激活的人微血管内皮细胞 (HMEC-1) 的表面上aHUS血清诱导的补体C5b-9沉积。

[1240] 背景/原理:进行以下研究来分析在存在或不存在OMS646 (特异性结合MASP-2并抑制凝集素途径活化的MASP-2抗体) 的情况下,在暴露于aHUS患者的在疾病的 (1) 急性期和 (2) 缓解期期间获得的血清后,在激活的HMEC-1细胞的表面上aHUS血清诱导的补体C5b-9沉积。

[1241] 方法:

[1242] 患者:选择在疾病的急性期期间和缓解期间研究的四名aHUS患者,用于本研究,他

们包括在International Registry of HUS/TTP和通过Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases of the Mario Negri Institute进行基因分型。一名aHUS患者具有杂合性p.R1210C补体因子H(CFH)突变和一名具有抗-CFH自身抗体,在其它两名aHUS患者中未发现CFH的突变或抗体。

[1243] 表21和22概述了在本研究中分析的这四名aHUS患者中筛选补体基因突变和抗-CFH自身抗体的结果,以及在急性期或缓解期测量的临床和生物化学数据。

[1244] 表21:本研究中的四名aHUS患者的临床参数

病例号	突变或抗-CFH Ab	疾病期	血小板 (150-400*10 ³ /μl)	LDH (266-500 IU/l)	血红蛋白 (14-18g/dl)	s-肌酐 (0.55-1.25mg/dl)
[1245]	#1	急性	31,000	1396	12.9	2.37
		缓解	267,000	n.a.	11.5	3.76
	#2	急性	46,000	1962	7	5.7
		缓解	268,000	440	13.4	7.24
	#3	急性	40,000	3362	9.5	1.77
		缓解	271,000	338	8.8	0.84
	#4	急性	83,000	1219	7.8	6.8
		缓解	222,000	495	12.2	13

[1246] 注释:n.a. = 不可获得

[1247] 表22:本研究中的四名aHUS患者的补体参数

病历号	突变或抗-CFH Ab	疾病期	血清 C3 (83-180 mg/dl)	血浆 SC5b-9 (127-400 ng/ml)
[1248]	#1	急性	51	69
		缓解	n.a.	117
	#2	急性	79	421
		缓解	119	233
[1249]	#3	急性	58	653
		缓解	149	591
	#4	急性	108	n.a.
		缓解	n.a.	n.a.

[1250] 实验方法:将来自真皮来源的人微血管内皮细胞系(HMEC-1)的细胞平铺到载玻片上和当汇合时使用。汇合的HMEC-1细胞用10μM ADP(腺苷二磷酸)活化10分钟,然后用来自上文在表23和24中描述的四名aHUS患者的在疾病的急性期采集的或来自同一aHUS患者在缓解期采集的或来自四名健康对照受试者的血清孵育4小时。在存在或不存在按上文实施例40中所述产生的MASP-2抑制性抗体OMS646(100μg/mL)的情况下,或在存在可溶性补体受体1(sCR1)(150μg/mL)作为补体抑制的阳性对照的情况下,用测试培养基(含0.5%BSA的HBSS)将血清按1:2稀释。在孵育步骤结束时,HMEC-1细胞用兔抗-人补体C5b-9处理,接着用FITC-缀合的第二抗体处理。在各实验中,来自一名健康对照的血清与aHUS患者血清(急性期和缓解期)平行测试。共聚焦倒置激光显微镜用于获得内皮细胞表面上的荧光染色。获得

15个视野/样品,并且荧光染色占据的面积使用软件Image J的内置特定功能通过自动边缘检测进行评价,表示为像素²/分析的视野。将显示最低和最高值的视野从计算中排除。

[1251] 对于统计学分析(单向ANOVA,接着是Tukey多重比较检验),对于各患者和对照,使用在各实验条件中考虑的13个视野的像素²的结果。

[1252] 结果:

[1253] 用来自四名aHUS患者的血清的补体沉积分析的结果概述在下表23A中,并来自四名健康受试者的血清的结果概述在下表23B中。

[1254] 表23A:在ADP-活化的HMEC-1细胞中补体抑制剂对aHUS血清诱导的C5b-9沉积的作用

aHUS患者#	aHUS急性期			aHUS缓解期		
	未治疗	+sCR1	+OMS646	未治疗	+sCR1	+OMS646
[1255] 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-)	5103 ± 648°	497 ± 67*	2435 ± 394*	3705 ± 570°	420 ± 65§	2151 ± 250§§§
[1256] R1210C) 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§§

[1257] 表23B:在ADP-活化的HMEC-1细胞中补体抑制剂对四名健康对照受试者(未患有aHUS)血清的C5b-9沉积的作用

健康对照受试者#	未治疗	+sCR1	+OMS646
[1258] 对照受试者 #1 (与aHUS受试者#1平行分析)	481 ± 66	375 ± 43	213 ± 57
	651 ± 61	240 ± 33	490 ± 69
对照受试者#2 (与aHUS受试者#2平行分析)			
对照受试者#3 (与aHUS受试者#3平行分析)	602 ± 83	234 ± 35	717 ± 109
对照受试者#4 (与aHUS受试者#4平行分析)	370 ± 53	144 ± 20	313 ± 36

[1259] 对于表23A和23B:数据为平均值 $\pm$ SE。 $^{\circ}$ P<0.001vs对照;*P<0.001,**P<0.01vs未治疗的aHUS急性期;§P<0.001,§§P<0.01,§§§P<0.05vs未治疗的aHUS缓解期。

[1260] 图56图示说明了MASP-2抗体(OMS646)和sCR1对在ADP-活化的HMEC-1细胞中aHUS血清诱导的C5b-9沉积的抑制作用。在图56中,数据为平均值 $\pm$ SE。 $^{\circ}$ P<0.0001vs对照;*P<0.0001vs未治疗的aHUS急性期;^P<0.0001vs aHUS急性期+sCR1;§P<0.0001vs未治疗的aHUS缓解期和#P<0.0001vs aHUS缓解期+sCR1。

[1261] 如表23A、23B和图56中所示,ADP-刺激的HMEC-1细胞在静态条件下暴露于aHUS患者的血清(在急性期或缓解期收集)4小时,显示在细胞表面上C5b-9的强烈沉积,如通过共聚焦显微镜测定的。通过测量C5b-9覆盖的面积,与在暴露于来自健康对照受试者的血清的细胞中相比,在暴露于来自aHUS患者的血清的细胞中观察到显著更高量的C5b-9沉积,不管aHUS血清在急性期还是在缓解期收集。在急性期和缓解期之间未观察到血清诱导的内皮C5b-9沉积的差异。

[1262] 如表23A、23B和图56中进一步显示的,与未治疗的aHUS血清相比,加入MASP-2抗体OMS646至aHUS血清(获自急性期或缓解期的患者)导致在内皮细胞表面上的C5b-9沉积显著降低。然而,与补体泛-抑制剂sCR1产生的作用相比,OMS646对C5b-9沉积的抑制作用较不明显。事实上,在存在OMS646 vs.sCR1时观察到aHUS血清诱导的C5b-9沉积的统计学显著差异(图56和表23A和23B)。

[1263] 当计算为四名aHUS患者的平均值时,在存在补体抑制剂时观察到的C5b-9沉积的降低的百分比(与通过来自同一患者的未治疗的血清诱导的认为是100%的C5b-9沉积相比)如下:

[1264] 急性期:

[1265] sCR1(150 μ g/ml):C5b-9沉积降低91%

[1266] OMS646(100 μ g/ml):C5b-9沉积降低40%

[1267] 缓解期:

[1268] sCR1(150 μ g/ml):C5b-9沉积降低91%

[1269] OMS646(100 μ g/ml):C5b-9沉积降低54%

[1270] 结论:本实施例中描述的结果证实补体的凝集素途径被激活的微血管内皮细胞刺激,该刺激是aHUS特有的放大的补体活化反应的有效驱动器。还证实,凝集素途径的该刺激和由此产生的放大的补体活化反应在aHUS的急性期和临床缓解期发生。此外,该发现未显示受限于与aHUS有关的任何特定的补体缺陷。如本实施例中进一步证实的,用MASP-2抑制性抗体例如OMS646选择性抑制凝集素途径减少具有各种病因的aHUS患者中的补体沉积。

[1271] 实施例42

[1272] 本实施例证实,在暴露于在aHUS的(1)急性期和(2)缓解期获得的aHUS患者血清后,MASP-2抑制性抗体(OMS646)抑制在激活的人微血管内皮细胞(HMEC-1)的表面上aHUS血清诱导的血小板聚集和血栓形成。

[1273] 方法:

[1274] 患者:研究了在疾病的急性期和缓解期的三名aHUS患者(患者#1、#2和#4,如实施例41的表21、22、23A和23B中所述的)(一名患者具有杂合p.R1210C CFH突变,在其它两名患者中未发现突变或抗-CFH抗体)。对于本研究选择患者,他们包括在International

Registry of HUS/TTP中和通过Laboratory of Immunology and Genetics of Transplantation and Rare Diseases of the Mario Negri Institute进行基因分型。还选择五名健康受试者作为血液供体用于灌注实验。

[1275] 方法: 汇合的HMEC-1细胞用10 μ M ADP激活10分钟,然后用来自三名aHUS患者(患者#1、2和4,描述于实施例41)的在疾病的急性期收集的或来自相同患者的在缓解期收集的的血清或用来自健康受试者的对照血清,孵育三小时。在存在或不存在按实施例40所述产生的MASP-2抑制性抗体OMS646(100 μ g/mL)的情况下,血清用试验培养基(含0.5%BSA的HBSS)按1:2稀释;或用sCR1(150 μ g/mL)作为补体抑制的阳性对照。对于患者#1和#2,另外的孔用包含100 μ g/mL的无关同种型对照抗体的试验培养基或用20 μ g/mL的OMS646按1:2稀释的血清(来自急性期和缓解期)孵育(对于后者,病例#1仅测试缓解期和病例#2测试急性期和缓解期两者)。

[1276] 在孵育步骤结束时,将HMEC-1细胞与获自健康受试者的肝素化全血(10 UI/mL)(包含标记血小板的荧光染料米帕林)以微循环中遇到的剪应力(60达因/cm²,三分钟)灌注到流动室。在三分钟灌注后,将内皮-细胞单层在丙酮中固定。通过共聚焦倒置激光显微镜获得内皮细胞表面上的每个血小板血栓样品15个图像,并且血栓占据的面积使用Image J软件评价。将显示最低和最高值的视野从计算中排除。

[1277] 对于统计学分析(单向ANOVA,接着Tukey多重比较检验),对于各患者和对照,使用在各实验条件中考虑的13个视野的像素²的结果。

[1278] 结果:

[1279] 用来自三名aHUS患者的血清的血栓形成实验的结果概述在下表24A中,和用来自五名健康受试者的血清的结果概述在下表24B中。

[1280] 表24A:在ADP-激活的HMEC-1细胞中补体抑制剂对aHUS血清诱导的血栓形成的作用(像素²±SE)

实验条件	疾病期	aHUS病例#1 血栓形成 (像素 ² ±SE) (无突变, 无抗-CFH ab)	aHUS病例#2 血栓形成 (像素 ² ±SE) (CFH-R1210C)	aHUS病例#4 血栓形成 (像素 ² ±SE) (无突变, 无抗-CFH ab)
未治疗	急性	5499 ± 600	22320 ± 1273°	10291 ± 1362°
	缓解	6468 ± 1012°	3387 ± 443°	17676 ± 1106°
+sCR1 (150 μ g/mL)	急性	4311 ± 676	5539 ± 578*	5336 ± 1214***
	缓解	573 ± 316§	977 ± 102§	2544 ± 498§
+OMS646 (20 μ g/mL)	急性	未测定	6974 ± 556*	未测定
	缓解	832 ± 150§	1224 ± 252§	未测定
+OMS646 (100 μ g/mL)	急性	3705 ± 777	9913 ± 984*	2836 ± 509*
	缓解	3321 ± 945§§§	733 ± 102§	1700 ± 321§
+无关的同种型 对照抗体(100 μ g/mL)	急性	5995 ± 725	18655 ± 1699	未测定
	缓解	10885 ± 1380	2711 ± 371	未测定

[1282] 表24B:在血栓形成(像素²±SE)测定法中在ADP-激活的HMEC-1细胞中,补体抑制

剂对来自五名健康对照受试者(未患有aHUS)的血清的作用

	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)
[1283]	未治疗	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
[1284]	无关的同种 型对照抗体 (100 µg/mL)	6325 ± 697	1024 ± 235	399 ± 82	45269	未测定
	与来自aHUS 受试者的血 清平行分析	#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 和缓解期 血清)

[1285] 对于表24A和24B:数据为平均值±SE。°P<0.001vs对照;*P<0.001,***P<0.05vs未治疗的aHUS急性期;§P<0.001,§§§P<0.05vs未治疗的aHUS缓解期。

[1286] 图57图示说明了MASP-2抗体(OMS646)和sCR1对在ADP-激活的HMEC-1细胞中aHUS血清诱导的血栓形成的作用。在图57中,显示的数据为平均值±SE。°P<0.0001,°°P<0.01vs对照;*P<0.0001,**P<0.01vs未治疗的aHUS急性期;§P<0.0001vs未治疗的aHUS缓解期。

[1287] 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,在用急性期或缓解期收集的aHUS血清治疗的HMEC-1细胞中观察到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(100µg/ml和20µg/ml)显示在预先暴露于取自急性期的aHUS血清的细胞中血栓形成的部分抑制。在两个不同剂量的OMS646之间抗-血栓形成作用是相当的,并且与sCR1的作用没有不同(图57和表24A)。加入无关的同种型对照抗体对aHUS-血清诱导的血栓形成没有抑制作用。

[1288] 如图57和表24A中进一步显示的,对取自缓解期的aHUS血清,OMS646的抑制作用甚至更加明显。事实上,将100 μ g/ml和20 μ g/ml剂量的OMS646加入取自缓解期的aHUS患者血清,导致几乎完全抑制血栓形成,这类似于加入sCR1所观察到的。无关的同种型对照抗体未显示显著的抑制作用。

[1289] 当计算为三名aHUS患者的平均值时,对于补体抑制剂记录的血栓沉积覆盖的HMEC-1表面的减少百分比(与通过来自相同患者的未治疗的血清诱导的血栓面积相比,其作为100%)如下:

[1290] 急性期:

[1291] sCR1 (150 μ g/ml):降低60%

[1292] OMS646 (100 μ g/ml):降低57%

[1293] OMS646 (20 μ g/ml):降低45%

[1294] 缓解期:

[1295] sCR1 (150 μ g/ml):降低85%

[1296] OMS646 (100 μ g/ml):降低79%

[1297] OMS646 (20 μ g/ml):降低89%

[1298] 结果讨论:

[1299] 本实施例的结果证实MASP-2抑制性抗体例如OMS646(按实施例40所述产生),对在HMEC-1细胞中aHUS血清-诱导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中诱导的C5b-9沉积的作用(如实施例41所述)。还令人惊讶的是,将100 μ g/ml和20 μ g/ml剂量的OMS646加入取自缓解期的aHUS患者血清导致几乎完全抑制血栓形成。另一令人惊讶的发现是,观察到在急性期和缓解期,OMS646与阳性对照sCR1一样有效,sCR1是补体系统的广泛和几乎完全抑制剂(Weisman H.等,Science 249:146-151,1990;Lazar H.等,Circulation 100:1438-1442,1999)。

[1300] 注意,来自健康受试者的对照血清也在HMEC-1细胞中诱导适度的血栓形成。对对照血清诱导的血栓形成,我们未观察到与OMS646或sCR1一致的抑制作用。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不依赖于补体,如通过在用对照血清孵育的HMEC-1中观察到的极低的C5b-9沉积所支持的(参见实施例41)。

[1301] 结论:

[1302] 总之,MASP-2抑制性抗体例如OMS646的观察的抗-血栓性作用基本上显示大于基于在本实验系统中观察到的OMS646对C5b-9沉积的抑制作用所预期的(如描述于实施例a41和显示于图56)。例如,如描述于Gastoldi等,Immunobiology 217:1129-1222Abstract 48 (2012),标题为“C5a/C5aR interaction mediates complement activation and thrombosis on endothelial cells in atypical hemolytic uremic syndrome(aHUS)”,确定加入抑制C5b-9沉积(减少60%)的C5抗体限制在HMEC-1中的血栓形成至相当的程度(减少60%)。相比之下,MASP-2抑制性抗体(OMS646,100 μ g/mL)抑制C5b-9沉积(平均值:急性期=减少40%;缓解期=减少54%);和以显著更高的百分比抑制血栓形成(急性期=减少57%;缓解期=减少79%)。比较而言,OMS646以比阳性对照补体抑制剂(sCR1,150 μ g/mL,C5b-9沉积的急性期抑制=减少91%;缓解期=减少91%)更低的百分比抑制补体沉积,但在抑制血栓形成中与sCR1阳性对照同等有效(sCR1,150 μ g/mL,急性期=减少60%;缓解期

=减少85%)。这些结果证实,MASP-2抑制性抗体(例如,OMS646)令人惊讶地在获自急性期和缓解期的aHUS受试者的血清中有效抑制血栓形成。

[1303] 根据前述内容,在一个实施方案中,本发明提供在患有或有风险发生血栓性微血管病(TMA)的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的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综合征(aHUS)。在一个实施方案中,TMA是aHUS。在一个实施方案中,在疾病的急性期将组合物给予aHUS患者。在一个实施方案中,在缓解期将组合物给予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,这样的减轻例如通过血小板计数增加和/或血清LDH浓度降低证明,例如描述于Loirat C等,Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60,2011中,其通过引用结合到本文中)。

[1304] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体结合人MASP-2,KD为10nM或更小;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法中在1%人血清中抑制C3b沉积,IC50为10nM或更小;所述抗体在90%人血清中抑制C3b沉积,IC50为30nM或更小,其中抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)2和F(ab')2的抗体片段,其中抗体是单链分子,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IgG4分子包括S228P突变,和/或其中抗体基本上不抑制经典途径。在一个实施方案中,抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制替代途径。在一个实施方案中,抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径或替代途径(即,抑制凝集素途径同时保留经典和替代补体途径完整)。

[1305] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体在来自患有TMA例如aHUS(急性或缓解期)的受试者的血清中抑制血栓形成至少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%直至99%。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体在来自患有aHUS的受试者的血清中以超过对血清中C5b-9沉积的抑制作用至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制血栓形成。

[1306] 在一个实施方案中,与未处理的血清相比,MASP-2抑制性抗体在来自缓解期的aHUS患者的血清中抑制血栓形成至少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%直至99%。在一些实施方案中,MASP-2抑制性抗体在缓解期的aHUS患者的血清中以超过对血清中C5b-9沉积的抑制作用至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制血栓形成。

[1307] 在一个实施方案中,通过静脉内导管或其它导管递送方法将MASP-2抑制性抗体给予所述受试者。

[1308] 在一个实施方案中,本发明提供在患有TMA的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,包括(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包括SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包括

[1309] SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包括

[1310] SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包括SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包括SEQ ID NO:70的50-56的

氨基酸序列的轻链

[1311] CDR-L2;和iii)包括SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链

[1312] CDR-L3;或(II)其变体,包括与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)的重链可变区和与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。

[1313] 在一个实施方案中,TMA选自非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)(急性或缓解期)、HUS和TTP。在一个实施方案中,所述受试者处于aHUS的急性期。在一个实施方案中,所述受试者处于aHUS的缓解期。

[1314] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,包括包含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,方法包括给予受试者包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,包括包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1315] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性地识别由参考抗体OMS646识别的人MASP-2上的表位的至少一部分,所述参考抗体包括SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。结合成员之间的竞争可容易地体外测定,例如使用ELISA和/或通过标记特定的报告分子至一个结合成员,其可在存在其它未标记的结合成员的情况下检出,以能够鉴定结合相同表位或重叠表位的特定结合成员。因此,本发明提供包含人抗体抗原-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。

[1316] 实施例43

[1317] 本实施例证实人MASP-2抑制性抗体(OMS646)能够在真皮来源的原代人微血管内皮细胞(MVEC)中抑制TMA患者血浆-介导的细胞凋亡诱导。

[1318] 背景/原理:

[1319] TMA的病理生理学已知涉及由各种因素诱导的内皮细胞损伤,之后是由血小板栓和/或纤维蛋白血栓导致的小血管(例如,小动脉和毛细血管)阻塞(Hirt-Minkowsk P.等, Nephron Clin Pract 114:c219-c235,2010;Goldberg R.J.等,Am J Kidney Dis 56(6):1168-1174,2010)。已经显示当体外暴露于来自TMA-相关病症的患者的血浆时,MVEC经过细胞凋亡损伤(参见Stefanescu等,Blood Vol 112(2):340-349,2008;Mittra D.等,Blood 89:1224-1234,1997)。与TMA有关的细胞凋亡损伤在获自这样的患者的组织活检(皮肤、骨、骨髓、脾、肾、回肠)的MVEC中证明。还显示对MVEC的细胞凋亡损伤降低MVEC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,Immunology 119:522,2006)。

[1320] 包括末端补体组分的正反馈环被认为参与TMA的病理生理学,包括非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)和与灾难性抗磷脂综合征(CAPS)、德戈斯病有关的TMA以及癌症、癌症化学疗法、自身免疫和移植继发性TMA,这些病况的每一种都是已知的,或被认为对用mAb艾库单抗的抗-C5疗法应答(Chapin J.等,Brit.J.Hematol 157:772-774,2012;Tsai等,Br J Haematol 162(4):558-559,2013);Magro C.M.等,Journal of Rare Diseases 8:185,

2013)。

[1321] 进行以下实验以分析在获自患有aHUS、ADAMTS13缺乏-相关的血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、CAPS和系统性德戈斯病以及癌症、移植、自身免疫疾病和化学疗法继发性TMA的患者的血浆样品中,人MASP-2抑制性抗体(OMS646)阻断在原代人真皮MVEC中TMA患者血浆-介导的细胞凋亡诱导的能力。

[1322] 方法:

[1323] 进行体外测定法以分析MASP-2抑制性抗体(OMS646)阻断在真皮来源的原代人MVEC中TMA患者血浆-介导的细胞凋亡诱导的功效,如Stefanescu R.等,Blood Vol 112(2):340-349,2008中所述,其通过引用结合到本文中。用于本测定法的血浆样品获自一批健康对照受试者和获自具有急性期或恢复期血栓性微血管病的个体。在TMA患者中微血管病的存在通过在外周血涂片上检测裂红细胞来评价。另外,TTP按Stefanescu R.等,Blood Vol 112(2):340-349,2008中所述诊断。

[1324] 内皮细胞(EC)培养

[1325] 如Stefanescu等所述,真皮来源的原代人MVEC购自ScienCell Research Labs(San Diego,CA)。MVEC表达CD34直至第5和6代(Blood 89:1224-1234,1997)。在用含0.1%明胶的水包被的聚苯乙烯瓶中,将MVEC维持在包含内皮细胞生长添加剂、青霉素、链霉素和15%胎牛血清的ECM1001培养基(ScienCell Research Labs)中。所有MVEC在第2-6代使用。次代培养包括5-10分钟暴露于0.25%胰蛋白酶-EDTA。

[1326] 细胞凋亡测定法

[1327] 已知对TTP/HUS血浆诱导的细胞凋亡易感的代表性的真皮来源的原代人MVEC用磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤和以 0.15×10^6 个活细胞/mL铺板在用含0.1%明胶的水包被的12-孔板的各室中。将铺板的MVEC细胞在完全培养基中饥饿24小时,然后在存在或不存在MASP-2mAb OMS646(150 μ g/mL)的情况下暴露于各种浓度(2%-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收获细胞。各TMA患者样品一式两份分析。血浆-介导的细胞凋亡程度使用碘化丙啶(PI)染色评价,在细胞荧光图中分析 $>5 \times 10^3$ 个细胞和AO峰通过计算机软件确定(MCycle Av,Phoenix Flow Systems,San Diego,CA)。还根据制造商的说明书(Roche Diagnostics,Mannheim,Germany),进行基于酶联免疫吸附测定法(ELISA)的来自细胞裂解物的胞质组蛋白相关DNA片段的定量测定。

[1328] 结果:

[1329] 在存在MASP-2mAb(OMS646)的情况下,TMA患者血浆诱导的MVEC细胞凋亡测定法的结果显示在下表25中。

[1330] 表25:在存在MASP-2mAb(OMS646)的情况下在真皮来源的原代人MVEC中测试的TMA患者血浆

[1331]

受试者 #	年龄/性别	临床诊断 (TMA) 和其它病况	MASP-2 ng/ml	基于 Cre/LDH 的诊断	C5a	sC5-b9	ADA MS 活性	基于 ADAM S 活性的诊断	用 OMS646 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	非应答者
#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	非应答者
#11	59/f	TTP	144.9	TTP	40.3	1352	<10%	TTP	非应答者
#13	49/f	HUS, 癌症, TTP	142.8	TTP	48.6	3843	86%	aHUS	非应答者
#42	27/m	TTP	341.5	TTP	100.0	5332	<5%	TTP	非应答者
#46	25/f	TTP, 德戈斯病, 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, APLAs, CVA	494.5		35.4	2100	ND	ND	应答者
#51	25/f	aHUS, APLAs	313.1	TTP	26.8	1595	23%	aHUS	应答者
#52	56/f	aHUS, SLE	333.1	TTP	18.9	1103	97%	aHUS	非应答者
#53	56/f	aHUS 缓解	189.9	缓解 TTP	28.69	344	74%	aHUS	非应答者

[1332] 用于表25的缩写:

[1333] “APLAs” = 与灾难性抗磷脂综合征 (CAPS) 有关的抗磷脂抗体

[1334] “SLE” = 系统性红斑狼疮

[1335] “CVA” = 脑血管意外 (中风)

[1336] 与 Stefanescu R. 等, Blood Vol 112(2):340-349, 2008 中报告的结果一致, 在存在 13 份 TMA 患者血浆样品的情况下在缺少 MASP-2 抗体时, 对于真皮来源的原代 MVEC 观察到显著的细胞凋亡。将来自健康人受试者的对照血浆样品平行运行, 在 MVEC 中未诱导细胞凋亡 (数据未显示)。如表 25 中所示, 在 13 份测试的患者血浆样品的 6 份中 (46%), MASP-2 抑制性 mAb (OMS646) 在原代 MVEC 中抑制 TMA 患者血浆-介导的细胞凋亡诱导 (表 25 中的“应答者”)。具体而言, 应注意 MASP-2 抑制性 mAb (OMS646) 在获自患有 aHUS、TTP、德戈斯病、SLE、移植和 APLA (CAPS) 的患者的血浆中抑制细胞凋亡。关于在该测定法中测试的其中 MASP-2mAb 未阻断细胞凋亡的 7 份患者样品 (表 25 中的“非应答者”), 应注意细胞凋亡可通过数个途径诱导, 并非所有的途径是补体依赖性的。例如, 如在 Stefanescu R. 等, Blood Vol 112(2):

340-349, 2008中所述的, 在EC测定法中细胞凋亡依赖于基础EC活化状态, 其受血浆因子的影响, 所述因子可在测定诱导细胞凋亡所需的损伤的水平中起作用。如在Stefanescu R. 等中进一步描述的, 能够调节细胞凋亡的其它因子可能存在于TMA患者血浆中, 例如细胞因子和补体系统的各种组分。因此, 因为这些复杂的因素, 并非出人意料的是, MASP-2抗体未在显示TMA-血浆诱导的细胞凋亡的所有血浆样品中都显示阻断作用。

[1337] 此外在这一点上, 应注意使用TMA-血浆诱导的细胞凋亡测定法用抗-C5抗体艾库组单抗进行了类似分析, 并观察到非常类似的结果 (参见Chapin等, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts): Abstract#3342, 120:2012)。艾库组单抗 (一种高度成功的市售产品) 的临床功效显示大于在该模型中证实的功效, 表明该体外模型可能低估了补体抑制性药物的临床潜力。

[1338] 这些结果证实, MASP-2抑制性抗体例如OMS646在获自患有TMA例如aHUS、TTP、德戈斯病、SLE、移植和APLA (CAPS) 的患者的血浆中有效抑制TMA-血浆-诱导的细胞凋亡。已知内皮损伤和细胞凋亡在TMA例如特发性TTP和散发性HUS的病理中起关键作用 (Kim等, Microvascular Research vol 62(2):83-93, 2001)。如Dang等所述, 在TTP患者而不是在健康对照受试者的脾红髓中显示细胞凋亡 (Dang等, Blood 93(4):1264-1270, 1999)。在HUS患者的MVEC来源的肾小球细胞中观察到细胞凋亡的证据 (Arends M.J. 等, Hum Pathol 20:89, 1989)。因此, 预期给予MASP-2抑制剂例如MASP-2抑制性抗体 (例如, OMS646) 将是患有TMA例如aHUS、TTP或其它微血管病性病症 (例如其它TMA, 包括CAPS、系统性德戈斯病和癌症继发性TMA、化学疗法继发性TMA或移植继发性TMA) 的患者的有效疗法。

[1339] 根据前述内容, 在一个实施方案中, 本发明提供在患有或有风险发生血栓性微血管病 (TMA) 的受试者中抑制内皮细胞损伤和/或内皮细胞凋亡和/或血栓形成的方法, 包括给予受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的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综合征 (aHUS)、血栓性血小板减少性紫癜 (TTP) 和溶血性尿毒综合征 (HUS)。在一个实施方案中, TMA是aHUS。在一个实施方案中, 在疾病的急性期将组合物给予aHUS患者。在一个实施方案中, 在缓解期将组合物给予aHUS患者 (即, 在已从急性期aHUS发作中恢复或部分恢复的受试者中, 这样的缓解通过例如, 血小板计数增加和/或血清LDH浓度降低来证明, 例如描述于Loirat C等, Orphanet Journal of Rare Diseases 6:60, 2011, 其通过引用结合到本文中)。

[1340] 在一个实施方案中, 所述受试者患有或有风险发生TMA, 其为 (i) 癌症继发性TMA; (ii) 化学疗法继发性TMA; 或 (iii) 移植继发性TMA (例如, 器官移植, 例如肾移植或同种异体造血干细胞移植)。在一个实施方案中, 所述受试者患有或有风险发生Upshaw-Schulman综合征 (USS)。在一个实施方案中, 所述受试者患有或有风险发生德戈斯病。在一个实施方案中, 所述受试者患有或有风险发生灾难性抗磷脂综合征 (CAPS)。

[1341] 根据任何本文公开的实施方案, MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征: 所述抗体结合人MASP-2, KD为10nM或更小; 所述抗体结合MASP-2的CCP1结构域中的表位; 在体外测定法中在1%人血清中所述抗体抑制C3b沉积, IC₅₀为10nM或更小; 在90%人血清中所述抗体抑制C3b沉积, IC₅₀为30nM或更小, 其中抗体是选自Fv、Fab、Fab'、F(ab)₂和F(ab')₂的抗体片段, 其中抗体是单链分子, 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IgG4分子包括S228P突变, 和/或其中抗体基本上不抑

制经典途径。在一个实施方案中,抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制替代途径。在一个实施方案中,抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径同时保留经典补体途径完整)。

[1342] 在一个实施方案中,在来自患有TMA例如aHUS(急性或缓解期)、溶血性尿毒综合征(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、癌症继发性TMA、化学疗法继发性TMA、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)继发性TMA的受试者的血清中,或在来自患有Upshaw-Schulman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,或在患有灾难性抗磷脂综合征(CAPS)的受试者中,MASP-2抑制性抗体抑制血浆诱导的MVEC细胞凋亡,其中与未处理的血清相比,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%直至99%。在一些实施方案中,在来自患有TMA(例如aHUS(急性或缓解期)、溶血性尿毒综合征(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、癌症继发性TMA、化学疗法继发性TMA、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)继发性TMA的受试者的血清中,或在来自患有Upshaw-Schulman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,或在患有灾难性抗磷脂综合征(CAPS)的受试者中,MASP-2抑制性抗体以超过对血清中C5b-9沉积的抑制作用至少20%或更大(例如至少30%、至少40%、至少50%)的水平抑制血栓形成。

[1343] 在一个实施方案中,通过静脉内导管或其它导管递送方法将MASP-2抑制性抗体给予所述受试者。

[1344] 在一个实施方案中,本发明提供在患有TMA(例如aHUS(急性或缓解期)、溶血性尿毒综合征(HUS)、血栓性血小板减少性紫癜(TTP)、癌症继发性TMA、化学疗法继发性TMA、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)继发性TMA的受试者中,或在来自患有Upshaw-Schulman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,或在患有灾难性抗磷脂综合征(CAPS)的受试者中抑制血栓形成的方法,包括给予受试者包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,包括(I) (a) 重链可变区,包含:i) 包括SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包括SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包括SEQ ID NO:67的95-102的氨基酸序列的重链CDR-H3;和b) 轻链可变区,包含:i) 包括SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包括SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包括SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3;或(II) 其变体,包括与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)的重链可变区和与

[1345] 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。

[1346] 在一个实施方案中,所述受试者患有TMA,选自癌症继发性TMA、化学疗法继发性TMA、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)继发性TMA、Upshaw-Schulman综合征(USS)、德戈斯病和灾难性抗磷脂综合征(CAPS)。

[1347] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗

原结合片段的组合物,包括包含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,方法包括给予受试者包含一定量的MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,包括包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1348] 在一些实施方案中,方法包括给予受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性地识别由参考抗体OMS646识别的人MASP-2上的表位的至少一部分,所述参考抗体包括SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[1349] 实施例44

[1350] 本实施例描述了在具有血栓性微血管病(TMA)的成人中评价全人单克隆MASP-2抑制性抗体的安全性和临床功效的正进行的2期临床试验的初始结果。

[1351] 背景:TMA是一类罕见的、虚弱性和威胁生命的病症,特征为在身体器官(最常见是肾和脑)的微循环中的过多血栓(凝块)(血小板的聚集)。

[1352] 方法:

[1353] 开放标签的2期临床试验的第一阶段在具有原发性非典型溶血性尿毒综合征(aHUS)、血浆疗法抵抗性aHUS和血栓性血小板减少性紫癜(TTP)的受试者中进行。鉴于该疾病的威胁生命性质,该2期临床试验没有安慰剂组。

[1354] 在筛选时受试者年龄 ≥ 18 岁,和仅在他们具有以下TMA之一的诊断时包括在该研究中:

[1355] 1) 原发性aHUS,其经临床诊断和在血浆中具有ADAMTS13活性 $>10\%$ 。有或没有证明的补体突变或抗-CFH抗体的患者均符合条件。患者根据他们对血浆疗法(血浆交换或血浆输注)的反应分类:

[1356] 血浆疗法抵抗性aHUS患者,为本研究的目的,满足所有以下条件:

[1357] (a) 尽管在筛选之前至少四次血浆疗法治疗,但筛选血小板计数 $<150,000/\mu\text{L}$;

[1358] (b) 微血管病性血细胞溶解的证据(存在裂红细胞,血清乳酸脱氢酶(LDH) $>$ 正常值上限(ULN),结合珠蛋白 $<$ LLN);和

[1359] (c) 血清肌酸酐 $>$ ULN。

[1360] 慢性血浆疗法-反应性aHUS患者(血浆疗法-敏感性)必须需要在第一剂OMS646之前至少每周一次的血浆疗法,持续四周,以及血清肌酸酐 $>$ ULN。

[1361] 2) TTP,定义为具有所有以下条件:

[1362] 血小板计数 $<150,000/\mu\text{L}$;

[1363] 微血管病性血细胞溶解的证据(存在裂红细胞,血清LDH $>$ ULN,或结合珠蛋白 $<$ LLN);和

[1364] 在TTP的当前发作期间或在历史上ADAMTS13活性 $\leq 10\%$ 。

[1365] 注意:如果在筛选前3个月内具有艾库组单抗疗法,则受试者从研究中排除。患者确定为血浆疗法抵抗性的标准是为在本研究中确定资格的目的。在本发明的其它方面,待用MASP-2抑制剂治疗的血浆疗法抵抗性患者之前用血浆疗法治疗至少一次,和在这样的血浆疗法治疗后仍具有通过这样的血浆疗法治疗未充分减少或消除的一种或多种aHUS临床标记。

[1366] 本研究使用的单克隆抗体OMS646是针对人MASP-2的全人IgG4 mAb。如实施例40

所证实的,OMS646紧密结合重组MASP-2(100pM范围的表观平衡解离常数)和显示同源蛋白C1s、C1r和MASP-1的大于5,000倍选择性。在功能测定中,OMS646以纳摩尔效力(大约3nM的浓度,导致50%抑制[IC₅₀])抑制人凝集素途径,但对经典途径没有显著影响。通过静脉内(IV)或皮下(SC)注射给予小鼠、非人灵长类和人的OMS646导致高的血浆浓度,其在离体试验中与凝集素途径活化的抑制有关。如实施例42进一步描述的,OMS646治疗在TMA的体外模型中减少C5b-9沉积和血栓形成,和在TMA的小鼠模型中减少血栓形成,因此证实了OMS646具有治疗功用。

[1367] 在本研究中,OMS646药物以浓度100mg/mL提供,其被进一步稀释用于IV给予。使用注射器将合适计算体积的OMS646 100mg/mL注射溶液从小瓶抽出,用于剂量制备。在制备的四小时内施用输注袋。

[1368] 在研究的阶段1中,OMS646被给予至剂量递增组(3个受试者/组)。阶段1的每个受试者接受四次每周一次剂量的OMS646,如下表26所示。

[1369] 表26:阶段1的给药方案

	阶段, 组	受试者数量	OMS646 剂量(mg/kg)
[1370]	1, 组 1	3	0.675, 每周一次 x 4
	1, 组 2	3	2.0, 每周一次 x 4
	1, 组 3	3	4.0, 每周一次 x 4

[1371] 阶段1研究设计如下:

[1372] 筛选(第-28天)——>剂量#1(第1天)——>剂量#2(第8天)——>剂量#3(第15天)——>剂量#4(第22天)——>随访(4次访问)(第29-78天),其中从剂量#1到剂量#4是治疗期间。

[1373] 稀释的研究药物在30分钟内经静脉内输注。

[1374] 主要终点

[1375] 共-主要终点是:

[1376] ●通过AE、生命体征、ECG和临床实验室检验评价的安全性

[1377] ●通过血小板计数变化评价的临床活性

[1378] 次要终点

[1379] 次要终点是:

[1380] ●TMA临床活性

[1381] ○血清LDH

[1382] ○血清结合珠蛋白

[1383] ○血红蛋白

[1384] ○血清肌酸酐

[1385] ○TMA-相关症状

[1386] ○需要血浆疗法(血浆交换或血浆输注)

[1387] ○需要透析

[1388] 允许的共存疗法

[1389] ●血浆疗法抵抗性aHUS-在OMS646治疗期间血浆疗法是允许的,如果研究者认为它在医学上是有必要的话。

[1390] ●慢性血浆疗法反应性aHUS-研究者被提议,血浆疗法应该继续,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,肌酸酐降低,此时研究者被提议考虑不给于血浆疗法和监测TMA参数以评价血浆疗法是否可以停止。

[1391] ●TTP-血浆疗法是允许的,如果研究者认为它在医学上是有必要的话。

[1392] ●研究者被提议,肾透析疗法应该根据护理标准进行管理。

[1393] ●在研究期间不给予艾库组单抗。

[1394] 结果:

[1395] 第一组受试者由三个用最低剂量的OMS646治疗的aHUS患者组成。在该研究组的所有患者中观察到TMA疾病标记的改进。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动的标记进行测量。当与基线水平比较时,血小板计数在所有患者中改进。血清LDH水平在一个患者中保持正常,在另一个中显著降低至接近正常范围和在第三个中保持升高。结合珠蛋白在两个患者中改进,在一个中正常化。在一个具有独立肾功能的患者中肌酸酐水平也得到改进。

[1396] 按设计的,三个患者在该临床试验的第二个中等剂量组中治疗。两个患者具有血浆疗法抵抗性aHUS和一个患者具有血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。具有aHUS的两个患者在研究招募之前和之时进行肾透析。在第二个或中等剂量组中,具有血浆疗法抵抗性aHUS的两个患者证实:

