(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118924900 A
(43)申请公布日 2024.11.12

(21)申请号 202410989581.X
(22)申请日 2013.06.18
(30)优先权数据
61/661167 2012.06.18 US
(62)分案原申请数据
201380044434.5 2013.06.18
(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 H-W·施维布尔
G·A·德莫普罗斯 T·杜德勒
P·格雷
(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 初明明 杨思捷
(51)Int.Cl.
A61K 45/00(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 1/00(2006.01)
A61P 1/16(2006.01)
A61P 11/00(2006.01)
A61P 11/06(2006.01)
A61P 13/12(2006.01)
A61P 17/02(2006.01)
A61P 19/02(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 31/10(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 33/00(2006.01)
A61P 33/14(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)
A61P 39/02(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
A61P 7/00(2006.01)
A61P 7/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书169页
序列表（电子公布） 附图58页

(54)发明名称

抑制MASP-1和/或MASP-2和/或MASP-3的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了抑制MASP-1和/或MASP-2和/或MASP-3的组合物和方法。本发明提供了通过给予患有或有风险发展选自以下疾病或病症的受试者包含一定量的MASP-3抑制剂的组合物而在所述受试者中抑制MASP-3-依赖性补体活化的方法和组合物:阵发性夜间血红蛋白尿、年龄相关性黄斑变性、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病,所述抑制剂的量有效抑制MASP-3-依赖性补体活化。在一些实施方案中,给予所述受试者MASP-2抑制剂和MASP-1抑制剂、MASP-2抑制剂和MASP-3抑制剂、MASP-3抑制剂和MASP-1抑制剂、或MASP-1抑制剂、MASP-2抑制剂和MASP-3抑制剂。

CN 118924900 A

1.包含一定量的有效抑制MASP-3-依赖性补体活化的MASP-3抑制剂的组合物在制备用于治疗患有或有风险发展选自以下疾病或病症的受试者的药物中的用途:弥散性血管内凝血、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎、年龄相关性黄斑变性和贝切特氏病,其中所述MASP-3抑制剂是MASP-3单克隆抗体或其片段,其特异性结合到人MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:8的aa 450-711)并且抑制因子D成熟。

2.权利要求1的用途,其中所述MASP-3单克隆抗体或其片段是以下的至少一种:

(i)结合到MASP-3(SEQ ID NO:8)的一部分上并且不抑制MASP-1或MASP-2的MASP-3抑制性抗体;

(ii)特异性地结合到MASP-3的一部分上的MASP-3抑制性抗体,其亲和力是其与MASP-1(SEQ ID NO:10)结合亲和力的至少10倍;和/或

(iii)特异性地结合到MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:8的aa 450-711)上的MASP-3抑制性抗体。

3.权利要求1的用途,其中所述组合物进一步包含以下的至少一种:MASP-1抑制剂、MASP-2抑制剂、或MASP-1抑制剂和MASP-2抑制剂的组合。

4.权利要求3的用途,其中所述MASP-1抑制剂是以下的至少一种:

(i)MASP-1单克隆抗体或其片段,其特异性地与SEQ ID NO:10的一部分结合;

(ii)特异性地与MASP-1的一部分结合的MASP-1抑制剂,其亲和力是其与MASP-3(SEQ ID NO:8)结合亲和力的至少10倍;和/或

(iii)特异性地与MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10的aa 449-694)结合的MASP-1抑制剂。

5.权利要求3的用途,其中所述MASP-2抑制剂是MASP-2单克隆抗体或其片段,其特异性地与SEQ ID NO:5的一部分结合。

6.权利要求1的用途,其中所述弥散性血管内凝血选自继发于败血症、创伤、感染(细菌感染、病毒感染、真菌感染、寄生虫感染)、恶性肿瘤、移植排斥、输血反应、产科并发症、血管动脉瘤、肝衰竭、中暑、烧伤、辐射暴露、休克或严重的毒性反应的弥散性血管内凝血。

7.权利要求1的用途,其中所述组合物经全身性给予。

8.权利要求7的用途,其中所述组合物经皮下、肌内、静脉内、动脉内给予或作为吸入剂给予。

抑制MASP-1和/或MASP-2和/或MASP-3的组合物和方法

[0001] 本申请是申请日为2013年6月18日,发明名称为“用于治疗各种疾病和病症的抑制MASP-1和/或MASP-2和/或MASP-3的组合物和方法”的发明申请201380044434.5的分案申请201811331359.1的分案申请202210652007.6的继续分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

本申请要求于2012年6月18日申请的申请号61/661,167的权益。

技术领域

本申请涉及补体系统的抑制剂以及在各种临床病况中的应用。

背景技术

补体系统为在人和其它脊椎动物中启动、放大和安排针对微生物感染和其它急性损伤的免疫应答提供了早期的作用机制(M.K.Liszewski和J.P.Atkinson,1993,载于Fundamental Immunology,第3版,W.E.Paul编辑,RavenPress,Ltd.,NewYork)。尽管补体活化提供了重要的针对潜在病原体的第一道防线,但是促进保护性免疫应答的补体活性也可以表现出对宿主的潜在威胁(K.R.Kalli等人,SpringerSemin.Immunopathol.15:417-431,1994;B.P.Morgan,Eur.J.Clinical Investig.24:219-228,1994)。例如,C3和C5蛋白水解产物募集并活化嗜中性粒细胞。尽管对于宿主防御是必不可少的,但是活化的嗜中性粒细胞在它们破坏性酶的释放中是不加选择的,并可以导致器官损伤。此外,补体活化可以导致溶胞的补体成分沉积在附近的宿主细胞以及微生物靶上,导致宿主细胞裂解。

[0005] 补体系统也与许多急性和慢性疾病状态的发病机制有牵连,所述疾病包括:心肌梗塞、中风、ARDS、再灌注损伤、败血性休克、热烧伤之后的毛细血管渗漏、心肺分流术后炎症、移植排斥、类风湿性关节炎、多发性硬化、重症肌无力和阿尔茨海默病。在几乎所有的这些病况中,补体都不是病因,而是发病机制所涉及的若干因素之一。尽管如此,补体活化可以是重要的病理机制,并对许多这类疾病状态中的临床控制表现出有效之处。对各种疾病状态中补体介导的组织损伤的重要性的逐渐增加的认识强调了对有效补体抑制药物的需求。迄今为止,Eculizumab(Solaris®),一种针对C5的抗体,是仅有的已被批准人用的补体靶向药物。然而,C5是位于补体系统“下游”的几个效应物分子之一,并且对C5的阻断并不抑制补体系统的活化。因此,补体活化的起始步骤的抑制剂将具有相对“下游”补体抑制剂的显著优势。

[0006] 目前,普遍接受的是补体系统可通过三种截然不同的途径被活化:经典途径、凝集素途径和替代途径。经典途径通常是由宿主抗体结合外源颗粒(即抗原)组成的复合物而触发,并且因此需要预先暴露于抗原以产生特异性抗体应答。因为经典途径的活化取决于宿主先前的获得性免疫应答,所以经典途径是获得性免疫系统的一部分。相反,凝集素途径和替代途径两者不依赖于获得性免疫,并且是先天性免疫系统的一部分。

[0007] 补体系统的活化导致丝氨酸蛋白酶酶原(zymogen)的连续活化。经典途径活化的第一步是特异性识别分子C1q与结合了抗原的IgG和IgM分子的结合。C1q与C1r和C1s丝氨酸

蛋白酶酶原结合成称为C1的复合物。当C1q与免疫复合物结合时,C1r的Arg-Ile位点进行自我蛋白水解切割,随后是C1r介导的C1s切割和活化,其从而获得切割C4和C2的能力。C4被切割成两个片段,称为C4a和C4b,并且,类似地,C2被切割成C2a和C2b。C4b片段能够与邻近的羟基或氨基形成共价键,并且通过与活化C2的C2a片段进行非共价相互作用而生成C3转化酶(C4b2b)。C3转化酶(C4b2b)通过蛋白水解切割成C3a和C3b亚成分而活化C3,导致C5转化酶(C4b2a3b)的生成,其通过切割C5导致可以破坏细胞膜导致细胞裂解的膜攻击复合物(结合C6、C7、C8和C9的C5b,也称为"MAC")的形成。C3和C4的活化形式(C3b和C4b)共价沉积在外源靶表面上,其被多种吞噬细胞上的补体受体所识别。

[0008] 独立地,补体系统通过凝集素途径活化的第一步也是特异性识别分子的结合,其随后是所结合的丝氨酸蛋白酶酶原的活化。然而,凝集素途径中的识别分子包括一组统称为凝集素的糖结合蛋白(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),而不是通过C1q来结合免疫复合物。参见J.Lu等人,Biochim.Biophys.Acta1572:387-400,(2002);Holmskov等人,Annu.Rev.Immunol.21:547-578(2003);Teh等人,Immunology101:225-232(2000))。另见J.Luet等人,Biochim BiophysActa 1572:387-400(2002);Holmskov等人,Annu RevImmunol 21:547-578(2003);Teh等人,Immunology 101:225-232(2000);Hansen等人,J.Immunol 185(10):6096-6104(2010)。

[0009] Ikeda等人首先证明,与C1q类似,MBL在与酵母甘露聚糖-包被的红细胞结合后可以以依赖C4的方式使补体系统活化(Ikeda等人,J.Biol.Chem.262:7451-7454,(1987))。MBL是胶原凝集素蛋白家族的成员,是钙依赖性凝集素,其与具有定向于吡喃糖环赤道面上的3-羟基和4-羟基的碳水化合物结合。因此MBL的重要配体是D-甘露糖和N-乙酰-D-葡糖胺,而不符合这种空间要求的碳水化合物则对MBL没有可检测的亲和性(Weis等人,Nature360:127-134,(1992))。MBL和单价糖之间的相互作用是相当微弱的,解离常数通常在个位数毫摩尔的范围内。MBL通过亲合力,即通过同时与位置彼此靠近的多个单糖残基相互作用来实现对聚糖配体特异性地紧密结合(Lee等人,Archiv.Biochem.Biophys.299:129-136,(1992))。MBL识别通常修饰微生物如细菌、酵母、寄生虫和某些病毒的碳水化合物模式。相反,MBL不识别D-半乳糖和唾液酸,即倒数第二位和倒数第一位的糖,它们一般修饰哺乳动物血浆和细胞表面糖蛋白上存在的"成熟"复合糖缀合物。认为这种结合特异性促进"外源"表面的识别和有助于保护免于"自身活化"。然而,MBL确实以高亲和性结合高甘露糖"前体"聚糖簇,这些簇位于被隔离在哺乳动物细胞的内质网和高尔基体内的N-连接的糖蛋白和糖脂上(Maynard等人,J.Biol.Chem.257:3788-3794,(1982))。另外,已经证实MBL可以结合可暴露在坏死的和凋亡的细胞上的多核苷酸、DNA和RNA(Palaniyar等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,1010:467-470(2003);Nakamura等人,J.Leuk.Biol.86:737-748(2009))。因此,受损细胞是经由MBL结合的凝集素途径活化的潜在目标。

[0010] 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。纤维胶凝蛋白以不依赖Ca^{++}的方式来结合糖残基。在人中,已经鉴定出三种类型的纤维胶凝蛋白(L-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白)。L-纤维胶凝蛋白和H-纤维胶凝蛋白这两种血清纤维胶凝蛋白共同对N-乙酰-D-葡糖胺具有特异性;然而,H-纤维胶凝蛋白还结合N-乙酰-D-半乳糖胺。L-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白、CL-1I和MBL的糖特异性

的差异意味着不同的凝集素可以是互补的,尽管有重叠,但是可靶向不同的糖缀合物。这个观点得到了最近报道的支持,即在凝集素途径的已知凝集素中,只有L-纤维胶凝蛋白与脂磷壁酸特异性结合,所述脂磷壁酸是在所有革兰氏阳性菌上发现的一种细胞壁糖缀合物(Lynch等人,J.Immunol.172:1198-1202,(2004))。除了乙酰化糖部分外,纤维胶凝蛋白还可结合乙酰化氨基酸和多肽(Thomsen等人,Mol.Immunol.48(4):369-81(2011))。胶原凝集素(即MBL)和纤维胶凝蛋白在氨基酸序列上没有显著的相似性。然而,这两组蛋白质具有类似的结构域组构,且与C1q类似,装配成寡聚结构,这样就使得多位点结合的可能性最大化。

[0011] MBL的血清浓度在健康人群中是高度可变的,这在遗传上是由MBL基因的启动子和编码区二者的多态性/突变所控制。作为急性期蛋白,MBL的表达在炎症期间进一步上调。L-纤维胶凝蛋白在血清中存在的浓度与MBL的浓度类似。因此,凝集素途径的L-纤维胶凝蛋白分支在强度上可能与MBL分支不相上下。MBL和纤维胶凝蛋白还可能作为调理素起作用,其允许吞噬细胞靶向MBL-和纤维胶凝蛋白-修饰的表面(参见Jack等人,J Leukoc Biol.,77(3):328-36(2004),Matsushita和Fujita,Immunobiology,205(4-5):490-7(2002),Aoyagi等人,JImmunol,174(1):418-25(2005))。此调理素作用需要这些蛋白与吞噬细胞受体相互作用(Kuhlman等人,J.Exp.Med.169:1733,(1989);Matsushita等人,J.Biol.Chem.271:2448-54,(1996)),这些吞噬细胞受体的身份还未得到确定。

[0012] 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相关的丝氨酸蛋白酶(MASP))形成特异性和高亲和性的相互作用。迄今为止已经描述了三种MASP。首先,鉴定出单一的酶“MASP”,并且其特征是作为负责启动补体级联(即切割C2和C4)的酶(Matsushita等人,J Exp Med 176(6):1497-1502(1992);Ji等人,J.Immunol.150:571-578,(1993))。随后,确定MASP活性实际上是两种蛋白酶MASP-1和MASP-2的混合物(Thiel等人,Nature 386:506-510,(1997))。然而,证明MBL-MASP-2复合物单独就足以使补体活化(Vorup-Jensen等人,J.Immunol.165:2093-2100,(2000))。此外,只有MASP-2以高速切割C2和C4(Ambrus等人,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。这是不同于经典途径中C1复合物的显著差异,在经典途径中两种特异性丝氨酸蛋白酶(C1r和C1s)协同作用导致了补体系统的活化。另外,已经分离出第三种新的蛋白酶MASP-3(Dahl,M.R.等人,Immunity 15:127-35,2001)。MASP-1和MASP-3是同一基因的可变剪接产物。

[0013] MASP与C1复合物的酶成分C1r和C1s共享相同的结构域组构(Sim等人,Biochem.Soc.Trans.28:545,(2000))。这些结构域包括N-末端C1r/C1s/海胆VEGF/骨形成蛋白(CUB)结构域、表皮生长因子-样结构域、第二CUB结构域、串联的补体调控蛋白结构域和丝氨酸蛋白酶结构域。与在C1蛋白酶中一样,MASP-2的活化通过丝氨酸蛋白酶结构域附近的Arg-Ile键裂解而发生,其将酶分成二硫键连接的A链和B链,后者由丝氨酸蛋白酶结构域构成。

[0014] MBL还与MASP-2的可变剪接形式,称为19kDa MBL相关蛋白(MAp19)或者小MBL相关蛋白(sMAP)缔合,所述蛋白缺乏MASP-2的催化活性(Stover,J.Immunol.162:3481-90,(1999);Takahashi等人,Int.Immunol.11:859-863,(1999))。MAp19包括MASP-2的前两个结构域,其后接4个独特氨基酸的额外序列。MAp19的功能尚不清楚(Degn等人,JImmunol.Methods,2011)。MASP-1基因和MASP-2基因分别位于人的3号和1号染色体上

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

[0015] 若干证据表明存在不同的MBL-MASP复合物,且血清中大部分MASP不与MBL复合(Thiel等人,J.Immunol.165:878-887,(2000))。H-纤维胶凝蛋白和L-纤维胶凝蛋白都与所有MASP结合,并且活化凝集素补体途径,如MBL所为(Dahl等人,Immunity 15:127-35,(2001);Matsushita等人,J.Immunol.168:3502-3506,(2002))。凝集素途径和经典途径都形成共同的C3转化酶(C4b2a),并且这两条途径在这一步会合。

[0016] 普遍认为凝集素途径在首次用于实验的(naïve)宿主中的宿主抵抗感染的防御中具有重要作用。MBL参与宿主防御的强有力证据来自于对功能性MBL血清水平降低的患者的分析(Kilpatrick,Biochim.Biophys.Acta1572:401-413,(2002))。这些患者表现出对复发性细菌和真菌感染的易感性。在易损性的表观窗期间,这些症状通常在生命早期是明显的,因为从母体获得的抗体效价降低,但处于完整的抗体应答谱(repertoire)发育之前。这种综合征经常是由于MBL胶原部分的数个位点突变引起的,其干扰了MBL寡聚体的正确形成。然而,由于MBL可以作为不依赖于补体的调理素起作用,所以还不知道对感染的易感性增加的多大程度是由于受损的补体活化所致。

[0017] 与经典途径和凝集素途径相反,没有发现替代途径中完成识别功能的引发剂,而在其它两种途径中是C1q和凝集素来完成识别功能的。目前普遍接受的是,替代途径自发经历低水平的周转活化(turnover activation),其可以容易地在外来表面或其它异常表面(细菌、酵母、病毒感染的细胞或者受损组织)上放大,所述表面缺少保持受控的自发补体活化的适当分子元件。有四种血浆蛋白直接参与了替代途径的活化:C3、因子B、因子D和备解素。

[0018] 尽管大量证据表明经典补体途径和替代补体途径两者都涉及非感染性人类疾病的发病机制,但是对凝集素途径作用的评价才刚刚开始。最近研究提供的证据表明,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。Collard等人(2000)报告受到氧化应激的培养的内皮细胞结合MBL,且在暴露于人血清时显示出C3沉积(Collard等人,Am.J.Pathol.156:1549-1556,(2000))。此外,用封闭性抗MBL单克隆抗体处理人血清抑制了MBL结合和补体活化。将这些发现扩展到心肌缺血-再灌注大鼠模型上,其中比起用对照抗体处理的大鼠,用针对大鼠MBL的封闭性抗体处理的大鼠在冠状动脉闭塞时显示心肌损伤显著较轻(Jordan等人,Circulation 104:1413-1418,(2001))。尚不清楚氧化应激后MBL与血管内皮结合的分子机制;最近的研究表明,氧化应激后凝集素途径的活化可能是由MBL与血管内皮细胞角蛋白结合而介导,而不是与糖缀合物结合而介导(Collard等人,Am.J.Pathol.159:1045-1054,(2001))。其它研究已表明缺血/再灌注损伤的发病机制中的经典途径和替代途径以及凝集素途径在这种疾病中的作用仍然存在争议(Riedermann,N.C.等人,Am.J.Pathol.162:363-367,2003)。

[0019] 近期的研究显示,MASP-1和MASP-3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.等人,J Exp Med 207(1):29-37(2010);Iwaki等人,J.Immunol.187:3751-58(2011))。此过程的生理重要性通过在MASP-1/3-缺陷小鼠的血浆中不存在替代途径功能活性而得以强调。对于替代途径,需要由天然C3蛋白水解生成的C3b发挥作用。由于替代途径C3转化酶(C3bBb)含有C3b作为必需亚基,因此关于经由替代途径的第一个C3b来源的疑问已提出了令人困扰的问题,且促使了相当多的研究工作。

[0020] C3属于含有被称为硫酯键的极少的翻译后修饰的蛋白质家族(与C4和α-2巨球蛋白一起)。硫酯基团由谷氨酰胺组成,其末端羰基与距离三个氨基酸外的半胱氨酸的巯基形成共价硫酯连接。该键不稳定,且亲电子的谷氨酰-硫酯可与亲核部分例如羟基或氨基反应并从而与其它分子形成共价键。当被隔离在完整C3的疏水口袋内部时,硫酯键是相当稳定的。然而,C3被蛋白水解切割成C3a和C3b,导致C3b上高反应性的硫酯键暴露出来,并随着通过包括羟基或氨基的邻近部分的亲核攻击,C3b与靶共价结合。除了充分记载的其在C3b与补体靶共价结合中的作用外,还认为C3硫酯具有触发替代途径的关键作用。根据普遍接受的"tick-over理论",替代途径由液相转化酶iC3Bb的生成所启动,iC3Bb由C3与水解的硫酯(iC3;C3(H_2O))和因子B形成(Lachmann,P.J.等人,Springer Semin.Immunopathol.7:143-162,(1984))。C3b-样C3(H_2O)由天然C3经蛋白质中内部硫酯的缓慢自发水解而产生(Pangburn,M.K.,等人,J.Exp.Med.154:856-867,1981)。通过C3(H_2O)Bb转化酶的活性,C3b分子沉积在靶表面,从而启动替代途径。

[0021] 在本文所述的发现之前,对替代途径活化的引发剂的了解甚少。认为活化剂包括酵母细胞壁(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、寄生虫和受损细胞。这些活化剂所共有的唯一特征是碳水化合物的存在,但是碳水化合物结构的复杂性和多样性使得难以确定被识别的共享分子决定子。广泛接受的是替代途径活化通过此途径的抑制性调节成分之间的精细平衡控制,所述成分例如因子H、因子I、DAF和CR 1和备解素,后者是替代途径唯一的阳性调节因子(参见Schwaeble W.J.和ReidK.B.,Immunol Today 20(1):17-21(1999))。

[0022] 除了上文所述的明显的未调节的活化机制,替代途径还可以为凝集素/经典途径C3转化酶(C4b2a)提供强力的放大环,因为任何生成的C3b都可以与因子B参与形成额外的替代途径C3转化酶(C3bBb)。替代途径C3转化酶通过结合备解素被稳定化。备解素使替代途径C3转化酶的半衰期延长六到十倍。向替代途径C3转化酶添加C3b导致替代途径C5转化酶的形成。

[0023] 一直以来认为所有三种途径(即经典、凝集素和替代途径)会合于C5,它被切割形成具有多种促炎作用的产物。会合的途径被称为末端补体途径。C5a是最有效的过敏毒素,引起平滑肌和血管紧张度以及血管通透性的改变。它还是嗜中性粒细胞和单核细胞两者的强有力的趋化因子和活化因子。C5a介导的细胞活化能够通过诱导释放多种另外的炎症介质来显著放大炎症反应,另外的炎症介质包括细胞因子、水解酶、花生四烯酸代谢物和活性氧类。C5裂解导致了C5b-9的形成,它也被称为膜攻击复合物(MAC)。目前强有力的证据表明,亚裂解的MAC沉积除了起到作为裂解的孔-形成复合物的作用外,还可能还在炎症中发挥重要作用。

[0024] 除了其在免疫防御中的重要作用之外,补体系统还在很多临床病况中导致组织损伤。因此,对开发治疗有效的补体抑制剂以防止这些不良作用而言存在着迫切需要。

发明内容

一方面,本发明提供在患有阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎

或贝切特氏病的受试者中抑制MASP-3-依赖性补体活化的方法。所述方法包括给予所述受试者包含一定量的MASP-3抑制剂的组合物的步骤,所述抑制剂有效抑制MASP-3-依赖性补体活化。在某些实施方案中,所述方法进一步包括给予所述受试者包含MASP-2抑制剂的组合物。

[0026] 在另一方面,本发明提供了在患有或有风险发展选自以下的疾病或病症的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化的方法:致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎或贝切特氏病。所述方法包括将包含一定量的有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的MASP-2抑制剂的组合物给予受试者的步骤。在一些实施方案中,MASP-2抑制剂是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:5的一部分的MASP-2单克隆抗体或其片段。在一些实施方案中,MASP-2抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0027] 另一方面,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含至少一种抑制剂和药学上可接受的载体,其中所述至少一种抑制剂包含MASP-2抑制剂和MASP-3抑制剂。

[0028] 另一方面,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含与MASP-1(SEQ ID NO:10:全长)的一部分结合并且还与MASP-3(SEQ ID NO:8)的一部分结合的MASP-3抑制剂和药用载体。

[0029] 另一方面,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含与MASP-2(SEQ ID NO:5:全长)的一部分结合并且还与MASP-3(SEQ ID NO:8)的一部分结合的MASP-3抑制剂和药用载体。

[0030] 另一方面,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含与MASP-1(SEQ ID NO:10:全长)的一部分结合并且还与MASP-2(SEQ ID NO:5)的一部分结合的MASP-3抑制剂和药用载体。

[0031] 另一方面,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含与MASP-1(SEQ ID NO:10全长)的一部分结合、与MASP-2(SEQ ID NO:5:全长)的一部分结合并且还与MASP-3(SEQ ID NO:8)的一部分结合的MASP-3抑制剂和药用载体。

[0032] 在另一方面,本发明提供了制备用于在有需要的活受试者中抑制MASP-3-依赖性补体活化作用的药物的方法,所述方法包括将治疗有效量的MASP-3抑制剂在药物载体中组合。在一些实施方案中,根据本发明该方面的方法包括制备用于在患有或有风险发展选自以下的疾病或病症的受试者中抑制MASP-3-依赖性补体活化作用的药物:阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎或贝切特氏病。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将治疗有效量的MASP-2抑制剂组合到包含MASP-3抑制剂的药物中或将治疗有效量的MASP-2抑制剂与包含MASP-3抑制剂的药物组合。

[0033] 在另一方面,本发明提供了制备用于在有需要的活受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化作用的药物的方法,所述方法包括将治疗有效量的MASP-2抑制剂在药物载体中组合。在一些实施方案中,根据本发明该方面的方法包括制备用于在患有或有风险发展选自以下的疾病或病症的受试者中抑制MASP-2-依赖性补体活化作用的药物:致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎或贝

切特氏病。在一些实施方案中,所述方法进一步包括将治疗有效量的MASP-3抑制剂组合到包含MASP-2抑制剂的药物或将治疗有效量的MASP-3抑制剂与包含MASP-2抑制剂的药物组合。

[0034] 如本文所述,可在本发明的药物组合物中使用MASP-3抑制剂的多种实施方案和/或MASP-2抑制剂的多种实施方案。

[0035] 如本文所述,本发明的药物组合物可以按照本发明的方法来使用。

[0036] 参考以下发明详述和附图,本文所述的发明的这些和其它方面和实施方案将会是显而易见的。本说明书涉及到的所有美国专利、美国专利申请公布、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物都通过引用以其整体结合到本文中,如同各自单独结合到本文中。

附图说明

通过参考下面的发明详述并结合附图,将更容易理解本发明的前述方面以及许多附带的优势,附图中:

图1说明了对凝集素途径和替代途径的新的理解;

图2是改编自Schwaeble等人,Immunobiol 205:455-466(2002)的示意图,由Yongqing等人,BBA 1824:253(2012)修改,表明MASP-2和MAp19蛋白结构域以及编码它们的外显子;

图3是改编自Schwaeble等人,Immunobiol 205:455-466(2002)的示意图,由Yongqing等人,BBA 1824:253(2012)修改,表明MASP-1,MASP-3和MAp44蛋白结构域以及编码它们的外显子;

图4显示了MASP-1、MASP-2和MASP-3蛋白质的氨基酸序列的比对并指示了它们之间的共有区;

图5显示了MASP-1、MASP-2和MASP-3α链的氨基酸序列的比对;

图6显示了MASP-1、MASP-2和MASP-3β链的氨基酸序列的比对;

图7A显示了MASP-1和MASP-2蛋白酶结构域(β-链)的氨基酸序列的成对比对;

图7B显示了MASP-1和MASP-3蛋白酶结构域(β-链)的氨基酸序列的成对比对;

图7C显示了MASP-2和MASP-3蛋白酶结构域(β-链)的氨基酸序列的成对比对;

图8是卡普兰-迈耶曲线,图示表示在给予2.6x 107cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟氏菌(N.meningitidis)血清组A Z2491后的MASP-2KO和WT小鼠的百分比生存率,证明MASP-2缺陷型小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟氏菌诱导的死亡,如实施例1所述;

图9是卡普兰-迈耶曲线,图示表示在给予6x 106cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58后的MASP-2KO和WT小鼠的百分比生存率,证明MASP-2缺陷型小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟氏菌诱导的死亡,如实施例1所述;

图10图示表示在用6x106 cfu脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58 i.p.感染后的不同时间点,从MASP-2KO和WT小鼠中回收的每毫升血中的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58的log cfu/mL(n=3,在不同的时间点,对于这两组小鼠),证明尽管MASP-2KO小鼠用与用于WT小鼠的相同的剂量的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58感染,但与WT相比,MASP-2KO小鼠具有增高的菌血症清除率,如实施例1所述;

图11图示表示在用6x106 cfu脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58感染后的3、6、12和24小时的MASP-2KO和WT小鼠的平均疾病评分,证明与WT小鼠相比,MASP-2-缺陷型小鼠在感染后6小时、12小时和24小时显示出低得多的疾病评分,如实施例1所述;

图12是卡普兰-迈耶曲线,图示表示在给予4x106 cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58后,接着在感染后3小时给予抑制性MASP-2抗体(1mg/kg)或对照同种型抗体的小鼠百分比生存率,证明MASP-2抗体有效治疗和改善感染了脑膜炎奈瑟氏菌的受试者的生存率,如实施例2所述;

图13图示表示在与脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58孵育后的不同时间点采集的如表5所示的人血清样品中的在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58的活菌计数的log cfu/mL,如实施例3所述;

图14图示表示在表7所示的人血清样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B-MC58的活菌计数的log cfu/mL,显示在人20%(v/v)血清中的脑膜炎奈瑟氏菌的补体-依赖性杀伤是MASP-3和MBL-依赖性的,如实施例3所述;

图15图示表示在表9所示的小鼠血清样品中的在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B-MC58的活菌计数的log cfu/mL,显示与WT小鼠血清相比,MASP-2-/-敲除(knockout)小鼠(称为"MASP-2-/-")血清对于脑膜炎奈瑟氏菌具有更高水平的杀菌活性,而相比之下,MASP-1/3-/-小鼠血清没有任何杀菌活性,如实施例3所述;

图16图示表示在凝集素途径-特异性条件下(1%血浆),在WT、C4-/-、MASP-1/3-/-、因子B-/-和MASP-2-/-小鼠的血清中的C3活化动力学,如实施例4所述;

图17图示表示在得自MASP-3-缺陷型、C4-缺陷型和MBL-缺陷型人类受试者的血清样品中,在"传统的"替代途径-特异性(AP-特异性)条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的替代途径-驱动的(AP-驱动的)C3b沉积水平随血清浓度的变化,如实施例4所述;

图18图示表示在得自MASP-3-缺陷型、C4-缺陷型和MBL-缺陷型人类受试者的10%人血清样品中,在"传统的"AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的AP-驱动的C3b沉积水平随时间的变化,如实施例4所述;

图19A图示表示在得自WT、MASP-2-缺陷型和MASP-1/3-缺陷型小鼠的血清样品中,在"传统的"AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下或在允许凝集素途径和替代途径(AP)两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在甘露聚糖-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平随血清浓度的变化,如实施例4所述;

图19B图示表示在得自WT、MASP-2-缺陷型和MASP-1/3-缺陷型小鼠的血清样品中,在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平随血清浓度的变化,如实施例4所述;

图19C图示表示在得自WT、MASP-2-缺陷型和MASP-1/3-缺陷型小鼠的血清样品中,在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在肺炎链球菌(S.pneumoniae)D39-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平随血清浓度的变化,如实施例4所述;

图20A图示表示在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集

素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在甘露聚糖-包被的微量滴定板上进行的在高度稀释的血清中的C3b沉积测定结果,使用血清浓度范围为0％至1.25％,如实施例4所述;

图20B图示表示在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上进行的C3b沉积测定结果,使用血清浓度范围为0％至1.25％,如实施例4所述;

图20C图示表示在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在肺炎链球菌D39-包被的微量滴定板上进行的C3b沉积测定结果,使用血清浓度范围为0％至1.25％,如实施例4所述;

图21图示表示在来自MASP-3-/-、热灭活的正常人血清(HI NHS)、MBL-/-、NHS+MASP-2单克隆抗体和NHS对照的血清中,一系列血清稀释度的人血清在生理条件下(即在Ca^{++}存在时)使甘露聚糖-包被的鼠红细胞溶血的水平(通过将溶解的小鼠红细胞(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量),如实施例5所述;

图22图示表示在来自MASP-3-/-、热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、NHS+MASP-2单克隆抗体和NHS对照的血清中,一系列血清浓度的人血清在生理条件下(即在Ca^{++}存在时)使甘露聚糖-包被的鼠红细胞溶血的水平(通过将溶解的小鼠红细胞(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量),如实施例5所述;

图23图示表示在来自3MC(MASP-3-/-)、热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、NHS+MASP-2单克隆抗体和NHS对照的血清中,一系列血清浓度的人血清在生理条件下(即在Ca^{++}存在时)使非-包被的鼠红细胞溶血的水平(通过将溶解的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量),如实施例5所述;

图24图示表示在来自热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、NHS+MASP-2单克隆抗体和NHS对照的血清中,一系列血清浓度的人血清在生理条件下(即在Ca^{++}存在时)使非-包被的鼠红细胞溶血(通过将溶解的小鼠红细胞(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量),如实施例5所述;

图25图示表示一系列血清浓度的MASP-1/3-/-小鼠血清和WT对照小鼠血清在生理条件下(即在Ca^{++}存在时)使甘露聚糖-包被的兔红细胞溶血(通过将溶解的兔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量),如实施例6所述;

图26图示表示在AP-特异性条件下进行的C3沉积测定法中,在来自因子D-/-、MASP-2-/-和WT小鼠血清的血清样品中,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平(OD 405nm)随血清浓度的变化,如实施例7所述;

图27图示表示在生理条件下(在Ca^{++}存在时)进行的C3沉积测定法中,在来自因子D-/-;MASP-2-/-和WT小鼠血清的血清样品中,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平(OD 405nm)随血清浓度的变化,如实施例7所述;

图28图示表示在生理条件下(在Ca^{++}存在时)进行的C3b沉积测定法中,在得自因子D-/-;因子B-/-;加和减MASP-2单克隆抗体的小鼠血清样品中,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平(OD 405nm)随血清孵育时间(分钟)的变化,如实施例7所述;

图29A图示表示在经皮下给予0.3mg/kg或1.0mg/kg小鼠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在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的凝集素途径特异性C4b沉积,如实施例13所述;

图29B图示表示在小鼠中单次腹膜内给予0.6mg/kg小鼠MASP-2MoAb后3周内凝集素途径恢复的时间进程,如实施例13所述;

图30A是对于克隆M3J5,MASP-3抗原/抗体结合的FACS直方图,如实施例15所述;

图30B是对于克隆M3M1,MASP-3抗原/抗体结合的FACS直方图,如实施例15所述;

图31图示表示对于MASP-3抗原,克隆M3J5(克隆5)的饱和结合曲线,如实施例15所述;

图32A是M3J5、M3M1、D14和1E10的VH区与鸡DT40 VH序列的氨基酸序列的比对,其中点表示与DT40序列的氨基酸同一性,横杠表示引入空位以使比对最大化,如实施例15所述;

图32B是M3J5、M3M1、D14和1E10的VL区与鸡DT40 VL序列的氨基酸序列的比对,其中点表示与DT40序列的氨基酸同一性,横杠表示引入空位以使比对最大化,如实施例15所述;

图33是柱状图,显示与测定试剂盒中提供的阳性血清以及同种型对照抗体相比,在Wieslab补体系统筛选MBL途径中mAb1E10的抑制活性,证明mAb1E10部分抑制LEA-2-依赖性活化,(通过抑制MASP-2的MASP-1-依赖性活化),而同种型对照抗体却非如此,如实施例15所述;

图34图示表示对于1%正常人血清加同种型对照、SGMI-1Fc或SGMI-2Fc,在浓度范围为0.15至1000nM时的C3b沉积水平,证明SGMI-1Fc和SGMI-2Fc两者在甘露聚糖-包被的ELISA孔中抑制来自正常血清的C3b沉积,IC_{50}值分别为大约27nM和300nM,如实施例16所述;

图35A提供在热灭活的金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)上的C3b沉积的流式细胞术分析结果,证明在正常人血清中在EDTA存在时(其已知灭活凝集素和替代途径),未观察到C3b沉积(图区1),在用Mg^{++}/EGTA处理的正常人血清中,观察到替代途径-驱动的C3b沉积(图区2),和如图区3、4和5所示,分别在因子B-耗尽的、因子D-耗尽的和备解素(因子P)-耗尽的血清中,未观察到替代途径驱动的C3b沉积,如实施例17所述;

图35B提供在热灭活的金黄色葡萄球菌上的C3b沉积的流式细胞术分析结果,证明正如在EDTA-处理的正常血清中(图区1),在3MC血清中在Mg^{++}/EGTA存在时不存在AP-驱动的C3b沉积(图区3),而图区4和5显示活性全长rMASP-3(图区4)和活性rMASP-3(CCP1-CCP2-SP)(图区5)两者在3MC血清中的AP-驱动的C3b沉积都恢复到用Mg^{++}/EGTA处理的正常血清中观察到的水平(图区2),而无活性rMASP-3(S679A)(图区6)或野生型rMASP-1(图区7)在3MC血清中都不能恢复AP-驱动的C3b沉积,如实施例17所述;

图36显示了在响应金黄色葡萄球菌时,在3MC血清中在rMASP-3存在或不存在时测定因子B切割的蛋白质印迹分析结果,证明在相对于在Mg^{++}/EGTA存在时的正常人血清而言(如泳道2(阳性对照)所示),EDTA存在时的正常人血清(阴性对照,泳道1)显示出非常少的因子B切割,如泳道3进一步所示,3MC血清在Mg^{++}/EGTA存在时显示出非常少的因子B切割。然而,如泳道4所示,通过将全长、重组MASP-3蛋白加入3MC血清中并预孵育,恢复了因子B切割,如实施例17所述;

图37显示了蛋白凝胶的考马斯染色,其中分析了因子B切割,证明因子B切割在C3、

MASP-3和前因子D(pro-factor D)存在时是最佳的(泳道1);如泳道4和5所示,单用MASP-3或单用前因子D都能介导因子B切割,只要C3存在,如实施例17所述;

图38图示表示在3MC血清中在rMASP-3存在时,得自mAbD14(其结合MASP-3)、mAb1A5(阴性对照抗体)和同种型对照抗体的金黄色葡萄球菌的C3b染色平均荧光强度(MFI)对于mAb浓度作图,证明mAbD14以浓度-依赖性方式抑制MASP-3-依赖性C3b沉积,如实施例17所述;

图39显示了前因子D底物切割的蛋白质印迹分析,其中与单用前因子D(泳道1)或无活性全长重组MASP-3(S679A;泳道3)或MASP-1(S646A;泳道4)相比,全长野生型重组MASP-3(泳道2)和MASP-1(泳道5)完全或部分地切割前因子D,产生成熟因子D,如实施例18所述;

图40是蛋白质印迹,显示与含有仅MASP-3和前因子D的对照反应(无mAb,泳道1)以及含有得自DTLac0文库的mAb(其与MASP-1结合,而不与MASP-3结合)的对照反应(泳道4)相比,MASP-3结合mAbs D14(泳道2)和M3M1(泳道3)对MASP-3-依赖性前因子D切割的抑制活性,如实施例18所述;

图41图示表示在得自MASP-3-缺陷型(3MC)、C4-缺陷型和MBL-缺陷型受试者的血清样品中,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的AP-驱动的C3b沉积水平随血清浓度的变化,证明来自患者2和患者3的MASP-3-缺乏的血清在高血清浓度(25%、12.5%、6.25%血清浓度)时具有残留的AP活性,但显著更高AP_{50}(即需要8.2%和12.3%血清以达到50%最大C3沉积),如实施例19所述;

图42A图示表示在得自MASP-3缺陷型、C4-缺陷型和MBL-缺陷型人类受试者的10%人血清样品中,在"传统的"AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的AP-驱动的C3b沉积水平随时间的变化,如实施例19所述;

图42B显示对于获自3MC患者#2(MASP-3(-/-)、MASP-1(+/+))、3MC患者#3(MASP-3(-/-)、MASP-1(-/-))的血浆和正常供体(W)的血清的蛋白质印迹,其中用人因子D特异性抗体检测人原因子D(25040道尔顿)和/或成熟因子D(24405道尔顿),如在实施例19所述;

图42C图示了对于获自3MC患者#2、3MC患者#3的血浆和正常人血清,Weislab经典、凝集素和替代途径测定的结果,如实施例19所述;

图43图示表示在来自2个正常人类受试者(NHS)和来自2个3MC患者(患者2和患者3)的血清中,在Ca^{++}不存在时测定的一系列血清浓度的甘露聚糖-包被的兔红细胞的溶血百分率(通过使溶解的兔红细胞的血红蛋白释放至上清液中测量,所述上清液按照光度测定法测量),证明与正常人血清相比,MASP-3缺陷降低了补体-介导的甘露聚糖-包被的红细胞溶解的百分率,如实施例19所述;

图44图示表示在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的AP-驱动的C3b沉积水平随加到得自人3MC患者2($MASP\text{-}3^{-/-}$)的血清样品中的重组全长MASP-3蛋白的浓度的变化,证明与阴性对照无活性重组MASP-3(MASP-3A;S679A)相比,活性重组MASP-3蛋白以浓度-依赖性方式重构在酵母聚糖-包被的板上的AP-驱动的C3b沉积,如实施例19所述;

图45图示表示在Ca^{++}不存在时测定的以下血清中一系列血清浓度的甘露聚糖-包被的兔红细胞的溶血百分率(通过使溶解的兔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量):(1)正常人血清(NHS);(2)3MC患者血清;(3)3MC患者血

清加活性全长重组MASP-3(20μg/ml);和(4)热灭活的人血清(HIS);证明与在无重组MASP-3的3MC血清中的溶血百分率相比,兔红细胞的溶血百分率在含有rMASP-3的3MC血清中显著增加(p＝0.0006),如实施例19所述;

图46图示表示在含有浓度范围为0至110μg/ml的活性重组MASP-3(在BBS/Mg^{++}/EGTA中)的来自3MC患者2和来自3MC患者3的7％人血清中兔红细胞溶解的百分率,证明兔红细胞溶解百分率以浓度-依赖性方式随重组MASP-3量而增加,如实施例19所述;和

图47图示表示对于来自正常人类受试者(NHS)、来自2个3MC患者(患者2和患者3)、来自患者3的父母和来自MBL-缺陷型受试者的血清,在甘露聚糖-包被的ELISA板上的LEA-2-驱动的C3b沉积水平随在BBS缓冲液中稀释的人血清浓度的变化。

[0038] 图48A呈现的结果显示,如实施例20中所述,在分离自野生型(WT)(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠的RPE脉络膜复合物中的基线VEGF蛋白水平;

图48B呈现的结果显示,如实施例20中所述,在黄斑变性模型中在激光诱导损伤后,(WT)(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠在第3天RPE脉络膜复合物中的VEGF蛋白水平;

图49呈现的结果显示,如实施例20中所述,在(WT)(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠中,在激光诱导损伤后第7天的平均脉络膜新生血管形成(CNV)体积;

图50图示了在经0.3mg/kg或1.0mg/kg小鼠MASP-2单克隆抗体单次ip注射预处理的WT(+/+)小鼠中,在激光诱导损伤后第7天的平均脉络膜新生血管形成(CNV)面积,如实施例21中所述;

图51A呈现的结果表明了在冠状动脉闭塞和再灌注模型中损伤后(WT)(+/+)的梗塞面积以及MASP-2(-/-)小鼠的减小梗塞面积,如实施例22中所述;

图51B给出的结果示出了在冠状动脉闭塞和再灌注模型中测试的各个动物的分布,如实施例22中所述;

图52A图示了在经历冠状动脉左前降支闭塞和再灌注后WT(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠中的平均风险面积(AAR)和梗塞体积(INF),作为总心肌体积的百分比,如实施例23中所述;

图52B图示了在经历动脉闭塞和再灌注后的WT(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠中,针对平均风险面积(AAR)作图的梗塞体积(INF)之间的关系,作为左心室心肌体积的百分比,如实施例23中所述;

图52C图示了按照Langendorff分离-再灌注的小鼠心脏模型制备的WT(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠的缓冲液灌注心脏的梗塞体积(INF),在该模型中在无血清的情况下进行全身性缺血和再灌注,如实施例23中所述;

图52D图示了按照Langendorff分离-再灌注的小鼠心脏模型制备的WT(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠的缓冲液灌注心脏的梗塞体积(INF)和风险区(RZ)之间的关系,如实例23中所述;

图53A图示了在免疫复合物包被平板上的C3b沉积测定结果,其中符号“*”表示来自WT(MASP-2(+/+))的血清;符号“●”表示WT血清(C1q耗尽);符号“□”表示MASP-2(-/-)血清;和符号“Δ”表示MASP-2(-/-)血清(C1q耗尽),这表明MASP-2(-/-)小鼠保留功能性经典途径,如实施例24中所述;

图53B图示了在酵母聚糖包被平板上的C3b沉积测定结果,其中符号“*”表示来自

WT(MASP-2(+/+))的血清,和符号“□”表示MASP-2(-/-)血清;这表明MASP-2(-/-)小鼠保留功能性替代途径,如实施例24中所述;

图54A图示了在C4(-/-)小鼠(n=6)和匹配WT同窝对照(n=7)中,在结扎冠状动脉左前降支(LAD)和再灌注后,心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)诱导的组织损失,示出了风险面积(AAR)和梗死面积(INF),如实施例24中所述;

图54B图示了如图42A所述处理的C4(-/-)和WT小鼠中,梗塞面积(INF)作为风险面积(AAR)的函数,这表明C4(-/-)小鼠与WT对照(虚线)同样易受MIRI,如实施例24中所述;

图55A图示了使用WT小鼠血清、C4(-/-)小鼠血清和经甘露聚糖预孵育的C4(-/-)小鼠血清,C3b沉积测定的结果,如实施例24中所述;

图55B图示了使用与不同浓度的鼠MASP-2单克隆抗体(mAbM11)混合的WT小鼠血清、C4(-/-)小鼠血清和MASP-2(-/-)小鼠血清,C3b沉积测定的结果,如实施例24所述;

图55C图示了使用来自WT(C4-足够)和C4缺陷受试者的人血清,以及经甘露聚糖预孵育的C4缺陷受试者的血清,C3b沉积测定的结果,如实施例24中所述;

图55D图示了使用与人MASP-2mAb(mAbH3)混合的来自WT(C4-足够)和C4缺陷受试者的人血清,C3b沉积测定的结果,如实施例24中所述;

图56A图示了在凝集素激活途径特异性测定条件下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的血浆的C3转化酶活性的比较分析,如实施例24中所述;

图56B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的血浆中C3转化酶活性的时间分辨动力学,如实施例24中所述;

图57A图示了在胃肠道(GIRI)中诱导短暂缺血/再灌注损伤后,WT和MASP-2(-/-)小鼠的组织损伤程度,证明与WT对照相比,MASP-2(-/-)小鼠具有显著程度的保护,如实施例25中所述;

图57B图示了C4b沉积测定的结果,所述测定使用获自在腹膜内单剂量推注重组鼠MASP-2抗体(mAbM11)后一段时间的小鼠(n=3)的血清进行,证明在体内凝集素途径的功能活性消融,如实施例25中描述的;

图57C图示了MASP-2mAb治疗对GIRI病理严重程度的作用,这表明在胃肠道(GIRI)中经受短暂缺血/再灌注损伤前24小时给予鼠MASP-2单克隆抗体(mAbM11)的小鼠与给予盐水的小鼠相比,具有显著减少的组织损伤(*P<0.05,当比较用MASP-2抑制性抗体mAbM11或无关同种型对照抗体处理的动物时),如实施例25中描述的;

图57D显示在诱导GIRI之前12小时,用单剂量腹膜内注射盐水、同种型对照抗体或重组鼠MASP-2抗体(mAbM11)预处理的小鼠中小肠的GIRI介导的病理组织学呈现,如实施例25中描述的;

图58图示了在30分钟缺血和24小时再灌注后,WT(MASP-2(+/+))和MASP-2(-/-)小鼠的脑梗塞体积,如实施例26中所述;

图59A示出了在30分钟缺血和24小时再灌注后,WT(MASP-2+/+)小鼠的一系列染色的脑切片照片。图52A的1-8组表明脑的不同切片区域,相对于听神经外叶(前囟点0)分别对应于前囟点1-8,如实施例26中所述;

图59B示出了在30分钟缺血和24小时再灌注后,MASP-2(-/-)小鼠的一系列染色的

脑切片照片。图52B的1-8组表明脑的不同切片区域,相对于听神经外叶(前囟点0)分别对应于前囟点1-8,如实施例26中所述;

图60呈现的结果显示了在Col2 mAb诱导的类风湿性关节炎后,(WT)(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠随时间变化的平均临床关节炎评分,如实施例27中所述;

图61图示了对在屋尘螨或酵母聚糖存在时获自WT小鼠的血清样品的C3沉积测定结果,如实施例28中所述;

图62A和62B呈现了在正常大鼠血清中给予MASP-2Fab2抗体(H1)后抑制C4b沉积(图62A)和抑制凝血酶活化的剂量反应曲线,如实施例29所述;

图63A和63B呈现了在弥散性血管内凝血的局部Shwartzman反应模型中,与未处理的野生型小鼠和其中补体途径被耗尽剂眼镜蛇毒因子(CVF)和终端途径抑制剂(C5aR拮抗剂)抑制的野生型小鼠的血小板聚集(图63A)相比,MASP-2(-/-)小鼠所测定的血小板聚集(图63B)(表示为聚集面积),如实例30中所述;

图64说明了蛋白质印迹分析结果,表明凝血酶底物FXIa和FXa活化人C3,通过a'链的存在表示,如实施例31中所述;

图65图示了对获自WT、MASP-2(-/-)、F11(-/-)、F11(-/-)/C4(-/-)和C4(-/-)小鼠的血清样品的C3b沉积测定结果,这表明即使在完全不存在C4或F11时,也有功能性凝集素途径,而具有组合F11-(-/-)/C4(-/-)-缺陷的小鼠缺乏功能性凝集素途径,如实施例31中描述的;

图66图示了在MASP-2(-/-)和WT小鼠中在LPS注射后至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小鼠百分比,表明WT小鼠在15分钟后检测到血栓形成,高达80%的WT小鼠显示在60分钟时血栓形成;相比之下,在60分钟期间,MASP-2(-/-)小鼠无一显示任何血栓形成(对数秩:P=0.0005),如实施例32中描述的;

图67图示了在STX/LPS诱导的HUS模型中,盐水处理的对照小鼠(n=5)和MASP-2抗体处理的小鼠(n=5)随时间(小时)的存活百分比,这表明,所有对照小鼠在42小时内死亡,而相比之下,100%的MASP-2抗体处理的小鼠在整个实验的时间过程中存活,如实施例33中描述的;

图68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,如实施例34中描述的;

图69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,其中数据报告为具有平均值(水平条)和标准误差条(垂直条)的散点图。用于分析的统计检验是非配对t检验;其中符号"*"表示p值=0.0129,如实施例34中描述的;和

图70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小时再次给药)的野生型小鼠,以分钟计的至闭塞的时间,如实施例34中所述。

[0039] 序列表描述

SEQ ID NO:1人MAp19 cDNA

SEQ ID NO:2人MAp19蛋白(带前导序列)

SEQ ID NO:3人MAp19蛋白(成熟)

SEQ ID NO:4人MASP-2cDNA

SEQ ID NO:5人MASP-2蛋白(带前导序列)

SEQ ID NO:6人MASP-2蛋白(成熟)

SEQ ID NO:7人MASP-3cDNA

SEQ ID NO:8人MASP-3蛋白(w/前导序列)

SEQ ID NO:9人MASP-1cDNA

SEQ ID NO:10人MASP-1蛋白(w/前导序列)

SEQ ID NO:11人MAp44蛋白(w/前导序列)

SEQ ID NO:12大鼠MASP-2cDNA

SEQ ID NO:13大鼠MASP-2蛋白(带前导序列)

SEQ ID NO:14编码17D20_dc35VH21N11VL(OMS646)重链可变区(VH)(无信号肽)的DNA

SEQ ID NO:1517D20_dc35VH21N11VL(OMS646)重链可变区(VH)多肽

SEQ ID NO:1617N16mc重链可变区(VH)多肽

SEQ ID NO:1717D20_dc21N11VL(OMS644)轻链可变区(VL)多肽

SEQ ID NO:18编码17N16_dc17N9(OMS641)轻链可变区(VL)(无信号肽)的DNA

SEQ ID NO:1917N16_dc17N9(OMS641)轻链可变区(VL)多肽

SEQ ID NO:20:scFv子克隆(daughter clone)17N16m_d17N9全长多肽

SEQ ID NO:21:scFv子克隆17D20m_d3521N11全长多肽

SEQ ID NO:22:编码全长多肽(无信号肽)的scFv子克隆17N16m_d17N9 DNA

SEQ ID NO:23:编码全长多肽(无信号肽)的scFv子克隆17D20m_d3521N11 DNA

SEQ ID NO:24:亲代DTLac0重链可变区(VH)多肽

SEQ ID NO:25:MASP-3特异性克隆M3J5重链可变区(VH)多肽

SEQ ID NO:26:MASP-3特异性克隆M3M1重链可变区(VH)多肽

SEQ ID NO:27:亲代DTLac0轻链可变区(VL)多肽

SEQ ID NO:28:MASP-3特异性克隆M3J5轻链可变区(VL)多肽

SEQ ID NO:29:MASP-3特异性克隆M3M1轻链可变区(VL)多肽

SEQ ID NO:30:MASP-3克隆D14重链可变区(VH)多肽

SEQ ID NO:31:MASP-3克隆D14轻链可变区(VL)多肽

SEQ ID NO:32:MASP-1克隆1E10重链可变区(VH)多肽

SEQ ID NO:33:MASP-1克隆1E10轻链可变区(VL)多肽

SEQ ID NO:34SGMI-1肽

SEQ ID NO:35SGMI-2肽

SEQ ID NO:36人IgG1-Fc多肽;

SEQ ID NO:37肽接头#1(12aa);

SEQ ID NO:38:肽接头#2(10aa);

SEQ ID NO:39:编码包含人IL-2-信号序列、SGMI-1、接头#1和人IgG1-Fc的多肽融合物的核酸;

SEQ ID NO:40:包含SGMI-1、接头#1和人IgG1-Fc的成熟多肽融合物(SGMI-1Fc);SEQ ID NO:41:编码包含人IL-2-信号序列、SGMI-2、接头#1和人IgG1-Fc的多肽融合物的核酸;

SEQ ID NO:42:包含SGMI-2、接头#1和人IgG1-Fc的成熟多肽融合物(SGMI-2Fc)。

具体实施方式

I.定义

除非本文明确规定,否则本文使用的所有术语都具有如本发明领域的普通技术人员所理解的相同含义。当这些术语用于说明书和权利要求书以描述本发明时,提供下列定义以澄清所述术语。

[0041] 如本文所用,凝集素途径效应物分支(arm)1(“LEA-1”)是指由MASP-3所致的因子B和因子D的凝集素-依赖性活化。

[0042] 如本文所用,凝集素途径效应物分支2(“LEA-2”)是指MASP-2-依赖性补体活化。

[0043] 本文所用的术语“MASP-3-依赖性补体活化”包含2部分:(i)因子B和因子D的凝集素MASP-3-依赖性活化,其包括在LEA-1-介导的补体活化中,在Ca^{++}存在时发生,通常导致C3bB转化为C3bBb和前因子D转化为因子D;和(ii)因子B和因子D的凝集素-非依赖性转化,其可以发生在Ca^{++}不存在时,通常导致C3bB转化为C3bBb和前因子D转化为因子D。已经确定LEA-1-介导的补体活化以及因子B和因子D的凝集素-非依赖性转化导致调理作用和/或细胞溶解。尽管不希望受到任何特定理论的束缚,但认为仅当多个C3b分子靠近地缔合和结合时,C3bBb C3转化酶才改变其底物特异性并切割C5为替代途径C5转化酶,即C3bBb(C3b)n。

[0044] 本文所用的术语“MASP-2-依赖性补体活化”在本文中也称为LEA-2-介导的补体活化,包括MASP-2凝集素-依赖性活化,其在Ca^{++}存在时发生,导致凝集素途径C3转化酶C4b2a的形成和在C3切割产物C3b积累后随之导致C5转化酶C4b2a(C3b)n的形成,其被确定导致调理作用和/或细胞溶解。

[0045] 本文所用的术语“替代途径的传统理解”也称为“传统的替代途径”是指先于本文所述的发现的替代途径,即例如由以下触发的补体活化:来自真菌和酵母细胞壁的酵母聚糖,来自革兰氏阴性外膜的脂多糖(LPS),和兔红细胞,以及多种纯的多糖、病毒、细菌、动物肿瘤细胞、寄生虫和受损细胞,并且在传统上一直认为是由自补体因子C3自发蛋白水解产生的C3b而引起的。如本文所用,“传统的替代途径”(在本文中也称为“替代途径”)的活化在Mg^{++}/EGTA缓冲液中(即在Ca^{++}不存在时)测定。

[0046] 本文所用的术语“凝集素途径”是指通过血清和非血清糖-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))的特异性结合而发生的补体活化。如本文所述,本发明人已经发现凝集素途径被两个效应物分支驱动:凝集素途径效应物分支1(LEA-1),其现在已知是MASP-3-依赖性的;和凝集素途径效应物分支2(LEA-2),其是MASP-2-依赖性的。如本文所用,凝集素途径的活化使用含有Ca^{++}的缓冲液来评价。

[0047] 本文所用的术语“经典途径”是指由抗体与外源颗粒结合而触发的并且需要结合识别分子C1q的补体活化。

[0048] 本文所用的术语“HTRA-1”是指丝氨酸肽酶高温需要丝氨酸蛋白酶A1。

[0049] 本文所用的术语“MASP-3抑制剂”是指直接或间接抑制MASP-3-依赖性补体活化的任何试剂,包括与MASP-3结合或直接与MASP-3相互作用的试剂,包括MASP-3抗体和其MASP-3结合片段、天然的和合成的肽、竞争性底物、小分子、表达抑制剂和分离的天然抑制剂,并且也包括与MASP-3竞争性结合在凝集素途径中的另一识别分子(例如MBL、CL-11、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白或L-纤维胶凝蛋白)的肽。在一个实施方案中,MASP-3抑制剂对MASP-3具有特异性,并且不结合MASP-1或MASP-2。直接抑制MASP-3的抑制剂可称为直接MASP-3抑制剂(例如MASP-3抗体),而间接抑制MASP-3的抑制剂可称为间接MASP-3抑制剂(例如抑制MASP-3活化的MASP-1抗体)。直接MASP-3抑制剂的实例是MASP-3特异性抑制剂,例如特异性地与MASP-3(SEQ ID NO:8)的一部分结合的MASP-3抑制剂,其结合亲和性比补体系统中的其它成分高至少10倍。在一个实施方案中,MASP-3抑制剂间接抑制MASP-3活性,例如,MASP-3活化抑制剂,包括MASP-1-介导的MASP-3活化抑制剂(例如MASP-1抗体或其MASP-1结合片段、天然的和合成的肽、小分子、表达抑制剂和分离的天然抑制剂,并且也包括与MASP-1竞争性结合到MASP-3的肽)。在另一个实施方案中,MASP-3抑制剂抑制MASP-3-介导的因子D成熟。在另一个实施方案中,MASP-3抑制剂抑制MASP-3-介导的因子B活化。用于本发明方法的MASP-3抑制剂可以降低MASP-3-依赖性补体活化达大于10%、例如大于20%、大于50%或大于90%。在一个实施方案中,MASP-3抑制剂降低MASP-3-依赖性补体活化达大于90%(即导致MASP-3补体活化仅为10%或更低)。预计MASP-3抑制将会全部或部分地阻断LEA-1-相关的细胞溶解和调理作用以及因子B和因子D相关的细胞溶解和调理作用的凝集素-非依赖性转化两者。

[0050] 本文所用的术语“MASP-1抑制剂”是指与MASP-1结合或直接与MASP-1相互作用并抑制以下至少一项的任何试剂:(i)MASP-3-依赖性补体活化和/或(ii)MASP-2-依赖性补体活化和/或(iii)凝集素-非依赖性的或凝集素-依赖性MASP-1-介导的因子D成熟,其中因子D的凝集素-依赖性MASP-1成熟涉及到因子D的直接活化,包括MASP-1抗体及其MASP-1结合片段、天然的和合成的肽、小分子、表达抑制剂和分离的天然抑制剂,并且也包括与MASP-1竞争性结合到凝集素途径中的另一识别分子(例如,MBL、CL-11、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白或L-纤维胶凝蛋白)上的肽。在一个实施方案中,用于本发明方法的MASP-1抑制剂降低MASP-3-依赖性补体活化达大于10%、例如大于20%、大于50%或大于90%。在一个实施方案中,MASP-1抑制剂降低MASP-3-依赖性补体活化达大于90%(即导致MASP-3补体活化仅为10%或更低)。在另一个实施方案中,用于本发明方法的MASP-1抑制剂降低MASP-2-依赖性补体活化达大于10%、例如大于20%、大于50%或大于90%。在一个实施方案中,MASP-1抑制剂降低MASP-2-依赖性补体活化达大于90%(即导致MASP-2补体活化仅为10%或更低)。

[0051] 在另一个实施方案中,用于本发明方法的MASP-1抑制剂降低MASP-3-依赖性补体活化(LEA-1)、因子B和因子D的凝集素-非依赖性转化、和MASP-2-依赖性补体活化(LEA-2)达大于10%、例如大于20%、大于50%或大于90%。在一个实施方案中,MASP-1抑制剂降低MASP-3-依赖性补体活化(LEA-1)、因子B和因子D的凝集素-非依赖性转化、和MASP-2-依赖性补体活化(LEA-2)达大于90%(即导致MASP-3补体活化仅为10%或更低和MASP-2补体活化仅为10%或更低)。

[0052] 直接MASP-1抑制剂的实例是MASP-1-特异性抑制剂,例如特异性地与MASP-1(SEQ

ID NO:10)的一部分结合的MASP-1抑制剂,其结合亲和性比补体系统中的其它成分高至少10倍。在许多情况下,鉴于MASP-1可以活化MASP-3,并且鉴于MASP-1可以活化MASP-2,预计MASP-1的抑制将有效抑制MASP-3和/或MASP-2。然而,在某些情况下,相对于其它MASP靶的抑制,MASP-1或MASP-3或MASP-2任一的抑制可以是优选的实施方案。例如,在金黄色葡萄球感染的情况下,MASP-3已经证明被活化并在MASP-1不存在时负责金黄色葡萄球菌调理作用(参见Iwaki D.等人,JImmunol 187(7):3751-8(2011))。因此,在例如阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)的治疗中,直接抑制MASP-1而不是MASP-3可能是有利的,从而在PNH的LEA-1-抑制性治疗期间降低对金黄色葡萄球菌的可能易感性。

[0053] 本文所用的术语"MASP-2抑制剂"是指与MASP-2结合或直接与MASP-2相互作用并抑制以下至少一项的任何试剂:(i)MASP-2-依赖性补体活化和/或(ii)MASP-1-依赖性补体活化,包括MASP-2抗体及其MASP-2结合片段、天然的和合成的肽、小分子、表达抑制剂和分离的天然抑制剂,并且也包括与MASP-2竞争性结合到凝集素途径中的另一识别分子(例如,MBL、CL-11、H-纤维胶凝蛋白、M-纤维胶凝蛋白或L-纤维胶凝蛋白)上的肽。用于本发明方法的MASP-2抑制剂可以降低MASP-2-依赖性补体活化达大于10%、例如大于20%、大于50%或大于90%。在一个实施方案中,MASP-2抑制剂降低MASP-2-依赖性补体活化达大于90%(即导致MASP-2补体活化仅为10%或更低)。直接MASP-2抑制剂的实例是MASP-2-特异性抑制剂,例如特异性地与MASP-2(SEQ ID NO:5)的一部分结合的MASP-2抑制剂,其结合亲和性比补体系统中的其它成分高至少10倍。

[0054] 本文所用的术语"抗体"包括这样的抗体及其抗体片段:其得自产生抗体的任何哺乳动物(如小鼠、大鼠、兔和包括人在内的灵长类动物),或得自杂交瘤、噬菌体选择、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),并与靶多肽(例如MASP-1、MASP-2或MASP-3多肽或其部分)特异性结合。不意欲按照抗体来源或其制备方式(例如通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物、肽合成等)来限制术语"抗体"。示例性的抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体和重组抗体;泛-特异性、多特异性抗体(如双特异性抗体、三特异性抗体);人源化抗体;鼠抗体;嵌合的小鼠-人、小鼠-灵长类、灵长类-人单克隆抗体;和抗-独特型抗体,并且可以是任何完整的抗体或其片段。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、人源化抗体、嵌合抗体以及包含所需特异性的抗原-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。

[0055] "单克隆抗体"是指同质抗体群,其中所述单克隆抗体由在选择结合表位中涉及的氨基酸(天然存在的和非-天然存在的)组成。单克隆抗体对靶抗原是高度特异性的。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、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体、以及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。不意欲按照抗体来源或其制备方式(例如通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)来限制它。该术语包括完整免疫球蛋白以及按照以上"抗体"定义所描述的片段等。

[0056] 本文所用的术语"抗体片段"是指是指得自或涉及全长抗体(例如MASP-1、MASP-2

或MASP-3的抗体)的一部分,一般包括其抗原结合区或其可变区。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、单链抗体分子和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0057] 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上。通常,Fv多肽还包括VH和VL结构域之间的多肽接头,这使得scFv能够形成所需的抗原结合结构。

[0058] 本文所用的"嵌合抗体"是含有得自非人物种(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来源于人抗体。

[0059] 本文所用的"人源化抗体"是包含符合源自非人免疫球蛋白的特异性互补决定区的最小序列的嵌合抗体,该特异性互补决定区被植入人抗体构架中。人源化抗体通常是其中只有抗体互补决定区是非人来源的重组蛋白(包括从噬菌体展示或酵母中产生的抗体)。

[0060] 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")。

[0061] 本文所用的"膜攻击复合物"("MAC")是指插入并破坏膜的末端5种补体成分(C5b以及C6、C7、C8和C9)的复合物(也称为C5b-9)。

[0062] 本文所用的"受试者"包括所有哺乳动物,包括但不限于人、非人灵长类动物、狗、猫、马、绵羊、山羊、牛、兔、猪和啮齿动物。

[0063] 本文所用的氨基酸残基的缩写如下: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)。

[0064] 从最广意义上看,天然存在的氨基酸可根据各个氨基酸侧链的化学特性来分组。"疏水"氨基酸是指Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、Val、Ala、Cys或Pro的任一个。"亲水"氨基酸是指Gly、Asn、Gln、Ser、Thr、Asp、Glu、Lys、Arg或His的任一个。氨基酸的这种分组可进一步细分如下。"不带电荷的亲水"氨基酸是指Ser、Thr、Asn或Gln的任一个。"酸性"氨基酸是指Glu或Asp的任一个。"碱性"氨基酸是指Lys、Arg或His的任一个。

[0065] 本文所用的术语"保守氨基酸置换"通过下面每组中氨基酸之间的置换来说明:(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)谷胺酰胺和天冬酰胺;和(6)赖氨酸、精氨酸和组氨酸。

[0066] 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。该术语还包括由天然存在的核苷酸、糖和核苷酸间(骨架)共价键所组成的寡核苷酸碱基以及具有非天然存在的修饰的寡核苷酸。

[0067] 本文所用的"表位"是指在蛋白(例如人MASP-3蛋白)上的与抗体结合的位点。"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。

[0068] 本文所用的术语"多肽"、"肽"和"蛋白"可互换使用,是指氨基酸的任何肽-连接的链,不管长度或翻译后修饰如何。本文所述的MASP蛋白(MASP-1、MASP-2或MASP-3)可含有或可以是野生型蛋白,或可以是具有不超过50(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。保守置换典型地包括以下组内的置换: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;以及苯基丙氨酸和酪氨酸。

[0069] 本文所述的人MASP-1蛋白(如SEQ ID NO:10所示)、人MASP-2蛋白(如SEQ ID NO:5所示)和人MASP-3蛋白(如SEQ ID NO:8所示)还包括所述蛋白的"肽片段",其比全长和/或未成熟(前-原(pre-pro))MASP蛋白更短,所包括的MASP蛋白的肽片段包括蛋白的末端以及内部缺失变体。缺失变体可以缺少(两个或更多氨基酸的)1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸区段或不连续的单个氨基酸。在某些实施方案中,人MASP-1蛋白可以具有这样的氨基酸序列:其与具有SEQ ID NO:10给出的氨基酸序列的人MASP-1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)%的同一性。

[0070] 在某些实施方案中,人MASP-3蛋白可以具有这样的氨基酸序列:其与具有SEQ ID NO:8给出的氨基酸序列的人MASP-3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)%的同一性。

[0071] 在某些实施方案中,人MASP-2蛋白可以具有这样的氨基酸序列:其与具有SEQ ID NO:5给出的氨基酸序列的人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)%的同一性。

[0072] 在某些实施方案中,肽片段的长度可以是至少6(例如,至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、250、300、350、400、450、500或600或更多)个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:5、8或10的任一个的至少6个连续氨基酸残基)。在某些实施方案中,人MASP蛋白的抗原性肽片段的长度为少于500(例如,少于450、400、350、325、300、275、250、225、200、190、180、170、160、150、140、130、120、110、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7或6)个氨基酸残基(例如SEQ ID NO:5、8或10的任一个的少于500个连续氨基酸残基)。

[0073] 在某些实施方案中,在产生结合MASP-1、MASP-2和/或MASP-3的抗体的情况下,肽片段是抗原性的,并保留全长蛋白在哺乳动物中诱导抗原性反应的能力的至少10%(例如,至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少55%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%、至少99.5%、或100%或更多)(参见以下"产生抗体的方法")。

[0074] 氨基酸序列同一性的百分率(%)定义为在比对序列和引入缺口(如果必要)以实现最大百分率序列同一性后,与参考序列中的氨基酸相同的候选序列中的氨基酸的百分率。为确定序列同一性百分率的比对可以以本领域技术内的多种方式来实现,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。用于测定比对的合适参数,包括实现跨越待比较的序列全长的最大比对所需的任何算法,可以

通过已知方法来确定。

[0075] 在代表性的实施方案中,人MASP-1蛋白(SEQ ID NO:10)由SEQ ID NO:9给出的cDNA序列编码;人MASP-2蛋白(SEQ ID NO:5)由SEQ ID NO:4给出的cDNA序列编码;和人MASP-3蛋白(SEQ ID NO:8)由SEQ ID NO:7给出的cDNA序列编码。本领域技术人员将知道,SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:7中公开的cDNA序列分别表示人MASP-1、MASP-2和MASP-3的单个等位基因,并且预期发生等位变异和可变剪接。SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列的等位变体,包括含有沉默突变的那些和其中突变导致氨基酸序列改变的那些,都在本发明范围内。可按照标准程序,通过探测来自不同个体的cDNA或基因组文库,克隆MASP-1、MASP-2或MASP-3序列的等位变体,或者可通过含有所述信息的数据库的同源性比较搜索(例如,BLAST搜索)来鉴定MASP-1、MASP-2或MASP-3序列的等位变体。

[0076] II.凝集素途径:新的理解

i.概述:凝集素途径已被重新定义

如本文所述,本发明人已经作出惊人发现:补体的凝集素途径具有激活补体的两个效应物分支,两者都被由碳水化合物识别成分(MBL、CL-11和纤维胶凝蛋白)所形成的凝集素途径活化复合物驱动:i)由凝集素途径-相关丝氨酸蛋白酶MASP-1和MASP-3所形成的效应物分支,在本文中称为“凝集素途径效应物分支1”或“LEA-1”;和(ii)MASP-2驱动的活化效应物分支,在本文中称为“凝集素途径效应物分支2”或“LEA-2”。LEA-1和LEA-2都可以起到细胞溶解和/或调理作用的效果。

[0077] 还已确定,MASP-3所致的因子B的凝集素-非依赖性转化以及HTRA-1、MASP-1和MASP-3所致的因子D的凝集素-非依赖性转化(这两者可在Ca^{++}不存在时发生)通常导致C3bB转化为C3bBb和前因子D转化为因子D。因此,抑制MASP-3可以同时抑制LEA-1和因子B和/或因子D的凝集素-非依赖性活化,这可导致对细胞溶解和/或调理作用的抑制。

[0078] 图1说明了对补体活化途径的这一新的理解。如图1所示,LEA-1被凝集素-结合的MASP-3所驱动,其可将因子D酶原活化为其活性形式和/或切割C3b-或C3b(H_2O)-结合的因子B,导致C3bB酶原复合物转化为其酶促活性形式C3bBb。MASP-3所产生的活化的因子D也可将C3bB或C3b(H_2O)酶原复合物转化为其酶促活性形式。MASP-1能够快速自我活化,而MASP-3不能。在许多情况下,MASP-1是MASP-3的活化剂。

[0079] 尽管在许多实例中,凝集素(即MBL、CL-11或纤维胶凝蛋白)可将活性指向细胞表面,图1也概述了MASP-3、MASP-1和HTRA-1在因子B活化和/或因子D成熟中的凝集素-非依赖性功能。正如在LEA-1中的MASP-3的凝集素-相关形式,MASP-3的凝集素-非依赖性形式能够介导将C3bB或C3b(H_2O)转化为C3bBb(另见图36和37)和将前因子D转化为因子D(参见图39)。MASP-1(另见图39)和非-MASP-相关蛋白HTRA-1也可活化因子D(Stanton等人,Evidence That the HTRA1 Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration,在2011年5月4日的The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2011会议上提交),其方式无需凝集素成分。

[0080] 因此,MASP-1(经由LEA-1和凝集素-非依赖性形式)、MASP-3(经由LEA-1和凝集素-非依赖性形式)和HTRA-1(仅凝集素-非依赖性)能够在沿着MASP-3-因子D-因子B轴上的一点或多点上直接或间接活化。在这种情况下,它们产生C3bBb(替代途径的C3转化酶)和它们

刺激C3b的产生并在微生物表面上沉积。C3b沉积在调理作用中起到关键性作用,标记微生物表面以便被宿主吞噬细胞(例如巨噬细胞)破坏。作为本文的一个实例(图35),MASP-3对于金黄色葡萄球菌的调理作用是至关重要的。C3b沉积在暴露给人血清的金黄色葡萄球菌上以MASP-3-依赖性方式快速发生(图35)。

[0081] 然而,LEA-1和MASP-3、MASP-1或HTRA-1的凝集素-非依赖性功能的贡献不限于调理作用。如图1所示,这3种成分还可通过因子B的间接或直接活化而引起细胞溶解,和C3b的产生。这些成分形成复合物,其产生替代途径C5转化酶,C3bBb(C3b)$_n$。正如本文中进一步描述的,在脑膜炎奈瑟氏菌的细胞溶解中(参见图13、14和15)对MASP-3和MBL而不是MASP-2(并且,因此在此实例中不是LEA-2)的需要,证明了LEA-1在细胞溶解中的作用。总之,得自金黄色葡萄球菌研究的调理作用结果和在脑膜炎奈瑟氏菌研究中观察到的细胞溶解结果支持LEA-1在这两个过程中的作用(如图1所示)。此外,这些研究证明调理作用和细胞溶解作用两者都可来自C3bB或C3b(H_20)的转化和/或前因子D向因子D的转化;因此,这两个过程可能是MASP-3、MASP-1或HTRA-1的凝集素-非依赖性作用的结果。因此,在图1中的本发明人开发的模型支持主要使用MASP-3的抑制剂,以及MASP-1和/或HTRA-1的抑制剂,以阻断调理作用和/或细胞溶解和治疗这些过程的失调所致的病理学。

[0082] 1.凝集素途径效应物分支(LEA-1)

凝集素途径的第一效应物分支LEA-1是由凝集素途径-相关丝氨酸蛋白酶MASP-1和MASP-3所形成。如本文所述,本发明人现在已经证明,在MASP-3不存在时和在MASP-1存在时,在表面结构上不有效活化替代途径。这些结果证明MASP-3在启动替代途径中起到先前未公开的作用,并且使用得自患有稀有3MC常染色体隐性病症的患者的MASP-3-缺乏的3MC血清证实了这一点(Rooryck C,等人,Nat Genet.43(3):197-203(2011)),所述患者具有使MASP-3丝氨酸蛋白酶结构域功能失调的突变。基于这些新发现,预期涉及替代途径的补体活化,正如常规定义的,是MASP-3-依赖性的。事实上,MASP-3,及其LEA-1活化,可以代表至今未搞清楚的替代途径的引发剂。

[0083] 如本文的实施例1-4中进一步描述,在MASP-2-缺乏的血清中,本发明人观察到更高活性的凝集素-依赖性替代途径活化,其导致针对脑膜炎奈瑟氏菌的更高杀菌活性(即细胞溶解活性)。尽管不希望受到任何特定理论的束缚,认为在MASP-2不存在时,带有MASP-1的碳水化合物识别复合物更可能紧密结合到带有MASP-3的碳水化合物识别复合物上,以活化MASP-3。已知在许多情况下,MASP-3的活化依赖于MASP-1活性,因为MASP-3不是自我活化的酶并且常常需要MASP-1的活性以便从其酶原形式转化为其酶促活性形式。MASP-1(如同MASP-2)是自我活化的酶,而MASP-3不是自我活化的,并且在许多情况下,需要MASP-1的酶促活性以便转化为其酶促活性形式。参见Zundel S,等人,J Immunol.,172(7):4342-50(2004)。在MASP-2不存在时,所有凝集素途径识别复合物都装载有MASP-1或MASP-3。因此,MASP-2不存在促进了MASP-1-介导的MASP-3向其酶促活性形式的转化。一旦MASP-3被活化,活化的MASP-3通过MASP-3-介导的C3bB向C3bBb的转化和/或前因子D向因子D的转化而启动替代途径活化(现在称为"LEA-1"活化)。C3bBb,也称为替代途径C3转化酶,切割额外的C3分子,得到调理素的C3b分子的沉积。如果若干C3b片段靠近而结合到C3bBb转化酶复合物上,则这导致形成替代途径C5转化酶C3bBb(C3b)n,其促进MAC形成。另外,C3b分子沉积在表面,形成因子B结合的新位点,其现在可以被因子D和/或MASP-3切割而形成额外位点,在此可以

形成替代途径C3和C5转化酶复合物。需要后一过程以便有效溶解细胞,并且当已经发生起初的C3b沉积后,不需要凝集素。近期出版物(Iwaki D.等人,JImmunol 187(7):3751-8(2011))以及本发明人得到的数据(图37)证明,替代途径C3转化酶酶原复合物C3bB通过活化MASP-3而转化为其酶促活性形式。本发明人现在已经发现,MASP-3-介导的因子B的切割代表新描述的LEA-1的亚成分,其促进替代途径C3转化酶C3bBb的凝集素-依赖性形成。

[0084] 2.凝集素途径效应物分支(LEA-2)

凝集素途径的第二效应物分支LEA-2,是由凝集素途径-相关丝氨酸蛋白酶MASP-2所形成。当识别成分与其各自模式结合后,MASP-2被活化,并且也可被MASP-1活化,随后切割补体成分C4为C4a和C4b。当切割产物C4b与血浆C2结合后,C4b-结合的C2变为第二MASP-2-介导的切割步骤的底物,其将C4b-结合的C2转化为酶促活性复合物C4bC2a和小C2b切割片段。C4b2a是凝集素途径的C3-转化的C3转化酶,将丰富的血浆成分C3转化为C3a和C3b。C3b经由硫酯键结合到靠近的任何表面上。如果若干C3b片段靠近而结合到C3转化酶复合物C4b2a上,则该转化酶改变其特异性,将C5转化为C5b和C5a,形成C5转化酶复合物C4b2a(C3b)n。尽管该C5转化酶可以启动MAC的形成,但该过程被认为自身不能有效促进细胞溶解。而是,由LEA-2所产生的起初的C3b调理素形成核,用于形成新的替代途径C3转化酶和C5转化酶位点,其最终导致大量MAC形成和细胞溶解。这后一事件是由与LEA-2-形成的C3b相关的因子B的因子D活化所介导,因此由于MASP-1在因子D成熟中的必要作用而依赖于LEA-1。亦存在MASP-2-依赖性C4-替代活化途径,以在C4不存在时活化C3,这在缺血-再灌注损伤的病理生理学中起到重要作用,因为C4-缺陷型小鼠不能保护自身免于缺血-再灌注损伤,而MASP-2-缺陷型小鼠却可以(Schwaeble等人,PNAS,2011supra)。LEA-2还涉及到凝血途径,包括将凝血酶原切割为凝血酶(共同途径)并还切割XII因子(接触因子)以转化为其酶促活性形式XIIa。XIIa因子反过来将XI因子切割为XIa因子(固有途径)。凝血级联的固有途径活化导致纤维蛋白形成,其对于血栓形成是至关重要的。

[0085] 图1基于本文提供的结果,说明了对凝集素途径和替代途径的新的理解。图1描绘了LEA-2在调理作用和细胞溶解两者中的作用。尽管MASP-2在生理性的多个凝集素-依赖性环境中是“下游”C3b沉积(和所导致的调理作用)的引发剂(图20A、20B、20C),但它在血清-敏感性细菌的细胞溶解中也起作用。如图1所示,对于血清-敏感性病原体例如脑膜炎奈瑟氏菌,所提出的负责MASP-2-缺乏的或MASP-2-耗尽的血清/血浆的杀菌活性增加的分子机制是,对于细菌的细胞溶解而言,与MASP-1和MASP-3缔合的凝集素途径识别复合物必须彼此靠近地结合到细菌表面上,从而允许MASP-1切割MASP-3。与MASP-1和MASP-2相反,MASP-3不是自我活化的酶,但是在许多情况下,需要被MASP-1活化/切割而转化为其酶促活性形式。

[0086] 进一步如图1所示,活化的MASP-3然后可以切割病原体表面上的C3b-结合的因子B,通过分别形成酶促活性替代途径C3和C5转化酶C3bBb和C3bBb(C3b)n而启动替代活化级联。携带MASP-2的凝集素-途径活化复合物不参与MASP-3活化,并且,在MASP-2不存在时或耗尽后,所有凝集素途径活化复合物将装载有MASP-1或MASP-3。因此,在MASP-2不存在时,在微生物表面上携带MASP-1和MASP-3的凝集素-途径活化复合物将彼此靠近的可能性明显增加,导致更多MASP-3被活化,从而导致更高速率的MASP-3-介导的C3b-结合的因子B切割,在微生物表面上形成替代途径C3和C5转化酶C3bBb和C3bBb(C3b)n。这导致末端活化级联

C5b-C9的活化,形成膜攻击复合物,其由表面-结合的C5b与C6缔合、C5bC6与C7缔合、C5bC6C7与C8缔合和C5bC6C7C8组成,导致C9聚合,其插入到细菌表面结构并在细菌壁中形成小孔,其将导致补体-靶向的细菌的渗透压杀伤。

[0087] 这一新概念的核心就是本文提供的数据清楚地显示了凝集素途径活化复合物驱动以下两个不同的活化途径,如图1所示:

i)LEA-1:MASP-3-依赖性活化途径,其通过在活化剂表面上的因子B的最初切割和活化而产生替代途径转化酶C3bBb,来启动和驱动补体活化,然后催化C3b沉积和替代途径转化酶C3bBb的形成。MASP-3-驱动的活化途径在调理作用和微生物细胞溶解中起到重要作用,并驱动在细菌表面上的替代途径,导致最佳活化速率,产生膜攻击复合物;和ii)LEA-2:MASP-2-依赖性活化途径,导致凝集素途径C3转化酶C4b2a的形成,并且在C3切割产物C3b积累后,随之形成C5转化酶C4b2a(C3b)n。在补体C4不存在时,MASP-2可以形成替代C3转化酶复合物,其包括C2和凝血因子XI。

[0088] 除了在细胞溶解中的作用外,MASP-2-驱动的活化途径还在细菌调理作用中起重要作用,导致微生物被共价结合的C3b及其切割产物(即iC3b和C3dg)所包被,这将是携带C3受体的吞噬细胞(例如粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、小胶质细胞)和网状内皮系统的摄取和杀伤的靶标。这是抵抗补体细胞溶解的细菌和微生物的清除的最有效途径。这些包括大部分革兰氏阳性菌。

[0089] 除了LEA-1和LEA-2外,对于MASP-3、MASP-1和/或HTRA-1所致的因子D的凝集素-非依赖性活化存在可能性,并且对于MASP-3所致的因子B的凝集素-非依赖性活化也存在可能性。

[0090] 尽管不希望受到任何特定理论的束缚,认为(i)LEA-1,(ii)LEA-2和(iii)因子B和/或因子D的凝集素-非依赖性活化中的每一种导致调理作用和/或伴有所导致的细胞溶解的MAC形成。

[0091] ii.MASP-1、MASP-2和MASP-3的背景

3种甘露聚糖-结合凝集素-相关丝氨酸蛋白酶(MASP-1、MASP-2和MASP-3)目前已知与具有甘露聚糖-结合凝集素(MBL)的人血清有关。甘露聚糖-结合凝集素在最近的文献中也称为“甘露糖-结合蛋白”或“甘露糖-结合凝集素”。MBL-MASP复合物通过MBL与多种微生物上存在的碳水化合物结构结合而在先天免疫中起到重要作用。MBL与特定排列的碳水化合物结构的相互作用导致MASP前酶(proenzyme)活化,其反过来又通过切割补体成分C4和C2形成C3转化酶C4b2b而活化补体(Kawasaki等人,J.Biochem 106:483-489(1989);Matsushita&Fujita,J.Exp Med.176:1497-1502(1992);Ji等人,J.Immunol 150:571-578(1993))。

[0092] MBL-MASP前酶复合物直到最近都被认为含有仅仅一类蛋白酶(MASP-1),但目前很清楚的是有2种其它不同的蛋白酶(即MASP-2和MASP-3)与MBL有关(Thiel等人,Nature386:506-510(1997);Dahl等人,Immunity 15:127-135(2001)),以及19kDa的另外的血清蛋白,称为“MAp19”或“sMAP”(Stover等人,J.Immunol 162:3481-3490(1999);Stover等人,J.Immunol 163:6848-6859(1999);Takahashi等人,Int.Immunol 11:859-63(1999))。

[0093] MAp19是MASP-2的结构基因的可变剪接的基因产物并缺乏MASP-2的4个C-末端结构域,包括丝氨酸内肽酶结构域。MASP-2基因的可变剪接/聚腺苷酸化事件产生了编码

MAp19的大量表达的截短的mRNA转录本。通过类似机制,MASP-1/3基因导致3种主要基因产物:2种丝氨酸蛋白酶MASP-1和MASP-3和称为“MAp44”的44kDa的截短的基因产物(Degn等人,J.Immunol 183(11):7371-8(2009);Skjoedt等人,JBiol Chem 285:8234-43(2010))。

[0094] MASP-1首次被描述为血清Ra-反应因子的P-100蛋白酶成分,其现在被认为是由MBL加MASP组成的复合物(Matsushita等人,Collectins andInnate Immunity,(1996);Ji等人,JImmunol 150:571-578(1993)。MBL-MASP复合物内的MBL-相关内肽酶以与补体经典途径的C1q-$(C1r)_2$-$(C1s)_2$复合物内的C1s酶明显相同的方式作用于补体成分C4和C2的能力表明,存在功能类似于C1q-$(C1r)_2$-$(C1s)_2$复合物的MBL-MASP复合物。通过C1q与免疫复合物中存在的抗体IgG或IgM的Fc区相互作用而活化C1q-$(C1r)_2$-$(C1s)_2$复合物。这导致C1r前酶的自我活化,其反过来又活化C1s前酶,后者再作用于补体成分C4和C2。

[0095] MBL-MASP复合物的化学计量学不同于C1q-$(C1r)_2$-$(C1s)_2$复合物中发现的化学计量学之处在于,不同的MBL寡聚物看来与不同比例的MASP-1/MAp19或MASP-2/MASP-3相关(Dahl等人,Immunity 15:127-135(2001)。血清中存在的大部分MASP和MAp19不与MBL复合(Thiel等人,JImmunol 165:878-887(2000))并且可以部分地与纤维胶凝蛋白缔合,纤维胶凝蛋白是目前描述的一组凝集素,其具有纤维蛋白原-样结构域,能够结合到微生物表面的N-乙酰基葡糖胺残基上(Le等人,FEBS Lett 425:367(1998);Sugimoto等人,J.Biol Chem273:20721(1998))。这其中,人L-纤维胶凝蛋白、H-纤维胶凝蛋白和M-纤维胶凝蛋白与MASP以及与MAp19缔合,并且在结合到纤维胶凝蛋白所识别的特异性碳水化合物结构上后可以活化凝集素途径(Matsushita等人,JImmunol 164:2281-2284(2000);Matsushita等人,JImmunol 168:3502-3506(2002))。除了纤维胶凝蛋白和MBL外,MBL-样凝集素胶原凝集素(称为CL-11)已被识别为凝集素途径识别分子(Hansen等人,J Immunol 185:6096-6104(2010);Schwaeble等人,PNAS108:7523-7528(2011))。具有非常明确的证据表明这些替代碳水化合物识别分子的生理重要性,因此重要的是理解MBL不是凝集素活化途径的仅有的识别成分和MBL缺陷不被误认为是凝集素-途径缺陷。与MBL结构相关的一组替代碳水化合物-识别复合物的可能的存在可以拓宽经由补体活化而起始先天免疫系统的直接响应的微生物结构谱。

[0096] 所有凝集素途径识别分子的特征在于在其胶原-同源茎区内的特异性MASP-结合基序(Wallis等人,J.Biol Chem 279:14065-14073(2004))。在MBL、CL-11和纤维胶凝蛋白中的MASP-结合位点的特征在于在该结构域内的独特基序:Hyp-Gly-Lys-Xaa-Gly-Pro,其中Hyp是羟脯氨酸和Xaa通常是脂肪族残基。该序列中的点突变破坏了MASP结合。

[0097] 1.各自的结构、序列、染色体定位和剪接变体

图2是示意图,表明MASP-2多肽(SEQ ID NO:5)和MAp19多肽(SEQ ID NO:2)的结构域结构以及编码它们的外显子。图3是示意图,表明MASP-1多肽(SEQ ID NO:10)、MASP-3多肽(SEQ ID NO:8)和MAp44多肽(SEQ ID NO:11)的结构域结构以及编码它们的外显子。如图2和3所示,丝氨酸蛋白酶MASP-1、MASP-2和MASP-3由6个独特结构域组成,其排列如同在C1r和C1s中所见;即(I)N-末端C1r/C1s/海胆VEGF/骨形成蛋白(或CUBI)结构域;(II)表皮生长因子(EGF)-样结构域;(III)第二CUB结构域(CUBII);(IV和V)2种补体对照蛋白(CCP1和CCP2)结构域;和(VI)丝氨酸蛋白酶(SP)结构域。

[0098] 人和小鼠MASP-1的cDNA-衍生的氨基酸序列(Sato等人,Int Immunol 6:665-669

(1994);Takada等人,Biochem Biophys Res Commun 196:1003-1009(1993);Takayama等人,J.Immunol 152:2308-2316(1994));人、小鼠和大鼠MASP-2的cDNA-衍生的氨基酸序列(Thiel等人,Nature 386:506-510(1997);Endo等人,J Immunol 161:4924-30(1998);Stover等人,J.Immunol 162:3481-3490(1999);Stover等人,J.Immunol 163:6848-6859(1999));以及人MASP-3的cDNA-衍生的氨基酸序列(Dahl等人,Immunity 15:127-135(2001))表明,这些蛋白酶是在其推定催化结构域中具有His、Asp和Ser残基的特征性三联体的丝氨酸肽酶(Genbank检索号:人MASP-1:BAA04477.1;小鼠MASP-1:BAA03944;大鼠MASP-1:AJ457084;人MASP-3:AAK84071;小鼠MASP-3:AB049755,正如2/15/2012访问的Genbank,其各自通过引用结合到本文中)。

[0099] 进一步如图2和3所示,当酶原转化为活性形式后,重链(α或A链)和轻链(β或B链)分裂而得到二硫键连接的A-链和代表丝氨酸蛋白酶结构域的较小的B-链。单链前酶MASP-1通过切割位于第二CCP结构域(结构域V)和丝氨酸蛋白酶结构域(结构域VI)之间的Arg-Ile键而被活化(像前酶C1r和C1s)。前酶MASP-2和MASP-3被认为是以类似于MASP-1的方式而活化。每种MASP蛋白形成同型二聚体并以Ca^{++}-依赖性方式分别与MBL和纤维胶凝蛋白缔合。

[0100] 2.MASP-1/3

人MASP-1多肽(SEQ ID NO:10)和MASP-3多肽(SEQ ID NO:8)来自一个结构基因(Dahl等人,Immunity 15:127-135(2001),其已被作图到3号染色体长臂的3q27-28区(Takada等人,Genomics 25:757-759(1995))。MASP-3和MASP-1的mRNA转录本是通过可变剪接/聚腺苷酸化过程而产生自初级转录本。MASP-3翻译产物是由α链(其是MASP-1和MASP-3共有的)和β链(丝氨酸蛋白酶结构域)(其是MASP-3独有的)组成。如图3所示,人MASP-1基因包括18个外显子。人MASP-1cDNA(如SEQ ID NO:9给出)是由外显子2、3、4、5、6、7、8、10、11、13、14、15、16、17和18所编码。进一步如图3所示,人MASP 3基因包括12个外显子。人MASP-3cDNA(如SEQ ID NO:7给出)是由外显子2、3、4、5、6、7、8、10、11和12所编码。可变剪接产生被称为MBL-相关蛋白44(“MAp44”)的蛋白(如SEQ ID NO:11给出),来自外显子2、3、4、5、6、7、8和9。

[0101] 人MASP-1多肽(来自Genbank BAA04477.1的SEQ ID NO:10)具有699个氨基酸残基,其包括19个残基的前导肽。当前导肽省略时,MASP-1的计算分子量为76,976Da。如图3所示,MASP-1氨基酸序列含有4个N-连接的糖基化位点。人MASP-1蛋白结构域(参照SEQ ID NO:10)见图3并且包括N-末端C1r/C1s/海胆VEFG/骨形成蛋白(CUBI)结构域(SEQ ID NO:10的aa 25-137)、表皮生长因子-样结构域(SEQ ID NO:10的aa 139-181)、第二CUB结构域(CUBII)(SEQ ID NO:10的aa 185-296)、以及串联的补体对照蛋白(SEQ ID NO:10的CCP1 aa 301-363和CCP2 aa 367-432)结构域和丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10的aa449-694)。

[0102] 人MASP-3多肽(SEQ ID NO:8,来自Genbank AAK84071)具有728个氨基酸残基,其包括19个残基的前导肽。当前导肽省略时,MASP-3的计算分子量为81,873Da。如图3所示,在MASP-3中有7个N-连接的糖基化位点。人MASP-3蛋白结构域(参照SEQ ID NO:8)见图3并且包括N-末端C1r/C1s/海胆VEGF/骨形成蛋白(CUBI)结构域(SEQ ID NO:8的aa 25-137)、表皮生长因子-样结构域(SEQ ID NO:8的aa 139-181)、第二CUB结构域(CUBII)(SEQ ID NO:8的aa 185-296)、以及串联的补体对照蛋白(SEQ ID NO:8的CCP1 aa301-363和CCP2 aa

367-432)结构域和丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:8的aa450-711)。

[0103] MASP-3翻译产物是由α链(重链)(α链:SEQ ID NO:8的aa 1-448)和轻链(β链:SEQ ID NO:8的aa 449-728)组成;所述α链含有CUB-1-EGF-CUB-2-CCP-1-CCP-2结构域,其是MASP-1和MASP-3两者共有的,所述轻链含有丝氨酸蛋白酶结构域,其是MASP-3和MASP-1是独有的。

[0104] 3.MASP-2

人MASP-2基因位于染色体1p36.3-2上(Stover等人,Cytogenet and Cell Genet 84:148-149(1999)和包括12个外显子,如图2所示。MASP-2(SEQ ID NO:5)和MAp19(SEQ ID NO:2)是由通过可变剪接/聚腺苷酸化而产生的单个结构基因的转录本所编码的(Stover等人,Genes and Immunity 2:119-127(2001))。人MASP-2cDNA(SEQ ID NO:4)是由外显子2、3、4、6、7、8、9、10、11和12所编码。20kDa蛋白,称为MBL-相关蛋白19("MAp19",也称为"sMAP")(SEQ ID NO:2),由(SEQ ID NO:1)所编码,产生自外显子2、3、4和5。MAp19是非酶蛋白,含有MASP-2的N-末端CUB1-EGF区与衍生自外显子5的4个额外残基(EQSL),如图2所示。

[0105] MASP-2多肽(SEQ ID NO:5)具有686个氨基酸残基,其包括15个残基的前导肽,其在分泌后被切掉,产生人MASP-2的成熟形式(SEQ ID NO:6)。如图2所示,MASP-2氨基酸序列不含任何N-连接的糖基化位点。MASP-2多肽具有类似于MASP-1、MASP-3和C1r和C1s(C1补体系统的蛋白酶)的分子结构。人MASP-2蛋白结构域(按照SEQ ID NO:5编号)见图2并且包括N-末端C1r/C1s/海胆VEGF/骨形成蛋白(CUBI)结构域(SEQ ID NO:5的aa24-136)、表皮生长因子-样结构域(SEQ ID NO:5的aa 138-180)、第二CUB结构域(CUBII)(SEQ ID NO:5的aa 184-295)、以及串联的补体对照蛋白(SEQ ID NO:5的CCP1 aa 300-359和CCP2 aa 364-431)结构域和丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:5的aa 445-682)。

[0106] 如图2所示,MASP-2多肽具有含有CUB-1-EGF-CUB-2-CCP-1-CCP-2结构域的α链(重链)(α链:SEQ ID NO:5的aa 1-443)和含有丝氨酸蛋白酶结构域的β链(轻链)(β链:aa444-686)。CUB-1、EGF和CUB-2的结构域是二聚化所需的并且CUB-1、EGF、CUB-2和CCP-1的结构域含有MBP结合位点。正如Wallis等人,J.Biol Chem 279:14065-14073(2004)所述,每个MASP-2二聚体结合到2个MBL亚单位上。

[0107] 4.MASP-1、MASP-2和MASP-3的氨基酸序列的比较

图4是MASP-1(SEQ ID NO:10)、MASP-2(SEQ ID NO:6)和MASP-3(SEQ ID NO:8)的蛋白质序列的氨基酸比对,显示CUBI、EGF、CUBII、CCP1、CCP2结构域和丝氨酸蛋白酶(SP)结构域中的保守催化三联体残基(H、D、S)。符号“.”表示相同的氨基酸序列。

[0108] 图5是MASP-1(α链:SEQ ID NO:10的aa 1-447)、MASP-2(α链:SEQ ID NO:5的aa 1-443)和MASP-3(α链:SEQ ID NO:8的aa 1-448)的α链序列的氨基酸比对,包括CUBI-EGF-CUBII-CCP1-CCP2。在CUBI、EGF和CUBII结构域中有多个同一性补位(patch),如图5中的虚线框所示。CCP1和CCP2结构域由黑色阴影框表示。人MASP1/3和人MASP-2的α链间的总体%同一性在下表1中提供。

[0109] 图6是MASP-1(β链:SEQ ID NO:10的aa 448-699)、MASP-2(β链:SEQ ID NO:5的aa 444-686)和MASP-3(β链:SEQ ID NO:8的aa 449-728)的β链序列(包括丝氨酸蛋白酶结构域)的氨基酸比对。图7A显示了MASP-1(β链:SEQ ID NO:10的aa 448-699)和MASP-2(β链:SEQ ID NO:5的aa 444-686)的β链序列之间的成对氨基酸比对。图7B显示了MASP-1(β链:

SEQ ID NO:10的aa 448-699)和MASP-3(β链:SEQ ID NO:8的aa 449-728)的β链序列之间的成对氨基酸比对。图7C显示了MASP-2(β链:SEQ ID NO:5的aa444-686)和MASP-3(β链:SEQ ID NO:8的aa 449-728)的β链序列之间的成对氨基酸比对。图5-7中的同一性区显示为围绕相同氨基酸(显示为“.”符号)的虚线框。

[0110] 人MASP-1、MASP-2和MASP-3蛋白的α和β链之间的百分比同一性在下表1中提供。

[0111] 表1:人MASP蛋白之间的百分比同一性

	A链之间的%同一性			B链之间的%同一性		
	MASP-1	MASP-2	MASP-3	MASP-1	MASP-2	MASP-3
MASP-1	100%	45.6%	98%	100%	27%	27%
MASP-2	45.6%	100%	45.4%	27%	100%	28.6%
MASP-3	98%	45.4%	100%	27%	28.6%	100%

对于α链(重链),如上表1所示,MASP-1和MASP-3的α链是相同的(除了3’末端的15个氨基酸序列)。MASP-2和MASP-3的α链间的总体%同一性为45.4%,在CUBI-EGF-CUBII结构域中有多个同一性补位,如图5所示。

[0112] 对于β链(轻链),3种β链间的总体百分比同一性很低,范围为27%至28%,然而,尽管3种B-链之间的总体同一性低,但有多个同一性补位,如图6所示。进一步如图7A-C所示,序列的相同补位在MASP-2和3之间比在1和2之间或1和3之间分布更广泛。

[0113] 在MASP-2、MASP-3、C1r和C1s中存在的所有半胱氨酸残基与MASP-1中的相当残基比对;然而,MASP-1有2个半胱氨酸残基(在L链中的位置465和481),其是MASP-2、MASP-3、C1r和C1s中不存在的。在MASP-1中的这2个半胱氨酸残基在预计的位置上,用于形成“组氨酸-环”二硫桥,正如在胰蛋白酶和胰凝乳蛋白酶中所见。这表明MASP-2、MASP-3、C1r和C1s可能通过基因复制和趋异,自MASP-1而进化(Nonaka&Miyazawa,GenomeBiology 3Reviews 1001.1-1001.5(2001))。

[0114] 5.各自的生物功能/活性,包括相关的人类遗传数据

MBL/纤维胶凝蛋白-MASP复合物在先天免疫中的作用是经由以下结合而介导:经由C-型凝集素结构域(在MBL分子中存在)与酵母、细菌、病毒和真菌上存在的碳水化合物结构的钙-依赖性结合,或经由纤维蛋白原-样结构域(在纤维胶凝蛋白分子中存在)与酵母、细菌、病毒和真菌上存在的碳水化合物结构的结合。这种识别阶段导致前酶MASP-2活化,其随后模拟C1q-(C1r)2-(C1s)2复合物内的活化的C1s的作用,通过切割C4和C2而形成C3转化酶C4b2b。这允许C4b和C3b沉积在靶病原体上并因此通过吞噬作用而促进杀伤和清除。

[0115] 近期文献中的证据表明,凝集素途径活化复合物仅需要MASP-2活性,以切割C4和C2:i)使用重组MBL和重组表达的MASP-2的最低凝集素-途径活化复合物的重构显然足以在体外有效切割C4和C2两者(Vorup-Jensen等人,J.Immunol 165:2093-2100(2000);Rossi等人,JBiol Chem 276:40880-40887(2001);Ambrus等人,JImmunol 170:1374-1382(2003);Gál等人,JBiol Chem 280:33435-33444(2005));同时ii)具有MASP-2的基因-靶向缺陷的小鼠血清缺乏任何凝集素途径功能活性(Schwaeble等人,PNAS108:7523-7528(2011))。最近描述了MASP-2的遗传确定的缺陷(Stengaard-Pedersen等人,New Eng.J.Med.349:554-560,(2003))。单核苷酸突变导致CUB1结构域中的Asp-Gly交换并使MASP-2不能与MBL结合。

[0116] 另外,同时缺乏MASP-1和MASP-3的小鼠血清的功能表征显示当在生理条件下比较野生型和MASP-1/MASP-3敲除(MASP-1/3$^{-/-}$)小鼠的血清时,凝集素途径活性减慢,但并非没有(Takahashi等人,J.Immunol 180:6132-6138(2008);Schwaeble等人,PNAS(2011))。这些研究表明与经典途径效应物内肽酶C1s相反,MASP-2的活化不一定涉及或需要任何其它MBL-相关丝氨酸内肽酶(即MASP-1或MASP-3)的活性并且MASP-2的蛋白水解活性足以将凝集素途径的碳水化合物识别分子(即MBL、纤维胶凝蛋白或CL-11)的结合转化为补体活化。然而,新近的研究已经证明尽管MASP-2具有自我活化能力,但MASP-2酶原的MASP-1活化的催化速率超过其自身酶原形式的MASP-2切割的速率大约85,000倍(Héja等人,PNAS106:10498-503(2011);Megyeri等人,J.Biol.Chem.288(13):8922-34(2013))。因此,在生理环境中,很可能MASP-2的主要活化物是MASP-1。根据所产生的C4片段大小和所产生的功能性C3转化酶活性来判断,似乎可能的是活化MASP-2以与活化C1s所进行的相同方式切割C4和C2,即,在C4的α-链内的单个精氨酰键上(Arg76 Ala77)和在C2的前酶链内的单个精氨酰键上(Arg223 Lys224)。还已报道,小鼠MASP(以小鼠MBL-MASP复合物形式,称为Ra-反应因子),不同于C1s,可切割补体成分C3的α-链,得到生物活性片段C3a和C3b(Ogata等人,J.Immunol 154:2351-2357(1995))。如果这在人体系统中发生,它将需要切割C3的α-链内的单个精氨酰键(Arg77 Ser78)。活化MASP-2,如同活化C1s,不能切割补体成分C5。MASP-1和MASP-2的蛋白水解活性被C1-抑制剂抑制(Matsushita等人,J Immunol 165:2637-2642(2000),而C1-抑制剂不与MASP-3反应(Dahl等人,Immunity15:127-135(2001);Zundel等人,JImmunol 172:4342-4350(2004))。

[0117] MASP-1和MASP-3的生物学功能一直在缓慢发现。MASP-1的底物特异性和生理作用自发现以来一直是争论对象。近年来已经鉴定了大量可能底物。已经提出MASP-1可以缓慢切割天然C3,并且这种对C3的直接切割可能启动补体级联,也许借助于替代途径(Matsushita等人,JImmunol 165:2637-2642(2000))。随后证明重组MASP-1切割无活性(硫酯水解的)形式的C3,这对于启动补体级联而言是徒劳无益的(Ambrus等人,J Immunol170:1374-1382(2003))。MASP-2-缺陷型小鼠的血清稀释液中的凝集素途径活性的缺乏明确证明了MASP-1-驱动的C3-旁路机制不存在(Schwaeble等人,PNAS108:7523-7528(2011))。被MASP-1以显著效率切割的补体成分是C2(Rossi等人,J Biol Chem 276:40880-40887(2001);Ambrus等人,J Immunol 170:1374-1382(2003))和因子D的酶原形式(Takahashi等人,JExp Med 207:29-37(2010))。正如对于MASP-1切割C2的能力,似乎可能因此MASP-1可以经由C2切割而扩大MASP-2的C3-转化酶(C4b2a)-形成能力。这一建议得到以下观点的支持:在MASP-1-耗尽的人血清中和在MASP-1/3-缺陷型小鼠血清中,凝集素途径的活性减少(Takahashi等人,JImmunol 180:6132-6138(2008)),所述观点也表明MASP-1在活化MASP-2中起作用。此外,尽管通过MBL-MASP复合物沉积的每个C4b都可形成C4b2a转化酶,但通过经典途径C1复合物沉积的4个C4b中仅有1个可以如此形成(Rawal等人,J Biol Chem283(12):7853-63(2008))。

[0118] MASP-1还切割MASP-2和MASP-3(Megyeri M.,等人,J Biol Chem.2013Mar 29;288(13):8922-34)。近期实验表明,尽管MASP-2可以自我活化,但MASP-1是酶原MASP-2的主要活化物。在MASP-1敲除小鼠血清中,MASP-2的活化被延迟(Takahashi等人,JImmunol 180:6132-6138(2008)),并且在正常人血清中当MASP-1活性被特异性抑制剂阻断时也观察到类

似结果(Kocsis等人,J Immunol 185(7):4169-78(2010))。此外,Degn等人,(J.Immunol.189(8):3957-69(2012))发现在人血清中,MASP-1对于MASP-2活化和随后的C4切割是至关重要的。酶原MASP-2转化为活性MASP-2的催化速率比MASP-2可自我活化的速率大85,000倍以上(Megyeri等人,J.Biol.Chem.288:8922-8934(2013);Héja等人,J.Biol.Chem.287(24):20290-300(2012);Héja等人,PNAS109:10498-503(2012))。

[0119] 近期研究还将MASP-1与替代途径相关联。MASP-1可将酶原因子D转化为其酶促活性形式(图39;Takahashi等人,JExp Med 207:29-37(2010))。此外,MASP-1活化MASP-3的酶原形式(Megyeri等人,J.Biol.Chem.288:8922-8934(2013);Degn等人,J.Immunol.189(8):3957-69(2012)),其自身可以活化酶原因子D(图39)以及将因子B(其是替代途径的另一必要成分)切割为其活性形式(Iwaki等人,J.Immunol.187:3751-58(2011))。然而,前因子D和前因子B的转化可能是独立于LEA-2的活化状态并且可通过非-复合物-结合的MASP-1而发生。

[0120] 若干条证据表明,MASP-1是凝血酶-样酶和在凝血途径的活化中是重要的。MASP-1可以切割凝血酶的若干底物,包括纤维蛋白原(Hajela K.等人,Immunobiology 205(4-5):467-75(2002))、XIII因子(Krarup等人,Biochim Biophys Acta 1784(9):1294-1300(2008))和蛋白酶-活化受体4(PAR4)(Megyeri等人,JImmunol 183(5):3409-16(2009))。此外,在肝素存在时的抗凝血酶是比C1-抑制剂更有效的MASP-1抑制剂(Dobó等人,J Immunol 183:1207-1214(2009))。以下观察结果也强调了补体和凝血途径之间的联系:MASP-2能够活化凝血酶原(Krarup A.等人,PLoS One 2(7):e623(2007))。当纤维蛋白凝块阻止入侵病原体的扩散时,有限的凝血代表古老类型的先天免疫。释放的血纤维蛋白肽B具有促炎活性。MASP-1-介导的PAR4切割活化内皮细胞-启动的炎性反应(Megyeri等人,JImmunol 183(5):3409-16(2009))。

[0121] MASP-3对C4、C2或C3底物没有蛋白水解活性。相反,MASP-3据报道起到凝集素途径的抑制剂的作用(Dahl等人,Immunity 15:127-135(2001))。得出该结论可能是因为与MASP-1和MASP-2相反,MASP-3不是自我活化的酶(Zundel S.等人,J Immunol 172:4342-4350(2004);Megyeri等人,J.Biol.Chem.288:8922-8934(2013)。

[0122] 最近,使用组合MASP-1和MASP-3缺陷的小鼠菌株,从转基因小鼠研究中得到MASP-1和MASP-3的可能的生理功能的证据。尽管MASP-1/3-敲除小鼠具有功能性凝集素途径(Schwaeble等人,PNAS108:7523-7528(2011)),但它们看来缺乏替代途径活性(Takahashi等人,JEM207(1):29-37(2010))。替代途径活性的缺乏看来是因为补体因子D的加工缺陷,补体因子D是替代途径活性所必需的。在MASP-1/3敲除小鼠中,所有因子D以蛋白水解的无活性前形式(pro-form)循环,而在正常小鼠血清中,几乎所有因子D都呈活性形式。生化分析表明MASP-1可以能够将补体因子D从其酶原形式转化为其酶促活性形式(图39;Takahashi等人,JEM 207(1):29-37(2010))。MASP-3在体外也切割前因子D酶原和产生活性因子D(图39;Takahashi等人,JEM 207(1):29-37(2010))。因子D以活性酶形式存在于正常个体的循环中,并且MASP-1和MASP-3、以及HTRA-1,可能负责该活化。此外,具有组合MBL和纤维胶凝蛋白缺陷的小鼠仍然产生正常水平的因子D并具有完全功能性替代途径。因此,MASP-1和MASP-3的这些生理功能不一定涉及凝集素,并因此与凝集素途径无关。重组小鼠和人MASP-3还看来在体外切割因子B和支持C3沉积在金黄色葡萄球菌上(图36;Iwaki D.等

人,JImmunol 187(7):3751-8(2011))。

[0123] 从3MC综合征(先前称为Carnevale、Mingarelli、Malpuech和Michels综合征;OMIM#257920)患者的近期研究中发现MASP-3的一个意外生理作用。这些患者表现出严重发育异常,包括腭裂、唇裂、颅骨畸形和智力迟钝。遗传学分析鉴定了功能失调的MASP-3基因为纯合子的3MC患者(Rooryck等人,Nat Genet.43(3):197-203(2011))。发现另一组3MC患者是MASP-1基因中的突变的纯合子,所述突变导致功能性MASP-1和MASP-3蛋白的不存在。再一组3MC患者缺乏功能性CL-11基因(Rooryck等人,Nat Genet.43(3):197-203(2011))。因此,CL-11MASP-3轴看来在胚胎发育期间起作用。该发育途径的分子机制尚不清楚。然而,这不太可能是由常规补体-驱动的过程介导,因为常见补体成分C3缺陷的个体并不出现这种综合征。因此,在本发明人的发现之前,如本文所述,MASP-3在凝集素-依赖性补体活化中的功能性作用在先前并未确定。

[0124] 通过X射线晶体学已经确定了MASP-1和MASP-2催化片段的结构。MASP-1蛋白酶结构域与其它补体蛋白酶的结构比较揭示出其不严格的底物特异性的基础(Dobó等人,J.Immunol 183:1207-1214(2009))。尽管MASP-2的底物结合沟的可达性受到表面环的限制(Harmat等人,JMolBiol 342:1533-1546(2004)),但MASP-1具有开放的底物结合口袋,其类似于胰蛋白酶而非其它补体蛋白酶。MASP-1结构的凝血酶-样性质是不寻常的大的60个氨基酸环(环B),其可以与底物相互作用。MASP-1结构的另一吸引人的性质是S1 Asp189和Arg224之间的内部盐桥。在因子D的底物结合口袋中可以发现类似的盐桥,其可以调节其蛋白酶活性。C1s和MASP-2具有几乎相同的底物特异性。令人吃惊的是,与C1s的相比,决定底物特异性的MASP-2的8个表面环中的一些具有完全不同的构象。这意味着这2种功能相关的酶以不同方式与相同底物相互作用。酶原MASP-2的结构显示了具有被破坏的氧阴离子洞和底物结合口袋的无活性蛋白酶结构域(Gál等人,J Biol Chem 280:33435-33444(2005))。令人吃惊的是,酶原MASP-2在大蛋白底物C4上显示了相当大的活性。很可能酶原MASP-2的结构相当柔韧,使得无活性和活性形式之间的转换成为可能。反映在结构中的这种柔韧性在自我活化过程中可能起作用。

[0125] 蛋白质印迹分析指出肝脏是MASP-1和MASP-2mRNA的主要来源。使用针对MASP-1的5'特异性cDNA探针,可见大MASP-1转录本在4.8kb和小的在大约3.4kb,这两者存在于人和小鼠肝脏内(Stover等人,Genes Immunity 4:374-84(2003))。MASP-2mRNA(2.6kb)和MAp19mRNA(1.0kb)在肝组织中大量表达。MASP-3在肝脏中表达,并且也在许多其它组织包括神经组织中表达(Lynch N.J.等人,JImmunol 174:4998-5006(2005))。

[0126] 发现具有感染和慢性炎性疾病史的患者具有MASP-2的突变形式,其不能形成活性MBL-MASP复合物(Stengaard-Pedersen等人,NEngl JMed 349:554-560(2003))。一些研究人员已经确定MBL缺陷导致对儿童频繁感染的倾向(Super等人,Lancet 2:1236-1239(1989);Garred等人,Lancet 346:941-943(1995)和对HIV感染的抵抗性增加(Nielsen等人,Clin Exp Immunol 100:219-222(1995);Garred等人,Mol Immunol 33(增刊1):8(1996))。然而,其它研究没有证明低MBL水平与增加的感染之间的显著相关(Egli等人,PLoS One.8(1):e51983(2013);Ruskamp等人,J Infect Dis.198(11):1707-13(2008);Israëls等人,Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.95(6):F452-61(2010))。尽管文献是混合的,但MASP的缺陷或无用性可能对个体产生针对某些病原体的直接非-抗体-依赖性防御

的能力具有不良效应。

[0127] iii.新的理解的支持数据,强调缺乏Ca^{++}的传统测定条件和使用包括Ca^{++}的更生理性的条件设置而得到的结果。

[0128] 本文提供了若干条独立的有力实验证据,指出补体的凝集素途径活化途径经由以下2种独立的效应物机制而活化补体的结论:i)LEA-2:MASP-2-驱动的路径,其介导补体-驱动的调理作用、趋化作用(Schwaeble等人,PNAS108:7523-7528(2011))和细胞溶解,和ii)LEA-1:新的MASP-3-依赖性活化途径,其启动补体活化,即通过经活化剂表面上的因子B的切割和活化而产生替代途径转化酶C3bBb,其然后催化C3b沉积和形成替代途径转化酶C3bBb,其可导致细胞溶解以及微生物调理作用。另外,如本文所述,由MASP-1、MASP-3或HTRA-1或任何这3者的组合所致的因子B和/或因子D的单独的凝集素-非依赖性活化,也可经由替代途径导致补体活化。

[0129] 替代途径的凝集素途径-依赖性MASP-3-驱动的活化看来有助于已充分确定的C3b-结合的因子B的因子D-介导的切割,以通过末端活化级联而达到补体-依赖性细胞溶解的最佳活化率,通过在细胞表面上形成C5b-9膜攻击复合物(MAC)而溶解细菌细胞(图14-15)。这种限速事件看来需要最佳协调,因为在MASP-3功能活性不存在时以及在因子D功能活性不存在时是有缺陷的。如本文的实施例1-4所述,本发明人在脑膜炎奈瑟氏菌感染的实验小鼠模型中研究MASP-2缺陷和MASP-2抑制的表型时,发现该MASP-3-依赖性凝集素途径功能。用基于抗体的MASP-2抑制剂治疗的基因-靶向的MASP-2-缺陷型小鼠和野生型小鼠对实验性脑膜炎奈瑟氏菌感染具有高度抗性(参见图8-12)。当将感染剂量调节至野生型同窝出生幼崽(littermate)达到大约60%死亡率时,所有MASP-2-缺乏的或MASP-2-耗尽的小鼠清除感染并且存活(参见图8和图12)。在MASP-2-缺乏的或MASP-2-耗尽的小鼠血清中血清杀菌活性显著增高反映了这种极高程度的抗性。进一步实验表明该杀菌活性依赖于替代途径-驱动的细菌溶解。缺乏因子B或因子D或C3的小鼠血清显示出无针对脑膜炎奈瑟氏菌的杀菌活性,表明替代途径对于驱动末端活化级联而言是必要的。令人吃惊的结果是缺乏MBL-A和MBL-C(这两者是识别脑膜炎奈瑟氏菌的凝集素-途径识别分子)的小鼠血清以及缺乏凝集素途径-相关丝氨酸蛋白酶MASP-1和MASP-3的小鼠血清失去所有针对脑膜炎奈瑟氏菌的溶菌活性(图15)。最近的论文(Takahashi M.等人,JEM 207:29-37(2010))和本文给出的工作(图39)证明MASP-1可以将因子D酶原形式转化为其酶促活性形式并且可以部分地解释通过这些血清中的酶促活性因子D的不存在而丧失细胞溶解活性。这未解释MBL-缺陷型小鼠中的杀菌活性的缺乏,因为这些小鼠具有正常酶促活性因子D(Banda等人,Mol Imunol 49(1-2):281-9(2011))。值得注意的是,当测试来自稀有3MC常染色体隐性病症的患者(所述患者具有使MASP-3丝氨酸蛋白酶结构域功能失调的突变)的人血清(Rooryck C,等人,Nat Genet.43(3):197-203),未检测到针对脑膜炎奈瑟氏菌的杀菌活性(注意:这些血清具有MASP-1和因子D,但没有MASP-3)。

[0130] 人血清需要凝集素途径-介导的MASP-3-依赖性活性以发展杀菌活性的假说得到以下观察结果的进一步支持:MBL-缺陷型人血清也不能溶解脑膜炎奈瑟氏菌(图13-14)。MBL是结合到该病原体上的仅有的人凝集素-途径识别分子。因为MASP-3不是自我活化的,所以本发明人假设可以通过MASP-3经由MASP-1的有利活化解释MASP-2-缺乏的血清中细菌溶解活性更高,因为在MASP-2不存在时,结合到细菌表面上的所有凝集素-途径活化复合物

都将装载有MASP-1或MASP-3。因为活化MASP-3在体外同时切割因子D(图39)和因子B,产生其各自的酶促活性形式(图37和Iwaki D.,等人,J.Immunol.187(7):3751-3758(2011)),所以MASP-3最可能的功能是促进替代途径C3转化酶(即C3bBb)的形成。

[0131] 尽管凝集素-依赖性作用的数据是引人注意的,但多个实验表明MASP-3和MASP-1在与凝集素分子的复合物中不一定具有功能。例如图35B所示的实验证明,在其中与凝集素的复合物不存在的条件下(即EGTA存在时)MASP-3活化替代途径的能力(正如C3b沉积在金黄色葡萄球菌所证明的)。图35A证明在这些条件下的沉积依赖于因子B、因子D和因子P,所有这些都是替代途径的关键成分。另外,MASP-3和MASP-1所致的因子D活化(图39)和MASP-3所致的因子B活化(图37)可以在体外在凝集素不存在时发生。最后,在人血清存在时的小鼠红细胞的溶血研究证明MBL和MASP-3两者对于细胞溶解的清楚作用。然而,MBL的缺陷不完全重现MASP-3缺陷的严重性,与如果所有功能性MASP-3都与MBL复合时所预计的相反。因此,本发明人不希望受到以下概念的限制:本文证明的MASP-3(和MASP-1)的所有作用可以仅归因于与凝集素相关的功能。

[0132] 对凝集素途径的2个效应物分支以及MASP-1、MASP-3和HTRA-1的可能的凝集素-非依赖性功能的鉴定,呈现有效治疗指定人类病理学的治疗干预的新机遇,所述病理学是在微生物病原体或改变的宿主细胞或代谢沉积物的存在下由过度补体活化所致。如本文所述,本发明人现在已经发现,在MASP-3不存在时和在MASP-1存在时,在表面结构上不活化替代途径(参见图17-18、35B、41-42、45-46)。因为替代途径在驱动导致细菌溶解以及细胞溶解的限速事件中是重要的(Mathieson PW,等人,JExp Med 177(6):1827-3(1993)),所以我们的结果证明活化MASP-3在补体的细胞溶解活性中起到重要作用。如图14-15、21-23、43-44和46-47所示,在缺乏MASP-3而非MASP-1的3MC患者血清中,补体的细胞溶解的末端活化级联是有缺陷的。图14和15所示的数据证明了在MASP-3和/或MASP-1/MASP-3功能活性不存在时损失溶菌活性。同样,在MASP-3-缺陷型人血清中的溶血活性的损失(图21-23、43-44和46-47),以及通过加入重组MASP-3而重构溶血的能力(图46-47),强烈支持以下结论:在靶表面上的替代途径的活化(其是驱动补体-介导的细胞溶解必不可少的)依赖于活化MASP-3的存在。根据以上详述的凝集素途径的新理解,靶表面的替代途径活化因此依赖于LEA-1和/或因子B和/或因子D的凝集素-非依赖性活化(其也由MASP-3介导),并且因此,阻断MASP-3-依赖性补体活化的试剂将阻止靶表面上的替代途径活化。

[0133] MASP-3-依赖性启动对替代途径活化的必要作用的公开内容暗示了替代途径并非补体活化的独立的、单一途径,正如基本上对补体的所有现有医学教科书和近期综述文章所述。现有的和广泛持有的科学概念是,替代途径通过自发的“tick-over”C3活化的放大而在某些特定靶(微生物、酵母聚糖和兔红细胞)的表面上活化。然而,在MASP-1和MASP-3双重-缺陷型小鼠血清中和人3MC患者血清中在酵母聚糖-包被的板上和2种不同细菌(脑膜炎奈瑟氏菌和金黄色葡萄球菌)上的任何替代途径活化的不存在,和来自人和小鼠的MASP-3-缺乏的血清中红细胞溶血的减少,都表明在这些表面上的替代途径活化的启动需要功能性MASP-3。MASP-3的所需作用可以是凝集素-依赖性的或凝集素-非依赖性的,并且分别导致替代途径C3转化酶和C5转化酶复合物即C3bBb和C3bBb(C3b)n的形成。因此,本发明人在此公开了对于替代途径而言存在先前难以捉摸的启动途径。该启动途径依赖于(i)LEA-1,一种新发现的凝集素途径的活化分支,和/或(ii)蛋白质MASP-3、MASP-1和HTRA-1的凝集素-

非依赖性作用。

[0134] III.MASP-2和MASP-3在阵发性夜间血红蛋白尿中的作用以及使用masp-2和MASP-3抑制剂的治疗方法

i.PNH的概述

阵发性夜间血红蛋白尿(PNH),有时也称为Marchiafava-Micheli综合征,是一种获得性的、可能危及生命的血液病。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"。大部分病例都是原发性PNH。PNH的特征在于补体-诱导的红细胞破坏(溶血)、低的红细胞计数(贫血)、血栓形成和骨髓衰竭。PNH的实验室发现显示与血管内溶血性贫血相符的变化:在作为可能诱因的自身反应性RBC-结合抗体不存在时,低的血红蛋白、升高的乳酸脱氢酶、升高的网织红细胞计数(由骨髓释放的不成熟的红细胞以置换被破坏的细胞)、升高的胆红素(血红蛋白的降解产物)。

[0135] PNH的标志是由在循环RBC表面上的未经调节的末端补体成分的活化所致的慢性补体-介导的溶血,所述补体成分包括膜攻击复合物。PNH RBC因在它们表面上的补体调节剂CD55和CD59不存在,而经历不受控制的补体活化和溶血(Lindorfer,M.A.,等人,Blood115(11):2283-91(2010),Risitano,等人,Mini-Reviews in Medicinal Chemistry,11:528-535(2011))。CD55和CD59在正常RBC上大量表达并控制补体活化。CD55作为替代途径的阴性调节剂起作用,抑制替代途径C3转化酶(C3bBb)复合物的装配并加速预先形成的转化酶的衰退,因此阻断膜攻击复合物(MAC)的形成。CD59直接通过结合C5b678复合物并阻止C9的结合和聚合而抑制补体膜攻击复合物。

[0136] 尽管溶血和贫血是PNH的主要临床特性,但该病是复杂的血液学病症,其进一步包括血栓形成和骨髓衰竭,作为临床发现的一部分(Risitano等人,MiniReviews in Med Chem11:528-535(2011))。在分子水平上,PNH是由缺乏功能性PIG A基因的造血干细胞的异常克隆扩增所致。PIG A是编码糖基化-磷脂酰肌醇转移酶的伴X基因,所述酶是GPI-锚定的A类糖蛋白(包括CD55和CD59)的稳定的表面表达所需。为了目前尚在研究的原因,作为自发体细胞突变的结果的具有功能失调的PIG A基因的造血干细胞可以经过克隆扩增到它们的后代构成相当大部分的外周造血细胞池的那一点。尽管突变干细胞克隆的红细胞和淋巴细胞的后代缺乏CD55和CD59,但当它们进入循环后,仅有RBC经历明显的溶血。

[0137] PNH的目前治疗包括对付贫血的输血,对付血栓形成的抗凝,和使用单克隆抗体eculizumab(Soliris®),其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):552-559(2004))。eculizumab(Soliris®)是人源化单克隆抗体,其靶向补体成分C5,封闭其被C5转化酶切割,从而阻止C5a的产生和MAC的装配。用eculizumab治疗PNH患者,在大约半数患者中导致血管内溶血减少(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(Risitano等人,Mini-Reviews in Medicinal Chemistry,11(6)(2011))。尽管经历eculizumab治疗的几乎所有患者都达到正常或几乎正常的LDH水平(因为控制了血管内溶血),但仅有大约三分之一的患者的血红蛋白值达到大约11gr/dL,其余接受eculizumab的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eculizumab的PNH患者含有与他们PNH红细胞结合的大量C3片段(而未经治疗的患者则没有)。该发现导致以下的认

识:在Soliris治疗的PNH患者中,因为C5阻断所致的不再被溶血的PNH RBC,现在可以积累大量的膜-结合的C3片段,其作为调理素起作用,导致它们通过特异性C3受体而被网罗到网状内皮细胞中并且随后导致血管外溶血。因此,尽管阻止了血管内溶血和所得结果,但eculizumab治疗仅仅是将这些RBC的处置从血管内转移到血管外溶血,在许多患者中导致大量剩余的未经治疗的贫血(Risitano A.M.等人,Blood 113:4094-100(2009))。因此,对于发生C3-片段-介导的血管外溶血的患者,需要除了使用eculizumab之外的治疗策略,因为他们继续需要输入红细胞。这样的C3片段靶向方法已经在实验系统中证明了用途(Lindorfer等人,Blood115:2283-91,2010)。

[0138] ii.在PNH中的补体-启动机制

在PNH中的负面补体调节剂CD55和CD59的缺陷的表面表达之间的因果关系,以及eculizumab在预防血管内溶血中的有效性,清楚地定义了PNH为补体系统所介导的病况。尽管这一范例被广泛接受,但启动补体活化事件的性质,和所涉及的补体活化途径仍然有待解决。因为CD55和CD59负面地调节所有补体启动途径共有的补体级联中的末端放大步骤,所以这些分子的缺陷将会导致膜攻击复合物的过量形成和膜整合,无论补体活化是否被凝集素途径、被经典途径或被替代途径的自发更新所启动。因此,在PNH患者中,导致C3b沉积在RBC表面的任何补体活化事件都可以触发随后的放大和病理性溶血(血管内和/或血管外)和促成溶血危象。对于在PNH受试者中触发溶血危象的分子事件的明确机制的理解,仍然是难以捉摸的。因为在经历溶血危象的PNH患者中没有补体启动事件是明显的,因此主流的观点是PNH中的补体活化可因替代途径的低水平“tick-over”活化而自发发生,其随后通过因缺乏CD55和CD59所致的末端补体活化的不适当控制而被放大。

[0139] 然而,重要的是注意到在其自然史中,PNH通常在某些事件例如感染或损伤后发生或恶化(Risitano,Biologics 2:205-222(2008)),已经证明所述事件触发补体活化。这样的补体活化反应不依赖于宿主针对刺激病原体的先前的免疫力,并且因此可能不涉及到经典途径。而是,看起来这样的补体活化反应是由凝集素结合到在微生物作用物或受损宿主组织的表面上表达的外源或“自身改变的”碳水化合物模式而启动。因此,在PNH中促使溶血危象的事件与经由凝集素启动的补体活化是密切相关的。这使以下事实变为可能:凝集素活化途径提供启动的触发,其最终导致PNH患者中的溶血。

[0140] 使用经由凝集素而活化补体的明确的病原体作为实验模型,以便在分子水平上分析活化级联,我们证明了根据刺激的微生物,补体活化可以被LEA-2或LEA-1启动,导致调理作用和/或细胞溶解。对于凝集素启动事件的双重反应(即调理作用和/或细胞溶解)的相同原理也可能适用于其它类型的感染物,或适用于在宿主组织损伤后的凝集素所致的补体活化,或可促成PNH的其它凝集素-驱动的补体活化事件。根据凝集素途径中的这种双重性,我们推断在PNH患者中,LEA-2-和/或LEA-1-启动的补体活化促进调理作用和/或通过C3b的RBC的溶解以及随后的血管外和血管内溶血。因此,在PNH的情况下,同时抑制LEA-1和LEA-2预计解决血管内和血管外溶血两者,提供了优于C5抑制剂eculizumab的明显优势。

[0141] 已经确定,肺炎链球菌暴露优先触发LEA-2的凝集素-依赖性活化,其导致通过C3b的该微生物的调理作用。因为肺炎链球菌对MAC-介导的细胞溶解具有抗性,所以将其从循环中清除掉通过C3b的调理作用而发生。该调理作用和随后从循环中的清除是LEA-2-依赖性的,正如在MASP-2-缺陷型小鼠和在用MASP-2单克隆抗体(PLOS Pathog.,8:e1002793.

(2012))治疗的小鼠中暴露的细菌对照所示。

[0142] 在研究LEA-2在对微生物作用物的先天宿主反应中的作用时,我们测试了额外的病原体。当研究脑膜炎奈瑟氏菌(Neisseriameningitidis)作为模式生物时观察到极为不同的结果。脑膜炎奈瑟氏菌也经由凝集素活化补体,并且补体活化对于在首次用于实验的宿主中的脑膜炎奈瑟氏菌感染而言是必需的。然而,LEA-2在这种反应中没有起到宿主保护功能的作用:如图8和9所示,通过MASP-2的遗传消融的LEA-2阻断在脑膜炎奈瑟氏菌感染后不降低生存率。相反,在这些研究中,通过MASP-2消融的LEA-2阻断显著地提高了生存率(图8和9)以及疾病评分(图11)。通过给予MASP-2抗体所致的LEA-2阻断得到同样结果(图12),在敲除-小鼠品系中消除了作为可能的原因的次级或补偿效应。在LEA-2-消融的动物中的这些有利结果与脑膜炎奈瑟氏菌从血液中更快速清除有关(图10)。另外,如本文所述,将脑膜炎奈瑟氏菌与正常人血清一起孵育杀伤脑膜炎奈瑟氏菌(图13)。加入阻断LEA-2的人MASP-2特异性的功能性单克隆抗体,但不给予同种型对照单克隆抗体,可以增强其杀伤反应。但是,该过程取决于凝集素和至少部分功能性补体系统,因为MBL-缺乏的人血清或热灭活的人血清不能杀伤脑膜炎奈瑟氏菌(图13)。总之,这些新发现表明在功能性补体系统存在时脑膜炎奈瑟氏菌感染受到补体活化的凝集素-依赖性的但LEA-2-非依赖性的途径的控制。

[0143] 使用来自一个3MC患者的血清标本,测试了LEA-1可能是负责脑膜炎奈瑟氏菌的凝集素-依赖性杀伤的补体途径的假设。该患者是MASP-1/3基因的外显子12中的无义突变的纯合体。结果,该患者缺乏功能性MASP-3蛋白,但其它补体足够(外显子12对MASP-3转录本是特异性的;该突变对MASP-1功能或表达水平无作用)(参见Nat Genet 43(3):197-203(2011))。正常人血清有效杀伤脑膜炎奈瑟氏菌,但缺乏MBL(凝集素途径的一种识别分子)的热灭活血清和MASP-3-缺乏的血清不能杀伤脑膜炎奈瑟氏菌(图14)。因此,LEA-1看来介导脑膜炎奈瑟氏菌杀伤。使用来自敲除小鼠品系的血清样品而证实了该发现。尽管含有补体的正常小鼠血清容易杀伤脑膜炎奈瑟氏菌,但MBL-缺陷型或MASP-1/3-缺陷型小鼠血清与缺乏功能性补体的热灭活的血清一样无效(图15)。相反,MASP-2-缺乏的血清表现出对脑膜炎奈瑟氏菌的有效杀伤。

[0144] 这些发现通过揭示凝集素-依赖性补体活化的单独的LEA-2和LEA-1途径的存在,提供了凝集素途径中迄今未知的双重性的证据。在以上详述的实例中,LEA-2和LEA-1是非-冗余的并介导不同的功能性结果。数据表明某些类型的凝集素途径活化剂(包括但不限于肺炎链球菌)经由LEA-2而优先启动补体活化,导致调理作用,而其它(以脑膜炎奈瑟氏菌为例)经由LEA-1而优先启动补体活化并促进细胞溶解过程。然而,数据不一定将LEA-2限制在调理作用和将LEA-1限制在细胞溶解过程,因为在其它情况下这两个途径可以介导调理作用和/或细胞溶解。

[0145] 在脑膜炎奈瑟氏菌所致的凝集素-依赖性补体活化的情况下,LEA-2和LEA-1分支看来彼此竞争,因为LEA-2的阻断在体外增强了LEA-1-依赖性的生物体的细胞溶解破坏(图15)。如以上详述的,该发现可以解释如下:在MASP-2不存在时,凝集素MASP-1复合物靠近凝集素MASP-3复合物滞留的可能性增加,这将增强LEA-1活化和因此促进脑膜炎奈瑟氏菌的更有效的细胞溶解。因为脑膜炎奈瑟氏菌的细胞溶解在首次进行实验的宿主中是主要的保护机制,所以LEA-2的阻断在体内增加了脑膜炎奈瑟氏菌的清除并导致增加的杀伤。

[0146] 尽管上述实例说明了LEA-2和LEA-1对于脑膜炎奈瑟氏菌感染后的结果的相反作用,但也可能存在其它情况,其中LEA-2和LEA-1两者可协同产生某种结果。如下详述,在经由凝集素(例如在PNH中存在的那些)的病理性补体活化的其它情况下,LEA-2-和LEA-1-驱动的补体活化可以以协同方式合作促进PNH的总体病理学。另外,如本文所述,MASP-3也促进因子B和因子D的凝集素-非依赖性转化,其可在Ca^{++}不存在时发生,通常导致C3bB转化为C3bBb和前因子D转化为因子D,其可进一步促进PNH病理学。

[0147] iii.PNH中的生物学和预期的功能活性

本部分描述了在PNH体外模型中LEA-2和LEA-1阻断对于溶血的抑制作用。所得发现支持使用LEA-2-阻断剂(包括但不限于,与MASP-2结合并阻断其功能的抗体)和LEA-1-阻断剂(包括但不限于,与MASP-3结合并阻断MASP-3的MASP-1-介导的活化的功能、阻断MASP-3的功能或同时阻断这两者的抗体),以治疗患有PNH的一个或多个方面的受试者,并且还使用LEA-2和/或LEA-1的抑制剂、和/或MASP-3-依赖性的、凝集素-非依赖性补体活化的抑制剂(包括MASP-2抑制剂、MASP-3抑制剂和双重-或双特异性MASP-2/MASP-3或MASP-1/MASP-2抑制剂、和泛特异性MASP-1/MASP-2/MASP-3抑制剂),以便在经历C5-抑制剂例如eculizumab治疗的PNH患者中改善C3-片段-介导的血管外溶血的作用。

[0148] iv.MASP-2抑制剂通过网状内皮系统阻断调理作用和PNH RBC的血管外溶血如上详述,PNH患者因为RBC从循环中清除的以下两种不同的机制而贫血:经由膜攻击复合物(MAC)的活化所致的血管内溶血,以及在C3b的调理作用和通过网状内皮系统的补体受体结合和摄取后的后续清除后的血管外溶血。当用eculizumab治疗患者时,极大地阻止了血管内溶血。因为eculizumab阻断末端溶解效应物机制(其发生在补体-启动的活化事件以及随后的调理作用的下游),因此eculizumab不阻断血管外溶血(Risitano A.M.等人,Blood113:4094-100(2009))。而是,在未经治疗的PNH受试者中将经历溶血的RBC在其表面上现在可以积累活化的C3b蛋白,其加大了网状内皮系统的摄取和加大了它们的血管外溶血。因此,eculizumab治疗有效地将RBC的处置从血管内溶血转移到可能的血管外溶血。结果,某些eculizumab-治疗的PNH患者仍然贫血。因此,阻断补体活化上游和阻止PNH RBC的调理作用的试剂可特别适合阻断用eculizumab偶然可见的血管外溶血。

[0149] 本文给出的微生物数据表明LEA-2通常是凝集素-依赖性调理作用的主要途径。此外,当在3种原型凝集素活化表面(甘露聚糖,图19A;酵母聚糖,图19B,和肺炎链球菌;图19C)上评价凝集素-依赖性调理作用(测量为C3b沉积)时,LEA-2看来在生理条件(即在Ca^{++}存在时,其中所有补体途径是有效的)下是凝集素-依赖性调理作用的主要途径。在这些实验条件下,与WT血清相比,MASP-2-缺乏的血清(其缺乏LEA-2)在调理测试表面中实质上效果更差。MASP-1/3-缺陷型血清(其缺乏LEA-1)也是缺损的,尽管与缺乏LEA-2的血清相比,该效果更不明显得多。LEA-2和LEA-1对凝集素-驱动的调理作用的贡献的相对量在图20A-20C中有进一步显示。尽管已经报道了在凝集素途径或经典途径不存在时,补体的替代途径支持凝集素活化表面的调理作用(Selander等人,J Clin Invest 116(5):1425-1434(2006)),但在隔离中(在无Ca^{++}的测定条件下测定)的替代途径看来比本文所述的LEA-2-和LEA-1-启动的过程实质上更加无效。通过外推,这些数据表明PNH RBC的调理作用也可被LEA-2优先启动,和在较小程度上被LEA-1(可能被替代途径扩增环扩大)启动,而不是凝集素-非依赖性替代途径活化的结果。因此,可以预计LEA-2抑制剂在限制调理作用和预防PNH

的血管外溶血中最有效。然而,认识到以下事实:凝集素而非MBL(例如纤维胶凝蛋白)结合到非-碳水化合物结构(例如乙酰化蛋白)上,并且MASP-3优先与H-纤维胶凝蛋白缔合(Skjoedt等人,Immunobiol.215:921-931,2010),也使LEA-1在PNH-相关RBC调理作用中的重要作用的可能性悬而未决。因此,预计LEA-1抑制剂具有额外的抗调理作用,而且预计LEA-1和LEA-2抑制剂的组合是最佳的并在PNH患者中在限制调理作用和血管外溶血中介导最有力的治疗益处。这一概念进一步得到图28中所示的调理作用数据的支持:与WT血清相比,因子D-缺陷型小鼠血清(其在液相中缺乏活化替代途径的能力,但具有功能性经典途径以及功能性LEA-1和LEA-2途径)显示了在调理作用中无缺陷。因子B-缺乏的血清(其缺乏LEA-1)显示了减少的调理作用,而用MASP-2单克隆抗体治疗以阻断LEA-2-介导的补体活化的因子D-缺乏的血清却得到对调理作用的更有力的抑制(图28)。重要的是,将MASP-2单克隆抗体加入到因子B-缺乏的血清抑制调理作用比单用MASP-2阻断或因子D阻断更有效。因此,LEA-2和LEA-1叠加或协同作用,以促进调理作用,并且预计交叉反应性或双特异性LEA-1/LEA-2抑制剂在PNH中在阻断调理作用和血管外溶血中最有效。

[0150] v.MASP-3抑制剂在PNH中的作用

使用PNH的体外模型,我们证明了在PNH中的补体活化和所得溶血的确是由LEA-2和/或LEA-1活化而启动,并且它不是替代途径的非依赖性功能。这些研究使用不同小鼠品系的甘露聚糖-敏化的RBC,包括来自Crry-缺陷型小鼠(小鼠的末端补体途径的一种重要的负面调节剂)的RBC,以及来自CD55/CD59-缺陷型小鼠(其缺乏在PNH患者中不存在的所述补体调节剂)的RBC。当将甘露聚糖-敏化的Crry-缺陷型RBC暴露给补体-足够的人血清时,在血清浓度3%时,RBC有效溶血(图21和22),而补体-缺乏的血清(HI:热灭活的)却不溶血。值得注意的是,补体-足够的血清(其中通过加入MASP-2抗体而阻断LEA-2)具有降低的溶血活性,并且为了有效溶血,需要6%血清。当测试CD55/CD59-缺陷型RBC时得到类似的观察结果(图24)。补充了MASP-2单克隆抗体的补体-足够的人血清(即其中LEA-2被抑制的血清)在支持溶血方面比未经处理的血清而言有效性大约低2倍。此外,与未经处理的血清相比,需要更高浓度的LEA-2-阻断血清(即经抗MASP-2单克隆抗体处理的)以促进未经处理的WT RBC的有效溶血(图23)。

[0151] 甚至更令人吃惊的是,来自功能失调的MASP-3蛋白为纯合子的3MC患者的血清(并因此缺乏LEA-1)完全不能使甘露聚糖-敏化的Crry-缺陷型RBC溶血(图22和图23)。当使用未敏化的正常RBC时观察到类似结果:如图23所示,分离自3MC患者的LEA-1-缺乏的血清在介导溶血中完全无效。总之,这些数据表明尽管LEA-2明显地促进血管内溶血反应,但LEA-1是导致溶血的主要的补体-启动途径。因此,尽管预计LEA-2阻断剂在PNH患者中显著地降低RBC的血管内溶血,但预计LEA-1阻断剂具有更深远的作用并且大量消除补体-驱动的溶血。

[0152] 应当注意,当在常规替代途径测定条件下测试时,在该研究中使用的LEA-1-缺陷型3MC患者的血清具有减少了的但有功能的替代途径(图17)。这一发现表明与替代途径活性相比,LEA-1在溶血上具有较大贡献,正如在PNH的该实验环境中常规定义的那样。经过推断,这表明LEA-1-阻断剂与替代途径的其它方面的阻断剂在预防或治疗PNH患者的血管内溶血中至少一样有效。

[0153] vi.MASP-2抑制剂在PNH中的作用

本文给出的数据表明PNH中的贫血的以下发病机制:因末端补体成分的未经调节

的活化和MAC形成所致的RBC溶血所致的血管内溶血,其主要是由(但并非唯一)LEA-1来启动;以及因通过C3b的RBC的调理作用所致的血管外溶血,其看来是主要由LEA-2来启动。尽管LEA-2在启动补体活化和促进MAC形成和溶血中的可识别的作用是显而易见的,但该过程看来比LEA-1-启动的补体活化而导致溶血的效果明显更差。因此,预计LEA-2-阻断剂在PNH患者中显著地降低血管内溶血,尽管预计该治疗活性仅仅是部分的。通过比较,对于LEA-1-阻断剂而言,预计在PNH患者中的血管内溶血更显著降低。

[0154] 血管外溶血(尽管不显著,但仍然是导致PNH中的贫血的RBC破坏的同样重要的机制),主要是C3b的调理作用的结果,其看来主要是由LEA-2介导。因此,可预计LEA-2-阻断剂优先阻断在PNH中的RBC调理作用和随后的血管外溶血。预计LEA-2-阻断剂的这一独特治疗活性对于所有PNH患者提供重要的治疗益处,因为目前并无对经历这种病理过程的PNH患者的治疗方法。

[0155] vii.LEA-2抑制剂作为LEA-1抑制剂或末端补体阻断剂的辅助治疗本文给出的数据详述了RBC清除和PNH中的贫血的两种发病机制,可以通过不同类型的治疗药分别或联合靶向这两种机制:主要是由(但并非唯一)LEA-1启动并因此预计通过LEA-1-阻断剂可有效预防的血管内溶血;以及主要由LEA-2驱动的C3b调理作用所致,并因此通过LEA-2-阻断剂有效预防的血管外溶血。

[0156] 有文件充分表明血管内和血管外溶血机制两者在PNH患者中导致贫血(Risitano等人,Blood 113:4094-4100(2009))。因此,预计预防血管内溶血的LEA-1-阻断剂和主要预防血管外溶血的LEA-2阻断剂的联用,比单用任一所述试剂更有效预防PNH患者中发生的贫血。事实上,预计LEA-1-和LEA-2-阻断剂的联用预防在PNH中的补体启动的所有相关机制并因此阻断PNH中的所有贫血症状。

[0157] 还已知道C5-阻断剂(例如eculizumab)有效阻断血管内溶血,但不干扰调理作用。这留下了一些经抗C5-治疗的PNH患者,其患有因LEA-2介导的未被治疗的血管外溶血所致的大量残余的贫血。因此,预计预防血管内溶血的C5-阻断剂(例如eculizumab)与降低血管外溶血的LEA-2阻断剂的联用,比单用任一所述试剂更有效预防PNH患者中发生的贫血。

[0158] 阻断补体系统的末端扩增环而导致C5活化和MAC沉积的其它试剂(包括但不限于阻断备解素、因子B或因子D或者增强因子I、因子H或其它补体抑制性因子的抑制活性的试剂)预计也抑制血管内溶血。然而,这些试剂在PNH患者中预计不干扰LEA-2-介导的调理作用。这留下了一些经所述试剂治疗的PNH患者,其患有因LEA-2介导的仍未被治疗的血管外溶血所致的大量残余的贫血。因此,预计用预防血管内溶血的所述试剂的治疗与使血管外溶血最小化的LEA-2阻断剂的联用,比单用任一所述试剂更有效预防PNH患者中发生的贫血。事实上,预计所述试剂和LEA-2-阻断剂的联用预防在PNH中的RBC破坏的所有相关机制并因此阻断PNH中的所有贫血症状。

[0159] viii.使用LEA-1和LEA-2的多种双特异性或泛特异性抗体以治疗PNH

如上详述,预计分别阻断LEA-1和LEA-2并因此联合阻断介导血管内以及血管外溶血的所有补体活化事件的药物试剂的组合使用,为PNH患者提供了最佳临床结果。通过例如共同给予具有LEA-1-阻断活性的抗体以及具有LEA-2-阻断活性的抗体,可以达到这一结果。在某些实施方案中,将LEA-1-和LEA-2-阻断活性合并到一个分子实体中,并且具有合并的LEA-1-和LEA-2-阻断活性的这类实体将有效阻断血管内以及血管外溶血并在PNH中预防

贫血。这类实体可包含这样的双特异性抗体或由这样的双特异性抗体组成:其中一个抗原-结合位点特异性地识别MASP-1和阻断LEA-1和减少LEA-2,而第二抗原-结合位点特异性地识别MASP-2和进一步阻断LEA-2。或者,这类实体可以由这样的双特异性单克隆抗体组成:其中一个抗原-结合位点特异性地识别MASP-3和因此阻断LEA-1,第二抗原-结合位点特异性地识别MASP-2和阻断LEA-2。这类实体可以最好由这样的双特异性单克隆抗体组成:其中一个抗原-结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者和因此阻断LEA-1和减少LEA-2,而第二抗原-结合位点特异性地识别MASP-2和进一步阻断LEA-2。根据总蛋白序列和结构中的相似性,还可预计可以开发具有两个相同结合位点的常规抗体,其以功能性方式特异性地结合到MASP-1和MASP-2和MASP-3上,因此达到功能性阻断LEA-1和LEA-2。预计这种具有泛-MASP抑制活性的抗体同时阻断血管内以及血管外溶血和因此在PNH患者中有效治疗贫血。

[0160] IV.MASP-2和MASP-3在年龄相关性黄斑变性中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法年龄相关性黄斑变性(AMD)是老年人视力障碍和失明的首要原因,占发达国家失明病例的高达50%。成人中AMD的患病率约为3%,且随年龄增加,使得超过80岁的人口中将近三分之二会有一些病征。据估计,在美国超过175万个体患有晚期AMD,并且随着人口老龄化,患病率正在增加,预计到2020年达到将近3百万(Friedman,D.S.等,Arch.Ophthalmol.122:564-572,2004)。AMD是视网膜色素上皮细胞(RPE)异常,其导致上覆中央视网膜光感受器或黄斑的变性和中心视力丧失。早期和中间形式的AMD的特征在于在邻近RPE的视网膜下间隙中玻璃疣渐进沉积,伴有视网膜中色素不规则性,玻璃疣是一种含脂质、蛋白质、脂蛋白和细胞碎片的淡黄色物质。晚期AMD由两个临床亚型组成:非新生血管的地理样萎缩(“干”)AMD和新生血管渗出(“湿”)AMD。虽然干性AMD占晚期AMD的80-90%,但大多数突发性和严重的视力丧失发生在湿性AMD患者中。还不知道这两种类型的AMD是否代表从类似的病理或两种不同的条件所产生的不同的表型。对于治疗干性AMD,美国食品和药物管理局(FDA)目前尚未批准疗法。湿性AMD的FDA批准的治疗选择包括抗血管生成药(兰尼单抗、哌加他尼钠、aflibercept)的玻璃体内注射、激光疗法、光动力激光疗法和可植入的望远镜。

[0161] AMD的病因和病理生理学是复杂和未被完全理解的。若干条证据支持补体系统的失调在AMD的发病机制中的作用。基因关联研究已经确定与AMD相关的多个基因位点,包括编码一系列补体蛋白、因子和调节剂的基因。最强关联是与补体因子H(CFH)基因的多态性,其中与非风险基因型相比Y402H变体纯合子发生AMD的风险增加约6倍,Y402H变体杂合子增加约2.5倍(Khandhadia,S.等,Immunobiol.217:127-146,2012)。在其他补体途径编码基因中的突变也已与AMD风险增加或降低关联,包括补体因子B(CFB)、C2、C3、因子I和CFH相关蛋白1和3(Khandhadia等)。在AMD患者的供体眼中的免疫组织化学和蛋白质组的研究表明,补体级联的蛋白增加并定位于玻璃疣(Issa,P.C.等,Graefes.Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.249:163-174,2011)。此外,AMD患者增加全身补体活化,如在外周血中测定的(Issa等,2011,同上)。