[1397] ●平均血小板计数增加47%,导致两个患者具有正常范围的计数

[1398] ●平均裂红细胞计数降低86%,其中裂红细胞在一个患者中消失

[1399] ●平均结合珠蛋白增加71%,其中两个患者在治疗期间达到正常范围,一个患者在最后剂量后一周略微下滑至低于正常值

[1400] ●平均LDH水平降低5%,其中在两个患者中水平保持略微升高至高于正常范围。

[1401] 具有TTP的中等剂量组患者在进入研究之前需要重复血浆输注疗法。实验室参数未显示一致的改进,但该患者在用OMS646治疗时不需要血浆疗法,从完成治疗至今也不需要血浆疗法。

[1402] 在整个治疗期间,该药物被所有患者良好耐受。基于来自第二个或中等剂量组的正面数据,第三个或高剂量组开始,和aHUS患者已完成了研究治疗过程。所有患者参考的数据包括至最后剂量后一周的测量。

[1403] 第三个(高剂量)组中的第一个患者(血浆疗法抵抗性aHUS患者,具有另外的并发症,包括丙型肝炎、冷球蛋白血症和淋巴瘤)也已完成用OMS646治疗。在OMS646治疗之前,该患者需要重复透析。在整个治疗中和在完成OMS646疗程后至今,该患者已保持不进行透析。血液学和肾参数显示:

[1404] ●血小板计数改进63%,回到正常水平

[1405] ●裂红细胞降低100%

[1406] ●结合珠蛋白从不可检测的水平增加和正常化

[1407] ●LDH降低43%,导致刚刚略微高于正常值的水平

[1408] ●肌酸酐水平降低24%

[1409] 如在第一个和第二个组中,该药物被良好耐受。

[1410] 在此开放标签的2期临床试验中主要终点是血小板计数的变化。中等剂量和高剂

量组的所有三个aHUS患者(中等剂量组中的两个和高剂量组中的一个)的血小板计数回到正常值,具有从基线大约68,000个血小板/mL的统计学显著的平均增加($p=0.0055$)。

[1411] 简言之,到目前为止从该2期临床试验获得的数据表明OMS646在具有原发性aHUS、血浆疗法抵抗性aHUS的患者中和在具有TTP的患者中的功效。

[1412] 根据前述内容,在一个实施方案中,本发明提供治疗患有血浆疗法抵抗性aHUS的受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在给予所述受试者包含MASP-2抑制性抗体的组合物之前,鉴定患有血浆疗法抵抗性aHUS的受试者的步骤。

[1413] 根据任何本文公开的实施方案,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体以10nM或更小的KD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1%人血清中以10nM或更小的IC50抑制C3b沉积,所述抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC50抑制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IgG4分子包含S228P突变。在一个实施方案中,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时保留经典补体途径完整)。

[1414] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以有效改进与aHUS有关的至少一个或多个临床参数(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/或肌酸酐降低)的量给予。

[1415] 在一些实施方案中,所述方法包括通过导管(例如,静脉内)给予MASP-2抑制性抗体至患有血浆疗法抵抗性aHUS的受试者,持续第一段时间(例如,至少一天至一周或两周),接着皮下给予MASP-2抑制性抗体至所述受试者,持续第二段时间(例如,至少两周或更长的慢性阶段)。在一些实施方案中,在第一段时间和/或第二段时间的给予在不存在血浆疗法时发生。在一些实施方案中,在第一段时间和/或第二段时间的给予在存在血浆疗法时发生。

[1416] 在一些实施方案中,所述方法包括经静脉内、肌内或优选地皮下,给予MASP-2抑制性抗体至患有血浆疗法抵抗性aHUS的受试者。治疗可以是慢性的,和每日至每月给予,但优选每两周给予。MASP-2抑制性抗体可单独给予,或与C5抑制剂、例如艾库组单抗组合给予。

[1417] 在一个实施方案中,所述方法包括治疗患有血浆疗法抵抗性aHUS的受试者,包括给予所述受试者包含一定量的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) 重链可变区,其包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3,和b) 轻链可变区,其包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其变体,包含与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)的重链可变区和与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。

[1418] 在一些实施方案中,所述方法包括给予所述受试者包含一定量的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包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1419] 在一些实施方案中,所述方法包括给予所述受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性识别在人MASP-2上由参考抗体OMS646识别的表位的至少一部分,参考抗体OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[1420] 实施例45

[1421] 本实施例描述了在具有血栓性微血管病(TMA)的成人中评价全人单克隆MASP-2抑制性抗体的安全性和临床功效的正进行的2期临床试验(如实施例44描述的)中获得的另外的结果。

[1422] 背景:如实施例44所述,TMA是一类罕见的、虚弱性和威胁生命的病症,特征为在身体器官(最常见是肾和脑)的微循环中的过多血栓(凝块)(血小板的聚集)。如本文所述的,移植相关的TMA(TA-TMA)是一种破坏性综合征,其可在移植患者、例如造血干细胞移植(HSCT)受体中发生。本实施例描述了在患有造血干细胞移植相关的TMA的患者中评价全人单克隆MASP-2抑制性抗体的安全性和临床功效的2期临床试验的初始结果。

[1423] 方法:

[1424] 如实施例44所述,2期TMA试验由MASP-2抑制性抗体OMS646的三个水平的剂量范围阶段,接着固定剂量阶段组成。如实施例44进一步描述的,从aHUS患者和一个TTP患者获得了正面结果,具有功效度量的一致和稳健改进。如在低剂量组中,在整个治疗期间在中等剂量和高剂量组中OMS646被所有患者良好耐受。临床前毒性研究已经完成,和证实了没有安全性顾虑,允许在临床试验中慢性给药。

[1425] 如实施例44所述,来自OMS6462期TMA临床试验的数据从aHUS和TTP患者获得。使用实施例44描述的方法,对于高剂量组的另外的造血干细胞移植相关TMA患者,给药现已完成。这是具有淋巴瘤史的患者,为此他经历了造血干细胞移植。他的移植后过程因为许多威胁生命的病症,包括需要输注血小板的TMA而变得复杂。尽管输血,但他的干细胞移植相关TMA持续,和他被招募至OMS6462期试验。

[1426] 结果:

[1427] 如实施例44所述,在四周给药期之后(高剂量组),具有干细胞移植相关TMA的患者证实:

[1428] ●血小板计数4倍,导致血小板计数超过100,000;

[1429] ●结合珠蛋白水平超过2倍,并且为正常值;

[1430] ●血浆乳酸脱氢酶水平(血管内损伤的度量)降低35%,但仍高于正常值;

[1431] ●裂红细胞计数保持在仅1个。

[1432] 在整个OMS646给药期间和从完成OMS646治疗以来,该患者不需要任何血小板输注或血浆去除术。

[1433] 简言之,到目前为止从该2期临床试验获得的数据(如实施例44和本实施例所述)显示OMS646在具有原发性aHUS、血浆疗法抵抗性aHUS、TTP的患者中和在具有造血干细胞移

植相关TMA的患者中的功效。

[1434] 根据前述内容,在一个实施方案中,本发明提供治疗患有与造血干细胞移植相关的TMA的人受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,所述受试者正患有与造血干细胞移植相关的TMA,其抵抗用血小板输注和/或血浆去除术治疗。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的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,其抵抗用血小板输注和/或血浆去除术治疗。

[1435] 根据任何本文公开的实施方案,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体以10nM或更小的KD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1%人血清中以10nM或更小的IC50抑制C3b沉积,所述抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC50抑制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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时保留经典补体途径完整)。

[1436] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以的量给予有效改进与造血干细胞移植相关TMA有关的至少一个或多个临床参数,例如血小板计数增加(例如,治疗之前的血小板计数的至少2倍、至少3倍、至少4倍)、结合珠蛋白增加和/或乳酸脱氢酶降低。

[1437] 在一些实施方案中,所述方法包括通过导管(例如,静脉内)给予MASP-2抑制性抗体至患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者,持续第一段时间(例如,至少一天至一周或两周),接着皮下给予MASP-2抑制性抗体至所述受试者,持续第二段时间(例如,至少两周或更长的慢性阶段)。在一些实施方案中,在第一段时间和/或第二段时间的给予在不存在血浆疗法时发生。在一些实施方案中,在第一段时间和/或第二段时间的给予在存在血浆疗法时发生。

[1438] 在一些实施方案中,所述方法包括经静脉内、肌内或优选地皮下,给予MASP-2抑制性抗体至患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者。治疗可以是慢性的,和每日至每月给予,但优选每两周给予。MASP-2抑制性抗体可单独给予,或与C5抑制剂、例如艾库组单抗组合给予。

[1439] 在一个实施方案中,所述方法包括治疗患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者,包括给予所述受试者包含一定量的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) 重链可变区,其包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3,和b) 轻链可变区,其包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II) 其变体,包含与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)的重链可变区和与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。

[1440] 在一些实施方案中,所述方法包括给予所述受试者包含一定量的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包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1441] 在一些实施方案中,所述方法包括给予所述受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性识别在人MASP-2上由参考抗体OMS646识别的表位的至少一部分,参考抗体OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[1442] 实施例46

[1443] 本实施例描述了在实施例44和45描述的在具有血栓性微血管病(TMA)的成人中评价全人单克隆MASP-2抑制性抗体的安全性和临床功效的正进行的2期临床试验中获得的另外的结果。

[1444] 背景:如实施例45所述,移植相关的TMA(TA-TMA)是一种破坏性综合征,其可在移植患者、例如造血干细胞移植(HSCT)受体中发生。造血干细胞移植相关的TMA(HSCT-TMA)是一种威胁生命并发症,其由内皮损伤触发。尽管HSCT-TMA可以为一种还涉及肺、肠、心脏和脑的多系统疾病,但肾是最通常受到影响的器官。甚至轻度TMA的发生也与长期肾损伤有关。根据各种诊断标准和调节以及移植物抗宿主病预防方案,同种异体HSCT后相关的TMA的发生在频率方面不同,其中钙依赖磷酸酶抑制剂是涉及的最常用的药物(Ho VT等,Biol Blood Marrow Transplant,11(8):571-5,2005)。免疫抑制性钙依赖磷酸酶抑制剂方案的更改可导致在减少或停止钙依赖磷酸酶抑制剂给予的几周内,在一些患者中TMA改善。

[1445] TMA是一种潜在威胁生命的HSCT并发症和目前主要通过改善刺激因素包括避免免疫抑制剂(例如,钙依赖磷酸酶抑制剂)和治疗正进行的感染,以及支持措施例如血液透析来控制。尽管许多HSCT-TMA患者对减少或停止免疫抑制剂的反应良好,但一部分患者具有持续性HSCT-TMA,尽管保守治疗措施(即,TMA对减少或停止免疫抑制剂无反应)。对这些保守治疗措施无反应的患者具有差的预后。血浆交换未显示功效,和没有其它疗法被批准。

[1446] 实施例45描述了在患有持续性造血干细胞移植相关的TMA(HSCT-TMA)的患者中评价全人单克隆MASP-2抑制性抗体(OMS646)的安全性和临床功效的2期临床试验的初始正面结果。本实施例描述了在患有抵抗保守治疗措施的持续性HSCT-TMA的三个另外的受试者中评价OMS646的安全性和临床功效的正进行的2期临床试验的另外的结果。

[1447] 方法:

[1448] 如实施例44所述,2期TMA试验由MASP-2抑制性抗体OMS646的三个水平的剂量范围阶段,接着固定剂量阶段组成。在整个治疗期间OMS646被低、中和高剂量组的所有患者良好耐受。临床前毒性研究已完成,和证实了没有安全性顾虑,允许在临床试验中慢性给药。

[1449] 2期TMA试验包括患有抵抗保守治疗措施的持续性HSCT相关的TMA的受试者,其为该研究的目的被定义为在减少或停止免疫抑制剂(例如,钙依赖磷酸酶抑制剂治疗)后至少两周或移植后至少30天,具有以下所有条件:

[1450] -血小板减少(血小板计数 $<150,000/\mu\text{L}$);和

[1451] -微血管病性溶血性贫血的证据(存在裂红细胞,血清乳酸脱氢酶(LDH) $>$ 正常值上

限 (ULN), 或结合珠蛋白 < 正常值下限 (LLN))。

[1452] 对 HSCT 相关 TMA 允许的共存疗法

[1453] ● 在 OMS646 治疗期间血浆疗法是允许的, 如果研究者认为它在医学上是有必要的话。给予血浆疗法的患者可接受额外半剂量的 OMS646。

[1454] ● 研究者被提议, 肾透析疗法应该根据护理标准进行管理。

[1455] ● 在研究期间不给予艾库组单抗。

[1456] 正进行的 TMA 研究包括患有抵抗标准治疗措施的持续性 HSCT-TMA (即, 减少或停止钙依赖磷酸酶抑制剂治疗后至少两周的持续性 TMA) 的受试者。

[1457] 如实施例 45 所述, 对于高剂量组 (一周一次 IV 给予 4mg/kg OMS646, 持续四周) 的患有持续性 HSCT-TMA 的患者 (患者 #1), 使用实施例 44 描述的方法完成给药。

[1458] 如下文所述的, 对于患有持续性 HSCT-TMA 的另外 4 个患者, 给药现在已经完成。

[1459] 患者 #1 (描述于实施例 44) 用 OMS646 治疗四周 (4mg/kg IV, 每周一次);

[1460] 患者 #2 和 #3 用 OMS646 治疗八周 (4mg/kg IV, 每周一次);

[1461] 患者 #4 和 #5 用 OMS646 治疗 (4mg/kg IV, 每周一次), 分别持续两周和三周。分别在两周和三周后从研究中退出的患者 #4 和 #5, 对治疗无反应并且恶化。注意这些患者之一在研究允许进入时具有显著升高的肌酸酐。

[1462] 结果:

[1463] 具有持续性 HSCT-TMA 的 5 个患者被招募至本研究。所有受试者都是成人, 和对于血液学恶性肿瘤接受 HSCT。图 58、59 和 60 提供了在用 MASP-2 抑制性抗体 OMS646 治疗后 TMA 变量从基线的变化。这些图提供了所有 5 个患者的数据, 其中两个患者在 2-3 周后停止研究, 其中一个随后复发和另一个接受姑息护理。如图 58、59 和 60 所示的, 最后可能的治疗在第 7 周给予。

[1464] 图 58 图示说明了在用 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的血栓性微血管病 (HSCT-TMA) 的受试者中, 随时间 (周) 血小板计数从基线的平均变化。

[1465] 图 59 图示说明了在用 MASP-2 抑制性抗体 (OMS646) 治疗后, 在患有持续性 (HSCT-TMA) 的受试者中随时间 (周) LDH 从基线的平均变化。

[1466] 图 60 图示说明了在用 MASP-2 抑制性抗体 (OMS646) 治疗后, 在患有持续性 (HSCT-TMA) 的受试者中随时间 (周) 结合珠蛋白从基线的平均变化。

[1467] 如图 59 和 60 所示, 在治疗期间观察到统计学显著的 LDH 和结合珠蛋白改进。如图 58 所示, 血小板计数改进, 但在该小数量的患者中未达到统计学显著性。在完成治疗的这些患者中, 一个患者未显示肌酸酐的改进, 但正接受共存的肾毒性剂。在其他两个患者中肌酸酐改进或保持正常。在延长的随访中, 一个患者经历移植失败, 和正等待第二次移植。其他两个患者保持稳定。

[1468] 尽管在两个受试者中与骨髓抑制和肾毒性有关的药物的可能混淆的效果, 但在患有持续性 HSCT-TMA 的三个受试者中 (其中之一描述于实施例 45) 观察到 OMS646 的有益的治疗效果, 并在下文进一步描述。特别地, 在三个响应者的每个中的治疗效果在用 OMS646 治疗大约三周后开始见到。

[1469] 患者 #1 (治疗 4 周, 如实施例 45 所述): 简言之, 血小板计数 4 倍, 导致超过 100,000/ μ

L的血小板计数;结合珠蛋白水平超过2倍,和是正常值;血浆乳酸脱氢酶水平降低35%,但仍高于正常值;和裂红细胞计数保持仅1个。

[1470] 患者#2(治疗8周):血小板计数对治疗无反应,尽管患者还患有用伐更昔洛韦共存治疗继发的骨髓抑制和随后移植失败;血浆乳酸脱氢酶水平从712U/L降低至低至256U/L;结合珠蛋白水平从不可检测的水平增加至高达250mg/dL。

[1471] 患者#3(治疗8周):血小板计数从13,500/ μ L增加至133,000/ μ L;血浆乳酸脱氢酶水平从537降低至225U/L,结合珠蛋白水平从不可检测的水平增加至高达181mg/dL。

[1472] 结果概述:

[1473] 对于完成用OMS646给药的患有持续性HSCT相关TMA的三个患者,数据证实强和一致的药效信号。在治疗期间观察到LDH和结合珠蛋白的统计学显著的改进。血小板计数改进,但在该小数量的患者中未达到统计学显著性。在完成治疗的三个患者中,一个患者未显示肌酸酐改进,但正接受共存的肾毒性剂。在其他两个患者中肌酸酐改进或保持正常。

[1474] 结论:

[1475] 在对保守治疗措施无反应的患有持续性HSCT-TMA的患者中,OMS646改进TMA标记。用OMS646治疗的HSCT-TMA患者代表了最难以治疗的一些患者,从而证实在高风险持续性HSCT-TMA的患者中(尽管保守治疗措施)OMS646的治疗效果的临床证据。

[1476] 根据前述内容,在一个实施方案中,本发明提供治疗患有与造血干细胞移植相关的TMA的人受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,所述受试者正患有与造血干细胞移植有关的持续性TMA,其抵抗保守治疗措施。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物的步骤之前,鉴定患有抵抗保守治疗措施的与造血干细胞移植有关的持续性TMA的人受试者。

[1477] 根据任何本文公开的实施方案,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体以10nM或更小的KD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1%人血清中以10nM或更小的IC50抑制C3b沉积,所述抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC50抑制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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时保留经典补体途径完整)。

[1478] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以的量给予有效改进与造血干细胞移植相关TMA有关的至少一个或多个临床参数,例如血小板计数增加(例如,治疗之前的血小板计数的至少2倍、至少3倍、至少4倍)、结合珠蛋白增加和/或乳酸脱氢酶降低。

[1479] 在一些实施方案中,所述方法包括通过导管(例如,静脉内)给予MASP-2抑制性抗体至患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者,持续第一段时间(例如,至少一天至一周或两周或三周或四周或更长),接着皮下给予MASP-2抑制性抗体至所述受试者,持续第二段时间(例如,至少两周或更长的慢性阶段)。在一些实施方案中,在第一段时间和/或第二段时间的给予在不存在血浆疗法时发生。在一些实施方案中,在第一段时间和/或第二段时间的给予在存在血浆疗法时发生。

[1480] 在一些实施方案中,所述方法包括经静脉内、肌内或皮下,给予MASP-2抑制性抗体至患有与造血干细胞移植相关的TMA的受试者。治疗可以是慢性的,和每日至每月给予,但优选至少每两周或至少一周一次、例如一周两次或一周三次给予。MASP-2抑制性抗体可单独给予,或与C5抑制剂、例如艾库组单抗组合给予。

[1481] 在一个实施方案中,所述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,包括给予所述受试者包含一定量的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,其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3和轻链可变区,其包含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)重链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii)包含SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3,和b)轻链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II)其变体,包含与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)的重链可变区和与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,所述方法包括给予所述受试者包含一定量的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包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含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,所述方法包括给予所述受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性识别在人MASP-2上由参考抗体OMS646识别的表位的至少一部分,参考抗体OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[1484] 在一些实施方案中,所述方法包括给予患有或有风险发生与HSCT有关的TMA的受试者,包括患有抵抗保守治疗措施的与造血干细胞移植有关的持续性TMA的受试者,包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,剂量为1mg/kg-10mg/kg(即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),至少每周一次(例如至少每周两次或至少每周三次),持续至少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周的时间。

[1485] 实施例47

[1486] 本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。

[1487] 背景:移植物抗宿主病是一种造血干细胞移植(HSCT)的常见并发症。急性和慢性形式二者均存在,和由识别受体患者为外来组织的供体免疫细胞产生。这触发了针对受体患者的免疫反应。急性GvHD在多达50%或更多的接受同种异体移植的患者中发生。急性GvHD最常见靶向皮肤、胃肠道和肝脏,但也可影响肾、眼、肺和血细胞。慢性GvHD在大约40%

在接受同种异体移植的患者中发生,和最常见影响皮肤、肝脏、眼、胃肠道和肺。急性和慢性 GvHD 二者均涉及明显的发病率和死亡率。

[1488] 方法和结果

[1489] 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 岁男性经历用环磷酰胺和全身辐射方案 (TBI-Cy) 的完全骨髓消融调节以及来自不相关的 35 岁 9/10 HLA 相容性 (在基因座 A 的抗原错配) 女性供体的外周血干细胞 (PBSC) 同种异体 HSCT 移植。移植物抗宿主病 (GVHD) 的预防基于抗胸腺细胞球蛋白 (ATG, 5mg/kg) (在调节期间)、环孢菌素 A (CSA) 和甲氨蝶呤的短期疗程 (即, 在第 +1、+3、+6 天的甲氨蝶呤 (由于低 CD34+ 而降低剂量))。他实现稳健的血液学重建 (移植物移入: 在第 +15 天 WBC > 1000/mm³, 嗜中性粒细胞 > 500/mm³; 在第 +18 天血小板 > 20000/mm³, 在第 +21 天 50000/mm³)。在第 +30、+60、+90、+180、+354 天以完全供体 (骨髓和外周血, CD3+ 和 CD3- 部分) 观察到嵌合现象。在第 +30、+60、+90、+180 天, 完全缓解得到证实 (免疫表型, 分子 MRD)。

[1490] 在移植后第 +35 天, 他发生胃肠 (GI) GVHD (表现为呕吐、食欲缺乏、腹泻、腹痛; 结肠检查: 弥漫性糜烂; 组织学: 弥漫性粘膜溃疡、固有层中淋巴粒细胞性炎症、腺和隐窝变形、凋亡小体), 和被诊断为急性 GvHD, 阶段 4 (肠), 总体等级 4 以及巨细胞病毒 (CMV) 结肠炎 (通过对肠活检的阳性免疫组织化学和实时 PCR; 全身 CMV 再活化 (在外周血中 2614 UI/mL) 确定)。两种病况用甲泼尼龙 (1mg/Kg)、膦甲酸和更昔洛韦同时治疗, 其中反应良好和类固醇逐渐缩减至停止。

[1491] 在移植后第 +121 天, 他经历类固醇难治性 GI GVHD 的复发 (表现为呕吐、食欲缺乏、腹泻、腹痛; 组织学发现 (胃和十二指肠)), 和被诊断为晚期发作性急性 GI GVHD 阶段 4 (肠), 总体等级 4, 其根据登记的临床研究 (ClinicalTrials.gov Identifier NCT02032446) 通过继续 CSA 以及序贯给予喷司他丁和间质干细胞治疗, 其中反应良好。

[1492] 在移植后第 +210 天, 患者表现为体重减轻、显著虚弱、全身肌肉萎缩、四肢软弱、深部腱反射降低、双侧腓肠感觉异常、神经源性膀胱和在不存在排尿刺激时的尿失禁。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、感觉运动和植物神经功能不全性多神经病的图片。神经放射学表明正常的 MRI (脑和脊柱) 和脑脊液是正常的。T-ALL 的复发、感染、血管损伤、营养缺乏、脱髓鞘病症和后部可逆脑病综合征 (PRES) 被排除。给予高剂量免疫球蛋白没有益处。还证明了共存的血小板减少 ($6 \times 10^9/L$) 以及没有肾损伤的大血管病变性溶血性贫血 (6.7g/dL)、网状细胞增多 ($335 \times 10^9/L$)、LDH 增加 (1635 U/L) 和不可检测的结合珠蛋白的特征。直接抗球蛋白检测是阴性的。在外周血涂片中 (2-3/视野 50x) 观察到裂红细胞, 以及不存在抗-B ab (主要不相容性患者/供体)、正常 ADAMTS13 活性、不存在抗-ADAMTS13 Ab、正常凝固测试和具有正常肌酐值的蛋白尿。他还在内窥镜检查中表现黑粪为证明的结肠性溃疡; 组织病理学研究显示粘膜水肿、纤维化、扩张的小血管以及管腔内纤维蛋白沉积、腺萎缩和凋亡小体, 没有微生物学发现。因此, 尽管有证据表明持续性 GI GVHD, 但临床和组织病理学图片也与结肠的移植相关的血栓性微血管病的诊断一致。因为复发的 GI GVHD, CSA 逐渐减少, 但不停止 (谷水平 100-150ng/mL), 没有获得临床或血液学变化。

[1493] 在移植后第 +263 天, 该患者被招募至上文实施例 45 和 46 中描述的临床试验, 所述临床试验涉及用 OMS646 (抑制补体活化的凝集素途径的 MASP-2 抑制性抗体) 治疗。如图 61 所

示,在前两次每周剂量的药物后,观察到临床和实验室反应,其中黑粪和溶血消退以及血小板计数升高。在4个剂量后,令人感兴趣的是,还证明了显著的神经学改进,具有感觉运动缺乏的临床和电生理学改进。在8个剂量的OMS646后,尽管CSA逐渐减少,但GvHD反应得到保持,未观察到毒性。到移植后第+354天,该患者证实进一步的神经学改进和排尿缺乏开始恢复。该患者实现的快速临床益处提示,给予OMS646导致的补体介导的内皮损伤的有效抑制可特别有效地用于治疗GVHD相关的TMA。

[1494] 简言之,本实施例描述了移植后具有共存在的HSCT-TMA和GvHD的HSCT患者的病例报告,二者在用MASP-2抑制性抗体(OMS646)治疗后被消除。用OMS646治疗前,患者具有困难的移植后过程,其被类固醇难治性GvHD、巨细胞病毒感染和HSCT-TMA的多种发作复杂化。在两次在前的GvHD发作后,患者表现为血性腹泻。肠活检证实了HSCT-TMA和GvHD二者。未鉴定出感染。特别地,患者还具有感觉异常、四肢麻痹和神经源性膀胱的新发作的神经学症状,它们已被报道为GvHD和TMA的神经学表现。患者由于四肢麻痹不能行走和需要至少每日一次输血。血液学标记证实具有血小板减少、乳糖脱氢酶(LDH)增加和裂红细胞的HSCT-TMA。患者进入临床试验和开始接受OMS646。他的免疫抑制(环孢菌素)在初期2周被降低,和根据其类固醇难治性GvHD的历史,他仅接受低剂量皮质类固醇。他不接受其它GvHD治疗。在2个OMS646剂量后,他的血性腹泻消除和他的血液学标记改善。在4个OMS646剂量后,他能够行走。他完成8周的OMS646治疗,和在家表现良好。HSCT-TMA和GvHD的所有迹象和症状已经消除。他的神经学症状继续改进。OMS646治疗之前,该患者正在恶化,和有早期死亡的高风险。用OMS646治疗后,观察到GvHD、HSCT-TMA和神经学症状改善,和患者在家表现良好。

[1495] 根据前述内容,在一个实施方案中,本发明提供治疗患有或有风险发生移植物抗宿主病(GVHD)的人受试者的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物,从而治疗GVHD或降低GVHD的发生风险,或降低与GVHD有关的一个或多个症状的严重性。在一个实施方案中,GVHD是活性的急性GVHD。在一个实施方案中,GVHD是慢性GVHD。在一个实施方案中,GVHD是类固醇抵抗性的(即,尽管类固醇治疗但仍持续)。在一个实施方案中,GVHD是胃肠(GI)

[1496] GVHD。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在用MASP-2抑制性抗体治疗之前,确定在受试者中存在GVHD的步骤。

[1497] 在一个实施方案中,所述受试者正患有,或有风险发生与造血干细胞移植有关的GVHD。在一个实施方案中,所述受试者正患有,或有风险发生与造血干细胞移植相关的TMA相关的GVHD。在一个实施方案中,所述受试者正患有白血病,例如T细胞急性成淋巴细胞性白血病。

[1498] 在一个实施方案中,所述受试者正患有与GvHD和/或TMA有关的一种或多种神经学症状,例如虚弱、感觉异常、四肢麻痹、感觉运动缺乏、植物神经功能不全性多神经病和/或神经源性膀胱,和MASP-2抑制性抗体以足以改善一种或多种神经学症状的量和时间给予。

[1499] 根据任何本文公开的实施方案,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体以10nM或更小的KD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1%人血清中以10nM或更小的IC50抑制C3b沉积,所述抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC50抑制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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时保留经典补体途径完整)。

[1500] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以有效改进与GVHD有关的至少一个或多个临床参数的量给予。

[1501] 在一些实施方案中,所述方法包括经静脉内、肌内或皮下,给予MASP-2抑制性抗体至患有与造血干细胞移植相关的GVHD的受试者。治疗可以是慢性的,和每日至每月给予,但优选至少每两周或至少一周一次、例如一周两次或一周三次给予。MASP-2抑制性抗体可单独给予,或与C5抑制剂、例如艾库组单抗组合给予。

[1502] 在一个实施方案中,所述方法包括治疗患有与造血干细胞移植相关的GVHD的受试者,包括给予所述受试者包含一定量的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,其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3和轻链可变区,其包含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)重链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii)包含SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3,和b)轻链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II)其变体,包含与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)的重链可变区和与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。

[1503] 在一些实施方案中,所述方法包括给予所述受试者包含一定量的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包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1504] 在一些实施方案中,所述方法包括给予所述受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性识别在人MASP-2上由参考抗体OMS646识别的表位的至少一部分,参考抗体OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[1505] 在一些实施方案中,所述方法包括给予患有或有风险发生GVHD的受试者,例如将经历、正经历或已经历HSCT的受试者,包括患有GVHD相关的TMA的受试者,包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,剂量为1mg/kg-10mg/kg(即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),至少每周一次(例如至少每周两次或至少每周三次),持续至少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周的时间。

[1506] 实施例48

[1507] 本实施例描述了证实在造血干细胞移植后用MASP-2抑制性抗体OMS646有效治疗

TMA和弥漫性肺泡出血(DAH)的病例研究。

[1508] 背景:造血干细胞移植(HSCT)诱导显著的内皮损伤,其促进严重的HSCT后并发症,例如血栓性微血管病(TMA)、移植物抗宿主病(GvHD)、弥漫性肺泡出血(DAH)和静脉闭塞性病(VOD)。(参见E.Carreras和M.Diaz-Ricart,Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502,2011;Akil等,Biol Blood Marrow Transplant 21:1739-1745,2015;和Vion等,Semin Thromb Hemost 41(06):629-643,2015,其各自通过引用结合到本文中)。

[1509] 弥漫性肺泡出血(DAH)是可在造血干细胞移植(HSCT)受体中发生的综合征。在HSCT受体中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 vol 46:1495-1502,2011,通过引用结合到本文中)。DAH的怀疑发病机制是隐性感感染以及HSCT调节加上移入的嗜中性粒细胞导致的肺毛细管内皮损伤,允许红细胞泄露至肺泡(E.Carreras和M.Diaz-Ricart,Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502,2011)。静脉闭塞性病(VOD),亦称为窦状隙闭塞综合征(SOS),是可在造血干细胞移植(HSCT)患者中发生的另一种综合征。VOD的临床表现包括由于液体滞留导致的显著体重增加、肝脏大小增加和血液中胆红素水平升高(参见E.Carreras和M.Diaz-Ricart,Bone Marrow Transplant vol 46:1495-1502,2011,通过引用结合到本文中)。

[1510] 方法和结果:

[1511] 人口统计学和过去的医学史

[1512] 在治疗开始时患者为14岁白人女性,在本实施例中称为“同情使用患者#1”。该患者具有先天性再生障碍性贫血和空蝶鞍综合征的历史。

[1513] 患者结果

[1514] 患者在第877天是存活的。

[1515] 需要移植的疾病

[1516] 该患者具有先天性再生障碍性贫血的历史。她从婴儿期以来每3周需要RBC输注,和之前发生铁超负荷。

[1517] 移植

[1518] 在2015年9月该患者经历她的干细胞移植。她接受来自9/10匹配的不相关供体的PBSC移植。到大约第35天发生嗜中性粒细胞移入。到第184天未实现血小板移入。她需要血小板和RBC输注超过1年。

[1519] 移植后并发症

[1520] 该患者具有复杂的移植后过程。在出院后不久,她在第67天因为呼吸急促和推定的肺炎重新入院。她在第162天出院。她在第167天重新入院,其中用阿昔洛韦治疗水痘带状疱疹再活化和用皮质类固醇治疗多浆膜炎。她具有持续性血小板减少和贫血、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TMA的诊断。免疫抑制被改变为MMF和泼尼松。她还经历HHV6和EBV再活化。她在第197天出院。

[1521] 在第229天,她因为持续性TMA和严重呼吸性窘迫再次入院。她被诊断为弥漫性肺泡出血,其用CPAP和皮质类固醇治疗。在第231天,她具有胸膜和心包积液,以及氧合恶化。她的血压增加。她需要ACE抑制剂、钙通道阻滞剂、 β -阻滞剂、利尿剂和硝酸甘油用于BP控制。她经历癫痫发作和加入可乐定。脑MRI显示脑中的铁与来自她的RBC输注历史的继发性血色素沉着病一致。血液透析在第231天开始。在第259天,由于持续的肾功能不全和肺状态

恶化,她开始艾库组单抗治疗。她的TMA改善,但她发生急性肺水肿和艾库组单抗被中断。她的TMA恶化和在第269、276和278天她经历血浆交换,没有改善。她用去纤苷治疗,其由于凝血紊乱而中断和没有TMA改善。在大约第320天开始,她再次接受较低剂量的艾库组单抗。艾库组单抗再次由于肺水肿而停止。TMA持续。她还发生了艰难梭菌 (*C.difficile*) 感染。在第379天她出院,接受了泼尼松、MMF、伏立康唑、复方增效磺胺 (cotrimazole)、氨氯地平、红细胞生成素、熊去氧胆酸和奥美拉唑。

[1522] 她在第380天因为发热、寒战和呼吸困难再次入院。她具有肺炎克雷伯氏菌 (*K.pneumoniae*) 肺炎和屎场球菌 (*E.faecium*) 脓毒症。她的MMF停止。她用塔唑西林、美罗培南和万古霉素治疗。因为持续性菌血症,她的中心线改变,和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,需要每周3次血液透析和每日输注血小板。肺水肿诊断为弥漫性肺泡出血 (用皮质类固醇治疗,没有反应)。在第404天,在同情使用方案下OMS646治疗开始。如本文所述,OMS646是抑制补体活化的凝集素途径的MASP-2抑制性抗体。

[1523] 她每周三次用4mg/kg OMS646的剂量治疗。她的氧中断,和她的皮质类固醇剂量降低。她的实验室TMA标记改进。她在第414天出院。

[1524] 她作为门诊患者继续OMS646治疗,每周三次,和在第416天她的血液透析降低至每周一次。她的抗高血压药物也减少至仅氨氯地平、可乐定和呋塞米。在第423天她能够停止血液透析和在第428天她的OMS646降低至每周两次,她的皮质类固醇和呋塞米剂量减少。在这期间她的血小板输注显著减少。

[1525] 她继续表现良好,直到第486天,此时她发生RSV感染。她的肌酸酐和LDH增加,和她的血小板计数和结合珠蛋白降低。她被诊断为复发性TMA,和OMS646治疗增加至每周三次。她的TMA因为OMS646治疗增加而消除。

[1526] 她保持无血液透析,和她的最后一次血小板输注发生在大约第630天。她目前表现良好,和接受用OMS646、去铁胺、左旋甲状腺素、司维拉姆、安美汀、左乙拉西坦、别嘌醇、氨氯地平、萘比洛尔、可乐定和红细胞生成素的治疗。对于血色素沉着病,她正接受静脉切开术。

[1527] TMA发作

[1528] 该患者具有一个持续和/或复发TMA的困难过程。她的过程与多器官TMA一致,和她具有弥漫性肺泡出血 (DAH),其为另一种内皮损伤综合征。她初始对艾库组单抗有反应,但不耐受该治疗。开始OMS646治疗之前,她进行血液透析和需要每日输血。OMS646治疗后不久,她的TMA消除,她的DAH消除,和她能够停止透析。随后她能够显著减少和随后停止血小板和RBC输注,同时保持稳定的或增加的血小板计数和血红蛋白值。这些结果在图62A-62E中证实,如下:

[1529] 图62A图示说明了随时间在同情使用患者#1中肌酸酐的水平,其中垂直线表示开始用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗。

[1530] 图62B图示说明了随时间在同情使用患者#1中结合珠蛋白的水平,其中垂直线表示开始用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗。

[1531] 图62C图示说明了随时间在同情使用患者#1中血红蛋白的水平,其中垂直线表示开始用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗。

[1532] 图62D图示说明了随时间在同情使用患者#1中LDH的水平,其中垂直线表示开始用

MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗。

[1533] 图62E图示说明了随时间在同情使用患者#1中血小板的水平,其中垂直线表示开始用MASP-2抑制性抗体 (OMS646) 治疗。

[1534] 总体上,该患者的疗程证实了TMA和DAH的成功OMS646治疗,允许患者停止氧疗法、血液透析和输血。

[1535] 简述

[1536] 简言之,本实施例描述了青少年女孩(同情使用患者#1)的HCST-TMA病例报告,所述女孩不耐受艾库组单抗治疗,但对OMS646治疗的同情使用反应良好。OMS646治疗后不久,她的TMA消除,她的DAH消除,和她能够停止透析。如实施例47所述,提供了另一个HSCT-TMA病例报告,描述了具有困难的移植后疗程的患者,包括类固醇抵抗性GvHD和巨细胞病毒感染。他发生对保守措施无反应的TMA和具有共存在GvHD以及多种神经学并发症,和不能够行走。如实施例47所述,在OMS646治疗后,他的TMA和GvHD消除,和他的神经学并发症改善。他能够回到工作,和他的神经学状态持续改善。

[1537] 在HSCT受体中总体存活和TMA标记的改善,结合在这些临床疾病患者中GvHD的消除和弥漫性肺泡出血的消除,表明凝集素途径在这些综合征中起到的作用,和在治疗和/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使用MASP-2抑制性抗体OMS646的功效。

[1538] 根据前述内容,在一个实施方案中,本发明提供治疗患有与造血干细胞移植有关的弥漫性肺泡出血的人受试者(即,在HSCT受体中)的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物的步骤之前,鉴定患有与HSCT有关的弥漫性肺泡出血的人受试者。

[1539] 根据任何本文公开的实施方案,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体以10nM或更小的KD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1%人血清中以10nM或更小的IC50抑制C3b沉积,所述抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC50抑制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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时保留经典补体途径完整)。

[1540] 在一个实施方案中,MASP-2抑制性抗体以在HSCT受体中有效改进与弥漫性肺泡出血有关的至少一个或多个临床参数的量给予。在一些实施方案中,所述方法包括经静脉内、肌肉或皮下,给予MASP-2抑制性抗体至患有弥漫性肺泡出血的受试者。治疗可以是慢性的,和每日至每月给予,但优选至少每两周或至少一周一次、例如一周两次或一周三次给予。MASP-2抑制性抗体可单独给予,或与C5抑制剂、例如艾库组单抗组合给予。

[1541] 在一个实施方案中,所述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,包括给予所述受试者包含一定量的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,其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3和轻链可变区,其包含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)重链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1;和ii)包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2;和iii)包含SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3,和b)轻链可变区,其包含:i)包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1;和ii)包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2;和iii)包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3,或(II)其变体,包含与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)的重链可变区和与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。

[1542] 在一些实施方案中,所述方法包括给予所述受试者包含一定量的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包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1543] 在一些实施方案中,所述方法包括给予所述受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段特异性识别在人MASP-2上由参考抗体OMS646识别的表位的至少一部分,参考抗体OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[1544] 在一些实施方案中,所述方法包括给予患有或有风险发生与HSCT有关的弥漫性肺泡出血的受试者,包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物,所述抗体或其抗原结合片段包含包含

[1545] SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区,剂量为1mg/kg-10mg/kg(即,1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg),至少每周一次(例如至少每周两次或至少每周三次),持续至少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周的时间。

[1546] 根据前述内容,在另一个实施方案中,本发明提供治疗患有与造血干细胞移植有关的静脉闭塞性病(VOD)的人受试者(即,在HSCT受体中)的方法,包括给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括在给予所述受试者包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的量的MASP-2抑制性抗体的组合物的步骤之前,鉴定患有与HSCT有关的静脉闭塞性病的人受试者。