[0162] 在AMD的发病机制中,补体替代途径似乎比经典途径更相关。通过免疫组织化学分析,在玻璃疣中未检测到C1q,其是用于活化经典途径的必需识别组分(Mullins等.,FASEB J.14:835-846,2000;Johnson等,Exp.Eye Res.70:441-449,2000)。遗传关联研究已经牵连CFH和CFB基因。这些蛋白参与替代途径扩增环,其中CFH是流体相抑制剂且CFB是替代途径

的活化蛋白酶组分。CFH的Y402H变体影响与配体结合的相互作用,包括与C反应蛋白、肝素、M蛋白和糖胺聚糖结合。与配体结合的这一改变可降低与细胞表面的结合,这反过来又可能导致因子I介导的C3b活化片段降解降低和替代C3转化酶的调节受损,这导致过度激活替代途径(Khandhadia等,2012,同上)。CFB基因变异与对于AMD发展的保护作用相关联。功能变体fB32Q与C3b的结合亲和力为风险变体fB32R的1/4,导致C3转化酶形成减少(Montes,T.等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.106:4366-4371,2009)。

[0163] AMD中的补体启动机制

上面所讨论的人类遗传连锁研究表明对于AMD发病机制中的补体系统的重要作用。此外,补体活化产物大量存在于玻璃疣(Issa,P.C.等,Graefes.Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.249:163-174,2011),其是湿性和干性AMD两者的标志性病理损害。然而,启动补体活化的事件的性质和所涉及的补体活化途径仍然未被完全理解。

[0164] 注意到玻璃疣沉积物由源自视网膜的细胞碎片和氧化废产物(其随着眼老化而积累在RPE之下)构成是重要的。另外,氧化应激似乎发挥着重要作用(Cai等;Front Biosci.,17:1976-95,2012),并已被证明导致RPE补体活化(JBiol Chem.,284(25):16939-47,2009)。广泛认为,氧化应激和细胞或组织损伤两者激活补体系统的凝集素。例如,Collard等人已经表明,暴露于氧化应激的内皮细胞触发由凝集素介导的大量补体沉积(Collard CD等,Mol Immunol.,36(13-14):941-8,1999;Collard C.D.等,Am JPathol.,156(5):1549-56,2000),并且凝集素结合和凝集素依赖性补体活化的阻断改进氧化应激损伤的实验模型中的结果(Collard C.D.等,Am JPathol.,156(5):1549-56,2000)。因此,似乎可能的是,玻璃疣中存在的氧化废产物也经由凝集素激活补体。由此推断,凝集素依赖性补体活化可能在AMD的发病机制中发挥关键作用。

[0165] 补体系统的作用已在AMD的小鼠模型中进行评估。在光损伤小鼠模型(氧化应激介导的光感受器变性实验模型)中,经典途径消除的敲除小鼠(C57BL/6背景中的$C1q\alpha^{-/-}$)与野生型同窝小鼠相比有相同的对于光损伤的敏感度,而消除替代途径的补体因子D($CFD^{-/-}$)导致保护免于光损伤(Rohrer,B.等,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.48:5282-5289,2007)。在由布鲁赫膜的激光光凝诱导的脉络膜新生血管形成(CNV)的小鼠模型中,与野生型小鼠相比,没有补体因子B的敲除小鼠($CFB^{-/-}$)被保护免于CNV(Rohrer,B.等,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.50:3056-3064,2009)。在相同的模型中,靶向补体活化位点的补体因子H(CR2-fH)的重组形式的静脉内给药减少CNV的程度。不管CR2-fH是在激光损伤时给予还是(激光损伤后)治疗性给予,都观察这种保护作用。一种人类治疗形式的CR2-fH(TT30)在鼠CNV模型中也是有效的(Rohrer,B.等J.Ocul.Pharmacol.Ther.,28:402-409,2012)。因为fB由LEA-1活化,并且因为MASP-1和MASP-3有助于因子D的成熟,这些发现暗示LEA-1抑制剂可在AMD患者中具有治疗益处。

[0166] 使用MBL缺陷小鼠在AMD啮齿动物模型的最初实验研究并不支持凝集素途径在致病性补体活化中的关键作用(Rohrer等,MolImmunol.48:e1-8,2011)。然而,MBL只是若干凝集素之一,并且除MBL外的凝集素可能在AMD中引发补体活化。事实上,我们以前的工作已经表明,在凝集素途径功能中极为需要的限速丝氨酸蛋白酶MASP-2在AMD中起关键作用。如在美国专利7919094中描述(转让给Omeros Corporation),通过引用并入本文,并在本文实施例20和21中,在激光诱导的CNV小鼠模型(经验证的湿性AMD临床前模型)中,MASP-2缺陷型

小鼠和MASP-2抗体处理的小鼠被保护(Ryan等,Tr Am Opth Soc LXXVII:707-745,1979)。因此,LEA-2的抑制剂预期在AMD患者中有效防止CNV和改善结果。

[0167] 因此,鉴于上述情况,在AMD中LEA-1和LEA-2抑制剂预期具有独立的治疗益处。此外,与单独的任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可以实现额外的治疗益处,或者可以为更广范围患者亚群提供有效的治疗。合并的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA-2阻断剂的联合给药来实现。最佳地,LEA-1和LEA-2的抑制功能可以包含在单一的分子实体中,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0168] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗年龄相关性黄斑变性(湿和干形式)的方法,所述方法通过向患有所述病况的受试者给予一种组合物来进行,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可以局部给药至眼,例如通过冲洗、玻璃体内给予或以凝胶、药膏或滴剂的形式施用该组合物。或者,MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0169] 在一个实施方案中,根据本发明此方面的方法进一步包括在患有年龄相关性黄斑变性的受试者中抑制LEA-2依赖性补体活化,包括向有此需要的受试者给予治疗有效量MASP-2抑制剂和MASP-1,MASP-3或MASP 1/3抑制剂。如上详述,在AMD患者中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0170] MASP-2抑制性组合物可以局部给药至眼,例如通过冲洗、玻璃体内注射或以凝胶、药膏或滴剂的形式局部施用组合物。或者,MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0171] 本发明的MASP-3抑制性组合物和任选MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于治疗AMD。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗AMD。

[0172] V.MASP-2和MASP-3在缺血再灌注损伤中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂

的治疗方法组织缺血是宽范围临床病症的基础。虽然及时恢复血流对于保护缺血组织是必要的,但早已认识到,再灌注,这可自发地或通过治疗性干预而发生,可能会导致额外的组织损伤,这一现象已被称为缺血再灌注(I/R)损伤(Eltzschig,H.K.和Tobias,E.,Nat.Med.17:1391-1401,2011)。I/R损伤可影响单个器官,如心脏(急性冠状动脉综合征)、肾(急性肾损伤)、肠(肠I/R)和脑(中风)。I/R损伤也可影响多器官,如下列主要创伤和复苏(多器官衰竭)、循环停止(缺氧性脑损伤、急性肾损伤)、周围血管疾病和镰状细胞病(急性胸部综合征、急性肾损伤)。大手术可与I/R损伤相关,包括心脏手术(心肺转流术后的急性心衰竭)、胸外科手术(急性肺损伤)、外周血管手术(间隔综合征)、血管手术(急性肾损伤)和实体器官移植(急性移植失败)。目前,还没有针对I/R损伤的特定疗法,需要有效的治疗,以使缺血区组织的抢救最大化并改善这些常见情况下的功能性结果。

[0173] I/R损伤的病理生理学是复杂的,其特征在于再灌注后的稳健炎性反应。补体系统的活化已经暗示为I/R损伤的重要组成部分,补体活性的抑制在多种动物模型中是有效的(Diepenhorst,G.M.P.等,Ann.Surg.249:889-899,2009)。I/R损伤中经典、凝集素和替代途径的相对重要性在很大程度上是不稳定的,并且取决于所影响的器官可能有所不同。最近可获得特定补体蛋白质和途径特异性抑制剂缺陷的敲除小鼠,这已经产生了涉及在I/R损伤中凝集素和替代途径的数据。

[0174] 使用因子D缺乏(-/-)小鼠和杂合子(+/-)小鼠,研究了胃肠道I/R损伤中替代途径的作用(Stahl,G.L.等Am.J.Pathol.162:449-455,2003)。与杂合子小鼠相比,在因子D缺乏的小鼠中,在瞬时胃肠缺血后,减少但并未防止肠和肺损伤,并且将人因子D加入-/-小鼠恢复I/R损伤。相同的模型在C1q缺陷和MBL-A/C缺陷的小鼠中进行评价,结果表明,胃肠I/R损伤独立于C1q和经典途径活化,但是MBL和凝集素途径激活对于肠损伤是必需的(Hart,M.L.等J.Immunol.174:6373-6380,2005)。相反地,经典途径的C1q识别分子负责肠I/R后的肺损伤(Hart,M.L.等J.Immunol.174:6373-6380,2005)。一种假说是I/R损伤期间,补体活化通过天然IgM与缺血性(但非正常)组织的表面上呈现的自身抗原(例如非肌肉肌球蛋白重链II型)结合而发生。在小鼠胃肠道I/R损伤模型中,在经典(C1q)、凝集素(MBL)或替代(因子B)途径中评价了来自肠组织的免疫复合物中引发因子的存在情况(Lee,H.等,Mol.Immunol.47:972-981,2010)。结果表明,在这些免疫复合物中检测到C1q和MBL而未检测到因子B,指示经典和凝集素途径的参与,但不是替代途径。在相同的模型中,因子B缺陷型小鼠没有受到保护而免于局部组织损伤,提供缺乏替代途径的参与的额外支持。在MASP-2缺陷型小鼠中直接评价胃肠I/R损伤中凝集素途径的作用,结果表明,与野生型对照相比,这些小鼠中胃肠道损伤减少;用MASP-2单克隆抗体的治疗也同样具有保护性(Schwaeble,W.J.等,Proc.Natl.Acad.Sci.108:7523-7528,2011),亦参见本文实施例23。总之,这些结果为胃肠道I/R损伤中凝集素途径的参与提供了支持,关于替代途径的参与具有冲突数据。

[0175] 在小鼠心肌I/R损伤模型中,对于凝集素途径,显示了致病作用,因为MBL缺陷型小鼠被保护免于心肌损伤而C1q缺陷和C2/fB缺陷型小鼠没有(Walsh,M.C.等,J.Immunol.175:541-546,2005)。在MASP-2缺陷型小鼠中也观察到免于心肌I/R损伤的保护作用(Schwaeble,W.J.等,Proc.Natl.Acad.Sci.108:7523-7528,2011);亦参见本文实施例22和23。在心肌I/R模型中用针对大鼠MBL的单克隆抗体治疗大鼠,导致缺血后再灌注损伤减少(Jordan,J.E.等,Circulation 104:1413-18,2001)。在用血管成形术治疗的心肌梗死

患者的研究中,与MBL-充分的对应物相比,MBL缺乏与减少的90天死亡率相关(MTrendelenburg等,Eur Heart J.31:1181,2010)。此外,血管成形术后发生心功能不全的心肌梗死患者的MBL水平为具有功能恢复的患者的约3倍(Haahr-Pedersen S.等,JInv Cardiology,21:13,2009)。MBL抗体还减少氧化应激后体外内皮细胞上的补体沉积,指示凝集素途径在心肌I/R损伤中的作用(Collard,C.D.等,Am.J.Pathol.156:1549-56,2000)。在I/R损伤的小鼠异位同系移植的心脏移植模型中,使用途径特异性融合蛋白CR2-fH研究替代途径的作用(Atkinson,C.等,J.Immunol.185:7007-7013,2010)。移植后立即全身给予CR2-fH导致心肌I/R损伤减少,其程度与用CR2-Crry治疗相当,用CR2-Crry治疗抑制所有补体途径,这表明在该模型中替代途径是极其重要的。

[0176] 在肾I/R损伤的小鼠模型中,涉及替代途径,因为与野生型小鼠相比,因子B缺陷的小鼠被保护而免于肾功能和肾小管损伤的下降(Thurman,J.M.等,J.Immunol.170:1517-1523,2003)。用针对因子B的抑制性单克隆抗体进行治疗,防止补体活化和减少鼠肾I/R损伤(Thurman,J.M.等,J.Am.Soc.Nephrol.17:707-715,2006)。在双侧肾I/R损伤模型中,与野生型小鼠相比,MBL-A/C缺陷小鼠受到保护免于肾损伤,且重组人MBL逆转MBL-A/C缺陷型小鼠的保护作用,暗示了MBL在此模型中的作用(Moller-Kristensen,M.等,Scand.J.Immunol.61:426-434,2005)。在大鼠单侧肾I/R损伤模型中,I/R后,用针对MBL-A的单克隆抗体抑制MBL,保留了肾功能(van der Pol,P.等,Am.J.Transplant.12:877-887,2010)。引人注意的是,MBL在这一模型中的作用并未涉及终端补体成分的活化,因为用C5抗体治疗对于防止肾损伤是无效的。相反,MBL似乎对肾小管细胞具有直接毒性作用,因为与MBL孵育的人类近端肾小管细胞在体外使MBL内化,随后细胞凋亡。在肾I/R的猪模型中,Castellano G.等人,(Am JPathol,176(4):1648-59,2010)测试了C1抑制剂,它不可逆的失活经典途径中的C1r和C1s蛋白酶以及凝集素途径的MBL复合物中的MASP-1和MASP-2蛋白酶,并且发现C1抑制剂降低了肾小管周围毛细血管和肾小球中的补体沉积和减少肾小管损害。

[0177] 替代途径似乎参与实验性创伤性脑损伤,因为与野生型小鼠相比,因子B缺陷的小鼠具有降低的全身补体活化(如通过血清C5a水平测量)和降低的创伤后神经细胞死亡(Leinhase,I.等,BMCNeurosci.7:55-67,2006)。在人中风中,通过在缺血性损伤中免疫组织化学染色检出补体成分C1q、C3c和C4d,表明经由经典途径的活化(Pedersen,E.D.等,Scand.J.Immunol.69:555-562,2009)。在脑缺血的动物模型中靶向经典途径已经产生了混合结果,有一些研究证明保护作用而其它显示没有益处(Arumugam,T.V.等,Neuroscience 158:1074-1089,2009)。实验和临床研究提供了凝集素途径参与的有力证据。在实验性中风模型中,与野生型小鼠相比,缺乏MBL或MASP-2导致减少梗死面积(Cervera A等;PLoS One3;5(2):e8433,2010;OsthoffM.等,PLoS One,6(6):e21338,2011和本文实施例26)。此外,与其MBL-充分的对应物相比,具有低水平MBL的中风患者有较好的预后(Osthoff M.等,PLoS One,6(6):e21338,2011)。

[0178] 在心肺转流术的狒狒模型中,用因子D单克隆抗体处理抑制全身性炎症(如通过C3a、SC5b-9和IL-6的血浆水平测定),并降低了心肌组织损伤,说明替代途径在这一模型中的参与(Undar,A.等,Ann.Thorac.Surg.74:355-362,2002)。

[0179] 因此,取决于受I/R影响的器官,补体的所有三个途径可促成发病和不良后果。根

据上面详述的实验和临床发现,LEA-2抑制剂预计在大部分I/R情况下具有保护性。至少在一些情况下,LEA-1的凝集素依赖性活化可导致经由替代途径的补体活化。此外,LEA-2启动补体活化可进一步由替代途径扩增环而扩增,从而加剧I/R相关的组织损伤。因此,LEA-1抑制剂预期在患有缺血相关病况的患者中提供附加的或补充的治疗益处。

[0180] 鉴于上述,LEA-1和LEA-2抑制剂预期在治疗、预防或减少缺血再灌注相关病况的严重程度中具有独立的治疗益处。此外,与单独的任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可以实现额外的治疗益处。因此,I/R-相关病况的最佳有效治疗包括单独或组合阻断LEA-1和LEA-2两者的活性药物成分。组合的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA-2阻断剂的联合给药来实现。优选地,LEA-1和LEA-2的抑制功能可以包含在单一的分子实体中,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0181] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少缺血再灌注损伤的严重程度的方法,所述方法通过向经历缺血再灌注的受试者给予一种组合物来进行,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,所述LEA-1抑制剂包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可通过动脉内、静脉内、颅内、肌内、皮下或其他肠胃外给药,以及潜在地对于非肽能抑制剂经口服,并且最适宜通过动脉或静脉内给药而给予受试者。本发明的LEA-1抑制性组合物的给药适宜在缺血再灌注事件之后立即开始或尽快开始。在再灌注发生在受控环境中的情况下(例如,在主动脉动脉瘤修复、器官移植或切断或受创伤的肢体或手指/脚趾的复位后),LEA-1抑制剂可先于再灌注和/或在再灌注期间和/或在再灌注之后给予。给药可由医师确定而周期性重复进行,以达到最佳治疗效果。

[0182] 在一些实施方案中,所述方法用于治疗或预防与以下至少一种相关联的缺血再灌注损伤:主动脉瘤修复、心肺转流术、器官移植和/或肢/手指/脚趾再植相关的血管再吻合术、中风、心肌梗死和休克和/或外科手术后的血流动力学复苏。

[0183] 在一些实施方案中,所述方法用于在受试者中治疗或预防与缺血再灌注损伤,所述受试者即将经历、正在经历或已经经历器官移植。在一些实施方案,所述方法用于在受试者中治疗或预防缺血再灌注损伤,所述受试者即将经历、正在经历或已经经历器官移植,前提是器官移植不是肾移植。

[0184] 在一个实施方案中,根据本发明此方面的方法进一步包括在经历缺血再灌注的受试者中抑制LEA-2依赖性补体活化,包括向受试者给予治疗有效量MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。如上详述,在治疗、预防或减少缺血再灌注损伤的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点

特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0185] MASP-2抑制性组合物可通过动脉内、静脉内、颅内、肌内、皮下或其他肠胃外给药,以及潜在地对于非肽能抑制剂经口服,并且最适宜通过动脉内或静脉内给药而给予有需要的受试者。本发明的MASP-2抑制性组合物的给药适宜在缺血再灌注事件之后立即开始或尽快开始。在再灌注发生在受控环境中的情况下(例如,在主动脉动脉瘤修复、器官移植或切断或受创伤的肢体或手指/脚趾的复位后),MASP-2抑制剂可先于再灌注和/或在再灌注期间和/或在再灌注之后给予。给药可由医师确定而周期性重复进行,以达到最佳治疗效果。

[0186] 本发明的MASP-3抑制性组合物和任选MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于治疗或预防缺血再灌注损伤。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗经历缺血再灌注的受试者。

[0187] VI.MASP-2和MASP-3在炎性和非炎性关节炎的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法类风湿性关节炎(RA)是滑膜关节的慢性炎性疾病,其也可以具有全身表现。RA影响到世界人口的大约1%,而女性的患病可能性是两到三倍。关节发炎体现在红肿、疼痛和僵硬。随着病情的发展,可存在关节侵蚀和破坏,导致运动范围受损和畸形。RA的治疗目标包括预防或控制关节损伤,预防关节功能损失和疾病进展,减轻症状和提高生活质量,并实现无药物缓解。药理治疗RA包括缓解疾病的抗风湿药(DMARD)、镇痛药和消炎药(糖皮质激素和非类固醇抗炎药)。DMARD是最重要的治疗,因为它们可诱导持久缓解和延迟或阻止不可逆的关节破坏的发展。传统的DMARD包括小分子,例如甲氨蝶呤、柳氮磺吡啶、羟氯喹、金盐、来氟米特、D-青霉胺、环孢菌素和硫唑嘌呤。如果传统的DMARD不足以控制疾病,那么靶向炎性细胞或介质的若干生物制剂是可用的治疗选择,如肿瘤坏死因子抑制剂(依那西普、英夫利昔单抗、阿达木单抗、certolizumab pegol和戈利木单抗(golimumab))、细胞因子拮抗剂(阿那白滞素和tocilizumab)、利妥昔单抗和阿巴西普。

[0188] 虽然适应性免疫显然对RA发病是重要的(如通过与T细胞活化基因的遗传关联和自身抗体的存在所证明的),先天免疫机制也被牵连(McInnes,I.B.和Schett,G.New Engl.J.Med.365:2205-2219,2011)。在人类RA中,替代途径裂解片段Bb的滑液水平是晶体诱导的关节炎或退行性关节病患者的样品的滑液水平的数倍,暗示RA患者的替代途径优先激活(Brodeur,J.P.等,Arthritis Rheum.34:1531-1537,1991)。在关节炎的实验性抗II型胶原抗体被动转移模型中,与野生型小鼠相比,因子B缺陷的小鼠具有减少的炎症和关节破坏,而C4缺陷型小鼠与野生型小鼠具有相似的疾病活性,指示在此模型中需要替代途径,而不是经典途径(Banda,N.K.等,J.Immunol.177:1904-1912,2006)。在胶原抗体诱发的关节炎(CAIA)的相同实验模型中,仅经典途径具有活性或仅凝集素途径具有活性的小鼠不能够发展关节炎(Banda,N.K.等,Clin.Exp.Immunol.159:100-108,2010)。从本研究的数据表明,无论是经典或凝集素途径均能够活化体外低水平的C3。然而,在没有替代途径扩增环时,C3的关节沉积水平不足以产生临床疾病。在替代途径的活化中的关键步骤是因子D(原因子D)酶原转换为成熟因子D,它是由MASP-1和/或MASP-3(Takahashi,M.等,J.Exp.Med.207:29-37,2010)和/或HTRA1(Stanton等,Evidence That the HTRA1

Interactome Influences Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration,由The Association for Research in Vision and Ophthalmology2011年会议在2011年3月4日提供)介导的。在鼠CAIA中评价MASP-1/3的作用,结果表明与野生型小鼠相比,MASP-1/3缺陷小鼠受到保护免于关节炎(Banda,N.K.等,J.Immunol.185:5598-5606,2010)。在MASP-1/3缺陷型小鼠中,在CAIA发展期间,在血清中检测到原因子D而不是成熟因子D,并且使用这些小鼠的血清,体外加入人因子D重构了C3活化和C5a产生。相比之下,在关节炎的效应阶段的鼠模型中,与WT小鼠相比,C3缺陷的小鼠发展十分轻微的关节炎,而因子B缺陷的小鼠仍然发展关节炎,表示经典/凝集素和替代途径两者的独立贡献(Hietala,M.A.等,Eur.J.Immunol.34:1208-1216,2004)。在炎性关节炎的K/BxN T细胞受体转基因小鼠模型中,缺乏C4或C1q的小鼠发展类似于野生型小鼠的关节炎,而缺乏因子B的小鼠没有发展关节炎或有轻度关节炎,表明在此模型中需要替代途径而不是经典途径(Ji H.等,Immunity 16:157-168,2002)。在K/BxN模型中,缺乏MBL-A的小鼠不受保护免于血清诱导的关节炎,但由于没有研究MBL-C的作用,对于凝集素途径的潜在作用不能被排除(Ji等人,2002年,同上)。

[0189] 两个研究小组已独立地提出,凝集素依赖性补体活化通过MBL与特异性IgG糖形相互作用而促进RA患者的炎症(Malhotra等,Nat.Med.1:237-243,1995;Cuchacovich等,J.Rheumatol.23:44-51,1996)。应该注意的是,类风湿性病况与在该分子的Fc区缺乏半乳糖的IgG糖形(被称为IgG0糖形)的显著增加相关(Rudd等,Trends Biotechnology 22:524-30,2004)。IgG0糖形的百分比随类风湿性病况的疾病进展而增加,并当患者缓解时返回到正常。在体内,IgG0沉积在滑膜组织,并且MBL以增加的水平存在于RA个体的滑液中。RA相关的聚集无半乳糖(agalactosyl)IgG(IgG0)可结合MBL,因此可通过LEA-1和/或LEA-2启动凝集素依赖性补体活化。而且,从临床研究中观察RA患者的MBL等位基因变体的结果表明,MBL在该疾病中可具有炎性增强的作用(Garred等,J.Rheumatol.27:26-34,2000)。因此,经由LEA-1和/或LEA-2的凝集素依赖的补体活化可以在RA的发病机理中起重要作用。

[0190] 补体活化还在幼年型类风湿性关节炎起着重要作用(Mollnes,T.E.等,Arthritis Rheum.29:1359-64,1986)。类似于成人RA,在幼年型类风湿性关节炎中,与C4d(经典或LEA-2激活的标志)相比,替代途径补体活化产物Bb的血清和滑液水平升高,表明补体活化主要由LEA-1介导(El-Ghobarey,A.F.等,J.Rheumatology 7:453-460,1980;Agarwal,A.等,Rheumatology 39:189-192,2000)。

[0191] 同样,补体活化在银屑病关节炎中起重要作用。患有该病况的患者在其循环中具有增加的补体活化产物,并且它们的红血细胞似乎具有较低水平的补体调节剂CD59(Triolo,.Clin Exp Rheumatol.,21(2):225-8,2003)。补体水平与疾病活动相关,并具有高的预测值,以确定治疗效果(Chimenti等,Clin Exp Rheumatol.,30(1):23-30,2012)。事实上,最近的研究表明,对于该病况的抗TNF疗法的效果可归因于补体调节(Ballanti等,Autoimmun Rev.,10(10):617-23,2011)。尽管补体在银屑病关节炎的精确作用还没有被确定,但C4d和Bb补体活化产物在这些患者循环中的存在表明在发病机制中起重要作用。基于所观察到的产物,认为LEA-1,并且还可能LEA-2负责这些患者中的病理补体活化。

[0192] 骨关节炎(OA)是关节炎中最常见的形式,在美国影响超过2500万人。OA的特征在于关节软骨断裂和最终丧失,伴随着新骨形成和滑膜增生,导致疼痛、僵硬、关节功能的丧

失和残疾。经常受OA影响的关节是手部、颈部、腰部、膝盖和髋部。该病是渐进的和目前的治疗是对症缓解疼痛的,并不会改变疾病的自然史。OA的发病机制尚不清楚,但已涉及补体的作用。在从OA患者滑液的蛋白质组和转录组分析中,与来自健康个体的样品相比,补体的若干组分异常表达,所述来自健康个体的样品包括经典(C1s和C4A)和替代(因子B)途径,并且还包括C3、C5、C7和C9(Wang,Q.等,Nat.Med.17:1674-1679,2011)。此外,在内侧半月板切除术诱导的OA小鼠模型中,C5缺陷的小鼠比C5阳性小鼠具有更少的软骨丧失、骨赘形成和滑膜炎,并且用CR2-fH(抑制替代途径的融合蛋白)治疗野生型小鼠减弱了OA的发展(Wang等人,2011同上)。

[0193] 罗斯河病毒(RRV)和基孔肯雅病毒(CHIKV)属于一组蚊子传播的病毒,可在人类引起急性和持续性关节炎和肌炎。除了引起地方病,这些病毒可引起涉及数百万感染个体的流行病。关节炎被认为是由关节中病毒复制和宿主炎症反应诱导而启动,并且补体系统已作为在这个过程中的一个关键组分被调用。患RRV诱导多关节炎的人滑液比患OA的人滑液含有更高水平的C3a(Morrison,T.E.等,J.Virol.81:5132-5143,2007)。在RRV感染的小鼠模型中,与野生型小鼠相比,C3缺陷型小鼠发展不太严重的关节炎,暗示补体的作用(Morrison等人,2007,同上)。研究了所涉及的具体补体途径,和具有灭活凝集素途径的小鼠(MBL-$A^{-/-}$和MBL-$C^{-/-}$)与野生型小鼠相比具有衰减的关节炎。相比之下,具有灭活的经典途径($C1q^{-/-}$)或替代途径(因子$B^{-/-}$)的小鼠发展严重的关节炎,指示由MBL引发的凝集素途径在这个模型中具有重要作用(Gunn,B.M.等,PLoSPathog.8:e1002586,2012)。由于关节炎涉及关节损害,由各种病因引起的初步关节损伤可触发通过LEA-2的第二波补体激活。为了支持这一概念,我们以前的工作已经证明,在胶原诱发的RA模型中,相比于WT小鼠,MASP-2KO小鼠具有降低的关节损伤,如在本文实施例27所述。

[0194] 鉴于上面详述的大量证据,单独或组合的LEA-1和LEA-2抑制剂预期可在治疗上用于治疗关节炎。因此关节炎的最佳有效治疗可包含活性药物成分,其单独或组合能阻断LEA-1和LEA-2两者。组合的LEA-1和LEA-2抑制可以通过共同给予LEA-1阻断剂和LEA2阻断剂来实现。优选地,LEA-1和LEA-2的抑制功能可以包含在单一的分子实体中,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少炎性或非炎性关节炎(包括骨关节炎、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎和银屑病关节炎)的严重程度的方法,所述方法通过向患有炎性或非炎性关节炎或具有发展炎性或非炎性关节炎风险的受试者给予一种组合物来进行,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,所述LEA-1抑制剂包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、皮下或其他肠胃外给药,或通过口服。或者,给药可以是通过局部递送,例如通过关节内注射。所述LEA-1抑制剂可以在延长的时间内周期性给予以治疗或控制慢性病况,或者可以在急性创伤或损伤(包括对关节进行的外科手术)之前、期间和/或之后的时间段通过单次或重复给药。

[0195] 在一个实施方案中,根据本发明此方面的方法进一步包括在患有或有风险发展炎性或非炎性关节炎(包括骨关节炎、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎和银屑病关节炎)的受试者中抑制LEA-2依赖性补体活化:通过将治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、

MASP-3或MASP-1/3抑制剂给予受试者。如上详述,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗或预防关节炎的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0196] MASP-2抑制性组合物可全身性给予有需要的受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、皮下或其他肠胃外给药,或潜在地对于非肽能抑制剂经口服给药。或者,给药可以是通过局部递送,例如通过关节内注射。所述MASP-2抑制剂可以在延长的时间内周期性给予以治疗或控制慢性病况,或者可以在急性创伤或损伤(包括对关节进行的外科手术)之前、期间和/或之后的时间段通过单次或重复给药。

[0197] 本发明的MASP-3抑制性组合物和任选MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于治疗、预防或减少炎性或非炎性关节炎的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗患有炎性或非炎性关节炎的受试者。

[0198] VII.MASP-2和MASP-3在弥散性血管内凝血(DIC)中的作用和使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法弥散性血管内凝血(DIC)是凝血系统的病理性过度刺激的综合征,可以在临床表现为出血和/或血栓形成。DIC不会作为主病况出现,而是与各种疾病过程关联,所述疾病过程包括组织损伤(创伤、烧伤、中暑、输血反应、急性移植排斥)、瘤形成、感染、产科病况(前置胎盘、羊水栓塞、妊娠毒血症)以及其它各种病况,如心源性休克、近乎溺死、脂肪栓塞、主动脉瘤。血小板减少症是重症监护病房患者的常见异常,发病率为35%-44%,并且在约25%的这些病例中DIC是病因,即,DIC在约10%重症患者中发生(Levi,M.和Opal,S.M.Crit.Care 10:222-231,2006)。DIC的病理生理学在于,潜在的疾病进程启动生理的凝血反应。然而,促血栓形成物质压制正常制衡机制,使得微循环中不适当沉积纤维蛋白和血小板,导致器官缺血、低纤维蛋白原血症和血小板减少。DIC的诊断基于在合适潜在的疾病或过程中的临床表现,以及实验室参数异常(凝血酶原时间、部分凝血活酶时间、纤维蛋白降解产物、D-二聚体或血小板计数)。DIC的主要治疗方法是解决作为负责的触发器的潜在病况。以红血细胞、血小板、新鲜冷冻血浆和冷沉淀物形式的血液产品支持对治疗或预防临床并发症可能是必要的。

[0199] 在一些研究中研究了DIC中补体途径的作用。在脑膜炎球菌感染的儿科患者中评价补体活化,相对于MBL基因型比较临床过程(Sprong,T.等,Clin.Infect.Dis.49:1380-1386,2009)。在入院时,MBL缺乏的患者比MBL-足够的患者具有较低循环水平的C3bc、末端补体复合物、C4bc和C3bBbP,表明共同补体、末端补体和替代途径活化的程度较低。另外,全

身性补体活化的程度与DIC疾病的严重程度和参数相关联,MBL缺乏的患者比MBL-足够的患者具有较温和的临床过程。因此,虽然MBL缺乏是感染易感性的危险因素,但败血性休克期间的MBL缺乏可与较低的疾病严重程度相关联。

[0200] 如本文实施例1-4中所示,实验研究已经强调了MBL和MASP-1/3在对于脑膜炎奈瑟氏菌(脑膜炎球菌感染的病原)的天然免疫应答中的重要贡献。小鼠或人的MBL缺陷型血清、MASP-3缺陷型人血清或MASP-1/3敲除小鼠相比野生型血清在体外激活补体和裂解脑膜炎球菌的有效性较差。同样,首次用于实验的MASP-1/3敲除小鼠比其野生型对应物更容易受到奈瑟氏球菌感染。因此,在没有适应性免疫的情况下,LEA-1途径有助于对奈瑟氏感染的先天宿主抵抗力。相反,LEA-1增强病理补体活化,引发有害的宿主反应,包括DIC。

[0201] 在动脉血栓形成的鼠模型中,与野生型或C2/无因子B的小鼠相比,无MBL和MASP-1/-3敲除小鼠的$FeCl_3$诱导的血栓形成减少,并且该缺陷被重组人MBL重构(La Bonte,L.R.等,J.Immunol.188:885-891,2012)。在体外,与野生型或C2/无因子B的小鼠血清相比,无MBL或MASP-1/-3敲除小鼠的血清具有减少的凝血酶底物裂解;在MASP-1/-3敲除小鼠的血清中,重组人MASP-1的添加恢复了凝血酶底物裂解(La Bonte等人,2012,同上)。这些结果表明,MBL/MASP复合物,特别是MASP-1,在血栓形成中起到关键作用。因此,LEA-1可在病理血栓形成,包括DIC中起重要作用。

[0202] 实验研究已经确立了LEA-2在病理血栓形成中的同样重要作用。如本文实施例30中描述的,在局部DIC的小鼠模型中,我们已经表明,MASP-2基因敲除小鼠比野生型小鼠对LPS诱导的微血管凝血更不易感。体外研究还表明LEA-2提供了补体系统和凝血系统之间的分子联系。如在实施例29和31描述的,MASP-2具有因子Xa样活性,并通过裂解激活凝血酶原形成凝血酶,其随后可清除纤维蛋白原和促进纤维蛋白凝块形成(也参见Krarup等人,PLoS One,18:2(7):e623,2007)。

[0203] 独立的研究已经表明,凝集素MASP复合物可在MASP-2依赖的过程中促进凝块形成、纤维蛋白沉积和纤维蛋白肽释放(Gulla等,Immunology,129(4):482-95,2010)。因此,LEA-2促进补体和凝血系统的同时凝集素依赖性活化。

[0204] 体外研究还表明,MASP-1具有类似凝血酶的活性(Presanis JS,等人,Mol Immunol,40(13):921-9,2004),并切割纤维蛋白原和因子XIII(Gulla K.C.等,Immunology,129(4):482-95,2010),这表明LEA-1可以独立地或与LEA-2共同激活凝血途径。

[0205] 上文详述的数据表明LEA-1和LEA-2提供凝集素依赖的补体活化和凝血之间的独立联系。因此,鉴于上述情况,LEA-1和LEA-2抑制剂预期在治疗患有弥散性血管内凝血的受试者中具有独立的治疗益处。在一些实施方案中,受试者患有继发于以下的弥散性血管内凝血:败血症、创伤、感染(细菌感染、病毒感染、真菌感染、寄生虫感染)、恶性肿瘤、移植排斥、输血反应、产科并发症、血管动脉瘤、肝衰竭、中暑、烧伤、辐射暴露、休克或严重的毒性反应(如蛇咬伤、昆虫叮咬、输血反应)。在一些实施方案中,创伤是神经创伤。在一些实施方案中,感染是细菌感染,如脑膜炎奈瑟氏菌感染。

[0206] 此外,相比于单独的任一剂,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可实现额外的治疗益处。由于LEA-1和LEA-2两者已知通过导致DIC(例如感染或创伤)的病况而激活,LEA-1-和LEA-2阻断剂,单独或组合地,预计在DIC的治疗中具有治疗效用。LEA-1和LEA-2阻断剂可以

防止补体和凝血之间不同的交叉对话机制。LEA-1-和LEA-2阻断剂可因此在预防DIC和其他血栓形成病症中具有互补效应、加和效应或协同效应。

[0207] 此外,相比于单独的任一剂,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可实现额外的治疗益处,或者可以为更宽范围的患者亚群提供有效的治疗。组合的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA-2阻断剂的联合给药来实现。最佳地,LEA-1和LEA-2的抑制功能可以包含在单一的分子实体中,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0208] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化的方法,以在有此需要的受试者中治疗、预防或减少弥散性血管内凝血的严重程度,所述方法包括将组合物给予患有弥散性血管内凝血或有发展弥散性血管内凝血风险的受试者,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。对于治疗或预防继发于创伤或其它急性事件的DIC,LEA-1抑制性组合物可在外伤性损伤后立即给予,或创伤诱导损伤或情况(如被视为有DIC风险患者的手术)之前、期间、之后立即或在1至7天或更长的时间例如24小时至72小时内预防性给予。在一些实施方案中,LEA-1抑制性组合物可以适当地以快速作用的剂型给予,例如通过含有LEA-1抑制剂组合物的推注溶液的静脉内或动脉内递送。

[0209] 在一个实施方案中,根据本发明这个方面的方法还包括在有此需要的受试者中抑制LEA-2依赖性补体活化,以治疗、预防或减少弥散性血管内凝血的严重程度,包括给予受试者治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。如上详述,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期在治疗或预防弥散性血管内凝血中提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0210] MASP-2抑制剂可全身性给予有此需要的受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,以及潜在地对于非肽能药剂经口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。对于继发于创伤或其它急性事件的DIC,MASP-2抑制性组合物可在外伤性损伤后立即给予,或创伤诱导损伤或情况(如被视为有DIC风险患者的手术)之前、期间、之后立即或在1至7天或更长的时间例如24小时至72小时内预防性给予。在一些实施方案中,MASP-2抑制性组合物可以适当地以快速作用的剂型给予,例如通过含有MASP-2抑制性组合物的推注溶液的静脉内或动脉内递送。

[0211] 本发明的MASP-3抑制性组合物和任选MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于治疗、预防或减少有此需要的受试者中弥散性血管内凝血的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗患有弥散性血管内凝血或有发展弥散性血管内凝血风险的受试者。

[0212] VIII.MASP-2和MASP-3在血栓性微血管病(TMA)包括溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(AHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP)中的作用,以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法血栓性微血管病(TMA)是指一组临床特征为血小板减少、微血管病性溶血性贫血和多器官缺血的病症。TMA的特征性病理特征是血小板活化和微血栓在小动脉和小静脉中的形成。经典的TMA是溶血性尿毒症综合征(HUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP)。HUS与TTP区别在于急性肾衰竭的存在。HUS以两种形式发生:腹泻相关的(D+)或典型HUS和无腹泻(D-)或非典型HUS(aHUS)。

[0213] HUS

D+HUS与通常由大肠杆菌O157或另一个志贺毒素产生细菌株引起的前驱腹泻疾病相关联,占儿童HUS病例中的90%以上,并且是儿童急性肾衰竭的最常见原因。尽管人感染大肠杆菌O157是相对频繁的,但发展到D+HUS的血性腹泻百分比范围在散发病例中为3%至7%和在一些爆发中为20%至30%(Zheng,X.L.和Sadler,J.E.,Annu.Rev.Pathol.3:249-277,2008)。HUS通常发生在腹泻发病后4至6天,在疾病的急性期大约三分之二的儿童需要透析。D+HUS的治疗是支持性的,因为没有特定的治疗已被证明是有效的。D+HUS的预后良好,大部分患者恢复肾功能。

[0214] D+HUS的发病机制涉及了结合于微血管内皮细胞、单核细胞和血小板的膜的细菌生产的志贺毒素。肾脏微血管最常受到影响。在结合后,毒素被内化,导致释放炎症介质,细胞最终死亡。据认为,内皮细胞损伤通过促进凝血级联的激活而触发肾脏微血管血栓形成。有证据表明D+HUS中补体系统活化。与正常对照相比,在住院时,D+HUS儿童的Bb和SC5b-9的血浆水平增加,并在出院后第28天,血浆水平已正常(Thurman,J.M.等,Clin.J.Am.Soc.Nephrol.4:1920-1924,2009)。发现由于活化在阻断经典途径的乙二醇四乙酸存在时进行,因此志贺毒素2(Stx2)在体外主要通过替代途径激活流体相中的人补体(Orth,D.等,J.Immunol.182:6394-6400,2009)。此外,Stx2结合因子H而不是因子I,并延迟细胞表面上因子H的辅因子活性(Orth等,2009,同上)。这些结果表明,志贺毒素可能通过多个潜在机制导致肾损害,包括直接的毒性作用,并间接地通过激活补体或抑制补体调节剂。预计对血管内皮的毒性作用通过LEA-2来激活补体,如在各种血管床中MASP-2阻断在防止补体介导的再灌注损伤中的有效性所证明,如本文实施例21-23所示,亦参见Schwaeble,W.J.等,Proc.Natl.Acad.Sci.108:7523-7528,2011。

[0215] 在共注射志贺毒素和脂多糖诱导的鼠HUS模型中,与野生型小鼠相比,因子B缺陷的小鼠具有更少的血小板减少症和被保护免于肾损害,暗示替代途径在微血管血栓形成中LEA-1依赖性活化(Morigi,M.等,J.Immunol.187:172-180,2011)。如本文实施例33中描述的,在相同的模型中,MASP-2抗体给药也是有效的,并在STX攻击后增加存活,暗示在微血管血栓形成中的LEA-2依赖性补体途径。

[0216] 鉴于上述,LEA-1和LEA-2抑制剂预期在治疗或预防HUS中具有独立的治疗益处。此外,与单独的任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可以实现额外的治疗益处,或可以为更宽范围的患者亚群提供有效治疗。组合的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA-2阻断剂的联合给药来实现。最佳地,LEA-1和LEA-2的抑制功能可以包含在单一的分子实体中,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0217] aHUS

非典型HUS是一种罕见的疾病,在美国发病率估计为百万分之二(Loirat,C.和Fremeaux-Bacchi,V.Orphanet J.Rare Dis.6:60-90,2011)。非典型HUS可在任何年龄发展,但多数患者在儿童期有发作。非典型HUS是异质的:某些病例是家族性的,有些是复发的,而有些是由传染性疾病,通常为上呼吸道或肠胃炎引起。aHUS的发病通常是突然的,大多数患者在入院时需要透析。额外肾脏表现存在于大约20%的患者中和可能涉及中枢神经系统、心肌梗死、远端缺血性坏疽或多器官衰竭。aHUS的治疗包括器官功能障碍的支持性护理、血浆输注或血浆置换和依库珠单抗(eculizumab),其为针对C5的人源化单克隆抗体,最近批准在美国和欧盟使用。aHUS的预后不如D+HUS的预后好,在急性期大约有25%的死亡率,多数幸存者发展为终末期肾病。

[0218] 非典型HUS表征为补体调节异常的疾病,大约50%患者的编码补体调节蛋白的基因具有突变(Zheng和Sadler,2008同上)。大多数突变见于因子H(FH);其它突变包括膜辅因子蛋白(MCP)、因子I(FI)、因子B及C3。功能研究表明,FH、MCP和FI突变导致功能丧失,因此更多补体活化,而因子B突变是功能获得。这些突变的作用主要影响替代途径。这些遗传异常是危险因素,而不是疾病的唯一原因,因为约50%携带该突变的家庭成员到45岁时并不呈现该疾病(Loirat和Fremeaux-Bacchi,2011同上)。

[0219] 因子H是一种补体调控蛋白,其保护宿主组织免于替代途径补体攻击。FH以三种方式调节替代途径扩增环:它是裂解C3b的FI的辅因子,它抑制替代途径C3转化酶C3bBb的形成,并且它结合到细胞表面和组织基质上的聚阴离子并阻断C3b沉积(Atkinson,J.P.和Goodship,T.H.J.,J.Exp.Med.6:1245-1248,2007)。aHUS患者的多数FH突变发生在蛋白质的C-末端短共有重复域,这导致FH与肝素、C3b和内皮结合缺陷,但不改变驻留在N-末端域中的血浆C3调节(Pickering,M.C.等,J.Exp.Med.204:1249-1256,2007)。FH-缺陷小鼠有不受控制的血浆C3激活和自发发展膜增生性肾小球肾炎II型,但不是aHUS。然而,转基因表达功能上等同于aHUS相关人FH突变体的小鼠FH蛋白的FH缺陷小鼠自发发展HUS但不是膜增生性肾小球肾炎II型,这提供了体内证据,表明肾内皮中替代途径激活的缺陷控制是FH-相关aHUS发病机制的关键事件(Pickering等人,2007同上)。FH相关aHUS的另一形式发生在具有导致FH功能活性损失的抗FH自身抗体的患者;大多数这些患者的编码5个FH相关蛋白的基因缺失(Loirat和Fremeaux-Bacchi,2011,同上)。

[0220] 类似于FH,MCP通过调节靶细胞上的C3b沉积而抑制补体活化。MCP突变产生具有低的C3b结合和辅因子活性的蛋白,因此允许失调的替代途径激活。FI是一种丝氨酸蛋白酶,其在辅因子例如FH和MCP存在时裂解C3b和C4b,由此防止C3和C5转化酶的形成和抑制替代和经典补体途径二者。大多数的FI-相关aHUS突变导致FI对C3b和C4b降解活性减少(Zheng和Stadler,2008年,同前)。FB是携带替代途径转化酶C3bBb的催化位点的酶原。功能分析表

明,aHUS相关FB突变导致增加的替代途径激活(Loirat和Fremeaux-Bacchi,2011,同上)。C3的杂合突变与aHUS相关联。大多数C3突变引起C3结合MCP缺陷,导致FB结合C3b的能力提高和C3转化酶的形成增加(Loirat和Fremeaux-Bacchi,2011,同上)。因此,aHUS是与导致替代途径扩增环控制不足的补体基因突变密切相关的疾病。由于替代途径扩增环依赖于因子B蛋白水解活性,并且由于LEA-1对于因子B活化是需要的(通过MASP-3依赖性裂解,或通过因子D型介导的裂解,其中MASP-1有助于因子D的成熟),LEA-1阻断剂预期在易感个体中防止不受控制的补体活化。因此,预期LEA-1阻断剂将有效治疗aHUS。

[0221] 尽管aHUS中失调替代途径扩增环的中心作用已被广泛接受,但启动补体活化的触发器和所涉及的分子途径是未解决的。不是所有的携带上述突变的个体发展aHUS。事实上,家族性的研究表明,aHUS的外显率只有约50%(Sullivan M.等,Ann Hum Genet 74:17-262010)。疾病的自然史表明,aHUS最常见在启动事件如感染性发作或受伤后发展。众所周知感染剂激活补体系统。在没有预先存在的适应性免疫时,感染剂的补体活化可主要通过LEA-1或LEA-2启动。因此,在aHUS-易感个体中,由感染引发的凝集素依赖的补体活化可代表补体活化后续病理扩增的启动触发器,这可能最终导致疾病进展。因此,本发明的另一个方面包括通过给予有效量的LEA-1-或LEA-2-抑制剂而治疗患有继发于感染的aHUS的患者。

[0222] 其他形式的宿主组织损伤将通过LEA-2激活补体,特别是血管内皮损伤。人血管内皮细胞经受氧化应激,例如通过表达结合凝集素和激活LEA-2补体途径的表面部分而响应(Collard等,Am J.Pathol 156(5):1549-56,2000)。缺血/再灌注后血管损伤也通过体内LEA-2而激活补体(Moller-Kristensen等,Scand JImmunol 61(5):426-34,2005)。在此情况下凝集素途径的激活对于宿主具有病理学后果,并且如实施例22和23中所示,通过阻断MASP-2而抑制LEA-2阻止进一步宿主组织损伤和不良结果(还参见Schwaeble PNAS,2011,同上)。

[0223] 因此,还已知促成aHUS的其它方法激活LEA-1或LEA-2。因此可能的是,在遗传倾向于aHUS的个体中,LEA-1和/或LEA-2途径可代表以失调方式被不适当扩增的初始补体活化机制,从而启动aHUS发病。由此推断,在aHUS易感个体中,通过LEA-1和/或LEA-2阻断补体激活的药剂预期阻止疾病进展或减少病情加重。

[0224] 进一步支持这一概念的是,最近的研究已经确定肺炎链球菌在aHUS的儿科病例中是重要的病原(Lee,C.S.等,Nephrology,17(1):48-52(2012);Banerjee R.等,Pediatr Infect Dis J.,30(9):736-9(2011))。该特定病因似乎有不利的预后,伴随显著死亡率和长期病态。值得注意的是,这些病例涉及非肠道感染,导致表现微血管病变、尿毒症和溶血,而无已知易患aHUS的补体基因并发突变的证据。注意到肺炎链球菌对于激活补体特别有效并且主要通过LEA-2实现这一点是重要的。因此,在与肺炎球菌感染相关的非肠道HUS的情况下,微血管病、尿毒症和溶血的表现预计主要由LEA-2活化而驱动,并且阻断LEA-2的药剂,包括MASP-2抗体,预期在这些患者中防止aHUS的进展或降低疾病的严重程度。因此,本发明的另一个方面包括通过给予有效量的MASP-2抑制剂而治疗患有与肺炎链球菌感染相关的非肠道aHUS的患者。

[0225] TTP

血栓性血小板减少性紫癜(TTP)是一种威胁生命的血液凝固系统病症,其由活化凝血级联或补体系统的自身免疫或遗传性功能障碍引起(George,JN,NEngl JMed;354:

1927-35,2006)。这导致整个身体的小血管中大量的微观凝块或者血栓,这是TMA的特有特征。红细胞受到剪切应力,其损害它们的膜,导致血管内溶血。所产生的血流量减少和内皮损伤导致器官损伤,包括脑、心脏和肾脏。TTP的临床特征是血小板减少、微血管病性溶血性贫血、神经学变化、肾衰竭和发烧。在血浆置换前的时代,急性发作期间的病死率为90%。即使采用血浆交换,六个月生存率为约80%。

[0226] TTP可源于酶ADAMTS-13的遗传性或获得性抑制,该酶是负责将血管性血友病因子(vWF)的大的多聚体裂解成较小单元的金属蛋白酶。ADAMTS-13抑制或不足最终导致凝血增加(Tsai,H.JAm Soc Nephrol 14:1072-1081,2003)。ADAMTS-13调节vWF活性;在不存在ADAMTS-13时,vWF形成大的多聚体,其更有可能结合血小板和使患者易患血小板聚集和微血管血栓形成。

[0227] 已在患有TTP的个体中确定众多ADAMTS13突变。该病还可由于针对ADAMTS-13的自身抗体而发展。此外,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(妊娠中期或产后)(George JN.,Curr Opin Hematol10:339-344,2003)期间发展,或与疾病如HIV或自体免疫疾病如系统性红斑狼疮相关联(Hamasaki K等,Clin Rheumatol.22:355-8,2003)。TTP也可通过某些药物疗法引起,包括肝素、奎宁、免疫介导的成分、癌症化疗剂(博来霉素、顺铂、阿糖胞苷、柔红霉素、吉西他滨、丝裂霉素C和他莫昔芬)、环孢菌素A、口服避孕药、青霉素、利福平和抗血小板药物包括噻氯匹定和氯吡格雷(Azarm,T.等,JRes Med Sci.,16:353-357,2011)。与TTP相关的其它因素或病况为毒素如蜜蜂毒液、败血症、脾隔离症、移植、血管炎、血管手术和感染如肺炎链球菌和巨细胞病毒感染(Moake JL.,NEnglJMed.,347:589-600,2002)。由于瞬时功能性ADAMTS-13缺乏的TTP可由于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)。

[0228] 血浆置换为TTP的标准治疗(Rock GA等,NEnglJMed 325:393-397,1991)。血浆置换在遗传缺陷患者中补充ADAMTS-13活性,并除去获得性自身免疫性TTP的那些患者的ADAMTS-13自身抗体(Tsai,H-M,Hematol Oncol Clin North Am.,21(4):609-v,2007)。将额外药剂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,血浆置换对于约20%的患者不成功,在超过三分之一的患者中出现复发,而且血浆置换成本高,技术要求高。此外,许多患者无法耐受血浆置换。因此仍然迫切需要TTP的额外和更好的治疗。

[0229] 因为TTP是血液凝固级联的病症,所以用补体系统的拮抗剂治疗可有助于稳定和校正疾病。尽管替代补体途径的病理激活与aHUS关联,但补体活化在TTP中的作用不太清楚。ADAMTS13的功能不足对于TTP易感性是重要的,但是它不足以引起急性发作。环境因素和/或其他遗传变异可有助于TTP的表现。例如,编码参与凝血级联调节的蛋白的基因、vWF、血小板功能、内皮血管表面的组分或补体系统可涉及急性血栓性微血管病的发展(Galbusera,M.等,Haematologica,94:166-170,2009)。具体地,补体活化已经显示出发挥关键作用;来自与ADAMTS-13缺乏有关的血栓形成性微血管病的血清已显示导致C3和MAC沉积和随后的嗜中性粒细胞激活,这可能通过补体失活而消除(Ruiz-Torres MP等,Thromb Haemost,93:443-52,2005)。此外,最近已表明,在TTP的急性发作期间C4d、C3bBbP或C3a的水平增加(M.Réti等,J Thromb Haemost.10(5):791-798,2012),这与经典、凝集素和替代

途径的激活一致。在急性发作中该增加量的补体活化可启动终端途径激活,并负责TTP的进一步恶化。

[0230] ADAMTS-13和vWF在TTP的作用显然是负责血小板活化和聚集,并其随后在微血管病的剪切应力和沉积中的作用。活化血小板与经典和替代补体途径两者相互作用并引发这两者。血小板介导的补体活化增加了炎症介质C3a和C5a(Peerschke E.等,Mol Immunol,47:2170-5(2010))。血小板可因此作为遗传或自身免疫TTP中经典补体活化的靶标。

[0231] 如上所述,凝集素依赖性补体活化,凭借MASP-1的类似凝血酶活性和LEA-2介导的凝血酶原活化,是连接内皮损伤与HUS中发生的凝固和微血管血栓形成的主要分子途径。同样地,LEA-1和LEA-2的激活可以直接驱动TTP中的凝血系统。LEA-1和LEA-2途径激活可响应于TTP中ADAMTS-13缺乏导致的初始内皮损伤而启动。因此,预期LEA-1和LEA-2抑制剂,包括但不限于阻断MASP-2功能、MASP-1功能、MASP-3功能或MASP-1和MASP-3功能的抗体,将在患有TTP的患者中减轻与微血管内凝血、血栓形成和溶血相关联的微血管病。

[0232] 患有TTP的患者通常在急诊室且具有以下的一个或多个:紫癜、肾衰竭、低血小板、贫血和/或血栓形成,包括中风。护理TTP的当前标准包括导管内递送(例如,静脉内或其它形式导管)血浆置换达两周或更长的时间,一般为每周三次,但高达每日。如果受试者对于ADAMTS13抑制剂(即,针对ADAMTS13的内源性抗体)的存在测试为阳性,则可与免疫抑制疗法(例如,皮质类固醇、利妥昔单抗(rituxan)或环孢素)组合进行血浆置换。患有难治性TTP(TTP患者的约20%)的受试者不响应至少两周的血浆置换疗法。

[0233] 根据前述内容,在一个实施方案中,在TTP的初步诊断的情况下,或者在表现出与TTP的诊断一致的一种或多种症状(例如,中枢神经系统的参与,严重的血小板减少症(如果没有阿司匹林,血小板计数小于或等于5000/μL,如果使用阿司匹林,小于或等于20,000/μL),严重的心脏受累,严重肺部受累,胃肠梗死或坏疽)的受试者中,提供了用有效量的LEA-2抑制剂(例如,MASP-2抗体)或LEA-1抑制剂(例如,MASP-1或MASP-3抗体)作为第一线疗法(不存在血浆置换,或与血浆置换组合)治疗受试者的方法。作为第一线疗法,LEA-1和/或LEA-2抑制剂可全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药。在一些实施方案中,LEA-1和/或LEA-2抑制剂在不存在血浆置换时给予受试者作为第一线疗法,以避免血浆置换的潜在并发症,例如出血、感染和暴露于血浆供体所固有的病症和/或变态反应,或另外反感血浆置换的受试者中,或者在血浆置换不可用的情况下。在一些实施方案中,LEA-1和/或LEA-2抑制剂与免疫抑制剂(例如,皮质类固醇、利妥昔单抗或环孢素)组合(包括共同给药)和/或与浓ADAMTS-13组合给予患有TTP的受试者。

[0234] 在一些实施方案中,该方法包括在第一时间段(例如,持续至少一天至一周或两周的急性期)经由导管(例如,静脉内)给予患有TTP的受试者LEA-1和/或LEA-2抑制剂,然后在第二时间段(例如,至少两周或更长的慢性期)皮下给予受试者LEA-1和/或LEA-2抑制剂。在一些实施方案中,在第一和/或第二时间段的给药在无血浆置换时进行。在一些实施方案中,该方法用于维持受试者以防止受试者患有一种或多种与TTP相关的症状。

[0235] 在另一个实施方案中,提供了通过给予有效减少TTP的一种或多种症状的量的LEA-1和/或LEA-2抑制剂而治疗患有难治性TTP的受试者(也就是,对至少两周血浆置换疗法没有响应的受试者)的方法。在一个实施方案中,在至少两周或更长的时间段,通过皮下或其他胃肠外给药将LEA-1和/或LEA-2抑制剂给予患有慢性难治性TTP的受试者。给药可由

医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0236] 在一些实施方案中,该方法进一步包括在治疗之前以及任选在治疗期间在受试者中判定至少一种补体因子(例如C3、C5)的水平,其中相较于标准值或健康对照受试者,至少一种补体因子的水平减小的判定指示需要用LEA-1和/或LEA-2抑制剂的继续治疗。

[0237] 在一些实施方案中,该方法包括将LEA-1和/或LEA-2抑制剂皮下或静脉内给予患有TTP或有发展TTP风险的受试者。治疗优选每天进行,但也可以没那么频繁如每月进行。继续治疗,直至受试者的血小板计数至少连续两天大于150,000/ml。

[0238] 总之,LEA-1和LEA-2抑制剂预期在治疗TMA包括HUS、aHUS和TTP中提供独立的治疗益处。此外,与单独任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用预期实现额外的治疗益处,或者可以为更广范围的患有TMA变体形式的患者亚群提供有效的治疗。合并的LEA-1和LEA-2抑制可通过LEA-1阻断剂和LEA2阻断剂的共给药来实现。最佳地,LEA-1和LEA-2的抑制功能可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0239] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少血栓性微血管病的严重程度的方法,所述血栓性微血管病例如溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)或血栓性血小板减少性紫癜(TTP),所述方法包括向患有血栓性微血管病的受试者或有发展血栓性微血管病风险的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0240] 在一个实施方案中,根据本发明此方面的方法进一步包括抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗、预防或减少血栓性微血管病的严重程度,所述血栓性微血管病例如溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)或血栓性血小板减少性紫癜(TTP),所述方法包括向患有血栓性微血管病的受试者或有发展血栓性微血管病风险的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。如上详述,在治疗或预防或减少血栓性微血管病的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0241] MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重

复进行,直到病况得到解决或控制。

[0242] 本发明的MASP-3抑制性组合物和任选MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于治疗、预防或减少患有血栓性微血管病的受试者或有发展血栓性微血管病风险的受试者的血栓性微血管病的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0243] IX.MASP-2和MASP-3在哮喘中的作用和使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法哮喘是呼吸道的一种常见的慢性炎性疾病。在美国大约2500万人有哮喘,包括18岁以下的700万儿童,其中一半以上每年至少经历一次哮喘发作,每年导致超过170万急诊和450000住院(world-wide-web在gov/health/prof/lung/asthma/naci/asthma-info/index.htm,在2012年5月4日进行访问)。该病是异类的,具有多个临床表型。最常见的表型是过敏性哮喘。其他表型包括非过敏性哮喘、阿司匹林加剧呼吸道疾病、感染后哮喘、职业性哮喘、空气传播的刺激剂诱发的哮喘及运动诱发的哮喘。过敏性哮喘的主要特征包括:对多种特异性和非特异性刺激的呼吸道高反应性(AHR)、过度呼吸道粘液生产、肺嗜酸粒细胞增多和升高的血清IgE浓度。哮喘的症状包括咳嗽、气喘、胸闷和气短。哮喘治疗的目标是控制疾病并使病情加重、每日症状最小化,并让患者进行身体活动。目前的治疗指南推荐逐步治疗直到哮喘控制实现。第一治疗步骤是根据需要速效吸入β2激动剂,随后加入控制药物如吸入皮质类固醇、长效吸入β2激动剂、白三烯改进剂药物、茶碱、口服糖皮质激素和抗IgE单克隆抗体。

[0244] 尽管哮喘起源是多因素的,但普遍认为它由于在遗传上易感的个体中对于共同环境抗原的不适当免疫反应而产生。哮喘与补体活化有关,而过敏毒素(AT)C3a和C5a具有促炎性和免疫调节性质,这与过敏反应的发展和调节相关(Zhang,X.和Kohl,J.Expert.Rev.Clin.Immunol.,6:269-277,2010)。然而,经典、替代和凝集素补体途径在哮喘中的相对参与并不是很了解。替代途径可在变应原的表面上被激活而凝集素途径可以通过识别变应原多糖结构而活化,这两个过程导致产生AT。根据所涉及的病因性变应原,补体可通过不同的途径被激活。例如Parietaria科的高度变应性草花粉非常有效地促进C4的MBL依赖性活化,这牵涉LEA-2。相反地,屋尘螨变应原不需要MBL用于补体活化(Varga等Mol Immunol.,39(14):839-46,2003)。

[0245] 哮喘的环境触发器可以由替代途径激活补体。例如,在体外将人血清暴露于香烟烟雾或柴油机排气颗粒导致激活补体,该效果不受EDTA存在的影响,表明激活经由替代途径,而不是经典途径(Robbins,R.A.等,Am.J.Physiol.260:L254-L259,1991;Kanemitsu,H.等,Biol.Pharm.Bull.21:129-132,1998)。在小鼠卵白蛋白致敏和攻击模型中评估过敏性呼吸道炎症中补体途径的作用。野生型小鼠响应于气源性变应原攻击而发展AHR和呼吸道炎症。在过敏性肺部炎症的小鼠卵白蛋白模型中,当全身给予或通过吸入局部给予时,抑制补体活化的所有途径的Crry-Ig融合蛋白有效预防AHR和肺部炎症(Taube等,Am J Respir Crit Care Med.,168(11):1333-41,2003)。

[0246] 相较于野生型小鼠,因子B缺陷的小鼠显示出较少的AHR和呼吸道炎症,而C4缺陷型小鼠具有与野生型小鼠相似的效果(Taube,C.等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:8084-8089,2006)。这些结果支持了替代途径而不是经典途径参与鼠气源性变应原攻击模型的作

用。在使用相同小鼠的模型中,因子H(FH)的研究提供了替代途径重要性的进一步证据(Takeda,K.等,J.Immunol.188:661-667,2012)。FH是替代途径的负调节剂,其作用是防止自身组织的自体伤害。在变应原攻击期间内源性FH被发现存在于呼吸道中,而用重组竞争性拮抗剂抑制FH增加了AHR和呼吸道炎症的程度(Takeda等人,2012,同上)。治疗性递送CR2-fH(连接CR2的iC3b/C3d结合区与FH的补体调节区的嵌合蛋白,其将fH的补体调节活性靶向现有的补体活化位点)防护变应原攻击后AHR的发展和嗜酸性粒细胞渗入呼吸道(Takeda等人,2012,同上)。用卵白蛋白以及豚草变应原(其是人类相关变应原)证明了该防护作用。

[0247] 凝集素依赖性补体活化在哮喘中的作用在真菌哮喘的小鼠模型中进行评价(Hogaboam等,J.Leukocyte Biol.75:805-814,2004)。这些研究使用甘露聚糖结合凝集素A(MBL-A)遗传缺陷的小鼠,所述MBL-A是碳水化合物结合蛋白,其用作活化凝集素补体途径的识别组分。在用烟曲霉分生孢子i.t.攻击后第4和28天检查MBL-A(+/+)和MBL-A(-/-)烟曲霉致敏小鼠。与致敏的MBL-A(+/+)组相比,在分生孢子攻击后的两个时间点,致敏MBL-A(-/-)小鼠的AHR显著衰减。与野生型组相比,肺TH2细胞因子水平(IL-4、IL-5和IL13)在分生孢子后第4天显著低于烟曲霉致敏的MBL-A(-/-)小鼠。这些结果表明,MBL-A和凝集素途径在慢性真菌哮喘期间AHR的发展和维持中起主要作用。

[0248] 上文详述的发现表明凝集素依赖性补体活化在哮喘发病机制中的参与。实验数据表明,因子B活化起着关键作用。鉴于LEA-1在因子B的凝集素依赖性活化和替代途径的随后活化中的基本作用,预期LEA-1阻断剂将有利于治疗替代途径介导的某些形式哮喘。因此,这样的治疗可特别用于屋尘螨引起的哮喘或环境触发剂例如香烟烟雾或柴油废气引起的哮喘。另一方面,由草花粉触发的哮喘反应有可能引起LEA-2依赖性补体活化。因此,LEA-2阻断剂预期可特别用于治疗该患者亚群的哮喘病况。

[0249] 鉴于上文详述的数据,本发明人相信,LEA-1和LEA-2介导哮喘中的病理补体活化。根据引发过敏剂,LEA-1或LEA-2可优先参与。因此,LEA-1阻断剂与LEA-2阻断剂组合可具有治疗多种形式哮喘的效用,而与潜在病因学无关。LEA-1和LEA-2阻断剂可在预防、治疗或逆转肺部炎症和哮喘症状中具有互补、加和或协同效应。

[0250] 合并的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA2阻断剂的共同给药来完成。最佳地,LEA-1和LEA-2抑制功能可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0251] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少哮喘的严重程度的方法,所述方法包括向患有哮喘或有风险发展哮喘的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0252] 在一个实施方案中,根据本发明此方面的方法进一步包括抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗、预防或减少哮喘的严重程度,所述方法包括向患有哮喘的受试者或有发展哮

喘风险的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。如上详述,在治疗或预防或减少哮喘的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0253] MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0254] 本发明的MASP-3抑制性组合物和任选MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于治疗、预防或减少患有哮喘的受试者或有发展哮喘风险的受试者的哮喘的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0255] X.MASP-2和MASP-3在致密沉积物病中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法

膜增生性肾小球肾炎(MPGN)是一种肾脏病症,形态学特征在于由于肾小球系膜的内皮下延伸而致的肾小球系膜细胞的增殖和肾小球毛细血管壁的增厚。MPGN被分类为原发性(也称为特发性)或继发性,基础疾病为例如感染性疾病、全身性免疫复合物疾病、肿瘤、慢性肝病等。特发性MPGN包括三种形态类型。I型,或经典MPGN,特点是免疫复合物的内皮下沉积和经典补体途径的激活。II型,或致密沉积物病(DDD),其特征在于额外的膜内致密沉积物。III型的特征在于额外的上皮下沉积物。特发性MPGN是罕见的,约占肾病综合征的原发性肾脏病因的4%至7%(Alchi,B.和Jayne,D.Pediatr.Nephrol.25:1409-1418,2010)。MPGN主要影响儿童和青少年,可能表现为肾病综合征、急性肾炎综合征、无症状性蛋白尿和血尿或复发性肉眼血尿。肾功能障碍在多数患者发生,该疾病具有缓慢渐进过程,约40%患者在10年诊断内发展终末期肾脏病(Alchi和Jayne,2010,同上)。目前的治疗选项包括糖皮质激素、免疫抑制剂、抗血小板治疗方案和血浆置换。

[0256] 通过肾活检的免疫荧光染色,通过缺乏免疫球蛋白和存在C3而诊断DDD,电子显微术显示沿肾小球基底膜的特征性密集嗜锇沉积物。DDD由补体替代途径的失调引起(Sethi等,Clin JAm Soc Nephrol.6(5):1009-17,2011),这可起因于许多不同的机制。在DDD中最常见的补体系统的异常是C3肾炎因子的存在,其是针对替代途径C3转化酶(C3bBb)的自身抗体,这增加其半衰期和因此该途径的激活(Smith,R.J.H.等,Mol.Immunol.48:1604-1610,2011)。其他替代途径异常包括阻断因子H功能的因子H自身抗体、功能获得性C3突变

和因子H的遗传缺陷(Smith等人,2011,同上)。最近的病例报告显示,在两个DDD患者中,eclizumab(抗C5单克隆抗体)治疗与肾功能改善相关(Daina,E.等,New Engl.J.Med.366:1161-1163,2012;Vivarelli,M.等,New Engl.J.Med.366:1163-1165,2012),这表明补体活化在肾脏后果中的致病作用。

[0257] 鉴于上述遗传性、功能性和免疫组化和轶事的临床数据,充分确立了补体在DDD发病机制中的关键作用。因此,阻断补体活化的致病机制或随后的补体活化产物的干预,预计治疗上可用于治疗这种病况。

[0258] 尽管人类遗传数据表明,替代途径扩增环的不恰当控制或过度活化起着关键的作用,但启动补体的事件还没有被确定。肾活组织检查的免疫组织化学研究表明了患病组织中MBL沉积的证据,表明了在DDD中凝集素途径参与启动病理性补体活化(Lhotta等,Nephrol Dial Transplant.,14(4):881-6,1999)。已在实验模型中进一步证实替代途径的重要性。因子H缺陷小鼠发展进行性蛋白尿和人类病况特有的肾脏病理病变(Pickering等,Nat Genet.,31(4):424,2002)。Pickering等进一步证明,介导替代途径的LEA-1依赖性活化的因子B除去充分保护因子H缺陷小鼠免于DDD(Pickering等,Nat Genet.,31(4):424,2002)。

[0259] 因此,可以预料,阻断LEA-1的药剂将有效阻断替代途径的凝集素依赖性活化,并因此将对DDD提供有效的治疗。鉴于替代途径扩增环在DDD患者中失调,可进一步预期阻断扩增环的药剂将是有效的。因为阻断MASP-1或MASP-1和MASP-3的LEA-1靶向剂抑制因子D的成熟,这种剂被预测为有效阻断替代途径扩增环。

[0260] 如上文详述,在患病的肾脏标本中发现明显MBL沉积,突出表明了凝集素驱动的激活事件可能参与DDD发病。一旦肾小球毛细血管的初始组织损伤被建立,则很可能出现额外的MBL结合到受损肾小球内皮和基础性肾小球系膜结构。这种组织损伤公知导致LEA-2活化,从而可引起进一步的补体活化。因此,LEA-2阻断剂也预期在防止受损肾小球结构的进一步补体活化方面具有效用,因此防止向终末期肾衰竭的进一步疾病进展。

[0261] 上文详述的数据表明LEA-1和LEA-2促进DDD中的单独病理补体活化过程。因此,LEA-1阻断剂和LEA-2阻断剂,单独或组合,预计可用于治疗DDD。

[0262] 当组合使用时,LEA-1-和LEA-2阻断剂预计会比任一单独剂更有效,或可用于治疗不同阶段的疾病。LEA-1-和LEA-2阻断剂可因此在预防、治疗或逆转DDD相关的肾功能障碍中具有互补、加和或协同效应。

[0263] 合并的LEA-1和LEA-2抑制可通过LEA-1阻断剂和LEA2阻断剂的共给药来实现。最佳地,具有抑制功能的LEA-1和LEA-2阻断剂可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0264] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少致密沉积物病的严重程度的方法,所述方法包括向患有致密沉积物病或有风险发展致密沉积物病的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给

药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0265] 在另一方面,提供了用于抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗、预防或减少致密沉积物病的严重程度的方法,所述方法包括向患有致密沉积物病或有风险发展致密沉积物病的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂。在另一方面,提供了包括抑制LEA-1和LEA-2依赖性补体活化两者以治疗、预防或减少致密沉积物病的严重程度的方法,所述方法包括向患有致密沉积物病或有风险发展致密沉积物病的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。

[0266] 在一些实施方案中,所述方法包括抑制LEA-1依赖性补体活化和LEA-2依赖性补体活化两者。如上详述,在治疗、预防或减少致密沉积物病的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0267] LEA-1和/或LEA-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0268] 本发明的MASP-3抑制性组合物和/或MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和/或MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于在有此需要的受试者中治疗、预防或减少致密沉积物病的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0269] XI.MASP-2和MASP-3的微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎(NCGN)是快速进行性肾小球肾炎的一种形式,其中肾小球毛细血管壁显示炎症迹象但还具有微量可检测的免疫复合物沉积或抗肾小球基底膜抗体。该病况与肾功能快速下降有关。发现大多数NCGN患者具有抗中性粒细胞胞浆自身抗体(ANCA),因此属于一组称为ANCA相关血管炎的疾病。血管炎是一种特征为血管壁的炎症和纤维素样坏死的血管病症。全身性血管炎根据血管大小:大、中和小而分类。几种形式的小血管炎与ANCA的存在,即韦格纳肉芽肿、显微镜下多血管炎、Churg-Strauss综合征和肾限定性血管炎(NCGN)相关联。它们也可以是潜在病况如系统性红斑狼疮的表现。ANCA的靶抗原包括蛋白酶-3(PR3)和髓过氧化物酶(MPO)。微量免疫NCGN是罕见的,在英国Wessex每百万中约4人报告发病(Hedger,N.等,Nephrol.Dial.Transplant.15:1593-1599,2000)。在Wessex系列的128例微量免疫NCGN患者中,73%为ANCA阳性,59%患者需要初始透析而36%患者需要长期透析。微量免疫NCGN的治疗包括皮质类固醇和免疫抑制剂如环磷酰胺和硫唑嘌呤。对于ANCA相关血管炎的其他治

疗选项包括利妥昔单抗和血浆置换(Chen,M.和Kallenberg,C.G.M.Nat.Rev.Rheumatol.6:653-664,2010)。

[0270] 虽然NCGN的特征在于微量补体沉积,但补体替代途径已经牵涉其发病机理。对7例MPO-ANCA相关微量免疫NCGN患者的肾活检评估检测到膜攻击复合物、C3d、因子B和因子P的存在(其在正常对照或微小病变疾病患者的活检中未检测到),而未检出C4d和甘露糖结合凝集素,表明替代途径的选择性激活(Xing,G.Q.等J.Clin.Immunol.29:282-291,2009)。实验NCGN可以通过转移抗MPOIgG到野生型小鼠或转移抗MPO脾细胞到免疫缺陷小鼠来诱导(Xiao,H.等J.Clin.Invest.110:955-963,2002)。在NCGN的该小鼠模型中,使用基因敲除小鼠研究特定的补体活化途径的作用。在注射抗MPOIgG后,$C4^{-/-}$小鼠发展与野生型小鼠可比的肾病,而$C5^{-/-}$和因子$B^{-/-}$小鼠没有发展肾病,这表明替代途径参与了该模型而经典和凝集素途径没有(Xiao,H.等Am.J.Pathol.170:52-64,2007)。而且,将患者的MPO-ANCA或PR3-ANCA IgG与TNF-α-引发的人中性粒细胞孵育,引起在正常人血清中导致补体活化的因子释放,如通过C3a产生所检测的;对于健康受试者的IgG没有观察到这种效果,提示ANCA在嗜中性粒细胞和补体活化的潜在致病作用(Xiao等人,2007,同上)。

[0271] 基于以上对于替代途径在该病况中概述的作用,预计阻断替代途径的激活将在ANCA阳性NCGN的治疗中具有效用。鉴于发病需要fB活化,预计LEA-1的抑制剂将特别可用于治疗此病况和在这些患者中防止肾功能进一步下降。

[0272] 然而,患者的另一亚群发展具有新月体形成的进行性肾血管炎,在无ANCA时伴随肾功能的快速下降。这种形式的病况被称为ANCA阴性NCGN并构成患有微量免疫NCGN的所有患者的大约三分之一(Chen等,JASN 18(2):599-605,2007)。这些患者趋于年轻化,且肾的结果往往特别严重(Chen等,Nat Rev Nephrol.,5(6):313-8,2009)。这些患者的鉴别性病理特征是MBL和C4d在肾脏病变的沉积(Xing等,J Clin Immunol.30(1):144-56,2010)。肾活组织检查中MBL和C4d的染色强度与肾功能负相关(Xing等人,2010,同上)。这些结果表明凝集素依赖性补体活化在发病机制中起重要作用。C4d而不是因子B通常存在于患病组织标本中的事实表明LEA-2参与。

[0273] 基于上述凝集素依赖性补体活化在ANCA阴性NCGN中的作用,预计阻断LEA-2途径的活化将在ANCA阴性NCGN治疗中具有效用。

[0274] 上文详述的数据表明LEA-1和LEA-2在ANCA阳性和ANCA阴性NCGN中分别介导病理补体活化。因此,LEA-1阻断剂与LEA-2阻断剂组合预期具有治疗所有形式的微量免疫NCGN的效用,而与潜在病因学无关。LEA-1和LEA-2阻断剂可因此在预防、治疗或逆转NCGN相关肾功能障碍中具有互补、加和或协同效应。

[0275] 与单独任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可实现额外的治疗益处,或者可以为更广范围的患者亚群提供有效的治疗。合并的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA2阻断剂的共同给药来完成。最佳地,LEA-1和LEA-2抑制功能可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0276] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎的严重程度的方法,所述方法包括向患有微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎或有风险发展微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎

的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0277] 在另一方面,提供了用于抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗、预防或减少微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎的严重程度的方法,所述方法包括向患有微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎或有风险发展微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂。在另一方面,提供了包括抑制LEA-1和LEA-2依赖性补体活化两者以治疗、预防或减少微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎的严重程度的方法,所述方法包括向有此需要的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。

[0278] 在一些实施方案中,所述方法包括抑制LEA-1依赖性补体活化和LEA-2依赖性补体活化两者。如上详述,在治疗或预防或减少微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0279] MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0280] 本发明的MASP-3抑制性组合物和/或MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和/或MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于治疗、预防或减少微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0281] XII.MASP-2和MASP-3在创伤性脑损伤中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法创伤性脑损伤(TBI)是每年导致至少1千万人死亡或住院治疗的全球主要健康问题(Langlois,J.A.等,J.Head Trauma Rehabil.21:375-378,2006)。2003年在美国估计有160万TBI,包括120万例急诊、290000例住院和51000例死亡(Rutland-Brown,W.等,J.Head Trauma Rehabil.21:544-548,2006)。在美国大多数TBI是由跌倒和机动车交通造成的。TBI可导致长期或终身的身体、认知、行为和情绪后果。超过500万美国人患有与TBI相关的长期或终生残疾(Langlois等人,2006年,同上)。

[0282] TBI可能涉及脑物质穿透(“穿透”损伤)或不穿透脑的损伤(“封闭”的损伤)。损伤

概况和相关的神经行为后遗症在穿透和关闭性TBI之间可能非常不同。虽然各损伤是独特的,但某些脑区域特别容易受到外伤引起的损害,包括额皮层和额下白质、基底节和间脑、喙脑干和颞叶包括海马(McAllister,T.W.Dialogues Clin.Neurosci.13:287-300,2011)。TBI可以导致急性期若干神经递质系统的改变,包括谷氨酸和其它兴奋性氨基酸的释放以及儿茶酚胺能和胆碱能系统中的慢性改变,其可与神经行为残疾相关联(McAllister,2011,同上)。显著TBI幸存者常患认知缺损、人格改变和增加的精神病症,尤其是抑郁、焦虑和创伤后应激病症。尽管大量研究,但对于TBI,尚未发现可以降低死亡率和发病率并改善功能性结果的临床上有效的治疗。

[0283] 补体因子和TBI

大量的研究已经确定了补体蛋白和神经病症,包括阿尔茨海默氏病、多发性硬化、重症肌无力、格林-巴利综合症、脑狼疮和中风的关系(在Wagner,E.等,Nature Rev DrugDisc.9:43-56,2010中综述)。最近已证实C1q和C3在突触消除中的作用,从而补体因子可能参与正常CNS功能和神经变性疾病两者(Stevens,B.等,Cell 131:1164-1178,2007)。MASP-1和MASP-3基因广泛表达于大脑以及神经胶质瘤细胞系T98G(Kuraya,M.等,Int Immunol.,15:109-17,2003),这与凝集素途径在CNS中的作用一致。

[0284] MASP-1和MASP-3对针对病原体和改变的自身细胞的直接防御是关键的,但凝集素途径还导致中风、心脏发作和其他缺血再灌注损伤后的严重组织损伤。同样,MASP-1和MASP-3是TBI引起的组织损伤中的可能介质。在两种小鼠模型中,替代途径中因子B的抑制已显示使TBI减弱。因子B敲除小鼠被保护免于TBI后的补体介导的神经炎症和神经病理(Leinhase I等,BMC Neurosci.7:55,2006)。此外,抗因子B抗体在TBI诱导的小鼠中减弱脑组织损伤和神经元细胞死亡(Leinhase I等,J Neuroinflammation 4:13,2007)。MASP-3直接激活因子B(Iwaki,D.等,JImmunol.187:3751-8,2011),因此也是TBI中的可能介质。类似于因子B的抑制,LEA-1抑制剂如抗MASP-3抗体预期提供有前景的策略用于治疗TBI中的组织损伤和随后的后遗症。

[0285] 因此,LEA-1和LEA-2抑制剂可在TBI中具有独立的治疗益处。与单独任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可实现额外的治疗益处,或者可以为更广范围的患者亚群提供有效的治疗。合并的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA2阻断剂的共同给药来完成。最佳地,LEA-1和LEA-2抑制功能可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点可以结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0286] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗或减少创伤性脑损伤的严重程度的方法,所述方法包括向患有创伤性脑损伤的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、颅内、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0287] 在另一方面,提供了用于抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗或减少创伤性脑损伤的严重程度的方法,所述方法包括向患有创伤性脑损伤的受试者给予治疗有效量的MASP-2

抑制剂。在另一方面,提供了包括抑制LEA-1和LEA-2依赖性补体活化两者以治疗或减少创伤性脑损伤的严重程度的方法,所述方法包括向患有创伤性脑损伤的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。

[0288] 在一些实施方案中,所述方法包括抑制LEA-1依赖性补体活化和LEA-2依赖性补体活化两者。如上详述,在治疗或减少创伤性脑损伤的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0289] MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下、颅内或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0290] 本发明的MASP-3抑制性组合物和/或MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和/或MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于治疗或减少创伤性脑损伤的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0291] XIII.MASP-2和MASP-3在吸入性肺炎中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法

吸入被定义为将口咽或胃内容物吸入到下呼吸道。吸入可导致吸入(化学)性肺炎、原发性细菌吸入性肺炎或化学性肺炎的继发性细菌感染的并发症。吸入的危险因素包括降低水平的意识(例如,头部创伤、酒精或药物引起的感觉中枢变化、中风)、各种胃肠道和食道异常以及神经肌肉疾病。据估计,450万例社区获得性肺炎中的5-15%是由于吸入性肺炎(Marik,P.E.New Engl.J.Med.344:665-671,2001)。化学性肺炎的治疗主要是支持性的,而使用经验性抗生素是有争议的。细菌吸入性肺炎的治疗是用适当的抗生素,这是基于吸入发生在社区还是医院,这是因为可能的致病微生物在这些情况下是不同的。应采取措施,以防止高危患者的吸入,例如养老院中咽反射受损的老年患者。已被证明是有效预防的措施包括喂养时床的头部抬高、牙科预防和良好的口腔卫生。预防性抗生素没有被证明是有效的并阻止使用,因为它们可能导致抗性微生物的出现。

[0292] 补体组分的调节已被建议用于许多临床适应症,包括传染病(脓毒症、病毒、细菌和真菌感染)和肺部病况(呼吸窘迫综合症、慢性阻塞性肺病和囊性纤维化)(综述在Wagner,E.等,Nature Rev Drug Disc.9:43-56,2010)。很多临床和遗传研究对这个建议提供了支持。例如,患有临床结核且具有低的MBL水平的患者的频率显著降低(Soborg等,Journal of InfectiousDiseases 188:777-82,2003),这表明MBL低水平与免于该疾病的

保护相关。

[0293] 在酸吸入损伤的鼠模型中,Weiser MR等人,J.Appl.Physiol.83(4):1090-1095,1997,表明C3敲除小鼠受到保护免于严重的伤害;而C4敲除小鼠没有受到保护,这表明补体活化是通过替代途径介导的。因此,在吸入性肺炎中用LEA-1抑制剂阻断替代途径预计将提供治疗益处。

[0294] 因此,LEA-1和LEA-2抑制剂在吸入性肺炎中可具有的独立治疗益处。此外,与单独任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可实现额外的治疗益处,或者可以为更广范围的患者亚群提供有效的治疗。合并的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA2阻断剂的共同给药来完成。最佳地,LEA-1和LEA-2抑制功能可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0295] 本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗吸入性肺炎的方法,所述方法通过向患有所述疾病或其他补体介导的肺炎的受试者给予一种组合物来进行,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制组合物可以局部给药至肺,如通过吸入器。或者,MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0296] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少吸入性肺炎的严重程度的方法,所述方法包括向患有吸入性肺炎或有风险发展吸入性肺炎的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0297] 在另一方面,提供了用于抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗、预防或减少吸入性肺炎的严重程度的方法,所述方法包括向患有吸入性肺炎或有风险发展吸入性肺炎的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂。在另一方面,提供了包括抑制LEA-1和LEA-2依赖性补体活化两者以治疗或减少吸入性肺炎的严重程度的方法,所述方法包括向患有吸入性肺炎的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。在一些实施方案中,所述方法包括抑制LEA-1依赖性补体活化和LEA-2依赖性补体活化两者。如上详述,在治疗或减少吸入性肺炎的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特

异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0298] MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或对于非肽能药剂可能通过口服给药。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0299] 本发明的MASP-3抑制性组合物和/或MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和/或MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于在有此需要的受试者中治疗、预防或减少吸入性肺炎的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0300] XIV.MASP-2和MASP-3在眼内炎中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法眼内炎是眼内腔的炎性病况,通常由感染引起。眼内炎可以是内源性的,起因于生物自远端感染源(例如,心内膜炎)的血行播散,或外源性的,起因于从外部直接接种生物,作为眼科手术、异物和/或钝性或穿透性眼外伤的并发症。外源性眼内炎比内源性眼内炎更常见,且大多数外源性眼内炎病例在眼科手术后发生。在美国,白内障手术是眼内炎的主要原因,并在0.1-0.3%的该手术中发生,在过去十年的发病率明显增加(Taban,M.等,Arch.Ophthalmol.123:613-620,2005)。手术后眼内炎可呈现为急性,术后2周之内,或延迟,术后数月。急性眼内炎的典型表现为疼痛、发红、眼睑肿胀和视力下降。延迟发作的眼内炎相比急性形式不太常见,且患者可能会仅报告轻度疼痛和光敏性。眼内炎的治疗取决于潜在病因,并且可包括全身性和/或玻璃体内抗生素。眼内炎可导致视力降低或丧失。

[0301] 如先前对于AMD描述的,多个补体途径基因已与眼科病症相关,并且这些具体包括凝集素途径的基因。例如,对于AMD亚型已经鉴定MBL2(Dinu V等,Genet Epidemiol 31:224-37,2007)。LEA-1和LEA-2途径有可能参与眼炎性病况例如眼内炎(Chow SP等,Clin Experiment Ophthalmol.39:871-7,2011)。Chow等检查眼内炎患者的MBL水平,表明MBL水平和功能性凝集素途径活性两者在发炎的人眼睛中都显著升高,但在非炎症对照眼中几乎检测不到。这表明了MBL和凝集素途径在威胁视力的眼炎性病况特别是眼内炎中的作用。此外,在角膜真菌性角膜炎的鼠模型中,MBL-A基因是五个上调炎性途径基因之一(Wang Y.等,Mol Vis 13:1226-33,2007)。

[0302] 因此,LEA-1和LEA-2抑制剂预期在治疗眼内炎中具有独立的治疗益处。此外,与单独任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可实现额外的治疗益处,或者可以为更广范围的患者亚群提供有效的治疗。合并的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA-2阻断剂的共同给药来完成。最佳地,LEA-1和LEA-2抑制功能可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0303] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少眼内炎的严重程度的方法,所述方法包括向患有眼内炎或有风险发展眼内炎的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可局部给药至眼,例如通过冲洗或以局部凝胶、药膏或滴剂的形式施用该

组合物,例如,通过玻璃体内给药。或者,MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0304] 在另一方面,提供了用于抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗、预防或减少眼内炎的严重程度的方法,所述方法包括向患有眼内炎或有风险发展眼内炎的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂。在另一方面,提供了包括抑制LEA-1和LEA-2依赖性补体活化两者以治疗或减少眼内炎的严重程度的方法,所述方法包括向患有眼内炎的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。

[0305] 在一些实施方案中,所述方法包括抑制LEA-1依赖性补体活化和LEA-2依赖性补体活化两者。如上详述,在治疗或预防或减少眼内炎的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0306] MASP-2抑制剂可局部给药至眼,例如通过冲洗或以局部凝胶、药膏或滴剂的形式施用该组合物,或通过玻璃体内注射。或者,MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0307] 本发明的MASP-3抑制性组合物和/或MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和/或MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于在有此需要的受试者中治疗、预防或减少眼内炎的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0308] XV.MASP-2和MASP-3在视神经脊髓炎中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法视神经脊髓炎(NMO)是一种靶向视神经和脊髓的自身免疫性疾病。这导致视神经的炎症(被称为视神经炎)和脊髓的炎症(被称为脊髓炎)。NMO中的脊髓病变可导致腿或手臂无力或瘫痪、失明、膀胱及肠道功能障碍和感觉功能障碍。

[0309] NMO与多发性硬化症(MS)具有数个相似之处,因为两者都是由于CNS靶标的免疫攻击并且都导致脱髓鞘(Papadopoulos和Verkman,Lancet Neurol.,11(6):535-44,2013)。然而,NMO的分子靶标、治疗以及病变均不同于MS。尽管MS在很大程度上是由T细胞介导的,但NMO患者通常具有靶向水通道蛋白水通道蛋白4(AQP4)的抗体,水通道蛋白是在包围血脑屏障的星形细胞中存在的蛋白质。对于MS,干扰素β是最常用的疗法,但在NMO中一般认为是有害的。NMO的炎性病变存在于脊髓和视神经中,并且可发展到大脑,包括白质和灰质。发生在NMO病变的脱髓鞘是通过补体介导的(Papadopoulos和Verkman,Lancet Neurol.,11(6):

535-44,2013)。

[0310] 补体依赖性细胞毒性似乎是引起NMO发展的主要机制。超过90％的NMO患者有抗AQP4的IgG抗体(Jarius和Wildemann,Jarius S,Wildemann B.,Nat Rev Neurol.2010Jul;6(7):383-92)。这些抗体在血脑屏障处启动病变形成。星形细胞表面上的初始抗原-抗体复合物(AQP4/AQP4-IgG)激活经典补体途径。这导致在星形细胞表面上形成膜攻击复合物,导致粒细胞浸润、脱髓鞘,最终导致星形细胞、少突胶质细胞和神经元坏死(Misu等,Acta Neuropathol 125(6):815-27,2013)。这些细胞事件反映在组织破坏和囊性、坏死病变的形成中。

[0311] 经典补体途径显然是NMO发病机制的关键。NMO病变显示免疫球蛋白的血管中心沉积(vasculocentric deposition)和活化补体成分(Jarius等,Nat Clin Pract Neurol.4(4):202-14,2008)。此外,补体蛋白例如C5a已从NMO患者的脑脊髓液中分离(Kuroda等,JNeuroimmunol.,254(1-2):178-82,2013)。此外,在小鼠NMO模型中,从NMO患者获得的血清IgG可导致补体依赖性细胞毒性(Saadoun等,Brain,133(Pt 2):349-61,2010)。在NMO的小鼠模型中,抗C1q的单克隆抗体阻止星形细胞的补体介导的破坏和病变(Phuan等,Acta Neuropathol,125(6):829-40,2013)。

[0312] 补体替代途径用于放大整体补体活性。Harboe及其同事(2004)证明了替代途径的选择性阻断抑制80％以上的经典途径诱导的膜攻击复合物形成(Harboe等,Clin Exp Immunol138(3):439-46,2004)。Tüzün及其同事(2013)检查了NMO患者的经典和替代途径产物两者(Tüzün E等,JNeuroimmunol.233(1-2):211-5,2011)。测定C4的分解产物C4d以评价经典途径活性,其与对照组相比在NMO患者血清中增加(2.14倍的增加)。此外,相比于MS患者或正常对照个体,观察到在NMO患者中替代途径因子B的分解产物因子Bb增加(1.33倍的增加)。这表明,在NMO中替代途径功能也增加。这种活化可以预期会提高整体补体活化,而且事实上,补体级联的最终产物sC5b-9显著增加(4.14倍增加)。

[0313] MASP-3的特异性抑制剂预期在治疗患有NMO的患者中提供益处。如实施例17和18所示,缺乏MASP-3的血清无法激活因子B或因子D,因子B是C5转化酶的必需成分,因子D是替代途径的中心活化剂。因此,用抑制剂例如抗体或小分子阻断MASP-3活性也预期将抑制因子B和因子D的活化。抑制这两个因子将阻止替代途径的扩增,从而导致整体补体活性减小。因此在NMO中抑制MASP-3将显著提高治疗结果。

[0314] 因此,LEA-1和/或LEA-2抑制剂预期在治疗NMO中具有独立的治疗益处。此外,与单独任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可实现额外的治疗益处,或者可以为更广范围的患者亚群提供有效的治疗。合并的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA-2阻断剂的共同给药来完成。最佳地,LEA-1和LEA-2抑制功能可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0315] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少NMO的严重程度的方法,所述方法包括向患有NMO或有风险发展NMO的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可局部给药至眼,例如通过冲洗或以局部凝胶、药膏或滴剂的形式施用该组合物,或

通过玻璃体内给药。或者,MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0316] 在另一方面,提供了用于抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗、预防或减少NMO的严重程度的方法,所述方法包括向患有NMO或有风险发展NMO的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂。在另一方面,提供了包括抑制LEA-1和LEA-2依赖性补体活化两者以治疗或减少NMO的严重程度的方法,所述方法包括向患有NMO的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。

[0317] 在一些实施方案中,所述方法包括抑制LEA-1依赖性补体活化和LEA-2依赖性补体活化两者。如上详述,在治疗或预防或减少NMO的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0318] MASP-2抑制剂可局部给药至眼,例如通过冲洗或以局部凝胶、药膏或滴剂的形式施用该组合物,或通过玻璃体内注射。或者,MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0319] 本发明的MASP-3抑制性组合物和/或MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和/或MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于在有此需要的受试者中治疗、预防或减少NMO的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0320] XVI.MASP-2和MASP-3在贝切特氏病中的作用以及使用MASP-2和MASP-3抑制剂的治疗方法贝切特氏病,或贝切特氏综合征,是一种罕见的免疫介导的小血管系统性血管炎,往往呈现粘膜溃疡和眼的问题。贝切特氏病(BD)是1937年以土耳其皮肤学家Hulusi Behçet命名的,Hulusi Behçet首次描述了复发性口腔溃疡、生殖器溃疡和葡萄膜炎的三重症状联合体。BD是一种原因不明的全身性、复发性炎性病症。BD的炎性血管周炎可涉及胃肠道、肺、肌肉骨骼、心血管和神经系统。由于破裂的血管动脉瘤或严重的神经系统并发症,BD可能是致命的。视神经病变和萎缩可起因于血管炎和供给视神经的血管闭塞。见Al-Araji A等,Lancet Neurol.,8(2):192-204,2009。

[0321] BD发病率最高的是中东和远东地区,但它在欧洲和北美是罕见的。BD往往最初用皮质类固醇和免疫抑制剂控制,但很多病例是难治性的,伴随严重发病率和死亡率。生物剂,包括干扰素-α、IVIG、抗TNF、抗IL-6和抗CD20,在一些病例中已显示益处,但对最佳治疗

没有达成共识。

[0322] 尽管BD显然是炎性病症,但其病理生物学尚不清楚。与HLA抗原有遗传关联,且基因组范围的关联研究已经牵连很多细胞因子基因(Kirino等,Nat Genet,45(2):202-7,2013)。免疫系统的机能亢进似乎是由补体系统来调节。在BD患者血清中已观察到增加的C3水平(Bardak和Aridoğan,OculImmunolInflamm 12(1):53-8,2004),而脑脊液中升高的C3和C4与疾病相关(Jongen等,Arch Neurol,49(10):1075-8,1992)。

[0323] Tüzün及其同事(2013)检查了BD患者血清中经典和替代途径产物两者(Tüzün E等,JNeuroimmunol,233(1-2):211-5,2011)。C4的分解产物4d在替代途径上游产生,经测量以评价初始经典途径的活性。与对照相比在BD患者血清中C4d增加(2.18倍的增加)。因子Bb是因子B的分解产物,经测定以确定替代途径的活性。与正常对照个体相比,BD患者的因子Bb增加(2.19倍的增加),这与BD替代途径功能提高是一致的。因为补体替代途径用于放大整体补体活性,这种活化可以预期会提高整体的补体活化。Harboe及其同事(2004)证明了替代途径的选择性阻断抑制了80%以上的经典途径诱导的膜攻击复合物形成(Harboe M等,Clin Exp Immunol,138(3):439-46,2004)。事实上,补体级联的最终产物SC5b-9在BD患者中显著增加(5.46倍的增加)。MASP-3的特异性抑制剂应在BD中提供益处。阻断MASP-3应抑制因子B和因子D的活化。这将终止替代途径的放大,从而导致整体补体活性的反应减弱。因而MASP-3抑制应在BD中显著改善治疗结果。

[0324] 因此,LEA-1和/或LEA-2抑制剂预期在治疗BD中具有独立的治疗益处。此外,与单独任一剂相比,LEA-1和LEA-2抑制剂一起使用可实现额外的治疗益处,或者可以为更广范围的患者亚群提供有效的治疗。合并的LEA-1和LEA-2抑制可以由LEA-1阻断剂和LEA-2阻断剂的共同给药来完成。最佳地,LEA-1和LEA-2抑制功能可以包含在单一的分子实体,诸如包含MASP-1/3和MASP-2特异性结合位点的双特异性抗体,或其中每个结合位点结合并阻断MASP-1/3或MASP-2的双重特异性抗体。

[0325] 按照上述内容,本发明的一个方面因此提供了用于抑制LEA-1依赖性补体活化以治疗、预防或减少BD的严重程度的方法,所述方法包括向患有BD或有风险发展BD的受试者给予一种组合物,所述组合物包含在药物载体中的治疗有效量的LEA-1抑制剂,其包含MASP-1抑制剂、MASP-3抑制剂或MASP-1/3抑制剂的组合。MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制性组合物可局部给药至眼,例如通过冲洗或以局部凝胶、药膏或滴剂的形式施用该组合物,或通过玻璃体内给药。或者,MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0326] 在另一方面,提供了用于抑制LEA-2依赖性补体活化以治疗、预防或减少BD的严重程度的方法,所述方法包括向患有BD或有风险发展BD的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂。在另一方面,提供了包括抑制LEA-1和LEA-2依赖性补体活化两者以治疗或减少BD的严重程度的方法,所述方法包括向患有BD的受试者给予治疗有效量的MASP-2抑制剂和MASP-1、MASP-3或MASP-1/3抑制剂。

[0327] 在一些实施方案中,所述方法包括抑制LEA-1依赖性补体活化和LEA-2依赖性补体活化两者。如上详述,在治疗或预防或减少BD的严重程度中,与单独抑制LEA-1相比,采用各自阻断LEA-1和LEA-2的药理剂的组合预期提供改进的治疗结果。这个结果可以实现,例如,

通过具有LEA-1阻断活性的抗体连同具有LEA-2-阻断活性的抗体的联合给药。在一些实施方案中,LEA-1-和LEA-2-阻断活性被组合成单一的分子实体,并且所述实体具有组合的LEA-1-和LEA-2-阻断活性。这种实体可以包括双特异性抗体或由其组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-1并阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2并阻断LEA-2。或者,这样的实体可由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性识别MASP-3,因此阻断LEA-1而第二抗原结合位点特异性识别MASP-2,并阻断LEA-2。这样的实体可最佳地由双特异性单克隆抗体组成,其中一个抗原结合位点特异性地识别MASP-1和MASP-3两者,因此阻断LEA-1,而第二抗原结合位点特异性地识别MASP-2,并阻断LEA-2。

[0328] MASP-2抑制剂可局部给药至眼,例如通过冲洗或以局部凝胶、药膏或滴剂的形式施用该组合物,或通过玻璃体内注射。或者,MASP-2抑制剂可以全身性给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌肉内、吸入、经鼻、皮下或其他肠胃外给药,或可能通过口服给予非肽能药剂。给药可由医师确定而重复进行,直到病况得到解决或控制。

[0329] 本发明的MASP-3抑制性组合物和/或MASP-2抑制性组合物的施用可通过组合物的单次给药(例如,含有MASP-2和/或MASP-3抑制剂或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或通过有限顺序的给药进行,用于在有此需要的受试者中治疗、预防或减少BD的严重程度。或者,组合物可以以周期性的间隔,例如每日、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月在长时间内给予以治疗有此需要的受试者。

[0330] XVII.MASP抑制剂

随着对补体的凝集素途径是由两个主要的补体活化分支(LEA-1和LEA-2)组成以及还存在凝集素-非依赖性补体活化分支的认识,逐渐认识到高度需要特异性地抑制导致与至少一种以下疾病相关病理学的这些效应物分支的一个或多个,而不完全关闭补体的免疫防御能力(即留下完整的经典途径):阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎或贝切特氏病。这将留下完整的C1q-依赖性补体活化系统,以进行免疫复合物的加工和有助于针对感染的宿主防御。

[0331] i.抑制LEA-1-介导的补体活化的组合物

如本文所述,本发明人已经意外地发现导致细胞溶解的LEA-1的活化是MASP-3-依赖性的。正如本文进一步所述,在生理条件下,MASP-3-依赖性LEA-1活化还促进调理作用,从而提供具有LEA-2-介导的补体活化的附加效应。正如实施例7所示,在Ca^{++}存在时,不需要因子D,因为MASP-3在因子$D^{-/-}$血清中可以驱动LEA-1活化。MASP-3、MASP-1和HTRA-1能够将前因子D转化为活性因子D。同样,MASP-3活化在许多情况下看来依赖于MASP-1,因为MASP-3(与MASP-1和MASP-2相反)不是自我活化酶并且在没有MASP-1的帮助下不能转化为其活性形式(Zundel,S.等人,J.Immunol.172:4342-4350(2004);Megyeri等人,J.Biol.Chem.288:8922-8934(2013)。因为MASP-3不是自我活化的,并且在许多情况下需要MASP-1活性以转化为其酶促活性形式,所以替代途径C3转化酶C3Bb的MASP-3-介导的活化可以通过靶向MASP-3酶原或已被活化的MASP-3而被抑制,或通过靶向MASP-3的MASP-1-介导的活化而被抑制,或通过以上两者而被抑制,因为在许多情况下,在MASP-1功能活性不存在时,MASP-3保持其

酶原形式,不能通过直接形成替代途径C3转化酶(C3bBb)而驱动LEA-1。

[0332] 因此,在本发明的一方面,在特异性地抑制LEA-1的治疗药的开发中作为目标的优选蛋白成分是MASP-3的抑制剂(包括MASP-1-介导的MASP-3活化的抑制剂(例如抑制MASP-3活化的MASP-1抑制剂))。

[0333] 依据前述,一方面,本发明提供在患有选自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病的疾病或病症或处于发展所述疾病或病症风险中的受试者中抑制LEA-1的不良反应(即溶血和调理作用)的方法,包括给予所述受试者药物组合物,所述药物组合物包含有效抑制MASP-3-依赖性补体活化的一定量的MASP-3抑制剂和药学上可接受的载体。

[0334] 在患有选自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎或贝切特氏病的疾病或病症或处于发展所述疾病或病症风险中的活的受试者中以有效抑制MASP-3-依赖性补体活化的量给予MASP-3抑制剂。在本发明该方面的实践中,代表性的MASP-3抑制剂包括:抑制MASP-3生物活性的分子,包括抑制以下至少一项或多项的分子:因子B的凝集素MASP-3-依赖性活化,前因子D的凝集素MASP-3-依赖性活化,因子B的MASP-3-依赖性的、凝集素-非依赖性活化,和前因子D的MASP-3-依赖性的、凝集素-非依赖性活化(例如小分子抑制剂、MASP-3抗体及其片段或与MASP-3相互作用或干扰蛋白-蛋白相互作用的阻断肽);和降低MASP-3表达的分子(例如MASP-3反义核酸分子、MASP-3特异性RNAi分子和MASP-3核酶)。MASP-3抑制剂可以有效地阻断MASP-3蛋白与蛋白的相互作用,干扰MASP-3二聚化或装配,阻断Ca^{++}结合,干扰MASP-3丝氨酸蛋白酶活性位点,或降低MASP-3蛋白表达,从而阻止MASP-3免于活化LEA-1-介导的补体活化或凝集素-非依赖性的补体活化。MASP-3抑制剂可以单独用作主要治疗,或作为辅助治疗与其它治疗药联用以增强其它药物治疗的治疗益处,如本文进一步所述。

[0335] 在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂特异性地结合到MASP-3(SEQ ID NO:8)的一部分上,其结合亲和性比补体系统中的其它成分高至少10倍。在另一个实施方案中,MASP-3抑制剂特异性地结合到MASP-3(SEQ ID NO:8)的一部分上,其结合亲和性比补体系统中的其它成分高至少100倍。在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂特异性地结合到MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:8的aa 450-711)上和抑制MASP-3-依赖性补体活化,前提条件是所述抑制剂不结合MASP-1(SEQ ID NO:10)的丝氨酸蛋白酶结构域,并且它不结合MASP-2(SEQ ID NO:5)的丝氨酸蛋白酶结构域。在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂是MASP-3单克隆抗体或其片段,其特异性地结合到MASP-3上。

[0336] 在另一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂特异性地结合到MASP-1(SEQ ID NO:10)的一部分上,其结合亲和性比补体系统中的其它成分高至少10倍,并抑制MASP-3的MASP-1-介导的活化。在另一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂特异性地结合到MASP-1(SEQ ID NO:

10)的一部分上,其结合亲和性比补体系统的其它成分(即多肽或其片段)高至少100倍,并抑制MASP-3的MASP-1-介导的活化。在某些实施方案中,所述MASP-3抑制剂特异性地结合到MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10的aa 449-694)上和抑制MASP-3的MASP-1-介导的活化,前提条件是所述抑制剂不结合MASP-2(SEQ ID NO:5)的丝氨酸蛋白酶结构域,并且它不结合MASP-3(SEQ ID NO:8)的丝氨酸蛋白酶结构域。在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂是MASP-1单克隆抗体或其片段,其特异性地结合到MASP-1上和抑制MASP-3的MASP-1-介导的活化。在某些实施方案中,结合到MASP-1上的所述MASP-3抑制剂抑制MASP-3的MASP-1-介导的活化和进一步抑制MASP-1-介导的因子D成熟。

[0337] 在另一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂结合到MASP-3(SEQ ID ON:8)的一部分上并且还结合到MASP-1(SEQ ID NO:10)的一部分上,前提条件是所述抑制剂不结合MASP-2(SEQ ID NO:5)或MAp19(SEQ ID NO:3)。在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂结合到MASP-3(SEQ ID ON:8)的一部分上并且还结合到MASP-1(SEQ ID NO:10)的一部分上,前提条件是所述抑制剂不结合MASP-2(SEQ ID NO:5)或MAp19(SEQ ID NO:3)。在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂结合到MASP-3(SEQ ID ON:8)的一部分上并且还结合到MASP-1(SEQ ID NO:10)的一部分上,前提条件是所述抑制剂不结合MASP-2(SEQ ID NO:5)、MAp19(SEQ ID NO:3)或MAp44(SEQ ID NO:11),从而因缺乏与MAp44的结合而允许较低有效剂量以抑制MASP-3-依赖性补体活化,该MAp44在人血清中以高浓度存在。

[0338] 在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂是MASP-1/MASP-3双重抑制剂,其结合到在MASP-1和MASP-3之间保守的氨基酸区内的表位上,所述区例如CUBI-CCP2结构域(SEQ ID NO:10的aa 25-432),如图3-5所示。在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂是MASP-1/MASP-3双重抑制剂,其结合到在MASP-1和MASP-3之间保守的氨基酸区内的表位上,前提条件是所述抑制剂不结合MAp44,例如CCP结构域(SEQ ID NO:10的aa 367-432)。在另一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂是双特异性抑制剂,例如双特异性单克隆抗体,其特异性地结合到MASP-3蛋白(SEQ ID NO:8)上的表位和MASP-1蛋白(SEQ ID NO:10)上的表位。在某些实施方案中,所述MASP-3抑制剂是双特异性单克隆抗体,其结合到MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10的aa 449-694)并且还结合到MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:8的aa 450-711)。

[0339] 所述MASP-3抑制剂的结合亲和性可以使用合适的结合测定法来检测。

[0340] 对MASP-3-依赖性补体活化的抑制的特征在于作为按照本发明方法给予MASP-3抑制剂的结果而发生的补体系统的成分的以下变化中的至少一项:LEA-1-介导的补体活化的抑制(溶血和/或调理作用的抑制);因子B的凝集素-非依赖性转化的抑制;因子D的凝集素-非依赖性转化的抑制;MASP-3丝氨酸蛋白酶底物-特异性切割的抑制;溶血的减少(例如如实施例5中所述而测定);或C3切割和C3b沉积的减少(例如如实施例4和实施例11中所述而测定)。

[0341] 在某些实施方案中,所述MASP-3抑制剂选择性地抑制MASP-3-依赖性补体活化(即LEA-1-介导的补体活化和/或因子B的凝集素-非依赖性转化和/或因子D的凝集素-非依赖性转化),而留下功能完整的C1q-依赖性补体活化系统。

[0342] 在某些实施方案中,所述MASP-3抑制剂是抗体或其片段,包括MASP-3抗体和其MASP-3结合片段、MASP-1抗体及其片段、天然的和合成的肽、或小分子。在某些实施方案中,

所述MASP-3抑制剂是小分子蛋白酶抑制剂,其对于MASP-1是选择性的,或对于MASP-3是选择性的,或对于MASP-1和MASP-3是选择性的。

[0343] ii.抑制LEA-2活化的组合物

如本文所述,LEA-2-介导的补体活化是MASP-2-依赖性的,导致调理作用和/或细胞溶解。因此,在特异性地抑制LEA-2凝集素-依赖性补体系统的治疗药的开发中作为目标的优选蛋白成分是MASP-2。若干蛋白质已证明通过蛋白与蛋白相互作用而结合到或干扰MASP-2。例如,MASP-2已知结合到凝集素蛋白质MBL、H-纤维胶凝蛋白和L-纤维胶凝蛋白和胶原凝集素-11上,并与之形成钙-依赖性复合物。Ma Y.,等人,J Innate Immun.Epub Dec 4(2012)。每种MASP-2/凝集素复合物都已证明通过蛋白质C4和C2的MASP-2-依赖性切割而活化补体(Ikeda,K.,等人,J.Biol.Chem.262:7451-7454,(1987);Matsushita,M.,等人,J.Exp.Med.176:1497-2284,(2000);Matsushita,M.,等人,J.Immunol.168:3502-3506,(2002))。研究已经表明MASP-2的CUB1-EGF结构域对于MASP-2与MBL缔合是必不可少的(Thielens,N.M.,等人,J.Immunol.166:5068,(2001))。还已证明CUB1EGFCUBII结构域介导MASP-2的二聚化,这是形成活性MBL复合物所必需的(Wallis,R.,等人,J.Biol.Chem.275:30962-30969,2000)。因此,可以鉴定MASP-2抑制剂,其结合到或干扰已知对MASP-2-依赖性补体活化具有重要性的MASP-2靶区。

[0344] 依据前述,一方面,本发明提供在患有选自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病的疾病或病症或处于发展所述疾病或病症风险中的受试者中抑制LEA-2-介导的补体活化的不良反应的方法,包括给予所述受试者药物组合物,所述药物组合物包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的一定量的MASP-2抑制剂和药学上可接受的载体。

[0345] 在一些实施方案中,本发明提供在患有选自以下的疾病或病症或处于发展所述疾病或病症风险中的受试者中抑制LEA-2-介导的补体活化的不良反应的方法:致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病,所述方法包括给予受试者药物组合物,所述药物组合物包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的一定量的MASP-2抑制剂和药学上可接受的载体。在患有PNH、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎或贝切特氏病或处于发展所述疾病风险中的活的受试者中以有效抑制MASP-2-依赖性LEA-2的量给予MASP-2抑制剂。

[0346] 在本发明该方面的实践中,代表性的MASP-2抑制剂包括:抑制MASP-2生物活性的分子(例如小分子抑制剂、MASP-2抗体、或与MASP-2相互作用或干扰蛋白-蛋白相互作用的阻断肽)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),从而阻止MASP-2以免活化LEA-2。

[0347] MASP-2抑制剂可以有效地阻断MASP-2蛋白与蛋白相互作用,干扰MASP-2二聚化或

装配,阻断Ca^{++}结合,干扰MASP-2丝氨酸蛋白酶活性位点,或可以降低MASP-2蛋白表达,从而阻止MASP-2以免活化LEA-2。MASP-2抑制剂可以单独用作主要治疗,或作为辅助治疗与其它治疗药联用以增强其它药物治疗的治疗益处,如本文进一步所述。

[0348] 在一个实施方案中,所述MASP-2抑制剂特异性地结合到MASP-2(SEQ ID NO:5)的一部分上,其结合亲和性比补体系统的其它抗原高至少10倍。在另一个实施方案中,所述MASP-2抑制剂特异性地结合到MASP-2(SEQ ID NO:5)的一部分上,其结合亲和性比补体系统的其它抗原高至少100倍。在一个实施方案中,所述MASP-2抑制剂特异性地结合到以下的至少一个上:(i)CCP1-CCP2结构域(SEQ ID NO:5的aa 300-431)或MASP-2的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:5的aa 445-682),并抑制MASP-2-依赖性补体活化,前提条件是所述抑制剂不结合MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10),并且它不结合MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:8)。在一个实施方案中,所述MASP-2抑制剂是MASP-2单克隆抗体或其片段,其特异性地结合到MASP-2上。

[0349] 所述MASP-2抑制剂的结合亲和性可以使用合适的结合测定法来检测。

[0350] 对MASP-2-依赖性补体活化的抑制特征在于作为按照本发明方法给予MASP-2抑制剂的结果而发生的补体系统的成分的以下变化中的至少一项:抑制MASP-2-依赖性补体-活化-系统产物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9(MAC)的产生或生产(例如如美国专利号7,919,094的实施例2中所述而测定),减少C4切割和C4b沉积(例如如实施例8或实施例9中所述而测定),或减少C3切割和C3b沉积(例如如实施例11中所述而测定)。

[0351] 在某些实施方案中,所述MASP-2抑制剂选择性地抑制MASP-2补体活化(即LEA-2),而留下功能完整的C1q-依赖性补体活化系统。

[0352] 在某些实施方案中,所述MASP-2抑制剂是抗体或其片段,包括MASP-2抗体和其MASP-2结合片段、天然的和合成的肽、或小分子。在某些实施方案中,所述MASP-2抑制剂是小分子蛋白酶抑制剂,其对于MASP-2是选择性的。

[0353] iii.抑制LEA-1-介导的补体活化和LEA-2-介导的补体活化的组合物另一方面,本发明提供在患有选自以下的疾病或病症或处于发展所述疾病或病症风险中的受试者中抑制LEA-1的不良作用和抑制LEA-2的不良作用的方法:阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病,所述方法包括给予所述受试者组合物,所述组合物包含有效抑制MASP-3-依赖性补体活化的一定量的MASP-1抑制剂和/或MASP-3抑制剂中的至少一种。

[0354] 在一个实施方案中,所述组合物包含MASP-1抑制剂。在一个实施方案中,所述MASP-1抑制剂抑制MASP-3-介导的补体活化并且还抑制MASP-2-介导的补体活化。

[0355] 在一个实施方案中,所述组合物包含MASP-3抑制剂。在一个实施方案中,所述MASP-3抑制剂抑制以下至少一个:因子B的凝集素MASP-3-依赖性活化;因子D的凝集素MASP-3-依赖性活化;因子B的MASP-3-依赖性的、凝集素-非依赖性活化;和/或因子D的MASP-3-依赖性的、凝集素-非依赖性的活化。

[0356] 在一个实施方案中,所述组合物包含MASP-1抑制剂和MASP-3抑制剂。

[0357] 在某些实施方案中,所述方法进一步包括给予所述受试者组合物,所述组合物包含MASP-2抑制剂。

[0358] 在另一个实施方案中,本发明的该方面包括给予患有PNH的受试者药物组合物,所述药物组合物包含有效抑制MASP-2-依赖性补体活化的一定量的MASP-2抑制剂和有效抑制MASP-3-依赖性补体活化的一定量的MASP-3抑制剂和药学上可接受的载体。

[0359] 在某些实施方案中,所述组合物包含抑制LEA-1和LEA-2两者的单一试剂(即双重MASP-2/MASP-3抑制剂、双重MASP-1/MASP-2抑制剂、双特异性MASP-2/MASP-3抑制剂、双特异性MASP-1/MASP-2抑制剂、或泛-MASP-1/2/3抑制剂或三特异性MASP-1/2/3抑制剂)。在某些实施方案中,所述组合物包含LEA-1和LEA-2抑制剂的组合,例如,双重抑制剂加单一抑制剂的组合,双特异性抑制剂加单一抑制剂的组合,或本文所述的MASP-1、MASP-2和/或MASP-3抑制剂的任意组合,其组合抑制LEA-1和LEA-2两者,如本文进一步描述。

[0360] 在一个实施方案中,本发明提供抑制LEA-1和LEA-2两者的药物组合物,其包含至少一种MASP-3抑制剂和至少一种MASP-2抑制剂和药学上可接受的载体。在一个实施方案中,所述药物组合物包含第一分子和第二分子的组合,所述第一分子是MASP-3抑制剂,所述第二分子是MASP-2抑制剂。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含单一分子实体,其包括作为MASP-3抑制剂的活性和作为MASP-2抑制剂的活性(即抑制MASP-2-介导的LEA-2活化和MASP-3-介导的LEA-1活化两者的抑制剂)。在一个实施方案中,所述抑制剂是MASP-2/MASP-3双重抑制剂,其结合到在MASP-2(SEQ ID NO:5)和MASP-3(SEQ ID NO:8)之间保守的氨基酸区内的表位上,所述区例如丝氨酸蛋白酶结构域,例如β链的N-末端区(例如SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:8的β链的N-末端区的前150aa),如图4、6和7C所示。在一个实施方案中,所述抑制剂是双特异性抑制剂,例如双特异性单克隆抗体,其特异性地结合到MASP-2蛋白(SEQ ID NO:5)上的表位和MASP-3蛋白(SEQ ID NO:8)上的表位上。在某些实施方案中,所述抑制剂是双特异性单克隆抗体,其结合到MASP-2的CCP1-CCP2结构域(SEQ ID NO:5的aa 300-431)或MASP-2的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:5的aa 445-682)的至少一个上并且还结合到MASP-3的丝氨酸蛋白酶(SEQ ID NO:8的aa 450-711)中的表位上。

[0361] 在另一个实施方案中,本发明提供抑制LEA-1和LEA-2两者的组合物,其包含抑制MASP-2-介导的LEA-2活化和MASP-3的MASP-1-介导的活化从而抑制MASP-3-介导的LEA-1活化两者的抑制剂(和任选地还抑制MASP-1-介导的因子D成熟)。在一个实施方案中,所述抑制剂是MASP-1/MASP-2双重抑制剂,其结合到在MASP-1(SEQ ID NO:10)和MASP-2(SEQ ID NO:5)之间保守的氨基酸区内的表位上,所述区例如丝氨酸蛋白酶结构域,如图4、6和7A所示。在一个实施方案中,所述抑制剂是双特异性抑制剂,例如双特异性单克隆抗体,其特异性地结合到MASP-1蛋白(SEQ ID NO:10)的表位上和MASP-2蛋白(SEQ ID NO:5)的表位上。在某些实施方案中,所述抑制剂是双特异性单克隆抗体,其结合到MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10的aa 449-694)并且还结合到MASP-2的CCP1-CCP2结构域(SEQ ID NO:5的aa 300-431)或MASP-2的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:5的aa 445-682)的至少一个上。

[0362] 在另一个实施方案中,本发明提供抑制LEA-1和LEA-2两者的组合物,其包含抑制MASP-2-介导的LEA-2活化、通过直接结合到MASP-3上而抑制MASP-3-介导的LEA-1活化、并且还抑制MASP-3的MASP-1-介导的活化从而抑制MASP-3-介导的LEA-1活化的抑制剂(和任

选地还抑制MASP-1-介导的因子D成熟)。在一个实施方案中,所述抑制剂是泛-MASP抑制剂,其结合到在MASP-1(SEQ ID NO:10)、MASP-2(SEQ ID NO:5)和MASP-3(SEQ ID NO:8)之间保守的氨基酸区,例如在CUBI-EGF-CUB2结构域中的保守区,如图4和5所示。如图4和5所示,在CUBI-EGF-CUBII结构域中存在MASP-1、MASP-2和MASP-3之间共有的多个同一性补位,从而允许产生泛特异性MASP抗体。在某些实施方案中,所述泛特异性MASP抗体可以结合到MASP-1的CUB2结构域(SEQ ID NO:10的aa185-296)、MASP-2的CUB2结构域(SEQ ID NO:5的aa 184-295)和MASP-3的CUB2结构域(SEQ ID NO:8的aa 185-296)内的表位上。要注意的是,结合到MASP-1、MASP-2和MASP-3的CUBI-EGF上的泛特异性MASP抑制剂还会结合到MAp19和MAp44上,因此这类抑制剂的有效治疗剂量将被调节到更高水平以补偿这类结合。还要注意的是,结合到MASP-1、MASP-2和MASP-3的CUBII结构域上的泛特异性MASP抑制剂也会结合到MAp44上,因此这类抑制剂的有效治疗剂量将被调节到更高水平以补偿这类结合。

[0363] 在一个实施方案中,所述抑制剂是三特异性MASP-1/2/3抑制剂,其结合到MASP-1蛋白(SEQ ID NO:10)上的表位上、MASP-2蛋白(SEQ ID NO:5)上的表位上和MASP-3蛋白(SEQ ID NO:8)上的表位上。在某些实施方案中,所述抑制剂是三特异性单克隆抗体,其结合到MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10的aa 449-694)上,结合到MASP-2的CCP1-CCP2结构域(SEQ ID NO:5的aa 300-431)或MASP-2的丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:5的aa 445-682)中的至少一个上,并且还结合到MASP-3丝氨酸蛋白酶(SEQ ID NO:8的aa 450-711)中的表位上。

[0364] 抑制LEA-1、LEA-2或LEA-1和LEA-2的示例性的抑制剂描述于下表2。

[0365] 表2:MASP抑制剂

MASP抑制剂类型	抑制剂结合结构域	交叉反应性*	抑制活性的测定法	治疗用途
MASP-3特异性	MASP-3丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:8的aa 450-711)	结合到MASP-3上；不结合MASP-1；MASP-2；MAp44或MAp19	抑制MASP-3丝氨酸蛋白酶底物-特异性切割；LEA-1抑制，测定因子D活化的抑制；人血清抑制非-人RBC溶血	抑制LEA-1-介导的补体活化(抑制细胞溶解和调理作用)
MASP-2特异性	MASP-2 CCP1-CCP2结构域(SEQ ID NO:5的aa 300-431)；或MASP-2丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:5的aa 445-682)	结合到MASP-2；不结合MASP-1；MASP-3；MAP19或MAp44	抑制MASP-2-特异性蛋白酶底物-特异性切割，LEA-2抑制	抑制LEA-2-介导的补体活化(抑制调理作用和/或细胞溶解)
MASP-1特异性	MASP-1丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10的aa449-694)	结合到MASP-1；不结合MASP-2、MASP-3、MAp44或MAp19	抑制MASP-1-特异性蛋白酶底物-特异性切割；LEA-1和LEA2抑制，抑制因子D活化的测定法；在补充有前因子D的因子D耗尽	抑制LEA-1和LEA-2介导的补体活化(抑制细胞溶解和/或调理作用)

			的血清中 AP-1 活性恢复的测定法	
MASP-2/MASP-3 双重抑制剂 (一个抗体结合到保守区)	在 MASP-2 和 MASP-3 之间保守的丝氨酸蛋白酶结构域区，尤其是β链的 N-末端区(前 150aa)	结合到 MASP-2 和 MASP-3；不结合 MASP-1、MAp44 或 MAp19	测定 MASP-2-和 MASP-3 蛋白酶底物-特异性切割，抑制 LEA-1 和 LEA-2	抑制 LEA-1 和 LEA-2-介导的补体活化 (抑制细胞溶解和/或调理作用)
不包括 MAp44 的 MASP-1/3 双重抑制剂	MASP-1/3 CCP2 结构域(SEQ ID NO:10 的 aa 367-432)	结合 MASP-1 和 MASP-3；不结合 MAp44、MASP-2 或 MAp19	测定 MASP-3 和 MASP-1 蛋白酶底物-特异性切割和抑制因子 D 活化，LEA-1 和 LEA-2 抑制	抑制 LEA-1-和 LEA-2-介导的补体活化 (抑制细胞溶解和/或调理作用)
包括 MAp44 的 MASP-1/3 双重抑制剂	MASP-1/3 CUBI-CCP1 结构域 (aa25-363 of SEQ ID NO:10)	结合 MASP-1、MASP-3 和 MAp44; 不结合 MASP-2 或 MAp19	测定 MASP-3 和 MASP-1 蛋白酶底物-特异性切割和抑制因子 D 活化，LEA-1 和 LEA-2 抑制	抑制 LEA-1-和 LEA-2-介导的补体活化 (抑制细胞溶解和/或调

				理作用)
MASP-1/2 双重抑制剂	在 MASP-1 和 MASP-2 之间保守的丝氨酸蛋白酶结构域区	结合 MASP-1 和 MASP-2；不结合 MASP-3、MAp19 或 MAp44	测定 MASP-1 和 MASP-2 丝氨酸蛋白酶底物-特异性切割的抑制；LEA-1 和 LEA-2 抑制	抑制 LEA-1-和 LEA-2-介导的补体活化(抑制细胞溶解和/或调理作用)
MASP-1/2/3 泛抑制剂	CUB1-EGF-CUB2 的保守区，尤其是 CUB2 结构域(共同的相互作用位点)	除了 MASP-1/2/3 结合到 MAp44，和可能结合到 Map19	测定 MASP-1-、MASP-2- 和 MASP-3- 特异性蛋白酶底物-特异性切割和抑制因子 D 活化；抑制 LEA-1 和 LEA-2	抑制 LEA-1-和 LEA-2-介导的补体活化(抑制细胞溶解和/或调理作用)

MASP-2/MASP-3 双特异性抑制剂	MASP-2-特异性结合到CCP1-CCP2 (SEQ ID NO:5 的 aa 300-431); 或 MASP-2 丝氨酸蛋白酶结构域 (SEQ ID NO:5 的 aa 445-682) 和 MASP-3-特异性结合到丝氨酸蛋白酶结构域 (SEQ ID NO:8 的 aa 450-711)	结合 MASP-2 和 MASP-3; 不结合 MASP-1、MAp44 或 MAp19	测定 MASP-2-和 MASP-3-特异性蛋白酶底物-特异性切割, 抑制 LEA-1 和 LEA-2	抑制 LEA-1-和 LEA-2-介导的补体活化 (抑制细胞溶解和/或调理作用)
MASP-1/MASP-2 双特异性抑制剂	MASP-1 丝氨酸蛋白酶结构域 (SEQ ID NO:10 的 aa449-694)和 MASP-2-特异性结合到 CCP1-CCP2 (SEQ ID NO:5 的 aa 300-431); 或 MASP-2 丝氨酸蛋白酶结构域 (SEQ ID NO:5 的 aa 445-682)	结合到 MASP-1 和 MASP-2; 不结合 MASP-3、MAp19 或 MAp44	测定 MASP-1-和 MASP-2-特异性丝氨酸蛋白酶底物-特异性切割的抑制; LEA-1 和 LEA-2 抑制	抑制 LEA-1-和 LEA-2-介导的补体活化 (抑制细胞溶解和/或调理作用)
MASP	MASP-1 丝氨酸	结合到	测定 MASP-1 和	抑制

-1/MASP-3 双特异性	蛋白酶结构域(SEQ ID NO:10的aa449-694)和MASP-3-特异性结合到丝氨酸蛋白酶结构域(SEQ ID NO:8的aa450-711)	MASP-1和MASP-3;不结合MASP-2、MAp44或MAp19	MASP-3-蛋白酶底物-特异性切割和抑制因子D活化,LEA-1和LEA-2抑制	LEA-1-和LEA-2-介导的补体活化(抑制细胞溶解和/或调理作用)
MASP-1/MASP-2/MASP-3 三特异性	MASP-1丝氨酸蛋白酶结构域,MASP-2丝氨酸蛋白酶结构域或CCP-CCP2结构域和MASP-3丝氨酸蛋白酶结构域	结合到MASP-1和MASP-2和MASP-3;不结合MAp19或MAp44	测定MASP-1-、MASP-2-和MASP-3-蛋白酶底物-特异性切割和抑制因子D活化,抑制LEA-1和LEA-2	抑制LEA-1-和LEA-2-介导的补体活化(抑制细胞溶解和/或调理作用)

*对于表2中给出的交叉反应性一栏,指定的MASP抑制剂结合到抑制剂结合结构域上,其结合亲和性比列为"不"结合的其它补体成分(即多肽或其片段)高至少10倍(例如至少20倍、至少50倍或至少100倍)。

[0366] 在某些实施方案中,所述组合物包含LEA-1和LEA-2的抑制剂的组合,例如如上所述和表2所示的单一抑制剂的组合。例如,在一个实施方案中,所述组合物包含MASP-1抗体和MASP-2抗体的组合。在一个实施方案中,所述组合物包含MASP-1抗体和MASP-3抗体的组合。在一个实施方案中,所述组合物包含MASP-2抗体和MASP-3抗体的组合。在一个实施方案中,所述组合物包含MASP-1和MASP-2和MASP-3抗体的组合。在某些实施方案中,本发明的方法包括给予单一组合物,所述组合物包含抑制剂的组合。在其它实施方案中,本发明的方法包括共同给予分开的组合物。

[0367] 在某些实施方案中,所述组合物包含双重抑制剂加单一抑制剂(即MASP-2/3双重抑制剂加MASP-1抑制剂;MASP-1/3双重抑制剂加MASP-2抑制剂;或MASP-1/2双重抑制剂加MASP-3抑制剂)的组合。在其它实施方案中,本发明的方法包括共同给予分开的组合物,所述组合物包含双重抑制剂和单一抑制剂。

[0368] 在某些实施方案中,所述组合物包含双特异性抑制剂加单一抑制剂(即MASP-2/3双特异性抑制剂加MASP-1抑制剂;MASP-1/3双特异性抑制剂加MASP-2抑制剂;或MASP-1/2

双特异性抑制剂加MASP-3抑制剂)的组合。在其它实施方案中,本发明的方法包括共同给予分开的组合物,所述组合物包含双特异性抑制剂和单一抑制剂。

[0369] 依据本发明的不同实施方案,要注意的是,与必须定位到作用位点的C5抗体相比,MASP-3抑制剂和/或MASP-2抑制剂和/或MASP-1抑制剂将用于从血浆中清除靶蛋白。

[0370] MASP抗体

在本发明的该方面的某些实施方案中,MASP抑制剂包含MASP抗体(例如MASP-1、MASP-2或MASP-3的抗体),其抑制LEA-1和/或LEA-2补体活化途径的至少一个。用于本发明该方面的MASP抗体包括得自产生抗体的任何哺乳动物的多克隆抗体、单克隆抗体或重组抗体并且可以是多特异性抗体(如双特异性或三特异性抗体)、嵌合抗体、人源化抗体、完整人抗体、抗独特型抗体和抗体片段。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。

[0371] 可以使用本文所述的测定法,筛选MASP抗体抑制LEA-1或LEA-2-依赖性补体活化系统的能力。在文献中已经描述了若干MASP-1、MASP-2和MASP-3的抗体,有些是新产生的,它们中的一些列于下表3。可以使用本文所述的测定法,筛选这些示例性的MASP抗体抑制LEA-1-和/或LEA-2-依赖性补体活化系统的能力。例如,如本文的实施例11-13中所述,已经鉴定了抗大鼠MASP-2Fab2抗体,其阻断MASP-2-依赖性补体活化。进一步如实施例14所述,已经鉴定了完整人MASP-2scFv抗体,其阻断MASP-2-依赖性补体活化。进一步如实施例15所述,已经产生了MASP-3抗体。一旦鉴定出作为LEA-1或LEA-2的抑制剂起作用的MASP抗体,它可用于本文所述的药物组合物,并且它还可用于产生双特异性和三特异性抑制剂,如表2所示和本文进一步所述(参见例如实施例8)。

[0372] 表3:MASP-1、MASP-2和MASP-3的特异性抗体

靶	抗原	抗体类型	参考文献
MASP-2	重组 MASP-2	大鼠多克隆	Peterson, S.V.,等人, *Mol. Immunol.* 37:803-811, 2000
MASP-2	重组人 CCP1/2-SP 片段 (MoAb 8B5)	大鼠 MoAb (亚类 IgG1)	Moller-Kristensen, M., 等人, *J. of Immunol. Methods* 282:159-167, 2003
MASP-2	重组人 MAp19 (MoAb 6G12) (与 MASP-2 交叉反应)	大鼠 MoAb (亚类 IgG1)	Moller-Kristensen, M., 等人, *J. of Immunol. Methods* 282:159-167, 2003
MASP-2	hMASP-2	小鼠 MoAb (S/P) 小鼠 MoAb (N-term)	Peterson, S.V.,等人, *Mol. Immunol.* 35:409, April 1998
MASP-2	hMASP-2 (CCP1-CCP2-SP 结构域	大鼠 MoAb : Nimoab101，由杂交瘤细胞系 03050904 (ECACC)产生	WO 2004/106384

靶	抗原	抗体类型	参考文献
MASP-2	hMASP-2 (全长 his-标签)	鼠 MoAbs: NimoAb104，由杂交瘤细胞系 M0545YM035 (DSMZ)产生，NimoAb108，由杂交瘤细胞系 M0545YM029 (DSMZ)产生，NimoAb109，由杂交瘤细胞系 M0545YM046 (DSMZ)产生 NimoAb110，由杂交瘤细胞系 M0545YM048 (DSMZ)产生	WO 2004/106384
MASP-2	大鼠 MASP-2 (全长)	MASP-2 Fab2 抗体片段	实施例 11-12
MASP-2	hMASP-2 (全长)	全长人 scFv 克隆	实施例 14
MASP-1	hMASP-1 (全长)	小鼠 MoAbs: MoaAbs1E2 和 2B11，由杂交瘤系 1E2 和 2B11 产生(不与 MASP-2 交叉反应)。这两种 ab 识别 MASP-1 和 MASP-3 两者共有的重链	Terai I.等人，*Clin Exp Immunol* 110:317-323 (1997); MoAb1E2：购自 Hycult Biotech Cat#HM2092 MoAb2B11：购自 Hycult Biotech: Cat#HM2093

靶	抗原	抗体类型	参考文献
MASP-1	hMASP-1 (全长)	小鼠 MoAb 4C2	Endo M. 等人, *Nephrol Dial Transplant* 13:1984-1990 (1998)
MASP-1	hMASP-1 (全长)	MASP-1 鸡 ab	实施例 15
MASP-3	hMASP-3 (全长)	小鼠 MoAb: MoAb-7D8 ; MoAb-7B7 ; MoAb-8B3 ; 和 MoAb-5H3 MoAb-7D8 和 mAb-5H3 是 MASP-3-特异性的, 其它与 MASP-1 交叉反应	Skjoedt 等人, *Immunobiology* 215(11):921-31 (2010)
MASP-3	hMASP-3 (全长)	大鼠 MoAb 38:12-3, 不识别 MASP-1	Moller-Kristensen 等人, *Int Immunol* 19:141 (2007); 购自 Hycult Biotech: Cat #HM2216
MASP-3	hMASP-3 (全长)	MASP-3 鸡 ab	实施例 15

i.效应物功能降低的MASP抗体

在本发明该方面的某些实施方案中,为了减少可由经典补体途径活化所致的炎症,本文所述的MASP抗体降低了效应物功能。IgG分子触发经典补体途径的能力已被证明是在分子的Fc部分内(Duncan,A.R.,等人,Nature332:738-740(1988))。分子的Fc部分被酶切割除去的IgG分子缺乏这种效应物功能(参见Harlow,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1988)。因此,通过具有使效应物功能减到最低的遗传改造Fc序列,或者成为人IgG2或IgG4同种型,由于缺少分子的Fc部分,可产生效应物功能降低的抗体。

[0373] 可对IgG重链的Fc部分进行标准分子生物学操作来产生效应物功能降低的抗体,如Jolliffe等人,Int'l Rev.Immunol.10:241-250,(1993)和Rodrigues等人,J.Immunol.151:6954-6961,(1998)中所述。效应物功能降低的抗体还包括人IgG2和IgG4同

种型,其活化补体和/或与Fc受体相互作用的能力降低(Ravetch,J.V.,等人,Annu.Rev.Immunol.9:457-492,(1991);Isaacs,J.D.,等人,J.Immunol.148:3062-3071,1992;van de Winkel,J.G.,等人,Immunol.Today14:215-221,(1993))。包含IgG2或IgG4同种型的人MASP-1、MASP-2或MASP-3特异性的人源化或全长人抗体(包括双重、泛、双特异性或三特异性抗体)可以通过本领域普通技术人员已知的若干方法之一来产生,如Vaughan,T.J.,等人,Nature Biotechnical 16:535-539,(1998)所述。

[0374] ii.MASP抗体的产生

使用MASP-1、MASP-2或MASP-3多肽(例如全长MASP-1、MASP-1或MASP-3)或使用携带抗原性MASP-1、2或3表位的肽(例如MASP-2多肽的一部分),可以产生MASP-1、MASP-2或MASP-3的抗体。免疫原性肽可以少至5个氨基酸残基。例如,可以使用包括SEQ ID NO:5全部氨基酸序列的MASP-2多肽来诱导用于本发明方法的MASP-2抗体。使用本领域众所周知的方法,可以将已知参与蛋白-蛋白相互作用的特定MASP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,例如表2所给出的)表达为重组多肽并用作抗原。另外,包含MASP-1多肽(SEQ ID NO:10)或MASP-2多肽(SEQ ID NO:5)或MASP-3多肽(SEQ ID NO:8)的至少6个氨基酸的部分的肽也分别用于诱导MASP-1、MASP-2或MASP-3的抗体。用于产生抗体的MASP肽和多肽可作为天然多肽、或者重组肽或合成肽以及无催化活性的重组多肽而被分离。用于产生抗MASP抗体的抗原还包括融合多肽,例如MASP多肽或其部分与免疫球蛋白多肽或者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部分。如果多肽部分是半抗原样的,则所述部分可有利地结合或连接到大分子载体(例如匙孔虫戚血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)或破伤风类毒素)上用于免疫。

[0375] iii.多克隆抗体

可通过使用本领域普通技术人员熟知的方法,用MASP-1、MASP-2或MASP-3多肽或其免疫原性部分免疫动物来制备抗MASP-1、MASP-2或MASP-3的多克隆抗体。参见例如,Green等人,"Production of Polyclonal Anti sera,"载于Immunochemical Protocols(Manson编辑)。可通过使用佐剂来增加MASP多肽的免疫原性,所述佐剂包括无机凝胶(例如氢氧化铝)或弗氏佐剂(完全或不完全)、表面活性剂(例如溶血卵磷脂)、普卢兰尼克多元醇(pluronic polyol)、聚阴离子、油乳液、KLH和二硝基苯酚。多克隆抗体一般由例如马、牛、狗、鸡、大鼠、小鼠、兔、豚鼠、山羊或绵羊等动物产生。或者,用于本发明的MASP抗体也可得自近似人类的灵长类。在狒狒中产生诊断用和治疗用抗体的通用技术可参见例如Goldenberg等人,国际专利公布号WO 91/11465,和Losman,M.J.,等人,Int.J.Cancer 46:310,(1990)。然后采用本领域众所周知的标准方法,从这些被免疫过的动物的血液中获得含有免疫活性抗体的血清。

[0376] iv.单克隆抗体

在某些实施方案中,LEA-2抑制剂是MASP-2单克隆抗体和/或LEA-1抑制剂是MASP-3单克隆抗体或MASP-1单克隆抗体。如上所述,在某些实施方案中,MASP-1、MASP-2和MASP-3的单克隆抗体是高度特异性的,针对单一MASP-1、MASP-2或MASP-3表位。本文所用的修饰语"单克隆"是指获自基本同源的抗体群的抗体性质,不理解为需要通过任何特定方法来产生抗体。可采用通过培养物中的连续细胞系以提供抗体分子产生的任何技术来获得单克隆抗体,例如Kohler,G.,等人,Nature256:495,(1975)中所述的杂交瘤方法,或者可以通过重组

DNA方法制备单克隆抗体(参见例如Cabilly的美国专利号4,816,567)。还可以采用Clackson,T.,等人,Nature 352:624-628,(1991)和Marks,J.D.,等人,J.Mol.Biol.222:581-597,(1991)中所述的技术,从噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体。这些抗体可以具有任何免疫球蛋白类别,包括IgG、IgM、IgE、IgA、IgD及其任何亚类。

[0377] 例如,可通过将包含MASP-1多肽、MASP-2多肽或MASP-3多肽或其部分的组合物注射给合适的哺乳动物(例如BALB/c小鼠)而获得单克隆抗体。在预定时间之后,从小鼠中取出脾细胞,使之悬浮于细胞培养基中。然后将脾细胞与无限增殖细胞系融合形成杂交瘤。将形成的杂交瘤在细胞培养基中培养,对它们产生抗MASP-1、MASP-2或MASP-3的单克隆抗体的能力进行筛选。(另见Current Protocols in Immunology,第1卷,John Wiley&Sons,第2.5.1-2.6.7页,1991.)。

[0378] 可通过使用转基因小鼠来获得人单克隆抗体,所述转基因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。在这种技术中,将人免疫球蛋白重链和轻链基因座元件引入得自胚胎干细胞系的小鼠品系中,所述胚胎干细胞系含有被定向破坏的内源免疫球蛋白重链和轻链基因座。该转基因小鼠可合成对人抗原(例如本文所述MASP-2抗原)特异性的人抗体,可使用该小鼠来产生分泌人MASP-2抗体的杂交瘤,具体方法是通过采用常规Kohler-Milstein技术,将来自所述动物的B细胞与合适的骨髓瘤细胞系融合。自转基因小鼠获得人抗体的方法例如描述于Green,L.L.,等人,Nature Genet.7:13,1994;Lonberg,N.,等人,Nature368:856,1994;和Taylor,L.D.,等人,Int.Immun.6:579,1994。

[0379] 可通过各种已确立的技术从杂交瘤培养物中分离和纯化单克隆抗体。这些分离技术包括用A蛋白琼脂糖凝胶的亲和色谱、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等人,"Purification of Immunoglobulin G(IgG),"载于Methods in MolecularBiology,The HumanaPress,Inc.,第10卷,第79-104页,1992)。

[0380] 多克隆抗体、单克隆抗体或得自噬菌体的抗体一旦产生后,首先要测试其对MASP-1、MASP-2或MASP-3结合的特异性,或者如有需要,测试其对双重MASP-1/3、MASP-2/3或MASP-1/2结合的特异性。测定抗体是否结合到蛋白抗原上和/或抗体对蛋白抗原的亲和性的方法是本领域已知的。例如,可使用各种技术来测定和/或定量测定抗体与蛋白抗原的结合,所述技术例如但不限于蛋白质印迹、斑点印迹、等离子体表面共振方法(例如BIAcore系统;Pharmacia Biosensor AB,Uppsala,Sweden和Piscataway,NJ)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)。参见例如Harlow和Lane(1988)"Antibodies:ALaboratory Manual"Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Benny K.C.Lo(2004)"Antibody Engineering:Methods and Protocols,"Humana Press(ISBN:1588290921);Borrebaek(1992)"Antibody Engineering,A Practical Guide,"W.H.Freeman and Co.,NY;Borrebaek(1995)"Antibody Engineering,"第2版,Oxford University Press,NY,Oxford;Johne等人(1993),Immunol.Meth.160:191-198;Jonsson等人(1993)Ann.Biol.Clin.51:19-26;和Jonsson等人(1991)Biotechniques 11:620-627。另见美国专利号6,355,245。

[0381] 本领域普通技术人员可以容易地测定MASP单克隆抗体的亲和性(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

MASP-1、MASP-2或MASP-3的单克隆抗体与MASP-1、MASP-2或MASP-3结合,其结合亲和性<100nM,优选地<10nM和最优选地<2nM。

[0382] 一旦特异性地结合到MASP-1、MASP-2或MASP-3上的抗体被鉴定后,在若干功能测定法之一中测试MASP-1、MASP-2或MASP-3的抗体作为LEA-1抑制剂或LEA-2抑制剂的能力,例如如表2所述。例如,在若干功能测定法之一中测试经鉴定特异性地结合到MASP-2上的抗体作为LEA-2抑制剂的能力,例如如表2所述(例如,凝集素-特异性C4切割测定法(例如实施例8或实施例9中所述的测定法),或C3b沉积测定法(例如实施例4或实施例11中所述的测定法))。作为再一个实例,在若干功能测定法之一中测试经鉴定特异性地结合到MASP-1或MASP-3上的抗体作为LEA-1抑制剂的能力,例如如表2所述(例如溶血的减少(例如如实施例5中所述而测定)或C3切割和C3b沉积的减少(例如如实施例4和实施例11中所述而测定))。

[0383] v.嵌合/人源化抗体

用于本发明方法的单克隆抗体包括嵌合抗体以及这些抗体的片段,其中重链和/或轻链的一部分与得自特定物种的抗体的相应序列相同或同源,或者属于特定抗体类别或亚类,而链的其余部分与得自另一物种的抗体的相应序列相同或同源,或者属于另一抗体类别或亚类(Cabilly的美国专利号4,816,567;和Morrison,S.L.,等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 81:6851-6855,(1984))。

[0384] 用于本发明的一种形式的嵌合抗体是人源化单克隆MASP-1、MASP-2或MASP-3抗体。非人(例如鼠)抗体的人源化形式是嵌合抗体,其含有得自非人免疫球蛋白的最小序列。通过将非人(例如小鼠)互补决定区(CDR)从小鼠免疫球蛋白的可变重链和可变轻链转移到人可变结构域,从而产生人源化单克隆抗体。然后,典型的做法是将人抗体的其余部分代入非人对应部分的构架区。此外,人源化抗体可包括受体抗体或供体抗体中不存在的残基。这些修饰被用来进一步改进抗体性能。一般而言,人源化抗体将包含至少一种、通常两种可变结构域的基本全部,其中所有或基本上所有的超变环都对应于非人免疫球蛋白的超变环,所有或基本上所有的Fv构架区都是人免疫球蛋白序列的Fv构架区。人源化抗体任选还包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常为人免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分。更多详情可参见Jones,P.T.,等人,Nature 321:522-525,(1986);Reichmann,L.,等人,Nature 332:323-329,(1988);和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596,(1992)。

[0385] 用于本发明的人源化抗体包括至少含有MASP-1、MASP-2或MASP-3结合CDR3区的人单克隆抗体。此外,可以替换Fc部分以便产生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效用,因为它们特异性地识别人MASP-1、MASP-2或MASP-3,但是却不会引起人体对抗体本身的免疫应答。因此它们更适用于人体的体内给药,尤其是必须重复或长期给药的时候。

[0386] 产生人源化单克隆抗体的技术还描述于例如Jones,P.T.,等人,Nature 321:522,(1986);Carter,P.,等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 89:4285,(1992);Sandhu,J.S.,Crit.Rev.Biotech.12:437,(1992);Singer,I.I.,等人,J.Immun.150:2844,(1993);Sudhir(编著),Antibody Engineering Protocols,Humana Press,Inc.,(1995);Kelley,"Engineering Therapeutic Antibodies,"载于Protein Engineering:Principles andPractice,Cleland等人(编著),John Wiley&Sons,Inc.,第399-434页,(1996);和Queen的美国专利号5,693,762,1997。此外,还有从特定鼠抗体区合成人源化抗体的商业公司,例

如Protein Design Labs(Mountain View,CA)。

[0387] vi.重组抗体

还可使用重组方法制备MASP-1、MASP-2或MASP-3的抗体。例如,可使用人免疫球蛋白表达文库(可获自例如Stratagene,Corp.,La Jolla,CA)来制备人抗体,以产生人抗体片段(VH、VL、Fv、因子D、Fab或F(ab')2)。然后使用类似于产生嵌合抗体的技术,将这些片段用以构建完整的人抗体。

[0388] vii.抗独特型抗体

一旦鉴定出具有所需抑制活性的MASP-1、MASP-2或MASP-3的抗体,便可采用本领域众所周知的技术将这些抗体用来产生类似于MASP-1、MASP-2或MASP-3的一部分的抗独特型抗体。参见例如Greenspan,N.S.等,FASEB J.7:437,(1993)。例如,结合MASP-2并竞争性抑制补体活化所需的MASP-2蛋白的相互作用的抗体可用来产生类似于MASP-2蛋白上的MBL结合位点的抗独特型抗体,从而结合并中和MASP-2的结合配体,例如MBL。

[0389] viii.免疫球蛋白片段

用于本发明方法的MASP-2和MASP-3的抑制剂不仅包括完整的免疫球蛋白分子,而且还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、单链抗体分子以及由抗体片段形成的多特异性(例如双特异性和三特异性)抗体。

[0390] 本领域众所周知的是,抗体分子的仅小部分即互补位(paratope)参与抗体与其表位的结合(参见例如Clark,W.R.,TheExperimentalFoundations ofModern Immunology,Wiley&Sons,Inc.,NY,1986)。抗体的pFc'区和Fc区是经典补体途径的效应物,但不参与抗原结合。其中pFc'区已被酶切割的抗体,或者所产生的没有pFc'区的抗体被称为F(ab')2片段,它保留了完整抗体的抗原结合位点中的两个。分离的F(ab')2片段由于有两个抗原结合位点而被称为二价单克隆片段。类似地,其中Fc区已被酶切割的抗体,或者所产生的没有Fc区的抗体被称为Fab片段,它保留了完整抗体分子的抗原结合位点中的一个。

[0391] 抗体片段可通过蛋白水解而获得,例如通过常规方法经胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化完整抗体。例如,可通过用胃蛋白酶进行酶切割抗体来产生抗体片段,从而提供称为F(ab')2的5S片段。该片段可再使用硫醇还原试剂切割,得到3.5S Fab'单价片段。任选可使用二硫键裂解产生的巯基的封闭基团来进行裂解反应。作为替代方法,使用胃蛋白酶的酶切割直接产生两个单价Fab片段和一个Fc片段。这些方法描述于例如,Goldenberg的美国专利号4,331,647;Nisonoff,A.,等人,Arch.Biochem.Biophys.89:230,(1960);Porter,R.R.,Biochem.J.73:119,(1959);Edelman,等人,载于Methods in Enzymology1:422,Academic Press,(1967);和Coligan的第2.8.1-2.8.10页和第2.10.-2.10.4页。

[0392] 在一些实施方案中,优选使用缺乏Fc区的抗体片段以避免Fc结合Fcγ受体时启动的经典补体途径的活化。有几种方法可产生避免与Fcγ受体相互作用的单克隆抗体。例如,单克隆抗体的Fc区可通过使用蛋白水解酶部分消化(例如无花果蛋白酶消化),从而用化学法去除,因此产生例如结合抗原的抗体片段,例如Fab或F(ab)2片段(Mariani,M.,等人,Mol.Immunol.28:69-71,(1991))。或者,可以在构建本文所述的人源化抗体期间使用不结合Fcγ受体的人γ4IgG同种型。还可使用本文所述的重组技术来工程改造缺少Fc结构域的抗体、单链抗体和抗原结合结构域。