[1547] 根据任何本文公开的实施方案,MASP-2抑制性抗体显示至少一个或多个以下特征:所述抗体以10nM或更小的KD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1%人血清中以10nM或更小的IC50抑制C3b沉积,所述抗体在90%人血清中以30nM或更小的IC50抑制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,所述抗体结合MASP-2和选择性抑制凝集素途径和基本上不抑制经典途径(即,抑制凝集素途径,同时保留经典补体途径完整)。

[1548] 在一个实施方案中, MASP-2抑制性抗体以在HSCT受体中有效改进与静脉闭塞性病有关的至少一个或多个临床参数的量给予。在一些实施方案中, 所述方法包括经静脉内、肌内或皮下, 给予MASP-2抑制性抗体至患有静脉闭塞性病的受试者。治疗可以是慢性的, 和每日至每月给予, 但优选至少每两周或至少一周一次、例如一周两次或一周三次给予。MASP-2抑制性抗体可单独给予, 或与C5抑制剂、例如艾库组单抗组合给予。

[1549] 在一个实施方案中, 所述方法包括治疗患有与造血干细胞移植相关的静脉闭塞性病的受试者, 包括给予所述受试者包含一定量的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, 其包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3和轻链可变区, 其包含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) 重链可变区, 其包含:i) 包含SEQ ID NO:67的31-35的氨基酸序列的重链CDR-H1; 和ii) 包含SEQ ID NO:67的50-65的氨基酸序列的重链CDR-H2; 和iii) 包含SEQ ID NO:67的95-107的氨基酸序列的重链CDR-H3, 和b) 轻链可变区, 其包含:i) 包含SEQ ID NO:70的24-34的氨基酸序列的轻链CDR-L1; 和ii) 包含SEQ ID NO:70的50-56的氨基酸序列的轻链CDR-L2; 和iii) 包含SEQ ID NO:70的89-97的氨基酸序列的轻链CDR-L3, 或(II) 其变体, 包含与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)的重链可变区和与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。

[1550] 在一些实施方案中, 所述方法包括给予患有与HSCT相关的静脉闭塞性病的受试者包含一定量的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包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[1551] 在一些实施方案中, 所述方法包括给予所述受试者包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物, 所述抗体或其抗原结合片段特异性识别在人MASP-2上由参考抗体OMS646识别的表位的至少一部分, 参考抗体OMS646包含SEQ ID NO:67所示的重链可变区和SEQ ID NO:70所示的轻链可变区。

[1552] 在一些实施方案中, 所述方法包括给予患有或有风险发生与HSCT相关的静脉闭塞性病的受试者, 包含MASP-2抑制性抗体或其抗原结合片段的组合物, 所述抗体或其抗原结合片段包含包含SEQ ID NO:67所示的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:70所示的氨基酸序列的轻链可变区, 剂量为1mg/kg-10mg/kg(即, 1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg), 至少每周一次(例如至少每周两次或至少每周三次), 持续至少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周的时间。

[1553] 尽管已经例举和描述了说明性的实施方案, 但应理解, 可在其中进行各种变化而不背离本发明的精神和范围。

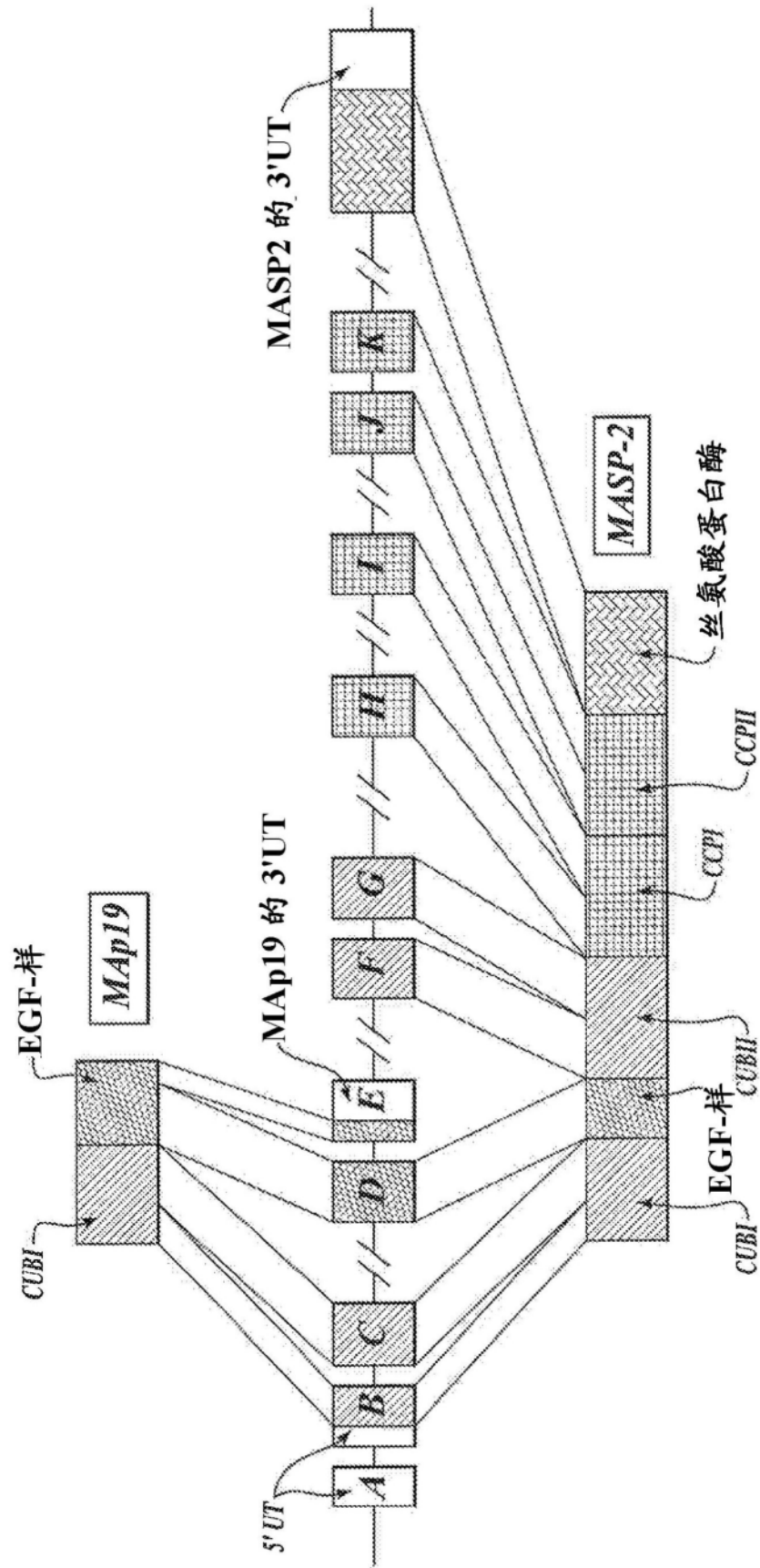


图1

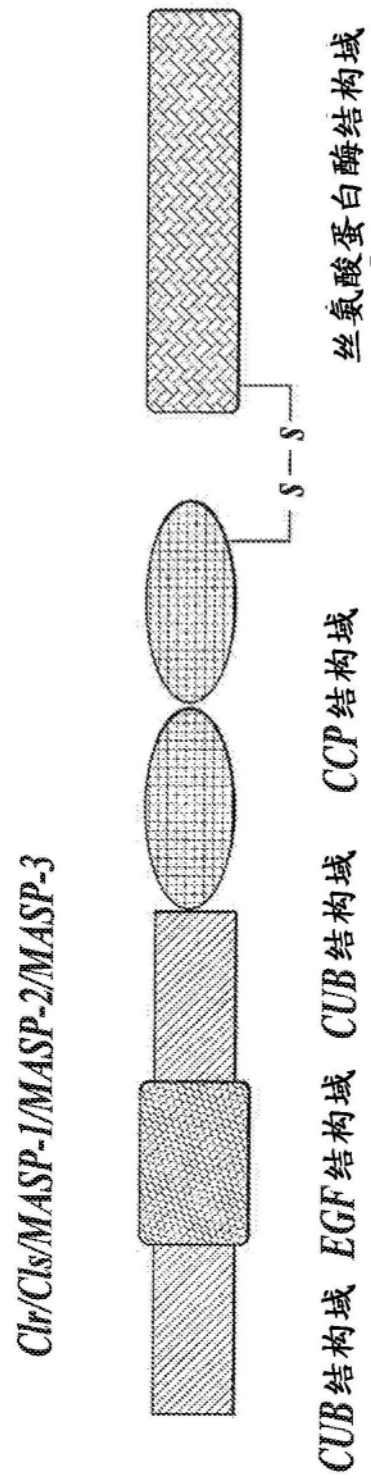


图2A

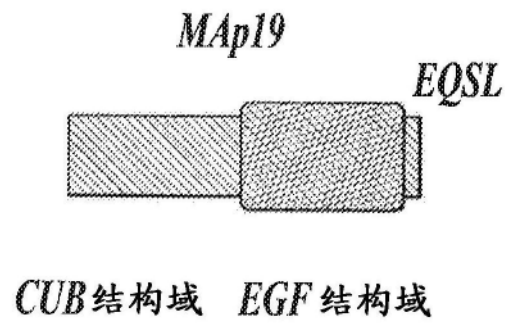


图2B

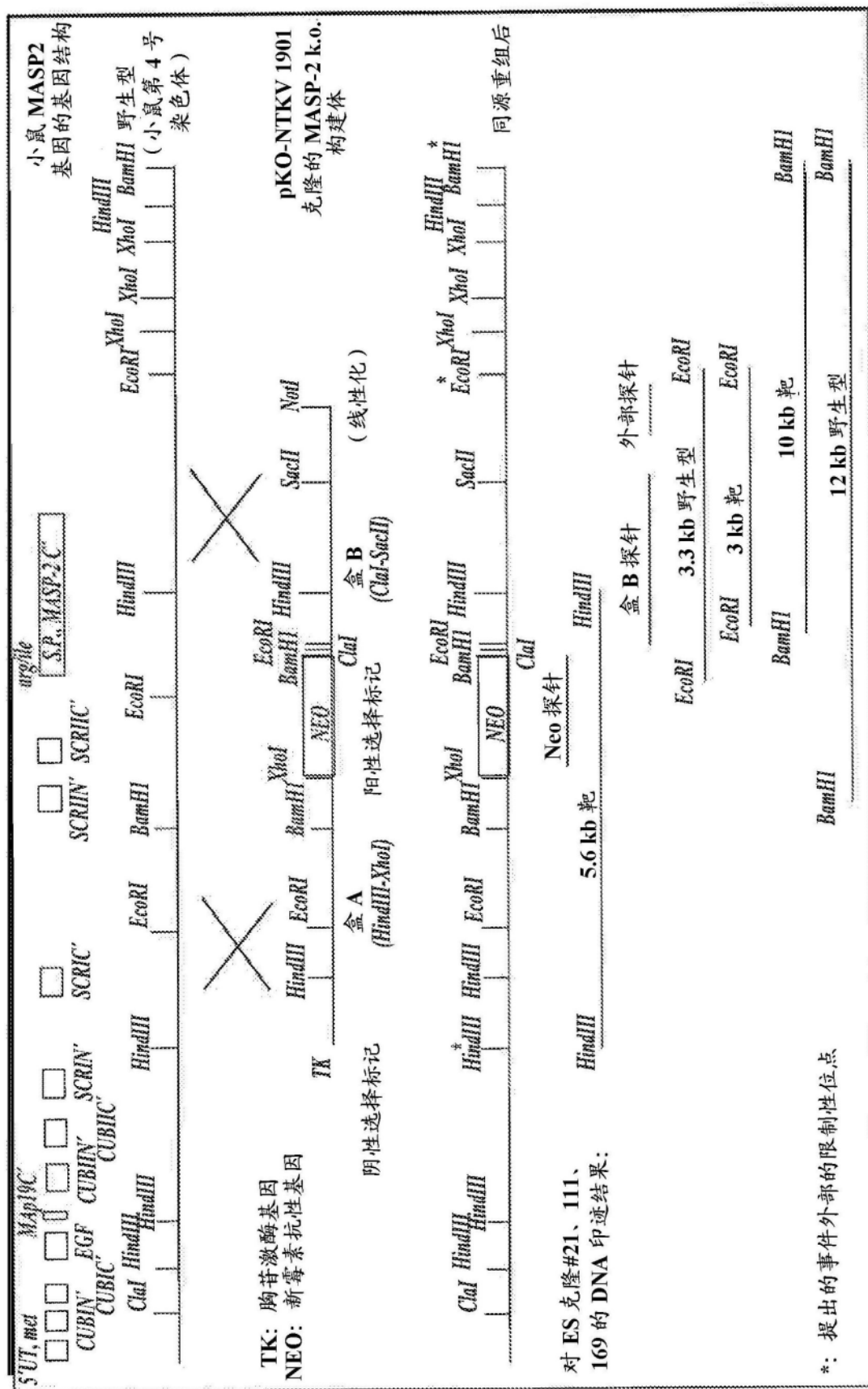


图3

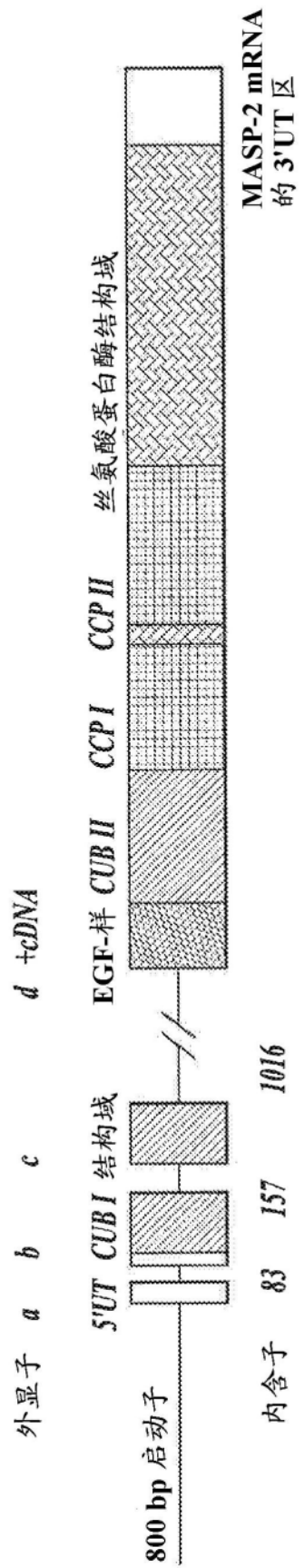


图4

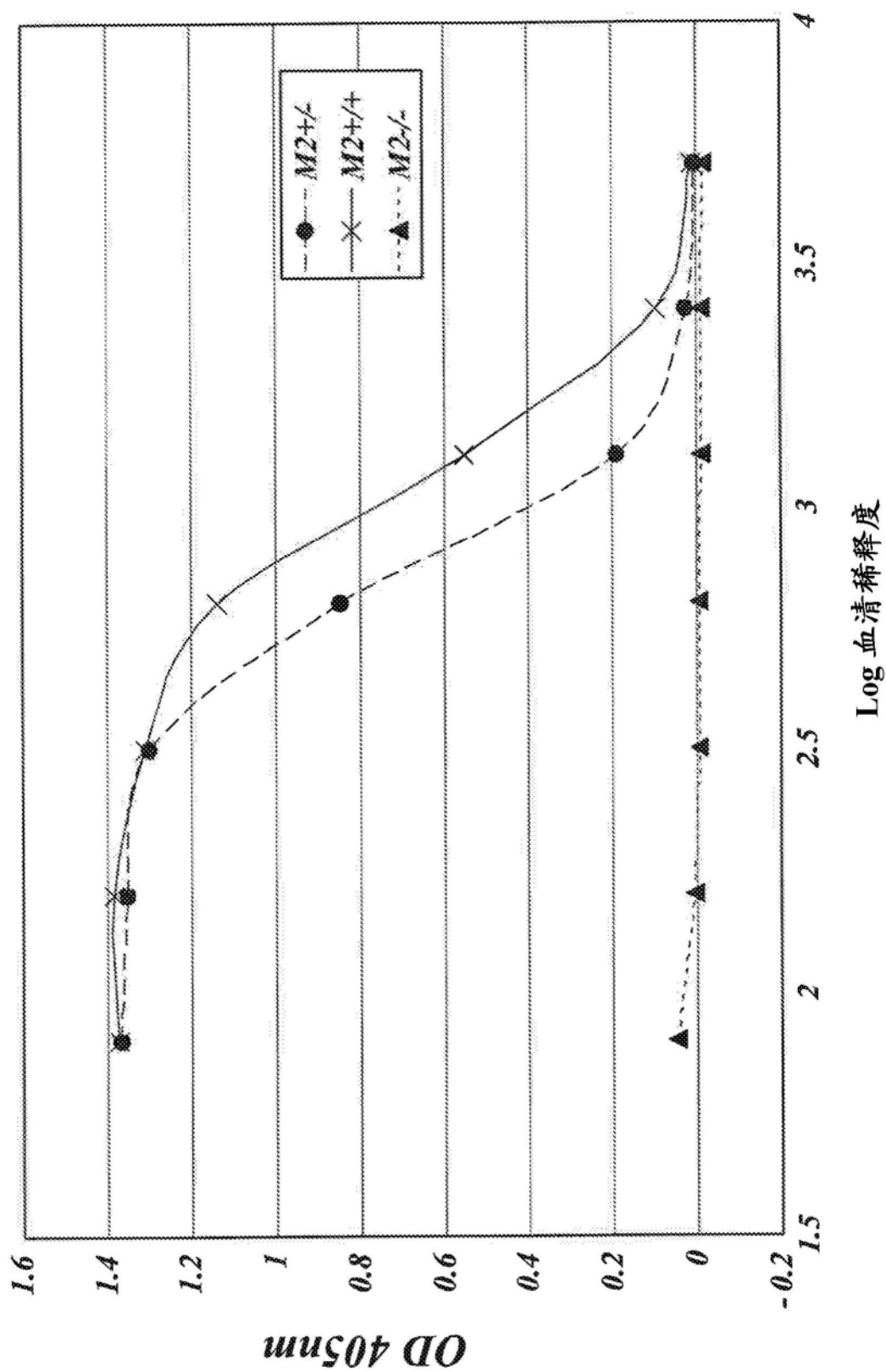


图5A

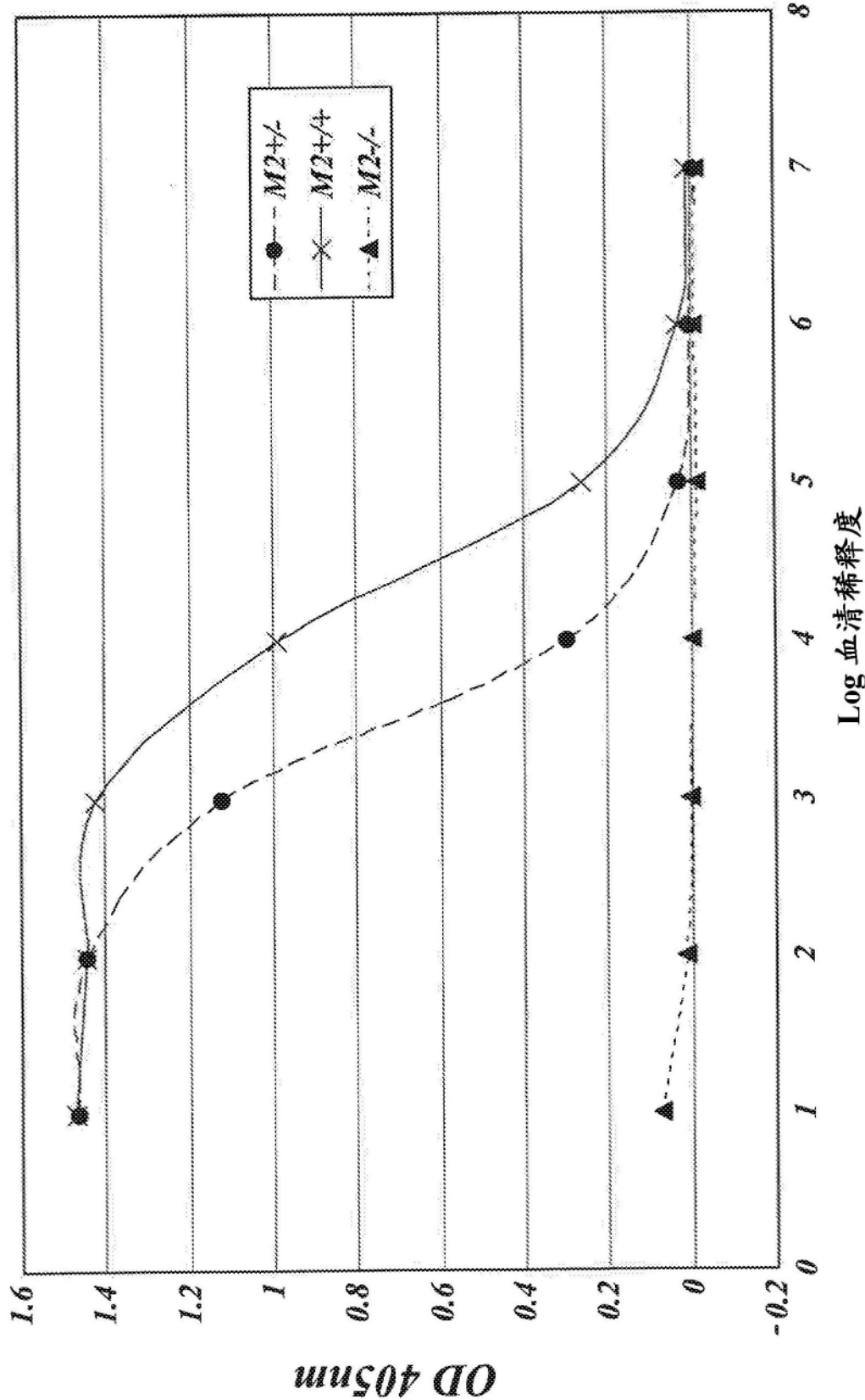


图5B

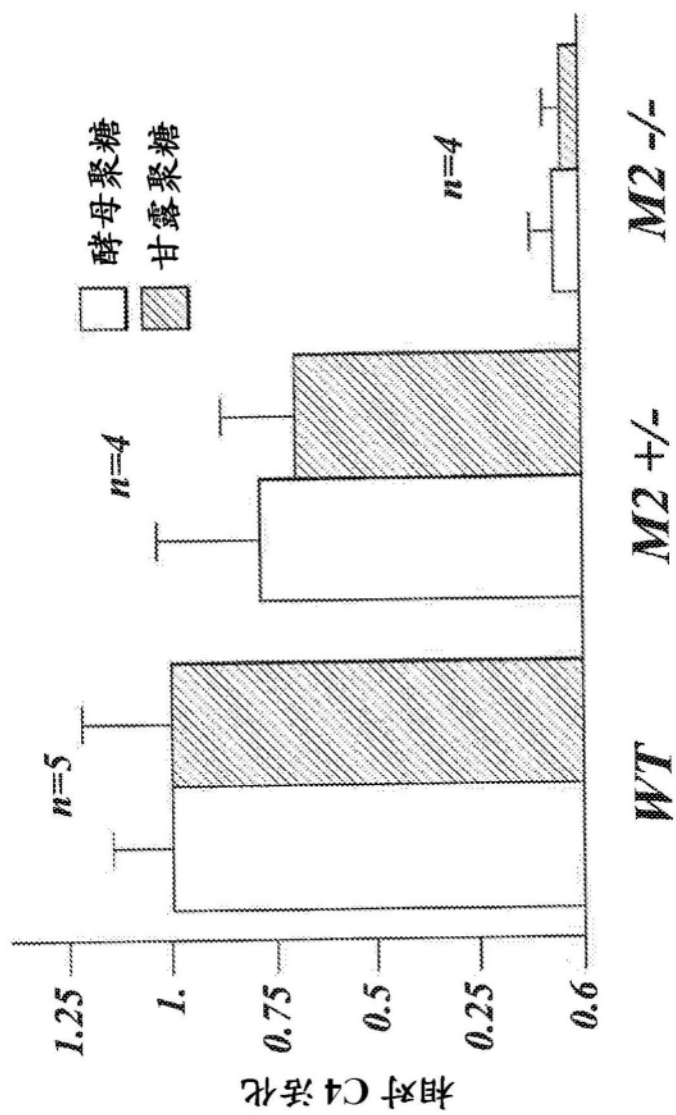


图5C

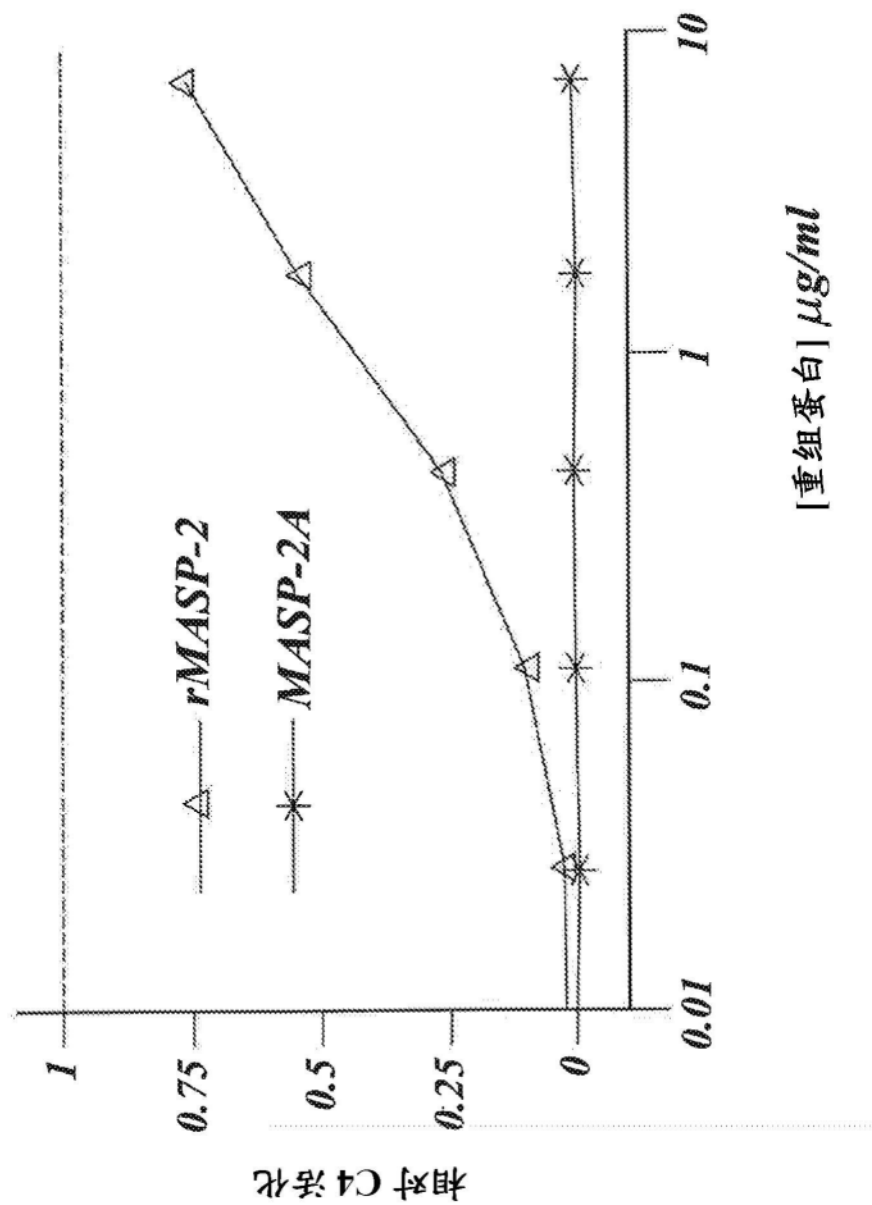


图6

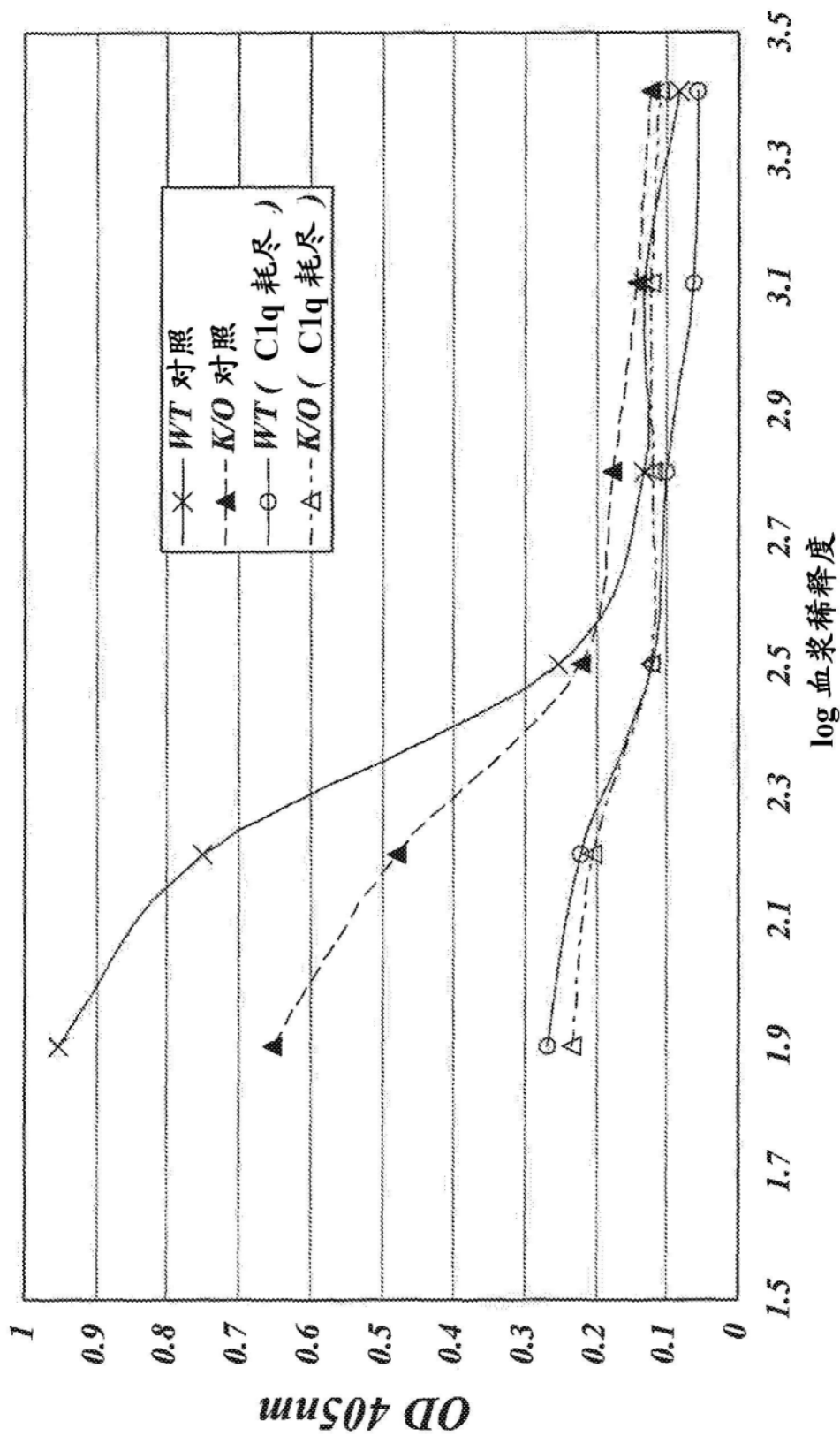


图7

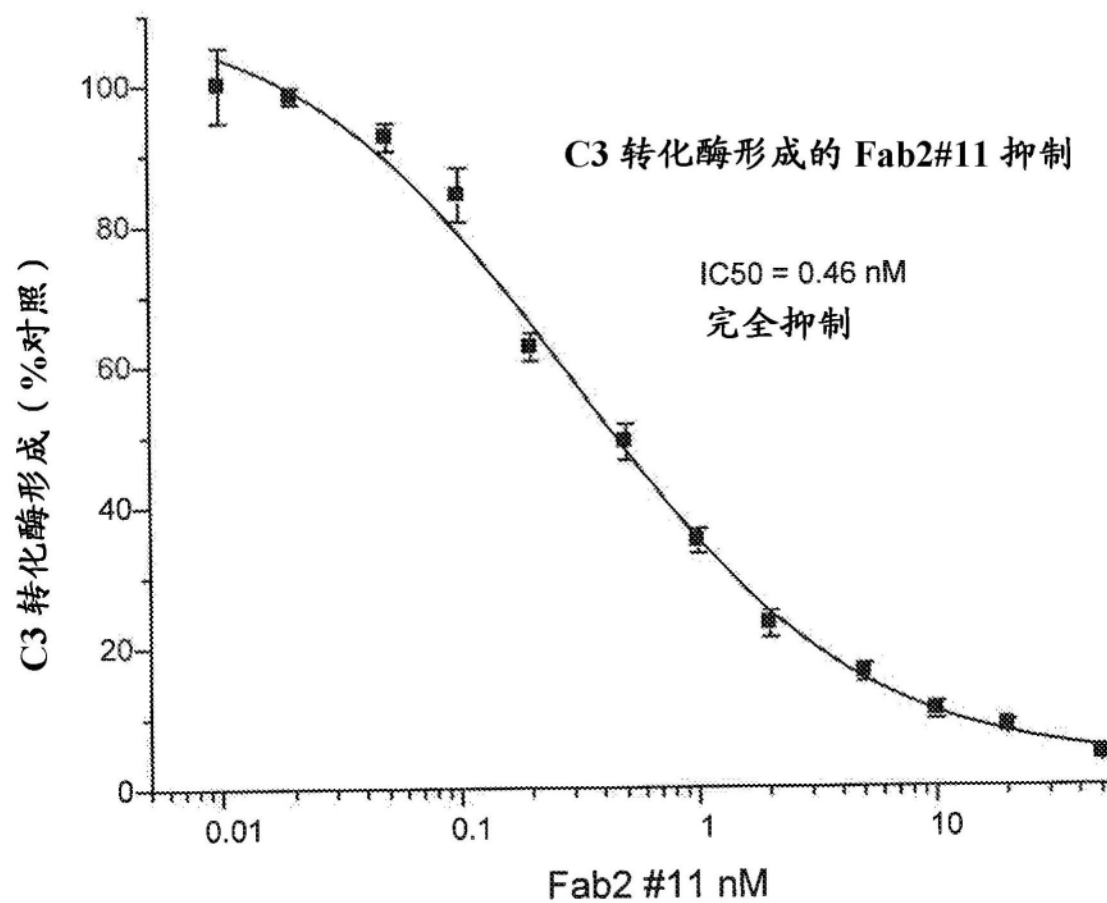


图8A

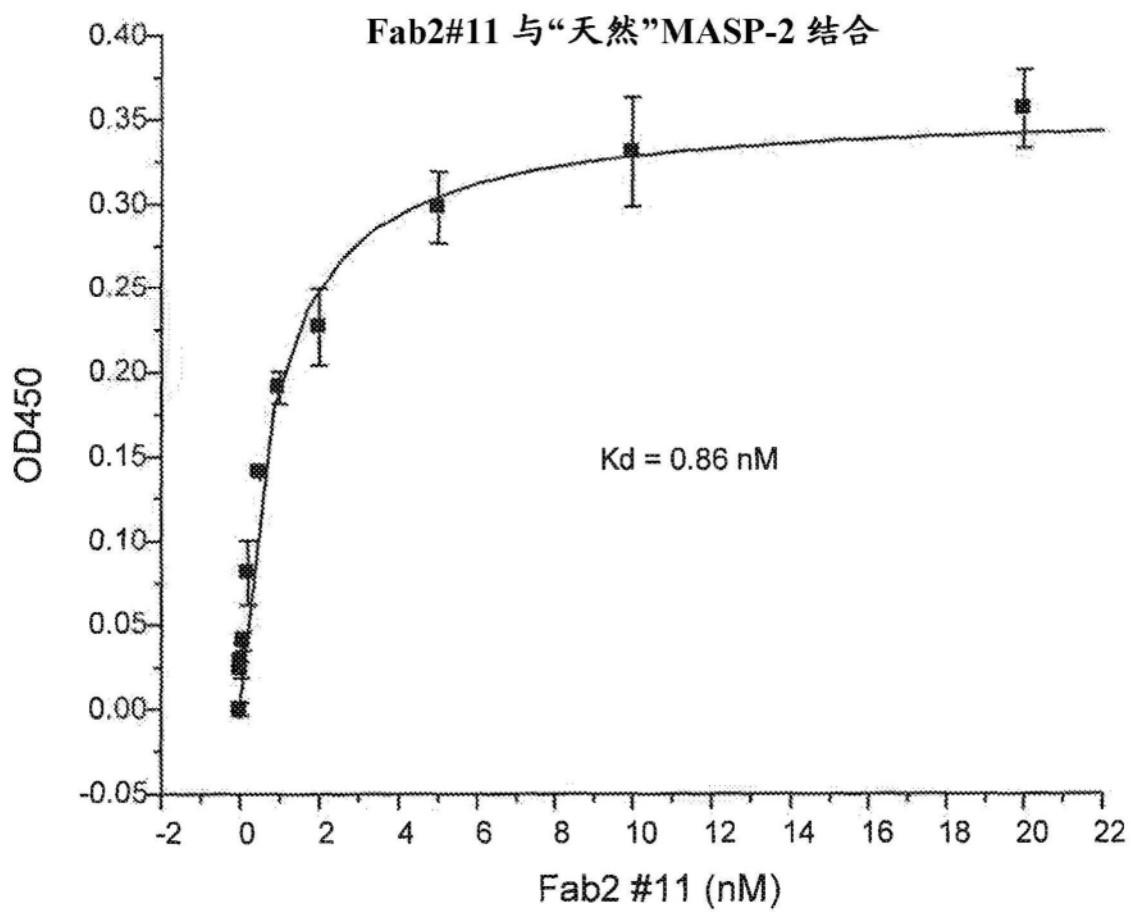


图8B

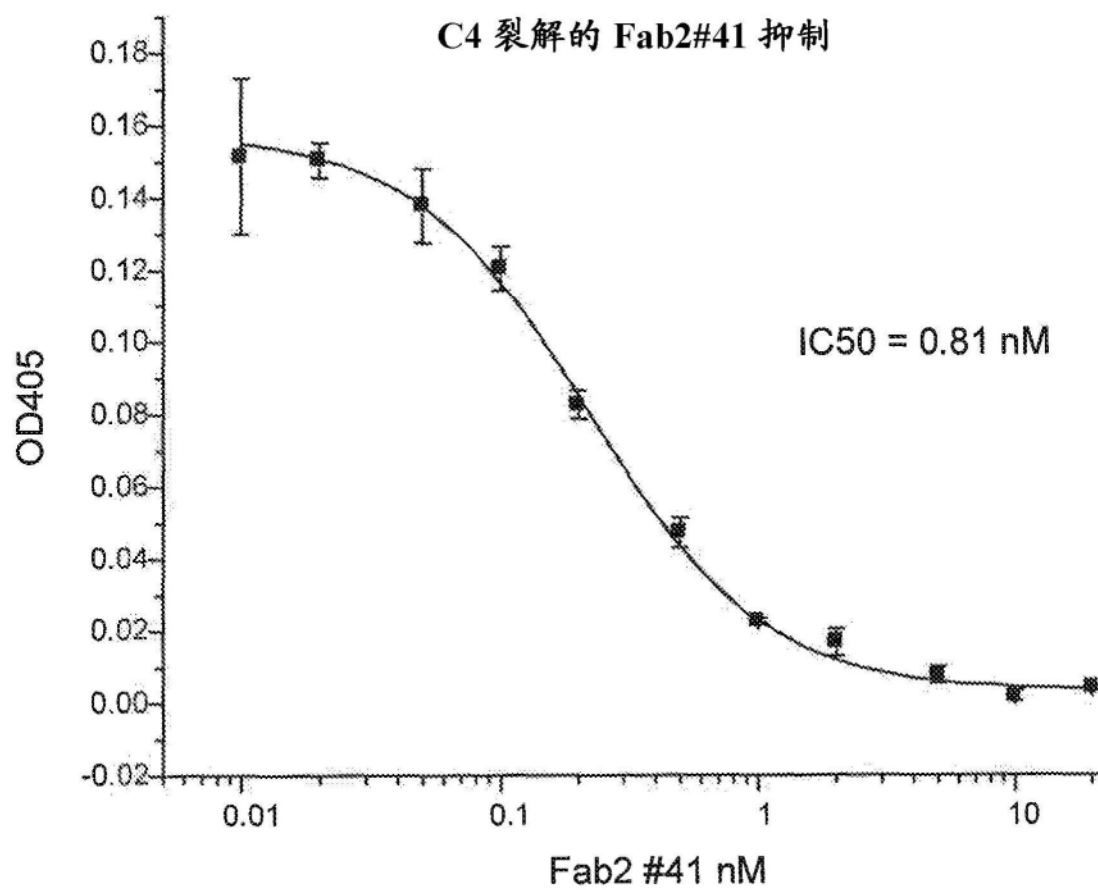


图8C

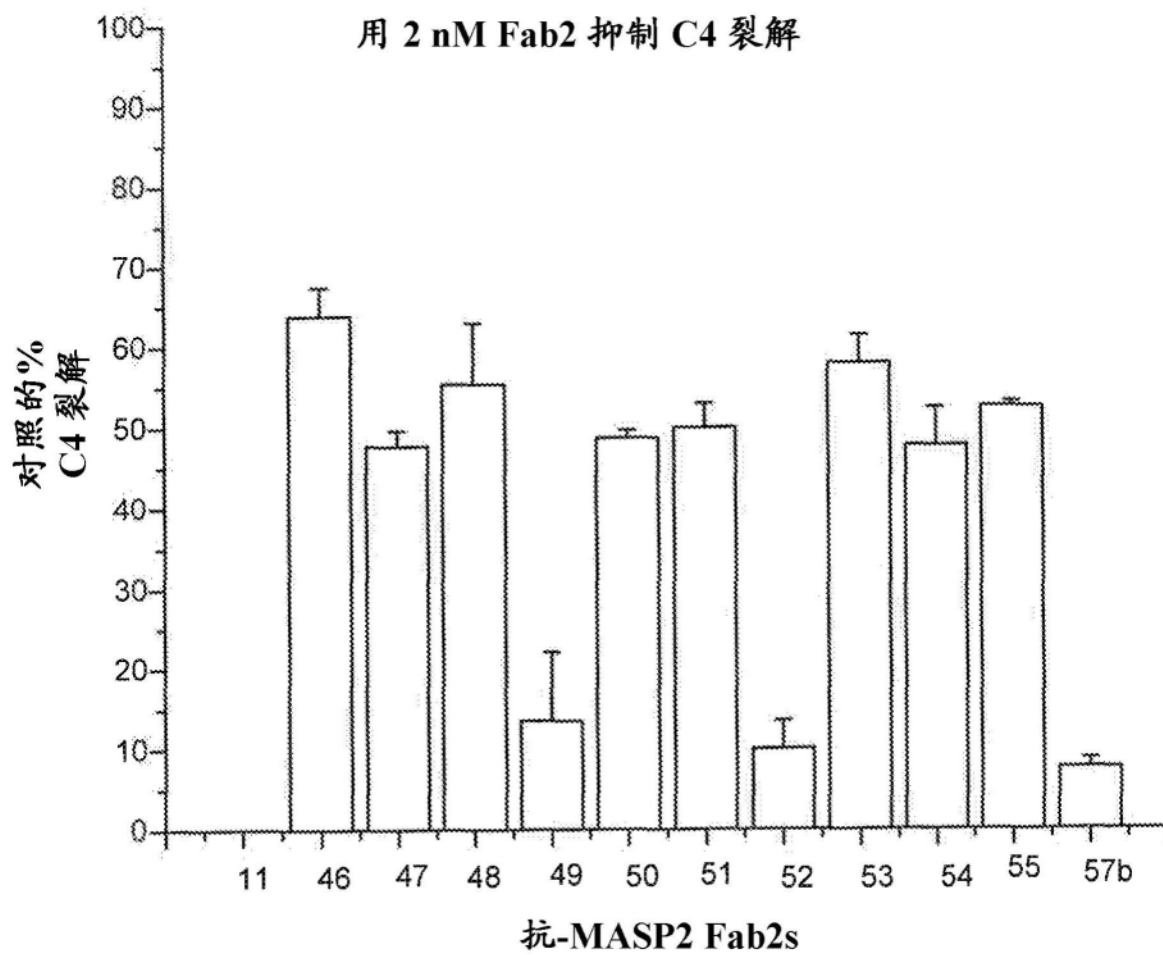


图9

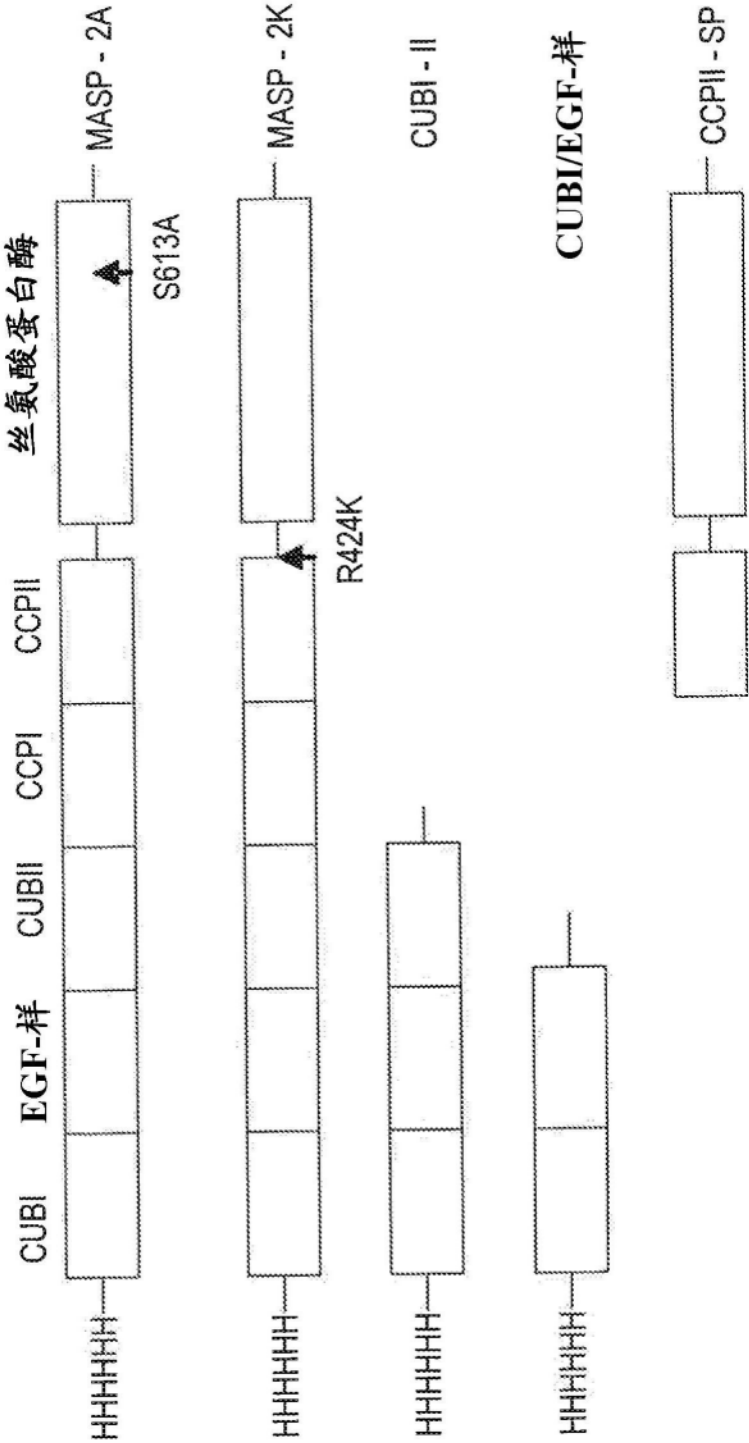


图10

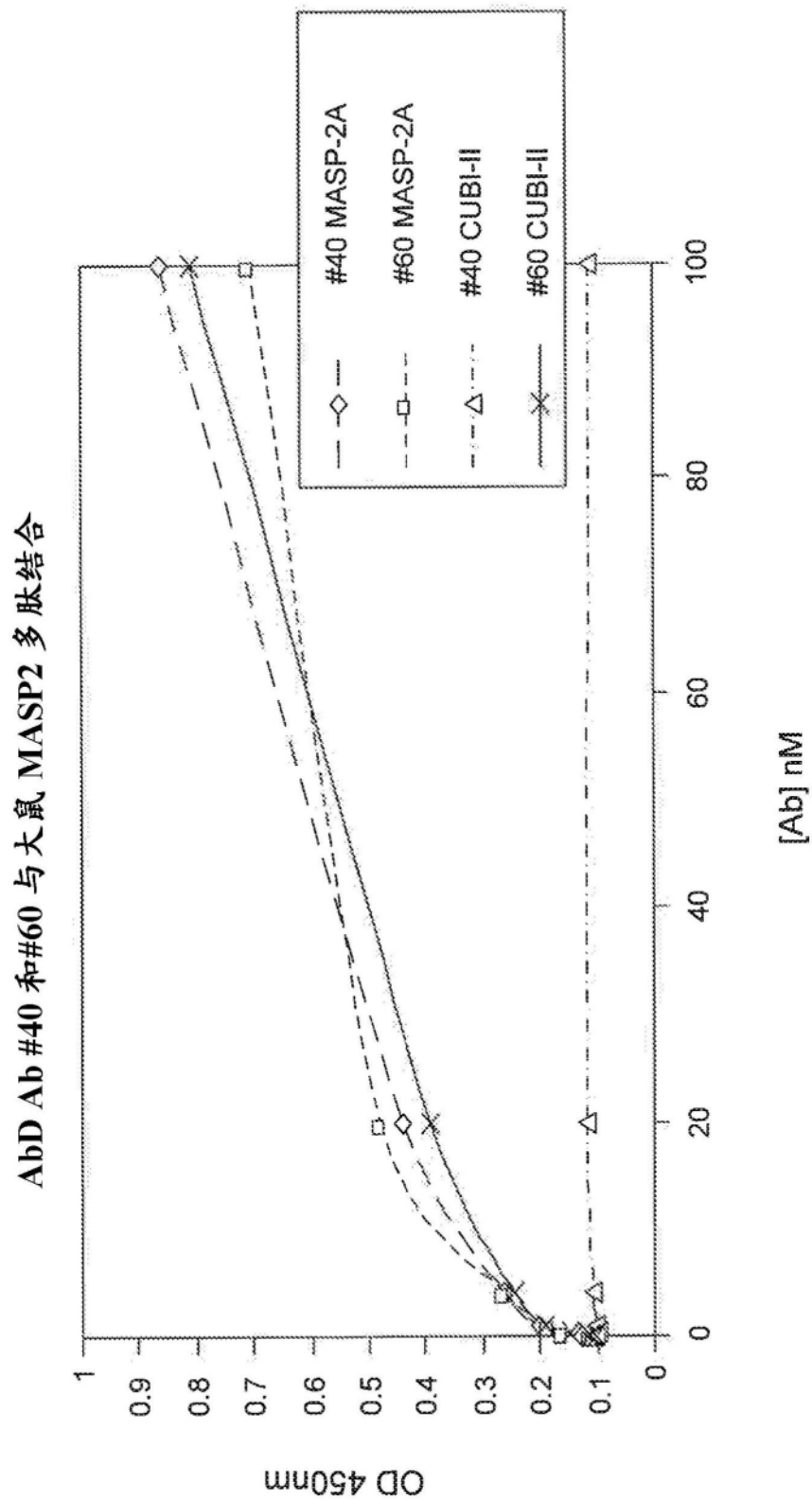


图11

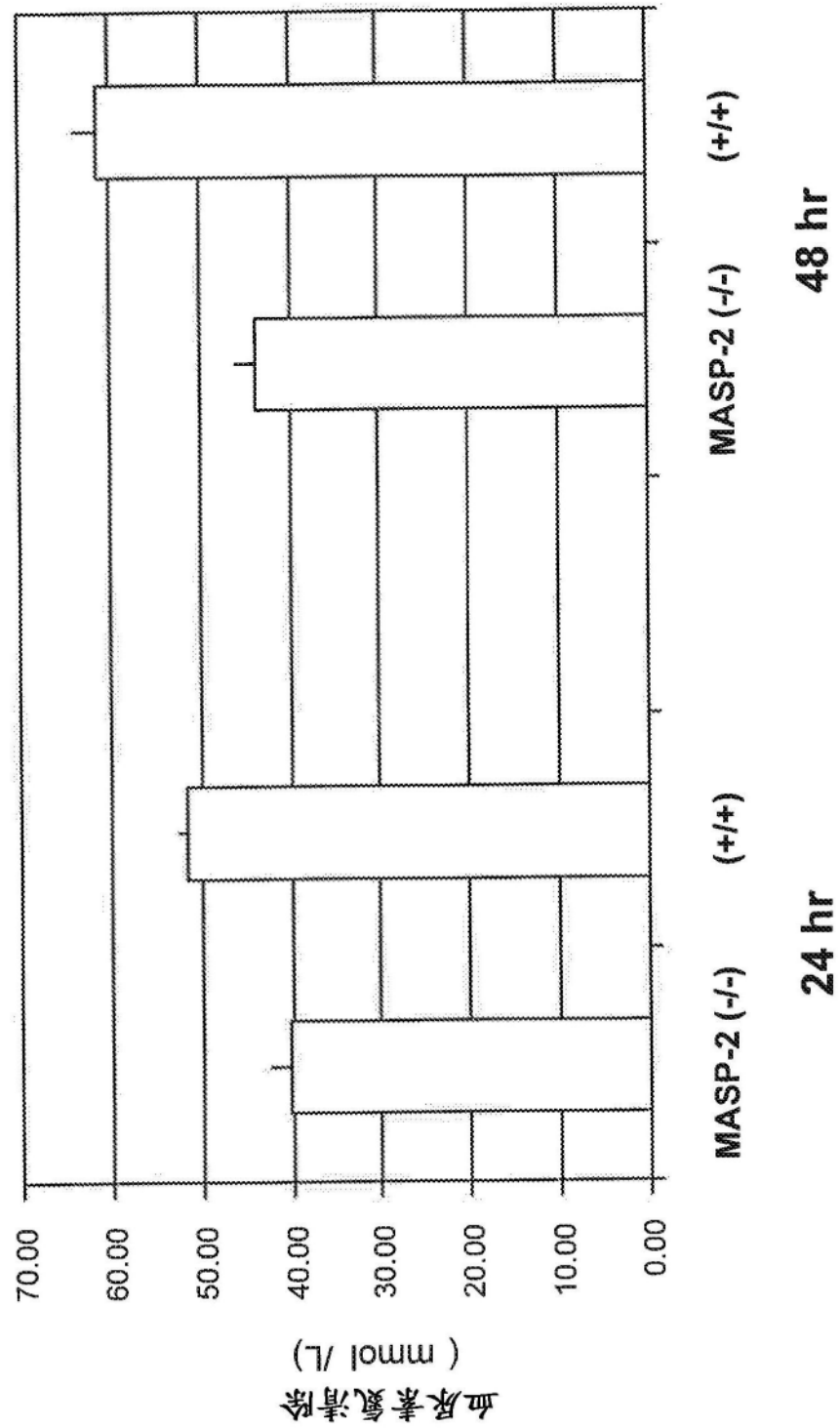


图12

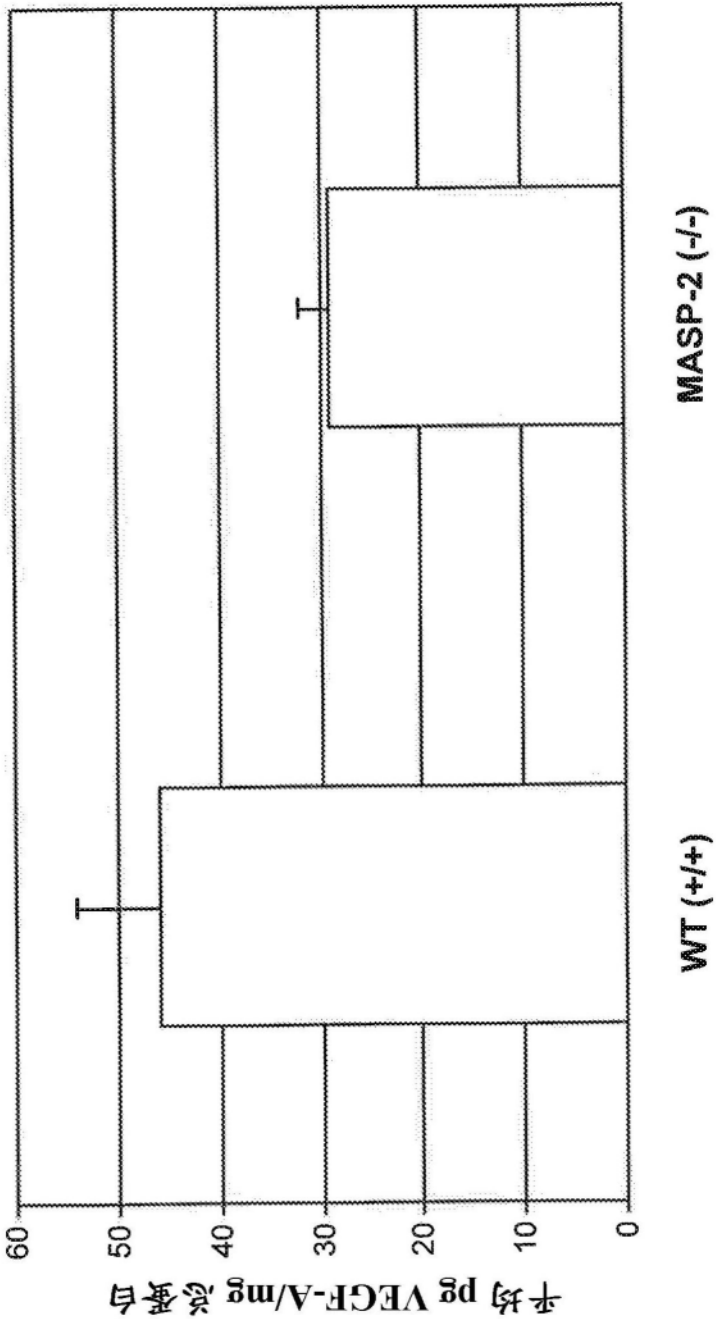