[0393] ix.单链抗体片段

或者,可以建立对MASP-1、MASP-2或MASP-3特异性的单一肽链结合分子,其中重链和轻链Fv区相连接。Fv片段可通过肽接头相连,形成单链抗原结合蛋白(scFv)。通过构建包含编码VH和VL结构域的DNA序列的结构基因来制备这些单链抗原结合蛋白,所述DNA序列通过寡核苷酸连接。将这些结构基因插入表达载体中,随后将其引入宿主细胞(例如大肠杆菌)中。重组宿主细胞合成了由接头肽桥接两个V结构域的单一多肽链。scFv的制备方法描述于例如Whitlow,等人,"Methods:A Companion to Methods in Enzymology"2:97,(1991);Bird,等人,Science 242:423,(1988);Ladner的美国专利号4,946,778;Pack,P.,等人,Bio/Technology11:1271,(1993)。

[0394] 举例来说,可通过将淋巴细胞体外暴露于MASP-3多肽,并在噬菌体或类似载体中选择抗体展示文库(例如通过使用固定化的或标记的MASP-3蛋白或肽),获得MASP-3特异性scFv。可通过对噬菌体或细菌(如大肠杆菌)上展示的随机肽文库进行筛选而获得编码具有可能的MASP-3多肽结合结构域的多肽的基因。这些随机肽展示文库可用于筛选与MASP-3相互作用的肽。构建和筛选这些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,;Lardner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等人,Phage Display of Peptides and Proteins Academic Press,Inc.,1996),随机肽展现文库和用于筛选这些文库的试剂盒是市售可得的,例如来自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.)。

[0395] 用于本发明这个方面的MASP-3抗体片段的另一种形式是编码单一互补决定区(CDR)的肽,其结合MASP-3抗原上的表位并抑制MASP-3依赖性补体活化(即LEA-1)。用于本发明这个方面的MASP-1抗体片段的另一种形式是编码单一互补决定区(CDR)的肽,其结合MASP-1抗原上的表位并抑制MASP-3依赖性补体活化(即LEA-1)。用于本发明这个方面的MASP-2抗体片段的另一种形式是编码单一互补决定区(CDR)的肽,其结合MASP-2抗原上的表位并抑制MASP-2依赖性补体活化(即LEA-2)。

[0396] 可通过构建编码目标抗体CDR的基因而获得CDR肽(“最小识别单元”)。例如通过使用聚合酶链式反应从抗体生成细胞的RNA合成可变区,从而制备这些基因(参见例如,Larrick等人,Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106,(1991);Courtenay-Luck,"Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies,"载于Monoclonal Antibodies:Production,Engineeringand Clinical Application,Ritter等人(编著),第166页,Cambridge University Press,(1995);和Ward等人,"Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,"载于Antibodies:Principles andApplications,Birch等人(编著),第137页,Wiley-Liss,Inc.,1995)。

[0397] 将本文所述的MASP抗体给予有需要的受试者以抑制LEA-1、LEA-2或者LEA-1和LEA-2组合的补体活化。在一些实施方案中,MASP抑制剂是效应物功能降低的高亲和性人或人源化单克隆MASP-1、MASP-2或MASP-3抗体。

[0398] x.双特异性抗体

用于本发明方法的MASP-2和MASP-3的抑制剂包括多特异性(即双特异性和三特异性)抗体。双特异性抗体是单克隆抗体,优选地为人或人源化抗体,所述抗体对至少两种不

同抗原具有结合特异性。如上所述和如表2所示,在一个实施方案中,所述方法包括双特异性抗体的使用,所述抗体包含对MASP-2的结合特异性(例如,结合到MASP-2的CCP1-CCP2或丝氨酸蛋白酶结构域的至少一个)和对MASP-3的结合特异性(例如结合到MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域)。在另一个实施方案中,所述方法包括双特异性抗体的使用,所述抗体包含对MASP-1的结合特异性(例如结合到MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域)和对MASP-2的结合特异性(例如结合到MASP-2的CCP1-CCP2或丝氨酸蛋白酶结构域的至少一个)。在另一个实施方案中,所述方法包括双特异性抗体的使用,所述抗体包含对MASP-1的结合特异性(例如结合到MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域)和对MASP-3的结合特异性(例如结合到MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域)。在另一个实施方案中,所述方法包括三特异性抗体的使用,所述抗体包含对MASP-1的结合特异性(例如结合到MASP-1的丝氨酸蛋白酶结构域)、对MASP-2的结合特异性(例如结合到MASP-2的CCP1-CCP2或丝氨酸蛋白酶结构域的至少一个)和对MASP-3的结合特异性(例如结合到MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域)。

[0399] 制备双特异性抗体的方法在本领域技术人员能力范围之内。传统上,双特异性抗体的重组产生是根据两个免疫球蛋白重链/轻链对的共表达,其中两条重链具有不同特异性(Milstein和Cuello,Nature 305:537-539(1983))。具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域可以与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合物优选具有免疫球蛋白重链恒定结构域,其包括至少部分的铰链区、C_H2区和C_H3区。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如有必要)免疫球蛋白轻链的DNA插入到分开的表达载体中,然后共转染到合适宿主生物体中。对于产生双特异性抗体的说明性的现有已知方法的更多细节参见例如Suresh等人,Methods in Enzymology 121:210(1986);WO96/27011;Brennan等人,Science 229:81(1985);Shalaby等人,J.Exp.Med.175:217-225(1992);Kostelny等人,J.Immunol.148(5):1547-1553(1992);Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA 90:6444-6448(1993);Gruber等人,J.Immunol.152:5368(1994);和Tutt等人,J.Immunol.147:60(1991)。双特异性抗体还包括交联的或异型缀合的抗体(heteroconjugate antibodies)。可使用任何常规交联方法制备异型缀合的抗体。合适的交联剂是本领域众所周知的并公开于美国专利号4,676,980以及许多交联技术。

[0400] 还已经描述了直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,使用亮氨酸拉链,已经制备了双特异性抗体。(参见例如Kostelny等人,J.Immunol.148(5):1547-1553(1992))。Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci USA 90:6444-6448(1993)所述的“双抗体”技术已经提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。所述片段包含通过接头与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH),所述接头太短而不允许同一链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的VH结构域和VL结构域被迫与另一片段的互补VL结构域和VH结构域配对,从而形成2个抗原-结合位点。与双特异性完整抗体相反,双特异性双抗体也可能是特别有用的,因为它们可以被容易地构建和在大肠杆菌中表达。使用噬菌体展示(WO94/13804),可从文库中容易地选择具有合适的结合特异性的双抗体(和许多其它多肽例如抗体片段)。如果双抗体的一个臂保持恒定,例如,具有针对抗原X的特异性,则可以构建文库,其中另一臂不同并选择具有合适特异性的抗体。

[0401] 还已报道了通过使用单链Fv(scFv)二聚体而制备双特异性抗体片段的另一策略(参见例如Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994))。或者,抗体可以是“线性抗体”,例如

描述于Zapata等人,Protein Eng.8(10):1057-1062(1995)。简要描述,这些抗体包含一对串联的因子D区段(V_H-C_HI-V_H-C_HI),其形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。本发明的方法还包括使用双特异性抗体的变体形式,例如Wu等人,Nat Biotechnol25:1290-1297(2007)所述的四价双重可变结构域免疫球蛋白(DVD-Ig)分子。之所以称为DVD-Ig分子,是因为来自两个不同母体抗体的2个不同的轻链可变区(VL)通过重组DNA技术直接或经由短接头而串联连接,接着是轻链恒定区。从两个母体抗体产生DVD-Ig分子的方法进一步描述于例如WO08/024188和WO07/024715,其各自的公开内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0402] 非-肽抑制剂

在某些实施方案中,所述MASP-3或MASP-2抑制剂是MASP-3或MASP-2或MASP-1的抑制性肽或者MASP-3或MASP-2或MASP-1的非-肽抑制剂。可将非-肽MASP抑制剂系统地给予受试者,例如通过动脉内、静脉内、肌内、皮下或其他肠胃外给药,或通过口服给药。可在延长的时间期限中定期给予MASP抑制剂以治疗或控制慢性病症,或者可以在急性创伤或损伤之前、期间或之后的一段时间内通过单次或重复给予。

[0403] XVIII.药物组合物和递送方法

剂量

另一方面,本发明提供在患有溶血疾病例如PNH,或选自年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病的疾病或病症的受试者中抑制MASP-3依赖性补体活化的不良作用的组合物,包括给予所述受试者组合物,所述组合物包含有效抑制MASP-3-依赖性补体活化的一定量的MASP-3抑制剂和药学上可接受的载体。在某些实施方案中,所述方法进一步包括给予组合物,其包含MASP-2抑制剂。可将治疗有效剂量的MASP-3和MASP-2的抑制剂给予有需要的受试者,以治疗或改善与MASP-3-依赖性补体活化(LEA-1)相关的病况和任选还与MASP-2-依赖性补体活化(LEA-2)相关的病况。治疗有效剂量是指MASP-3抑制剂或MASP-3抑制剂和MASP-2抑制剂的组合足以导致改善所述病况的症状的量。

[0404] 可通过标准药学方法,使用实验动物模型来测定MASP-3和MASP-2的抑制剂的毒性和治疗功效。使用这些动物模型,可使用标准方法来确定NOAEL(无明显不良作用水平)和MED(最小有效剂量)。NOAEL和MED效应之间的剂量比是治疗比率,用NOAEL/MED之比表示。最优选的是治疗比率或指数高的MASP-3抑制剂和MASP-2抑制剂。从细胞培养测定和动物研究中获得的数据可用来制定用于人体的剂量范围。MASP-3抑制剂和MASP-2抑制剂的剂量优选在循环浓度的范围之内,包括几乎无毒性或没有毒性的MED。剂量可在这个范围内变化,这取决于所采用的剂型和所使用的给药途径。

[0405] 对于任何化合物制剂来说,可使用动物模型来评价治疗有效剂量。例如,可在动物模型中配制达到包括MED在内的循环血浆浓度范围的剂量。还可通过例如高效液相色谱法来测量血浆中MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂的定量水平。

[0406] 除了毒性研究之外,还可根据活的受试者中存在的靶MASP蛋白的量以及MASP-3或MASP-2的抑制剂的结合亲和性来估计有效剂量。

[0407] 已报道在正常人类受试者血清中存在的MASP-1水平在1.48至12.83μg/mL的范围内(Terai I.等人,Clin Exp Immunol 110:317-323(1997);Theil等人,Clin.Exp.Immunol.169:38(2012))。已报道正常人类受试者的平均血清MASP-3浓度在大约2.0至12.9μg/mL的范围内(Skjoedt M等人,Immunobiology 215(11):921-31(2010);Degn等人,J.Immunol Methods,361-37(2010);Csuka等人,Mol.Immunol.54:271(2013)。已经证实正常人类受试者血清中存在的MASP-2水平在500ng/ml的低水平范围内,可使用以下文献所述的MASP-2定量测定法来测定具体受试者的MASP-2水平:Moller-Kristensen M.,等人,J.Immunol.Methods282:159-167(2003)和Csuka等人,Mol.Immunol.54:271(2013)。

[0408] 通常,包含MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂的组合物的给药剂量根据例如受试者年龄、体重、身高、性别、一般疾病状况和病史等因素而变化。举例来说,可在大约0.010至100.0mg/kg、优选地0.010至10mg/kg、优选地0.010至1.0mg/kg、更优选地0.010至0.1mg/kg受试者体重的剂量范围内给予MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂(例如MASP-3抗体、MASP-1抗体或MASP-2抗体)。在某些实施方案中,给予MASP-2抑制剂(例如MASP-2抗体)的剂量范围为大约优选地0.010至10mg/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。在某些实施方案中,给予MASP-1抑制剂(例如MASP-1抗体)或MASP-3抑制剂(例如MASP-3抗体)的剂量范围为大约0.010至100.0mg/kg,优选地0.010至10mg/kg,优选地0.010至1.0mg/kg,更优选0.010至0.1mg/kg的受试者体重。

[0409] 根据本领域技术人员众所周知的补体测定法,可以测定在指定受试者中的MASP-3抑制性组合物(任选与MASP-2抑制性组合物组合)或MASP-1抑制性组合物(任选与MASP-2抑制性组合物组合)以及本发明方法的治疗功效和合适剂量。补体产生多种特定产物。在最近十年中,对于这些活化产物的大部分,已经开发出灵敏而专一的测定法并且是市售可得的,所述活化产物包括小的活化片段C3a、C4a和C5a和大的活化片段iC3b、C4d、Bb和sC5b-9。大多数的这类测定法都利用了与暴露在片段而不是暴露在其所形成的天然蛋白上的新抗原(neoantigen)起反应的单克隆抗体,这使得这些测定法非常简单而专一。大多数都依赖于ELISA技术,尽管有时放射免疫测定法仍用于C3a和C5a。放射免疫测定法测定未经加工的片段及其“脱Arg”片段两者,这些片段是存在于循环中的主要形式。未经加工的片段和$C5a_{desArg}$通过结合细胞表面受体而被迅速清除掉,因而以极低浓度存在,而$3a_{desArg}$则不结合细胞,并在血浆中蓄积。测定C3a提供了补体活化灵敏的、不依赖途径的标志物。可通过测定Bb片段和/或测定因子D活化来评价替代途径活化。检测膜攻击途径活化的液相产物sC5b-9,提供了补体被完全激活的证据。因为凝集素途径和经典途径都产生同样的活化产物C4a和C4d,所以测定这两种片段并不提供有关这两条途径中哪一条途径产生了所述活化产物的任何信息。

[0410] 对MASP-3-依赖性补体活化的抑制特征在于作为按照本发明方法给予MASP-3抑制剂的结果而发生的补体系统的成分的以下变化中的至少一项:抑制LEA-1-介导的补体活化(抑制溶血和调理作用);抑制MASP-3丝氨酸蛋白酶底物-特异性切割;减少溶血(例如如实施例5中所述而测定);或减少C3切割和C3b沉积(例如如实施例4或实施例11中所述而测定)。

[0411] 对MASP-2-依赖性补体活化的抑制特征在于作为按照本发明方法给予MASP-2抑制剂的结果而发生的补体系统的成分的以下变化中的至少一项:抑制MASP-2-依赖性补体活

化系统产物C4b、C3a、C5a和/或C5b-9(MAC)的产生或生产(例如如美国专利号7,919,094实施例2中所述而测定);减少C4切割和C4b沉积(例如如实施例8或实施例9中所述而测定);或减少C3切割和C3b沉积(例如如实施例11中所述而测定)。

[0412] i.药用载体和递送媒介物

一般而言,本发明的MASP-3抑制剂组合物和MASP-2抑制剂组合物或包含MASP-2和MASP-3的抑制剂的组合的组合物,可以与任何其它所选治疗药组合,并适宜地包含在药学上可接受的载体中。载体是无毒的、生物相容的并且可被选择以便不会有害影响MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂(和与其组合的任何其它治疗药)的生物学活性。用于肽的示例性药学可接受的载体描述于Yamada的美国专利号5,211,657。如本文所述,用于本发明的MASP抗体可以配制成固体、半固体、凝胶、液体或气体形式的制备物,例如片剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、吸入剂和注射剂,供口服、胃肠外或外科施用。本发明还包括通过将组合物涂敷在医疗装置上进行局部施用等。

[0413] 用于经由注射、输注或冲洗的胃肠外递送和局部递送的合适载体包括蒸馏水、磷酸盐缓冲生理盐水、标准林格氏液或乳酸盐林格氏液、葡萄糖溶液、Hank氏溶液或丙二醇。此外,无菌不挥发油可用作溶剂或悬浮介质。对于此目的,可采用任何生物相容性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。此外,脂肪酸(例如油酸)可用于注射剂的制备中。可将载体和试剂配制成为液体制剂、混悬剂、可聚合或不可聚合的凝胶剂、糊剂或药膏。

[0414] 载体还可包括递送媒介物以使一种或多种试剂的递送持续(即延长、延缓或调节),或者增强一种或多种治疗药的递送、摄取、稳定性或药代动力学。这种递送媒介物以非限制性实例的方式可包括:由蛋白质、脂质体、碳水化合物、合成有机化合物、无机化合物、聚合水凝胶或共聚水凝胶和聚合物胶束组成的微粒、微球、纳米球、纳米粒。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公布号2002/0019369A1中公开的PEO和PEO/环糊精复合物。这些水凝胶可局部注射到预期作用部位,或者皮下或肌内注射以形成缓释贮库(depot)。

[0415] 本发明的组合物可配制成用于皮下、肌内、静脉内、动脉内递送或作为吸入剂递送。

[0416] 对于关节内递药,MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂可被装载于上述可注射的液体或凝胶载体、上述可注射的缓释递药媒介物、或者透明质酸或透明质酸衍生物中。

[0417] 对于非肽能药物的口服给药,MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂可被装载于惰性填充物或稀释剂例如蔗糖、玉米淀粉或纤维素中。

[0418] 对于局部给药,MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂可装载于软膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体制剂或粉剂中,或者经由透皮贴剂的凝胶或微胶囊递送系统中。

[0419] 各种经鼻和经肺的递送系统正在研发中,包括气雾器、剂量吸入器、干粉吸入器和雾化器,可分别适于在气雾剂、吸入剂或雾化递药溶媒中的本发明的递送。

[0420] 对鞘内(IT)或脑室内(ICV)递送,合适的无菌递送系统(例如液体制剂;凝胶剂、混悬剂等)可用来给予本发明。

[0421] 本发明的组合物还可包括生物相容性赋形剂,例如分散剂或润湿剂、助悬剂、稀释剂、缓冲剂、渗透促进剂、乳化剂、粘合剂、增稠剂、矫味剂(用于口服给药)。

[0422] ii.抗体和肽的药用载体

至于本文所述的MASP抗体,更具体地讲,示例性的制剂可以按注射剂量的所述化合物的溶液剂或混悬剂经胃肠外给予,所述化合物包含在生理上可接受的稀释剂与药用载体内,药用载体可以是无菌液体,例如水、油、盐水、甘油或乙醇。此外,包含MASP抗体的组合物中可存在例如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、PH缓冲物质等辅助物质。药物组合物的其外组分包括石油(petroleum)(例如动物、植物或合成来源的石油),例如大豆油和矿物油。一般而言,二元醇例如丙二醇或聚乙二醇是用于注射溶液剂的优选液体载体。

[0423] 还能以储库注射制剂或植入制剂的形式给予MASP抗体,这些制剂可按允许活性剂缓释或脉冲释放的方式来配制。

[0424] XVIX.给药方式

可以多种方式给予包含MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂的药物组合物,这取决于是局部还是全身性给药方式最适于待治疗的病况。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。

[0425] i.系统递送

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,它们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、动脉内和吸入。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特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。

[0426] 可通过任何合适的方法将本文所述的MASP抑制性抗体递送到有需要的受试者中。递送MASP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,并且可将其配制成适于各自给药途径的剂型。

[0427] 举例来说,可以通过将MASP抑制性抗体和肽应用到能够吸收所述多肽的身体膜上,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.ControlledRelease13:213,(1990);Lee,V.H.L.主编,Peptide andProtein DrugDelivery,Marcel Dekker,New York(1991);DeBoer,A.G.,等人,J.Controlled Release13:241,(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)。

[0428] 可以引入与其它分子(例如脂质)缔合的本文所述的MASP抑制性抗体,以保护多肽不被酶降解。例如,共价结合的聚合物、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 Release11:139,(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.ControlledRelease9:271,(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 Release10:

195,(1989);Asano,M.,等人,J.Controlled Release9:111,(1989);Rosenblatt,J.,等人,J.Controlled Release9:195,(1989);Makino,K.,J.Controlled Release12:235,(1990);Takakura,Y.,等人,J.Pharm.Sci.78:117,(1989);Takakura,Y.,等人,J.Pharm.Sci.78:219,(1989))。

[0429] 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)。

[0430] 对于经皮应用,可将本文所述的MASP抑制性抗体与其它合适的成分(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,并且不能降低组合物中活性成分的活性。合适溶媒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抑制性抗体还可被浸渍到透皮贴剂、膏药和绷带中,优选以液体或半液体形式。

[0431] 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、受试者年龄、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-3抑制剂或MASP-2抑制剂以及任何递药溶媒(例如缓释递送溶媒)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。

[0432] ii.局部递送

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。

[0433] MASP-3抑制剂或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-3抑制剂或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连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-3抑制剂或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方法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,Circulation85:1110-1117,(1992)中公开的那些。另见已公开的PCT申请WO 95/23161

中对于将治疗用蛋白附着到气囊血管成形术导管上的示例性方法。同样地,可将MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂包入应用于支架上的凝胶或聚合涂层材料中,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-3抑制剂或MASP-2抑制剂洗脱出来。

[0434] 用于治疗关节炎和其它肌肉骨骼疾病的MASP-3抑制剂或MASP-2抑制剂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药溶媒。作为其中可能需要局部递药的另一个实例,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。

[0435] XX.治疗方案

在预防性应用中,将药物组合物给予易患选自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病的疾病或病症或否则处于患有所述疾病症状风险中的受试者,其量足以消除或降低所述病况的症状发展的风险。在治疗性应用中,以足以缓解或至少部分减少所述病况的症状的治疗有效量,将药物组合物给予疑似患有或已经患有选自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病的疾病或病症的受试者。

[0436] 在一个实施方案中,将药物组合物给予患有PNH或处于发展PNH风险中的受试者。根据这一点,所述受试者的红细胞在组合物不存在时被C3片段调理,将所述组合物给予所述受试者,在受试者中增加红细胞存活。在一个实施方案中,所述受试者在组合物不存在时表现出选自以下的一种或多种症状:(i)血红蛋白低于正常水平,(ii)血小板低于正常水平;(iii)网织红细胞高于正常水平,和(iv)胆红素高于正常水平,并且将组合物给予受试者改善至少一种或多种症状,导致(i)增加、正常或几乎正常水平的血红蛋白(ii)增加、正常或几乎正常水平的血小板,(iii)减少、正常或几乎正常水平的网织红细胞,和/或(iv)减少、正常或几乎正常水平的胆红素。

[0437] 在用于治疗、预防或减少选自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病的疾病或病症的严重程度中的预防兼治疗方案中,可以给予包含MASP-3抑制剂和任选MASP-2抑制剂的组合物若干剂,直到在受试者中获得充分的治疗结果。在本发明的一个实施方案中,MASP-3和/或MASP-2的抑制剂包含MASP-1抗体、MASP-2抗体或MASP-3抗体,其可适宜地给予成年患者(例如平均成年体重70kg),剂量为0.1mg至10,000mg,更适宜地为1.0mg至5,000mg,更适宜地为10.0mg至2,000mg,更适宜地为10.0mg至1,000mg和还更适宜地为50.0mg至500mg,或10至200mg。对于儿科患者,可按照患者体重的比例来调节剂量。

[0438] 本发明的MASP-3抑制性组合物和任选的MASP-2抑制性组合物的施用可通过单次给予组合物(例如包含MASP-2和MASP-3的抑制剂、或双特异性或双重抑制剂的单一组合物,或共同给予分开的组合物),或有限顺序的给药来进行,用于治疗选自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病的疾病或病症。或者,在医师确定的延长的时间周期内,可以定期间隔给予组合物,例如每天、每两周、每周、每隔一周、每月或每两月,以达到最佳治疗效果。

[0439] 在某些实施方案中,将包含至少一种MASP-3抑制剂的第一组合物和包含至少一种MASP-2抑制剂的第二组合物给予患有选自阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎和贝切特氏病的疾病或病症或处于发展所述疾病或病症风险的受试者。在一个实施方案中,将包含至少一种MASP-3抑制剂的第一组合物和包含至少一种MASP-2抑制剂的第二组合物同时给予(即在不超过大约15分钟或更短、例如不超过10、5或1分钟的任一种的间隔时间内)。在一个实施方案中,将包含至少一种MASP-3抑制剂的第一组合物和包含至少一种MASP-2抑制剂的第二组合物序贯给予(即在给予第二组合物之前或之后给予第一组合物,其中给药的间隔时间超过15分钟)。在某些实施方案中,将包含至少一种MASP-3抑制剂的第一组合物和包含至少一种MASP-2抑制剂的第二组合物并发给予(即第一组合物的给予时间与第二组合物的给予重叠)。例如,在某些实施方案中,给予第一组合物和/或第二组合物达至少1、2、3或4周或更长的时间周期。在一个实施方案中,至少一种MASP-3抑制剂和至少一种MASP-2抑制剂在单位剂型中组合。在一个实施方案中,将包含至少一种MASP-3抑制剂的第一组合物和包含至少一种MASP-2抑制剂的第二组合物一起包装在药盒中,用于治疗阵发性夜间血红蛋白尿(PNH)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎或贝切特氏病。

[0440] 在某些实施方案中,患有PNH、年龄相关性黄斑变性(AMD)、缺血-再灌注损伤、关节炎、弥散性血管内凝血、血栓性微血管病(包括溶血性尿毒症综合征(HUS),非典型溶血性尿毒症综合征(aHUS)和血栓性血小板减少性紫癜(TTP))、哮喘、致密沉积物病、微量免疫坏死性新月体肾小球肾炎、创伤性脑损伤、吸入性肺炎、眼内炎、视神经脊髓炎或贝切特氏病的受试者先前已经经历、或目前正经历用抑制补体蛋白C5切割的末端补体抑制剂的治疗。在某些实施方案中,所述方法包含给予所述受试者本发明的组合物,所述组合物包含MASP-3和任选MASP-2的抑制剂;和进一步给予所述受试者抑制补体蛋白C5切割的末端补体抑制剂。在某些实施方案中,所述末端补体抑制剂是人源化抗C5抗体或其抗原-结合片段。在某些实施方案中,所述末端补体抑制剂是eculizumab。

[0441] XXI.实施例

下面的实施例仅举例说明目前预期的用于实施本发明的最佳方式,但是不应解释为限制本发明。本文所引用的所有文献都通过引用明确地予以结合。

[0442] 实施例1

本实施例说明了用脑膜炎奈瑟氏菌血清组A或脑膜炎奈瑟氏菌血清组B感染后,MASP-2缺陷型小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟氏菌诱导的死亡。

[0443] 方法:

如US 7,919,094的实施例1所述,产生MASP-2敲除小鼠(MASP-2KO小鼠),所述文献通过引用结合到本文中。10周龄MASP-2KO小鼠(n=10)和野生型(WT)C57/BL6小鼠(n=10)经腹膜内(i.p.)注射接种剂量为2.6x 107CFU、体积为100μl的脑膜炎奈瑟氏菌血清组AZ2491。将感染剂量连同右旋糖酐铁给予小鼠,终浓度为400mg/kg。在72小时时间周期内,监测感染后的小鼠生存率。

[0444] 在不同的实验中,10周龄MASP-2KO小鼠(n=10)和WT C57/BL6小鼠(n=10)经i.p.注射接种剂量为6x 106CFU、体积为100μl的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58。将感染剂量连同右旋糖酐铁给予小鼠,终剂量为400mg/kg。在72小时时间周期内,监测感染后的小鼠生存率。在感染后72小时时间周期中,根据下表4所述的疾病评分参数,还对WT和MASP-2KO小鼠测定疾病评分,所述参数是基于略加修改的Fransen等人(2010)的方案。

[0445] 表4:在感染小鼠中与临床体征相关的疾病评分

体征	评分
正常	0
稍微皱缩的皮毛	1
皱缩的皮毛,迟钝和发粘的眼睛	2
皱缩的皮毛,昏睡和闭眼	3
严重生病和刺激后不动	4
死亡	5

感染后按照每小时间隔从小鼠采集血液样品并分析,以测定脑膜炎奈瑟氏菌的血清水平(log cfu/mL),以证实感染和测定细菌从血清中的清除率。

[0446] 结果:

图8是卡普兰-迈耶曲线,图示表示在给予2.6x 107cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟氏菌血清组A Z2491后的MASP-2KO和WT小鼠的百分比生存率。如图8所示,100%MASP-2KO小鼠在感染后72小时周期内生存。相比之下,仅80%的WT小鼠(p=0.012)在感染后24小时仍生存,仅50%的WT小鼠在感染后72小时仍生存。这些结果证明MASP-2-缺陷型小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟氏菌血清组AZ2491-诱导的死亡。

[0447] 图9是卡普兰-迈耶曲线,图示表示在给予6x 106cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58后的MASP-2KO和WT小鼠的百分比生存率。如图9所示,90%的MASP-2KO小鼠在感染后72小时周期内生存。相比之下,仅20%的WT小鼠(p=0.0022)在感染后24小时仍生存。这些结果证明MASP-2-缺陷型小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58-诱导的死亡。

[0448] 图10图示表示在i.p.感染6x106 cfu脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58后,从MASP-2KO和WT小鼠在不同时间点采集的血液样品中回收的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株

MC58的log cfu/mL(n＝3,在不同的时间点,对于这两组小鼠)。结果表示为平均值±SEM。如图10所示,在WT小鼠中,血液中的脑膜炎奈瑟氏菌水平在感染后24小时达到大约6.0log cfu/mL的峰值,并在感染后36小时降至大约4.0log cfu/mL。相比之下,在MASP-2KO小鼠中,脑膜炎奈瑟氏菌水平在感染后12小时达到大约4.0log cfu/mL的峰值,并在感染后36小时降至大约1.0log cfu/mL(符号“*”表示p<0.05;符号“**”表示p＝0.0043)。这些结果证明尽管MASP-2KO小鼠用与用于WT小鼠的相同的剂量的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58感染,但与WT相比,MASP-2KO小鼠具有增高的菌血症清除率。

[0449] 图11图示表示在感染6x106 cfu脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58后的3、6、12和24小时的MASP-2KO和WT小鼠的平均疾病评分。如图11所示,MASP-2-缺陷型小鼠显示出对感染的高抗性,与WT小鼠相比,其在感染后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)具有低得多的疾病评分。图11中的结果表示为平均值±SEM。

[0450] 总之,本实施例的结果证明在脑膜炎奈瑟氏菌血清组A或脑膜炎奈瑟氏菌血清组B感染后,MASP-2-缺陷型小鼠受到保护免于脑膜炎奈瑟氏菌-诱导的死亡。

[0451] 实施例2

本实施例说明了在脑膜炎奈瑟氏菌感染后给予MASP-2抗体增加了脑膜炎奈瑟氏菌感染小鼠的生存率。

[0452] 背景/原理:

如美国专利7,919,094的实施例24所述(通过引用结合到本文中),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MASP-2抗体的药效动力学参数(如美国专利7,919,094的实施例38所述)。

[0453] 在该实施例中,在脑膜炎奈瑟氏菌感染的小鼠模型中分析来自Fab2#11的小鼠的MASP-2全长抗体。

[0454] 方法:

在脑膜炎奈瑟氏菌感染的小鼠模型中,如下测试如上产生的来自Fab2#11的小鼠IgG2a全长MASP-2抗体同种型。

[0455] 1.感染后给予小鼠-MASP-2单克隆抗体(MoAb)

在i.p.注射高剂量(4x106 cfu)脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58后3小时,9周龄C57/BL6 Charles River小鼠用抑制性小鼠MASP-2抗体(1.0mg/kg)(n＝12)或对照同种型抗体(n＝10)治疗。

[0456] 结果:

图12是卡普兰-迈耶曲线,图示表示在给予4x106 cfu的感染剂量的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58,接着在感染后3小时给予抑制性MASP-2抗体(1.0mg/kg)或对照同种型抗体后的小鼠百分比生存率。如图12所示,用MASP-2抗体治疗的小鼠的90％在感染后72小时周期内生存。相比之下,用同种型对照抗体治疗的小鼠的仅50％在感染后72小时周期内生存。符号“*”表示p＝0.0301,如通过两条生存曲线的比较而测定。

[0457] 这些结果证明给予MASP-2抗体有效治疗和改善感染了脑膜炎奈瑟氏菌的受试者的生存率。

[0458] 如本文所证明,当在感染后3小时内给予时,在感染脑膜炎奈瑟氏菌的受试者的治疗中使用MASP-2抗体是有效的,并且预期在感染后24小时至48小时内有效。脑膜炎球菌性疾病(脑膜炎球菌血症或脑膜炎)是医学急症,并且如果怀疑脑膜炎球菌性疾病(即在脑膜炎奈瑟氏菌被明确鉴定为病原之前),通常将会立即启动治疗。

[0459] 考虑到实施例1中给出的MASP-2KO小鼠的结果,认为在脑膜炎奈瑟氏菌感染之前给予MASP-2抗体也将有效预防或改善感染的严重程度。

[0460] 实施例3

本实施例证明在人血清中的脑膜炎奈瑟氏菌的补体-依赖性杀伤是MASP-3-依赖性的。

[0461] 原理:

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 Biophys Acta 1572:401-413(2002))。已知脑膜炎奈瑟氏菌被MBL识别,和已经证实MBL-缺乏的血清不溶解脑膜炎奈瑟氏菌。

[0462] 考虑到实施例1和2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MASP-2抗体治疗脑膜炎奈瑟氏菌感染的功效。在高浓度血清(20%)中进行实验以保护补体途径.

方法:

1.在不同补体-缺乏的人血清和在用人MASP-2抗体处理的人血清中的血清杀菌活性以下补体-缺乏的人血清和对照人血清用于本实验:

表5:所测试的人血清样品(如图13所示)

样品	血清类型
A	正常人血清(NHS)+人MASP-2Ab
B	NHS+同种型对照Ab
C	MBL-/-人血清
D	NHS
E	热灭活的(HI)NHS

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。

[0463] 在37℃并伴随振荡,将脑膜炎奈瑟氏菌血清组B-MC58与表5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MASP-2抗体(3μg在100μl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。

[0464] 结果:

图13图示表示在表5所示的人血清样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B菌株MC58的活菌计数的log cfu/mL。表6提供图13的Student's t-检验结果。

[0465] 表6:图13的Student's t-检验结果(时间点60分钟)

	平均差(Log)	显 著 性 ? P<0.05?	P 值概述
A vs B	-0.3678	是	***(0.0002)
A vs C	-1.1053	是	***(p<0.0001)
A vs D	-0.2111	是	**(0.0012)
C vs D	1.9	是	***(p<0.0001)

如图13和表6所示,通过加入人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氏菌的补体-依赖性杀伤。

[0466] 2.在不同补体-缺乏的人血清中的血清杀菌活性以下补体-缺乏的人血清和对照人血清用于本实验:

表7:所测试的人血清样品(如所示图14)

样品	血清类型
A	正常人血清(NHS)
B	热灭活的 NHS
C	MBL -/-
D	MASP-3 -/- (MASP-1 +)

注意:在样品D中的MASP-3-/-(MASP-1+)血清是采自3MC综合征受试者,3MC综合征是覆盖Carnevale、Mingarelli、Malpuech和Michels综合征的统一术语。正如实施例4的进一步描述,MASP-1/3基因的外显子12中的突变使MASP-3(而非MASP-1)的丝氨酸蛋白酶结构域功能失调。如实施例19所述,前-因子D优先存在于3MC血清中,而活化因子D优先存在于正常人血清中。

[0467] 在37℃并伴随振荡,将脑膜炎奈瑟氏菌血清组B-MC58与不同补体-缺乏的人血清(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-、45-、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。

[0468] 结果:

图14图示表示在表7所示的人血清样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B-MC58的活菌计数的log cfu/mL。如图14所示,WT(NHS)血清对脑膜炎奈瑟氏菌具有最高水平的杀菌活性。相比之下,MBL-/-和MASP-3-/-(其是MASP-1-足够的)人血清不具有任何杀菌活性。这些结果表明在人20％(v/v)血清中的脑膜炎奈瑟氏菌的补体-依赖性杀伤是MASP-3-和MBL-依赖性的。表8提供图14的Student's t-检验结果。

[0469] 表8:图14的Student's t-检验结果

比较	时间点 (min)	平均差(Log)	显著性？ P<0.05?	P值概述
A vs B	60	-0.8325	是	***(p<0.0001)
A vs B	90	-1.600	是	***(p<0.0001)
A vs C	60	-1.1489	是	***(p<0.0001)
A vs C	90	-1.822	是	***(p<0.0001)
A vs D	60	-1.323	是	***(0.0005)
A vs D	90	-2.185	是	***(p<0.0001)

总之,图14和表8所示结果表明在20％人血清中的脑膜炎奈瑟氏菌的补体-依赖性杀伤是MASP-3-和MBL-依赖性的。

[0470] 3.在缺乏MASP-2、MASP-1/3或MBL A/C的20％(v/v)小鼠血清中,脑膜炎奈瑟氏菌的补体-依赖性杀伤。

[0471] 以下补体-缺乏的小鼠血清和对照小鼠血清用于本实验:

表9:所测试的小鼠血清样品(如图15所示)

样品	血清类型
A	WT
B	MASP-2-/-
C	MASP-1/3-/-
D	MBLA/C-/-
E	WT热灭活的(HIS)

在37℃并伴随振荡,脑膜炎奈瑟氏菌血清组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。

[0472] 结果:

图15图示表示在表9所示的小鼠血清样品中,在不同时间点回收的脑膜炎奈瑟氏菌血清组B-MC58的活菌计数的log cfu/mL。如图15所示,MASP-2-/-小鼠血清与WT小鼠血清相比,对脑膜炎奈瑟氏菌具有更高水平的杀菌活性。相比之下,MASP-1/3-/-小鼠血清没有任何杀菌活性。符号“**”表示p＝0.0058,符号“***”表示p＝0.001。表10提供图15的Student's t-检验结果。

[0473] 表10:图15的Student's t-检验结果

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)

总之,本实施例的结果证明与WT血清相比,MASP-2-/-血清对脑膜炎奈瑟氏菌具有更高水平的杀菌活性,并且20%血清中的脑膜炎奈瑟氏菌的补体-依赖性杀伤是MASP-3-和MBL-依赖性的。

[0474] 实施例4

本实施例描述了一系列实验,进行这些实验以确定在如实施例1-3所述的MASP-2KO小鼠中观察到的针对脑膜炎奈瑟氏菌感染的MASP-3-依赖性抵抗的机制。

[0475] 原理:

为了测定在MASP-2KO小鼠中观察到的针对脑膜炎奈瑟氏菌感染的MASP-3-依赖性抵抗(在以上实施例1-3中所述)的机制,如下进行了一系列实验。

[0476] 1.MASP-1/3-缺陷型小鼠不缺乏凝集素途径功能活性(也称为"LEA-2")

方法:

为了测定MASP-1/3-缺陷型小鼠是否缺乏凝集素途径功能活性(也称为LEA-2),进行测定以检测在凝集素活化途径-特异性测定条件(1%血浆)下测定的在来自不同补体-缺陷型小鼠品系的血清中的C3转化酶活性的动力学,例如描述于Schwaeble W.等人,PNAS第108(18)卷:7523-7528(2011),通过引用结合到本文中。

[0477] 测试来自WT、C4-/-、MASP-1/3-/-;因子B-/-和MASP-2-/-小鼠的血浆,如下所述。

[0478] 为了测定C3活化,用含甘露聚糖(1μg/孔)、酵母聚糖(1μg/孔)的包被缓冲液(15mM Na_2Co_3,35mM $NaHCO_3$)或免疫复合物包被微量滴定板,所述免疫复合物通过用含1%人血清白蛋白(HSA)的包被缓冲液来包被,然后加入含绵羊抗HAS血清(2μg/mL)的TBS(10mM Tris,140mM NaCl,pH 7.4)和0.05%Tween 20和5mM Ca^{++}原位产生。将各板用含0.1%HAS的TBS封闭并用TBS/Tween 20/Ca^{++}洗涤3次。血浆样品在4mM巴比妥、145mM NaCl、2mM $CaCl_2$、1mM $MgCl_2$(pH 7.4)中稀释,加入到各板并在37℃孵育1.5h。洗涤后,使用兔抗人C3c(Dako)、接着是碱性磷酸酶-缀合的山羊抗兔IgG和磷酸对硝基苯酯,测定结合的C3b。

[0479] 结果:

在凝集素途径-特异性条件下的C3活化动力学(通过C3b沉积在甘露聚糖-包被的板上而测定,用1%血清)见图16。在MASP-2-/-血浆中未见C3切割。因子B-/-(因子B-/-)血浆以WT血浆的一半的速率切割C3,可能是因为扩增环的缺乏。在C4-/-中($T_{1/2}$=33min)以及在MASP-1/3-/-缺乏的血浆($T_{1/2}$=49min)中,在C3向C3b的凝集素途径-依赖性转化中观察到明显延迟。这种在MASP-1/3-/-血浆中的C3活化的延迟已被证明是MASP-1-依赖性的,而非MASP-3-依赖性的(参见Takahashi M.等人,J Immunol 180:6132-6138(2008))。这些结果证明MASP-1/3-缺陷型小鼠不缺乏凝集素途径功能活性(也称为"LEA-2")。

[0480] 2.遗传性MASP-3缺陷对替代途径活化的影响。

[0481] 原理:

通过测定MASP-3-缺乏的3MC综合征(因编码MASP-3丝氨酸蛋白酶的外显子中的移码突变所致)患者的血清,测定遗传性MASP-3缺陷对替代途径活化的影响。3MC综合征是覆盖Carnevale、Mingarelli、Malpuech和Michels综合征的统一术语。这些罕见的常染色体隐性病症表现出发育特征谱,包括特征性面部畸形、唇裂和/或腭裂、颅缝早闭、学习障碍以及生殖器、肢体和膀胱肾异常。Rooryck等人,Nature Genetics 43:197-203(2011)研究了11个3MC综合征家族并鉴定了2个突变基因:COLEC11和MASP-1。MASP-1基因中的突变使得编码

MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域的外显子而非编码MASP-1的丝氨酸蛋白酶的外显子功能失调。因此,在编码MASP-3的丝氨酸蛋白酶的外显子中具有突变的3MC患者缺乏MASP-3,但MASP-1却足够。

[0482] 方法:

MASP-3-缺乏的血清得自3MC患者、3MC患者的父母(两者是携带突变的等位基因的杂合体,所述突变使编码MASP-3丝氨酸蛋白酶结构域的外显子功能失调)以及得自C4-缺陷型患者(在两种人C4基因中缺陷)和MBL-缺陷型受试者。如Bitter-Suermann等人,Eur.J.Immunol11:291-295(1981))所述,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上,在0.5至25%血清浓度范围内,在传统的AP-特异性条件(BBS/Mg^{++}/EGTA,无Ca^{++},其中BBS=含有蔗糖的巴比妥缓冲盐水)下进行替代途径测定,并且随时间测定C3b沉积。

[0483] 结果:

图17图示表示在得自MASP-3-缺陷型、C4-缺陷型和MBL-缺陷型受试者的血清样品中,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的替代途径-驱动的C3b沉积水平随血清浓度的变化。如图17所示,MASP-3-缺陷型患者血清在高血清浓度(25%、12.5%、6.25%血清浓度)时具有残留的替代途径(AP)活性,但显著更高的AP_{50}(即需要9.8%血清以达到50%最大C3沉积)。

[0484] 图18图示表示在得自MASP-3-缺陷型、C4-缺陷型和MBL-缺陷型人类受试者的10%人血清样品中,在"传统的"替代途径-特异性(AP-特异性)条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的替代途径-驱动的C3b沉积水平随时间的变化。

[0485] 下表11概述了图17所示的AP_{50}结果和图18所示的C3b沉积的一半时间。

[0486] 表11:图17和18中所示结果的概述

血清类型	AP_{50}(%)	$T_{1/2}$(min)
MASP-3-缺陷型(3MC患者)	9.8	37.4
3MC受试者的母亲(杂合子)	4.3	17.2
3MC受试者的父亲(杂合子)	4.3	20.9
C4-缺陷型	4.0	11.6
MBL-缺陷型	4.8	11.0

注意:在BBS/Mg^{++}/EGTA缓冲液中,凝集素途径-介导的作用缺乏,因为在该缓冲液中缺乏Ca^{++}。

[0487] 总之,在这些测定的条件下,3MC患者中的替代途径显著受损。

[0488] 3.在缺乏MASP-2或MASP-1/3的小鼠血清中,测定在甘露聚糖、酵母聚糖和肺炎链球菌D39上的C3b沉积。

[0489] 方法:

在甘露聚糖、酵母聚糖和肺炎链球菌D39-包被的微量滴定板上测定C3b沉积,使用得自MASP-2-/-、MASP-1/3-/-和WT小鼠的浓度范围0%至20%的小鼠血清。在"传统的"替代途径-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++}),或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(即BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,进行C3b沉积测定。

[0490] 结果:

图19A图示表示在得自WT、MASP-2-缺陷型和MASP-1/3-缺陷型小鼠的血清样品中,

在传统的替代途径-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下,或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在甘露聚糖-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平随血清浓度的变化。图19B图示表示在得自WT、MASP-2-缺陷型和MASP-1/3-缺陷型小鼠的血清样品中,在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平随血清浓度的变化。图19C图示表示在得自WT、MASP-2-缺陷型和MASP-1/3-缺陷型小鼠的血清样品中,在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下,或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在肺炎链球菌D39-包被的微量滴定板上的C3b沉积水平随血清浓度的变化。

[0491] 图20A图示表示在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,在甘露聚糖-包被的微量滴定板上进行的在高度稀释的血清中的C3b沉积测定结果,使用血清浓度范围为0%至1.25%。图20B图示表示在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/EGTA/Mg^{++}/Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上进行的C3b沉积测定结果,使用血清浓度范围为0%至1.25%。图20C图示表示在传统的AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/EGTA/Mg^{++}/Ca^{++})下,在肺炎链球菌D39-包被的微量滴定板上进行的C3b沉积测定结果,使用血清浓度范围为0%至1.25%。

[0492] 如图20A-C所示,还在传统的替代途径-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})或在允许凝集素途径和替代途径两者起作用的生理条件(BBS/Mg^{++}/Ca^{++})下,进行C3b沉积测定,使用更高稀释度范围为0%至1.25%血清,在甘露聚糖-包被的板(图20A);酵母聚糖-包被的板(图20B)和肺炎链球菌D39-包被的板上(图20C)。在更高血清稀释度下替代途径逐渐消失,使得在Ca^{++}存在时在MASP-1/3-缺乏的血清中观察到的活性是MASP-2-介导的LP活性,并且在Ca^{++}存在时在MASP-2-缺乏的血清中的活性是MASP-1/3-介导的AP残留活化。

[0493] 讨论:

本实施例中所述的结果表明,MASP-2抑制剂(或MASP-2KO)通过促进MASP-3-驱动的替代途径活化而提供免于脑膜炎奈瑟氏菌感染的显著保护作用。小鼠血清溶菌测定和人血清溶菌测定的结果进一步证明,通过监测针对脑膜炎奈瑟氏菌的血清杀菌活性,在MBL-缺陷型(小鼠MBL A和MBL C双重-缺陷型和人MBL-缺陷型血清)中,针对脑膜炎奈瑟氏菌的杀菌活性不存在。

[0494] 图1基于本文提供的结果,说明了对凝集素途径和替代途径的新的理解。图1描绘了LEA-2在调理作用和细胞溶解中的作用。尽管MASP-2在多个生理性的凝集素-依赖性环境中是"下游"C3b沉积(和所导致的调理作用)的引发剂(图20A、20B、20C),但它在血清-敏感性细菌的溶菌中也起作用。如图1所示,对于血清-敏感性病原体例如脑膜炎奈瑟氏菌,所提出的负责MASP-2-缺乏的或MASP-2-耗尽的血清/血浆的增加的杀菌活性的分子机制就是,对于细菌的溶菌,与MASP-1和MASP-3缔合的凝集素途径识别复合物必须彼此靠近地结合到细菌表面上,从而允许MASP-1切割MASP-3。与MASP-1和MASP-2相反,MASP-3不是自我活化的酶,但是在许多情况下,需要被MASP-1活化/切割而转化为其酶促活性形式。

[0495] 进一步如图1所示,活化的MASP-3然后可以切割病原体表面上的C3b-结合的因子

B,通过分别形成酶促活性替代途径C3和C5转化酶C3bBb和C3bBb(C3b)n而启动替代活化级联。携带MASP-2的凝集素-途径活化复合物不参与MASP-3活化,并且,在MASP-2不存在时或耗尽后,所有凝集素途径活化复合物将会装载MASP-1或装载MASP-3。因此,在MASP-2不存在时,在微生物表面携带MASP-1和MASP-3的凝集素-途径活化复合物将彼此靠近的可能性明显增加,导致更多MASP-3被活化,从而导致MASP-3-介导的C3b-结合的因子B切割的更高速率,在微生物表面形成替代途径C3和C5转化酶C3bBb和C3bBb(C3b)n。这导致末端活化级联C5b-C9的活化,形成膜攻击复合物,其是由表面-结合的C5b与C6缔合、C5bC6与C7缔合、C5bC6C7与C8缔合和C5bC6C7C8组成,导致C9聚合,其插入到细菌表面结构并在细菌壁中形成小孔,其将导致补体-靶向的细菌的渗透压杀伤。

[0496] 这一新概念的核心就是本文提供的数据清楚地显示了凝集素途径活化复合物驱动以下两个不同的活化途径,如图1所示。

[0497] 实施例5

本实施例表明MASP-2缺乏和/或MASP-3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。

[0498] 背景/原理:

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-诱导的血管内溶血性贫血。PNH的标志是慢性补体-介导的血管内溶血,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的治疗包括对付贫血的输血,对付血栓形成的抗凝,和使用单克隆抗体eculizumab(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))。eculizumab(Soliris®)是人源化单克隆抗体,其靶向补体成分C5,封闭其被C5转化酶切割,从而阻止C5a的产生和MAC的装配。用eculizumab治疗PNH患者,在大约半数患者中导致血管内溶血减少(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eculizumab治疗的几乎所有患者都达到正常或几乎正常的LDH水平(因为控制了血管内溶血),但仅有大约三分之一的患者的血红蛋白值达到大约11gr/dL,接受eculizumab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eculizumab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),导致以下结论: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受体而被网罗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eculizumab之外的治疗策略,因为他们继续需要输入红细胞。

[0499] 本实施例描述了评价MASP-2-和MASP-3-缺乏的血清对得自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抑制和/或MASP-3抑制对治疗PNH受试者的功效,并且还支持在经历C5抑制剂例如eculizumab治疗的PNH受试者中使用MASP-2抑制剂和/或MASP-3抑制剂(包括双重或双特异性MASP-2/MASP-3抑制剂)以改善C3片段-介导的血管外溶血的作用。

[0500] 方法:

PNH动物模型:

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。这些小鼠丢失了其红细胞上的各自的表面补体调节剂,因此这些红细胞易于发生自发补体自我溶解,如同PNH人红细胞那样。

[0501] 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、MASP-1/3-/-血浆、人NHS、人MBL-/-血浆和用人MASP-2抗体处理的NHS中测试其溶血。

[0502] 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

第一天。鼠RBC的制备(±甘露聚糖包被)。

[0503] 材料包括:新鲜小鼠血液,BBS/$Mg^{++/}Ca^{++}$(4.4mM巴比妥酸、1.8mM巴比妥钠、145mM NaCl、pH 7.4,5mM Mg^{++}、5mM Ca^{++})、氯化铬、$CrCl_3 \cdot 6H_20$(0.5mg/mL在BBS/Mg^{++}/Ca^{++}中)和甘露聚糖,100μg/mL在BBS/Mg^{++}/Ca^{++}中。

[0504] 在4℃冷冻离心机中在2000xg将全血(2mL)离心1-2min。吸去血浆和血沉棕黄层。然后通过将RBC沉淀物重悬于2mL冰冷的BBS/明胶/Mg^{++}/Ca^{++}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/Mg^{++}/Ca^{++}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并温和搅拌5min。反应通过加入7.5mL BBS/明胶/Mg^{++}/Ca^{++}而终止。将样品如上所述地离心,重悬于2mL BBS/明胶/Mg^{++}/Ca^{++}和如上所述地再洗涤2次,然后贮存于4℃。

[0505] 第二天。溶血测定

材料包括BBS/明胶/Mg^{++}/Ca^{++}(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。

[0506] 首先测定RBC浓度并将细胞调整至10^9/mL,并在此浓度下贮存。使用前,将细胞在测定缓冲液中稀释至10^8/mL,然后使用100ul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/Mg^{++}/Ca^{++}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。加入100μl适当稀释的RBC制备物(即10^8/mL),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,移至平底板中,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)。

[0507] 实验#1

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108/mL,其中100μl用于溶血测定,所述测定如上所述地进行。

[0508] 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)。

[0509] 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)。

[0510] 实验#1的结论

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,表明经典途径对所观察的溶解也不起作用。因为需要凝集素途径识别分子(即MBL),所以这种溶解是由凝集素途径介导。

[0511] 实验#2

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:MASP-3-/-;无MBL;WT;用人MASP-2抗体预处理的NHS;和热灭活的NHS作为对照。

[0512] 实验#2的结果:在PNH动物模型中,MASP-2抑制剂和MASP-3缺陷阻止红细胞溶解

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、人MASP-3-缺乏的血清(来自3MC患者)和用MASP-2mAb预处理的NHS、和热灭活的NHS作为对照。

[0513] 离心ELISA微量滴定板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。

[0514] 观察到MASP-3-/-血清完全不溶解甘露聚糖-包被的小鼠红细胞。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。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。

[0515] 图21图示表示在来自MASP-3-/-、热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、用MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的血清中,一系列血清稀释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)。

[0516] 图22图示表示在来自MASP-3-/-、热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、用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)。

[0517] 根据图21和22所示的结果,证明了抑制MASP-3将会阻止任何补体-介导的敏化红细胞的溶解,所述红细胞缺乏来自自体补体活化的保护作用。MASP-2抗体对MASP-2的抑制显著地改变了CH_{50}并在某种程度上具有保护性,但MASP-3抑制更有效。

[0518] 实验#3

在如上所述的溶血测定中,在以下血清存在时分析得自Crry/C3和CD55/CD59双重-缺陷型小鼠的新鲜血液的非-包被的Crry-/-小鼠红细胞:MASP-3-/-;MBL-/-;WT;用人MASP-2抗体预处理的NHS;和热灭活的NHS作为对照。

[0519] 结果:

图23图示表示在一系列血清浓度的来自3MC(MASP-3-/-)患者、热灭活的(HI)NHS、MBL-/-,用MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的人血清中,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23所示和表12所概述的,证明了抑制MASP-3抑制补体-介导的非-敏化的WT小鼠红细胞的溶解。

[0520] 图24图示表示在来自热灭活的(HI)NHS、MBL-/-、用MASP-2抗体预处理的NHS和NHS对照的人血清中,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)。如图24所示和表12所概述的,证明了抑制MASP-2在有限程度上具有保护性。

[0521] 表12:表示为血清浓度的CH_{50}值

血清	WT	CD55/59 -/-
3MC 患者	不溶解	不溶解
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 + MASP-2 抗体	5.4%	1.5%
NHS	3.1%	0.73%

注意:"CH_{50}"是补体-介导的溶血达到50%的点。

[0522] 总之,本实施例的结果证明了抑制MASP-3阻止任何补体的敏化和非-敏化红细胞的溶解,所述红细胞缺乏来自自体补体活化的保护作用。MASP-2抑制在某种程度上也具有保护性。因此,MASP-2和MASP-3的抑制剂单独或联用(即共同给予、序贯给予)或MASP-2/MASP-3双特异性或双重抑制剂可以用于治疗PNH受试者,并且还可用于在经历用C5抑制剂例如eculizumab(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。

[0523] 实施例6

本实施例描述了溶血测定,在WT或MASP-1/3-/-小鼠血清存在时测定了甘露聚糖-包被的兔红细胞的溶解。

[0524] 方法:

1.在小鼠MASP-1/3-缺陷型血清和WT对照血清中对兔RBC(甘露聚糖包被的)的溶血测定第一天。兔RBC的制备。

[0525] 材料包括:新鲜兔血、BBS/Mg^{++}/Ca^{++}(4.4mM巴比妥酸、1.8mM巴比妥钠、145mM NaCl、pH 7.4、5mM Mg^{++}、5mM Ca^{++})、含0.1%明胶的BBS/Mg^{++}/Ca^{++}、含氯化铬的缓冲液即$CrCl_3.6\ H_2O$(0.5mg/mL在BBS/Mg^{++}/Ca^{++}中)和甘露聚糖,100μg/mL在BBS/Mg^{++}/Ca^{++}中。

[0526] 1.将兔全血(2mL)分到2个1.5mL微量离心管中并在4℃冷冻微量离心机中在8000rpm(大约5.9rcf)离心3分钟。重悬于冰冷的BBS/Mg^{++}/Ca^{++}后,将RBC沉淀物洗涤3次。第3次洗涤后,将沉淀物重悬于4mL BBS/Mg^{++}/Ca^{++}中。将2mL该等分试样加入到15-mL falcon

管中,用作未包被对照。将剩余的2mL RBC等分试样在2mL $CrCl_3$缓冲液中稀释,加入2mL甘露聚糖溶液并将悬液在室温下孵育5分钟,同时温和搅拌。通过向该混合物中加入7.5mL BBS/0.1%明胶/Mg^{++}/Ca^{++}而终止反应。将红细胞沉淀,并如上所述地用BBS/0.1%明胶/Mg^{++}/Ca^{++}将RBC洗涤2次。将RBC悬液在4℃贮存于BBS/0.1%明胶/Mg^{++}/Ca^{++}中。

[0527] 2.100μl悬浮的RBC用1.4mL水稀释并在8000rpm(大约5.9rcf)离心3分钟,将上清液在541nm处的OD调节至0.7(在541nm处的OD为0.7,相当于大约10^9红细胞/mL)。

[0528] 3.将重悬的RBC用BBS/0.1%明胶/Mg^{++}/Ca^{++}稀释至浓度为10^8/mL。

[0529] 4.在冰冷的BBS/明胶/Mg^{++}/Ca^{++}中制备测试血清稀释液,并将100μl每种血清稀释液移入圆底板的相应孔中。加入100μl适当稀释的RBC(即10^8/mL)到各孔中。作为完全溶解的对照,将纯净水(100μL)与稀释RBC(100μL)混合,导致100%溶解,而BBS/0.1%明胶/Mg^{++}/Ca^{++}无血清(100μL)用作阴性对照。然后将板在37℃孵育1小时。

[0530] 5.将圆底板在3250rpm离心5分钟。将来自各孔的上清液(100μL)移至平底板的相应孔中并在ELISA读板器中在415-490处读取OD。结果报告为在415nm处的OD与在490nm处的OD之比。

[0531] 结果:

图25图示表示在来自MASP-1/3-/-和WT对照的血清中,一系列血清浓度的小鼠血清使甘露聚糖-包被的兔红细胞溶血(通过溶解的兔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25所示,证明了抑制MASP-3阻止补体-介导的甘露聚糖-包被的WT兔红细胞的溶解。这些结果进一步支持使用MASP-3抑制剂来治疗如实施例5所述的PNH的一个或多个方面。

[0532] 实施例7

本实施例说明了在因子D-缺乏的血清中在Ca^{++}存在时替代途径被活化。

[0533] 实验#1:在替代途径特异性条件下,C3b沉积测定

方法:

在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的C3b沉积测定,在替代途径-特异性条件(BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下进行,使用以下小鼠血清的递增稀释度:因子D-/-;MASP--/-;和WT。

[0534] 结果:

图26图示表示在替代途径特异性条件下进行的C3沉积测定中,在来自因子D-/-;MASP-2-/-;和WT小鼠血清的血清样品中,C3b沉积水平(OD 405nm)随血清浓度的变化。如图26所示,在这些条件下,因子D-/-小鼠血清完全不活化C3并且替代途径不起作用。MASP-2-/-血清显示了替代途径以与WT血清类似的速率而活化。这些结果证实,在Ca^{++}不存在时,因子D是C3b沉积所需的。这与MASP-3在这些条件下不能转化为其酶促活性形式的证据是相符的,因为MASP-1、MASP-3活化酶和MASP-3与其各自的碳水化合物识别成分的相互作用是Ca^{++}-依赖性的。

[0535] 实验#2:在生理条件下的C3b沉积测定

方法:

在生理条件下(BBS/Ca^{++}/Mg^{++})(同时允许LP和AP起作用)进行C3b沉积测定,使用以下小鼠血清的递增稀释度:因子D-/-;MASP-2-/-;和WT。

[0536] 结果:

图27图示表示在生理条件下(在Ca^{++}存在时)进行的C3b沉积测定中,使用来自因子D-/-;MASP-2-/-和WT小鼠血清的样品,C3b沉积水平(OD 405nm)随血清浓度的变化。如图27所示,因子D-/-小鼠血清同时经由凝集素和替代途径而活化C3,与指定血清稀释度的WT血清相比无差异。MASP--/-血清显示了在较低血清稀释度中,仅通过替代途径(即MASP-3-驱动的替代途径活化)的C3的周转。这些结果表明在Ca^{++}存在时,鉴于MASP-3可以驱动替代途径活性,因子D是不需要的。

[0537] 实验#3:使用因子B或因子D缺乏的小鼠血清,在MASP-2mAb存在或不存在时的C3b沉积测定

方法:

在生理条件下(BBS/Ca^{++}/Mg^{++}),在甘露聚糖包被的微量滴定板上如下所述地进行C3b沉积测定:

1.微量滴定ELISA板用含甘露聚糖(1μg/mL)的包被缓冲液(15mM Na_2CO_3、35mM $NaHCo_3$、0.02%叠氮化钠,pH 9.6)在4℃包被过夜。

[0538] 2.次日,剩余蛋白结合位点用含0.1%HSA的BBS(4mM巴比妥、145mM NaCl、2mM $CaCl_2$、1mM $MgCl_2$,pH 7.4)以250μl/孔,在室温下封闭2小时。

[0539] 3.用洗涤缓冲液(含0.05%Tween 20和5mM $CaCl_2$的TBS)将各板洗涤3次。

[0540] 4.在指定时间点,将在BBS中1:10稀释的血清样品加入到各孔。仅加入缓冲液的孔作为阴性对照。将板在37℃孵育至多40分钟。

[0541] 5.然后各板用洗涤缓冲液洗涤3次。

[0542] 6.然后将在洗涤缓冲液中1:5000稀释的100μl兔抗人C3c(Dako)加入孔中并将各板在37℃孵育90分钟。

[0543] 7.用洗涤缓冲液洗涤3次后,将在洗涤缓冲液中1:5000稀释的100μl碱性磷酸酶-缀合的抗兔加入孔中,然后在室温下孵育90分钟。

[0544] 8.洗涤后,通过加入100μl底物溶液来检测碱性磷酸酶。

[0545] 9.孵育15分钟后,在OD 405nm测量光密度。

[0546] 结果:

图28图示表示在生理条件下(在Ca^{++}存在时)进行的C3b沉积测定中,在得自因子D-/-或因子B-/-小鼠的小鼠血清样品中,在MASP-2mAb存在或不存在时,C3b沉积水平(OD 405nm)随血清孵育时间(分钟)的变化。如图28所示,在WT和因子D-/-血清中,C3b沉积量没有差异,为以下结论提供强烈支持:MASP-3可以启动替代途径活化,甚至在因子D不存在时。认为所观察到的信号是因为凝集素途径和替代途径同时活化所致。进一步如图28所示,因子D-/-加MASP-2mAb显示了仅MASP-3-介导的替代途径活化。因子B-/-加MASP-2mAb仅是背景(数据未显示)。热灭活的血清用作背景对照值,其与因子D-/-以及因子B-/-和MASP-2相同(数据未显示)。

[0547] 总之,本实施例的结果证明,仅在非-生理条件下(即当在BBS/EGTA/Mg^{++}中在Ca^{++}不存在时测定替代途径活化时)才需要因子D。相比之下,当在生理条件下(在Ca^{++}存在时)测试替代途径活化时(其允许经由MASP-3活化替代途径),与WT对照相比,因子D-缺乏的血清完全不缺乏替代途径活性。因此,在生理条件下,因子D是过剩的,所以替代途径活化的启动是由MASP-3驱动。这些结果支持以下结论:凝集素途径通过MASP-3-依赖性活化事件而指导

AP活化。

[0548] 实施例8

本实施例描述了生产针对人MASP-1、MASP-2或MASP-3多肽的鼠单克隆抗体的示例性方法,以及产生双重、双特异性或泛特异性MASP抗体的示例性方法。

[0549] 1.产生MASP抗体的方法

雄性A/J小鼠(Harlan,Houston,Tex.),8至12周龄,经皮下注射在200μl磷酸盐缓冲盐水(PBS)pH 7.4中的完全弗氏佐剂(Difco Laboratories,Detroit,Mich.)中的100μg人全长多肽:rMASP-1(SEQ ID NO:10)、rMASP-2(SEQ ID NO:5)或rMASP-3(SEQ ID NO:8)或例如表2中所示的其抗原片段。2周后,小鼠经皮下注射在不完全弗氏佐剂中的50μg所述人多肽。在第6周,给小鼠注射在PBS中的50μg所述人多肽,并在4天后融合。

[0550] 对于每次融合,从经免疫的小鼠脾脏制备单细胞悬液,用于与Sp2/0骨髓瘤细胞融合。将5x108 Sp2/0和5x108脾细胞在含有50%聚乙二醇(分子量1450)(Kodak,Rochester,N.Y.)和5%二甲亚砜(Sigma Chemical Co.,St.Louis,Mo.)的培养基中进行融合。然后将细胞调节到每200μl的Iscove培养基(Gibco,Grand Island,N.Y.)悬液1.5x105脾细胞的浓度,所述培养基中补充有10%胎牛血清、100单位/ml青霉素、100μg/mL链霉素、0.1mM次黄嘌呤、0.4μM氨基蝶呤和16μM胸苷。将200微升细胞悬液加到大约二十个96孔微量培养板的各孔中。大约10天后,取出培养上清液,用于在ELISA测定法中筛选与靶纯化抗原(MASP-1、MASP-2或MASP-3或表2的抗原片段)的反应性。

[0551] ELISA测定法(参照MASP-2描述):通过加入50μl纯化的hMASP-2(50ng/mL)后在室温下过夜,包被Immulon 2(Dynatech Laboratories,Chantilly,Va.)微量测定板的各孔。用于包被的低浓度MASP-2使得能够选择高亲和性抗体。在轻轻拍打培养板除去包被溶液后,将200μl的BLOTTO(脱脂奶粉)的PBS溶液加到各孔中达1小时以封闭非特异性位点。1小时后,各孔用缓冲液PBST(含有0.05%Tween 20的PBS)洗涤。将来自各融合孔的培养物上清液(50uL)与50μl的BLOTTO混合,然后加到微量试验板的MASP-2-包被的各孔中。温育1小时后,各孔用PBST洗涤,然后通过加入辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的山羊抗小鼠IgG(Fc特异性)(Jackson ImmunoResearch Laboratories,West Grove,Pa.)检测结合MASP-2的抗体。将HRP-缀合的抗小鼠IgG在BLOTTO中适当稀释以提供合适的信噪比,然后加入到每个含样品的孔中。洗涤后,用过氧化物酶底物溶液检测结合的HRP-缀合的抗体。将含有0.1%3,3,5,5四甲基联苯胺(Sigma,St.Louis,Mo.)和0.0003%过氧化氢(Sigma)的过氧化物酶底物溶液加入孔中,显色30分钟。每孔加入50μl 2M H2SO4终止反应,用BioTek ELISA读板器(BioTek Instruments,Winooski,Vt.)测量反应混合物在450nn的光密度。

[0552] 结合测定法(参照MASP-2描述):

在上述MASP-2ELISA测定法中测试为阳性的培养上清液可在结合测定中进行测定,以测定MASP-2抑制剂对MASP-2的结合亲和性。也可使用类似测定法来确定抑制剂是否结合补体系统中的其它抗原。

[0553] 用含MASP-2(20ng/100μl/孔,Advanced Research Technology,San Diego,CA)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)(pH7.4)在4℃下过夜,包被聚苯乙烯微量滴定板的各孔(96孔培养基结合板,Coming Costar,Cambridge,MA)。吸出MASP-2溶液后,各孔用含有1%牛血清白蛋白(BSA;Sigma Chemical)的PBS在室温下封闭2小时。无MASP-2包被的孔用作背景对照。将在

BSA PBS封闭溶液中不同浓度的杂交瘤上清液或已纯化的MASP-2MoAb的等分溶液加到各孔中。在室温下孵育2小时之后,各孔用PBS充分漂洗。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)并在室温下温育1小时,来检测MASP-2-结合的MASP-2MoAb。该板用PBS再次充分漂洗后,加入100μl 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物(Kirkegaard and Perry Laboratories,Gaithersburg,MD)。通过加入100μl 1M磷酸来猝灭TMB的反应,将板在微量板读板器(SPECTRA MAX 250,Molecular Devices,Sunnyvale,CA)中在450nm处读数。

[0554] 然后测定来自阳性孔的培养物上清液在功能测定法(例如本文实施例9所述的C4裂解测定法)中抑制补体活化的能力。然后经有限稀释克隆阳性孔中的细胞。再在上述ELISA测定法中测定MoAb与hMASP-2的反应性。使选出的杂交瘤在转瓶中生长,收集耗尽培养物的上清液,通过A蛋白亲和色谱纯化抗体。

[0555] 在C4切割测定法(例如实施例9所述)中,可以测定MASP-2抗体的LEA-2抑制活性。

[0556] 尽管上述ELISA和结合测定参照MASP-2而描述,但本领域技术人员将会理解,可以使用MASP-1或MASP-3多肽和其抗原片段(例如表2所述),进行相同的ELISA和结合测定。在C3b沉积测定(例如实施例4所述)中,在溶血测定(例如实施例5所述)中,可以测定MASP-3抗体对MASP-3底物的MASP-3丝氨酸蛋白酶切割的抑制和对LEA-1的抑制活性。在C3b沉积测定(例如实施例4所述)中和在溶血测定(例如实施例5所述)中,可以测定MASP-1抗体对MASP-1底物的MASP-1丝氨酸蛋白酶切割的抑制,对MASP-3活化的抑制和对LEA-1的抑制活性。

[0557] 2.产生双重-MASP抗体的方法

MASP-2/3双重抑制性抗体:如图4、6和7C所示,在丝氨酸蛋白酶结构域中存在MASP-2和MASP-3之间的保守区,所述丝氨酸蛋白酶结构域被SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:8的β链编码。因此,可以如下产生双重MASP-2/3抗体:使用包含MASP-2(或MASP-3)的丝氨酸蛋白酶结构域例如SEQ ID NO:5(或SEQ ID NO:8)的β链的抗原,以产生如上所述的单克隆抗体,或者,这些抗原可以用于筛选噬菌体文库中能特异性地结合这些抗原的克隆,接着筛选与MASP-3(或MASP-1)的双重结合。然后在功能测定(例如表2所述)中,筛选双重MASP-2/3抗体的抑制活性。

[0558] MASP-1/3双重抑制性抗体:如图3-5所示,MASP-1和MASP-3在CUBI-CCP2结构域(SEQ ID NO:10的aa 25-432)中共享相同的保守区,其也被MAp44共享。如图3所示,MAp44不含CCP2结构域。因此,如下产生双重MASP-1/3抗体(包括MAp44在内):使用包含MASP-1(或MASP-3)的CUBI-CCP-2结构域的抗原或由MASP-1(或MASP-3)的CUBI-CCP-2结构域组成的抗原以产生如上所述的单克隆抗体,或者,该抗原用于筛选噬菌体文库中特异性地结合该抗原的克隆,接着筛选与MASP-3(或MASP-1)的双重结合。使用包含MASP-1(或MASP-3)的CCP2结构域的抗原或者由MASP-1(或MASP-3)的CCP2结构域组成的抗原,以类似方式产生双重MASP-1/3抗体(不包括MAp44)。然后在功能测定(例如表2所述)中,筛选双重MASP-1/3抗体的抑制活性。

[0559] MASP-1/2双重抑制性抗体:如图4、6和7A所示,MASP-1和MASP-2的丝氨酸蛋白酶结构域含有保守区。因此,如下产生双重MASP-1/2抗体:使用包含MASP-1(或MASP-2)的丝氨酸蛋白酶结构域的抗原或者由MASP-1(或MASP-2)的丝氨酸蛋白酶结构域组成的抗原以产生如上所述的单克隆抗体,或者,该抗原用于筛选噬菌体文库中特异性地结合该抗原的克隆,

接着筛选与MASP-2(或MASP-1)的双重结合。然后在功能测定(例如表2所述)中,筛选双重MASP-1/2抗体的抑制活性。

[0560] 3.产生泛特异性MASP抗体的方法:

α链:在MASP-2和MASP-1/3之间的多个同一性补位表明,有可能产生与MASP-1/3和MASP-2结合的单克隆抗体。具体地讲,大部分同一性位于CUB1-EGF-CUB2结构域内,如图5所示。按照以下文献鉴定图5所示的不同结构域:Yongqing,等人,Biochemica et Biophysica Acta 1824:253-262(2012);Teillet等人,J.Biol.Chem.283:25715-25724(2008);和Marchler-Bauer等人,NucleicAcidsRes.39:D225-229(2011)。

[0561] β链:在MASP-2和MASP-1/3之间的多个同一性补位,如图6所示,将会允许产生泛特异性MASP-1/2/3抑制剂。

[0562] 方法:

泛特异性MASP抑制性抗体(即抑制MASP-1、2和3活性的抗体)产生如下:

1.针对MASP-1/3和MASP-2α-链CUB1-EGF-CUB2结构域来筛选文库并选择同时与MASP-1/3和MASP-2交叉反应的克隆。

[0563] 2.筛选克隆的抑制功能活性的能力,例如如表2所述。

[0564] 3.使用DTLac0亲和性/功能性成熟技术(Yabuki等人,PLoS ONE,7(4):e36032(2012)),以同时优化与所有三种蛋白的结合和抑制性功能。

[0565] 4.如表2所述,泛-MASP抑制剂可用于抑制LEA-1-和LEA-2-介导的补体活化。

[0566] 4.产生双特异性MASP-2/3抗体的方法

双特异性MASP-2/3抑制性抗体产生如下:

1.已经鉴定了与CCP1结构域结合和抑制MASP-2-依赖性补体活化的示例性的MASP-2特异性抑制性抗体,如实施例11-14所述。

[0567] 2.通过针对MASP-3多肽而筛选文库和鉴定MASP-3抗体,产生MASP-3特异性抑制性抗体,如实施例15所述,接着在功能测定(例如表2所述)中测定所述抗体的LEA-1抑制活性。示例性的MASP-3抗体描述于实施例15。

[0568] 3.将对MASP-2和MASP-3具有特异性的抗原结合区克隆到框架中,以产生双特异性抗体。已经描述了多种双特异性抗体形式,包括免疫球蛋白G-样形式以及不同融合蛋白和单链可变片段结构(Holmes,Nature Reviews,Drug Discovery 10:798-800(2011),Müller和Kontermann,Biodrugs 24:89-98(2010))。在一个实例中,通过使表达针对两种不同抗原的抗体的两个杂交瘤融合,可以产生双特异性抗体,导致不同重链和轻链配对,其百分率包含对一种抗原具有特异性的重链和轻链,其与对另一种抗原具有特异性的重链和轻链配对(Milstein和Cuello,Nature 305:537-539(1983))。可通过共表达2种免疫球蛋白重链/轻链对,重组产生类似的双特异性抗体,其中两条重链具有不同的特异性。具有所需结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域(例如实施例11-14所述的MASP-2抗体,实施例15所述的MASP-3抗体)可以与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。融合优选与免疫球蛋白重链恒定结构域融合,其包括铰链、C_H2区和C_H3区的至少一部分。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如有必要)免疫球蛋白轻链的DNA插入到分开的表达载体中,然后共转染到合适宿主生物体中。

[0569] 除了配对的免疫球蛋白重链和轻链,对2种不同靶具有特异性的单链可变片段的

连接在Kipriyanov等人,J.Mol.Biol.293:41(1999))中举例说明。在该实例中,将单一多核苷酸表达构建体设计为编码被接头肽间隔的两对重链和轻链的可变区,每一对分别对不同蛋白靶具有特异性。一旦表达后,该多肽以这样的结构装配:其中对一种靶具有特异性的重链和轻链对形成该蛋白的一个抗原-结合表面,而另一对形成分开的抗原-结合表面,产生称为单链双抗体的分子。根据中间的重链和轻链可变区对之间的接头长度,多肽也可被迫二聚化,导致形成串联的双抗体。

[0570] 例如,可将编码以下免疫球蛋白多肽的DNA插入到一个或多个载体中并在合适宿主生物中表达,以产生以下双特异性抗体的说明性的、非限制性实例。

[0571] MASP-2/3双特异性抗体

在一个实施方案中,提供双特异性抗体,其与人MASP-2和人MASP-3结合并且包含:

(I)MASP-2特异性结合区,包含以下的至少一个或多个:a)重链可变区,包含:i)重链CDR1,包含SEQ ID NO:21的31-35的氨基酸序列;和ii)重链CDR2,包含SEQ ID NO:21的50-65的氨基酸序列;和iii)重链CDR3,包含SEQ ID NO:21的95-102的氨基酸序列;和/或以下的至少一个或多个:b)轻链可变区,包含:i)轻链CDR1,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的24-34的氨基酸序列;和ii)轻链CDR2,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的50-56的氨基酸序列;和iii)轻链CDR3,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的89-97的氨基酸序列;和

(II)MASP-3特异性结合区,任选MASP-3特异性结合区包含以下的至少一个:a)重链可变区,包含:i)重链CDR1,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26的31-35的氨基酸序列;和ii)重链CDR2,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26的50-65的氨基酸序列;和iii)重链CDR3,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:26的95-102的氨基酸序列;和

b)轻链可变区,包含:i)轻链CDR1,包含SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:29的24-34的氨基酸序列;和ii)轻链CDR2,包含SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:29的50-56的氨基酸序列;和iii)轻链CDR3,包含SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:29的89-97的氨基酸序列。

[0572] MASP-1/2双特异性抗体

在一个实施方案中,提供双特异性抗体,其与人MASP-1和人MASP-2结合并且包含:

(I)MASP-2特异性结合区,包含以下的至少一个或多个:a)重链可变区,包含:i)重链CDR1,包含SEQ ID NO:21的31-35的氨基酸序列;和ii)重链CDR2,包含SEQ ID NO:21的50-65的氨基酸序列;和iii)重链CDR3,包含SEQ ID NO:21的95-102的氨基酸序列;和/或以下的至少一个或多个:b)轻链可变区,包含:i)轻链CDR1,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的24-34的氨基酸序列;和ii)轻链CDR2,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的50-56的氨基酸序列;和iii)轻链CDR3,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的89-97的氨基酸序列;和

(II)MASP-1特异性结合区。

[0573] 4.进行针对MASP-2和/或MASP-3的功能性抑制活性的测试,例如如表2所述,和进一步如本文所述。

[0574] 实施例9

本实施例描述了体外C4切割测定,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。

[0575] C4切割测定:C4切割测定已经描述于Petersen,S.V.,等人,

J.Immunol.Methods257:107,2001,其检测了由结合到L-纤维胶凝蛋白的金黄色葡萄球菌上的脂磷壁酸(LTA)所致的凝集素途径活化。

[0576] 试剂:福尔马林固定的金黄色葡萄球菌(DSM20233)制备如下:将细菌在胰胨大豆血培养基(tryptic Soy blood medium)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。

[0577] 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MASP-2MoAb)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溶于100μl 4mM巴比妥、145mM NaCl,2mM CaCl2,1mM MgCl2,pH 7.4中的经纯化的人C4(按照Dodds,A.W.,Methods Enzymol.223:46,1993所述获得)。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。

[0578] 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。

[0579] 在H-纤维胶凝蛋白(HakataAg)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。

[0580] 实施例10

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抑制剂是否阻断了经典途径。

[0581] 方法:为了测试MASP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10μg/mL免疫复合物或PBS存在时,将一式三份的含有90%NHS的50μl样品在37℃孵育,并且还包括平行的一式三份的样品(+/-免疫复合物),其在37℃孵育期间含有200nM抗备解素单克隆抗体。在37℃孵育2小时后,将13mM EDTA加到所有样品中终止进一步的补体活化,并立即将样品冷却到5℃。再将样品保存于-70℃,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。

[0582] 实施例11

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

[0583] 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切割位点和两个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。

[0584] 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MASP-2Fab2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。

[0585] 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转化酶是蛋白水解切割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。

[0586] 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:13)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。

[0587] 将50个独特的MASP-2抗体纯化,将250μg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。

[0588] 用于评价MASP-2Fab2抑制(封闭)活性的测定法

1.测定抑制凝集素途径C3转化酶形成的测定法:

背景:凝集素途径C3转化酶是蛋白水解切割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。MASP-2不是凝集素途径C3转化酶(C4bC2a)的结构成分;因此,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MASP-2Fab2(即阻断性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转化酶切割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。

[0589] 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MASP-2Fab2抑制C3转化酶形成和随后C3b产生的能力。

[0590] 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。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200μlPBS洗涤3次。在5℃,将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 $MgCl_2$,2.0mM $CaCl_2$,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℃水浴转移装有冰-水混合物的容器中终止反应。各孔依次用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 H_3PO_4终止过氧化物酶反应,测定OD_{450}。

[0591] 2.测量抑制MASP-2-依赖性C4切割的测定法背景: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。MASP-2Fab2可结合直接参与C4切割的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。

[0592] 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切割活性的下列方法中,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方法测定固定在孔中的人C4b。在该测定法中所产生的C4b的量可衡量MASP-2-依赖性C4切割活性。在该测定法中,测定选定浓度的MASP-2Fab2抑制C4切割的能力。

[0593] 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200μl PBS洗涤3次。在5℃,将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 $MgCl_2$,2.0mM $CaCl_2$,0.1％明胶,pH 7.4)至选定浓度。1.0μg/mL人C4(Quidel)也包括在这些样品中。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,然后各孔再用200μl PBS洗涤2次。加入100μl/孔的1:700稀释的生物素-缀合的鸡抗人C4c(Immunsystem 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200μl PBS洗涤5次。加入100μl/孔的0.1μg/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16分钟。通过加入100μl/孔1.0M H_3PO_4终止过氧化物酶反应,并测定OD_{450}。

[0594] 3.抗大鼠MASP-2Fab2与“天然”大鼠MASP-2的结合测定法背景: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MASP-2Fab2与MASP-2生理相关形式的结合,则重要的

是开发出结合测定法,其中利用的是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MASP-2Fab2与固定化“天然”MASP-2的结合亲和性进行了研究。

[0595] 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200μl TBS/Tween/Ca^{++}洗涤缓冲液(Tris-缓冲盐水,0.05％Tween 20,含有5.0mM $CaCl_2$,pH 7.4)洗涤3次。在冰上制备10％大鼠血清的高盐结合缓冲液(20mM Tris,1.0MNaCl,10mM $CaCl_2$,0.05％Triton-X100,0.1％(w/v)牛血清白蛋白,pH 7.4)。加入100μl/孔并在5℃孵育过夜。各孔用200μl TBS/Tween/Ca^{++}洗涤缓冲液洗涤3次。然后,各孔用200μl PBS洗涤2次。加入100μl/孔的稀释于含Ca^{++}和Mg^{++}的GVB缓冲液(4.0mM巴比妥,141mM NaCl,1.0mM $MgCl_2$,2.0mM $CaCl_2$,0.1％明胶,pH 7.4)的选定浓度的MASP-2Fab2,并在室温下孵育1小时并温和搅动。各孔用200μl 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100μl/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200μl PBS洗涤5次。加入100μl/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100μl/孔1.0M H_3PO_4终止过氧化物酶反应,并测定OD_{450}。

[0596] 结果:

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MASP-2抗体进行纯化,用于进一步分析。250μg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13。

[0597] 表13:阻断凝集素途径补体活化的MASP-2FAB2

Fab2抗体#	C3转化酶(IC50(nM)	Kd(nM)	C4切割IC50(nM)
88	0.32	4.1	ND
41	0.35	0.30	0.81
11	0.46	0.86	<2nM
86	0.53	1.4	ND
81	0.54	2.0	ND
66	0.92	4.5	ND
57	0.95	3.6	<2nM
40	1.1	7.2	0.68
58	1.3	2.6	ND
60	1.6	3.1	ND
52	1.6	5.8	<2nM
63	2.0	6.6	ND
49	2.8	8.5	<2nM
89	3.0	2.5	ND

71	3.0	10.5	ND
87	6.0	2.5	ND
67	10.0	7.7	ND

如上表13所示,在所测的50个MASP-2Fab2中,17个被鉴定为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13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。因为甚至当各MASP-2分子被Fab2结合时,“阻断性”Fa2仅可能微弱地抑制MASP-2功能,这在理论是可能的,因此要慎重考虑。

[0598] 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。

[0599] 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13。对于其它Fab2也进行了类似的结合测定,其结果见表13。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,EMBO J22:2348-59(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)的复合物的组成部分而存在;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,可能不必预期IC50和Kd之间确切的对应性,因为在各个测定法中,Fab2可能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之间看似有相当密切的对应性(参见表13)。

[0600] 对抑制MASP-2-介导的C4切割,评价若干个阻断性Fab2。如表13所示,发现所有测试的Fab2都抑制C4切割,IC50类似于C3转化酶测定法中所获得的IC50。

[0601] 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切割而产生C4b。然而,已经鉴定出有效抑制C4b产生(>95％)的若干MASP-2Fab2,因此证明了该测定法对于MASP-2-介导的C4切割的特异性。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切割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。

[0602] 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。

[0603] 实施例12

本实施例描述了对若干按照实施例11所述方法产生的阻断性抗大鼠MASP-2Fab2抗体进行的表位作图。

[0604] 方法:

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:

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;

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

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。

[0605] 按照前述方法将这些蛋白质通过镍-亲和层析从培养上清液中纯化出来(Chen等人,J.Biol.Chem.276:25894-02(2001))。

[0606] 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出来。硫氧还蛋白融合物配偶体由pTrxFus空载体表达作为阴性对照。

[0607] 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。

[0608] 斑点印迹分析:

将连续稀释的上述5个重组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5%脱脂奶粉的TBS溶液(封闭缓冲液)封闭,然后与1.0μg/mL 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,J Immunol 163:6848-59(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。

[0609] MASP-2结合测定法:

ELISA板用1.0μg/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1%BSA的TBS溶液封闭,然后加入连续稀释的MASP-2Fab2的TBS溶液(含有5.0mM Ca^{++})。将所述板在室温下孵育1小时。用TBS/Tween/Ca^{++}洗涤3次后,加入按1/10,000稀释于TBS/Ca^{++}的HRP-缀合的抗人Fab(AbD/Serotec),将所述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。

[0610] 结果:

斑点印迹法分析的结果表明了Fab2与下表14中提供的各种MASP-2多肽的反应性。表14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(仅硫氧还蛋白融合物配偶体例外)均被阳性对照Ab(多克隆抗人MASP-2血清,在兔中产生)识别。

[0611] 表14: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

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。

[0612] 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,可能表明该Fab2识别CCP1的表位。Fab2#40和#49仅结合完整的MASP-2A。在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观亲和性(数据未显示)。

[0613] 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。

[0614] 实施例13

本实施例描述了如实施例11所述而鉴定的代表性的高亲和性MASP-2Fab2抗体的药效动力学分析。

[0615] 背景/原理:

如实施例11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基因序列来构建。如实施例11所示,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。

[0616] 如实施例11表13所示,该分析的结果是鉴定了17个具有功能阻断活性的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切割的直接度量。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11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,如实施例11表13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13所示的17个阻断性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。

[0617] 大鼠IgG2c和小鼠IgG2a全长抗体同种型变体衍生自Fab2#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。

[0618] 方法:

如实施例11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。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如下。

[0619] 在小鼠中的体内研究:

在小鼠中进行药效动力学研究,以调查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。

[0620] 图29A图示表示在经皮下给予0.3mg/kg或1.0mg/kg小鼠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在酵母聚糖-包被的微量滴定板上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MASP-2抗体的血清用作阳性对照(0％活性)。

[0621] 图29A所示的结果表明在经皮下给予1.0mg/kg剂量的小鼠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MASP-2MoAb后见到对C4b沉积的部分抑制。

[0622] 在小鼠中,在单次ip给予0.6mg/kg小鼠MASP-2MoAb后,接着是3周的凝集素途径恢复的时间进程。如图29B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。在第二和第三周观察到凝集素途径活性的缓慢恢复,在MASP-2MoAb给予后17天,在小鼠中观察到完全的凝集素途径回复。

[0623] 这些结果证明衍生自Fab2#11的小鼠MASP-2Moab当系统性递送时以剂量-反应方式抑制小鼠的凝集素途径。

[0624] 实施例14

本实施例描述了通过使用噬菌体展示对全长人scFv抗体的鉴定,所述抗体与MASP-2结合并抑制凝集素-介导的补体活化(LEA-2),同时保留免疫系统的经典(C1q-依赖性的)途径成分的完整性。

[0625] 概述:

通过筛选噬菌体展示文库,鉴定了全长人、高亲和性MASP-2抗体。所述抗体的可变的轻链和重链片段同时以scFv形式和以全长IgG形式而分离。人MASP-2抗体可用于抑制凝集素途径-介导的替代补体途径活化相关的细胞损伤,同时保留完整的免疫系统的经典(C1q-依赖性的)途径成分。在某些实施方案中,所测的MASP-2抑制性抗体具有以下特征:(a)对人MASP-2的高亲和性(例如KD为10nM更低),和(b)在90％人血清中抑制MASP-2-依赖性补体活性,IC50为30nM或更低。

[0626] 方法:

全长无催化活性的MASP-2的表达:

将编码具有前导序列的人MASP-2多肽(SEQ ID NO:5)的人MASP-2的全长cDNA序列(SEQ ID NO:4)亚克隆到哺乳动物表达载体pCI-Neo(Promega)中,所述载体在CMV增强子/启动子区的控制下驱动真核表达(描述于Kaufman R.J.等人,Nucleic Acids Research19:4485-90,1991;Kaufman,Methods in Enzymology,185:537-66(1991))。

[0627] 为了产生无催化活性的人MASP-2A蛋白,按照US2007/0172483(其通过引用结合到本文中)所述,进行定点诱变。PCR产物在琼脂糖凝胶电泳和条带制备后被纯化,使用标准加尾方法产生单腺苷重叠。然后将加腺苷尾的MASP-2A克隆到pGEM-T easy载体中,再转化到大肠杆菌中。将人MASP-2A进一步亚克隆到哺乳动物表达载体pED或pCI-Neo中。

[0628] 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。

[0629] 在经淘选/scFv转化和过滤筛选而鉴定的ScFv侯选克隆上的MASP-2AELISA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。

[0630] 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噬菌粒文库,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。

[0631] 测定抑制凝集素途径C3转化酶形成的测定法

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转化酶的两种蛋白成分(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转化酶的从头形成。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转化酶切割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。

[0632] 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。

[0633] 方法:

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2μg/mL的每个scFv克隆。阳性对照是OMS100 Fab2并以0.4μg/mL来测定。在有和没有scFv/IgG克隆存在时监测C3c形成。

[0634] 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。

[0635] 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。

[0636] 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靶标准。

[0637] 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)。此过程涉及由每个母克隆的VH配对来自六个健康供体的首次用于实验的人类λ轻链(VL)的文库组成的组合文库的生成。然后筛选此文库具有改善的结合亲和性和/或功能性的scFv克隆。

[0638] 表15: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

scFv 克隆	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)
17D20mc	38	nd	nd
17D20m_d3521N11	26	>1000	140
17N16mc	68	nd	nd
17N16m_d17N9	48	15	230

以下给出的是上表15所示的和下表16A-F所列的母克隆和子克隆的重链可变区(VH)序列。

[0639] Kabat CDR(31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3))以黑体表示;Chothia CDR(26-32(H1)、52-56(H2)和95-101(H3))以下划线表示。

[0640] 17D20_35VH-21N11VL重链可变区(VH)(SEQ ID NO:15,由SEQ ID NO:14编码)

QVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLS**RG**K**MG**VSWIRQPPGKALEW**LA**H**IFSS**D**EKSY**

RTSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTAT**YYCARIRR**GGIDYWGQGTLVTVSS

d17N9 重链可变区(VH) (SEQ ID NO:16)

QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSS**TSAA**WNWIRQSPSRGLEW**LGRTYYRSKWY**

NDYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDT**AVYYCARD**PFGVPFDIWGQGTMVTVSS

重链可变区

表16A:重链(aa 1-20)

重链																			
aa	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**
d3521N11 (SEQ:15)	Q	V	T	L	K	E	S	G	P	V	L	V	K	P	T	E	T	L	T	L
d17N9 (SEQ:16)	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	G	L	V	K	P	S	Q	T	L	S	L

表16B:重链(aa 21-40)

重链						CDR-H1														
aa	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	**30**	**31**	**32**	**33**	**34**	**35**	**36**	**37**	**38**	**39**	**40**
d3521N11 (SEQ:15)	T	C	T	V	S	G	F	S	L	S	**R**	**G**	**K**	**M**	**G**	V	S	W	I	R
d17N9 (SEQ:16)	T	C	A	I	S	G	D	S	V	S	**S**	**T**	**S**	**A**	**A**	W	N	W	I	R

表16C:重链(aa41-60)

重链										CDR-H2										
aa	**41**	**42**	**43**	**44**	**45**	**46**	**47**	**48**	**49**	**50**	**51**	**52**	**53**	**54**	**55**	**56**	**57**	**58**	**59**	**60**
d3521N11 (SEQ:15)	Q	P	P	G	K	A	L	E	W	**L**	**A**	**H**	**I**	**F**	**S**	**S**	**D**	**E**	**K**	**S**
d17N9 (SEQ:16)	Q	S	P	S	R	G	L	E	W	**L**	**G**	**R**	**T**	**Y**	**Y**	**R**	**S**	**K**	**W**	**Y**

表16D:重链(aa 61-80)

重链	CDR-H2 (续前)																			
aa	**61**	**62**	**63**	**64**	**65**	**66**	**67**	**68**	**69**	**70**	**71**	**72**	**73**	**74**	**75**	**76**	**77**	**78**	**79**	**80**
d3521N11 (SEQ:15)	**Y**	**R**	**T**	**S**	**L**	K	S	R	L	T	I	S	K	D	T	S	K	N	Q	V
d17N9 (SEQ:16)	**N**	**D**	**Y**	**A**	**V**	S	V	K	S	R	I	T	I	N	P	D	T	S	K	N

表16E:重链(aa 81-100)

重链															CDR-H3					
aa	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
d3521N11 (SEQ:15)	V	L	T	M	T	N	M	D	P	V	D	T	A	T	**Y**	**Y**	**C**	**A**	**R**	**I**
d17N9 (SEQ:16)	Q	F	S	L	Q	L	N	S	V	T	P	E	D	T	**A**	**V**	**Y**	**Y**	**C**	**A**

表16F:重链(aa 101-118)

重链	CDR-H3 (续前)																			
aa	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
d3521N11 (SEQ:15)	**R**	**R**	G	G	I	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S		
d17N9 (SEQ:16)	**R**	**D**	P	F	G	V	P	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S

以下给出的是下表17A-F所列的母克隆和子克隆的轻链可变区(VL)序列。

[0641] Kabat CDR(24-34(L1);50-56(L2);和89-97(L3)以黑体表示;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或Chothia系统编号。

[0642] 17D20m_d3521N11轻链可变区(VL)(SEQ ID NO:17)

QPVLTQPPSLSVSPGQTASITCS**GEKLGDKYAYW**YQQKPGQSPVLVMYQ**DKQRPSG**IPERF

SGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYCQ**AWDSSTAVF**GGGTKLTVL

17N16m_d17N9轻链可变区(VL)(SEQ ID NO:19,由SEQ ID NO:18编码)

SYELIQPPSVSVAPGQTATITCA**GDNLGKKRVHW**YQQRPGQAPVLVIYD**DSDRPSG**IPDRF

SASNSGNTATLTITRGEAGDEADYYCQ**VWDIATDHV**VFGGGTKLTVLAAAGSEQKLISE

表17A:轻链(aa 1-20)

轻链																				
aa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
d3521N11 (SEQ:17)	Q	P	V	L	T	Q	P	P	S	**L**	S	V	S	P	G	Q	T	A	S	I
d17N9 (SEQ:19)	S	Y	**E**	L	**I**	Q	P	P	S	V	S	V	A	P	G	Q	T	A	**T**	I

表17B:轻链(aa 21-40)

轻链				CDR-L1																
aa	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
d3521N11 (SEQ:17)	T	C	S	G	**E**	K	L	G	D	K	**Y**	A	Y	W	Y	Q	Q	K	P	G
d17N9 (SEQ:19)	T	C	**A**	G	**D**	N	**L**	G	**K**	K	**R**	V	H	W	Y	Q	Q	**R**	P	G

表17C:轻链(aa41-60)

轻链										CDR-L2										
aa	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
d3521N11 (SEQ:17)	Q	S	P	V	L	V	M	Y	Q	D	K	Q	R	P	S	G	I	P	E	R
d17N9 (SEQ:19)	Q	A	P	V	L	V	I	Y	D	D	S	D	R	P	S	G	I	P	D	R

表17D:轻链(aa 61-80)

轻链	CDR-L2 (续前)																			
aa	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
d3521N11 (SEQ:17)	F	S	G	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	S	G	T	Q	A	M
d17N9 (SEQ:19)	F	S	A	S	N	S	G	N	T	A	T	L	T	I	T	R	G	E	A	G

表17E:轻链(aa 81-100)

轻链									CDR-L3											
aa	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
d3521N11 (SEQ:17)	D	X	A	D	Y	Y	C	Q	A	W	D	S	S	T	A	V	F	G	G	G
d17N9 (SEQ:19)	D	E	A	D	Y	Y	C	Q	V	W	D	I	A	T	D	H	V	V	F	G

表17F:轻链(aa 101-120)

轻链	CDR-L3 (续前)																			
aa	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
d3521N11 (SEQ:17)	T	K	L	T	V	L	A	A	A	G	S	E	Q	K	L	I	S	E	E	D
d17N9 (SEQ:19)	G	G	T	K	L	T	V	L	A	A	A	G	S	E	Q	K	L	I	S	E

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,这两者已证明以高亲和性与人MASP-2结合并具有阻断功能性补体活性的能力。结果表明d3521N11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,导致以下结论:结合位点包含CCP1。

[0643] 因此,在一个实施方案中,用于要求保护的本发明的组合物和方法中的MASP-2抑制剂包含人抗体,所述抗体与由人MASP-2(SEQ ID NO:3)组成的多肽结合,其中所述抗体包含:

I)a)重链可变区,包含:i)重链CDR1,包含SEQ ID NO:21的31-35的氨基酸序列;和ii)重链CDR2,包含SEQ ID NO:21的50-65的氨基酸序列;和iii)重链CDR3,包含SEQ ID NO:21的95-102的氨基酸序列;和

b)轻链可变区,包含:i)轻链CDR1,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的24-34的氨基酸序列;和ii)轻链CDR2,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的50-56的氨基酸序列;和

iii)轻链CDR3,包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27的89-97的氨基酸序列;或II)其变体,其与所述可变区相同,除了在所述重链可变区的所述CDR区内最多组合共有6个氨基酸置换以及在所述轻链可变区的所述CDR区内最多组合共有6个氨基酸置换之外,其中所述抗体或其变体抑制MASP-2-依赖性补体活化。

[0644] 实施例15

本实施例描述了MASP-1和MASP-3的单克隆抗体的产生,使用包含修饰的DT40细胞系DTLacO的体外系统。

[0645] 背景/原理:

使用包含修饰的DT40细胞系DTLacO的体外系统,产生针对人MASP-1和MASP-3的抗体,所述系统允许特定多肽的多样化的可逆诱导,如WO2009029315和US2010093033中的进一步描述。DT40是已知在培养中其重链和轻链免疫球蛋白(Ig)基因发生组成型突变的鸡B细胞系。正如其它B细胞,该组成型诱变将突变靶向Ig基因的V区,和因此,所表达抗体分子的CDR。DT40细胞中的组成型诱变是通过基因转化而发生,使用作为供体序列的位于各功能性V区上游的一组非-功能性V基因区段(假-V基因;ψV)。先前已经证明ψV区的缺失引起多样化机制的转换(从基因转化到体细胞超变),所述机制通常可见于人B细胞。已经证明DT40鸡B细胞淋巴瘤细胞系对于离体的抗体进化而言是有希望的起点(Cumbers,S.J.等人,Nat Biotechnol 20,1129-1134(2002);Seo,H.等人,Nat Biotechnol 23,731-735(2005))。DT40细胞在培养中稳定增殖,倍增时间为8-10小时(与人B细胞系的20-24hr相比),它们支持非常有效的同源基因打靶(Buerstedde,J.M.等人,Embo J 9,921-927(1990))。鉴于DT40细胞可以进入多样化、基因转化和体细胞超变的2种独特的生理途径,其分别产生模板化和非模板化的突变,因此DT40细胞控制大量潜在的V区序列多样化(Maizels,N.Annu Rev Genet 39,23-46(2005))。多样化的重链和轻链免疫球蛋白(Ig)以细胞表面展示的IgM的形式表达。表面IgM具有双价形式,结构上类似于IgG分子。可以通过与固定的可溶性的或膜展示的抗原形式结合,而分离展示对特定抗原具有特异性的IgM的细胞。然而,对于抗体进化,使用DT40细胞在实践中是受限的,因为正如在其它转化的B细胞系中,多样化以小于1%生理比率而发生。

[0646] 在用于本实施例的系统中,正如WO2009029315和US2010093033所述,DT40细胞经改造以加速Ig基因多样化率,而不牺牲进一步进行遗传修饰的能力或者基因转化和体细胞超变以促进诱变的潜力。对DT40进行了两个关键性修饰,以增加多样化率,并因此在我们的细胞文库中增加结合特异性的复杂性。首先,在强效大肠杆菌乳糖操纵子/阻遏物调节性网络的控制之下进行Ig基因多样化。将由强效大肠杆菌乳糖操纵子的大约100个聚合重复单位组成的多聚物(PolyLacO)插入到通过同源基因打靶而重排和表达的Igλ和IgH基因的上游。然后可将融合到乳糖阻遏蛋白(LacI)上的调节因子与LacO调节元件相连,以调控多样化,利用乳糖阻遏物对操纵子DNA的高亲和性($k_D = 10^{-14}$M)。与进行任何改造之前的亲代DT40细胞相比,DT40 PolyLacO-λ_R细胞(其中PolyLacO仅在Igλ整合)在Ig基因多样化率上表现出5倍的增加(Cummings,W.J.等人,PLoS Biol 5,e246(2007))。在经改造而携带同时靶向Igλ和IgH基因的PolyLacO的细胞("DTLacO")中,多样化进一步升高。相对于亲代DT40 PolyLacO-λ_R LacI-HP1系的2.8%特征,DTLacO细胞已证明其多样化率升高了2.5-至9.2-倍。因此,相对于DT40亲代细胞系,将PolyLacO元件靶向重链和轻链基因,加速了多样化达

21.7倍。将调节因子与Ig基因座相连,不仅改变了诱变频率,而且可改变诱变途径,产生独特序列变化的更大的集合(Cummings等人,2007;Cummings等人,2008)。第二,产生了序列起点的多样化集合,用于连接的因子-加速的Ig基因多样化。通过将重排的Ig重链可变区(分离自2月龄鸡)靶向重链基因座,将这些多样化序列起点加到DTLac0。这些重链可变区的加入产生了10^7个新起点谱(repertoire),用于抗体多样化。将这些新起点构建到DTLac0细胞系中,允许鉴定与特定靶结合的克隆,并随之允许通过连接的因子所致的快速亲和性成熟。亲和性成熟后,通过将成熟的、重排的重链-和轻链-可变序列(VH和Vλ;包括鸡构架区和互补决定区或CDR)克隆到含有人IgG1和λ恒定区的表达载体中,产生全长、重组嵌合IgG。这些重组mAb适于体外和体内应用,并且它们可用作人源化的起点。

[0647] 方法:

对MASP-1和MASP-3抗原结合的选择

通过结合DTLac0群体,进行初步选择,所述群体是通过以下方式而多样化:通过基因靶向到与人MASP-1(SEQ ID NO:10)和MASP-3抗原(SEQ ID NO:8)复合的珠;并且随后通过FACS选择,使用荧光标记的可溶性抗原(Cumbers,S.J.等人,Nat Biotechnol20,1129-1134(2002);Seo,H.等人,Nat Biotechnol23,731-735(2005)。因为MASP-1和MASP-3之间共享的α链中的保守氨基酸序列(见图5)和独特的β链序列(见图6),进行了MASP-1和MASP-3的结合剂的单独的、平行的筛选,以鉴定MASP-1特异性mAb、MASP-3特异性mAb以及能够与MASP-1和MASP-3两者结合的(双重-特异性)mAb。2种形式的抗原用于选择和筛选结合剂。首先,将与Fc结构域融合的重组MASP-1或MASP-3(全长或片段)与Dynal磁性蛋白G珠结合或用于基于FACS的选择,使用PECy5-标记的抗人IgG(Fc)第二抗体。或者,将重组形式的MASP-1或MASP-3蛋白用Dylight粉直接标记并用于选择和筛选。

[0648] 结合和亲和性

通过将PCR扩增的V区克隆到支持人IgG1在293F细胞中表达的载体中,产生重组抗体(Yabuki等人,PLoS ONE,7(4):e36032(2012))。通过用不同浓度的荧光-标记的可溶性抗原染色表达结合MASP-1或MASP-3的抗体的DTLac0细胞,来测定饱和结合动力学。分别如实施例17和18所述,进行用于MASP-3特异性活性(包括MASP-3-依赖性C3b沉积和MASP-3-依赖性因子D切割)的功能测定法。如下所述,进行MASP-1-特异性活性(即抑制MASP-1-依赖性C3b沉积)的功能测定法。

[0649] 结果:

所用上述方法,产生多种MASP-1和MASP-3的结合抗体。如FACS分析所示,对于在MASP-3结合剂的筛选中分离的代表性的克隆M3J5和M3M1,描述了结合。

[0650] 图30A是对于DTLac0克隆M3J5,MASP-3抗原/抗体结合的FACS直方图。图30B是对于DTLac0克隆M3M1,MASP-3抗原/抗体结合的FACS直方图。在图30A和30B中,灰色填充曲线是IgG1-染色的阴性对照,黑色曲线是MASP-3-染色。

[0651] 图31图示表示对于MASP-3抗原,克隆M3J5(克隆5)的饱和结合曲线。如图31所示,M3J5抗体对MASP-3的表观结合亲和性为大约31nM。

[0652] 使用标准方法,对已鉴定的克隆进行序列分析。将所有克隆与共同的(DT40)VH和VL的序列比较并且彼此比较。提供两个前述克隆M3J5和M3M1的序列,与2个额外代表性的克隆D14和1E10进行比对,后两者分别是在MASP-1和MASP-3的CCP1-CCP2-SP片段的筛选中鉴

定出来的。D14和1E10与MASP-1和MASP-3两者共有的区域结合。

[0653] 图32A是M3J5、M3M1、D14和1E10的VH区与鸡DT40 VH序列的氨基酸序列的比对。

[0654] 图32B是M3J5、M3M1、D14和1E10的VL区与鸡DT40 VL序列的氨基酸序列的比对。

[0655] 每个克隆的VH和VL的氨基酸序列提供如下。

[0656] 重链可变区(VH)序列

图32A显示了亲代DTLac0(SEQ ID NO:24)、MASP-3-结合克隆M3J5(SEQ ID NO:25)以及M3M1(SEQ ID NO:26)和MASP-1/MASP-3双重结合克隆D14(SEQ ID NO:30)和1E10的重链可变区(VH)序列的氨基酸比对。

[0657] 以下VH序列中的Kabat CDR位于以下氨基酸位置:H1:aa 31-35;H2:aa 50-62;和H3:aa 95-102。

[0658] 以下VH序列中的Chothia CDR位于以下氨基酸位置:H1:aa 26-32;H2:aa 52-56;和H3:aa 95-101。

[0659] 亲代DTLac0VH(SEQ ID NO:24)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSNAMGWVRQAPGKGLEWVAGIDDDGSGTRY
APAVKGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYYCTKCAYSSGCDYEGGYIDAWGHGTE
VIVSS

克隆M3J5VH:(SEQ ID NO:25)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFTFSSYAMGWMRQAPGKGLEYVAGIRSDGSFTLYA
TAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYFCTRSGNVGDIDAWGHGTEVIVSS

克隆M3M1VH:(SEQ ID NO:26)

AVTLDESGGGLQTPGGGLSLVCKASGFDFSSYQMNWIRQAPGKGLEFVAAINRFGNSTGHG
AAVKGRVTISRDDGQSTVRLQLSNLRAEDTATYYCAKGVYGYCGSYSCCGVDTIDAWGHG
TEVIVSS

克隆D14VH:(SEQ ID NO:30)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAGIYKSGAGTNY
APAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTGTYYCAKTTGSGCSSGYRAEYIDAWGHGT
EVIVSS

克隆1E10VH:(SEQ ID NO:32)

AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSYDMVWVRQAPGKGLEFVAGISRNDGRYTE
YGSAVKGRATISRDNGQSTVRLQLNNLRAEDTATYYCARDAGGSAYWFDAGQIDAWGHG
TEVIVSS

轻链可变区(VL)序列

图32B显示了亲代DTLac0(SEQ ID NO:27)和MASP-3-结合克隆M3J5(SEQ ID NO:28)和M3M1(SEQ ID NO:29)和MASP-1/MASP-3双重结合克隆D14(SEQ ID NO:31)和1E10(SEQ ID NO:33)的轻链可变区(VL)序列的氨基酸比对。

[0660] 亲代DTLac0VL(SEQ ID NO:27):

ALTQPASVSANLGGTVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDKRPSDIPSR
FSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

克隆M3J5VL(SEQ ID NO:28):

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGYSGYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIPS
RFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

克隆M3M1VL(SEQ ID NO:29):

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIPSRF
SGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

克隆D14VL:(SEQ ID NO:31)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIPSRF
SGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL

克隆1E10VL:(SEQ ID NO:33)

ALTQPASVSANPGETVKITCSGGGSYAGSYYYGWYQQKAPGSAPVTLIYYNNKRPSDIPSRF
SGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVLLEA-2(MASP-2-依赖性的)功能测定

MASP-1经由其活化MASP-2的能力而有助于LEA-2(参见图1)。Wieslab®补体系统筛选MBL测定法(Euro Diagnostica,Malmö,Sweden)在分离LEA-2-依赖性活化(即传统的凝集素途径活性)的条件下测定了C5b-C9沉积。按照制造商的说明书进行该测定法,用代表性的克隆1E10,其终浓度经测定为400nM。

[0661] 图33是柱状图,显示与测定试剂盒中提供的阳性血清以及同种型对照抗体比较的mAb 1E10的抑制活性。如所示图33,mAb 1E10证明部分抑制LEA-2-依赖性活化(通过抑制MASP-2的MASP-1-依赖性活化),而同种型对照抗体却不。在DTLac0系统中使用连接的因子,通过对MASP-1结合的该抗体的持续亲和性成熟,应该达到更强烈的抑制。

[0662] 对代表性的mAb的LEA-1(MASP-3-依赖性的)功能测定法描述于以下实施例17和18。

[0663] 结果概述:

以上结果表明DTLac0平台允许快速离体发现具有对LEA-1(如以下实施例17和18所示)和对LEA-2(如本实施例所示)的抑制性质的MASP-1和MASP-3单克隆抗体。

[0664] 实施例16

本实施例描述了MASP-1和MASP-2的多肽抑制剂的产生。

[0665] 原理:

MASP-1和MASP-2的特异性抑制剂即SGMI-1和SGMI-2的产生,描述于Heja等人,J Biol Chem 287:20290(2012)和Heja等人,PNAS109:10498(2012),其各自通过引用结合到本文中。SGMI-1和SGMI-2各自是36个氨基酸肽,其是从沙漠蝗(Schistocerca gregaria)蛋白酶抑制剂2的变体的噬菌体文库中选择出来的,其中蛋白酶结合环的8个位置中的6个是完全随机化的。随后的体外进化得到单特异性抑制剂,具有个位数的nM K_I值(Heja等人,J.Biol.Chem.287:20290,2012)。结构研究揭示出优化的蛋白酶结合环形成第一结合位点,其限定了这两种抑制剂的特异性。延长的第二和内部结合区的氨基酸序列对于这两种抑制剂是共有的并促成接触界面(Heja等人,2012.J.Biol.Chem.287:20290)。从机制上看,SGMI-1和SGMI-2都阻断补体活化的凝集素途径,而不影响经典或替代途径(Heja等人,2012.Proc.Natl.Acad.Sci.109:10498)。

[0666] SGMI-1和SGMI-2抑制剂的氨基酸序列如下:

SGMI-1-全长:LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAFCTRKLCYQ(SEQ ID NO:34)

SGMI-2-全长:LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ(SEQ ID NO:35)

SGMI-1和SGMI-2分别是MASP-1和MASP-2的高特异性抑制剂。然而,作为肽,它们在用于生物研究中具有有限的可能性。为了解决这些限制,我们将这些生物活性肽氨基酸序列移植到人IgG1 Fc区的氨基端,以产生Fc-融合蛋白。

[0667] 方法:

为了表达SGMI-IgG1 Fc融合蛋白,合成了编码SGMI-1(SEQ ID NO:34)和SGMI-2(SEQ ID NO:35)肽的多核苷酸(DNA 2.0)并将其插入到表达载体pFUSE-hIgG1-Fc2(InvivoGen)中的编码IL-2信号序列和人IgG1 Fc区的核苷酸序列(SEQ ID NO:36)之间。柔性多肽接头(例如SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:38)被包括在SGMI肽和IgG1 Fc区之间。

[0668] 柔性多肽接头序列:

GTGGGSGSSSRS(SEQ ID NO:37)

GTGGGSGSSS(SEQ ID NO:38)

所得构建体描述如下:

编码包含人IL-2信号序列、SGMI-1、接头和人IgG1-Fc的多肽融合物(pFUSE-SGMI-1Fc)的多核苷酸,如SEQ ID NO:39所示,其编码成熟多肽融合物,包含SGMI-1(下划线)、接头区(斜体)和人IgG1-Fc(并称为“SGMI-1Fc”),如SEQ ID NO:40所示。

[0669] SEQ ID NO:40

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAFCTRKLCYQ*GTGGGSGSSSRS*DKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

编码包含人IL-2信号序列、SGMI-2、接头和人IgG1-Fc的多肽融合物(pFUSE-SGMI-2Fc)的多核苷酸,如SEQ ID NO:41所示,其编码成熟多肽融合物,包含SGMI-2(下划线)、接头区(斜体)和人IgG1-Fc(并称为“SGMI-2Fc”),如SEQ ID NO:42所示。

[0670] SEQ ID NO:42

LEVTCEPGTTFKDKCNTCRCGSDGKSAVCTKLWCNQ*GTGGGSGSSSRS*DKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

重组蛋白的产生:

按照供应商的方案,用两个表达质粒(pFUSE-SGMI-1Fc(SEQ ID NO:39)和pFUSE-SGMI-2Fc(SEQ ID NO:41))中的一个,瞬时转染Freestyle 293-F或Expi293F细胞(Invitrogen)。在37℃孵育4天后,收获培养基。Fc-融合蛋白经A蛋白亲和色谱而纯化。

[0671] 测定凝集素途径活化的测定法

在甘露聚糖-包被的96孔板上测试SGMI-1Fc和SGMI-2Fc融合蛋白抑制C3b从1%血清中沉积的能力,其是凝集素途径活性的度量。在冰上将SGMI-1Fc和SGMI-2Fc与1%正常人

血清预孵育1小时,然后加入到包被甘露聚糖的孔中(2μg/孔)。如Schwaeble等人,PNAS108:7523,2011所述,通过ELISA测定C3b沉积。

[0672] 图34图示表示对于1%正常人血清加同种型对照、SGMI-1Fc或SGMI-2Fc,在浓度范围为0.15至1000nM时的C3b沉积水平。如图34所示,在甘露聚糖-包被的ELISA孔中,SGMI-1Fc和SGMI-2Fc两者都抑制C3b从正常血清中沉积下来,IC_{50}值分别为大约27nM和300nM。

[0673] 这些结果证明SGMI肽的MASP-1和MASP-2的抑制性功能在SGMI-1Fc和SGMI-2Fc融合蛋白中被保留下来。

[0674] 实施例17

在3MC血清中用金黄色葡萄球菌分析补体途径。

[0675] 背景/原理:

已经确定,在正常人血清存在或不存在时,通过暴露给非-固定化的液相甘露聚糖、酵母聚糖A或N-乙酰基半胱氨酸,MASP-3不被活化。然而,已经确定,在有和没有正常人血清(NHS)或热灭活的人血清(HIS)存在时,重组和天然MASP-3在热灭活的金黄色葡萄球菌表面上活化(数据未显示)。也已确定,在正常人血清存在时,C3b沉积发生在金黄色葡萄球菌表面上,并可以使用流式细胞术监测沉积。因此,按照本实施例所述,测定响应金黄色葡萄球菌的替代途径(AP),作为评价MASP-3对LEA-1的贡献的方式。

[0676] 方法:

重组MASP-3:将编码全长重组人MASP-3、截短的丝氨酸蛋白酶(SP)活性形式的MASP-3(CCP1-CCP2-SP)、和SP-灭活形式的MASP-3(S679A)的多核苷酸序列克隆到pTriEx7哺乳动物表达载体(Invivogen)中。所得表达构建体编码具有氨基-末端Strep标签和羧基-末端His_6标签的全长MASP-3或CCP1-CCP2-SP片段。按照制造商提供的方案,将表达构建体转染到Freestyle 293-F或Expi293F细胞(Invitrogen)中。在5%CO_2中在37℃培养3-4天后,重组蛋白用Streptactin亲和色谱来纯化。

[0677] 重组MASP-1:如以上对于重组MASP-3所述,产生全长或截短的CCP1-CCP2-SP形式的重组MASP-1,其有或无稳定化的R504Q(Dobo等人,J.Immunol 183:1207,2009)或SP灭活(S646A)突变并携带氨基-末端Step标签和羧基-末端His6标签。

[0678] 1.在3MC(人)血清中,在金黄色葡萄球菌上的C3b沉积和因子B切割。

[0679] 进行初步试验,以证明流式细胞术测定法能够如下检测AP-驱动的C3b沉积(AP-C3b)的存在或不存在。将5%的以下血清:正常人血清、因子B(因子B)-耗尽的人血清、因子D-耗尽的人血清和备解素-耗尽的人血清(得自Complement Technology,Tyler,Texas,USA)与测试抗体一起,在Mg^{++}/EGTA缓冲液或EDTA中混合,在4℃过夜。将热灭活的金黄色葡萄球菌(10^8/反应)加入到每种混合物中至总体积100μL并在37℃旋转40分钟。在洗涤缓冲液中洗涤细菌,将细菌沉淀物重悬于洗涤缓冲液中,分析每种样品的80μL等分试样在细菌表面上的C3b沉积,并使用流式细胞术,用抗人C3c(Dako,UK)对其进行测定。

[0680] C3b的流式细胞术检测结果见图35A。如图35A图面1所示,在EDTA存在时在正常人血清中(其已知不活化AP),未见C3b沉积(阴性对照)。在用Mg^{++}/EGTA处理的正常人血清中,仅凝集素-非依赖性补体途径可以起作用。在图面2中,使用Mg^{++}/EGTA缓冲液,因此AP是有活性的,并观察到AP-驱动的C3b沉积(阳性对照)。如图面3、4和5所示,分别在因子B-耗尽的、因子D-耗尽的和备解素-耗尽的血清中,不出所料,未见替代途径驱动的C3b沉积。这些结果

证明该测定法能够测定AP-依赖性C3b沉积。

[0681] 如上所述,进行C3b在金黄色葡萄球菌上沉积的测定法,以评价重组MASP-3在人3MC血清中重构AP(LEA-1)的能力,所述血清缺乏MASP-3(Rooryck C,等人,Nat Genet.43(3):197-203(2011))。测试了以下试剂组合。

[0682] 1.5%正常人血清+EDTA

2.5%正常人血清+Mg/EGTA

3.5%人3MC(MASP-$3^{-/-}$)血清+Mg^{++}/EGTA

4.5%人3MC(MASP-$3^{-/-}$)血清+Mg^{++}/EGTA加活性全长rMASP-3

5.5%人3MC(MASP-$3^{-/-}$)血清+Mg^{++}/EGTA加截短的活性rMASP-3(CCP1/CCP2/SP)

6.5%人3MC(MASP-$3^{-/-}$)血清+Mg^{++}/EGTA加无活性rMASP-3(S679A)

7.5%人3MC(MASP-$3^{-/-}$)血清+Mg^{++}/EGTA加活性全长rMASP-1

将上述的5%血清和重组蛋白(各5μg)的不同混合物在指定缓冲液条件(Mg^{++}/EGTA缓冲液或EDTA)中在4℃孵育过夜。孵育过夜后,将10^8热灭活的金黄色葡萄球菌加入到各混合物中,总体积100μL,并在37℃旋转40分钟。细菌经洗涤并重悬于洗涤缓冲液中,通过FACS分析每种样品的80μL等分试样的C3b沉积。每种样品的剩余20μL等分试样用于通过蛋白质印迹来测定因子B切割,使用下述的抗因子B抗体。

[0683] C3b的流式细胞术检测结果见图35B。图面编号对应于以上概述的每种试剂组合的编号。阴性对照(图面1)和阳性对照(图面2)显示C3b沉积不存在和存在,正如所料。图面3显示了在3MC血清中,AP-驱动的C3b沉积不存在。图面4和5显示活性全长rMASP-3(图面4)和活性rMASP-3(CCP1-CCP2-SP)(图面5)两者在3MC血清中都恢复了AP-驱动的C3b沉积。图面6显示了无活性rMASP-3(S679A)在3MC血清中不恢复AP-驱动的C3b沉积。图面7显示了rMASP-1在3MC血清中不恢复AP-驱动的C3b沉积。

[0684] 总之,这些结果证明MASP-3是在人血清中的AP-驱动的C3b沉积在金黄色葡萄球菌上所需要的。

[0685] 2.因子B的MASP-3-依赖性活化

为了分析因子B的MASP-3-依赖性活化,如上所述地测定上述的5%血清(正常人血清或3MC患者血清)和重组蛋白的不同混合物。从各反应混合物中,取出20μL并加入到蛋白样品装载缓冲液中。将样品在70℃加热10分钟并装载到SDS-PAGE凝胶上。进行蛋白质印迹分析,使用因子B多克隆抗体(R&D Systems)。通过形成两个较低分子量切割产物(Bb和Ba)(衍生自较高分子量前-因子B蛋白),因子B的活化是明显的。

[0686] 图36显示了在响应金黄色葡萄球菌时,在3MC血清中在rMASP-3存在或不存在时测定因子B切割的蛋白质印迹分析结果。如泳道1所示,在EDTA存在时的正常人血清(阴性对照,泳道1)显示出非常少的因子B切割,相对于在Mg^{++}/EGTA存在时的正常人血清而言,如泳道2(阳性对照)所示。如泳道3所示,3MC血清在Mg^{++}/EGTA存在时显示出非常少的因子B切割。然而,如泳道4所示,通过将全长、重组MASP-3蛋白(5μg)加入3MC血清中并预孵育,恢复了因子B切割。

[0687] 3.在因子B/C3(H2O)切割中,检测rMASP-3对前因子D的作用的测定法进行以下测定法,以确定因子B的MASP-3-依赖性活化/切割的最低要求。

[0688] 将C3(H_2O)(200ng)、纯化的血浆因子B(20μg)、重组前因子D(200ng)和重组人

MASP-3(200ng)以不同组合而混合在一起(如图37所示),总体积为在BBS/Ca^{++}/Mg^{++}中的100μL,并在30℃孵育30分钟。通过加入含有5%2-巯基乙醇的25uL SDS装载染料而终止反应。在振摇(300rpm)下在95℃煮沸10分钟后,将混合物在1400rpm离心5分钟,然后将20uL上清液装载到10%SDS凝胶上并分离。凝胶用考马斯亮蓝染色。

[0689] 结果:

图37显示了考马斯染色的SDS-PAGE凝胶,其中分析了因子B切割。如泳道1所示,因子B切割在C3、MASP-3和前因子D存在时是最佳的。如泳道2所示,绝对需要C3;然而,如泳道4和5所示,MASP-3或前因子D都能介导因子B切割,只要C3存在。

[0690] 4.对MASP-3mAb抑制MASP-3-依赖性AP-驱动的C3b沉积的能力的分析如本实施例所述,已经证明了在人血清中,MASP-3是AP-驱动的C3b沉积在金黄色葡萄球菌上所需要的。因此,进行以下测定法,以确定如实施例15中所述而鉴定的代表性的MASP-3mAb是否能抑制MASP-3活性。在冰上,将有活性的、重组MASP-3(CCP1-CCP2-SP)片段蛋白(250ng)与同种型对照mAb、mAb1A5(得自DTLac0平台的对照,其不与MASP-3或MASP-1结合)、或mAbD14(与MASP-3结合)以3种不同浓度(0.5、2和4μM)预孵育1小时。将酶-mAb混合物暴露给5%3MC血清(缺乏MASP-3)和5x10^{7}热灭活的金黄色葡萄球菌,最终反应体积50μL。将反应物在37℃孵育30分钟,然后染色,用于检测C3b沉积。通过流式细胞术分析染色后的细菌细胞。

[0691] 图38图示表示在3MC血清中在rMASP-3存在时,得自3种抗体的C3b染色的平均荧光强度(MFI)对于mAb浓度作图。如图38所示,mAbD14表现出以浓度-依赖性方式抑制C3b沉积。相比之下,对照mAbs都不抑制C3b沉积。这些结果证明mAbD14能够抑制MASP-3-依赖性C3b沉积。在DTLac0系统中使用连接的因子,通过对MASP-3结合的该抗体的持续亲和性成熟后,预期mAbD14的改进的抑制活性。

[0692] 结果概述:

总之,本实施例的结果表明在缺乏MASP-3的血清中明显缺乏AP。因此,MASP-3已被证明对AP作出关键性贡献,使用因子B活化和C3b沉积作为功能终点。此外,加入功能性的、重组MASP-3(包括MASP-3的催化活性C-末端部分),纠正了在来自3MC患者的血清中的因子B活化和C3b沉积的缺陷。相反,如本实施例进一步证明的,在含有rMASP-3的3MC血清中加入MASP-3抗体(例如mAbD14),抑制AP-驱动的C3b沉积。以下观察结果证明了MASP-3在因子B活化中和因此在AP活化中的直接作用:重组MASP-3以及C3,足以活化重组因子B。

[0693] 实施例18

本实施例说明了MASP-1和MASP-3活化因子D。

[0694] 方法:

测试了重组MASP-1和MASP-3切割2种不同重组形式的前因子D的能力。第一种形式(前因子D-His)缺乏N-末端标签,但具有C-末端His标签。因此,这种形式的前因子D含有5个氨基酸前肽,其在活化期间被切割而除去。第二种形式(ST-前因子D-His)在N端具有Strep-TagII序列,因此将切割的N-末端片段增加至15个氨基酸。ST-前因子D在C末端也含有His_6标签。ST-前因子D-His的前肽的长度增加,与前因子D-HIS形式的可能分辨率相比,改善了切割和未切割形式的SDS-PAGE的分辨率。

[0695] 将重组MASP-1或MASP-3蛋白(2μg)加入到前因子D-His或ST-前因子D-His底物(100ng)中并在37℃孵育1小时。将反应物在12%Bis-Tris凝胶上进行电泳,以分离前因子D

和活性因子D切割产物。将分离的蛋白质移至PVDF膜上并通过蛋白质印迹,通过用生物素化因子D抗体(R&D Systems)检测来分析。

[0696] 结果:

图39显示了前因子D底物切割的蛋白质印迹分析。

[0697] 表18:图39中所示蛋白质印迹的泳道描述。

实验条件	泳道 1	泳道 2	泳道 3	泳道 4	泳道 5
前因子 D	+	+	+	+	+
rMASP-3 (全长)	-	+	–	–	–
rMASP-3a (S679A)	-	-	+	-	-
rMASP-1a (S646A)	-	-	-	+	-
rMASP-1 (CCP-1-CCP2-SP)	-	-	-	-	+

[0698] 如图39所示,仅全长MASP-3(泳道2)和MASP-1(CCP1-CCP2-SP)片段(泳道5)才切割ST-前因子D-His_6。无催化活性的全长MASP-3(S679A;泳道3)和MASP-1(S646A;泳道3)不能切割任一种底物。用前因子D-His_6多肽得到相同结果(未显示)。摩尔过量的MASP-1(CCP1-CCP2-SP)相对于MASP-3的比较表明,与MASP-1相比,MASP-3是前因子D切割的更有效的催化剂,至少在本文所述的条件下如此。

[0699] 结论:MASP-1和MASP-3两者都能切割和活化因子D。这一活性将LEA-1与AP活化直接联系起来。更具体地讲,MASP-1或MASP-3对因子D的活化,将会导致因子B活化、C3b沉积和可能的调理作用和/或细胞溶解。

[0700] 1.用MASP-3抗体抑制MASP-3-依赖性的前因子D切割的测定法如下进行测定法,以测定如实施例15中所述而鉴定的代表性的MASP-3和MASP-1mAb对MASP-3-依赖性因子D切割的抑制作用。将活性重组MASP-3蛋白(80ng)与1μg代表性的mAb D14、M3M1和对照抗体(其与MASP-1特异性结合,但不与MASP-3结合)在室温下预孵育15分钟。加入具有N-末端Strep-标签的前因子D(ST-前因子D-His,70ng)并将混合物在37℃孵育75分钟。然后将反应物电泳,印迹和用抗因子D染色,如上所述。

[0701] 图40是蛋白质印迹,显示mAb D14和M3M1的部分抑制活性,与含有仅MASP-3和ST-前因子D-His的对照反应物(无mAb,泳道1)以及含有得自DTLacO文库的mAb(其与MASP-1结合,而不与MASP-3结合)的对照反应物(泳道4)相比。如图40所示,在抑制性抗体不存在时,MASP-3将大约50%前因子D切割成因子D(泳道1)。对照MASP-1特异性抗体(泳道4)不改变前因子D与因子D的比率。相比之下,如泳道2和3所示,mAb D14和mAb M3M1两者都抑制MASP-3-依赖性的前因子D切割为因子D,导致所产生的因子D的减少。

[0702] 结论:这些结果证明MASP-3mAb D14和M3M1不能抑制MASP-3-依赖性因子D切割。在DTLacO系统中使用连接的因子,通过对MASP-3结合的这些抗体的持续亲和性成熟后,预期mAbD14和mAb M3M1的改进的抑制活性。

[0703] 实施例19

本实施例说明了MASP-3缺乏阻止了补体-介导的甘露聚糖-包被的WT兔红细胞的

溶解。

[0704] 背景/原理:

如本文的实施例5和6所述,MASP-2-和MASP-3-缺乏的血清对得自PNH小鼠模型的血液样品的红细胞溶解的作用,证明了MASP-2抑制和/或MASP-3抑制在治疗PNH受试者中的功效,并且也支持了使用MASP-2抑制剂和/或MASP-3抑制剂(包括双重或双特异性MASP-2/MASP-3抑制剂)以在经历用C5抑制剂例如eculizumab治疗的PNH受试者中改善C3片段-介导的血管外溶血的效果。

[0705] 如本实施例所述,在来自额外3MC患者的MASP-3缺乏的血清中进行了C3b沉积实验和溶血实验,证实了实施例5和6中获得的结果。另外,进行了实验,证明了将rMASP-3加入到3MC血清中,能够重构C3b沉积和溶血活性。

[0706] 方法:

MASP-3-缺乏的血清得自以下3个不同的3MC患者:

3MC患者1:含有携带突变的等位基因,所述突变使编码MASP-3丝氨酸蛋白酶结构域的外显子功能失调,其是由3MC患者的父母提供(两者是携带突变的等位基因的杂合体,所述突变使编码MASP-3丝氨酸蛋白酶结构域的外显子功能失调),

3MC患者2:在MASP-1外显子12、编码MASP-3的丝氨酸蛋白酶结构域的外显子中具有C1489T(H497Y)突变,导致非功能性MASP-3,但导致功能性MASP-1蛋白。

[0707] 3MC患者3:在MASP-1基因中具有经证实的缺陷,导致非功能性MASP-3和非功能性MASP-1蛋白。

[0708] 实验#1:C3b沉积测定

如Bitter-Suermann等人,Eur.J.Immunol 11:291-295(1981))所述,在传统的AP-特异性条件(BBS/Mg^{++}/EGTA无Ca^{++},其中BBS=含蔗糖的巴比妥缓冲盐水)下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上,进行AP测定法,血清浓度范围为0.5至25%,并且测定C3b沉积随时间的变化。

[0709] 结果:

图41图示表示在得自MASP-3-缺陷型(3MC)、C4-缺陷型和MBL-缺陷型受试者的血清样品中,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的AP-驱动的C3b沉积水平随血清浓度的变化。如图41所示和如下表18所述,来自患者2和患者3的MASP-3-缺陷型患者血清在高浓度(25%、12.5%、6.25%血清浓度)时具有残留的AP活性,但显著更高AP_{50}(即需要8.2%和12.3%血清以达到50%最大C3沉积)。

[0710] 图42A图示表示在得自MASP-3缺陷型、C4-缺陷型和MBL-缺陷型人类受试者的10%人血清样品中,在"传统的"AP-特异性条件(即BBS/EGTA/Mg^{++}无Ca^{++})下,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的AP-驱动的C3b沉积水平随时间的变化。

[0711] 下表19概述了图41所示的AP_{50}结果和图42A所示的C3b沉积的一半时间。

[0712] 表19:图41和42A中所示结果的概述

血清类型	AP_{50}(%)	$T_{1/2}$(min)
正常	4.5	26.3
MBL-缺陷型(MBL-/-)	5.7	27.5
C4-缺陷型(C4-/-)	5.1	28.6

3MC(患者3)	8.2	58.2
3MC(患者2)	12.3	72.4

注意:在BBS/Mg^{++}/EGTA缓冲液中,凝集素途径-介导的作用缺乏,因为该缓冲液中缺乏Ca^{++}。

[0713] 实验#2:通过蛋白质印迹分析3MC患者血清的原因子D裂解方法:血清从3MC患者#2(MASP-3(-/-)、MASP-1(+/+)),并从3MC患者#3(MASP-3(-/-)、MASP-1(-/-))得到。患者血清,连同来自正常供体(W)的血清,用SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离,并且将解析的蛋白质印迹至聚偏氟乙烯膜。用人因子D特异性抗体检测人原因子D(25040道尔顿)和/或成熟因子D(24405道尔顿)。

[0714] 结果:蛋白质印迹的结果示于图42B。如图42B所示,在正常供体(W)的血清中,因子D抗体检测到与成熟因子D(24405道尔顿)一致大小的蛋白质。如在图42B中进一步示出,在3MC患者#2(P2)和3MC患者#3(P3)血清中,因子D抗体检测到稍大蛋白质,这与原因子D(25040道尔顿)在这些3MC患者中的存在一致。

[0715] 实验#3:用3MC患者血清的Wieslab补体测定方法:根据制造商的说明,使用Wieslab补体系统Screen(Euro-Diagnostica,Malmö,Sweden),还测试了获自3MC患者#2(MASP-3(-/-)、MASP-1(+/+))和3MC患者#3(MASP-3(-/-)、MASP-1(-/-))的血清中的经典、凝集素和替代途径的活性。正常人血清作为对照平行试验。

[0716] 结果:图42C图示了用获自3MC患者#2、3MC患者#3的血浆和正常人血清,Weislab经典、凝集素和替代途径测定的结果。如图42C所示,在Wieslab测定的条件下,经典、替代和MBL(凝集素)途径均在正常人血清起作用。3MC患者#2(MASP-3(-/-)、MASP-1(+/+))的血清中,经典途径和凝集素途径是功能性的,但不存在可检测的替代途径的活性。3MC患者#3(MASP-3(-/-)、MASP-1(-/-))的血清中,经典途径是功能性的,但不存在可检测的凝集素途径活性和没有可检测的替代途径的活性。

[0717] 图42B和42C中的结果进一步支持我们对于MASP-1和MASP-3在LEA-1和LEA-2途径中作用的理解。具体地讲,在仅乏MASP-3的患者2血清中,不存在替代途径且凝集素途径具有几乎完全功能,证实了MASP-3对于替代途径激活是必需的。缺乏MASP-1和MASP-3两者的患者3血清已经失去激活凝集素途径以及替代途径的能力。这一结果证实功能性的LEA-2途径需要MASP-1,并且与实施例15和16以及表明MASP-1激活MASP-2的文献是一致的。两种血清明显不能激活原因子D,这也符合实施例18中描述的数据,该数据表明MASP-3裂解原因子D。这些观察结果与LEA-1和LEA-2途径一致,如图1中图解的。

[0718] 实验#4:测定甘露聚糖-包被的兔红细胞在人正常或3MC血清存在时(在Ca^{++}不存在时)细胞溶解的溶血测定法

方法:

在Ca^{++}不存在时制备兔RBC(即通过使用EGTA)

将兔全血(2mL)分到2个1.5mL微量离心管中并在4℃冷冻微量离心机中在8000rpm(大约5.9rcf)离心3分钟。重悬于冰冷的BBS/Mg^{++}/Ca^{++}(4.4mM巴比妥酸、1.8mM巴比妥钠、145mM NaCl,pH 7.4,5mM Mg^{++},5mM Ca^{++})后,将RBC沉淀物洗涤3次。第3次洗涤后,将沉淀物重悬于4mL BBS/Mg^{++}/Ca^{++}中。沉淀红细胞,并将RBC用BBS/0.1%明胶/Mg^{++}/Ca^{++}洗涤,如上所述。将RBC悬液在4℃贮存于BBS/0.1%明胶/Mg^{++}/Ca^{++}中。然后,100μl悬浮的RBC用1.4mL水

稀释并在8000rpm(大约5.9rcf)离心3分钟,将上清液在541nm处的OD调节至0.7(在541nm处的OD为0.7相当于大约10^9红细胞/mL)。然后,将1mL重悬的RBC(OD 0.7)加入到9ml BBS/Mg^{++}/EGTA中,以达到10^8红细胞/ml的浓度。在冰冷的BBS、Mg^{++}、EGTA中制备测试血清或血浆的稀释液,并将100μl每种血清或血浆稀释液移入圆底板的相应孔中。加入100μl适当稀释的RBC(10^8红细胞/mL)到各孔中。Nano-water用于产生阳性对照(100%细胞溶解),而BBS/Mg^{++}/EGTA无血清或血浆的稀释液用作阴性对照。然后将板在37℃孵育1小时。将圆底板在3250rpm离心5分钟。将来自各孔的上清液(100μL)移至平底板的相应孔中并在415-490处读取OD。

[0719] 结果:

图43图示表示在来自正常受试者和来自2个3MC患者(患者2和患者3)的血清中,在Ca^{++}不存在时测定的一系列血清浓度使甘露聚糖-包被的兔红细胞的溶血的百分率(通过溶解的兔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43所示,证明与正常人血清相比,MASP-3缺陷降低了补体-介导的甘露聚糖-包被的红细胞溶解的百分率。来自正常人血清的两条曲线和来自3MC患者的两条曲线之间的差异是显著的(p=0.013,Friedman检验)。

[0720] 下表20概述了图43所示的AP_{50}结果。

[0721] 表20:图43所示的结果概述

血清类型	AP_{50}(%)
正常人血清#1	7.1
正常人血清#2	8.6
3MC患者#2	11.9
3MC患者#3	14.3

注意:当将表20所示的血清样品合并时,正常人血清的AP_{50}值=7.9,3MC血清的AP_{50}值=12.8(p=0.031,Wilcox配对符号秩检验)。

[0722] 实验#5:由重组MASP-3重构的人3MC血清恢复在酵母聚糖包被板上的AP-驱动的C3b沉积

方法:

如Bitter-Suermann等人,Eur.J.Immunol 11:291-295(1981))所述,在酵母聚糖-包被的微量滴定板上,在传统的AP-特异性条件(BBS/Mg^{++}/EGTA无Ca^{++},其中BBS=含有蔗糖的巴比妥缓冲盐水)下,在以下血清样品中进行AP测定:(1)来自3MC患者#2的5%人血清并加入范围为0至20μg/ml的全长活性rMASP-3;(2)来自3MC患者#2的10%人血清并加入范围为0至20μg/ml的全长活性rMASP-3;和(3)来自3MC患者#2的5%人血清并加入范围为0至20μg/ml的无活性rMASP-3A(S679A)。

[0723] 结果:

图44图示表示在酵母聚糖-包被的微量滴定板上的AP-驱动的C3b沉积水平随加到得自人3MC患者2(MASP-3缺陷型)的血清样品中的rMASP-3蛋白的浓度的变化。如图44所示,活性重组MASP-3蛋白以浓度-依赖性方式重构在酵母聚糖-包被板上的AP-驱动的C3b沉积。如图44进一步所示,在含无活性rMASP-3(S679A)的3MC血清中未见C3b沉积。

[0724] 实验#6:由重组MASP-3重构人的3MC血清在3MC患者血清中恢复溶血活性方法:

使用兔RBC,使用以上实验#2中所述的方法进行溶血测定法,使用范围为0至12%血清的以下测试血清:(1)正常人血清;(2)3MC患者血清;(3)3MC患者血清加活性全长rMASP-3(20μg/ml);和(4)热灭活的人血清。

[0725] 结果:

图45图示表示在以下血清中,在Ca^{++}不存在时测定的一系列血清浓度使甘露聚糖-包被的兔红细胞的溶血的百分率(通过溶解的兔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):(1)正常人血清;(2)3MC患者血清;(3)3MC患者血清加活性全长rMASP-3(20μg/ml);和(4)热灭活的人血清。如图45所示,兔红细胞的溶血百分率在含有rMASP-3的3MC血清中显著增加,与在无重组MASP-3的3MC血清中的溶血百分率相比(p=0.0006)。

[0726] 图46图示表示在含有浓度范围为0至110μg/ml的活性rMASP-3(在BBS/Mg^{++}/EGTA中)的来自3MC患者2和来自3MC患者3的7%人血清中,兔红细胞溶解的百分率。如图46所示,一定量的rMASP-3以浓度-依赖性方式使兔RBC溶解百分率恢复至最多100%活性。

[0727] 实验#7:MASP-3缺陷型(3MC)患者血清具有功能性MASP-2,如果MBL存在的话方法:

使用甘露聚糖-包被的ELISA板进行C3b沉积测定法,以检测3MC血清是否缺乏LEA-2。将柠檬酸盐血浆在BBS缓冲液中系列稀释(开始于1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560)并铺板到甘露聚糖-包被板上。使用鸡抗人C3b测定法检测沉积的C3b。在来自正常人类受试者(NHS)、来自2个3MC患者(患者2和患者3)、来自患者3的父母和来自MBL-缺陷型受试者的血清中,评价在甘露聚糖-包被的ELISA板上的LEA-2驱动的C3b沉积(血浆稀释液高到使AP和LEA-1可起作用)随人血清浓度的变化。

[0728] 结果:

图47图示表示对于来自正常人类受试者(NHS)、来自2个3MC患者(患者2和患者3)、来自患者3的父母和来自MBL-缺陷型受试者的血清,在甘露聚糖-包被的ELISA板上的LEA-2-驱动的(即MASP-2-驱动的)C3b沉积水平随在BBS缓冲液中稀释的人血清浓度的变化。这些数据表明患者2是MBL足够的。然而,患者3和患者3的母亲是MBL缺陷型,因此他们的血清不能经由LEA-2将C3b沉积在甘露聚糖上。在这些血清中替换MBL,在患者3(其是SNP纯合体,导致MASP-3缺陷)和他的母亲(其对于突变的MASP-3等位基因是杂合体)的血清中恢复了LEA-2介导的C3b沉积(数据未显示)。该发现说明了3MC血清不缺乏LEA-2,而是看来具有功能性MASP-2。

[0729] 总概述和结论:

这些结果证明在人血清中的MASP-3缺陷导致AP活性的损失,正如在酵母聚糖-包被的孔上的C3b沉积减少和兔红细胞溶解减少所证明的那样。在这两种测定法中通过给血清补充功能性的重组人MASP-3可恢复AP。

[0730] 实施例20

本实施例描述了鼠黄斑变性模型中MASP-2-/-的结果。

[0731] 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。

[0732] 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 Ophthalmology48:257-293,2003)。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。

[0733] 方法:

如实施例1中所述生成MASP-2-/-小鼠,用C57Bl/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,

诱导脉络膜新生血管生成(CNV):激光光凝(532nm,200mW,100ms,75μm;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。

[0734] 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。

[0735] 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0.5%的FITC-异凝集素B4(Vector laboratories,Burlingame,CA)孵育眼杯过夜,用含有0.2%BSA和0.1%的Triton X-100的PBS稀释。FITC--异凝集素B4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。

[0736] 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(1μm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。

[0737] 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。

[0738] 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 $MgCL_2$、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+/-SEM并使用Mann Whitney U检验比较。零假设在P<0.05拒绝。

[0739] 结果:

VEGF水平的评估:

图48A图出了在第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48A所示,VEGF水平的评估表明相对于C57B1/6野生型对照小鼠,MASP-2(-/-)小鼠中基线水平的VEGF降低。图48B图示了激光诱导损伤后第三天测得的VEGF蛋白水平。如图48B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。

[0740] 脉络膜新生血管形成(CNV)的评估:

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49图示了在激光诱导损伤后第7天在C57b1/6野生型小鼠和MASP-2(-/-)小鼠中测得的CNV体积。如图49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%。

[0741] 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将具有预防或治疗性效果。

[0742] 实施例21

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MASP-2Moab的功效。

[0743] 背景/原理:

如在实施例11和12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MASP-2抗体的药效动力学参数(如实施例13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MASP-2全长抗体,如Bora P.S.等,JImmunol 174:491-497(2005)所述。

[0744] 方法:

在如实施例20所述的年龄相关性黄斑变性(AMD)的小鼠模型中I,测试如实施例13所述源自Fab2#11的小鼠IgG2a全长MASP-2抗体同种型,其中改动如下。

[0745] 小鼠MASP-2MoAb的给药

CNV诱导前16小时,将两个不同剂量(0.3mg/kg和1.0mg/kg)的小鼠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)。

[0746] 诱导脉络膜新生血管形成(CNV)

如实施例20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。

[0747] 结果:

图50图示了在用同种型对照MoAb或小鼠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50所示,在预先用1.0mg/kg 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<0.01)减少。如在图50中进一步示出,观察到0.3mg/kg剂量的MASP-2MoAb不能有效减少CNV。应该注意的是,0.3mg/kg剂量的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13中描述并在图29A示出的。

[0748] 本实施例中所述的结果证明用抑制剂例如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,这些结果与在实施例20中描述的MASP-2(-/-)小鼠中进行的研究所观察到的结果一致,在实施例20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。

[0749] 实施例22

本实施例描述了在小鼠心肌缺血/再灌注模型中分析MASP-2(-/-)小鼠。

[0750] 背景/原理:

甘露糖结合凝集素(MBL)是以不依赖于免疫复合物的方式,响应于宽范围的碳水化合物结构而启动补体活化的循环分子。这些结构可以是感染剂或改变的内源的碳水化合物部分的组分,特别是在坏死、肿胀或凋亡细胞内。这些形式的细胞死亡发生在再灌注的心肌中,其中补体活化有可能使损伤超出在局部缺血被再灌注终止时刻存在的边界而延伸。虽然有令人信服的证据表明补体活化加重心肌再灌注,但所述活化的机制还不是很清楚,抑制所有已知途径很可能有无法忍受的不利影响。最近的一项研究表明,活化可能涉及MBL,而不是经典途径或替代扩增环(如本发明中所定义的),因为在MBL(A/C)-而不是C1q-缺失小鼠中梗死减少(Walsh M.C.等,Jour ofImmunol.175:541-546(2005))。然而,虽然令人鼓舞,但这些小鼠仍然具有能够通过凝集素途径激活补体的循环组分如纤维胶凝蛋白A。

[0751] 本研究研究了MASP-2(-/-)小鼠与野生型(+/+)对照,以确定MASP-2(-/-)对心肌缺血和再灌注损伤是否更不敏感。MASP-2(-/-)小鼠经受局部缺血并且将梗塞面积与其野生型同窝小鼠进行了比较。

[0752] 方法:以下方案基于用于诱导局部缺血/再灌注损伤的过程,先前由Marber等,J.Clin Invest.95:1446-1456(1995)描述。

[0753] 如实施例1中所述生成MASP-2(-/-)小鼠并用C57BL/6回交至少10代。用氯胺酮/美托咪定(分别100mg/kg和0.2mg/kg)麻醉7只MASP-2(-/-)小鼠和7只野生型(+/+)小鼠,并将其仰卧置于恒温控制加热垫上,以维持直肠温度在37±0.3℃。将小鼠在直视下插管并以110/分钟的呼吸速率和225微升/分钟的潮气量通入室内空气(Ventilator-Hugo Sachs Elektronic MiniVent Type 845,Germany)。

[0754] 皮毛被剃光,并从左侧腋窝到剑突产生前外侧皮肤切口。解剖胸大肌,在其胸骨缘切断,并移进腋窝坑。胸小肌在其颅缘切断并向尾端移动。肌肉后来被用作肌皮瓣,在冠状动脉闭塞期间覆盖心脏。在左肺边缘稍稍内侧的点用镊子渗透第五肋间隙和胸膜壁层的肌肉,从而避免了肺或心脏的损伤。胸膜渗透后,将镊子小心地从胸膜外引向胸骨而不触及心脏,并且胸膜和肋间肌用电池驱动烧灼器(Harvard Apparatus,UK)解剖。特别注意要避免任何出血。使用相同的技术,将开胸术延伸到腋中线。在其胸骨缘切割第四肋后,肋间隙变宽,直到整个心脏从底部到尖端暴露。用两个小动脉钳,打开心包,心包支架适于使心脏向前轻微移动。左冠状动脉前降支(LAD)暴露,然后带有圆形针的8-0单纤维缝合线在LAD下通过。在LAD结扎的部位就位于左心房尖端尾部,沿着从房室顶部到左心室尖端贯穿的线约1/4。

[0755] 所有实验以盲方式进行,研究者不知道每个动物的基因型。仪器操作和外科手术完成后,让小鼠有15分钟的平衡期。然后小鼠经历冠状动脉闭塞30分钟,再灌注时间120分钟。

[0756] 冠状动脉闭塞和再灌注模型

冠状动脉闭塞使用吊重系统(hanging weight system)来实现,如先前所述(Eckle等,Am JPhysiol Heart Circ Physiol291:H2533-H2540,2006)。将单丝结扎的两端通过2毫米长的一段塑胶PE-10管和使用氰基丙烯酸酯胶附着到5-0缝合线长度。然后将缝合线引导到两个水平安装的可动金属杆上,将各1g团块附着到缝合线的两端。通过抬高杆,悬吊团块,并将缝合线置于受控张力下以用限定和恒定的压力闭塞LAD。LAD闭塞通过风险面积的淡色度验证,将LAD灌注区的颜色由鲜红变至紫色,说明停止血流。再灌注通过降低杆实现,直到团块平放在手术垫上,并缓解结扎的张力。再灌注通过用来验证闭塞的相同三个标准验证。如果在开始冠状动脉闭塞或在再灌注15分钟内分别没有达到所有这三个标准,则小鼠被排除进行进一步分析。在冠状动脉闭塞期间,心脏表面的温度和湿度通过用胸小肌瓣覆盖心脏和通过用0.9%盐水湿纱布密封开胸术得以保持。

[0757] 测量心肌梗死面积:

梗死面积(INF)和风险面积(AAR)由面积法确定。静脉注射500I.U肝素后,LAD被重新闭塞,将300微升5%(重量/体积)伊文思蓝(Sigma-Aldrich,Poole,UK)缓慢注射到颈静脉以划定风险面积(AAR)。这种策略使染料进入左心室的非缺血区并使缺血AAR未染色。在小鼠通过颈椎脱位被安乐死后,心脏被迅速去除。心脏在冰上冷却,并安装在5%琼脂糖块中,然后切成800微米厚的8个横向切片。用溶解在调节至pH7.4的0.1M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4缓冲液中的3%2,3,5-三苯基氯化四唑(Sigma-Aldrich,Poole,UK)将所有切片在37℃下孵育20分钟。切片在10%的甲醛中固定过夜。切片置于两个盖玻片之间,每个切片的侧面利用高