图13A

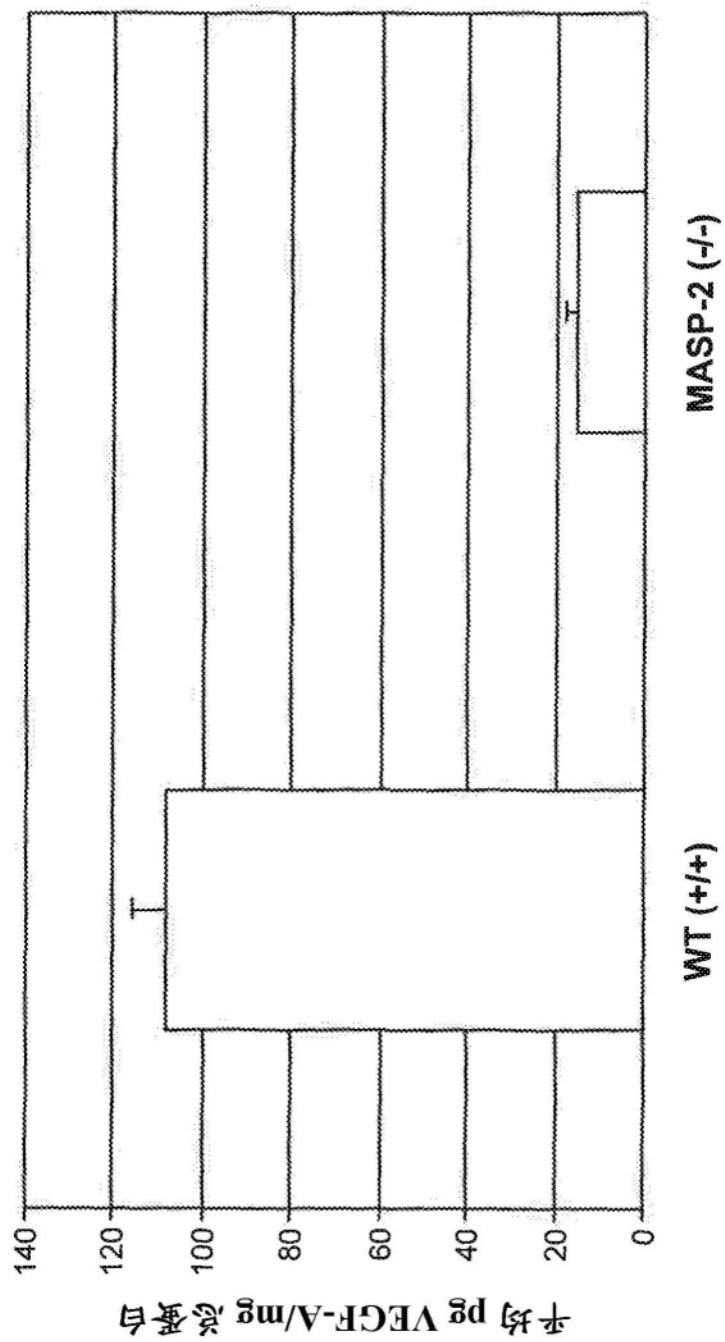


图13B

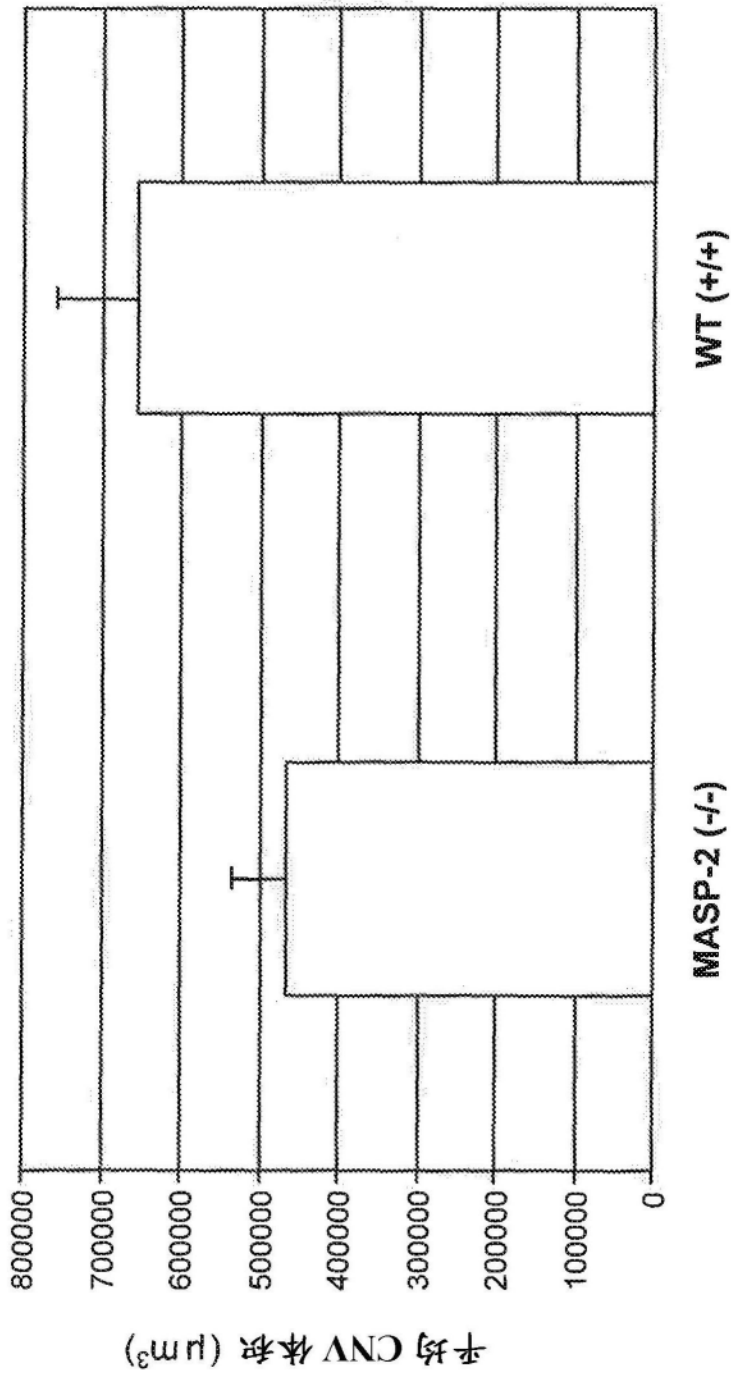


图14

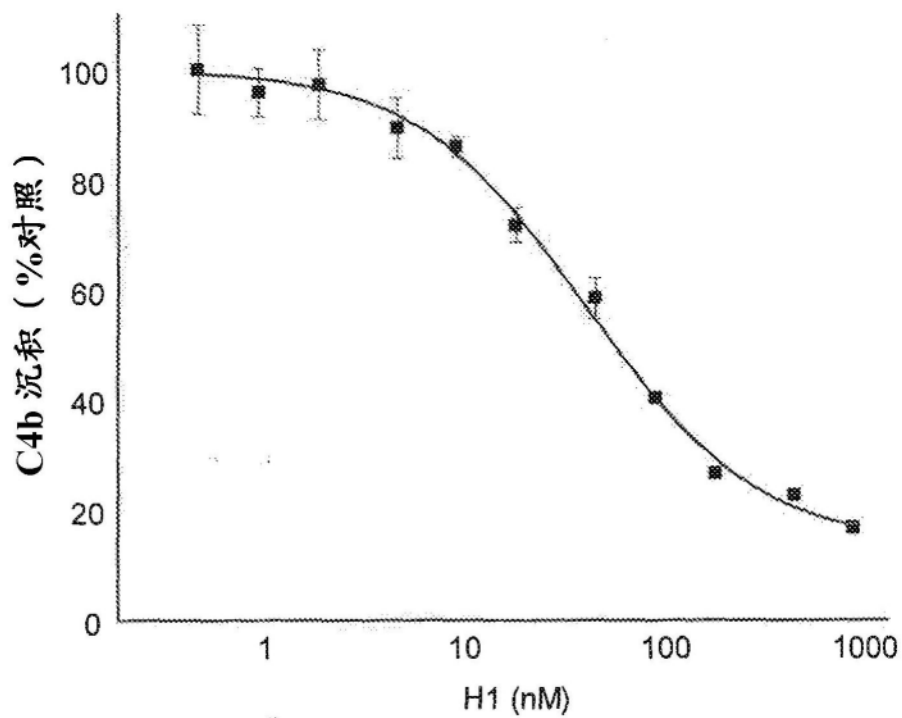


图15A

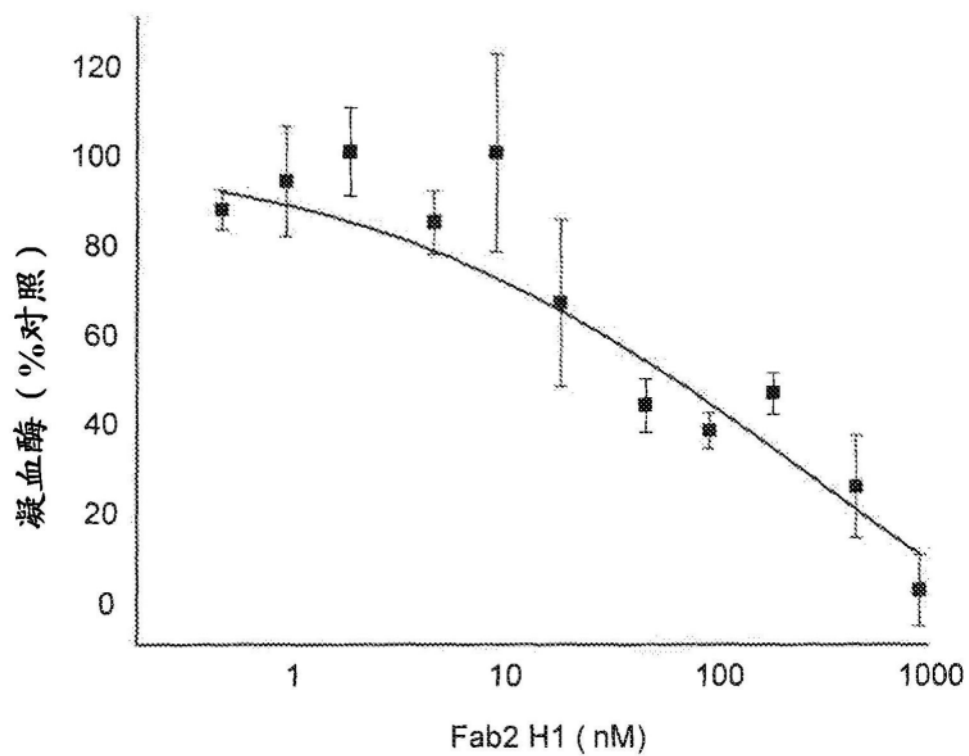


图15B

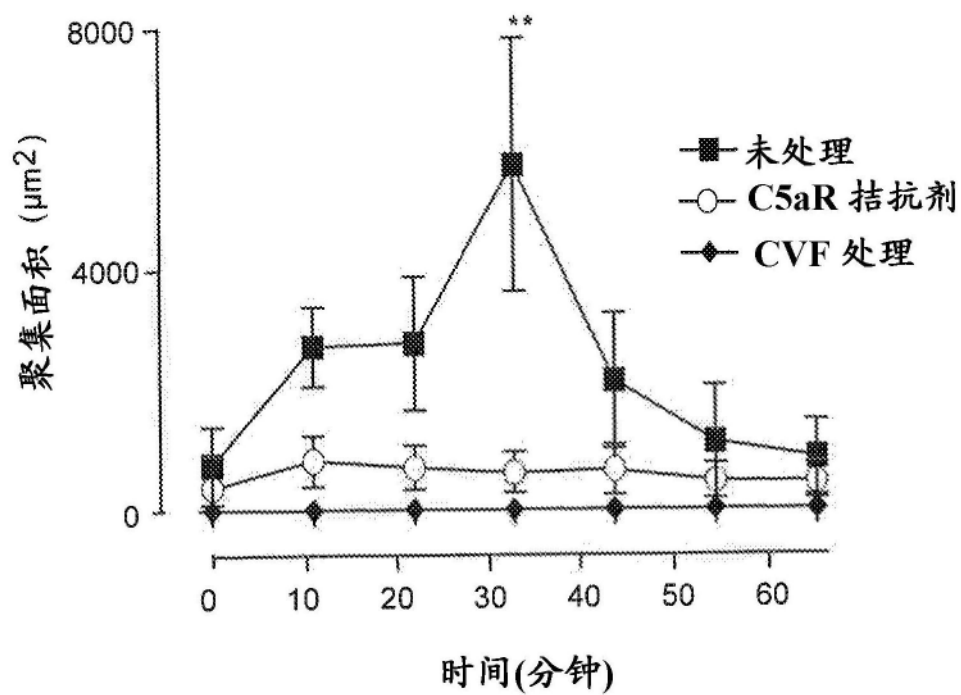


图16A

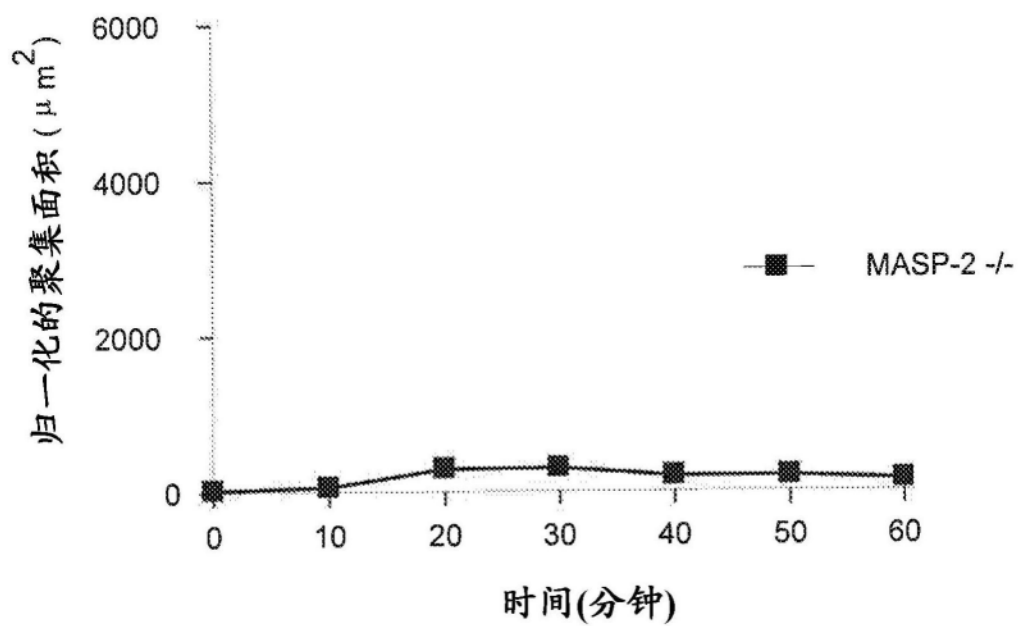


图16B

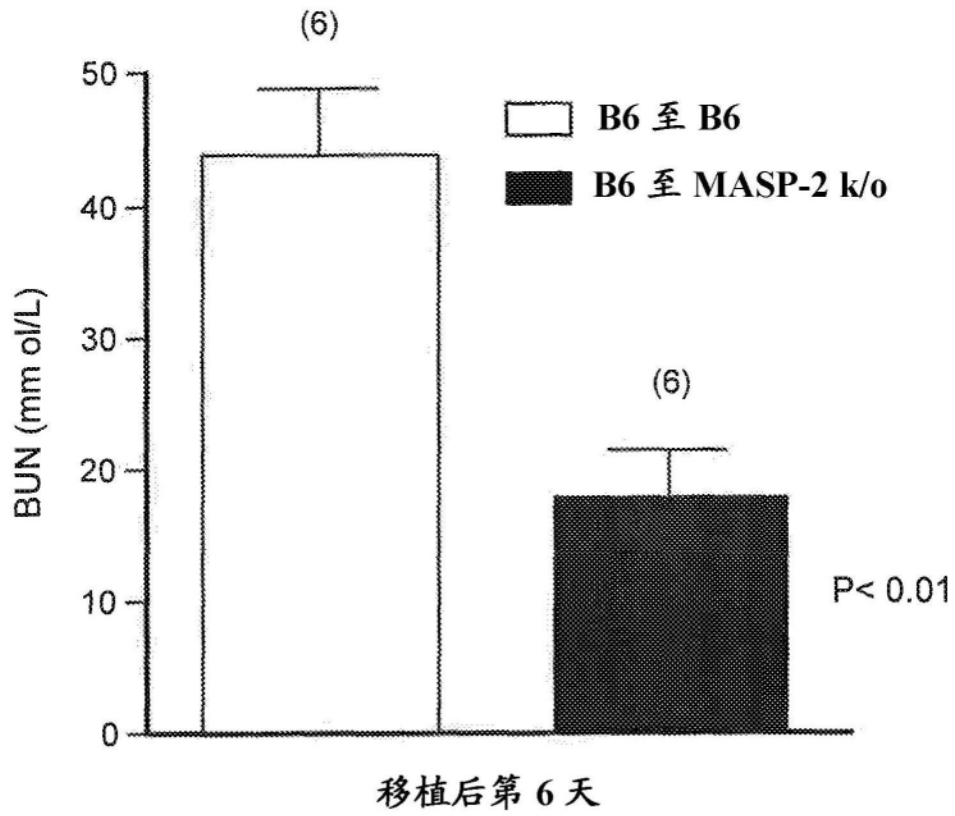


图17

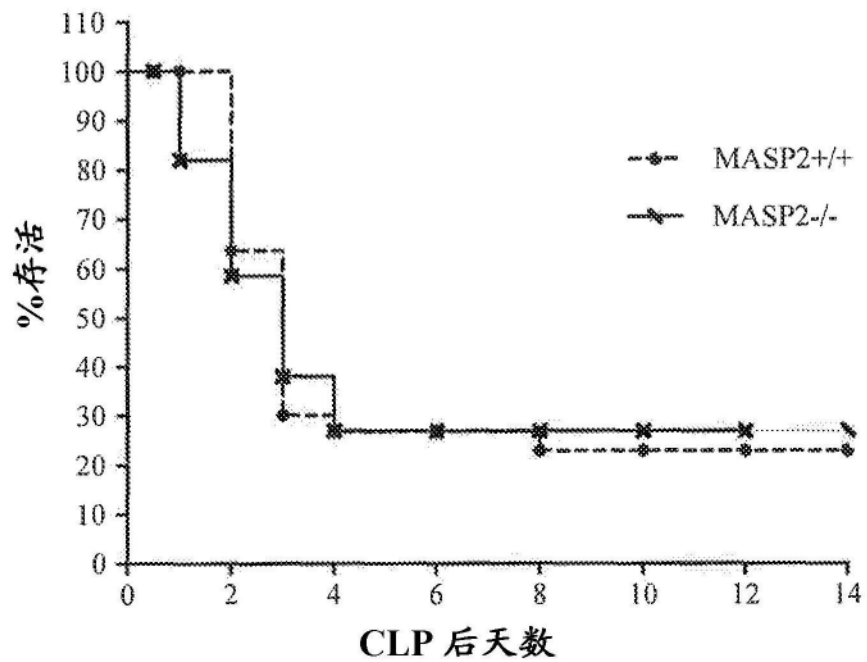


图18

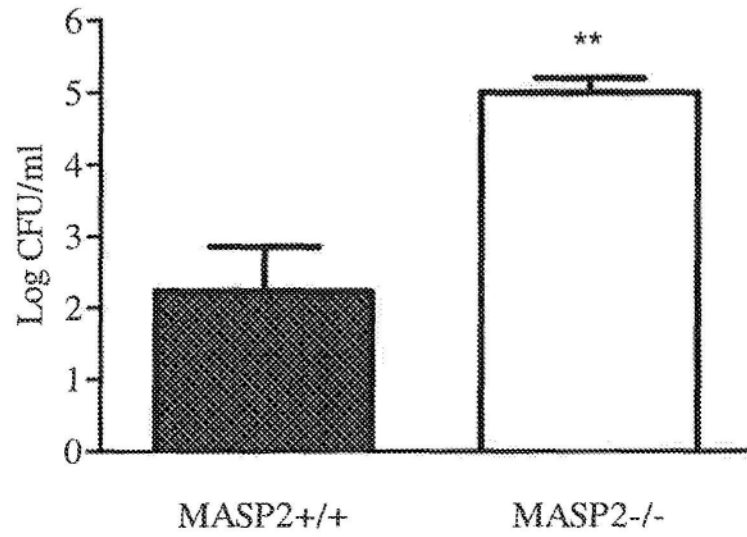


图19

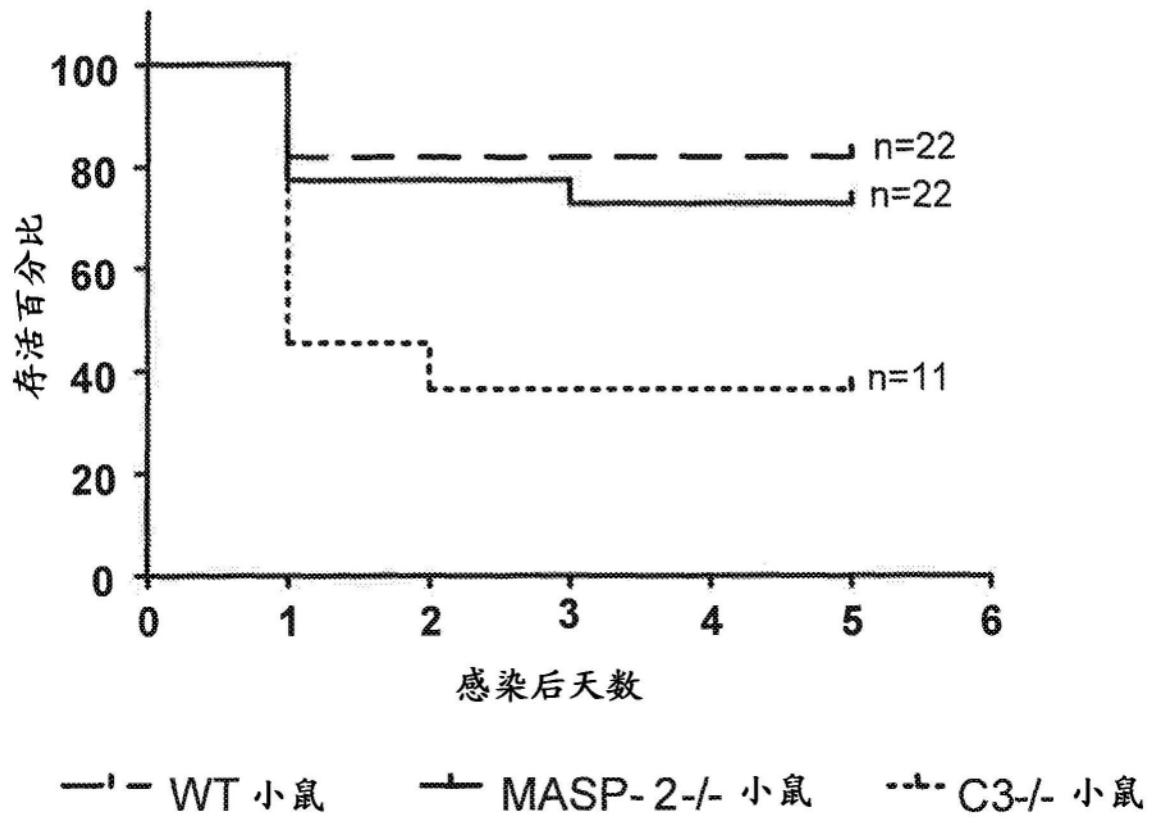


图20

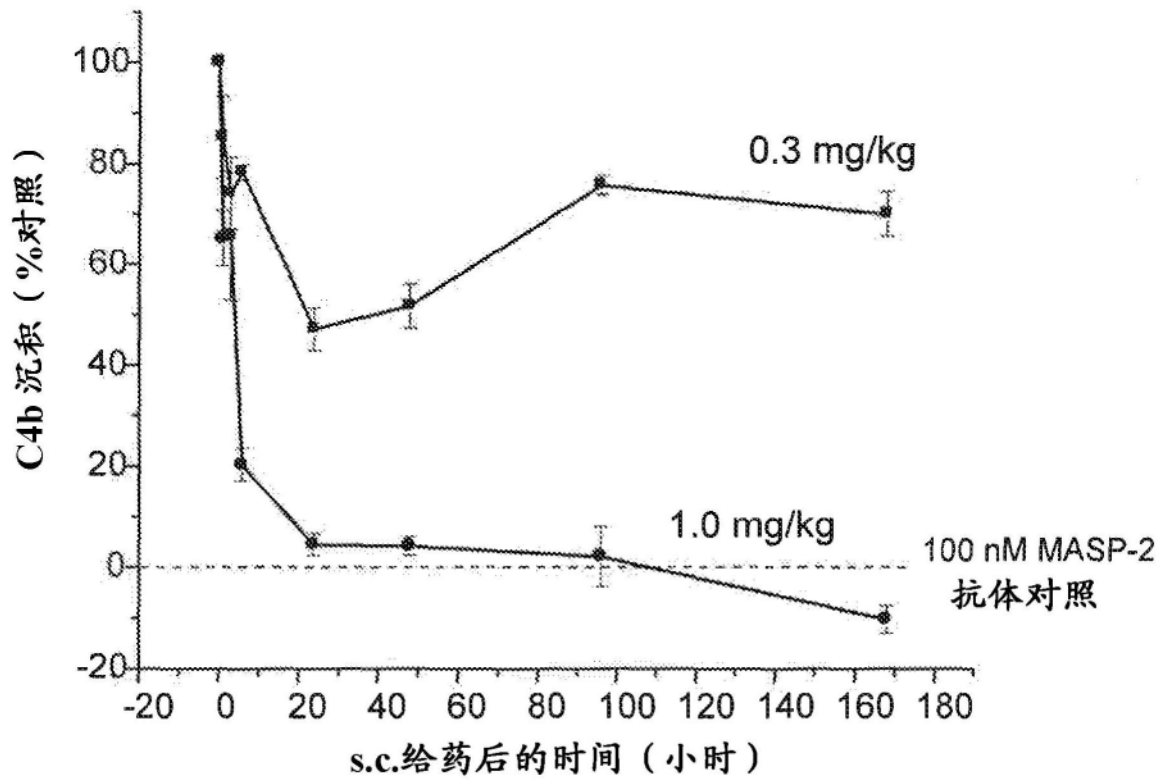


图21

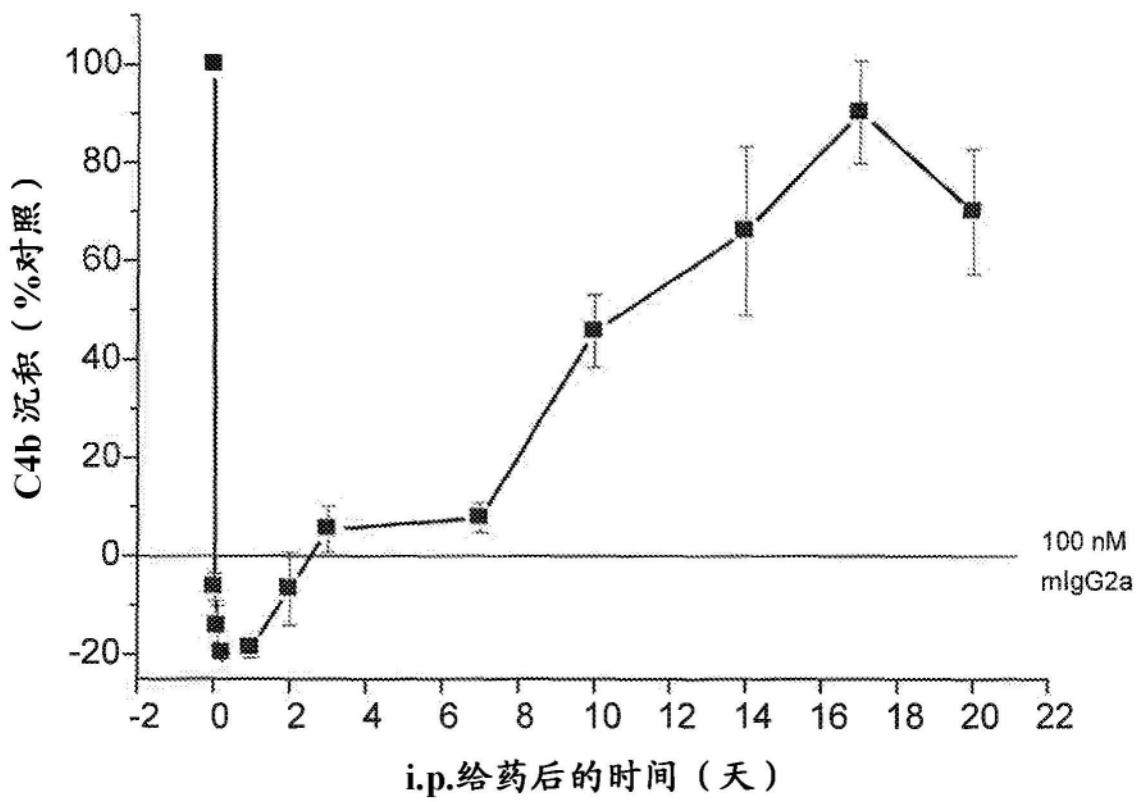


图22

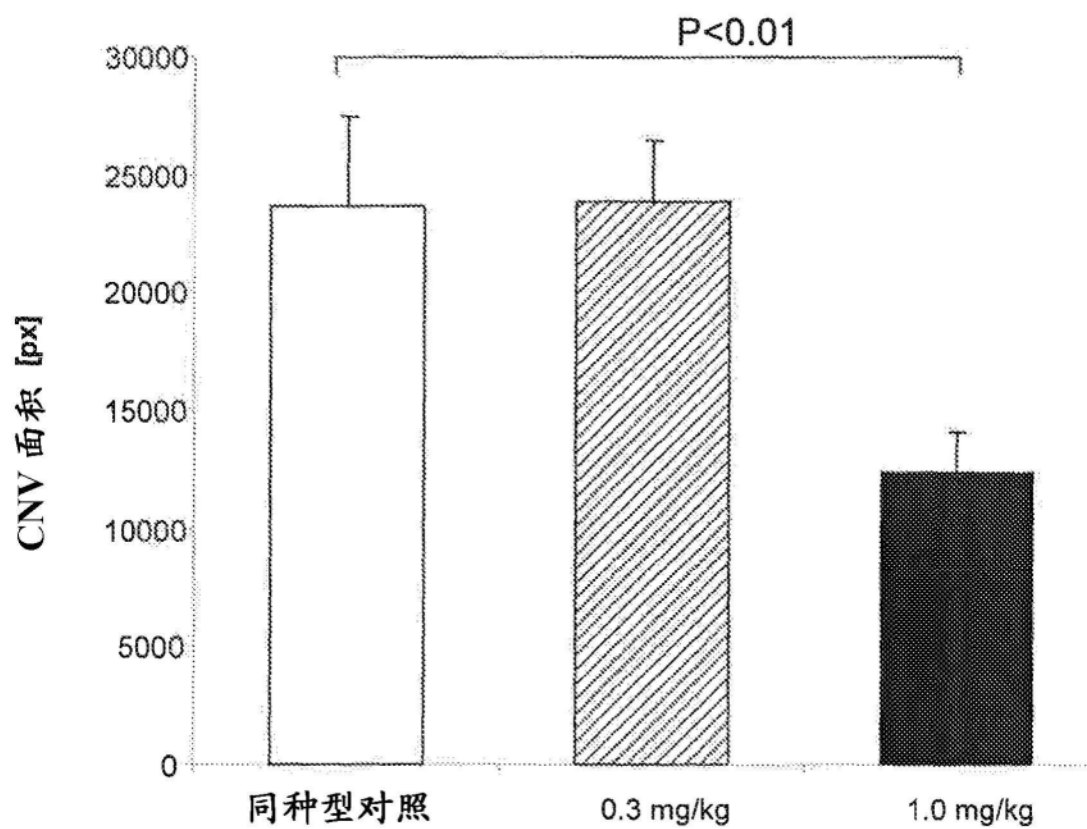


图23

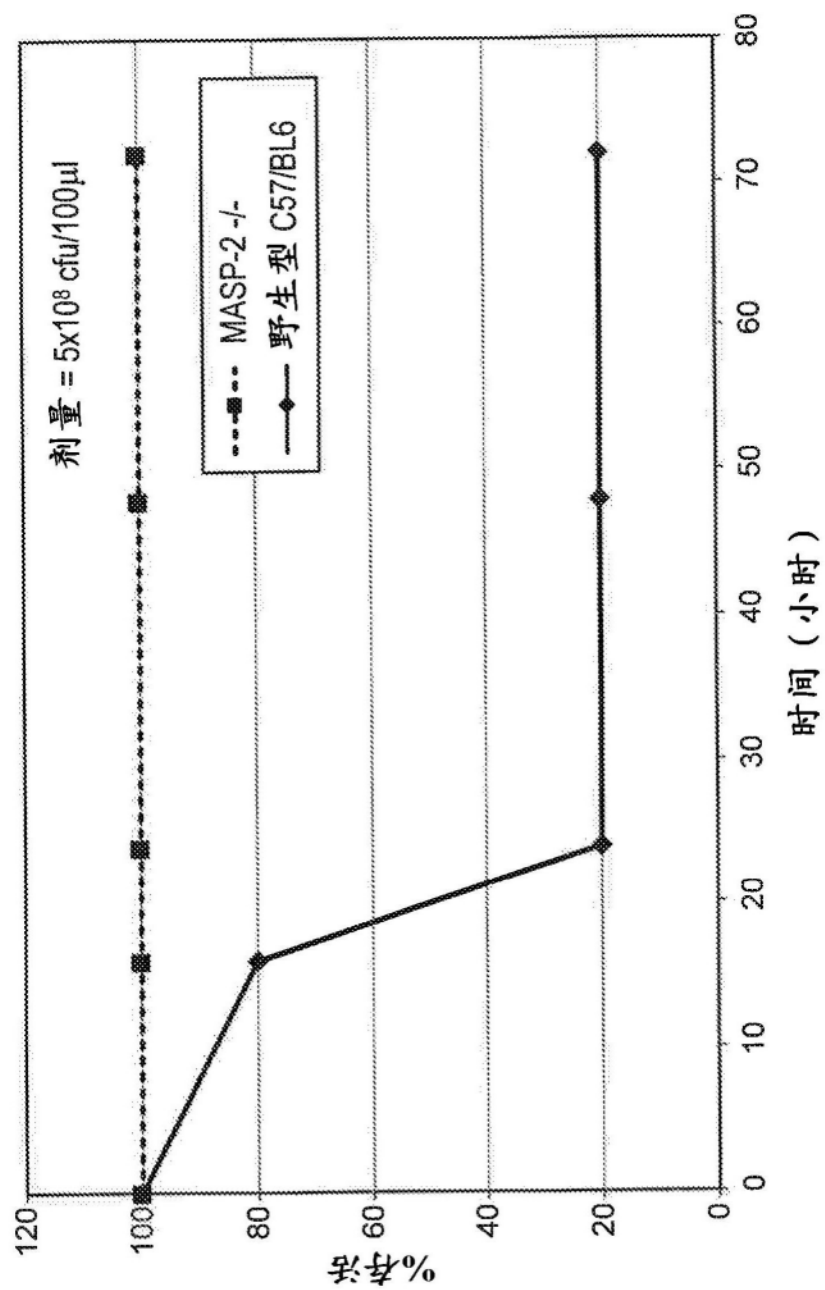


图24A

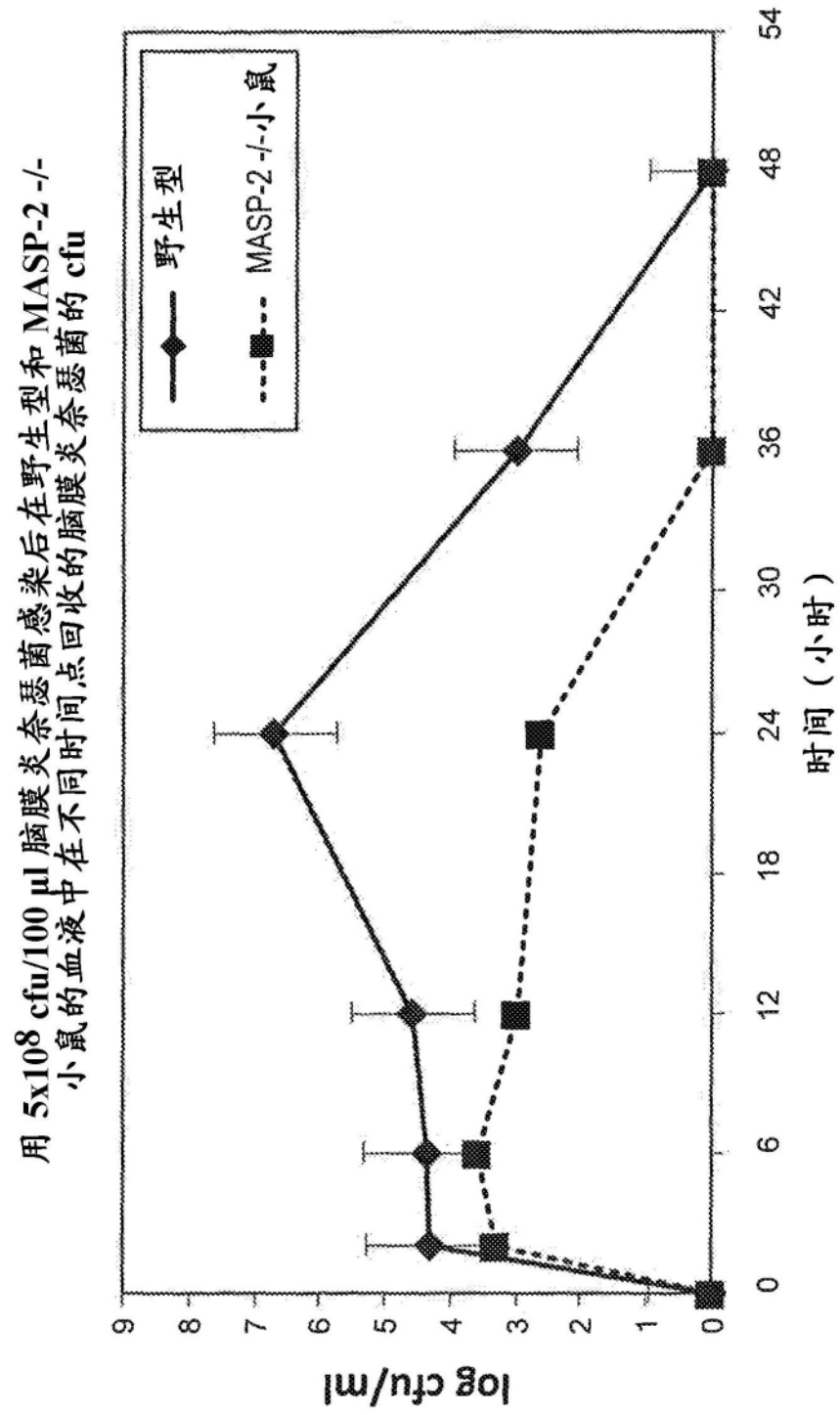


图24B

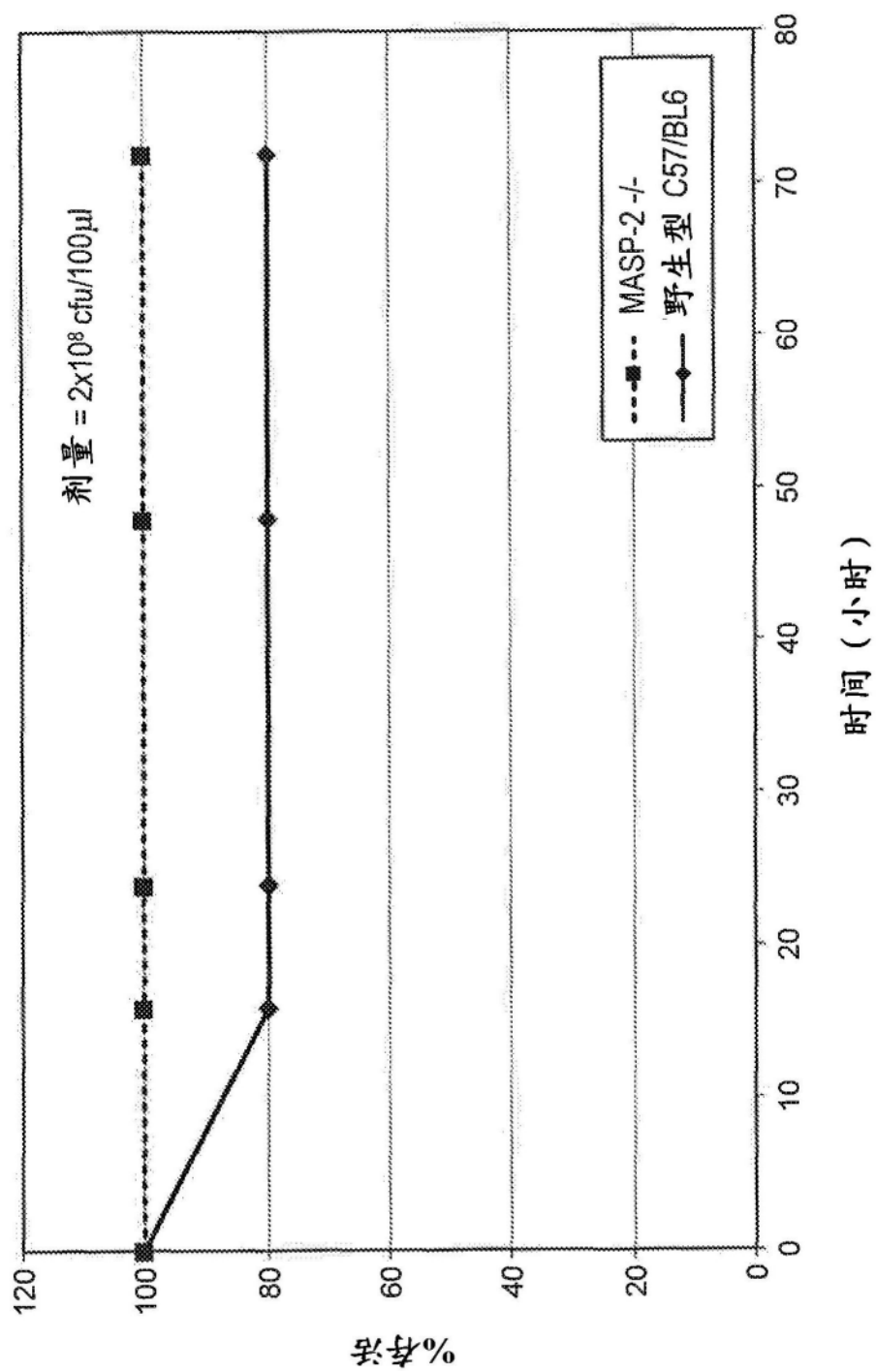


图25A

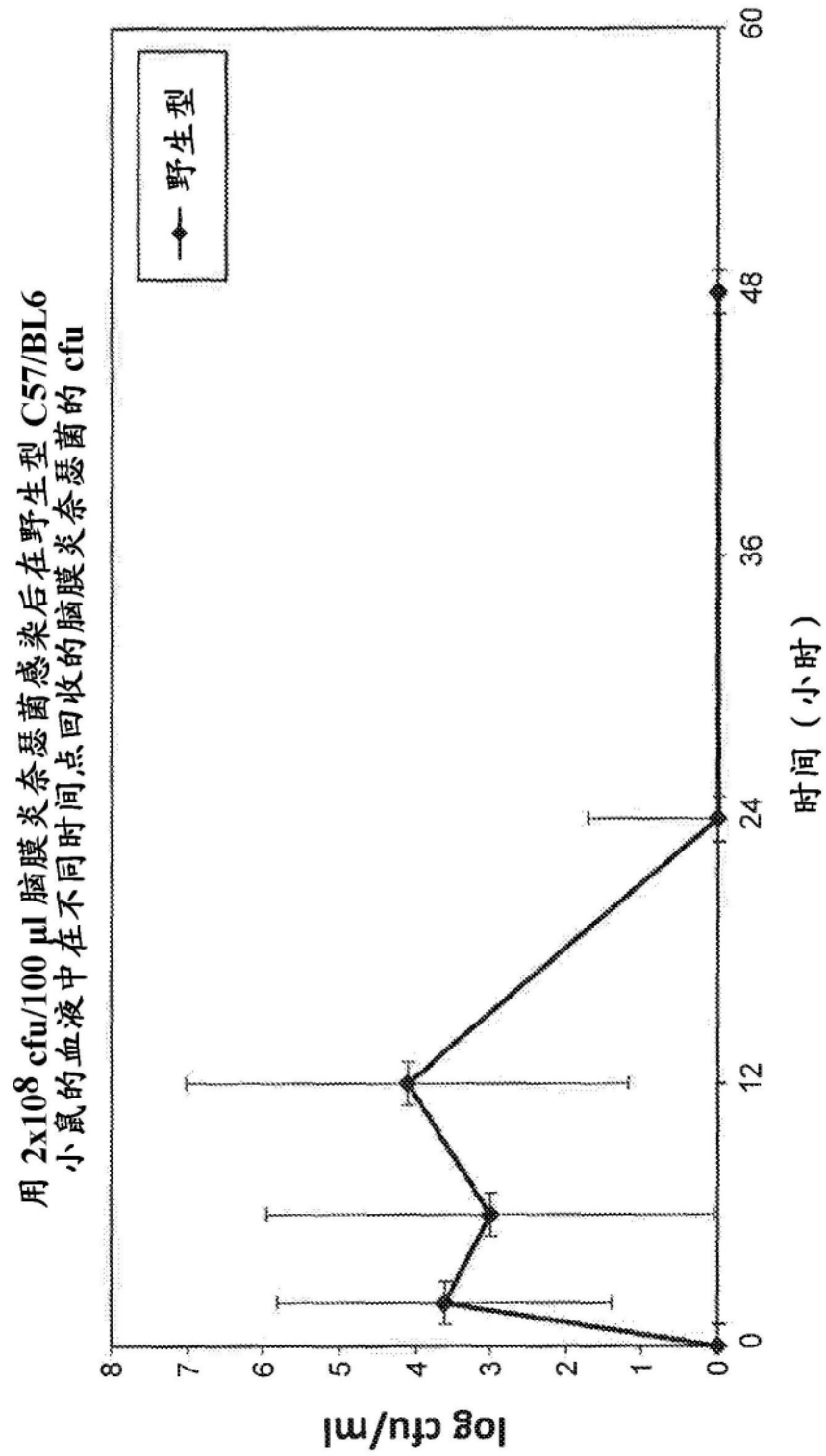


图25B

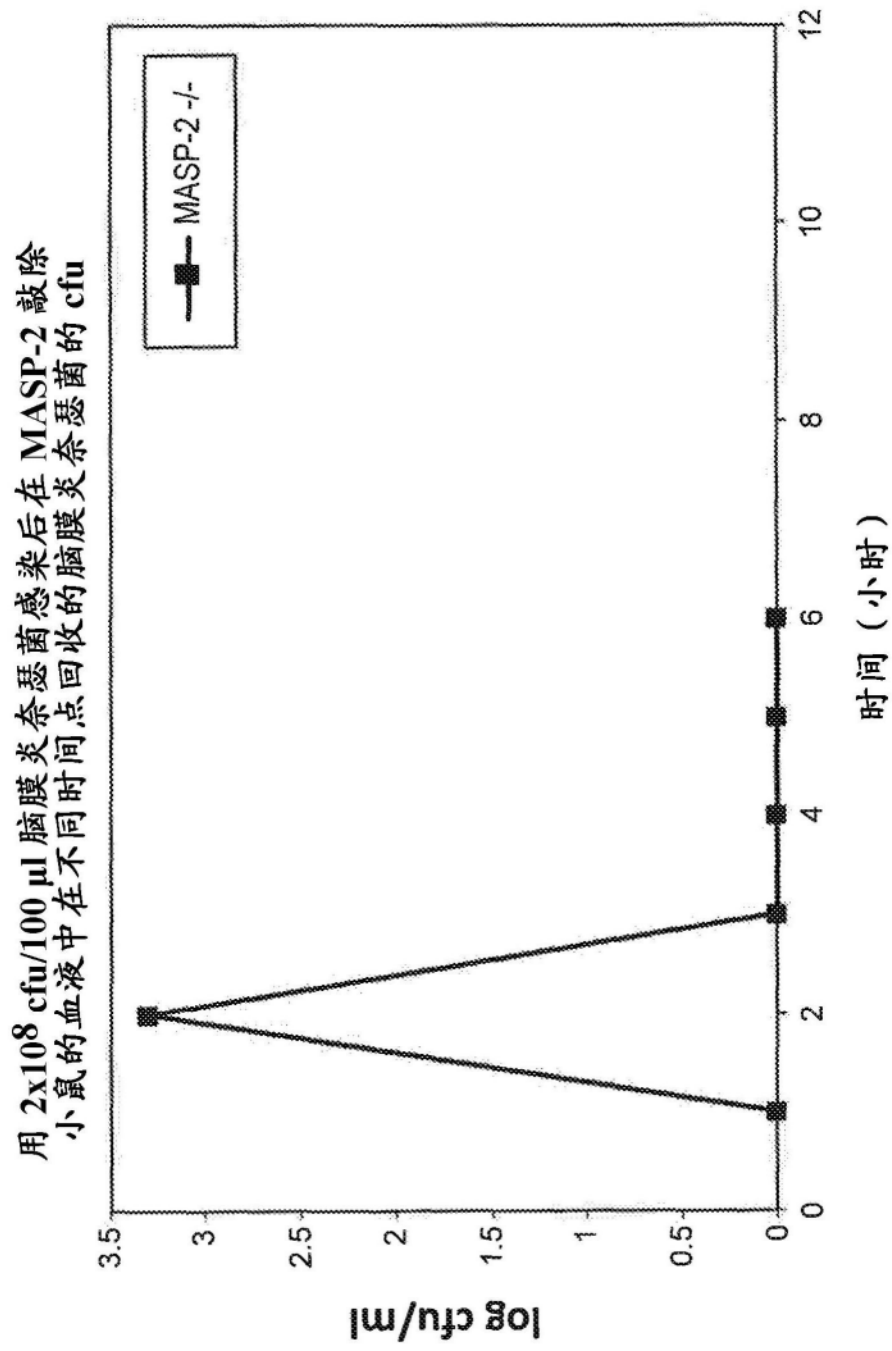


图25C