分辨率光学扫描器进行数字成像。数字图像然后利用SigmaScan软件(SPSS,US)分析。通过识别其颜色外观和颜色边界概述了各切片中梗塞区(淡)、左心室(LV)风险面积(红色)和正常灌注的LV区(蓝色)的大小。在各切片的两侧上对面积进行量化并由研究者平均化。梗死面积计算为每只动物风险面积的%。

[0758] 结果:图51A示出了在进行上述冠状动脉闭塞和再灌注技术后,评价7只WT(+/+)小鼠和7只MASP-2(-/-)小鼠,测定其梗塞面积。如图51A所示,相对于WT(+/+)小鼠,MASP-2(-/-)小鼠显示梗塞面积的统计学显著减少($P<0.05$),表明在缺血再灌注模型中免于损害的保护心肌作用。图51B示出了测试的个体动物的分布,表明对MASP-2(-/-)小鼠的明确保护作用。

[0759] 实施例23

该实施例描述在鼠心肌缺血/再灌注模型中MASP-2(-/-)小鼠的分析。

[0760] 背景/原理:

为了评估在冠状动脉缺血损伤后MASP-2对炎性再灌注损伤的贡献,在如Marber等,J.Clin Invest.95:1446-1456(1995)所述鼠缺血/再灌注(MIRP)模型中以及在Langendorff分离的灌注小鼠心脏模型中,比较了MASP-2(-/-)和MASP-2(+/+)小鼠。

[0761] 方法:

本研究中使用的MASP-2(-/-)小鼠如实施例1中描述的产生。采用实施例22所述的方法,在8只WT(MASP-2(+/+)和11只MASP-2(-/-)小鼠中,实施左心室的缺血性损伤。通过如实施例22中所述的面积法测定梗塞面积(INF)和风险面积(AAR)。

[0762] Langendorff分离的灌注小鼠心脏模型:从小鼠制备心脏用于Langendorff分离的灌注小鼠心脏模型的方法如F.J.Sutherland等,Pharmacol Res 41:613(2000)所述进行。亦参见A.M.Kabir等,.Am J Physiol Heart Circ Physiol 291:H1893(2006);Y.Nishino等,Circ Res103:307(2008)和I.G.Webb等,Cardiovasc Res(2010)。

[0763] 简要地描述,WT(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠用腹膜内给予戊巴比妥(300mg/kg)和肝素(150单位)而麻醉。迅速分离心脏并将其放置在冰冷的改良Krebs-Henselit缓冲液(KH,118.5mmol/l NaCl,25.0mmol/l $NaHCO_3$,4.75mmol KCl,$KH_2PO_4$1.18,$MgSO_4$1.19,D-葡萄糖11.0和$CaCl_2$1.41)。将切断的心脏安装到具有水套的Langendorff装置中,并以80毫米汞柱的恒定压力用95%O_2和5%CO_2平衡的KH缓冲液逆行灌注。灌注液的温度保持在37℃。插入左心室的流体填充的气球监视收缩功能。该气球逐渐膨胀,直到舒张末期压力为介于1和7毫米汞柱。用0.075毫米银线(Advent)以580bpm执行心房起搏。冠状动脉血流通过定时采集灌注液而测量。

[0764] 体外梗死评估

逆行灌注开始后,使心脏稳定30分钟。对于包括,所有心脏必须满足以下标准:冠脉流量1.5-4.5mL/分钟,心率>300bpm(未起搏),左心室形成压>55毫米汞柱,从开胸术到主动脉插管的时间<3分钟,和稳定过程中没有持续性心律失常。然后在不存在血清时进行全身缺血和再灌注。然后通过夹闭动脉流入管使所有心脏进行全身缺血30分钟,随后再灌注2小时。

[0765] 当缺血期间收缩停止时,终止电起搏并重新启动30分钟到再灌注。再灌注2小时后,用5ml的1%三苯基氯化四唑(TTC)/KH灌注心脏,持续1分钟,然后在37℃将其放置相同

溶液达10分钟。然后除去心房,将心脏吸干,称重,并储存在-20℃下至多1周。

[0766] 然后解冻心脏,将其置于2.5％戊二醛1分钟,并置于5％琼脂糖。然后使用vibratome(Agar Scientific)从顶点到底部以0.7毫米切片切割琼脂糖心脏块。切片后,将切片在室温下放置在10％甲醛中过夜,然后在4℃转移到PBS中,持续额外的一天。然后将切片在Perspex板之间(0.57毫米的间隔)压缩,并用扫描器(Epson model G850A)成像。放大后,使用图像分析软件(SigmaScan Pro 5.0,SPSS)实施面积法,并且通过将整个的表面区域和TTC阴性的左心室心肌乘以组织厚度而转化为体积。在每一个心脏内,单独的切片求和后,TTC-阴性梗死体积表示为左心室容积的百分比,或针对左心室容积作图。

[0767] 结果:

在每个切片中通过识别其颜色外观和颜色边界概述了梗塞区(淡)、左心室(LV)风险面积(红色)和正常灌注的LV区(蓝色)的大小。对各切片两侧的面积进行了量化并通过研究者平均化。每只动物的梗死体积计算为风险区的％(％RZ)。

[0768] 图52A示出了在进行上述冠状动脉闭塞和再灌注技术后,评价8只WT(+/+)小鼠和11只MASP-2(-/-)小鼠,测定其梗塞面积。图52A图示了平均风险面积(AAR,受缺血影响区域的量度)和梗塞体积(INF,心肌损害的量度),为总心肌体积的百分比。如图52A所示,尽管两组间AAR没有差异,但与其WT同窝小鼠相比,INF体积在MASP-2(-/-)小鼠中显著降低,从而表明在该MIRP模型中在不存在MASP-2时免于心肌损伤的保护作用。

[0769] 图52B图示了针对作为左心室(LV)心肌体积％的AAR作图的INF之间的关系。如图52B所示,对于任何给定的AAR,与其WT同窝小鼠比较,MASP-2(-/-)动物的梗塞面积表现出高度显著减少。

[0770] 图52C和52D示出在缓冲液灌注的WT(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠心脏中心肌梗塞的结果,所述小鼠按照Langendorff分离的灌注小鼠心脏模型制备,其中全身缺血和再灌注在无血清时进行。如图52C和52D所示,在MASP-2(-/-)和WT(+/+)小鼠心脏之间,所得梗塞体积(INF)没有观察到差别,这表明图52A和52B示出的梗塞面积差别是由血浆因子造成的,而不是由MASP-2(-/-)小鼠心肌组织对缺血性损伤的较低易感性造成的。

[0771] 总之,这些结果表明,在鼠心肌缺血/再灌注模型中MASP-2缺乏显著减少了缺血性心脏再灌注时的心肌损伤,并支持使用MASP-2抑制剂治疗和预防缺血/再灌注损伤。

[0772] 实施例24

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。

[0773] 原理:

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,Science 249:146-151(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。

[0774] 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切割并从而激活C1s。C1s将C1q结合以两个切割步骤转化成补体活化:它首先将C4转化成C4a和C4b,然后切割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);Schwaeble,W.等,Immunobiology 205:455-466(2002);和Fujita,T.,Nat.Rev.Immunol.2:346-353(2002))。

[0775] 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,Nature386:506-510(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))。

[0776] 有强有力的证据表明,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。

[0777] 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。

[0778] 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。

[0779] 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。

[0780] 方法:

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制剂的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。

[0781] 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)。

[0782] 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)。

[0783] 结果:

MASP-2对于凝集素途径的功能活性必不可少。

[0784] 如本文和US7919094所述,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和C3两者。同样,在包被有N-乙酰葡糖胺的表面上的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)。

[0785] 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,并且在MASP-2缺乏时,MASP-1和MASP-3均不能维持或恢复凝集素途径活性(数据未示出)。

[0786] 但是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53A)和替代途径(图53B)而激活补体。在图53A和53B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)。

[0787] 图53A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53B图示了MASP-2缺陷型小鼠保留功能性替代途径:C3b沉积在仅允许替代途径激活(含有Mg^{2+}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。图53A和图53B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清来源。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53B所示结果证明的,而使经典途径和凝集素途径均失活。

[0788] 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)中的炎性组织损失。

[0789] 如实施例23中描述的,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。实施例23中所述的结果清楚地表明,与其凝集素途径足够的同窝小鼠相比,MASP-2缺陷型动物表现出显著保护程度,梗塞面积显著降低($P<0.01$)。

[0790] 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。使用实施例23中描述的相同方法,我们评估了在实验性MIRI后C4缺乏对梗塞面积的影响。如图54A和图54B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54A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。如图52描述的确定风险面积(AAR)和梗死面积(INF)。图54B图解说明了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。

[0791] 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补体C3的残留凝集素途径的特异性激活。

[0792] 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。

[0793] 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缺陷型小鼠是否可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。

[0794] 使用再钙化的血浆以抑制替代途径激活的血浆浓度(1.25%和以下),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切割(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切割活性。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切割的竞争性抑制而证明(参见图55A)。如图55A-D所示,在不存在C4时观察到C3的MASP-2依赖性激活。图55A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(1μg/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55B图解说明了实验结果,其中WT(十字)、MASP-2缺陷型(空心方块)和C4(-/-)(空心圆)小鼠血浆(1%)与不同浓度的大鼠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(±SD)。

[0795] 图55C图示了实验结果,其中将正常人血浆:合并的NHS(十字)、C4(-/-)血浆(空心圆)和与1μg/ml甘露聚糖预孵育的C4(-/-)血浆(实心圆)在甘露聚糖包被的孔中孵育并测定C3b沉积。结果代表三个独立实验。

[0796] 图55D图示了在C4-足够和C4缺陷的人血浆(1%)中通过人MASP-2mAbH3(均值±一式三份的SD)抑制C3b沉积。

[0797] 如图55B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。

[0798] 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。

[0799] 如图55B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IC_{50}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%)。

[0800] 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55C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55A)和人C4缺陷血浆(图55C)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55D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。

[0801] 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切割的相对量针对使用WT血浆时

沉积的C3量作图。

[0802] 图56A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)、C 4/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56A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Bf/C2(-/-)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切割。使用C1q(-/-)血浆验证了测定条件。图56B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(-/-)、C 4(-/-)、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56B所示,虽然在MASP-2(-/-)血浆中没有观察到C3切割,但fB(-/-)血浆以与WT血浆相似的动力学切割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))。

[0803] 讨论:

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切割活性的损失可通过最近描述的MASP-1作用进行说明,该作用即通过直接切割和活化MASP-2而提高MASP-2依赖性补体活化(Takahashi,M.等,J.Immunol.180:6132-6138(2008))。同样地,MASP-1可以通过其切割C2的能力而有助于MASP-2功能活性(Moller-Kristensen等,Int.Immunol.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切割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。

[0804] 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。

[0805] 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切割依赖性肝再生(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物排斥模型中(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))。

[0806] 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。

[0807] 实施例25

本实施例证明不存在MASP-2功能活性导致显著程度的保护而免于胃肠缺血/再灌注损伤(GIRI)。

[0808] 原理:

我们使用已建立的鼠模型探讨MASP-2在GIRI中的作用(Zhang,M.等Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101,3886-3891(2004);Zhang,M.等J.Exp.Med.203,141-152(2006))。

[0809] 方法:

如实施例1所述生成MASP-2缺陷型小鼠。通过手术夹闭肠系膜上动脉40分钟,使MASP-2(-/-)小鼠和野生型同窝对照经历急性肠缺血,随后通过三小时再灌注。如前所述进行GIRI的手术方案(Zhang,M.等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101:3886-3891(2004))。在麻醉后,进行剖腹术并将手术微型夹施加到肠系膜上动脉(SMA)。40分钟缺血后,除去微型夹,允许缺血组织再灌注三小时。假对照进行剖腹术但不夹紧SMA。再灌注后,处死动物并收获远端空肠的对应片段。

[0810] 肠道损伤通过在限定的空肠区(每个组织切片4厘米)对200-400绒毛进行半定量病理学评分而评估。恒冷切片机切片用苏木精和曙红染色,盲编码,并在光学显微镜下检查。如(Zhang等人,2004,同上)所述评估病理学评分。第一组实验评估8周龄雌性MASP-2(-/-)和它们的MASP-2(+/+)同窝对照中的GIRI。在第二组实验中,研究了6组8周龄雌性WT C57BL/6小鼠:用盐水;或同种型对照抗体;或MASP-2抗体mAbM11预处理的I/R-手术小鼠和假手术小鼠。手术前18小时腹腔注射抗体(各剂量为1mg/kg)或盐水。

[0811] 结果:

图57A图示说明在短暂(40分钟)肠系膜动脉闭塞和缺血性肠组织的再灌注(3小时)后,MASP-2(-/-)小鼠显示出显著程度的保护而免于严重的GIRI损害(*P<0.05如通过Student检验来确定)。如图57A所示,与WT同窝小鼠相比,MASP-2(-/-)小鼠的I/R组织损伤显著减少(MASP-2(-/-)I/R组的病理学评分:4±1,n=6;MASP-2(+/+)I/R组的病理学评分:11±3,n=7;P<0.05)。

[0812] 为了评估MASP-2功能活性的短暂抑制是否可通过在体内施加基于选择性抗体的MASP-2抑制剂而实现,我们评估了在i.p.注射0.6mg/kg体重的剂量后,鼠特异性MASP-2抑

制剂mAbM11的凝集素途径抑制活性的程度和持续时间。在推注后,在时间点0小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时和7天、10天、14天和17天通过心脏穿刺收集血液,并且根据通过引用并入本文的Petersen等,J.Immunol.Methods 257:107-116(2001)描述的方法,测定血浆的凝集素途径介导的C4激活。

[0813] 图57B示出了在体内凝集素途径功能活性消融的时间过程中获得的结果,所述凝集素途径功能活性消融通过腹膜内单剂量推注重组抗鼠MASP-2抗体mAbM11(0.6mg/kg体重)来实现。在指定的时间点,处死小鼠组(n=3),和制备血清并测定LP-依赖性C4激活。相对LP功能活性标准化为在不存在(100%)或存在100nM阻断抗体(0%)时测定的首次用于实验的小鼠汇集血清的LP活性。结果是三种不同小鼠血浆样品在每个时间点的均值(±SEM)。

[0814] 图57B所示的结果描绘凝集素途径依赖性C4激活的相对消融作为抗体给药之前凝集素途径介导的C4激活的相对百分比。结果表明,在抗体给药后6小时内该抗体处理产生凝集素途径功能活性的完全消融。凝集素途径功能活性在给药后完全缺陷达至多48小时,并且没有显著恢复(小于抗体治疗之前活性水平的10%)达至多7天。

[0815] 为了测试MASP-2功能活性的治疗性耗尽是否可以保护动物免受GIRI,在肠I/R或假手术前18小时,给WT小鼠(雄性C57BL/6J,8-10周龄)注射mAbM11(i.p.,1mg/kg体重),或相同剂量的无关同种型对照抗体(i.p.,1mg/kg体重)或盐水。

[0816] 图57C图示了MASP-2mAb治疗对GIRI病理严重程度的保护作用。在经受40分钟的GI缺血接着是3小时再灌注前24小时,给予小鼠1mg/kg mAbM11(n=10)或不相关同种型对照抗体(n=10)或仅给小鼠注射盐水(n=10)。(当用MASP-2抑制性抗体处理的动物与用无关同种型对照抗体或盐水处理的小鼠比较时*P<0.05)。假动物(每组n=5)以相同的方式进行处理,只是不施加夹钳到肠系膜动脉。

[0817] 图57D示出了在诱导GIRI及其各自的假对照之前12小时,用单剂量腹膜内注射等渗盐水、同种型对照抗体(1mg/kg体重)或重组鼠MASP-2抗体mAbM11(1mg/kg体重)预处理的WTC57BL/6小鼠中小肠的GIRI介导的病理组织学呈现。箭头指示在绒毛腔部(特征在于连续上皮层下缺乏细胞内容物)中上皮下间隙作为GIRI病理学的典型特征。(放大倍数,X100)。

[0818] 如图57C和57D所示,当盐水处理的小鼠进行肠I/R手术时,与假手术对照相比它们具有显著组织损伤(25±7,n=10;相对于1±0,n=5,P<0.01)。与盐水对照相比,用同种型对照抗体预处理没有得到保护而免受I/R损伤(17±2相对于25±7,n=10/每组,P>0.05)。相比之下,与同种型对照抗体处理的小鼠相比,mAbM11预处理显著减少组织I/R损伤超过2倍(8±2相对于17±2,n=10/每组,P<0.01)。用MASP-2mAb处理的GIRI组中缺血肠损伤没有下降到在假手术对照组中见到的基线水平(8±2中,n=10,相对于2±1,n=5,P<0.01),但组织损伤的显著缺乏在MASP-2(-/-)和MASP-2mAb处理的动物中均明显。MASP-2mAb的结果进一步验证了凝集素途径在缺血再灌注损伤的有害作用。

[0819] 讨论:

许多最近的报告旨在阐明氧气剥夺细胞中导致补体活化的机制和途径。IgM抗体参与补体依赖性GIRI已经确立(Zhang,M.等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.101I3886-3891(2004);Zhang,M.等,J.Exp.Med.203:141-152(2006))。由于IgM是经典途径的强效激活剂,认为经典途径缺陷型小鼠(如C1qa(-/-)小鼠)可得到保护而免受补体依赖性GIRI和MIRI(实施例24中所述)。令人惊奇的是,最近的两项研究表明,C1qa(-/-)小鼠不受保护,无论是

在GIRI还是在MIRI中,而凝集素途径识别分子MBL A和MBL C缺陷型小鼠显示GIRI和MIRI两者显著减少(Hart,M.L.等,J.Immunol.174:6373-6380(2005);Walsh,M.C..等.J.Immunol.175:541-546(2005))。这些研究结果在两个随后的GIRI研究中被证实,确定了IgM依赖性补体活化的关键促炎作用在没有经典途径活性而通过自身反应性IgM和MBL之间的直接相互作用利用凝集素激活途径而发生(Zhang,M.等,J.Immunol.177:4727-4734(2006);McMullen,M.E.等,Immunobiology 211:759-766(2006))。相比之下,在肾脏IRI模型中测试了同样无MBL的品系(即,无MBL小鼠保留通过纤维胶凝蛋白A的残余凝集素途径功能活性),并仅显示中等程度的保护而免受组织损伤(Moller-Kristensen,M.等,Scand.J.Immunol.61:426-434(2005))。

[0820] 总之,这些研究表明,无MBL小鼠中的保护程度可在不同IRI实验模型之间变化,因为其余的凝集素途径识别分子纤维胶凝蛋白A在介导IRI中的作用尚不清楚。在人类中,我们最近表明在腹部动脉瘤修复术期间在手术诱导的缺血后血浆MBL在再灌注阶段被迅速消耗(Norwood,M.G.等,Eur.J.Vasc.Endovasc.Surg.31:239-243(2006))。在人中,情况甚至会更加复杂,因为除了MBL之外,还有三种不同纤维胶凝蛋白可以用作凝集素途径的识别亚组分。

[0821] 在MIRI模型中利用MASP-2(-/-)小鼠,我们已经表明,凝集素途径功能活性是导致心肌组织主要损失的炎性过程的必需组分。MASP-2(-/-)小鼠仍可通过经典途径或替代途径激活补体,但不含任何残留凝集素途径的功能活性,同时具有所有三种鼠凝集素途径模式识别分子MBL A、MBL C和纤维胶凝蛋白A存在于血浆。此外,MASP-2功能活性也被证明是驱动GIRI模型的缺血后炎性病理的必要组分,这通过对MASP-2(-/-)和MASP-2(+/+)动物中GIRI介导的组织损伤评分而监视。我们的结果清楚地表明,在不存在凝集素途径的功能活性时,无论是经典途径还是替代途径的补体活化途径都不足以引发缺血后组织损伤的炎性病理。然而似乎可能的是,替代途径可能从属地促进其它组织中补体活化的增强。这可以解释为什么因子B的缺乏可改善缺血性急性肾衰竭模型中缺血后炎性组织损失(Thurman,J.M.等,J.Immunol.170:1517-1523(2003))。

[0822] 最后,关于MASP-2缺陷的表型和对治疗性干预的影响,我们的结果表明,MASP-2和凝集素途径功能活性的瞬时和长期持续阻断可以在体内通过全身施用抑制性MASP-2特异性单克隆抗体而实现。在体内使用相对低剂量的抑制性抗体抑制MASP-2功能活性的高效力可在治疗上可行,这是由于相对低丰度的血浆MASP-2(小鼠血浆中范围为260-330ng/ml(见结果),而人血浆中范围为170至1196ng/ml(Moller-Kristensen,M.等,J.Immunol.Methods282:159-167(2003)),以及严格没有任何肝外MASP-2生物合成(Stover,C.M.等,J.Immunol.163:6848-6859(1999);Endo,Y.等,Int.Immunol.14:1193-1201(2002))。因此认为通过给予抗MASP-2的抑制性单克隆抗体抑制MASP-2将有效治疗缺血诱导的炎性病理。

[0823] 实施例26

本实施例证明MASP-2(-/-)小鼠模型中没有MASP-2功能活性导致显著程度的保护而免受脑缺血/再灌注损伤(中风)。

[0824] 方法:

三血管闭塞(3VO)手术:

通过三血管闭塞(3VO)中风模型引入短暂缺血,如Yanamoto等,Exp Neurology 182(2):261-274(2003)所描述的。简要地说,在手术前,将Vetergesic(止痛药)给予8-18周龄的雌性C57/B16小鼠,以减少手术后疼痛。用3%至4%异氟烷与O_2/N_2O将动物麻醉,然后将异氟烷减少为0.5至1.5%以维持麻醉。两颈总动脉(CCA)通过颈部腹侧正中切口而暴露,接着用动脉瘤夹夹住左CCA。这减少烧灼同侧大脑中动脉(MCA)手术过程中的出血。在夹住左CCA后,除去左颧弓以允许进入颅骨和大脑中动脉。1mm厚的钻孔被打开以允许进入MCA然后用双极电凝器(Aura,Kirwan Surgical Products)将其永久烧灼。在MCA闭塞后,夹住右CCA而诱导缺血30分钟。在缺血时间期间,缝合头部伤口。缺血终止后,除去两个夹子,允许再灌注24小时,之后将动物通过颈脱位处死。

[0825] 梗死面积确定

在24小时再灌注后,通过颈脱位处死小鼠,取出其脑并用预冷却的脑基质切成1mm厚的切片。缺血后梗塞体积通过使用2,3,5-三苯基氯化四唑(TTC)的可靠方法来确定,TTC是线粒体活性的代谢细胞指示剂,如在Bederson,J.B.等,Stroke 17:1304-1308(1986)和Lin T.N.等,Stroke 24:117-121(1993)中所述。在此测定中,脑切片的红的着色(在黑白照片中表示为黑色区域)表示正常非梗塞组织而非着色的白色区域表示梗塞组织(Bederson等人,1986)。在脑切片后,用2%TTC/盐水在室温在黑暗中将切片染色30分钟。之后将切片固定在10%福尔马林中,并存储在4℃暗处。拍摄数字图像并用Scion Image软件进行分析,以计算梗死体积。梗死体积如下计算以避免梗塞面积由于水肿而高估:

梗死体积=梗死面积/(同侧面积/对侧面积)×1mm(切片厚度)

结果:

图58图解说明在30分钟缺血和24小时再灌注后在WT和MASP-2(-/-)小鼠中的脑梗死体积。如图58所示,与WT(MASP-2(+/+)小鼠相比,3-VO后的梗塞体积在MASP-2(-/-)小鼠中显著降低(p=0.0001)。

[0826] 图59A示出了在30分钟缺血和24小时再灌注后WT(MASP-2+/+)小鼠的一系列脑切片。图59A的1-8组表明相对于听神经外叶(前囟点0)分别对应于前囟点1-8的脑的不同切片区域。

[0827] 图59B示出了在30分钟缺血和24小时再灌注后MASP-2(-/-)小鼠的一系列脑切片。图59B的1-8组表明相对于听神经外叶(前囟点0)分别对应于前囟点1-8的脑的不同切片区域。

[0828] 下表21提供对于图59A和59B示出的脑切片所测定的梗死体积。

[0829] 表21:经30分钟MCA闭塞和接着24小时再灌注处理的小鼠脑切片的梗塞体积测定(示于图59A和59B)。

图(参考组)	基因型	前囟点(相对于听神经外叶，前囟点=0)	梗塞体积
图 59A-1	WT (MASP2 +/+)	1	1.70 mm
图 59A-2	WT (MASP2 +/+)	2	0.74 mm
图 59A-3	WT (MASP2 +/+)	3	-0.10 mm
图 59A-4	WT (MASP2 +/+)	4	-0.82 mm
图 59A-5	WT (MASP2 +/+)	5	-1.82 mm
图 59A-6	WT (MASP2 +/+)	6	-3.08 mm
图 59A-7	WT (MASP2 +/+)	7	-4.04 mm
图 59A-8	WT (MASP2 +/+)	8	-4.60 mm
图 59B-1	MASP2 (-/-)	1	1.54 mm
图 59B-2	MASP2 (-/-)	2	0.98 mm
图 59B-3	MASP2 (-/-)	3	-0.46 mm
图 59B-4	MASP2 (-/-)	4	-1.22 mm
图 59B-5	MASP2 (-/-)	5	-1.70 mm
图 59B-6	MASP2 (-/-)	6	-2.80 mm
图 59B-7	MASP2 (-/-)	7	-4.36 mm
图 59B-8	MASP2 (-/-)	8	-4.72 mm

[0830] 如图59A、59B和表21所示,MASP-2-缺乏限制了短暂脑缺血(MCAO 30分钟)接着24小时再灌注后的组织损失。这些结果表明,在MASP-2(-/-)小鼠模型中不存在MASP-2功能活性导致显著程度的保护而免受脑缺血/再灌注损伤(中风)。

[0831] 实施例27

本实施例描述了在鼠单克隆抗体诱导的类风湿性关节炎模型中MASP-2(-/-)的结果。

[0832] 背景/原理:对于类风湿性关节炎(RA)最常用的动物模型是胶原诱导的关节炎(CIA)(近期综述参见Linton和Morgan,Mol.Immunol.36:905-14,1999)。II型胶原(CII)是关节基质蛋白的主要成分之一,用天然CII/佐剂进行免疫通过对关节软骨中CII的交叉反应性自身免疫反应而引起自身免疫性多关节炎。如在RA中,易患CIA与某些MHC II类等位基因的表达相关。一些小鼠品系(包括C57Bl/6品系)耐经典CIA,因为它们缺乏适当的MHC单倍型,因此不会产生高的CII抗体滴度。然而,已经发现,可在所有小鼠品系中,通过静脉内或腹膜内给予小鼠针对II型胶原的4种特异性单克隆抗体(Col2 MoAb)混合物而诱导一致的关节炎。这些引起关节炎的单克隆抗体可市售得到(Chondrex,Inc.,Redmond,WA)。CIA的这种被动转移模型已被成功地用于多个最近发表的报告,其使用C57BL/6小鼠品系(Kagari等,J.Immunol.169:1459-66,2002;Kato等,J.Rheumatol.30:247-55,2003;Banda等,

J.Immunol.177:1904-12,2006)。以下研究比较了使用CIA的被动转移模型,均具有C57Bl/6遗传背景的WT(+/+)和MASP-2(-/-)小鼠对于发展关节炎的易感性。

[0833] 方法:

动物:MASP-2(-/-)小鼠如实施例1中所述生成并用C57BL/6回交10代。在该研究中使用在抗体注射时为7至8周龄的14只雄性和雌性C57BL/6野生型小鼠以及在抗体注射时为7至8周龄的10只雄性和雌性MASP-2(-/-)和WT(+/+)C57BL/6小鼠。用单克隆抗体混合物注射20只小鼠,得到20只一致的应答小鼠(两组,每组10只)。动物(10只/组)以5只动物/笼饲养,并在启动研究前驯化5-7天。

[0834] 在第0天和1天用单克隆抗体混合物(Chondrex,Redmond WA)(5mg)静脉内注射小鼠。测试剂为单克隆抗体(Col2 MoAb)+LPS,来自Chondrex。第2天,经ip将LPS给予小鼠。在第0、2、4、6、8、10、12天和第14天(终止前)对小鼠称重。第14天将小鼠用异氟烷麻醉并终端放血,得到血清。采血后,将小鼠安乐死,并除去前后肢与膝盖,将其置于福尔马林中,用于将来的处理。

[0835] 治疗组:

第1组(对照):4只C57/BL/6WT(+/+)品系小鼠;

第2组(试验):10只C57/BL/6WT(+/+)品系小鼠(接受Col2 MoAb加LPS);和

第3组(试验):10只C57/BL/MASP-2KO/6Ai(-/-)品系小鼠(接受Col2 MoAb mAb加LPS)使用以下评分系统每日评估临床关节炎得分:0=正常;1=1个后或前掌关节受到影响;2=2个后或前掌关节受到影响;3=3个后或前掌关节受到影响;4=中度(红斑和中度肿大,或4个趾关节受到影响);5=严重(整个爪弥漫性红斑和肿胀严重,无法弯曲趾)

结果:

图60示出了针对长达两周平均每日临床关节炎得分绘制的组数据。在未接受CoL2 MoAb治疗的对照组中没有观察到临床关节炎得分。从第9天到14天MASP(-/-)小鼠具有较低的临床关节炎得分。用曲线下面积分析(AUC)总体临床关节炎得分表明相对于WT(+/+)小鼠,MASP-2(-/-)组中减少21%。然而,先前讨论的C57B16小鼠背景没有提供稳健的总体关节炎临床评分。由于小发病率和组大小,尽管具有正向趋势,但数据只提供了趋势(P=0.1),并且不是在P<0.05水平显著。在治疗组中的其他动物有必要显示出统计学显著性。由于关节炎的发病率降低,评价了受影响的爪评分的严重性。在任一MASP-2(-/-)小鼠中,没有观察到大于3的单一发病率的临床关节炎得分,这在30%的WT(+/+)小鼠中观察到,进一步表明了(1)关节炎的严重程度可能与补体途径激活相关和(2)阻断MASP-2可在关节炎中具有有益效果。

[0836] 实施例28

本实施例显示了使用纯尘螨变应原作为凝集素途径介导的C3激活的强效激活剂,作为哮喘模型。

[0837] 原理:

已经开发了良好表征的屋尘螨(HDM)诱发过敏性哮喘的小鼠模型。参见X.Zhang等,J.of Immunol.182:5123-5130(2009),在此通过引用并入本文。如Zhang等人(2009)所描述,该模型涉及在三周内每周一次将小鼠暴露于气管内HDM。在WT BALB/c小鼠中,气管内HDM给药显著增加呼吸道反应性、BAL液中的总细胞数和嗜酸性粒细胞数以及血清总IgE和

变应原特异性IgE水平。该模型可用于评估使用MASP-2mab作为哮喘治疗药。

[0838] 方法：

用获自WT小鼠的血清样品进行C3沉积测定法。为了测量C3活化，用甘露聚糖(1μg/孔)，然后用绵羊抗HSA血清(2μg/ml)在TBS/Tween/Ca^{2+}中包被微量滴定板。用0.1％HAS/TBS封闭平板并如上所述洗涤。血浆样品在4mM巴比妥，145mM NaCl，2mM $CaCl_2$，1mM $MgCl_2$，pH 7.4中稀释，加入板中，并在37℃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。

[0839] 结果：

图61图示了在获自WT小鼠的血清样品中在屋尘螨或酵母聚糖存在下C3沉积测定的结果。如图61所示，尘螨变应原是凝集素途径介导的C3激活的强效激活剂，以与酵母聚糖几乎相同的水平活化C3。这些结果表明，尘螨变应原能够刺激凝集素途径。鉴于MASP-2抗体已显示阻断替代补体途径激活的事实，预计MASP-2抗体将是有效的治疗由于尘螨变应原敏化个体所致的哮喘的治疗药。

[0840] 实施例29

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介入的程度。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62A和62B可看到，本系统中凝血酶活化由MASP-2阻断抗体H1(Fab2形式)抑制，表现出抑制浓度-反应曲线(图62B)，这与对于补体活化的抑制平行(图62A)。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阻断抗体可能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。

[0841] 实施例30

本实施例提供了在MASP-2(-/-)和WT(+/+)小鼠中使用评估DIC中凝集素途径的作用的弥散性血管内凝血(“DIC”)的局部Schwarztman反应模型产生的结果。

[0842] 背景/原理：

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只从属涉及补体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。

[0843] 方法：

如实施例1所述产生本研究中使用的MASP-2(-/-)小鼠。在此实验中采用局部Schwarztman反应(LSR)模型。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TNFα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(15-60μm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(100μg),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。LSR的主要量度是聚集数据。

[0844] 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WT(+/+)小鼠。结果(图63A)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(-/-)小鼠(图63B)还表现出局部Schwarztman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。

[0845] 实施例31

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。

[0846] 原理:

如实施例29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介入的程度。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。

[0847] 方法:

通过凝血酶底物活化C3

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FXIa,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。

[0848] 结果:

C3的活化涉及完整a-链切割成截短a'链和可溶的C3a。图64示出了对凝血酶底物活化人C3的蛋白质印迹分析的结果,其中未切割的C3α链和活化产物a'链用箭头示出。如图64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切割C3。

[0849] 在甘露聚糖上的C3沉积

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(1μg/孔),然后用在TBS/Tween/Ca^{2+}中的山羊抗HSA血清(2μg/ml)包被。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 $CaCl_2$,1mM $MgCl_2$,pH 7.4中稀释,加入板中,并在37℃孵育1.5小时。洗涤后,使用兔抗人体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。

[0850] 结果:

图65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65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65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。

[0851] 讨论:

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。如实施例24中所述,对于其中MASP-2敲除小鼠被保护而C4敲除小鼠未受保护的心肌梗死模型,我们已证明了这一点。

[0852] 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。

[0853] 实施例32

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。

[0854] 原理:

由产志贺毒素的大肠杆菌感染引起的溶血性尿毒症综合征(HUS)是儿童中急性肾衰竭的首要原因。在此实施例中,在MASP-2(-/-)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。

[0855] 方法:

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。

[0856] 结果:

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66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66所示,在60分钟时,MASP-2(-/-)无一具有血栓形成(对数秩:P=0.0005)。

[0857] 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防护作用。

[0858] 实施例33

本实施例描述了使用腹膜内共注射纯化的志贺毒素2加LPS,在HUS的小鼠模型中MASP-2抗体的作用。

[0859] 背景:

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))。

[0860] 方法:

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150μl盐水的总体积中稀释的重组MASP-2抗体mAbM11(每只小鼠100μg;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MASP-2抗体mAbM11后6小时,所有小鼠接受在150μl总体积中组合的i.p.注射亚致死剂量(3μg/动物;对应于150μg/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)。盐水注射被用于控制。

[0861] 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℃,用于在治疗组和对照组中测定BUN和血清肌酐水平。

[0862] 免疫组织化学

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。

[0863] 电子显微术

将肾脏的中间部分切成约1至2mm^{3}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。

[0864] 冰冻切片

将肾脏的另一三分之一切成约1至2mm^{3}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。

[0865] 结果:

图67图示了在STX/LPS诱导的模型中,盐水处理的对照小鼠(n=5)和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67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MASP-2抗体治疗的小鼠在整个实验的时间过程中存活。与图67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)例如溶血性尿毒症综合征(HUS)、非典型HUS(aHUS)或血栓性血小板减少性紫癜(TTP)的受试者。

[0866] 实施例34

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。

[0867] 背景/原理:如实施例32和33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67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'exact P<0.01;N=5)。因此,在该HUS模型中,抗MASP-2疗法保护小鼠。

[0868] 进行下面的实验以分析异硫氰酸荧光素(FITC)葡聚糖诱导的内皮细胞损伤的血栓性微血管病(TMA)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

治疗具有HUS、aHUS、TTP和其他病因的TMA的益处。

[0869] 方法：

活体内显微术如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,Pfitzer 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 Dickson and Company,Sparks,MD,USA)插管。左颈动脉用PE10管(Becton Dickson and Company,Sparks,MD,USA)插管进行血液取样和系统性单克隆抗体(mAb)给药。

[0870] 提睾肌的准备

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 12:56-68,20112011所述,用热控制的(35℃碳酸氢盐缓冲盐水)表面灌流提睾肌。

[0871] 光激发FITC葡聚糖损伤模型

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,SigmaAldrich,Poole,U.K.)。该程序启动局部血栓形成。作为光毒性试剂,将60μL 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整个循环血液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,LangenbecksArch Surg 385:290-298,2000所述。

[0872] 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。

[0873] 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。

[0874] 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。

[0875] 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)。

[0876] 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。

[0877] 结果:

图68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68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)。

[0878] 图69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=0.0129。如示于图69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。

[0879] 图70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70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70,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。

[0880] 结论:

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。

[0881] 实施例35

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。

[0882] 背景/原理:如实施例34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。

[0883] 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。

[0884] 结果:

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22。

[0885] 表22:在5分钟时间段内的血小板聚集。

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

[0886] 如上表22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34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。

[0887] 尽管已经说明和描述了本发明的优选实施方案,但是应理解,其中可以进行多种改变,只要不偏离本发明的精神和范围。

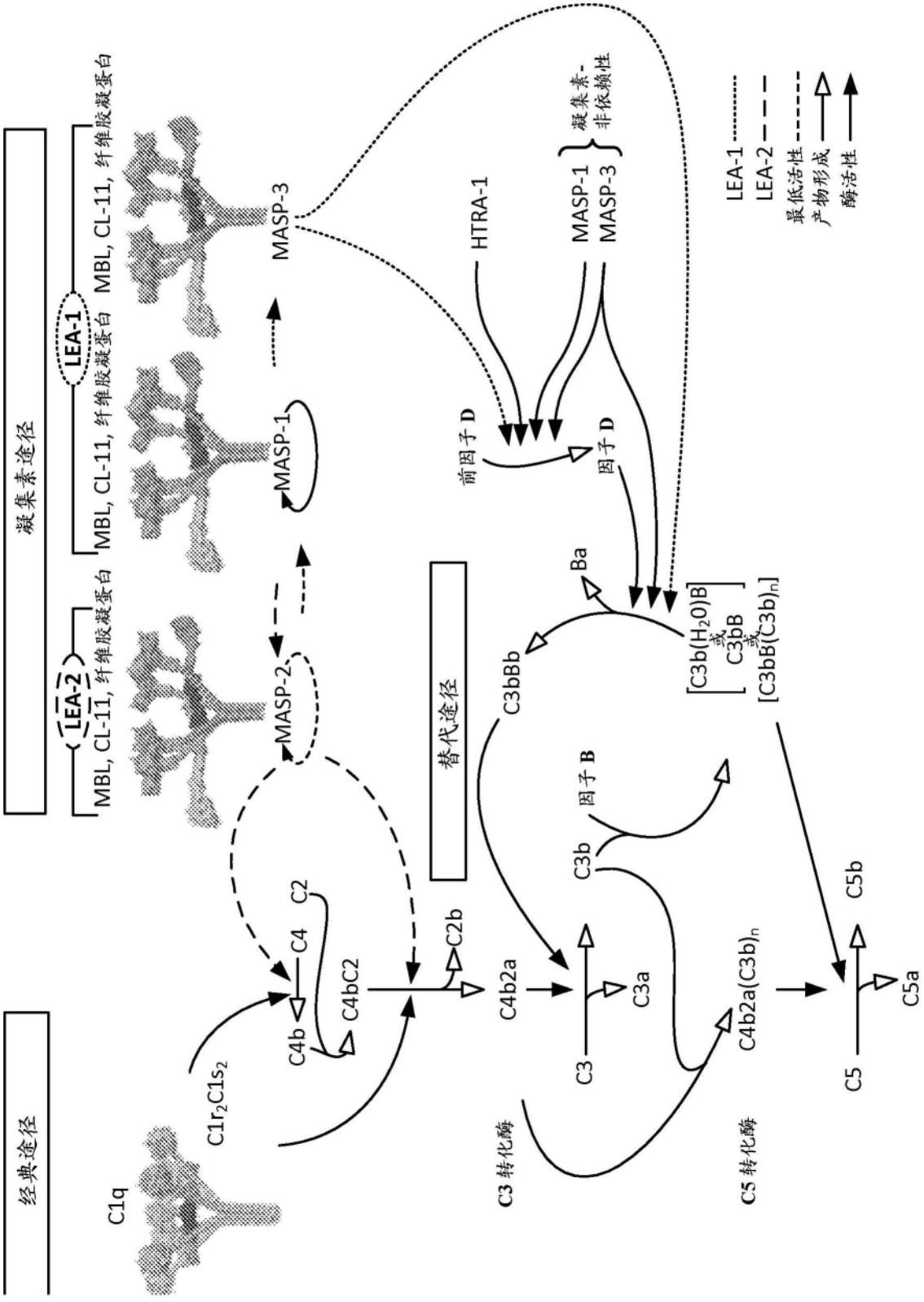

经典途径
凝集素途径
替代途径
C1q
C1r2C1s2
C4
C2
C4b
C4bC2
C2b
MASP-2
LEA-2
MBL, CL-11, 纤维胶凝蛋白
LEA-1
MBL, CL-11, 纤维胶凝蛋白
MBL, CL-11, 纤维胶凝蛋白
MASP-1
MASP-3
前因子 D
因子 D
HTRA-1
MASP-1
MASP-3
凝集素-非依赖性
C3bBb
Ba
[C3b(H2O)B
或
C3bB
或
[C3bB(C3b)n]
因子 B
C3b
C3
C3a
C4b2a
C4b2a(C3b)n
C3 转化酶
C5 转化酶
C5
C5b
C5a
LEA-1
LEA-2
最低活性
产物形成
酶活性

图1

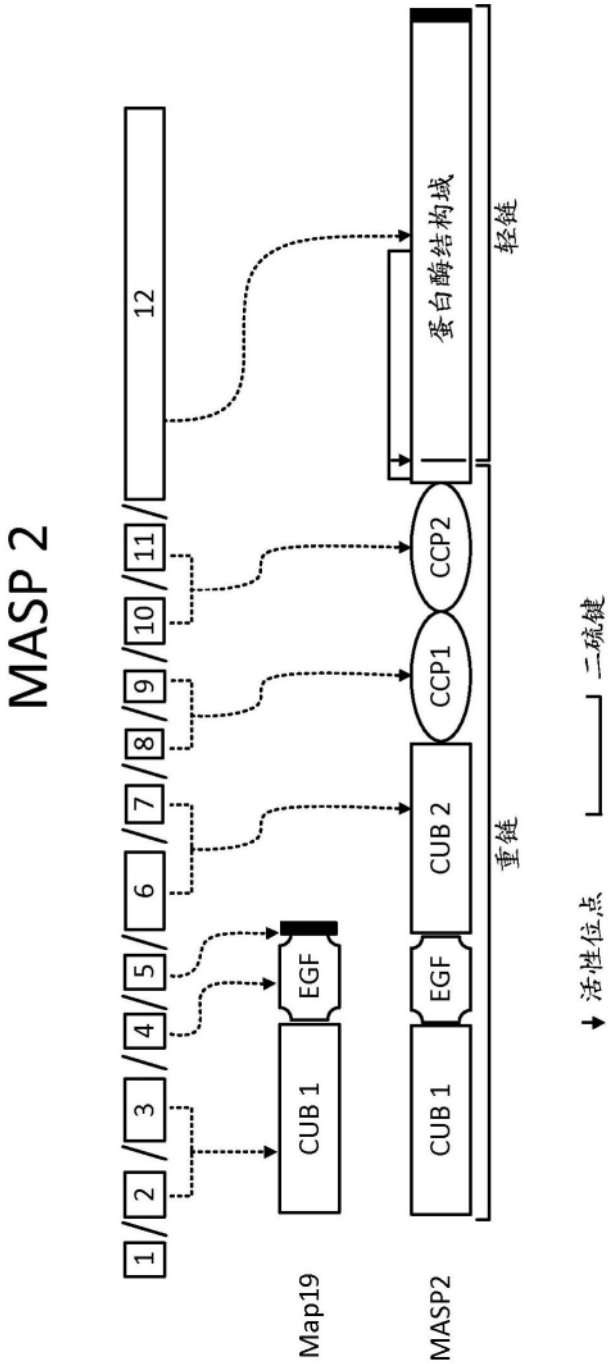

MASP 2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
CUB 1
EGF
Map19
CUB 1
EGF
CUB 2
CCP1
CCP2
蛋白酶结构域
重链
轻链
活性位点
二硫键
MASP2

图2

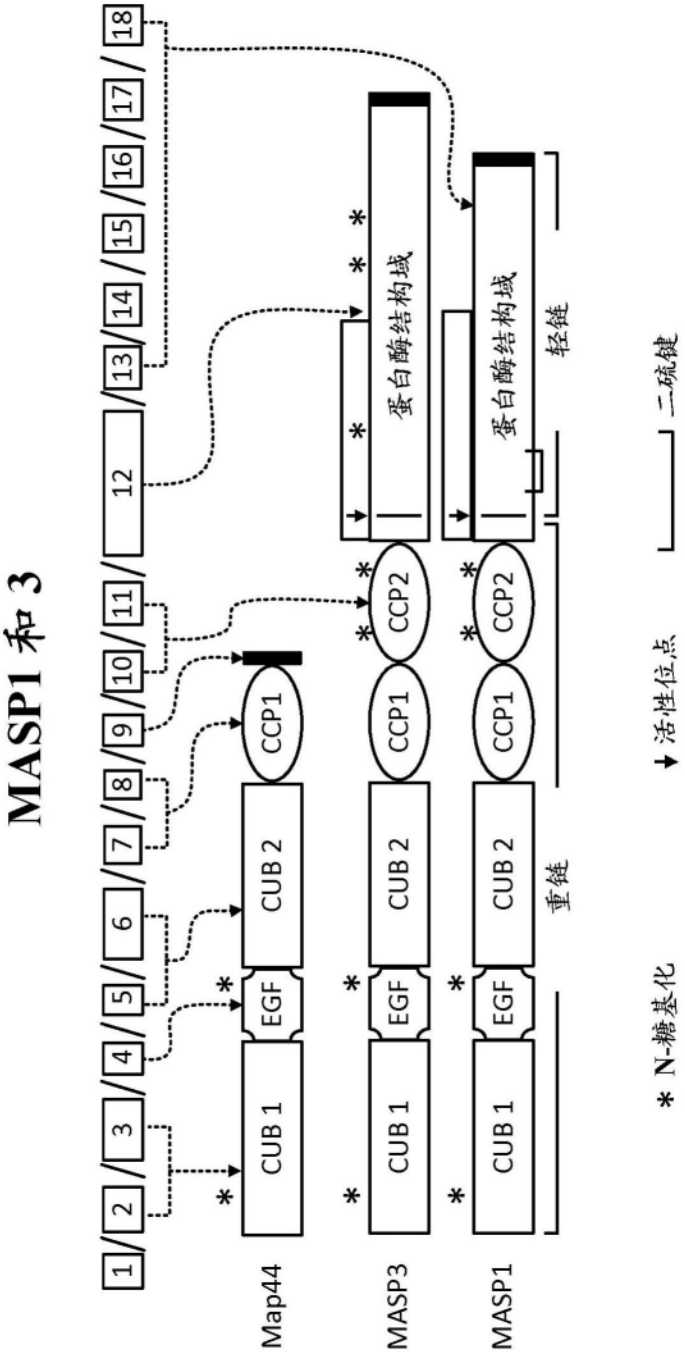

MASP1 和 3
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
CUB 1
EGF
CUB 2
CCP1
CCP2
蛋白酶结构域
重链
轻链
Map44
MASP3
MASP1
* N-糖基化
活性位点
二硫键

图3

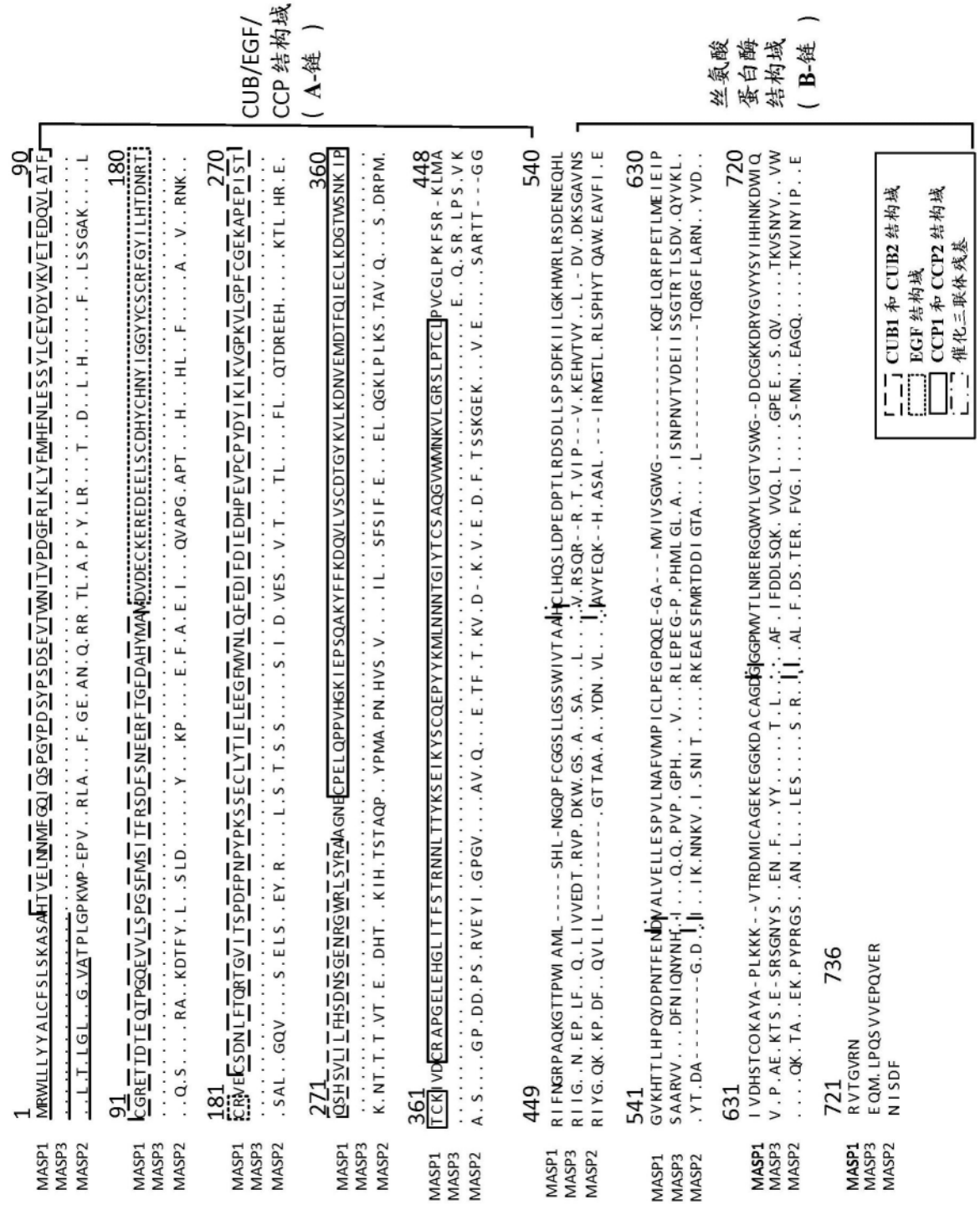

CUB/EGF/
CCP 结构域
(A-链)
丝氨酸
蛋白酶
结构域
(B-链)
CUB1 和 CUB2 结构域
EGF 结构域
CCP1 和 CCP2 结构域
催化三联体残基

图4

MASP A-链的比对
1
90
1ASP1_A 链 MRWLLLYYALCFSLSKASAHTVELNNMFGQIQSPGYPDSYPSDSEVTWNITVPDGFRIKLYFMHFNLESSYLCEYDYVKVETEDQVLATF
1ASP3_A 链 . . . . . .
1ASP2_A 链 . . L . T . LGL . . G . VATPLGPKWP - EPV . . RLA . . . F . GE . AN . Q . RR . TL . A . P . Y . LR . . . T . . . D . . . L . H . . . . . F . . LSSGAK L
91
180
MASP1_A 链 CGRETTDTEQTPGQEVVLSPGSFMSITFRSDFSNEERFTGFDAHYMAVDVDECKEREDEELSCDHYCHNYIGGYYCSCRFGYILHTDNRT
MASP3_A 链 . . . . . .
MASP2_A 链 . . Q . S . . . . . RA . . KDTFY . L . . SL D . . . . . Y . . . . KP . . . . . E . F . A . E . I . . . . QYAPG . APT . . . . H . . . HL . . F . . . . . A . . V . . RNK . .
181
270
MASP1_A 链 CRVECSDNLFTQRTGVITSPDFPNPYPKSSECLYTIELEEGFMVNLQFEDIFDIEDHPEVPCPYDYIKIKVGPKVLGPFCGEKAPEPIST
MASP3_A 链 . . . . . .
MASP2_A 链 . SAL . . GQV . . . . S . ELS . . EY . R . . . . L . S . T . S . S . . . . . S . I . D . VES . . V . T . . . . TL . . . . . FL . . QTDREEH . . . . . KTL . HR . E .
271
360
MASP1_A 链 QSHSVLILFHSDNSGENRGWRLSYRAAGNECPELQPPVHGKIEPSQAKYFFKDQVLVSCDTGYKVLKDNVEMDTFQIECLKDGTWSNKIP
MASP3_A 链 . . . . . .
MASP2_A 链 K . NT . T . T . VT . E . . DHT . . K IH . TSTAQP . . YPMA . PN . HVS . V . . . . IL . . S F S I F . E . . . EL . QGHLPL KS . TAV . Q . . . S . DRPM .
361
448
MASP1_A 链 TCKIVDCRAPGELEHGLITFSTRNNLTTYKSEIKYSCQEPYYKMLNNNTGIYTCSAQGVMVMNKVLGRSLPTCLPVCGLPKFSRKLMA
MASP3_A 链 . . . . . .
MASP2_A 链 A . S . . . . GP . DD . PS . RVEYI . GPGV . . . . . AV . Q . . . E . TF . T . KV . D - . K . V . E . D . F . T S SKGEK . . . V . E . . . . . SARTTGG

图5

MASP 丝氨酸蛋白酶结构域(B-链)的比对

```
                1                                                  90
MASP1_B链       RIFNGRPAQKGTTPWIAMLSHLNGQP------FCGGSLLGSSWIVTAAHCLHQSLDPEDPTLRDSDLLSPSDFKIILGKHWRLRSDENEQ
MASP2_B链       ..YG.QK..KP.DF...QVLILGGTTA----------A.A..YDN.VL....AVYEQ--KH.ASAL.---I-RMGTLKR.SP.Y-TQAWSEAV
MASP3_B链       ..IG...N.EP.LF...Q..LIVVEDTSRVPNDKW.GS.A..SA....L.....V.RSQ--RR.T.VIP---V.KEHVTVY..L.D-V.DKSGAV

               91                                                 180
MASP1_B链       HLGVKHTTLHPQYDPNTFENDVALVELLESPVLNAFVMPICLP----EGPQQEGAMVIVSGWGKQFLQR----------FPETLMEIIE
MASP2_B链       ------FIHEGYTHDAG.D...I...IK.NNKV.I.SNIT.....RKEA.SFMRTDDIGTA.....LTQRGF----------LARN..YVD
MASP3_B链       NSSAARVV....DFNIQNYNH.I....Q.Q.PVP.GPH.....V....RLEP..-PAPHMLGL.A.....ISNPNVTVDEIISSGTRTLSDV.QYVK

               181                                                270
MASP1_B链       IPIVDHSTCQKAYAPL---KKKVTRDMICAGEKEGGKDACAGDSGGPMVTLNRERGQWYLVGTVSWG--DDCGKKDRYGVYSYIHHNKDW
MASP2_B链       ......QK.TA..EKPPYPRGS..AN.L....LES.....S.R.....AL.F.DS.TER.FVG.I.....SMN-.....EAGQ.....TKVINYIP.
MASP3_B链       L.V.P.AE.KTS..ESRS-GNYS..EN.F....YY.....T.L.....AF.IFDDLSQR.VVQ.L.....GPEE....S.QV.....TKVSNYV..

               271          288
MASP1_B链       IQRVTGVRN
MASP2_B链       .ENISDF
MASP3_B链       VWEQM.LPQSVVEPQVER
```

图6

MASP 丝氨酸蛋白酶结构域(B-链)的成对比对

```
                                                
```

MASP 丝氨酸蛋白酶结构域(B-链)的成对比对

```
                1                                                  90
MASP1_B链   RIFNGRPAQKGTTPWIAML-----SHL-NGQPFCGGSLLGSSWIVTAAHCLHQSLDPEDPTLRDSDLLSPSDFKIILGKHWRLRSDENEQ
MASP2_B链   ..IG..N.EP.LF..Q.LIVVEDT.RVP.DKW.GS.A..SA....L.....V.RSQR--R.T.VIP---V.KEHVTVY..L..-DV.DKSGAV

               91                                                 180
MASP1_B链   HLGVKHTTLHPQYDPNTFENDVALVELLESPVLNAFVMPICLPEGPQQEGA---MVIVSGWG----------KQFLQRFPETLMEIEI
MASP2_B链   NSSAARVV...DFNIQNYNH.I....Q.Q.PVP.GPH...V...RLEPEGP.PHMLGL.A....ISNPNVTVDEIISSGTRTLSDV.QYVKL

               181                                                270
MASP1_B链   PIVDHSTCQKAYAPLKKK--VTRDMICAGEKEGGKDACAGDSGGPMVTLNRERGQWYLVGTVSWG--DDCGKKDRYGVYSYIHHNKDWIQ
MASP2_B链   .V.P.AE.KTS.ESRSGNYS..EN.F.....YY.....T.L.....AF.IFDDLSQR.VVQ.L.....GPEE..S.QV.....TKVSNYV..VW

               271        286
MASP1_B链   RVTGVRN
MASP2_B链   EQM.LPQSVVEPQVER
```

图7B

MASP 丝氨酸蛋白酶结构域(B-链)的成对比对
1
90
MASP2_ B 链
RIYGGQKAKPGDFPWQVLILGGTTA----------AGALLYDNWVLTAAHAVYEQKHDASALDI-RMGTLKRLSPHYTQAWSEAV------
MASP3_ B 链
..I...RN.E...L.....A...VVED.SRVPNDKWFGS.....SAS...I.....VLRS.RR.TTVIPVSKEHVTVY.GL.DVRDK.G..NSSAAR
91
180
MASP2_ B 链
FIHEGYTHDAGFDNDIALIKLNNKVVINSNITPICLPRKEAESFMRTDDIGTASGWGLTQRGF----------LARNLMYVDIPIVDH
MASP3_ B 链
VVLHPDFNICNYNH.....VQ.QEP.PLGPHVM.V.....L.P.G-PAPHML.LVA...ISNPNVTVDEIISSGTRT.SCV.Q..KL.V.P.
181
270
MASP2_ B 链
CKCTAAYEKPPYPRGSVTANMLCAGLESGGKDSCRGDSGGALVFLDSETERWVGGIVSWGSMN-CGEAGQYGVYTKVINYIPWIENISD
MASP3_ B 链
AE.KTS..SRS-GNY.....E...F.....YYE.....T.L.....F.IF.DLSQ...Q.L.....GPEE..SKCV.....S..VD.VWEQMG
271
282
MASP2_ B 链
F
MASP3_ B 链
LPQSVVEPQVER

图7C

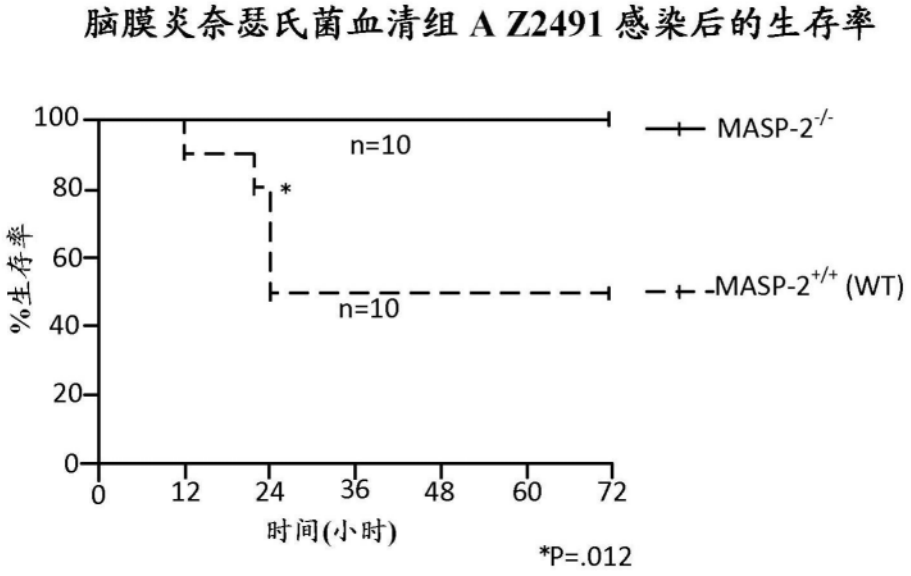

脑膜炎奈瑟氏菌血清组 A Z2491 感染后的生存率
100
80
60
40
20
0
%生存率
n=10
*
n=10
MASP-2-/-
MASP-2+/+ (WT)
0
12
24
36
48
60
72
时间(小时)
*P=.012

图 8

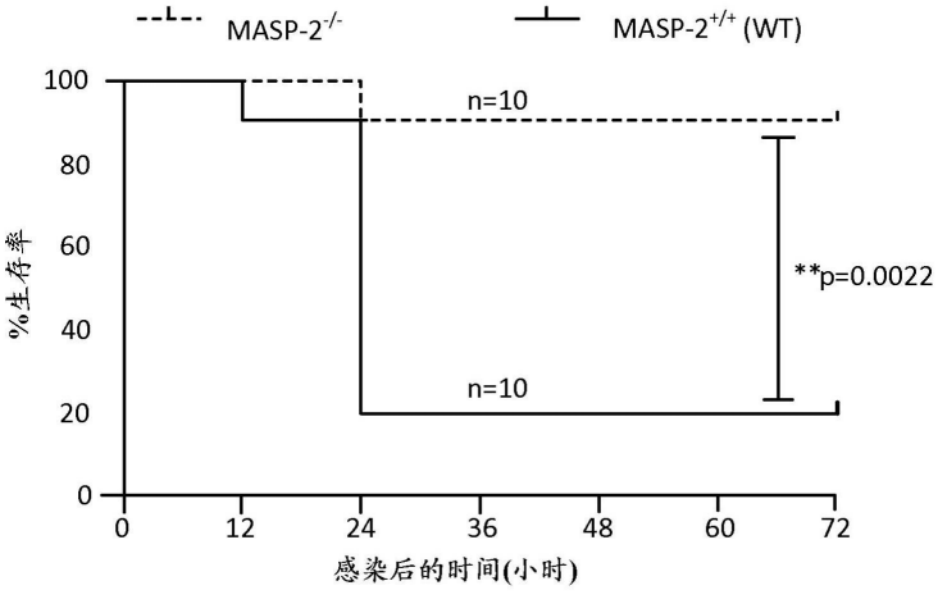

MASP-2-/-
MASP-2+/+ (WT)
100
80
60
40
20
0
%生存率
n=10
n=10
**p=0.0022
0
12
24
36
48
60
72
感染后的时间(小时)

图 9

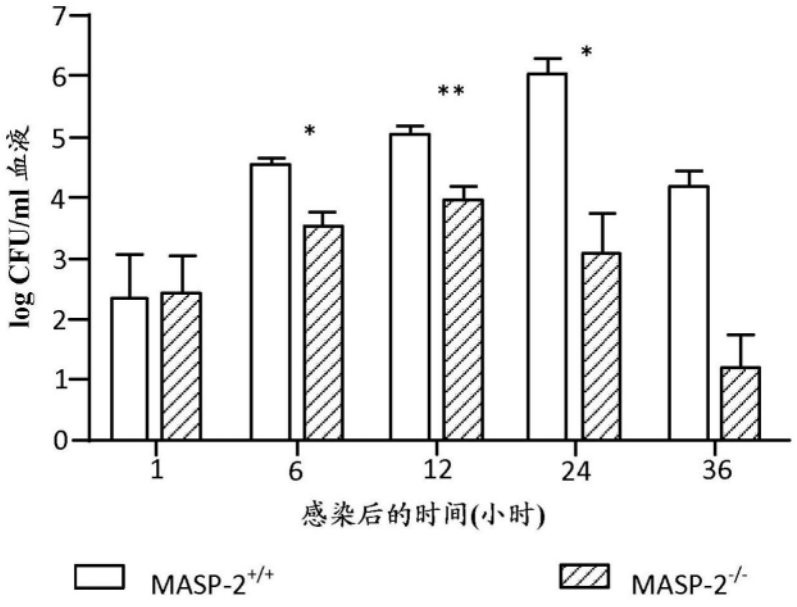

log CFU/ml 血液
0
1
2
3
4
5
6
7
*
**
*
1
6
12
24
36
感染后的时间(小时)
MASP-2+/+
MASP-2-/-

图10

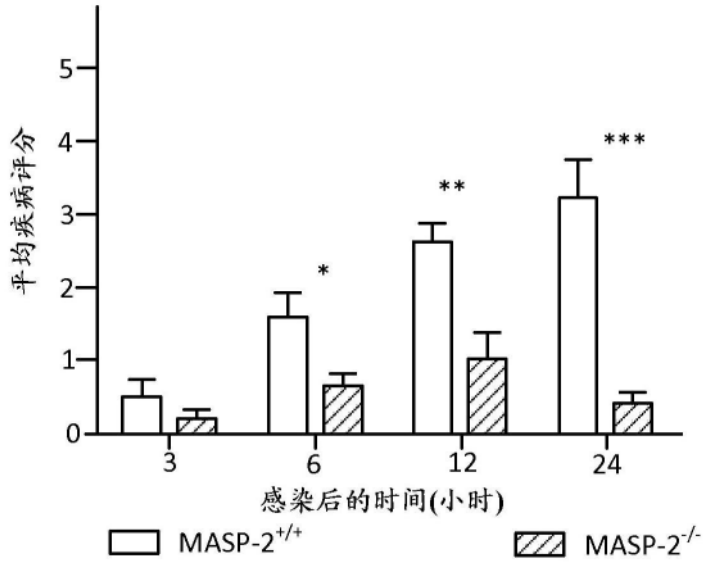

平均疾病评分
0
1
2
3
4
5
*
**
***
3
6
12
24
感染后的时间(小时)
MASP-2+/+
MASP-2-/-

图11

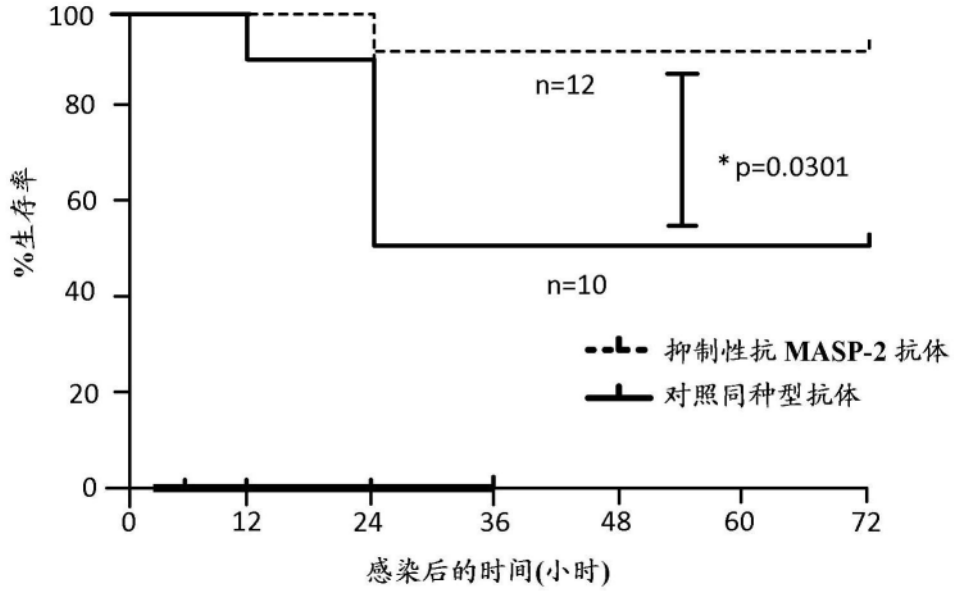

100
80
60
40
20
0
%生存率
n=12
* p=0.0301
n=10
抑制性抗 MASP-2 抗体
对照同种型抗体
0
12
24
36
48
60
72
感染后的时间(小时)

图12

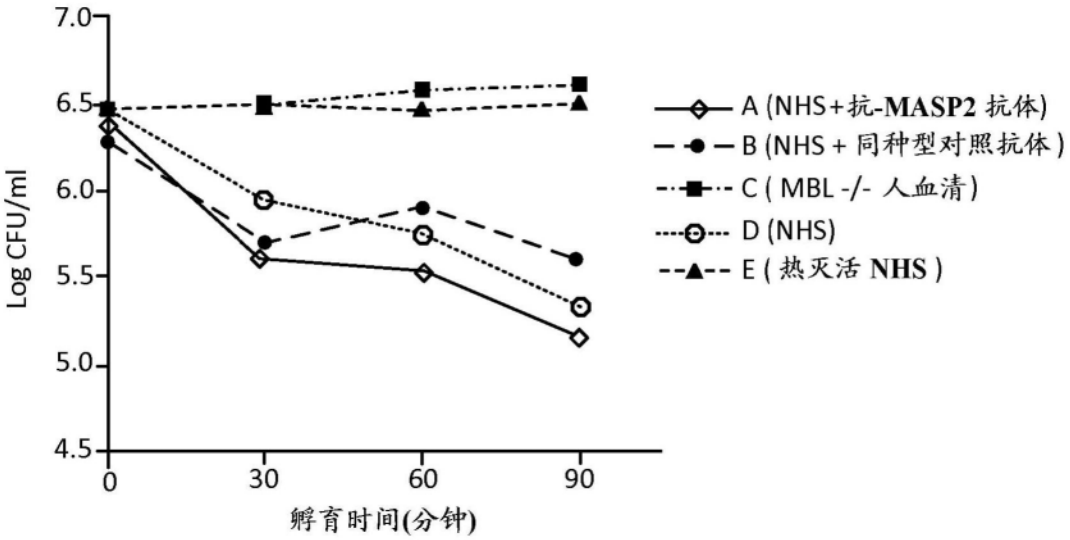

7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
Log CFU/ml
0
30
60
90
孵育时间(分钟)
A (NHS+抗-MASP2 抗体)
B (NHS + 同种型对照抗体)
C (MBL -/- 人血清)
D (NHS)
E (热灭活 NHS)

图13

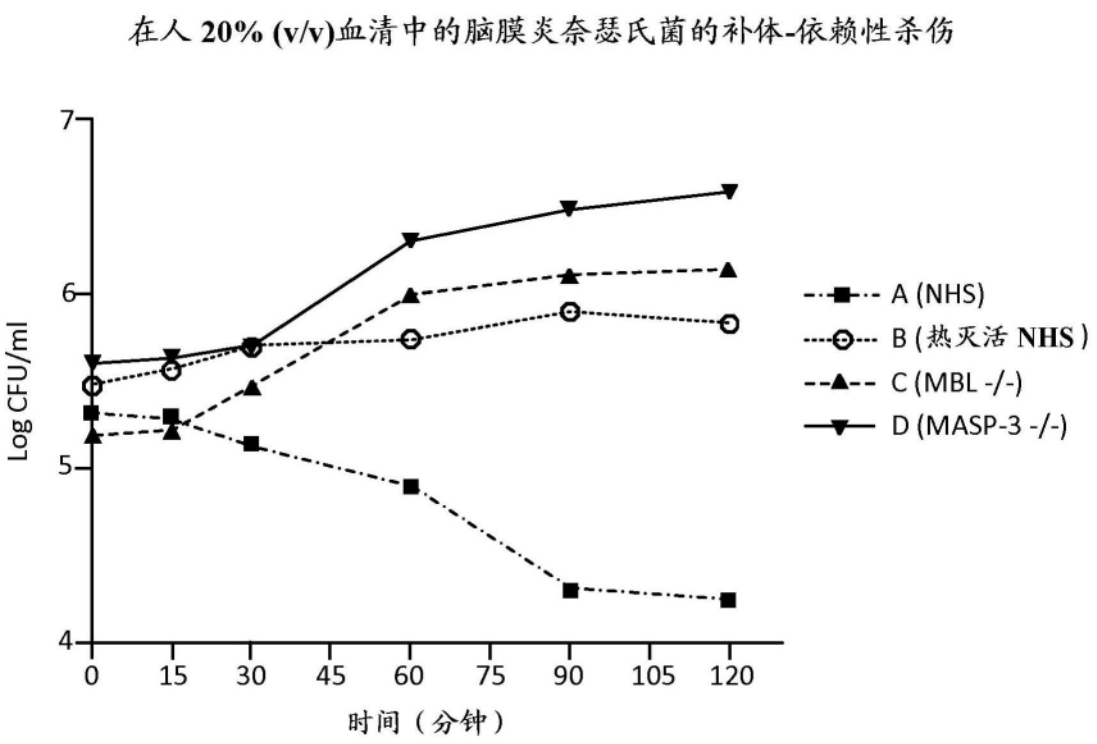

在人 20% (v/v)血清中的脑膜炎奈瑟氏菌的补体-依赖性杀伤
Log CFU/ml
7
6
5
4
0
15
30
45
60
75
90
105
120
时间（分钟）
A (NHS)
B (热灭活 NHS)
C (MBL -/-)
D (MASP-3 -/-)

图14

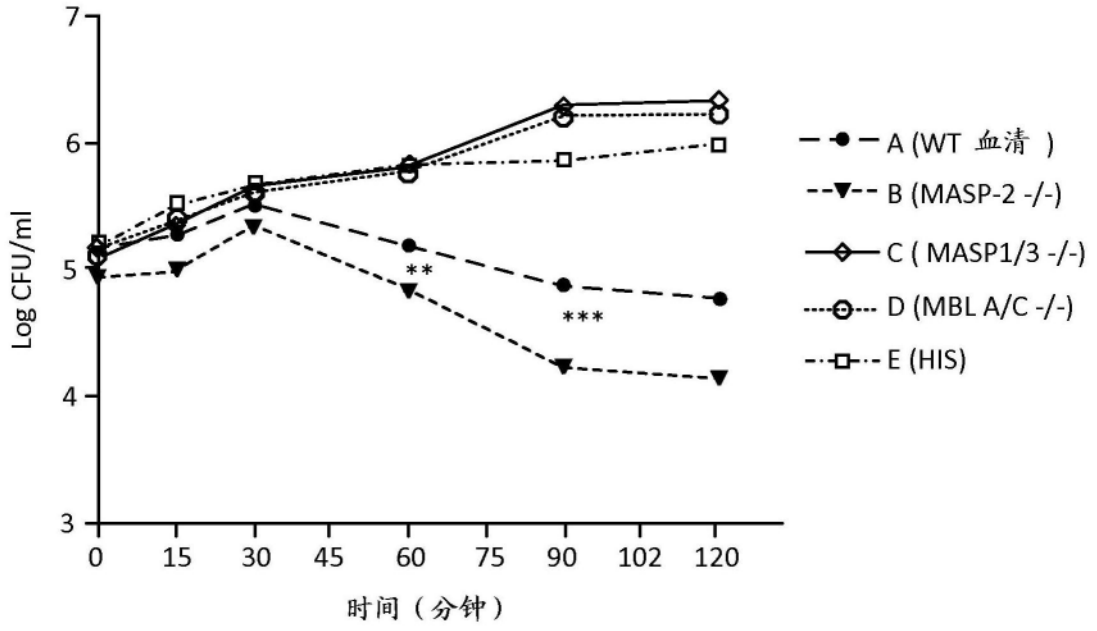

Log CFU/ml
7
6
5
4
3
0
15
30
45
60
75
90
102
120
时间（分钟）
**
***
A (WT 血清)
B (MASP-2 -/-)
C (MASP1/3 -/-)
D (MBL A/C -/-)
E (HIS)