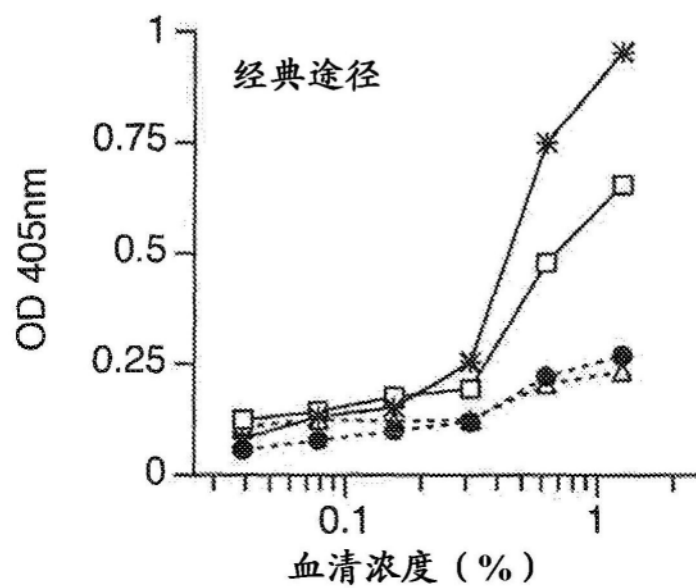


图26A

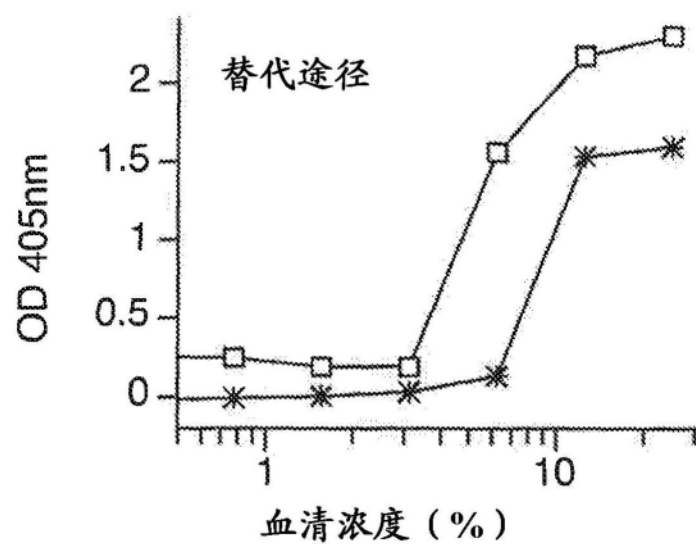


图26B

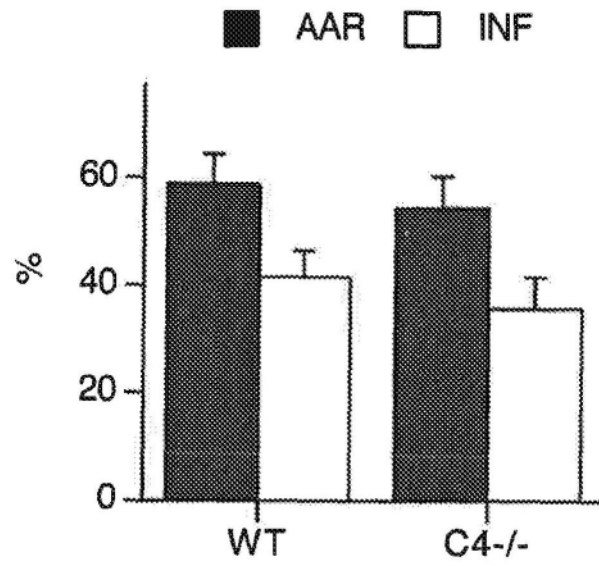


图27A

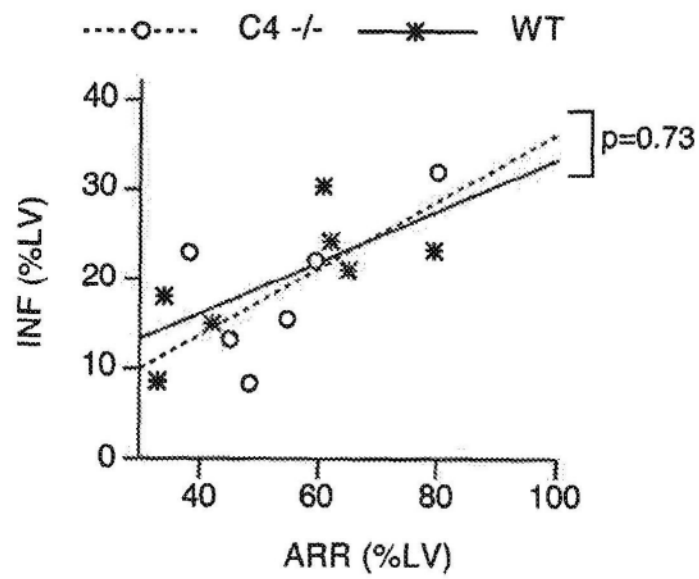


图27B

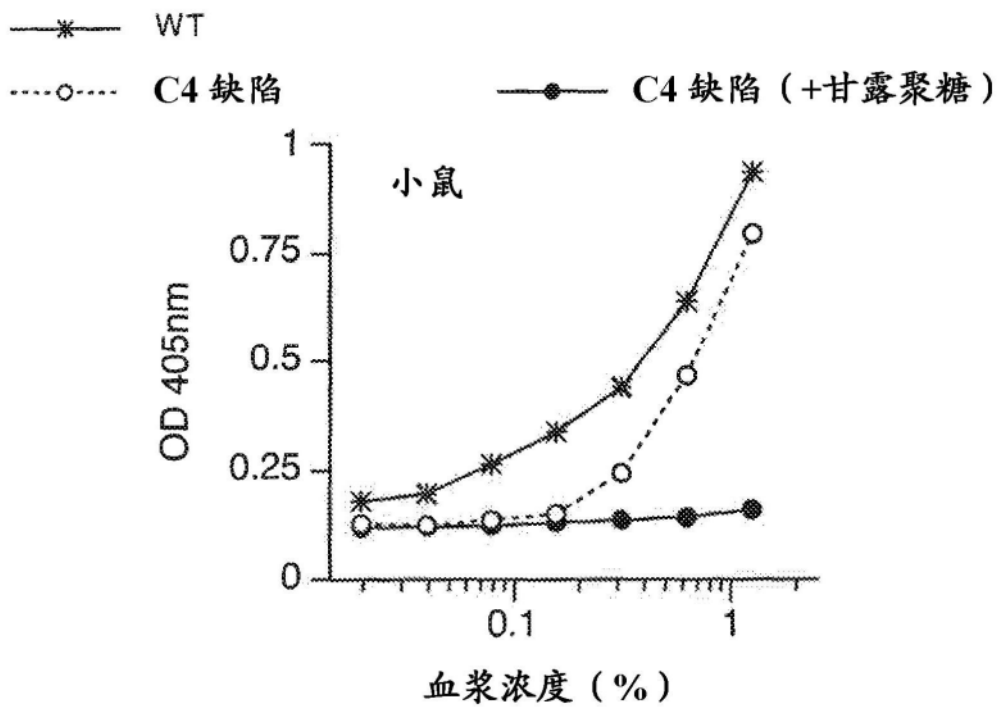


图28A

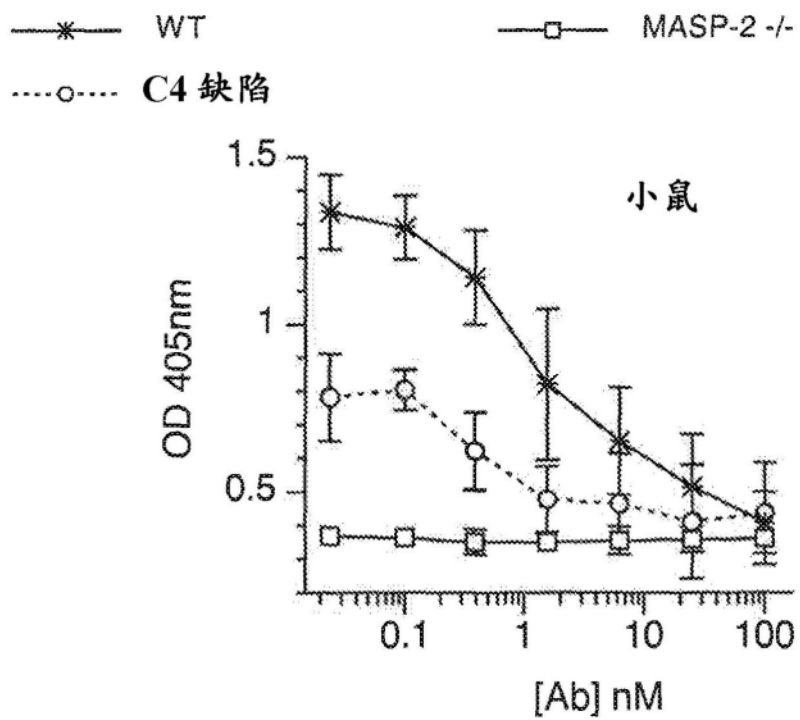


图28B

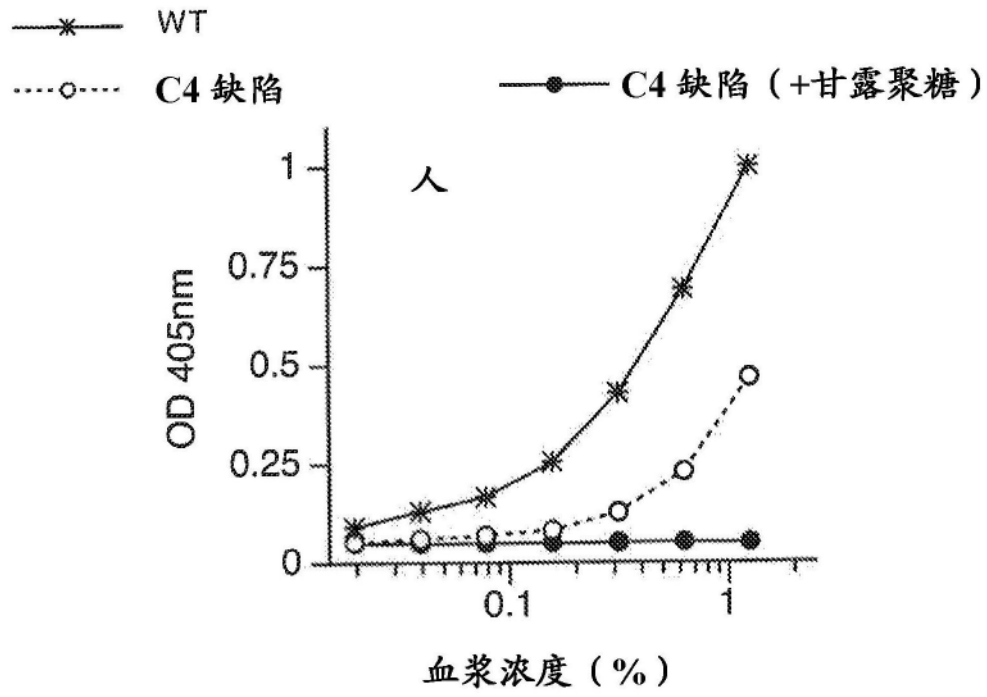


图28C

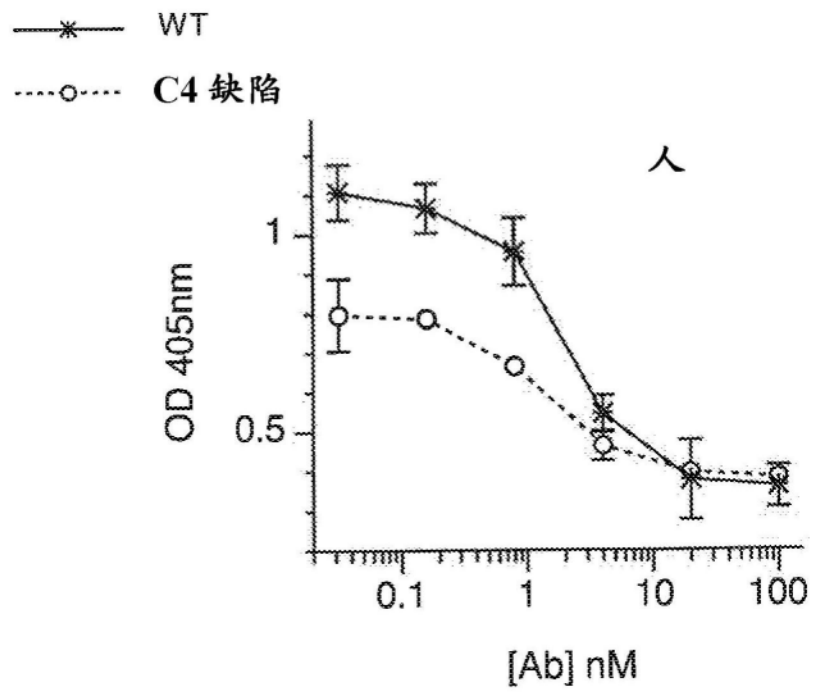


图28D

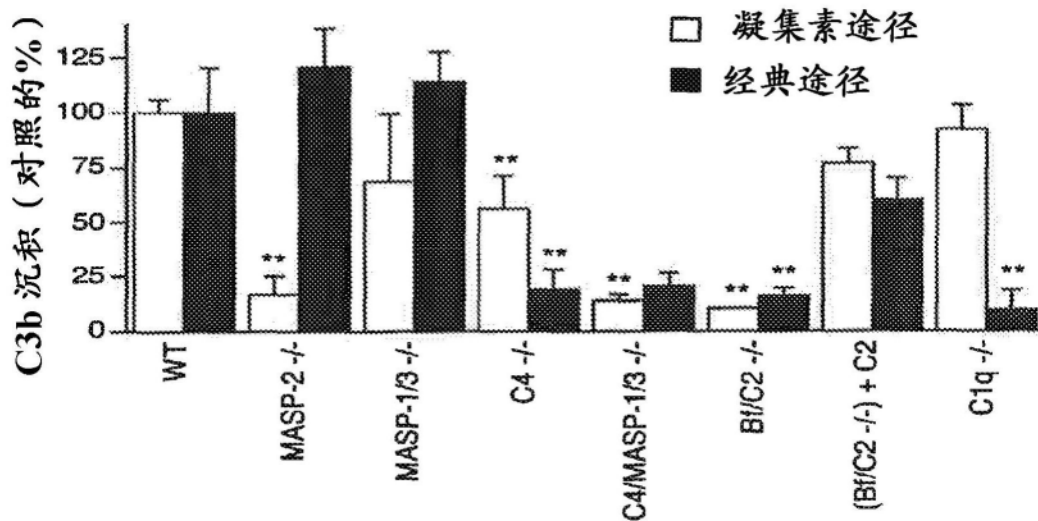


图29A

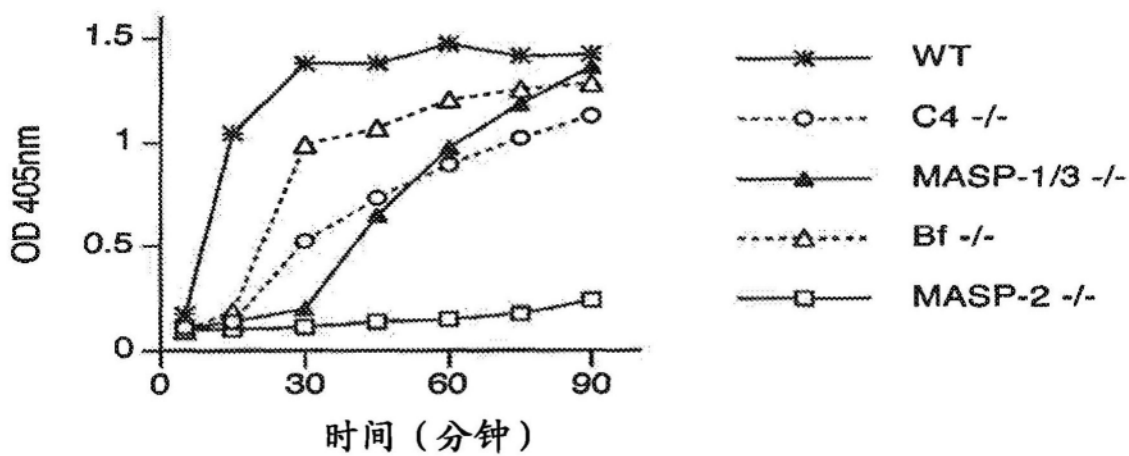


图29B

通过凝血酶底物的
C3 活化

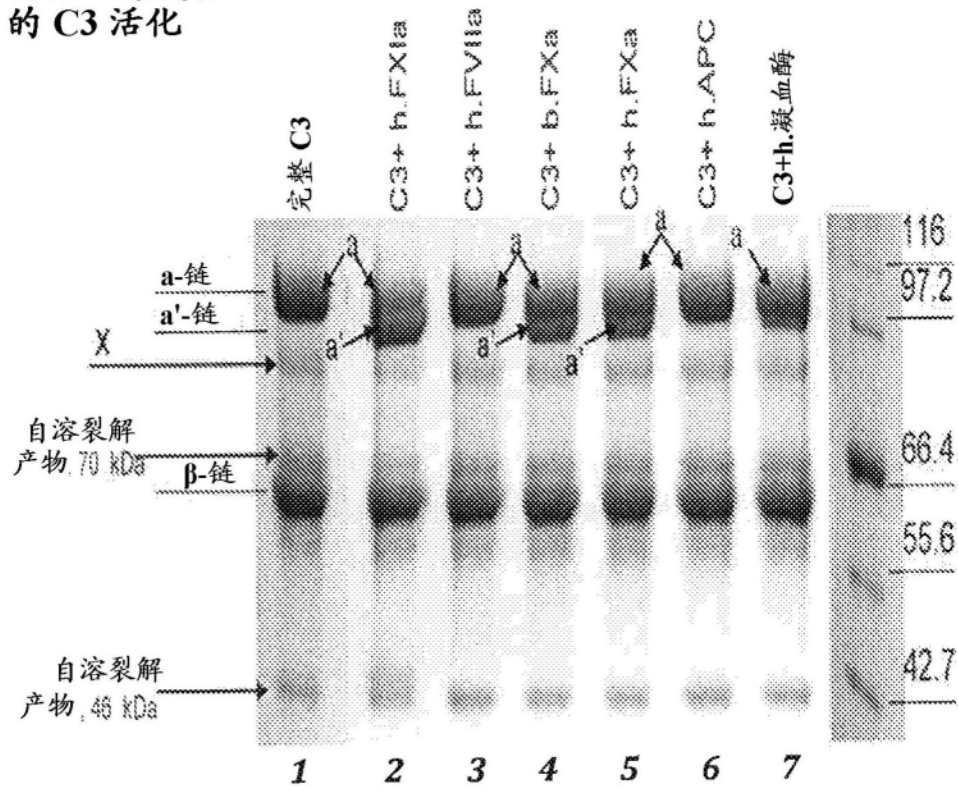


图30

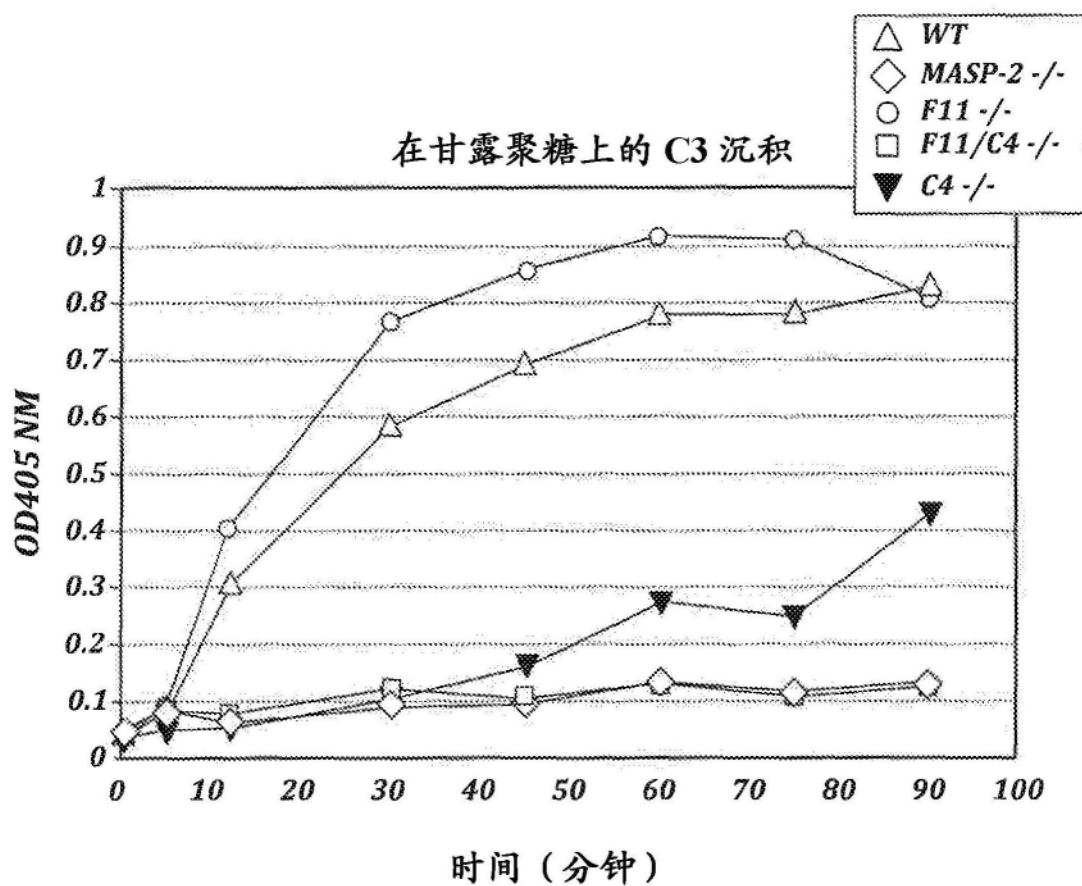


图31

对 7.0 Gy 暴露的存活曲线

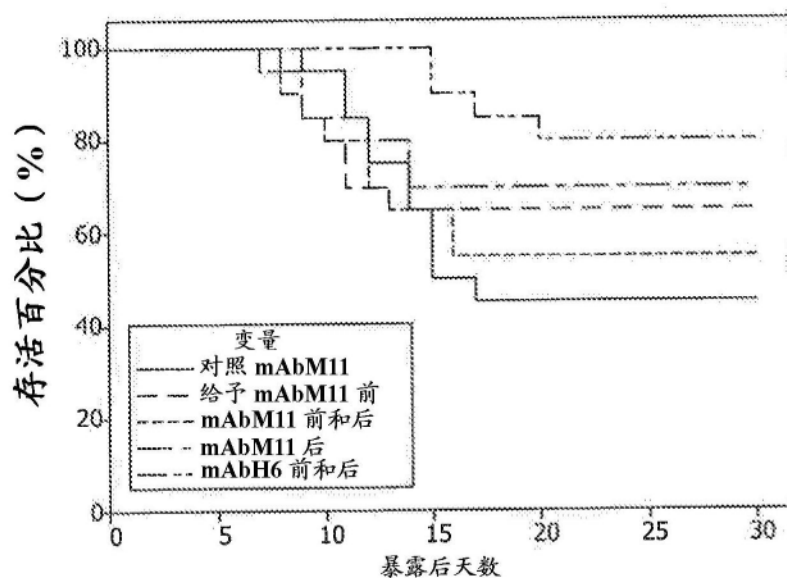


图32A

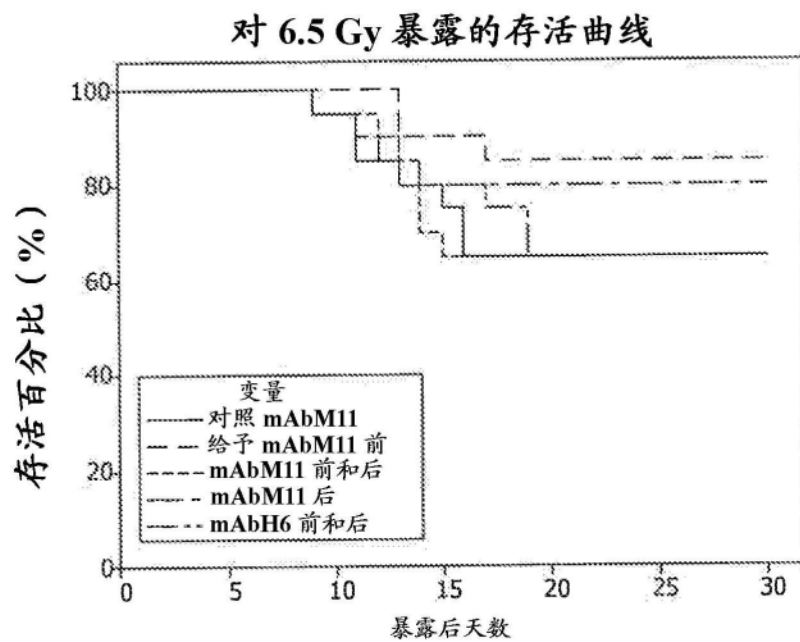


图32B

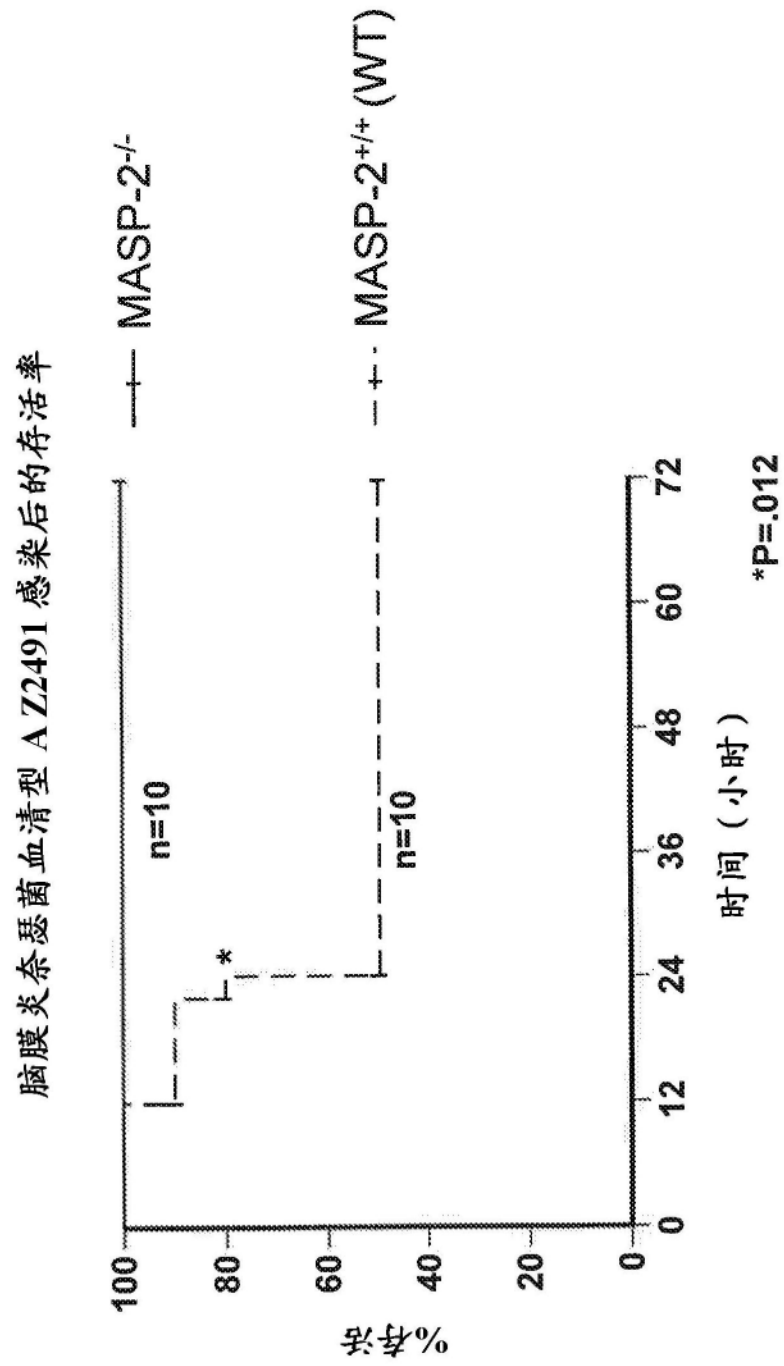


图33

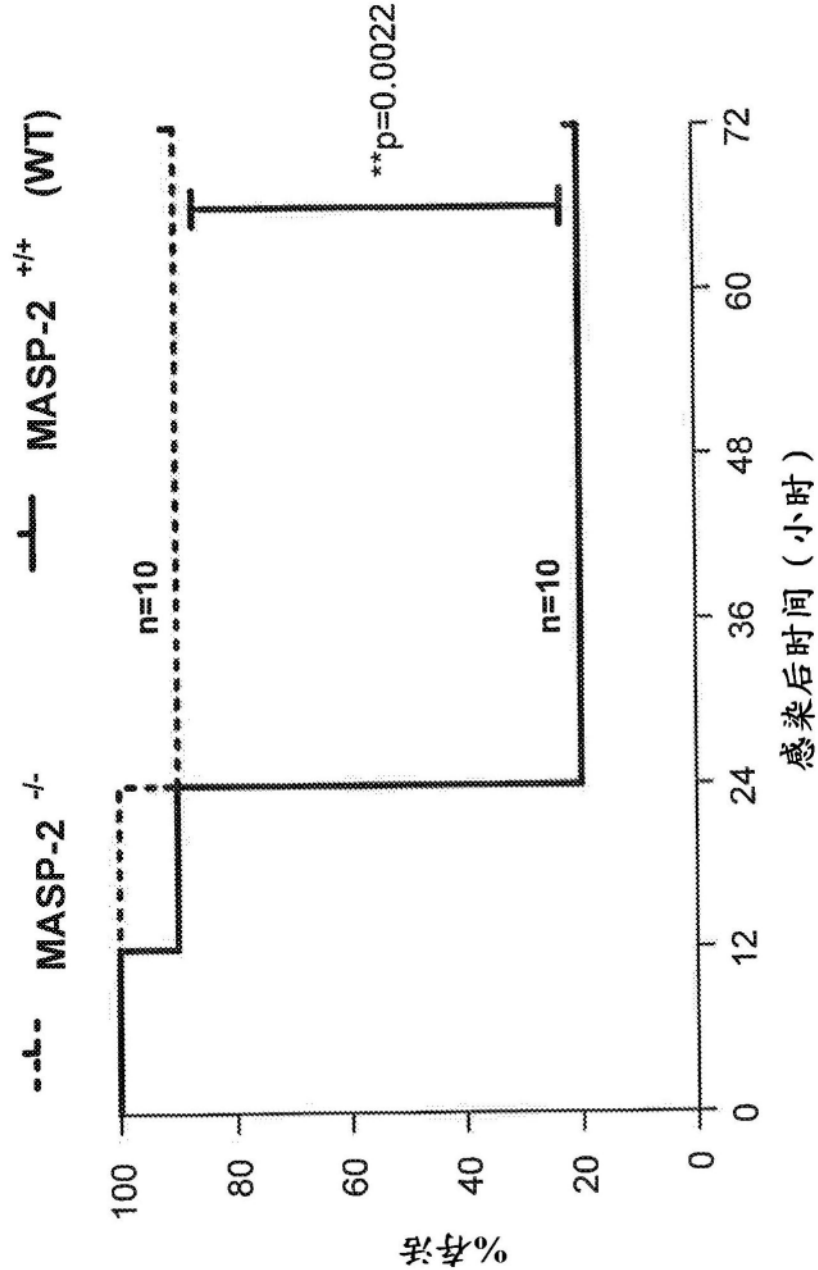


图34

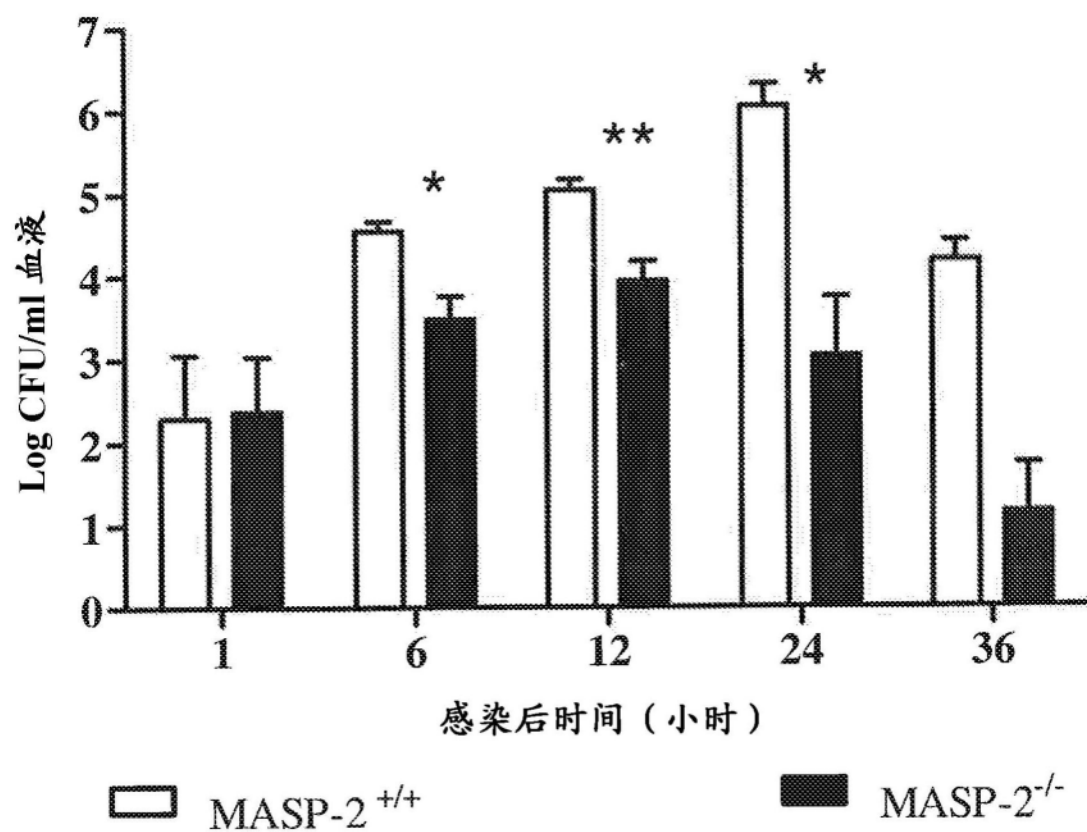


图35

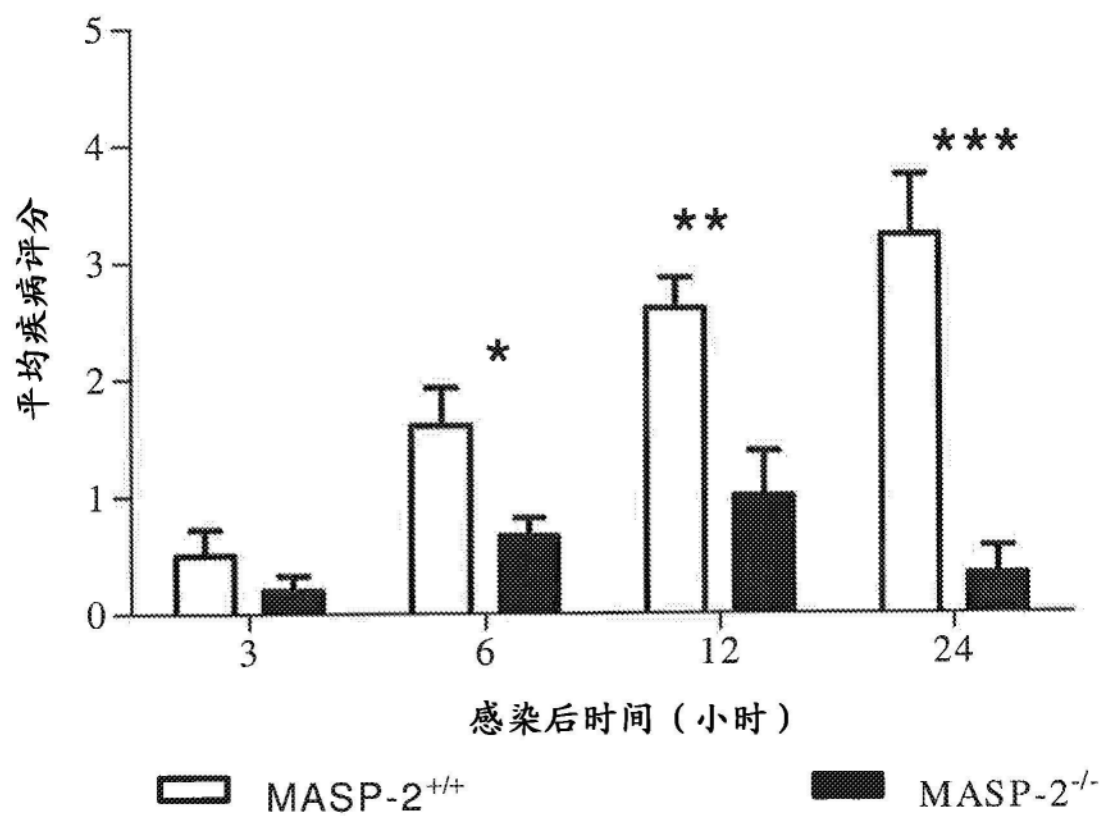


图36

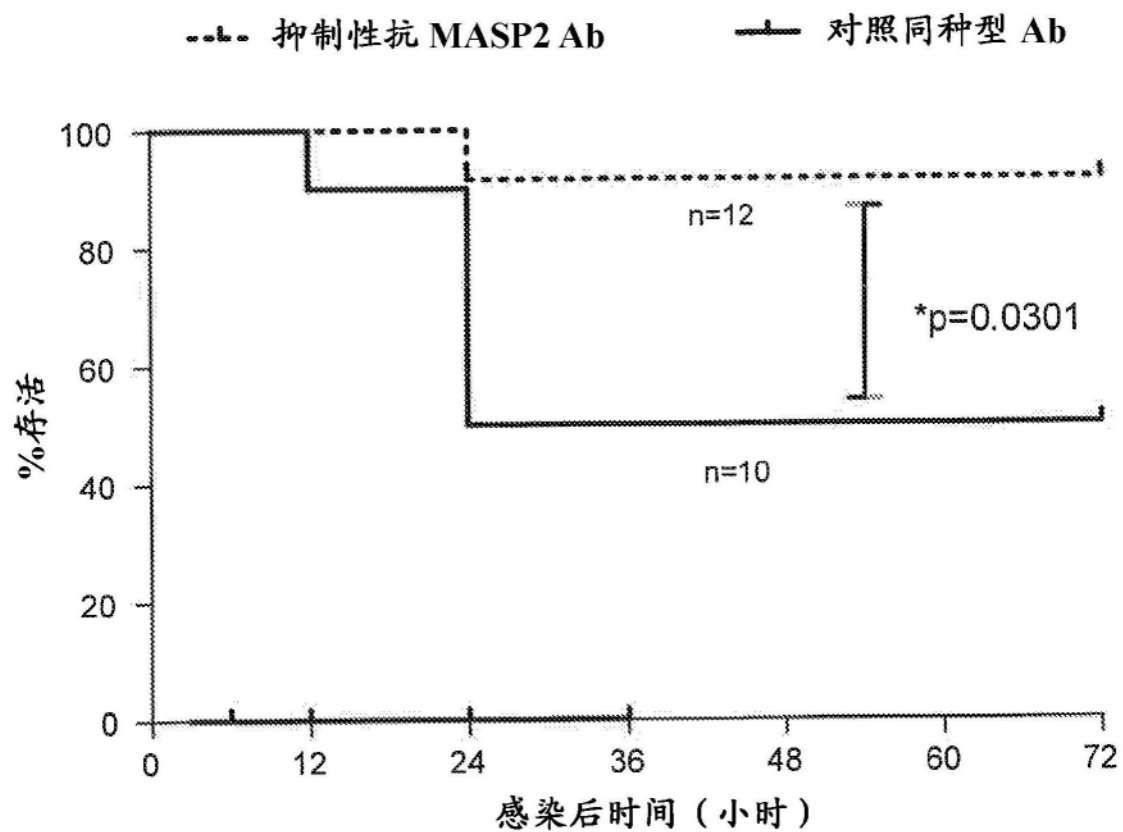


图37

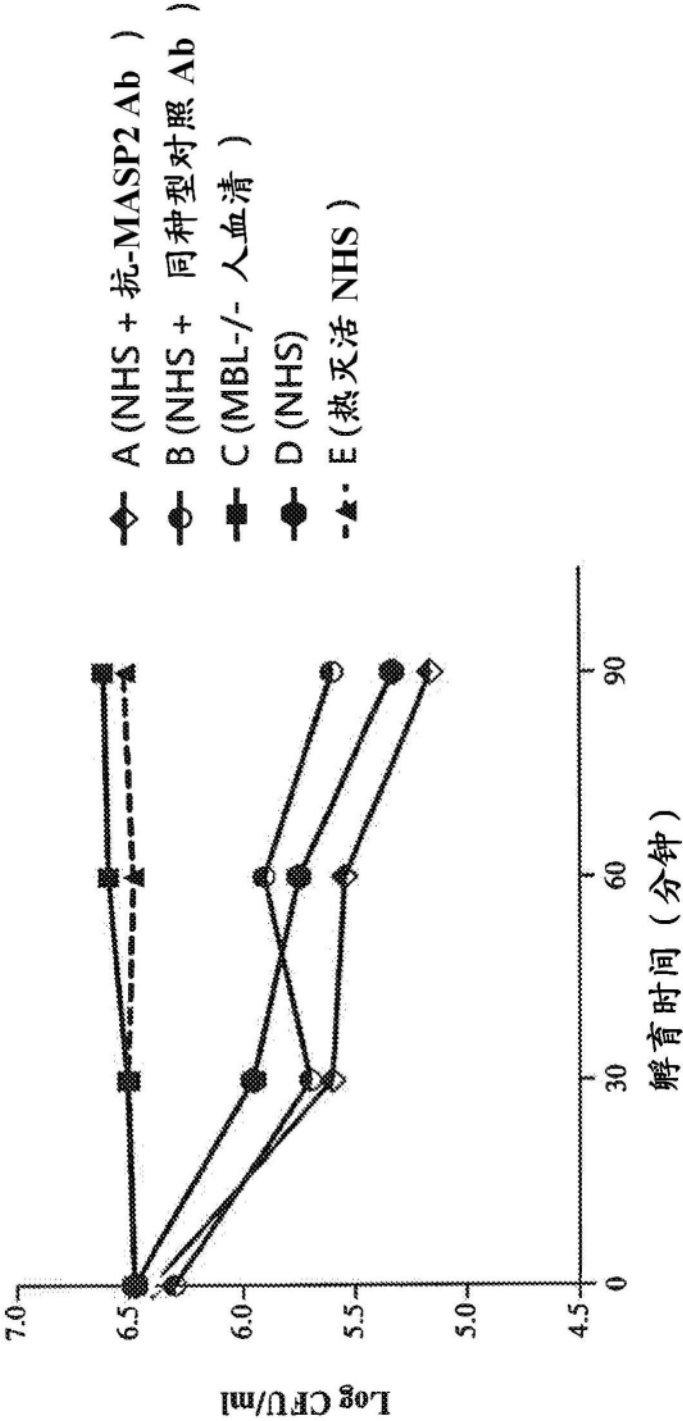


图38

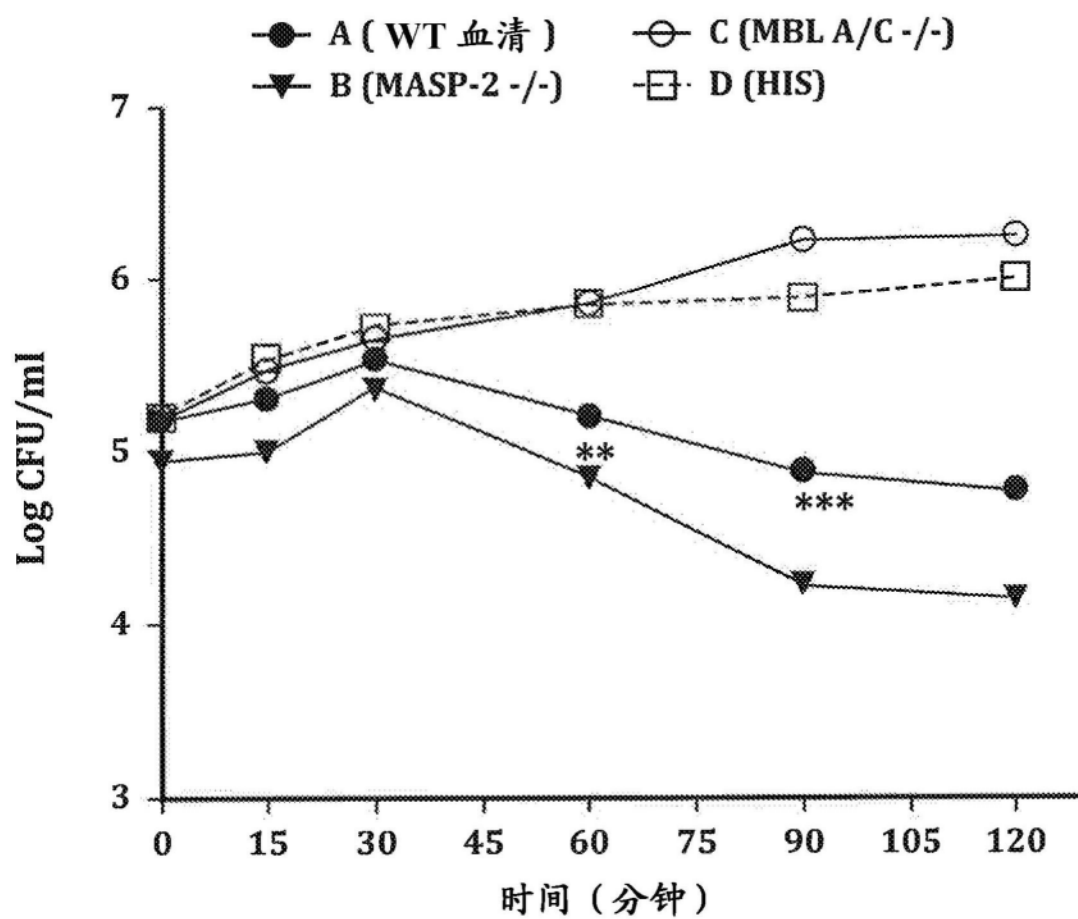


图39

甘露聚糖-包被的鼠 RBC 被人血清溶血

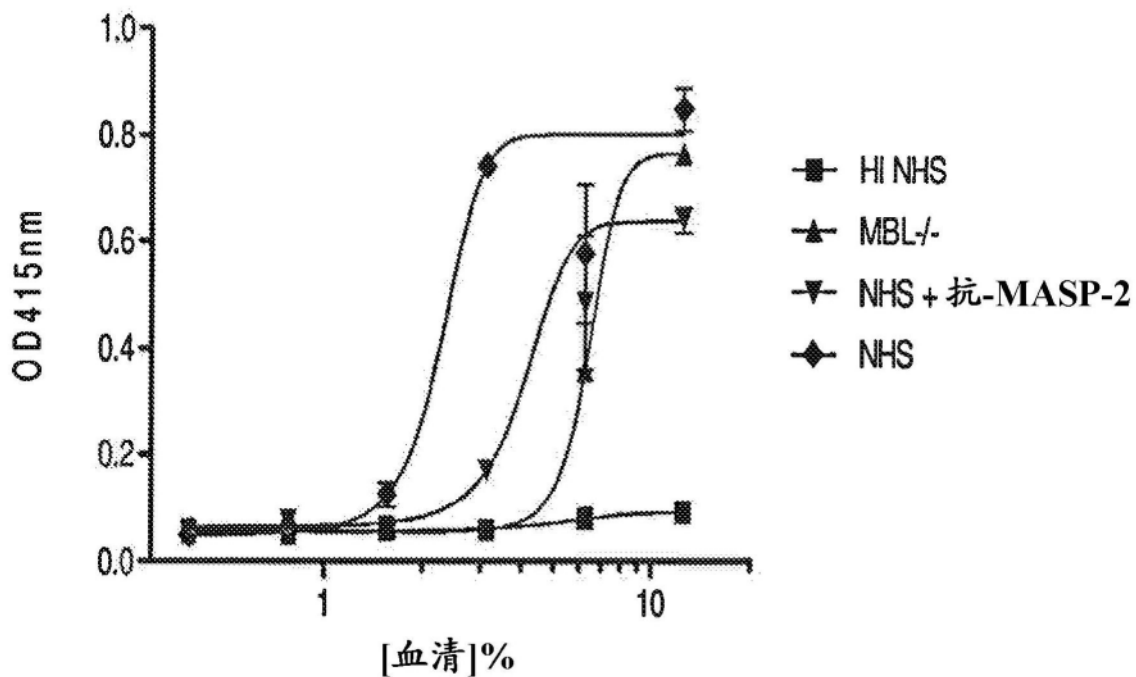


图40

WT 鼠 RBC 被人血清溶血

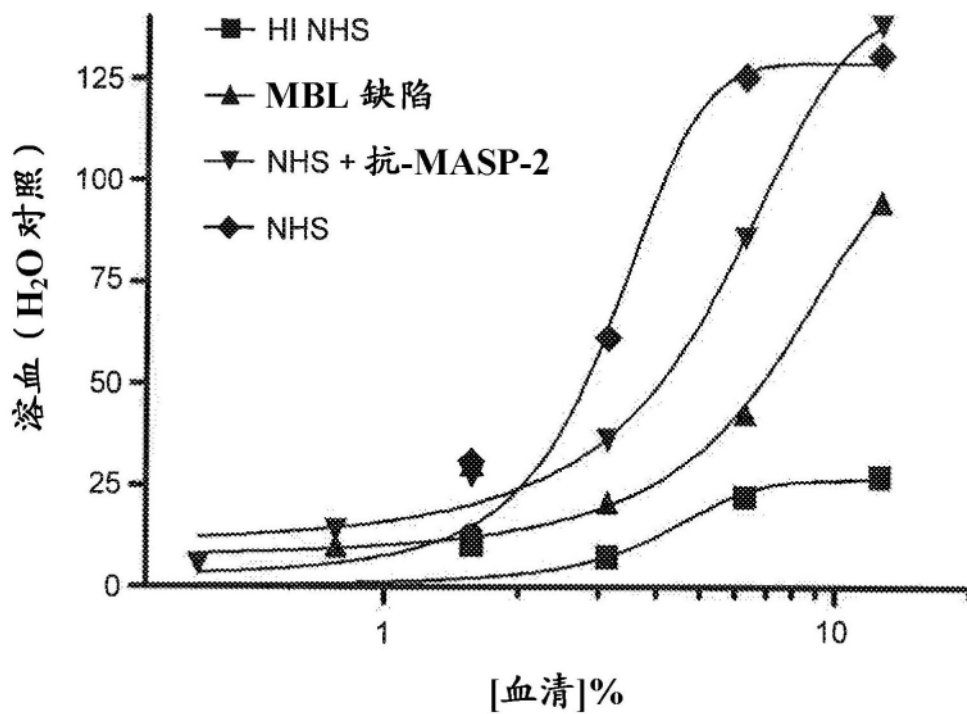


图41

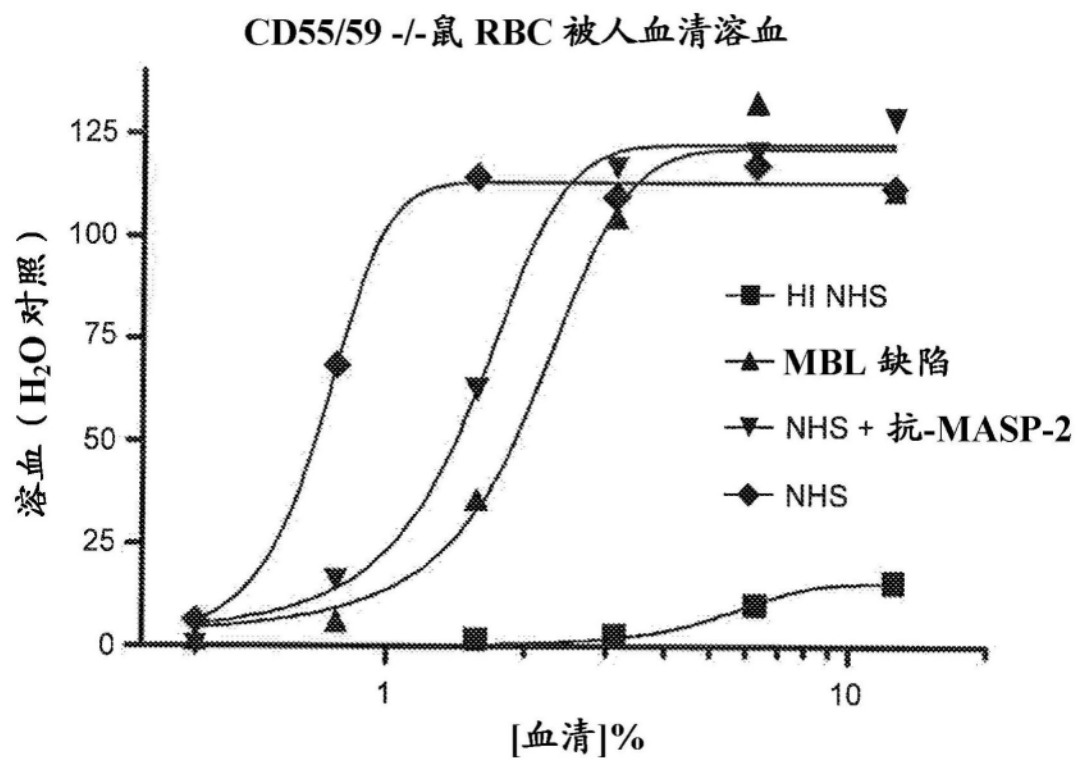


图42

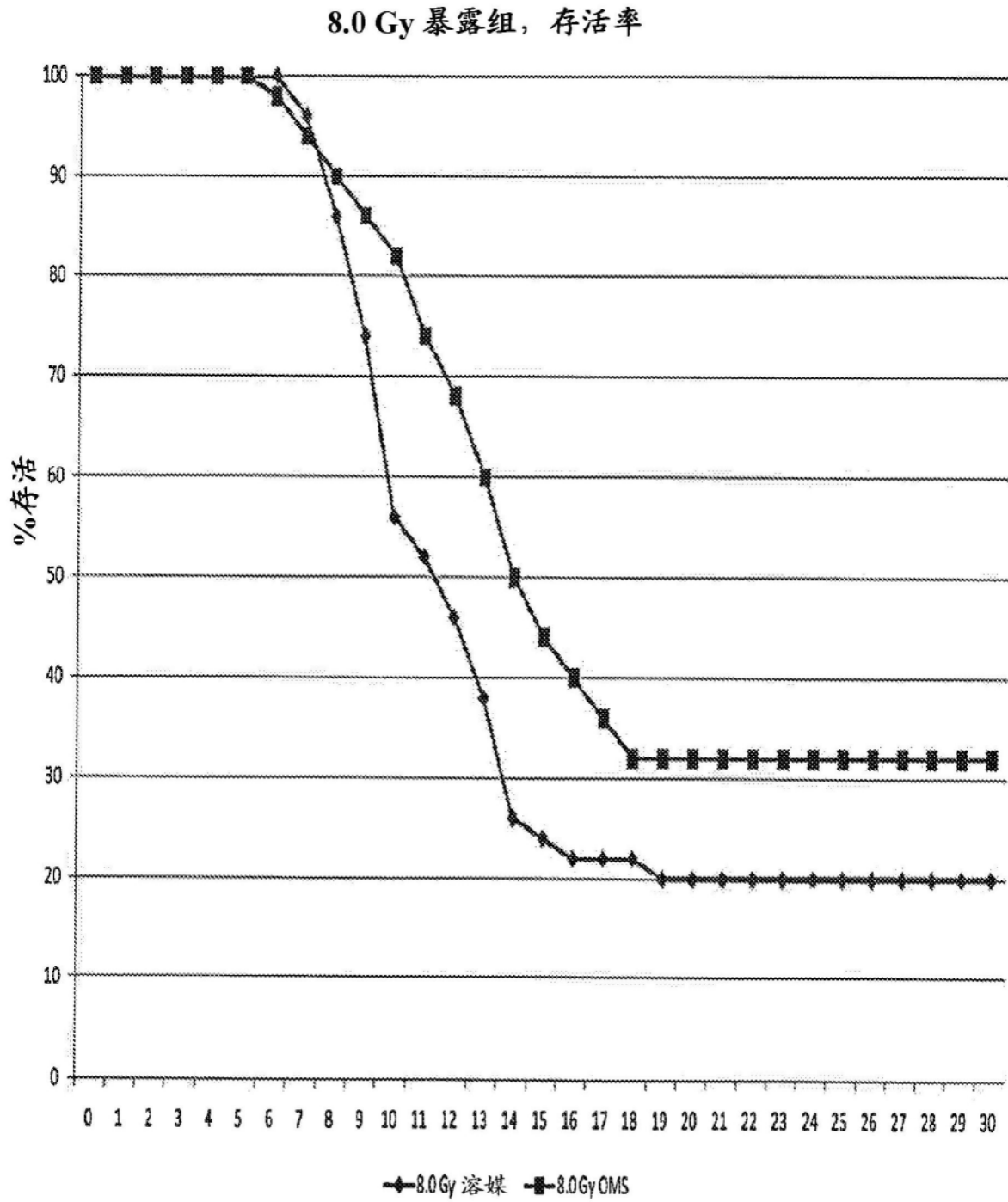


图43

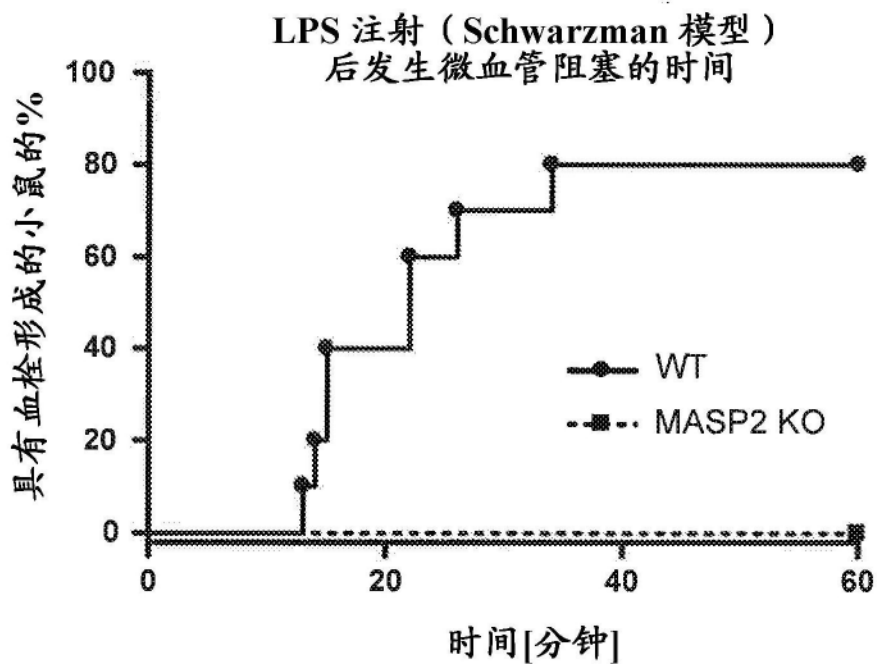


图44

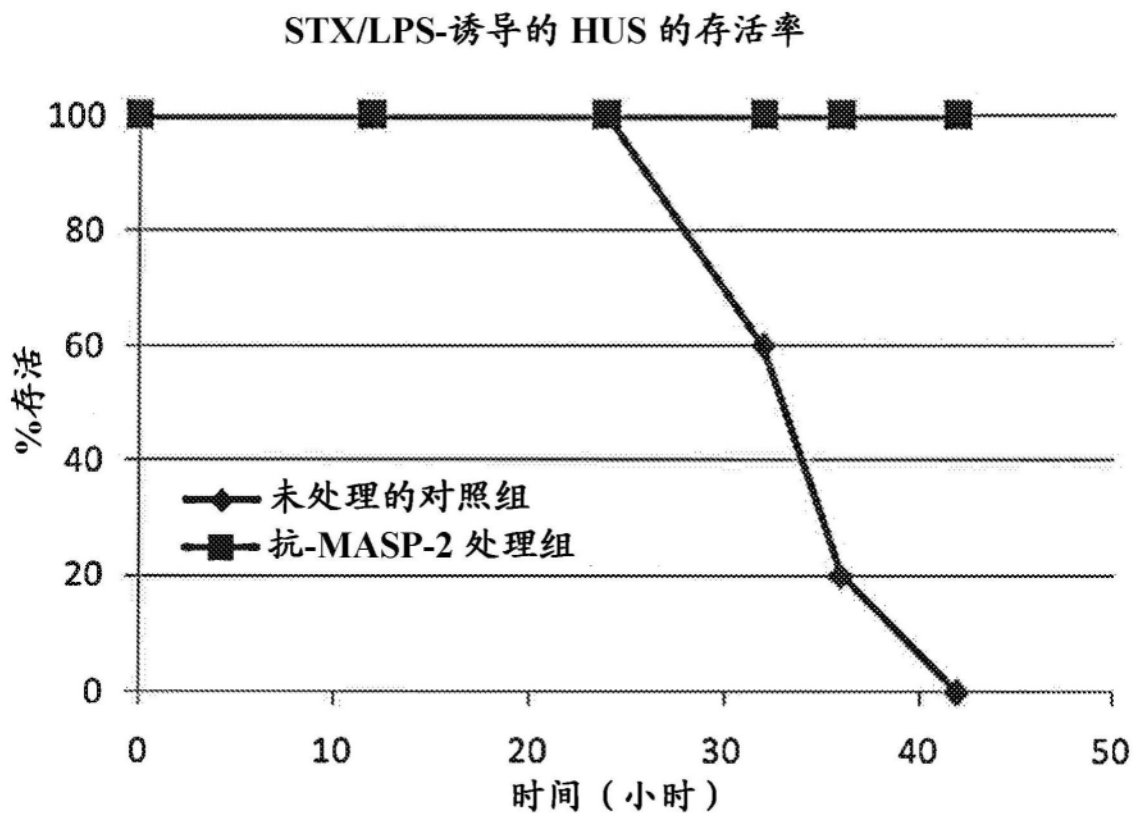


图45

在 FITC-葡聚糖诱导的血栓性
微血管病的小鼠模型中 mAbH6
抑制血栓形成

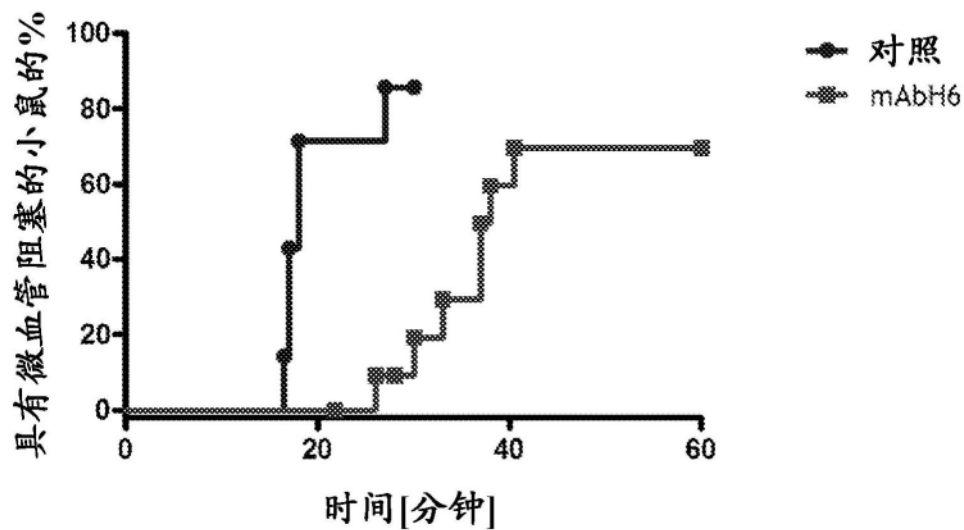


图46

FITC 处理

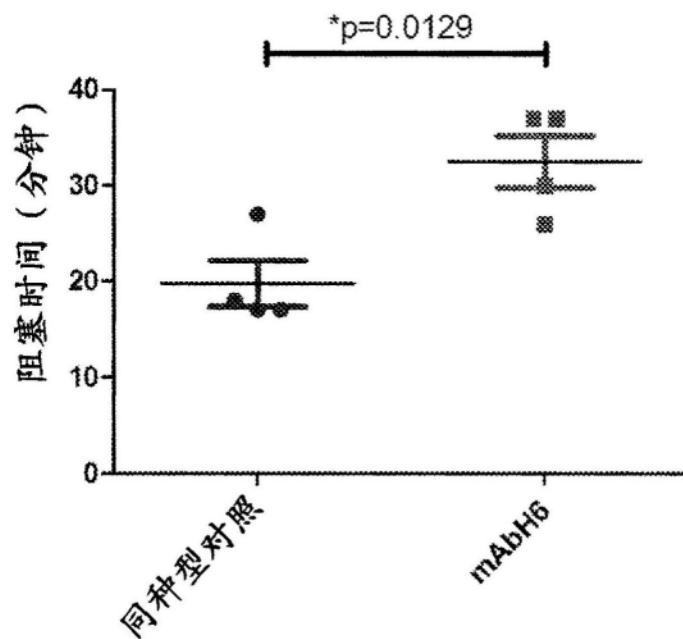


图47

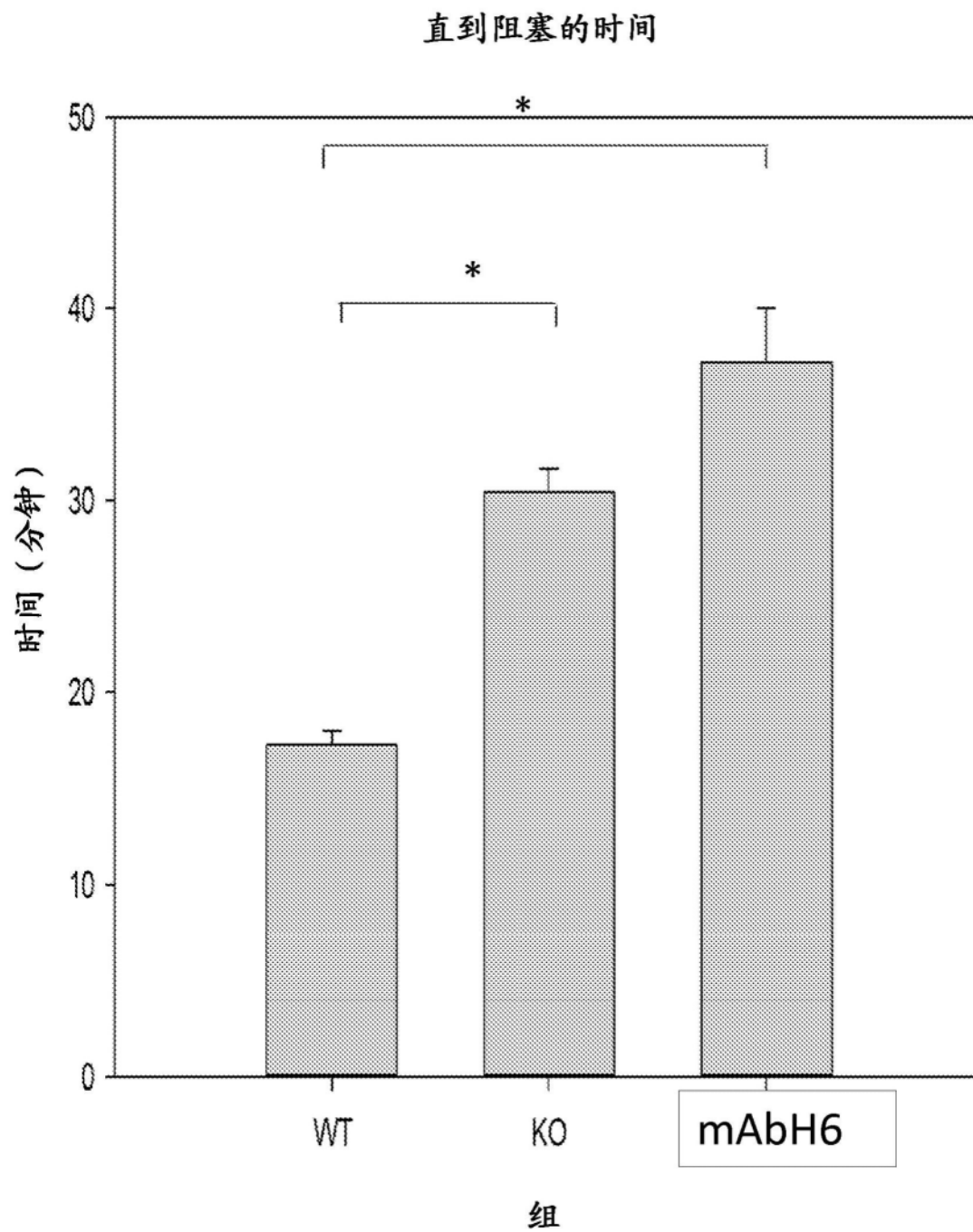


图48

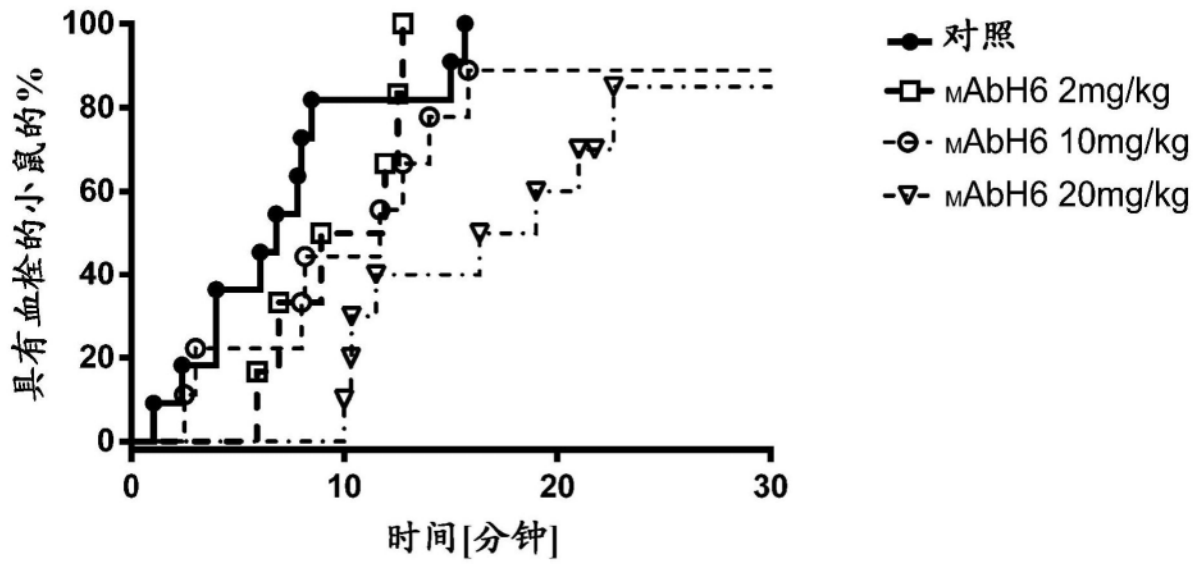


图49

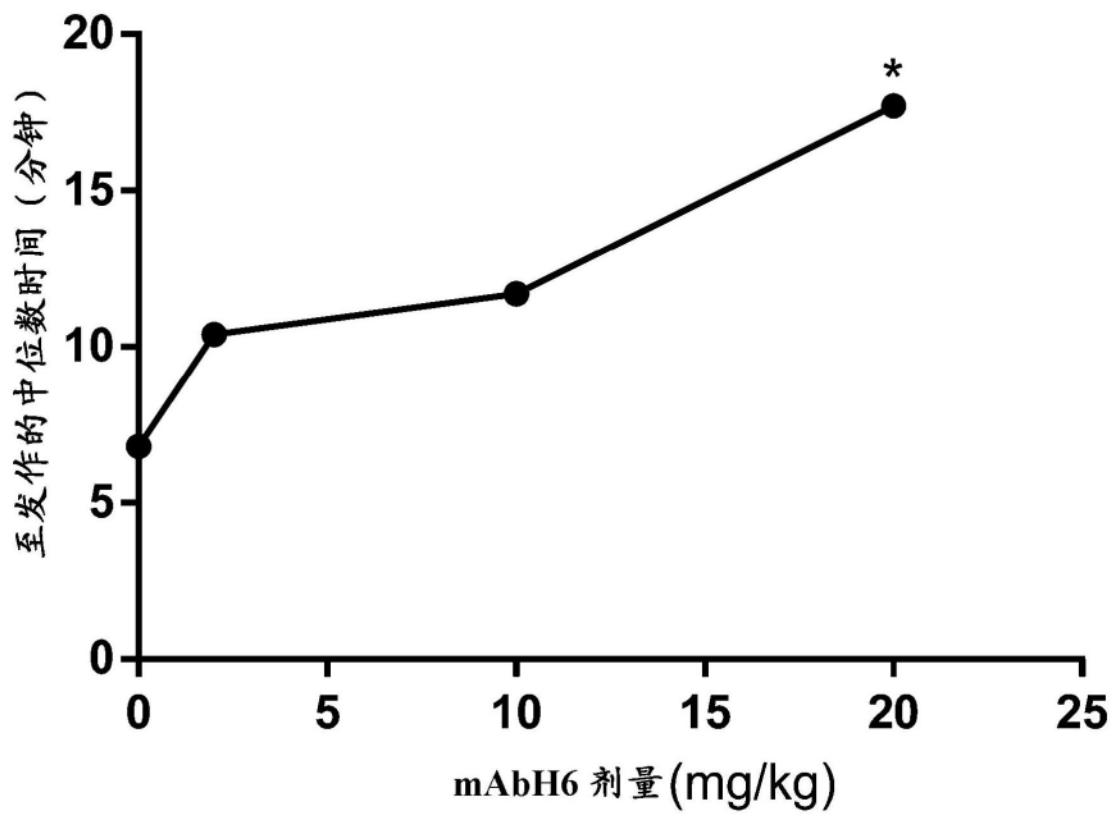


图50

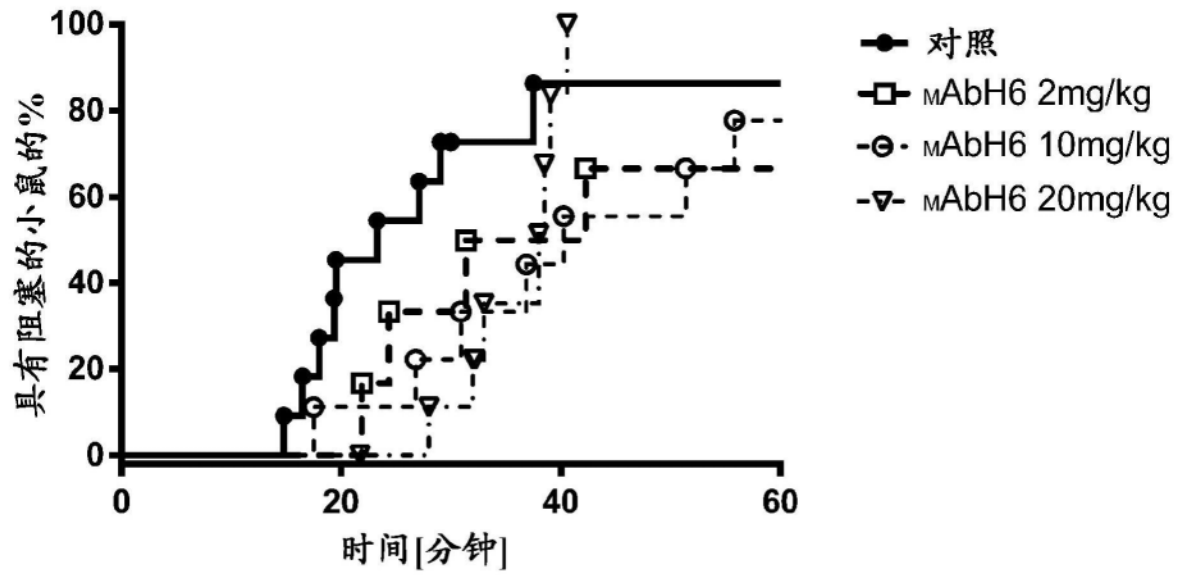


图51

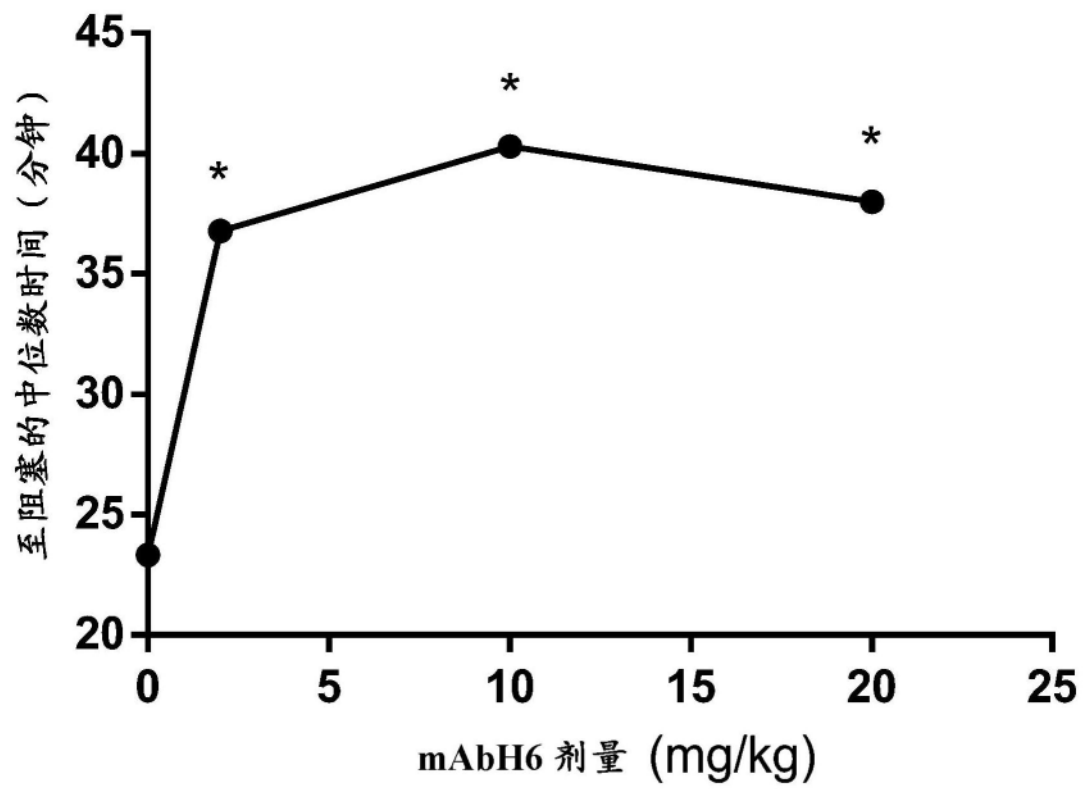


图52

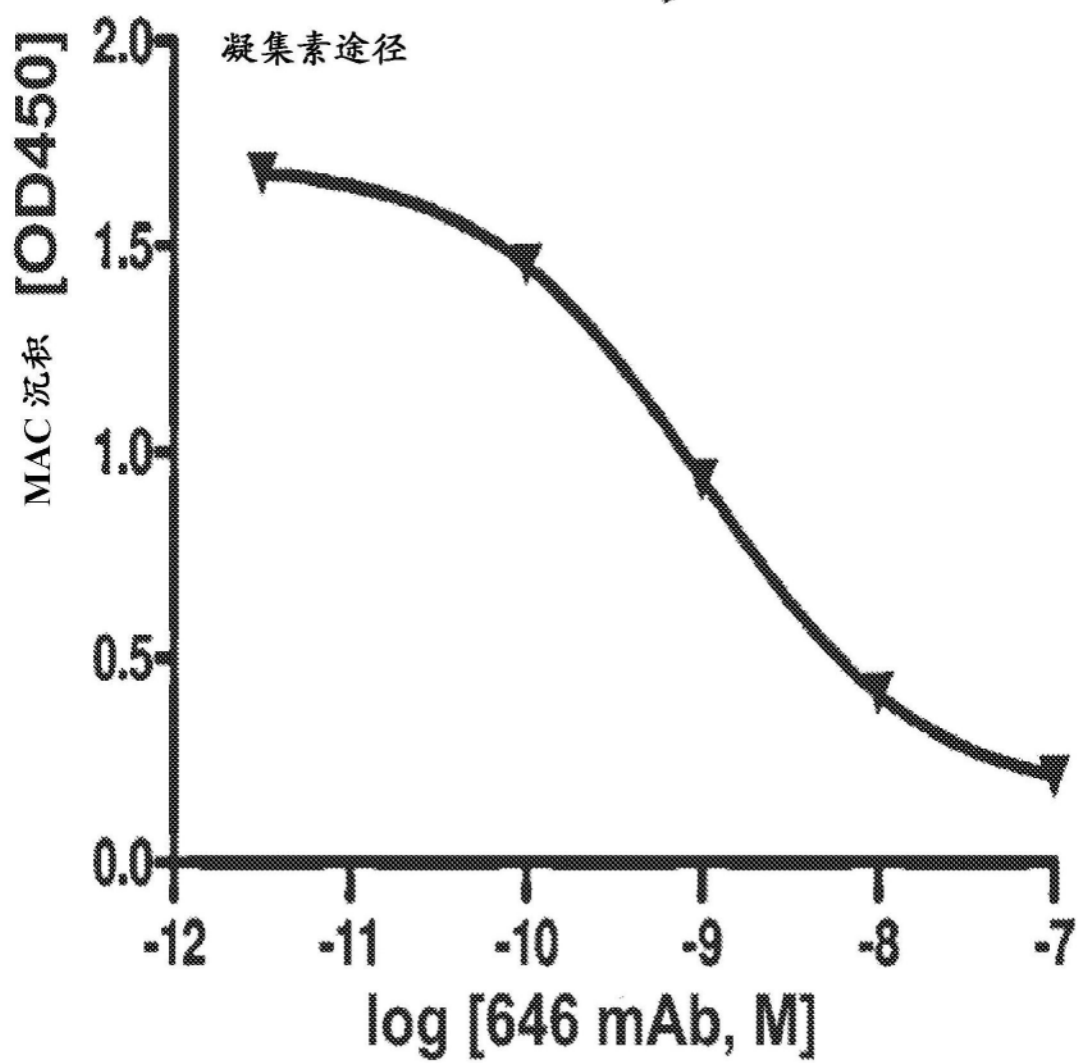


图53A

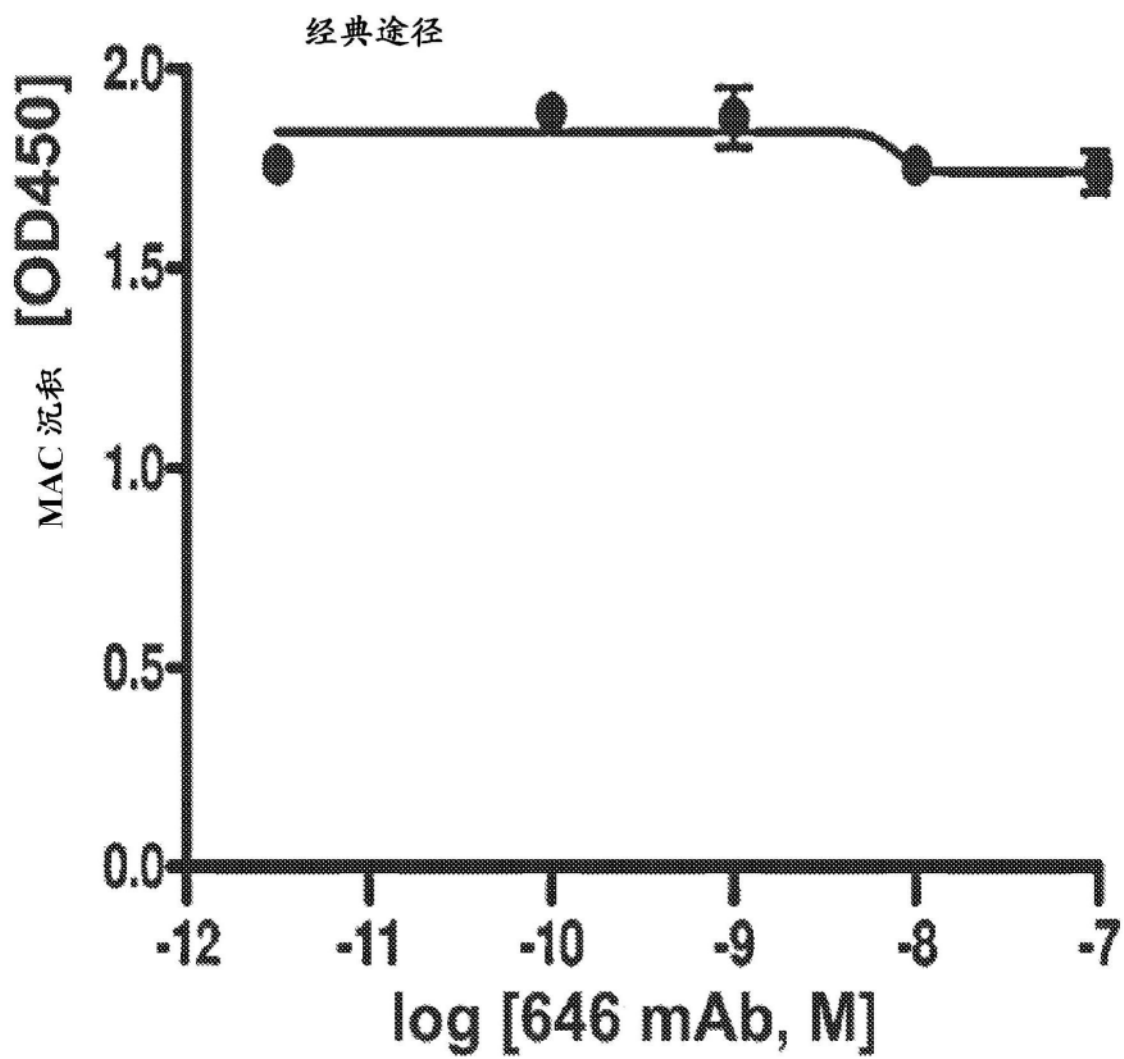


图53B

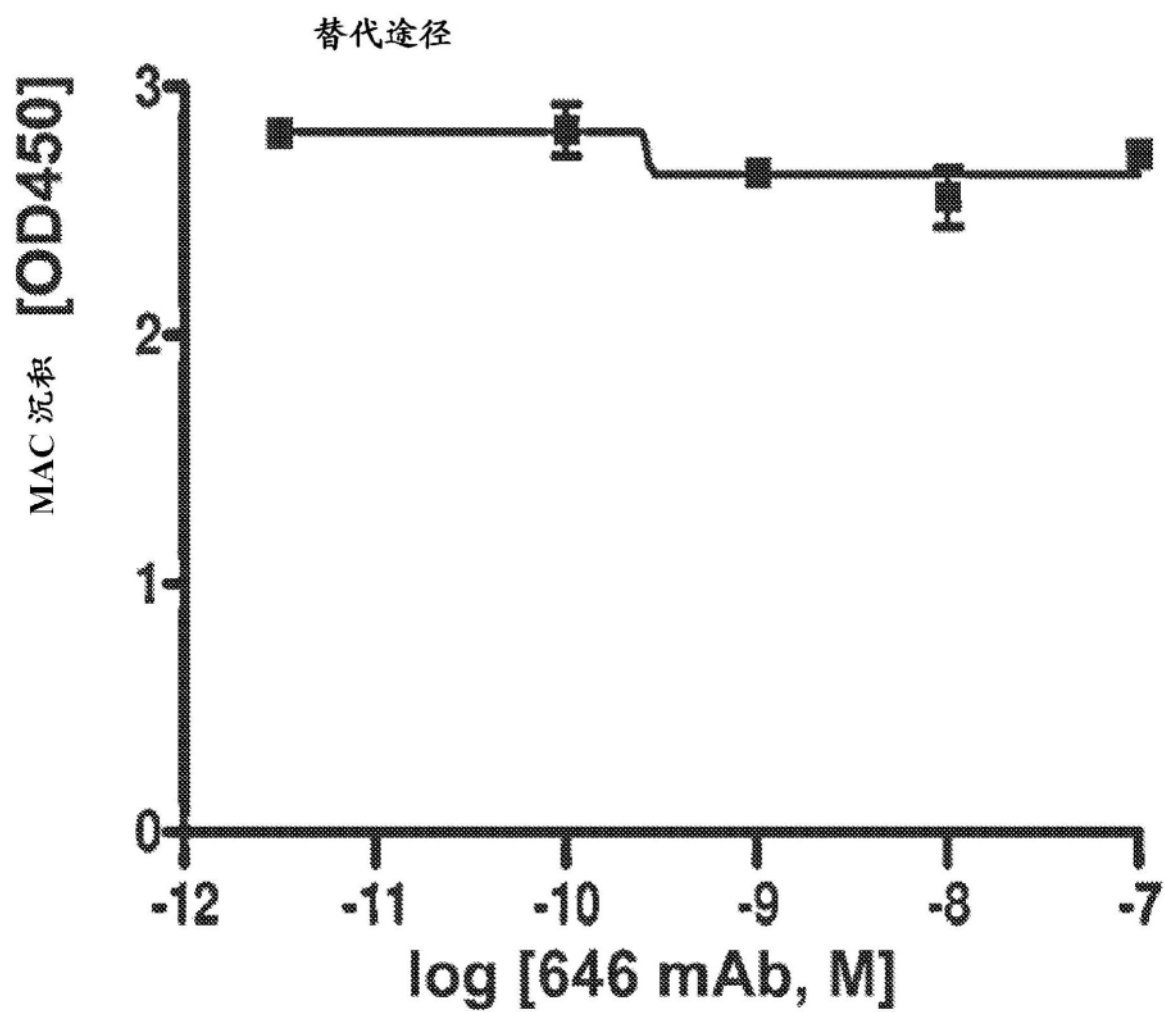


图53C

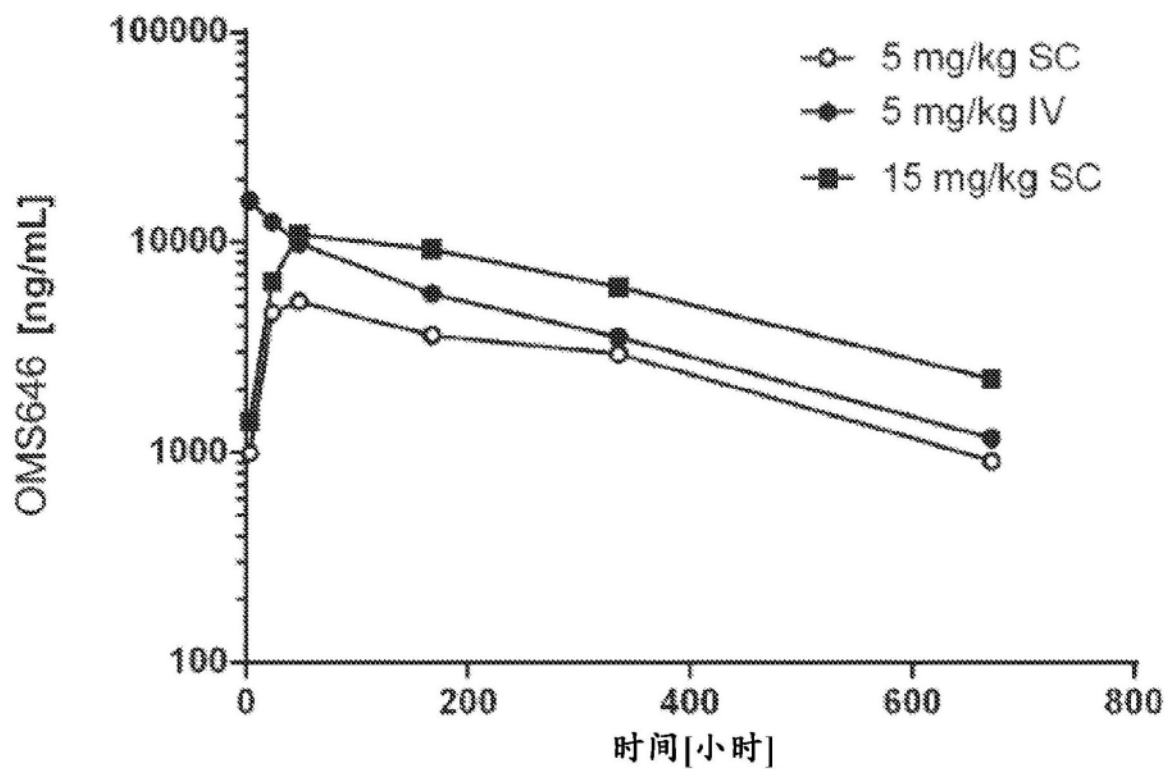


图54

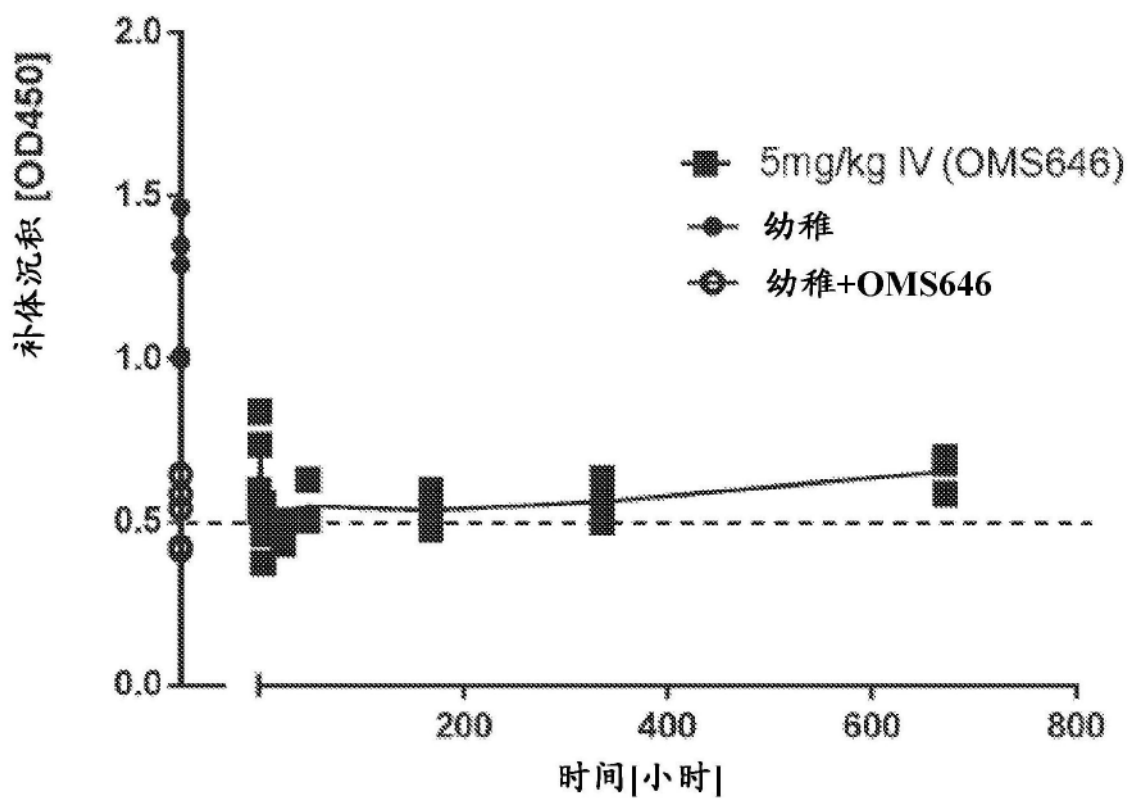


图55A

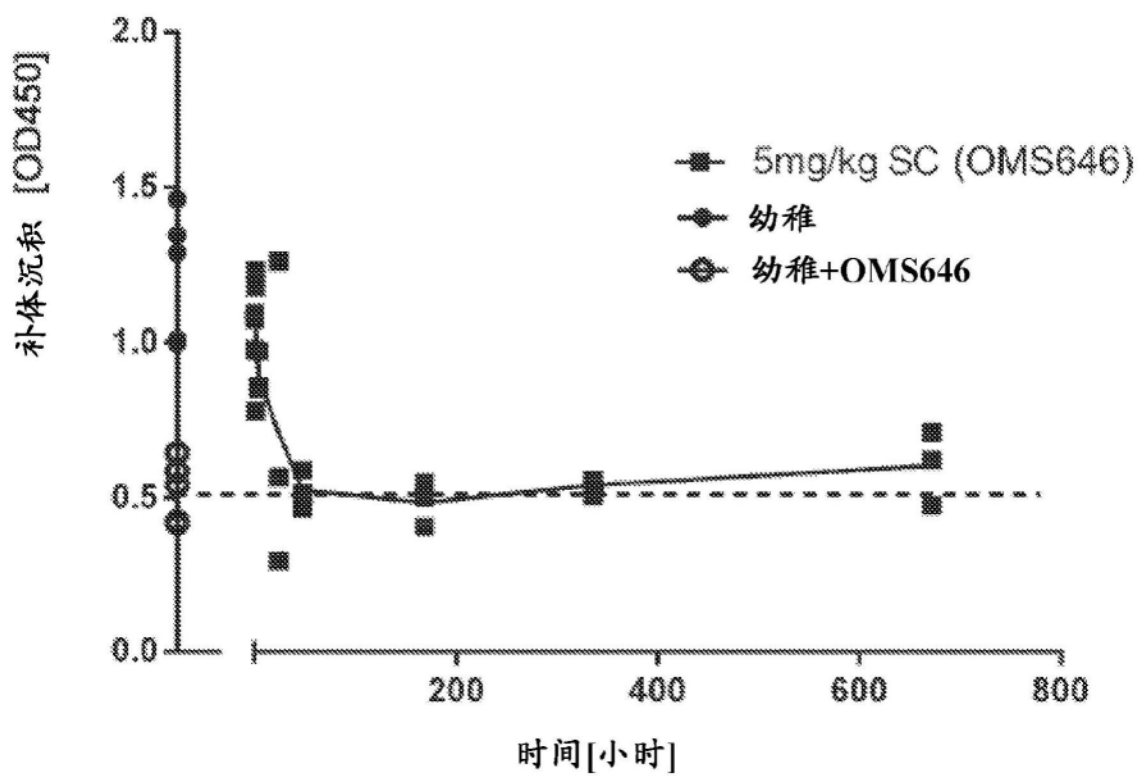


图55B

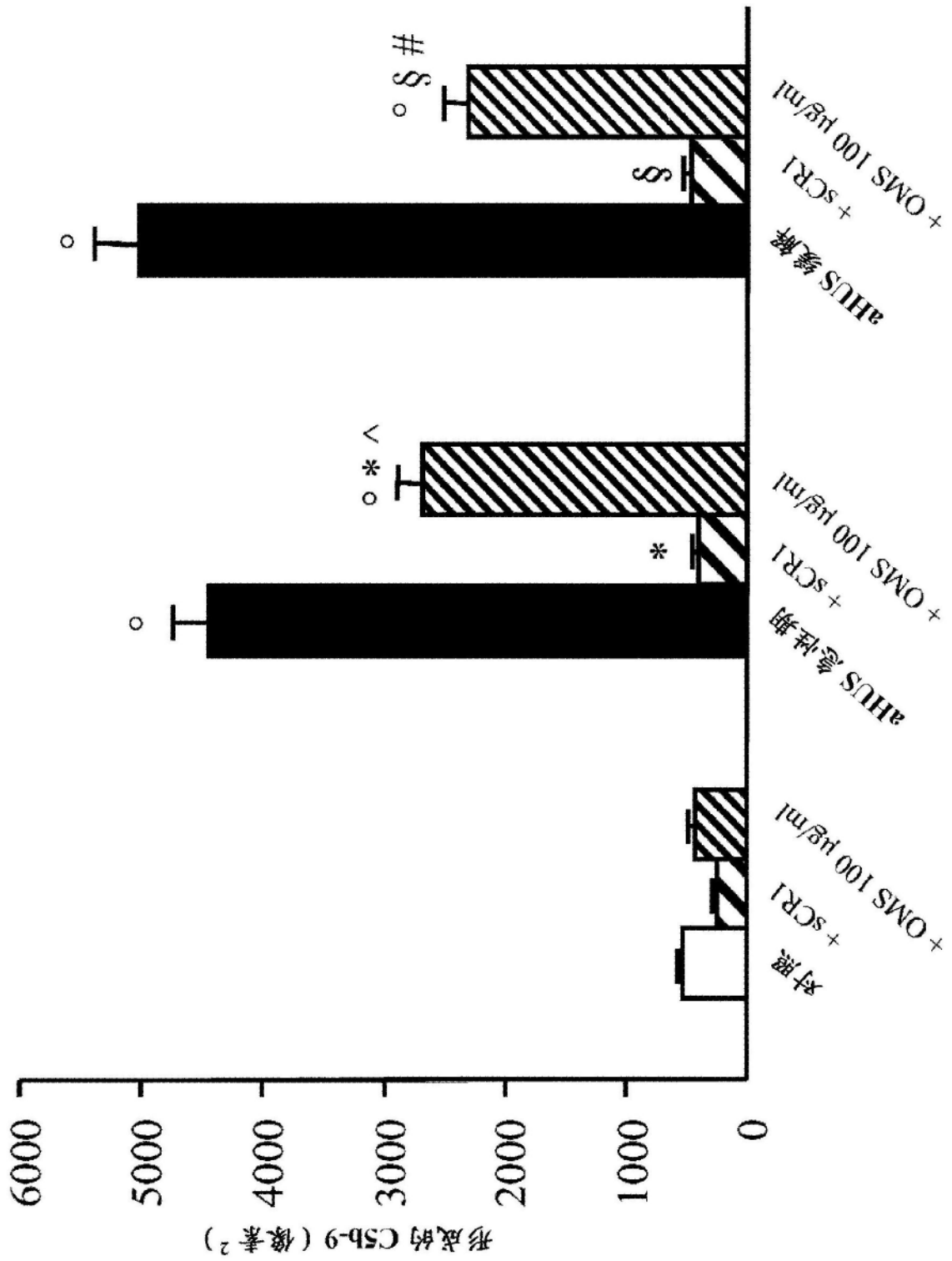


图56

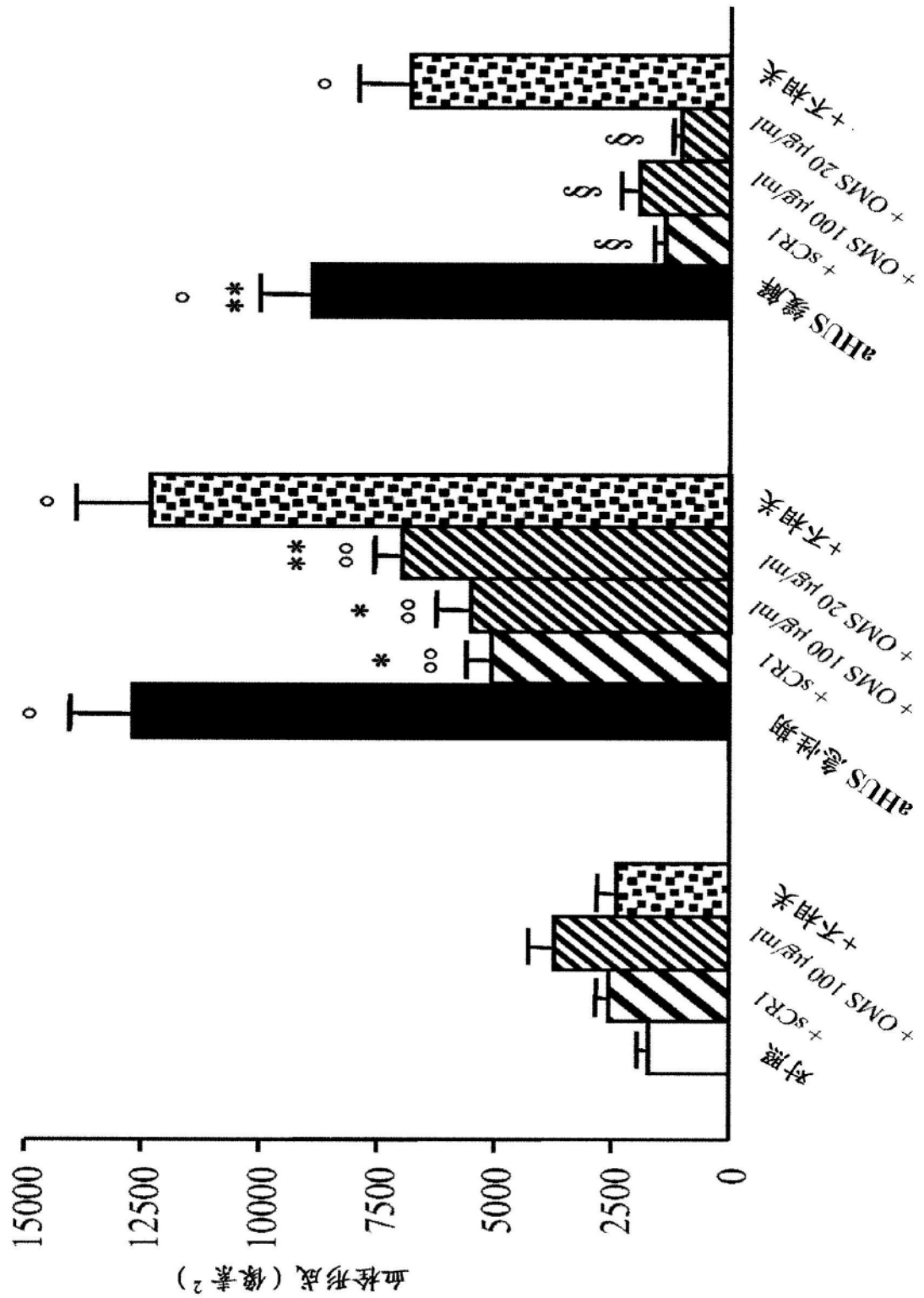


图57

随时间从基线的血小板计数变化

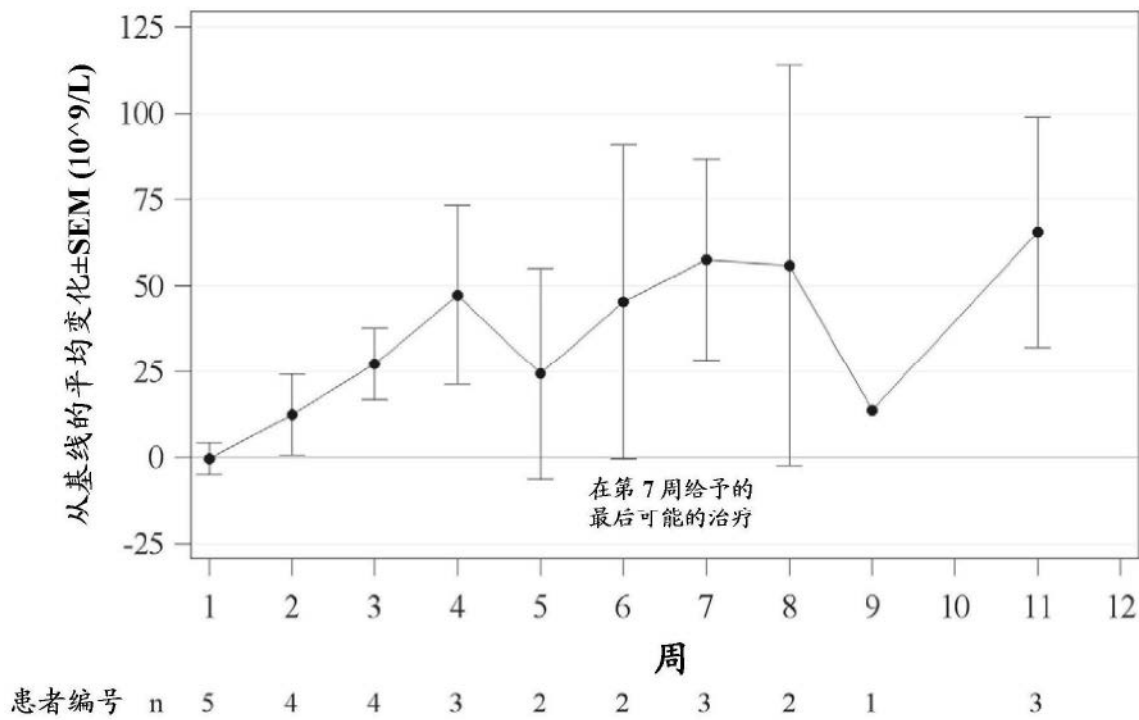


图58

随时间从基线的 LDH 变化

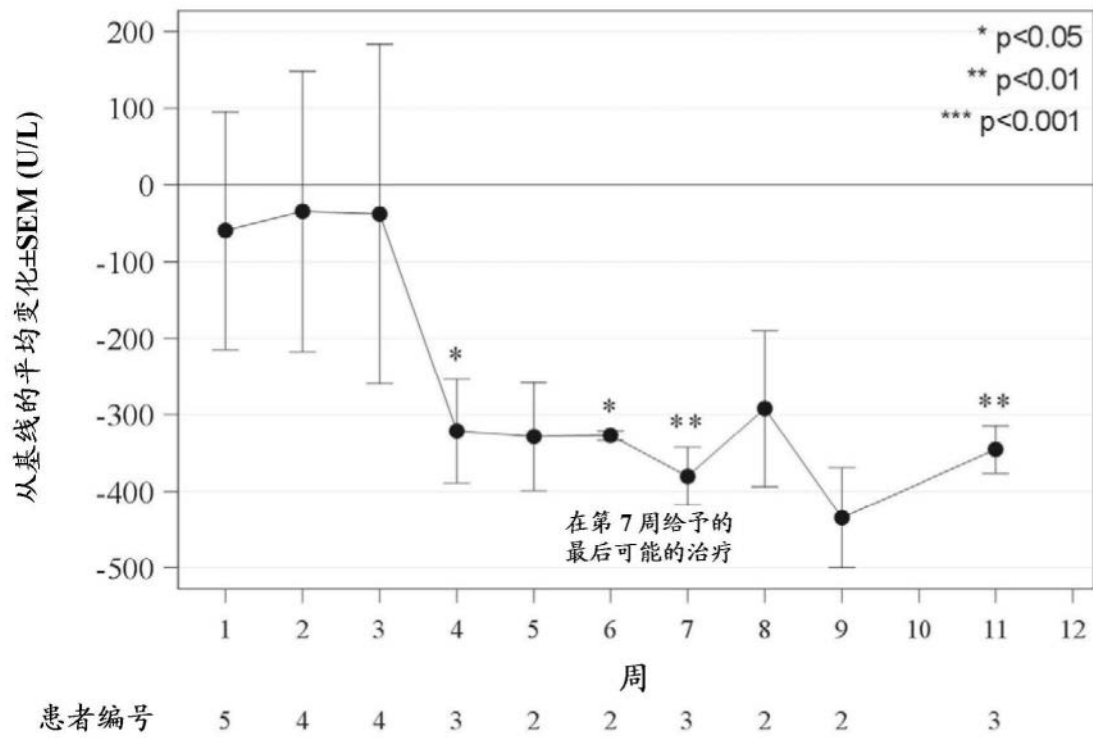


图59

随时间的结合珠蛋白变化

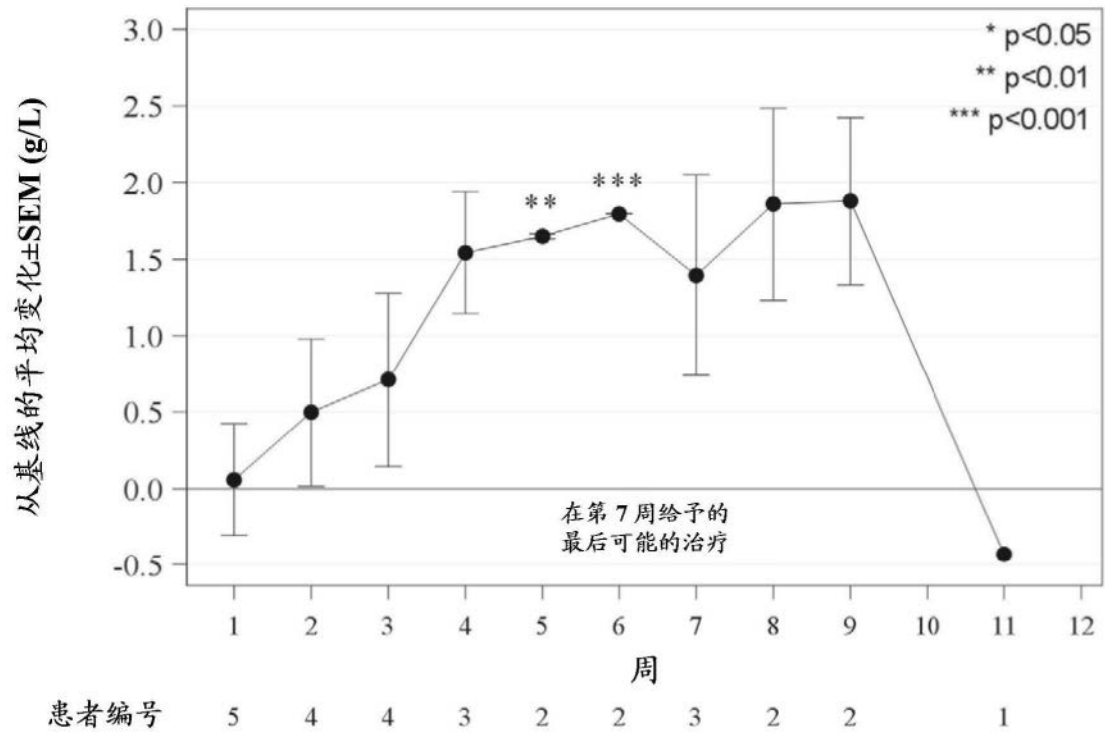


图60

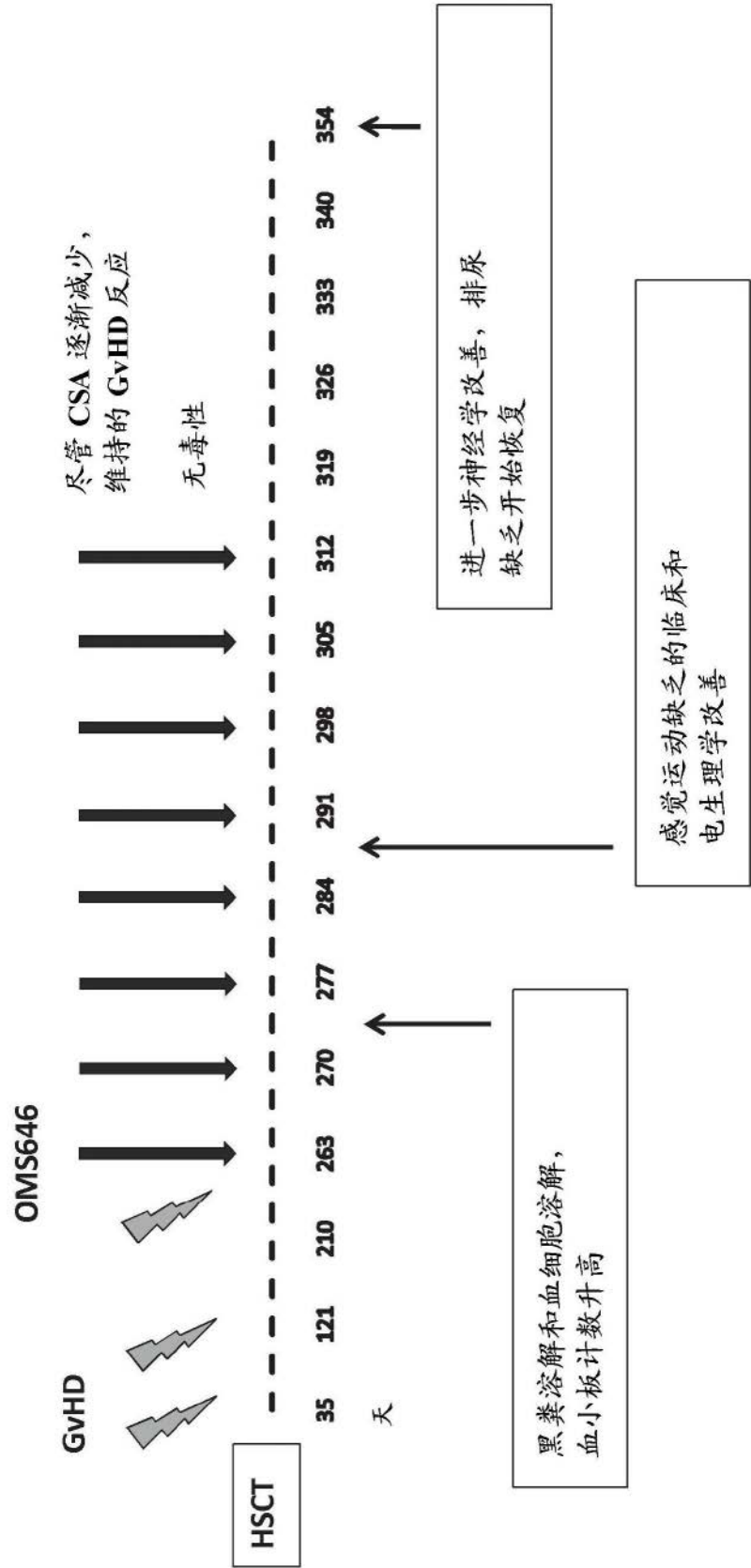


图61

同情使用患者#1: 肌酸酐

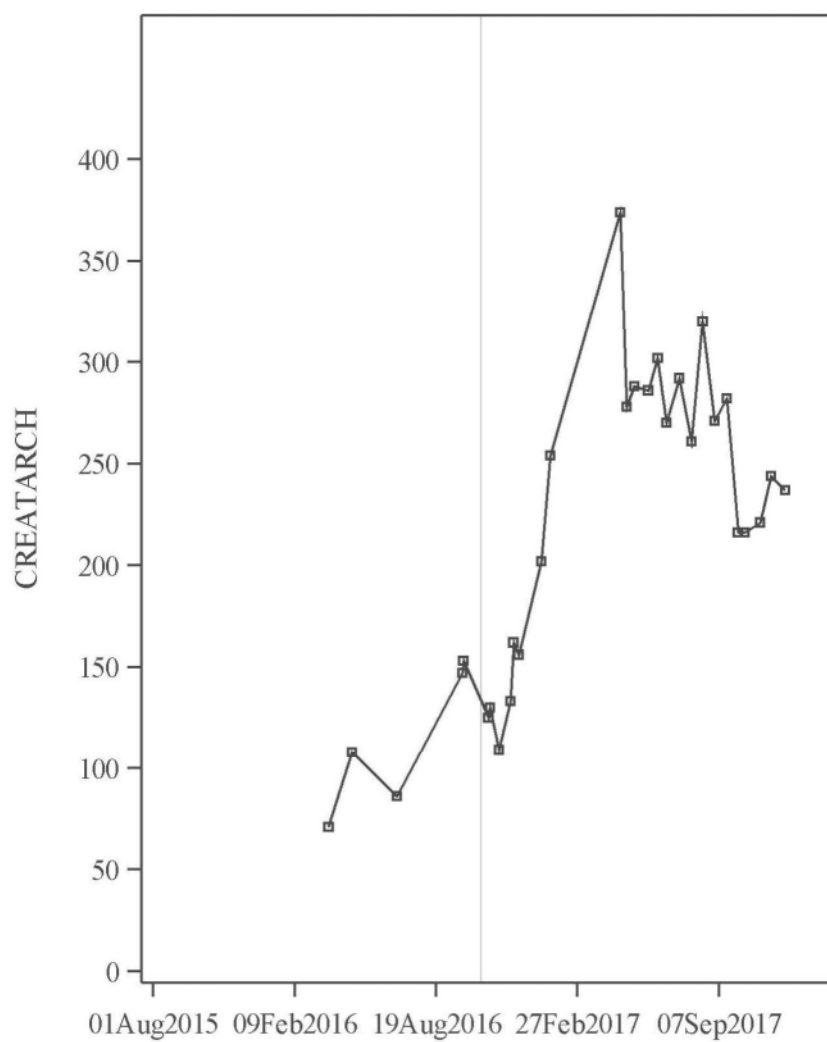


图62A

同情使用患者#1: 结合珠蛋白

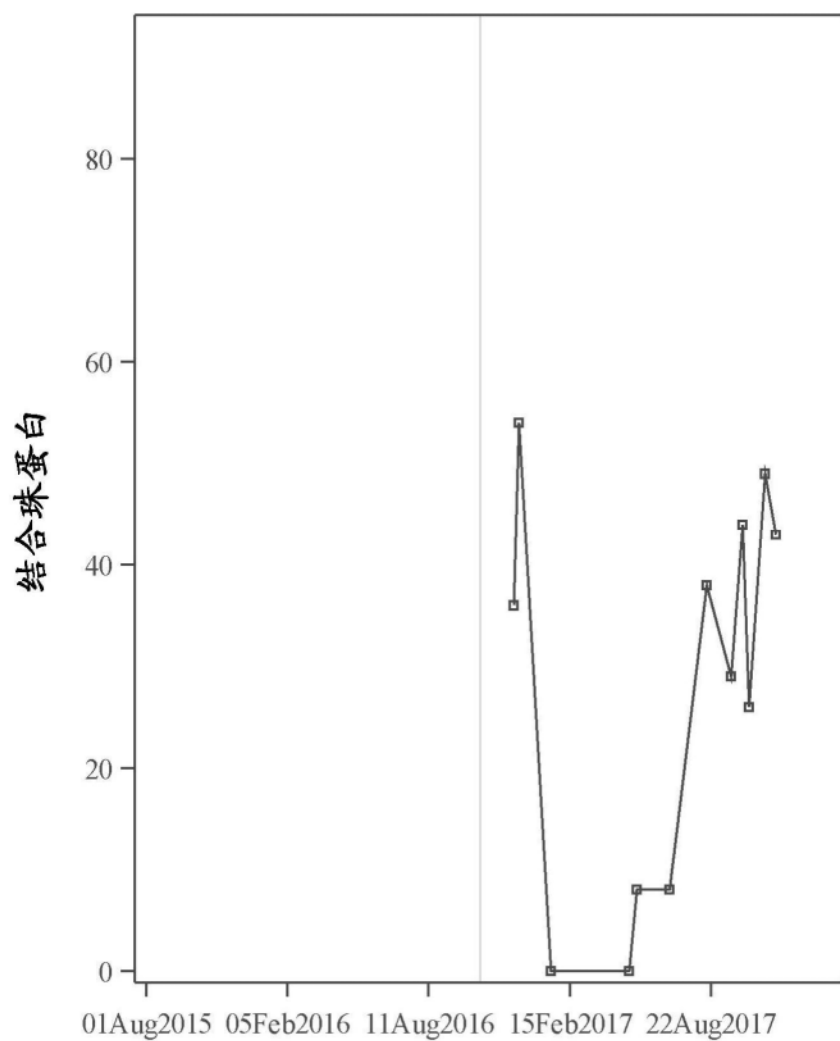


图62B

同情使用患者#1: 血红蛋白

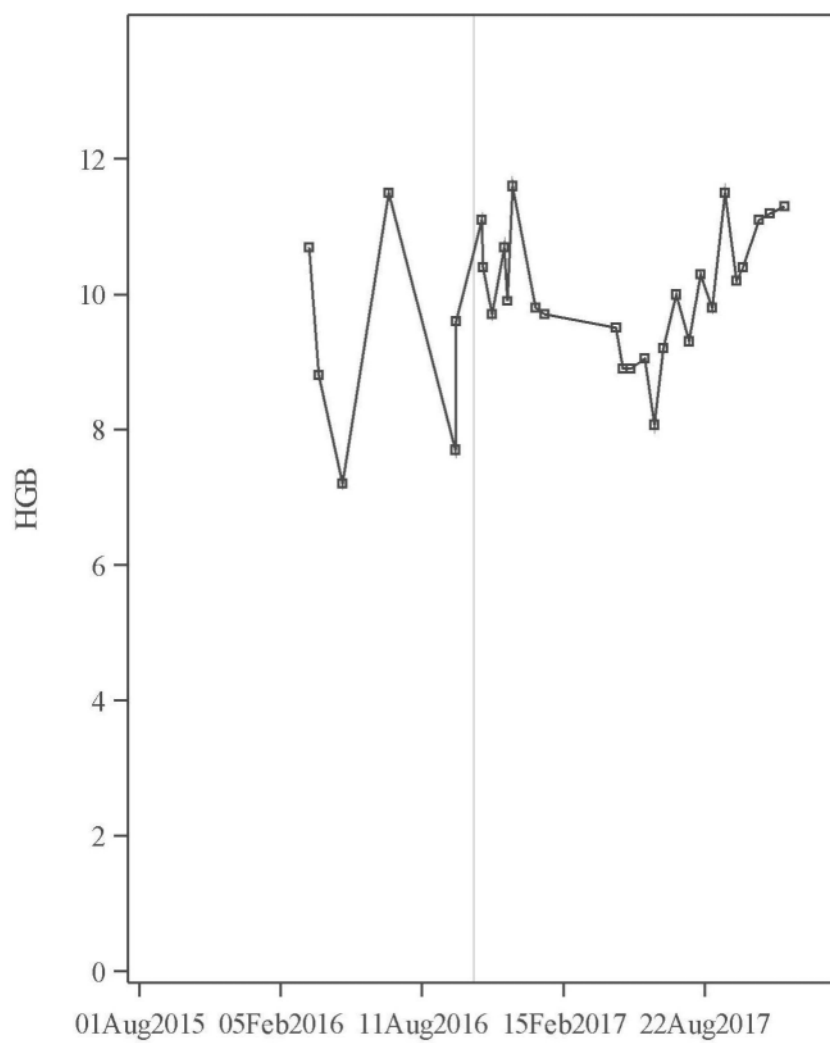


图62C

同情使用患者#1: LDH

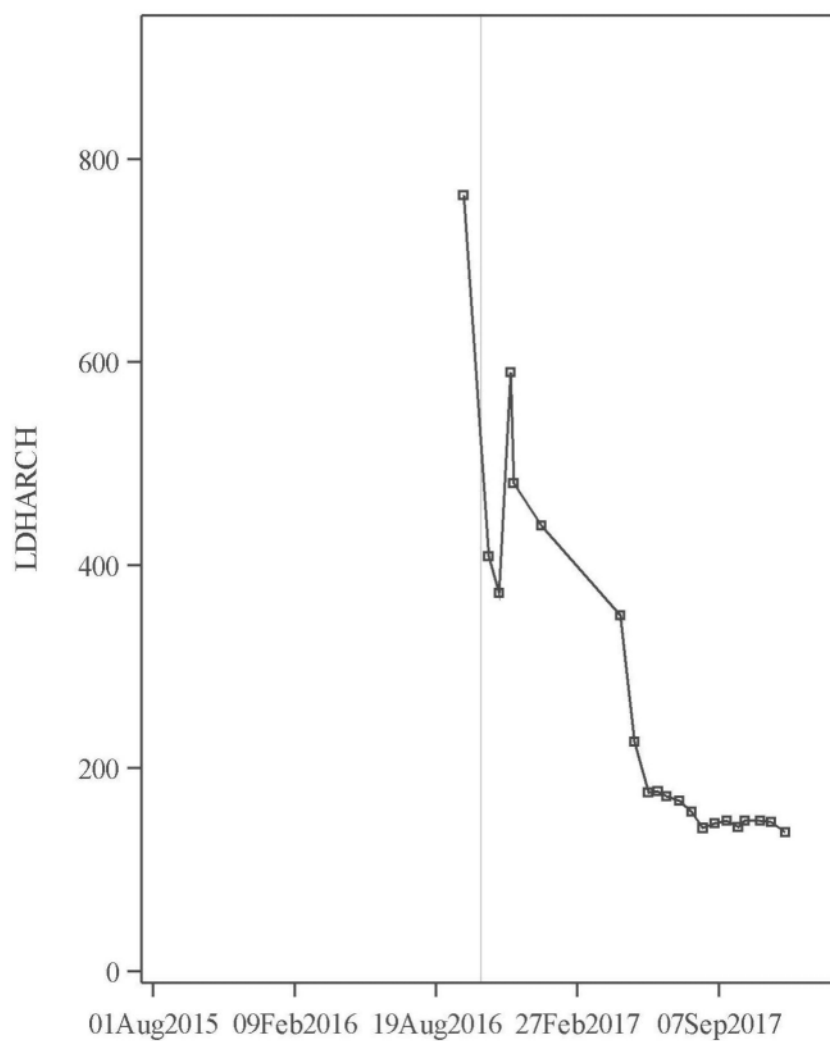


图62D

同情使用患者#1: 血小板

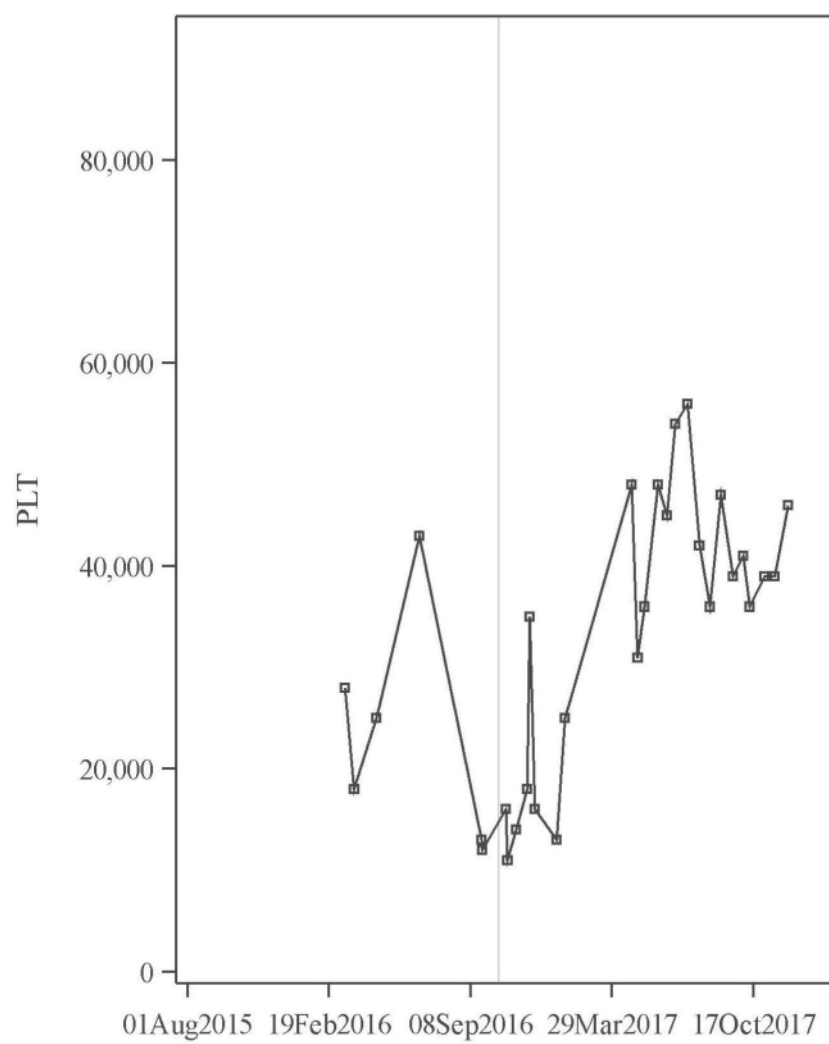


图62E