图15

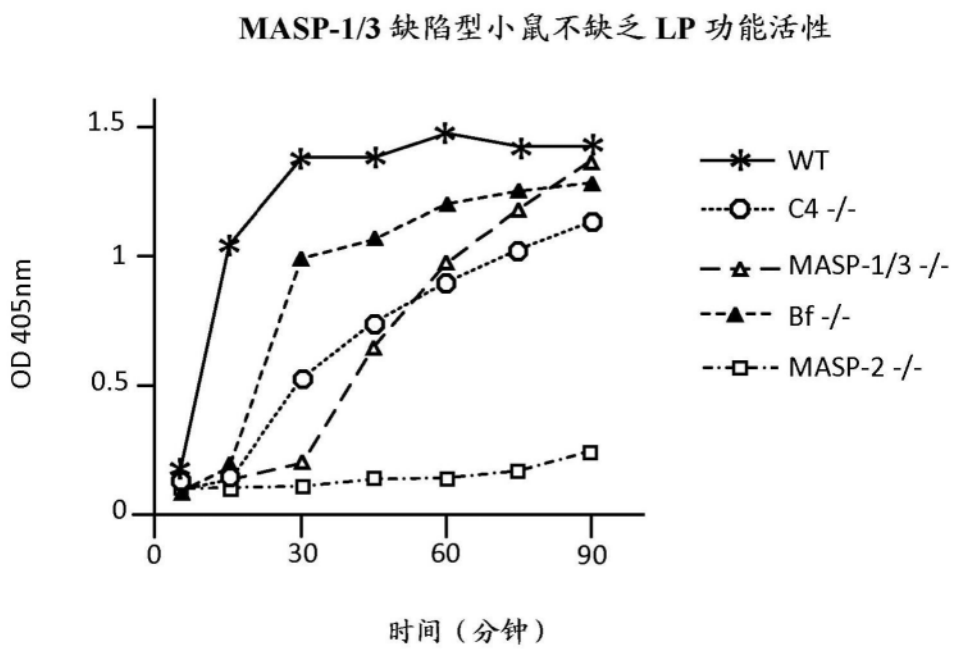

MASP-1/3 缺陷型小鼠不缺乏 LP 功能活性
OD 405nm
1.5
1
0.5
0
0
30
60
90
时间（分钟）
WT
C4 -/-
MASP-1/3 -/-
Bf -/-
MASP-2 -/-

图16

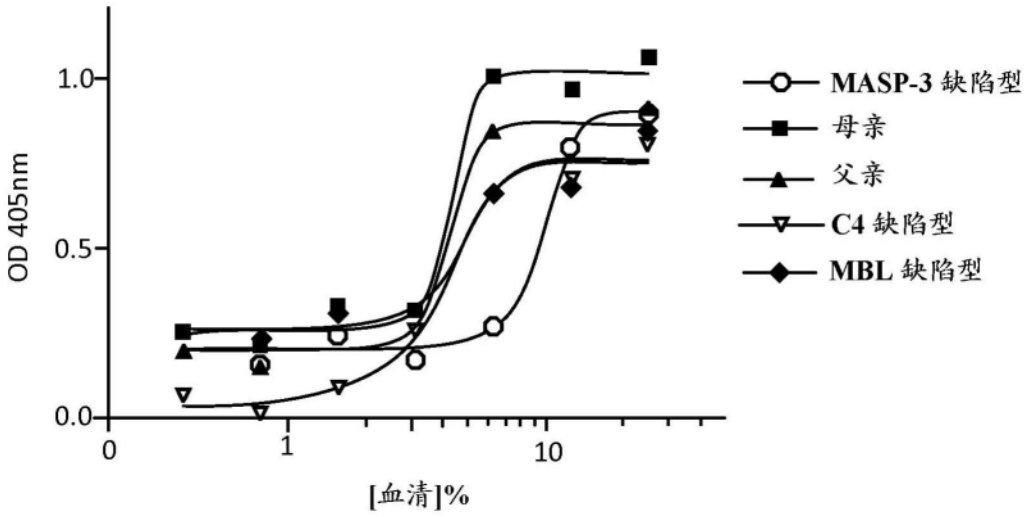

OD 405nm
1.0
0.5
0.0
0
1
10
[血清]%
MASP-3 缺陷型
母亲
父亲
C4 缺陷型
MBL 缺陷型

图17

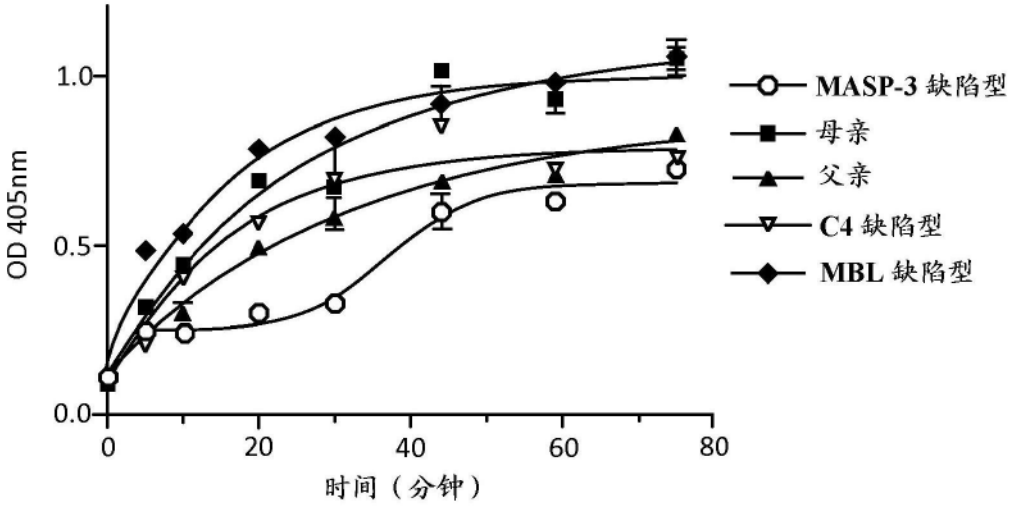

1.0
0.5
0.0
OD 405nm
0
20
40
60
80
时间（分钟）
MASP-3 缺陷型
母亲
父亲
C4 缺陷型
MBL 缺陷型

图18

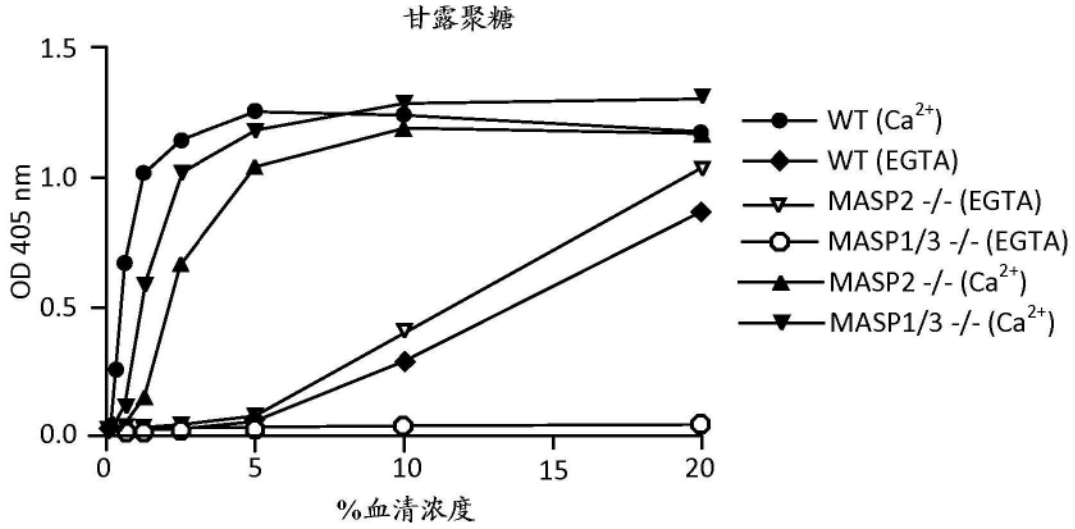

甘露聚糖
1.5
1.0
0.5
0.0
OD 405 nm
0
5
10
15
20
%血清浓度
WT (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)
MASP2 -/- (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)

图19A

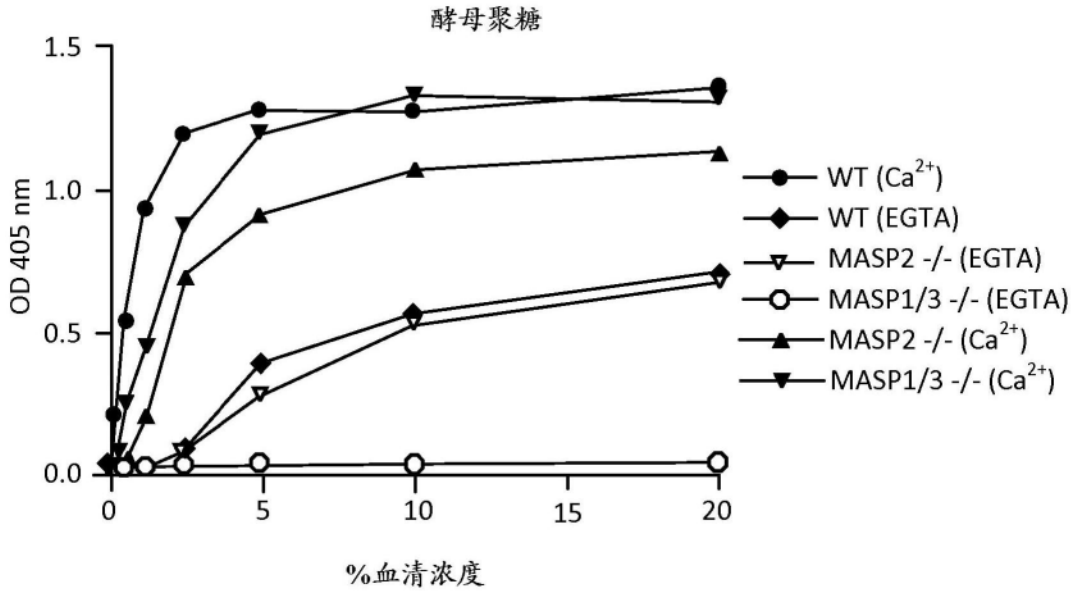

酵母聚糖
OD 405 nm
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5
10
15
20
%血清浓度
WT (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)
MASP2 -/- (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)

图19B

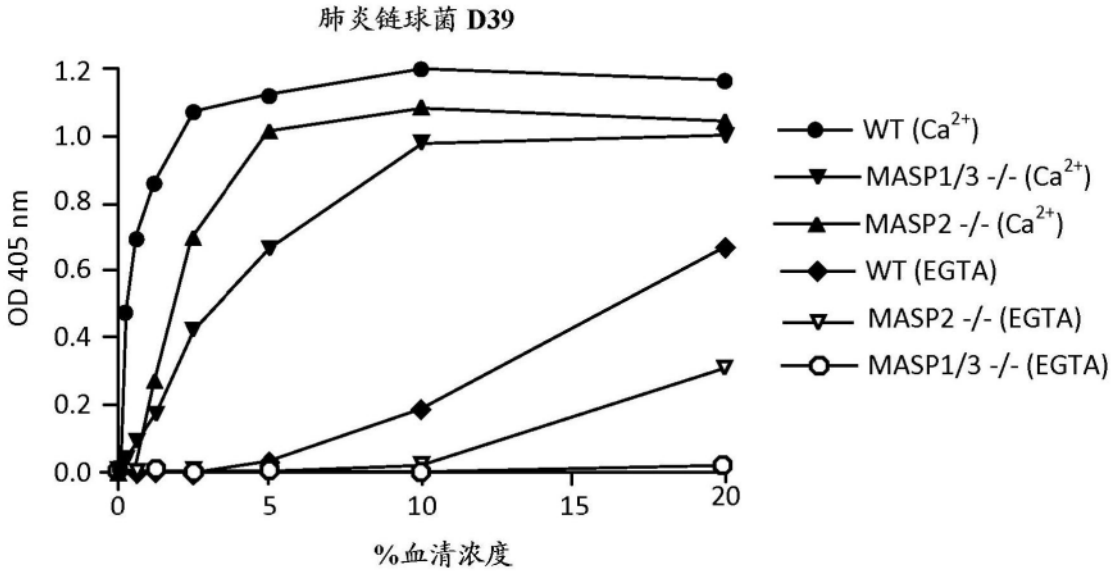

肺炎链球菌 D39
OD 405 nm
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
%血清浓度
WT (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)
MASP2 -/- (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)

图19C

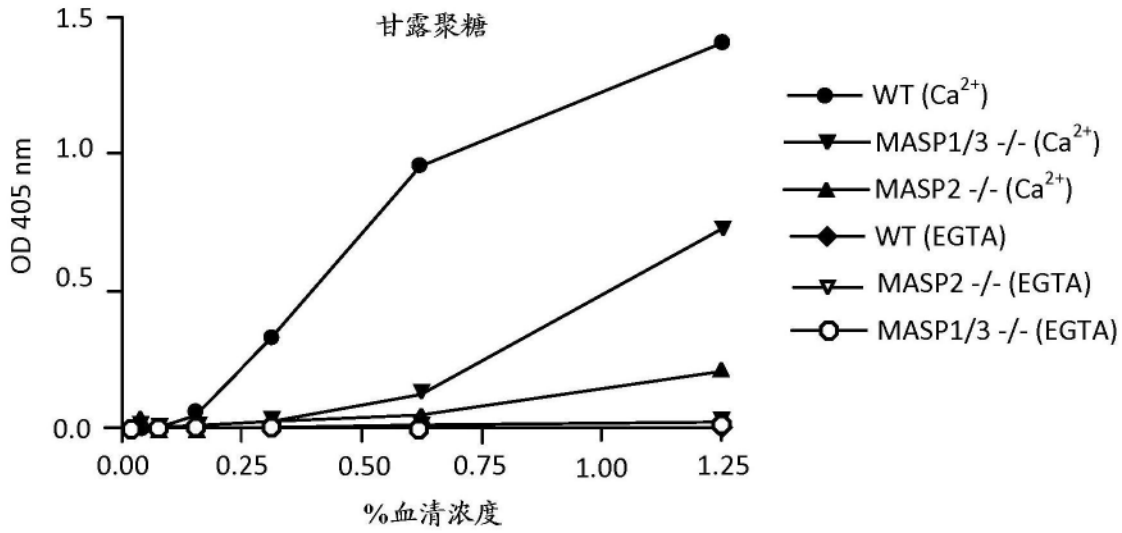

甘露聚糖
OD 405 nm
1.5
1.0
0.5
0.0
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
%血清浓度
WT (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)
MASP2 -/- (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)

图20A

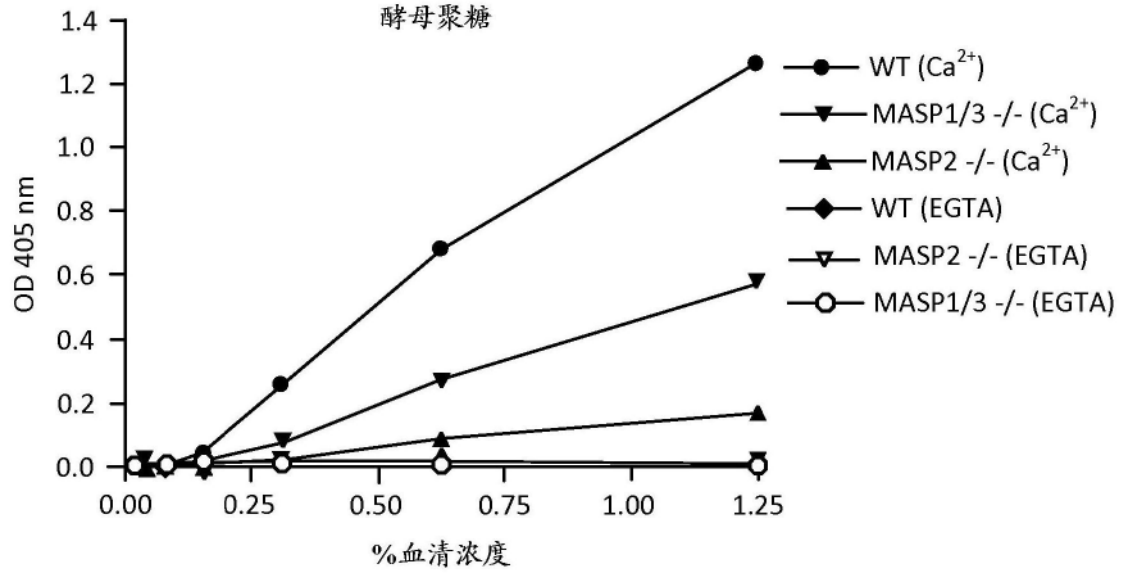

酵母聚糖
OD 405 nm
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.00
0.25
0.50
0.75
1.00
1.25
%血清浓度
WT (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)
MASP2 -/- (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)

图20B

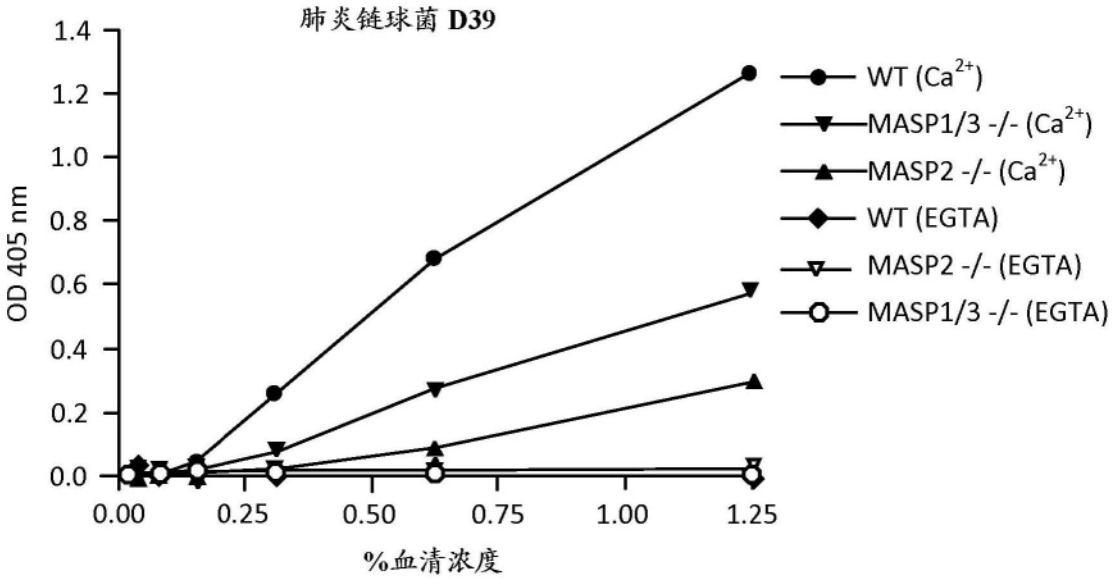

肺炎链球菌 D39
OD 405 nm
%血清浓度
WT (Ca2+)
MASP1/3 -/- (Ca2+)
MASP2 -/- (Ca2+)
WT (EGTA)
MASP2 -/- (EGTA)
MASP1/3 -/- (EGTA)

图20C

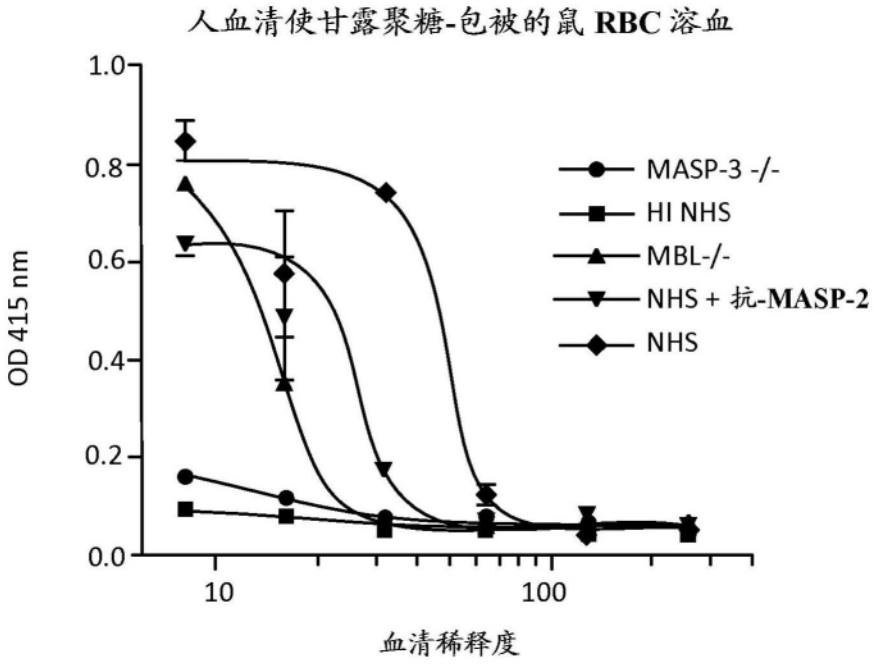

人血清使甘露聚糖-包被的鼠 RBC 溶血
OD 415 nm
血清稀释度
MASP-3 -/-
HI NHS
MBL-/-
NHS + 抗-MASP-2
NHS

图21

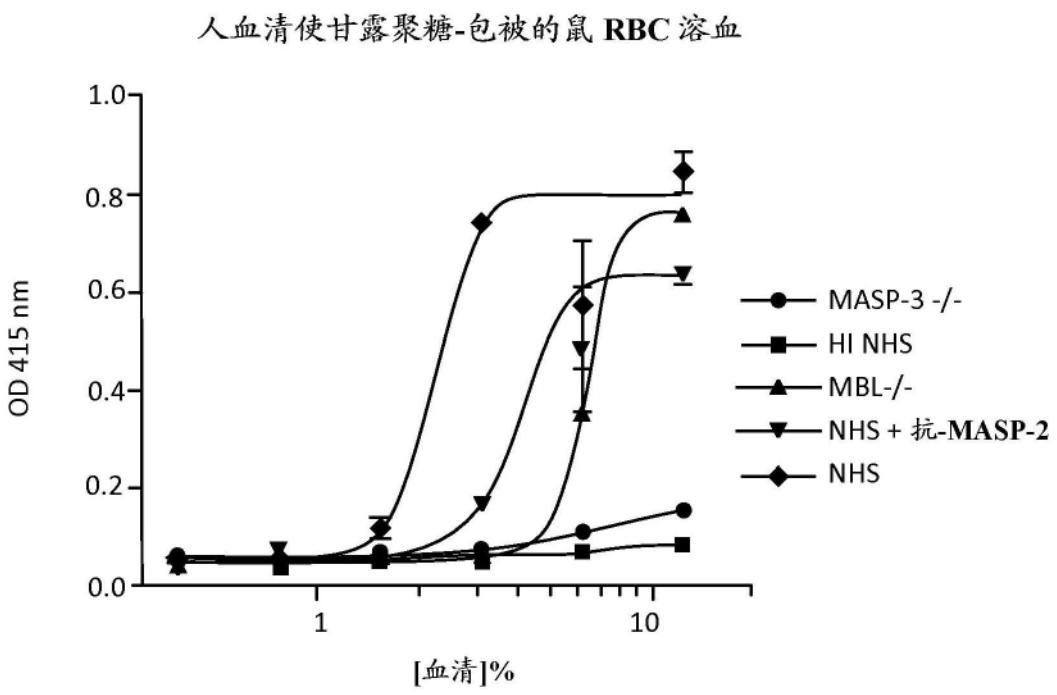

人血清使甘露聚糖-包被的鼠 RBC 溶血
OD 415 nm
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1
10
[血清]%
MASP-3 -/-
HI NHS
MBL-/-
NHS + 抗-MASP-2
NHS

图22

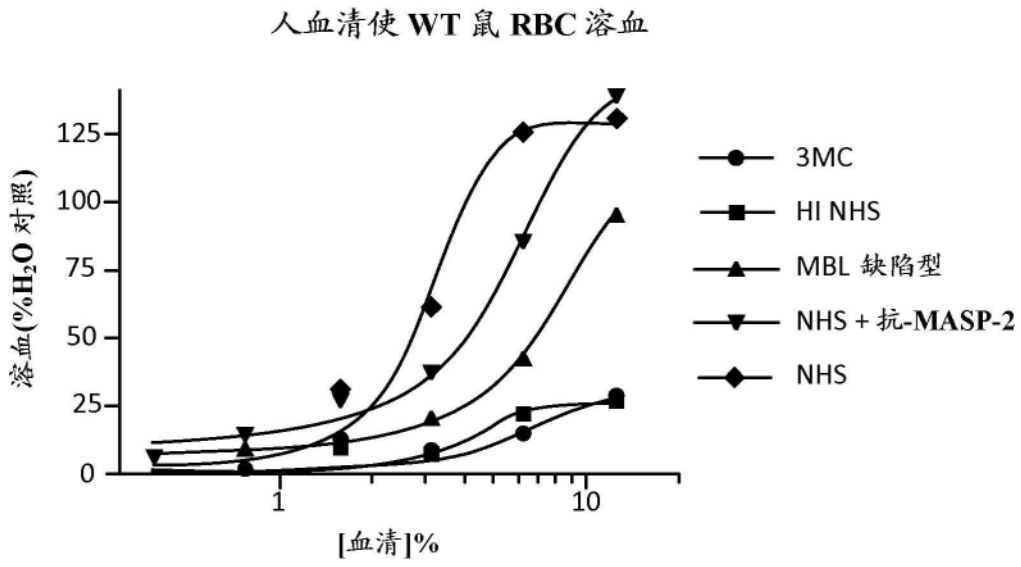

人血清使 WT 鼠 RBC 溶血
溶血(%H2O 对照)
125
100
75
50
25
0
1
10
[血清]%
3MC
HI NHS
MBL 缺陷型
NHS + 抗-MASP-2
NHS

图23

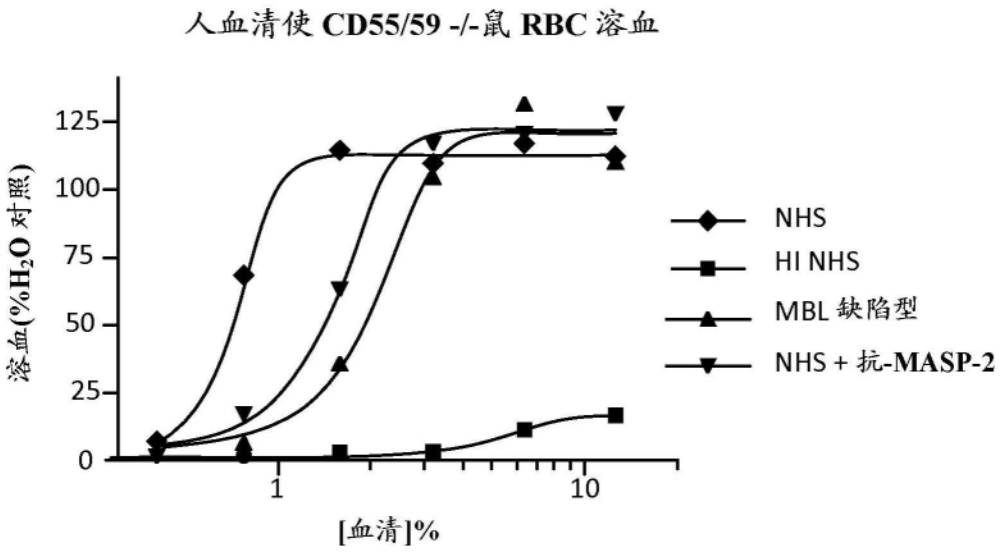

人血清使 CD55/59 -/-鼠 RBC 溶血
溶血(%H2O 对照)
125
100
75
50
25
0
1
10
[血清]%
NHS
HI NHS
MBL 缺陷型
NHS + 抗-MASP-2

图24

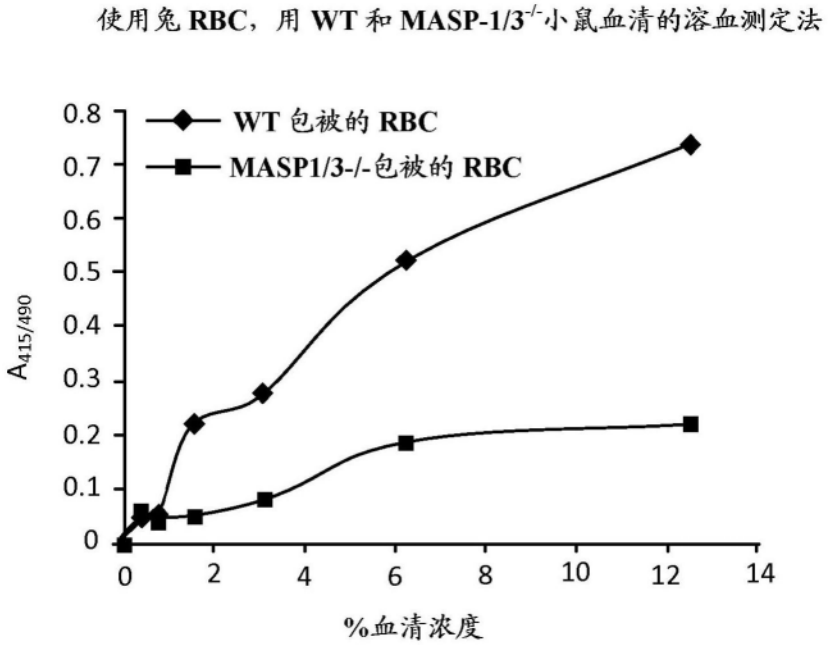

使用兔 RBC，用 WT 和 MASP-1/3-/-小鼠血清的溶血测定法
A415/490
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
2
4
6
8
10
12
14
%血清浓度
WT 包被的 RBC
MASP1/3-/-包被的 RBC

图25

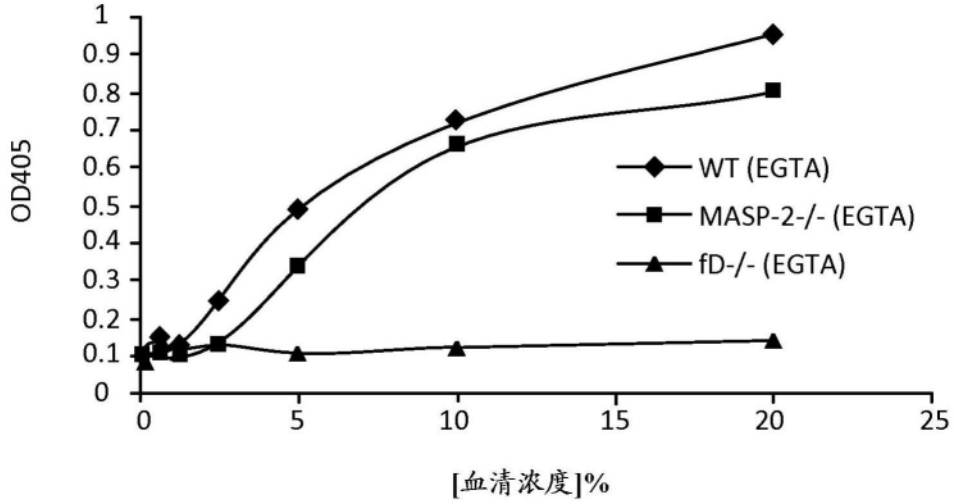

OD405
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0
5
10
15
20
25
WT (EGTA)
MASP-2-/- (EGTA)
fD-/- (EGTA)
[血清浓度]%

图26

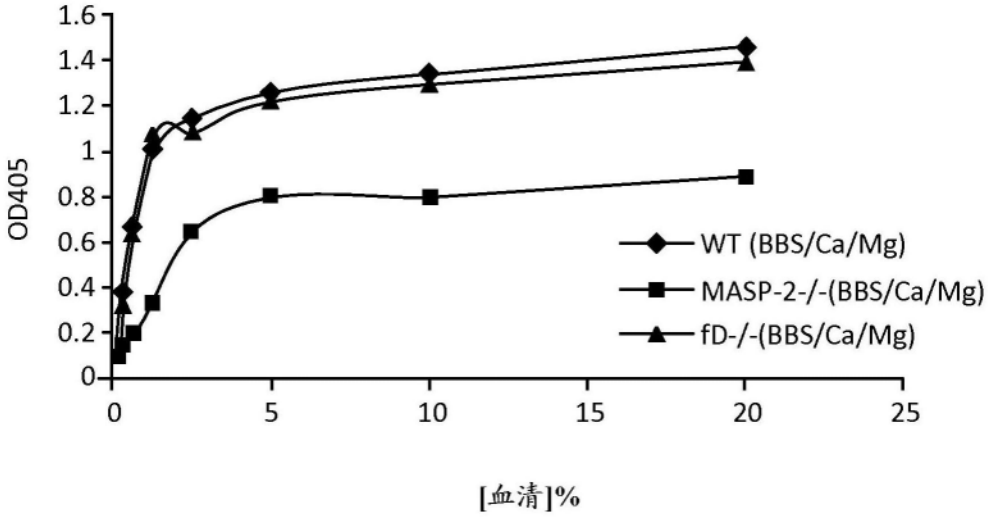

OD405
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
5
10
15
20
25
WT (BBS/Ca/Mg)
MASP-2-/-(BBS/Ca/Mg)
fD-/-(BBS/Ca/Mg)
[血清]%

图27

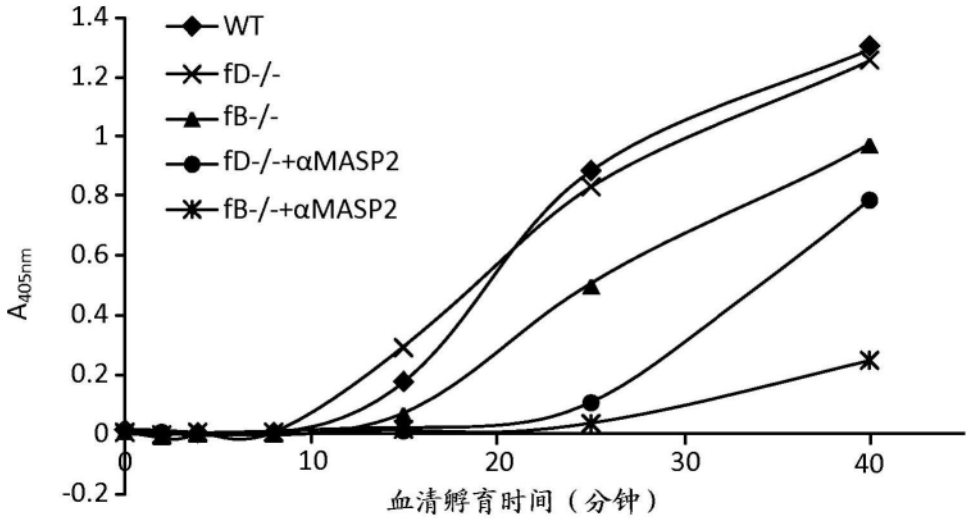

WT
fD-/-
fB-/-
fD-/-+αMASP2
fB-/-+αMASP2
A_{405nm}
血清孵育时间（分钟）

图28

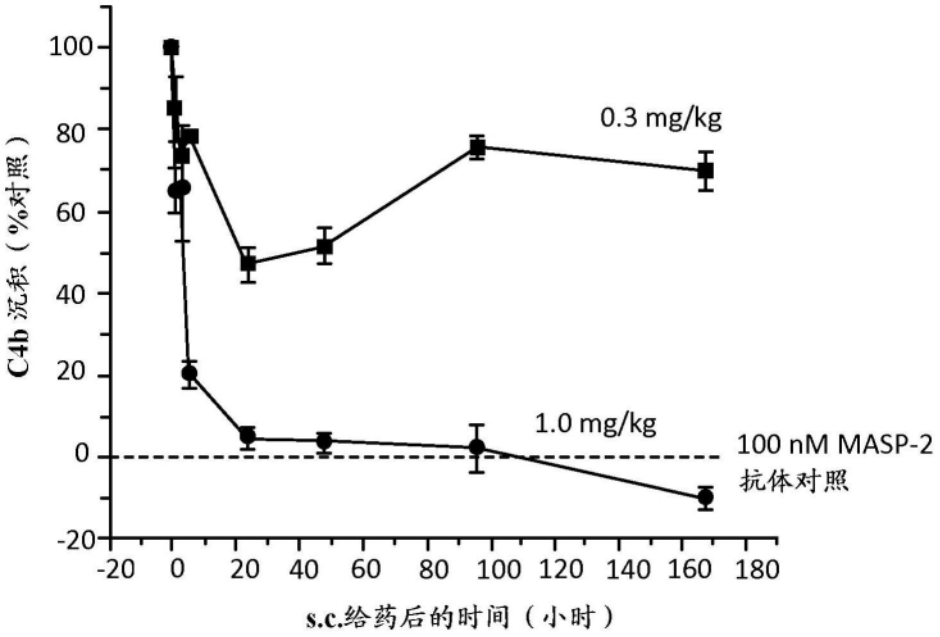

0.3 mg/kg
1.0 mg/kg
100 nM MASP-2
抗体对照
C4b 沉积（%对照）
s.c.给药后的时间（小时）

图29A

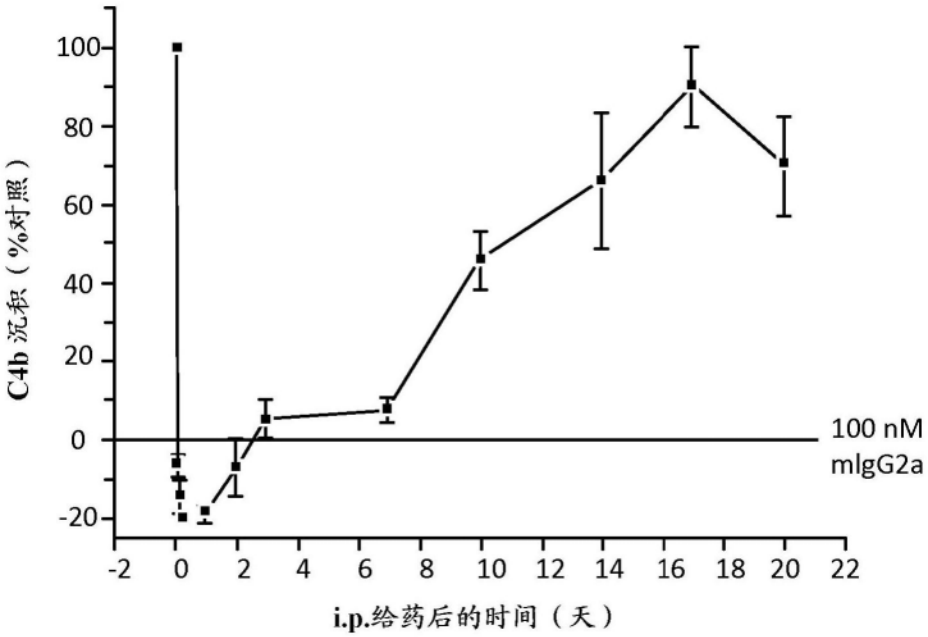

C4b 沉积（%对照）
100
80
60
40
20
0
-20
-2
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
i.p.给药后的时间（天）
100 nM
mIgG2a

图29B

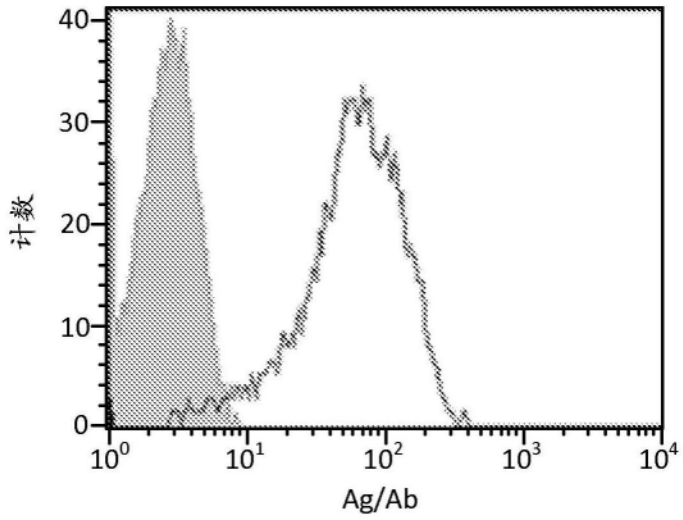

计数
40
30
20
10
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Ag/Ab

图30A

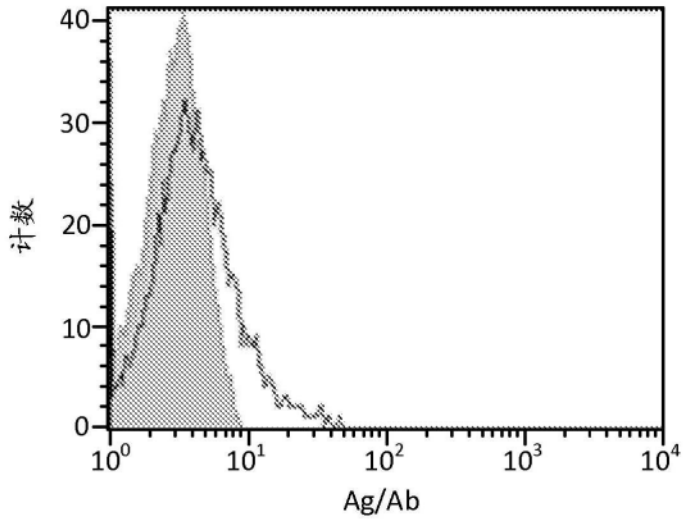

40
30
20
10
0
计数
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
Ag/Ab

图30B

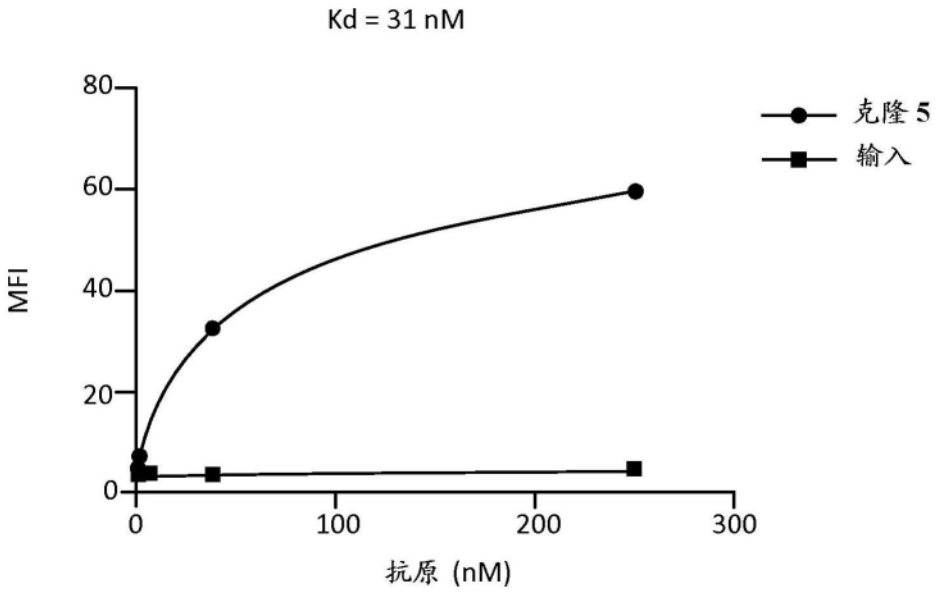

Kd = 31 nM
80
60
40
20
0
MFI
0
100
200
300
抗原 (nM)
克隆 5
输入

图31

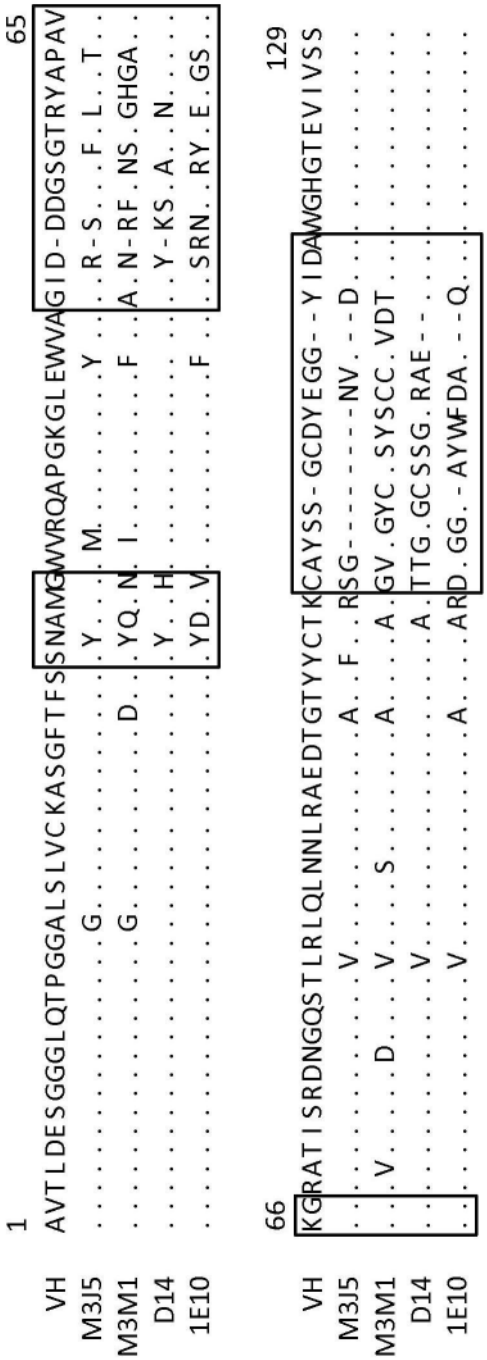

1
65
66
129
VH AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKASGFTFSSNAMGWVRQAPGKGLEWVAGIDDDGSGTRYAPAV
M3J5 ..G.....Y...M.....Y...R-S...F.L..T..
M3M1 ..G.....D...YQ.N..I.....F...A.N-RF.NS.GHGA..
D14 .....Y..H.....Y-KS.A..N.....
1E10 .....YD.V.....F...SRN..RY.E.GS..
VH KGRATISRDNGQSTLRLQLNNLRAEDTGTYYCTKCAYSS-GCDYEGG--YIDAWGHGTEVIVSS
M3J5 .....V.....A..F..RSG-----NV.--D.....
M3M1 ..V.....D....V.....S.....A....A..GV.GYC.SYSCC.VDT.....
D14 .....V.....A..TTG.GCSSG.RAE--.....
1E10 .....V.....A....ARD.GG.-AYWFDA.--Q.....

图32A

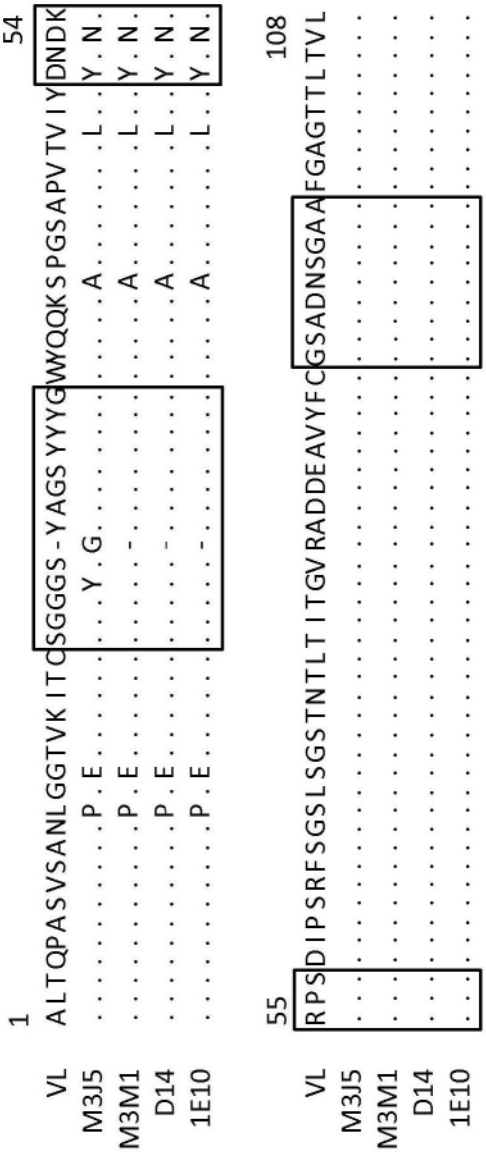

1
54
55
108
VL ALTQPASVSANLGGTVKITCSGGGS-YAGSYYYGWYQQKSPGSAPVTVIYDNDK
M3J5 .....PE.....Y.G.....-.....A.....L..Y.N.
M3M1 .....PE.....-.....A.....L..Y.N.
D14 .....PE.....-.....A.....L..Y.N.
1E10 .....PE.....-.....A.....L..Y.N.
VL RPSDIPSRFSGSLSGSTNTLTITGVRADDEAVYFCGSADNSGAAFGAGTTLTVL
M3J5 .....
M3M1 .....
D14 .....
1E10 .....

图32B

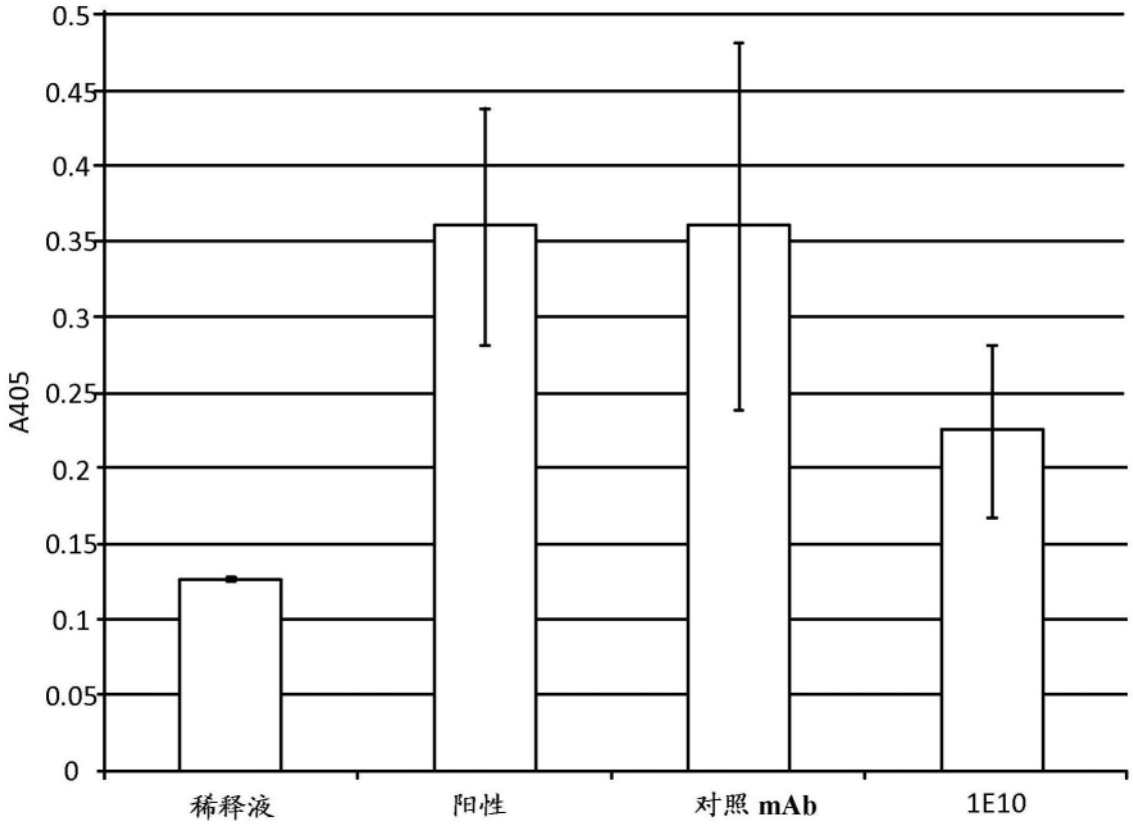

0.5
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
A405
稀释液
阳性
对照 mAb
1E10

图33

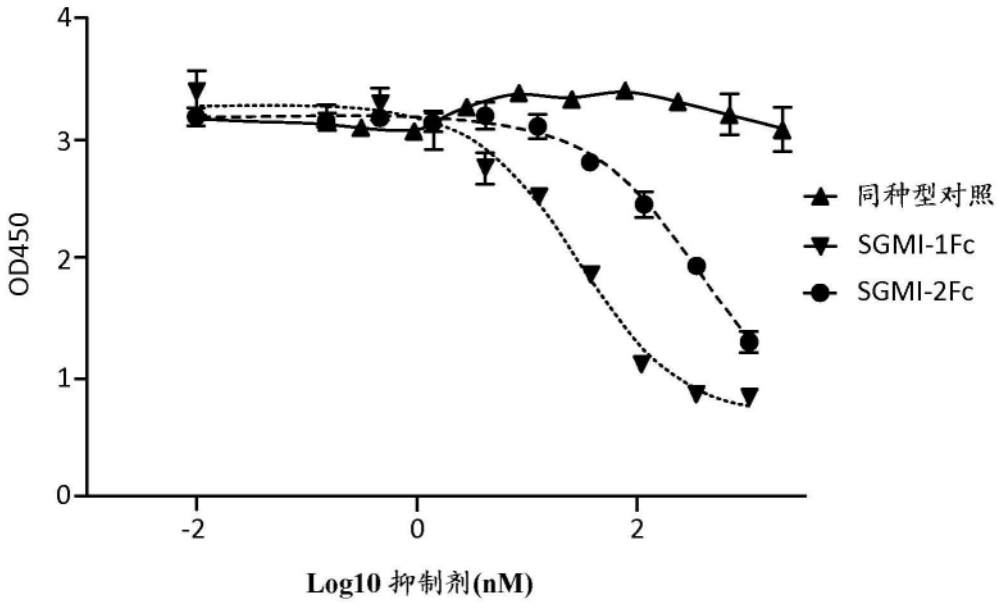

4
3
2
1
0
OD450
-2
0
2
Log10 抑制剂(nM)
同种型对照
SGMI-1Fc
SGMI-2Fc

图34

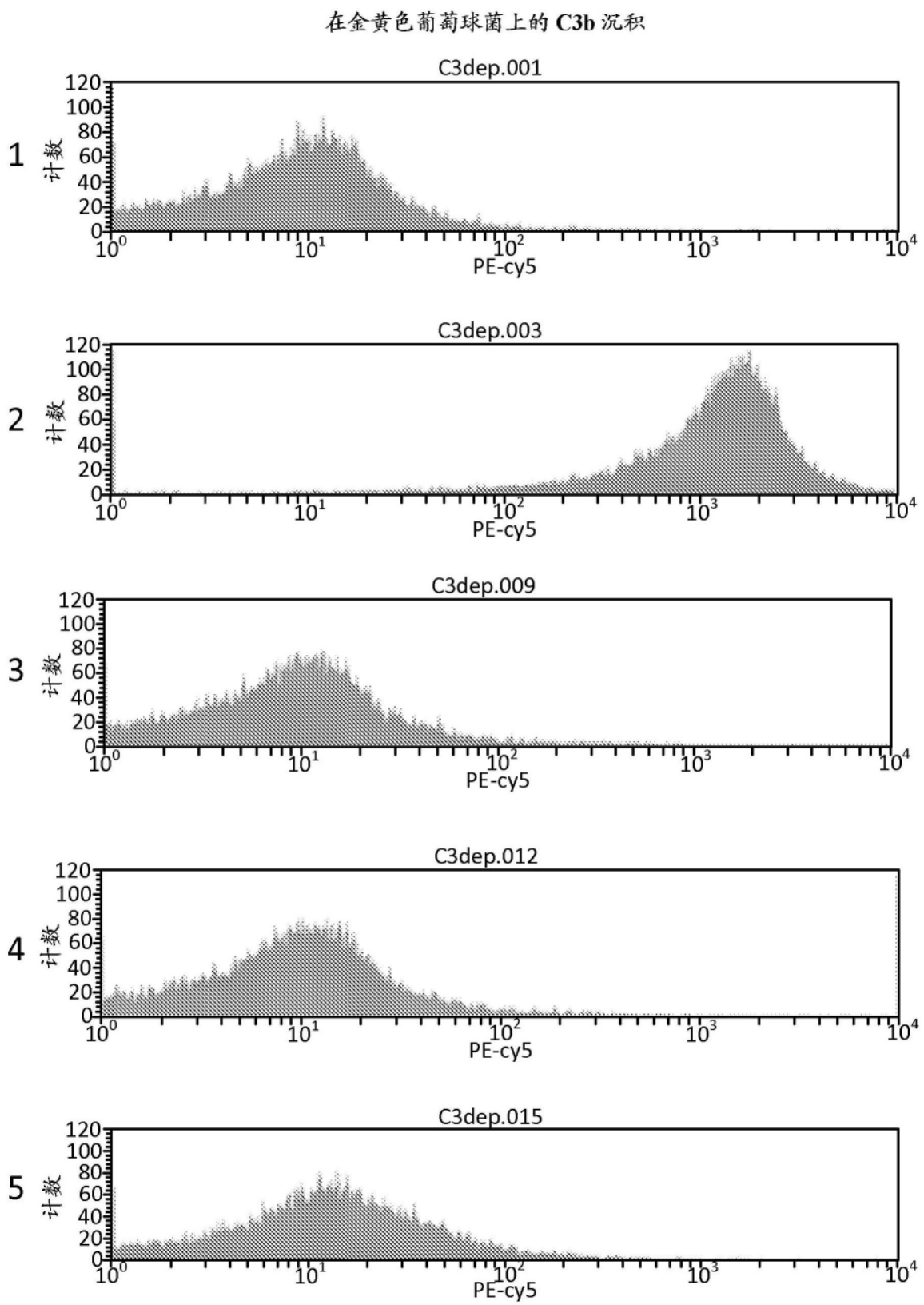

在金黄色葡萄球菌上的 C3b 沉积
C3dep.001
1
计数
PE-cy5
C3dep.003
2
计数
PE-cy5
C3dep.009
3
计数
PE-cy5
C3dep.012
4
计数
PE-cy5
C3dep.015
5
计数
PE-cy5

图35A

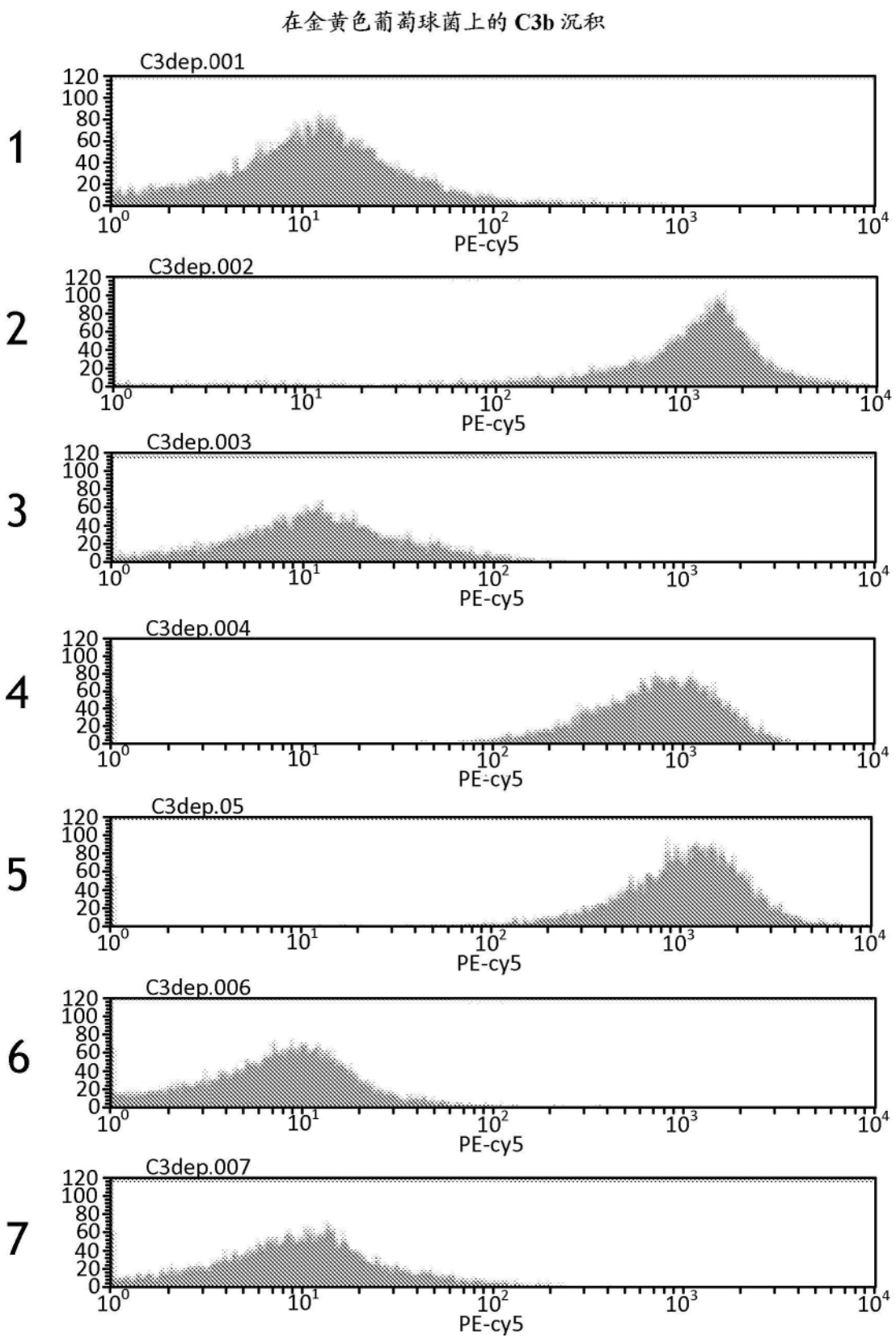
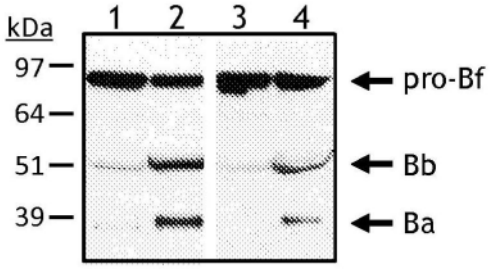

在金黄色葡萄球菌上的 C3b 沉积
C3dep.001
C3dep.002
C3dep.003
C3dep.004
C3dep.05
C3dep.006
C3dep.007
1
2
3
4
5
6
7
120
100
80
60
40
20
0
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
PE-cy5

图35B

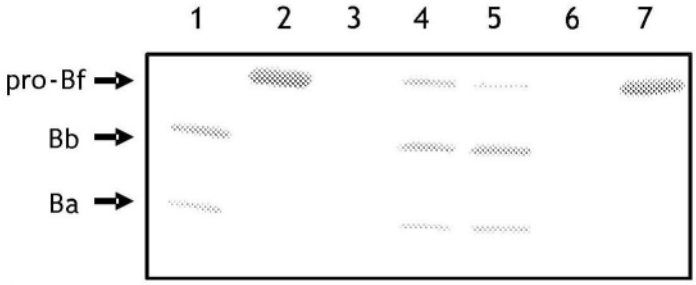
在响应金黄色葡萄球菌时的因子 B 切割



含重组 MASP-3 的 3MC 血清的
补体增加因子 B 切割

图36

MASP-3 直接切割 pro-Bf



C3	+	-	+	+	+	+	-
pro-Bf	+	+	-	+	+	-	+
MASP-3	+	+	+	+	-	-	-
pro-Df	+	+	+	-	+	-	-

图37

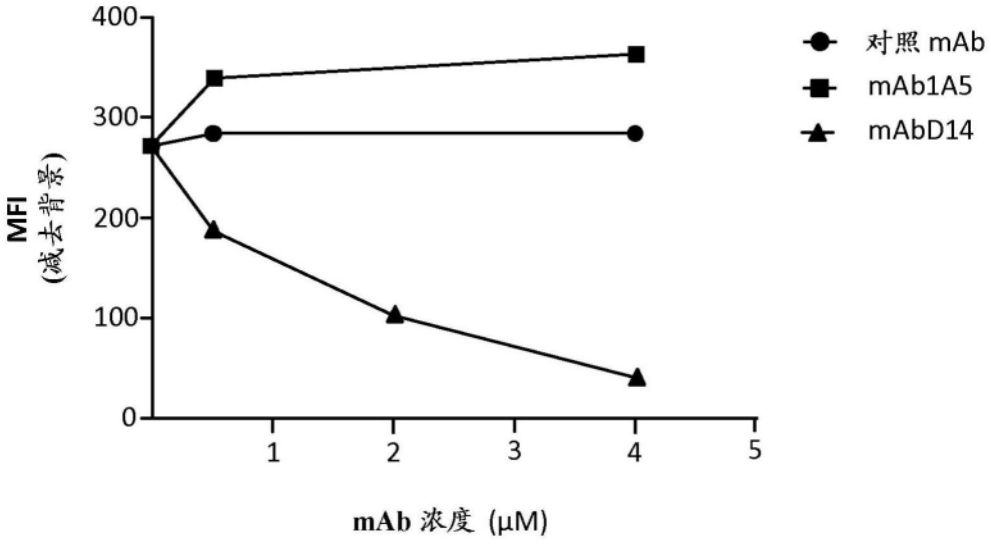

400
300
200
100
0
MFI
(减去背景)
1
2
3
4
5
mAb 浓度 (μM)
对照 mAb
mAb1A5
mAbD14

图38

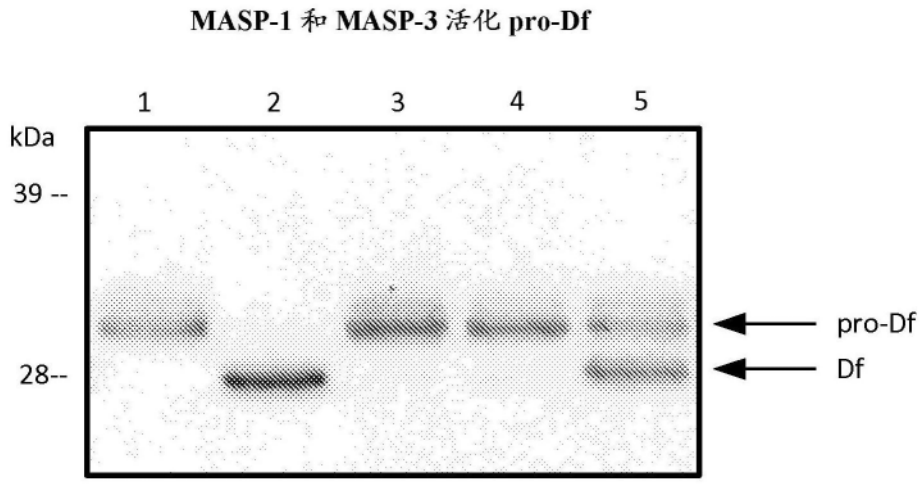

MASP-1 和 MASP-3 活化 pro-Df
1
2
3
4
5
kDa
39 --
28--
pro-Df
Df

图39

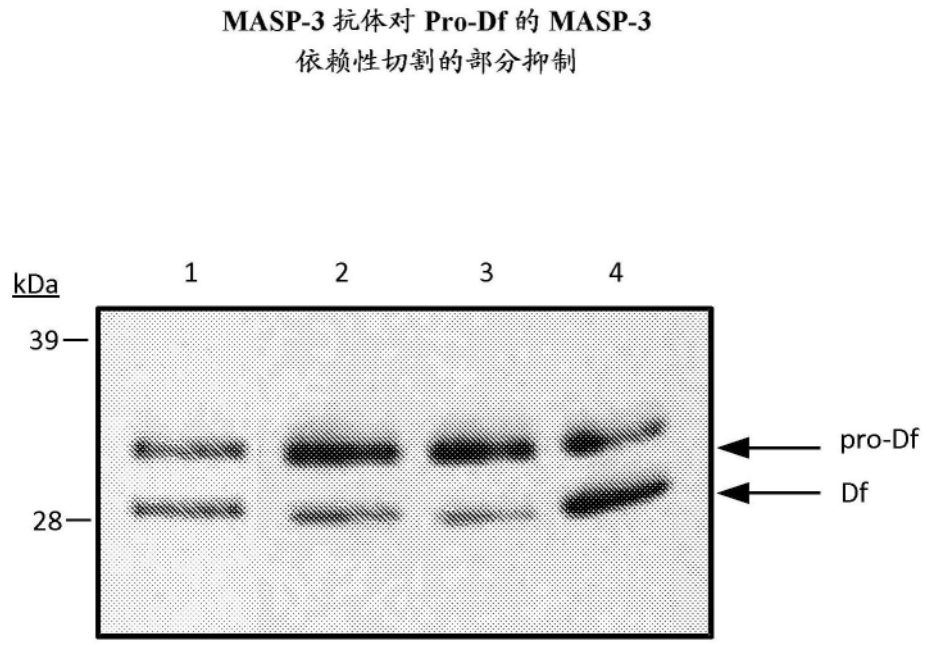

MASP-3 抗体对 Pro-Df 的 MASP-3
依赖性切割的部分抑制
kDa
1
2
3
4
39
28
pro-Df
Df

图40

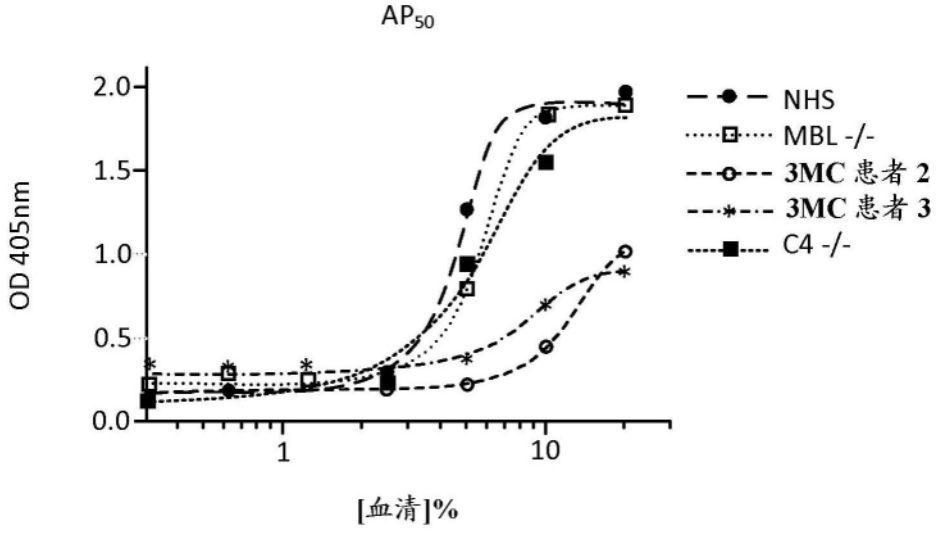

AP50
OD 405nm
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
10
[血清]%
NHS
MBL -/-
3MC 患者 2
3MC 患者 3
C4 -/-

图41

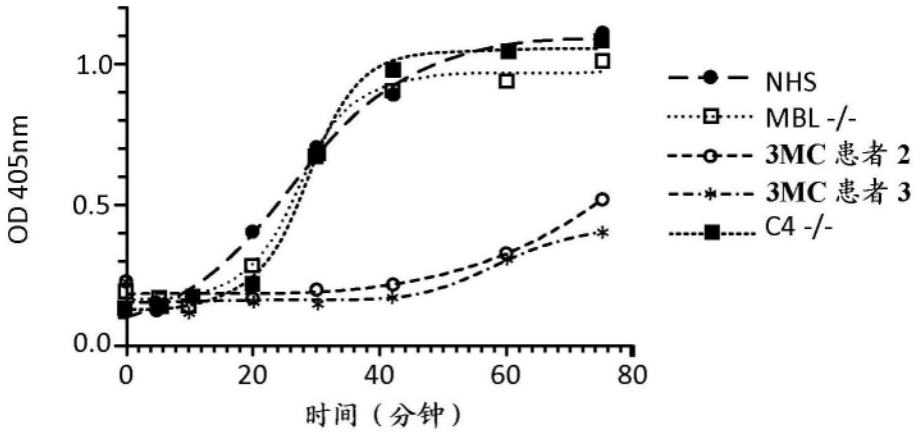

OD 405nm
1.0
0.5
0.0
0
20
40
60
80
时间（分钟）
NHS
MBL -/-
3MC 患者 2
3MC 患者 3
C4 -/-

图42A

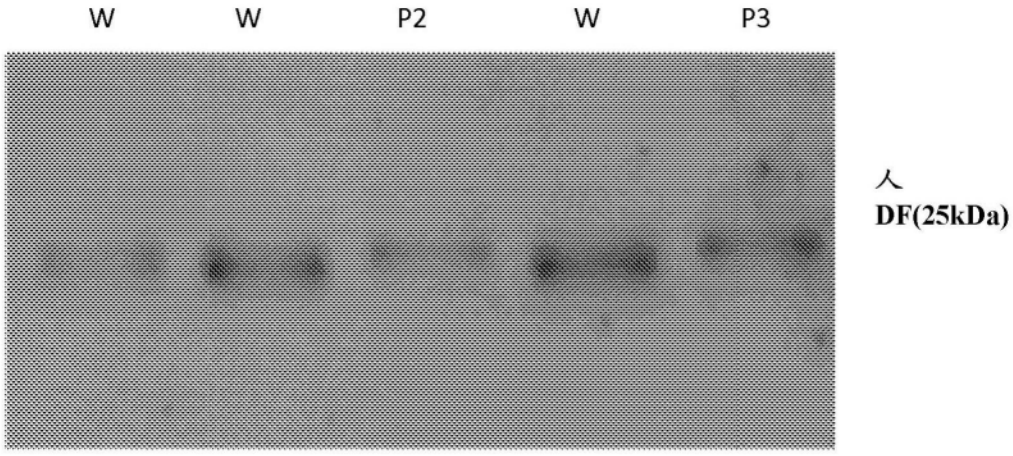

W
W
P2
W
P3
人
DF(25kDa)

图42B

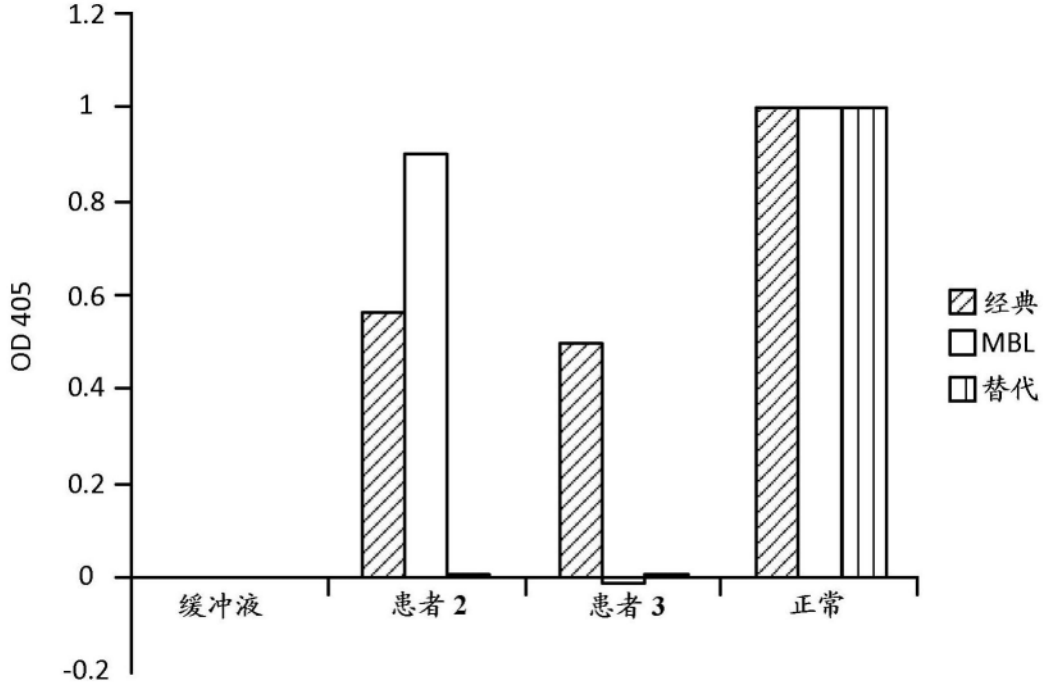

1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
OD 405
缓冲液
患者 2
患者 3
正常
经典
MBL
替代

图42C

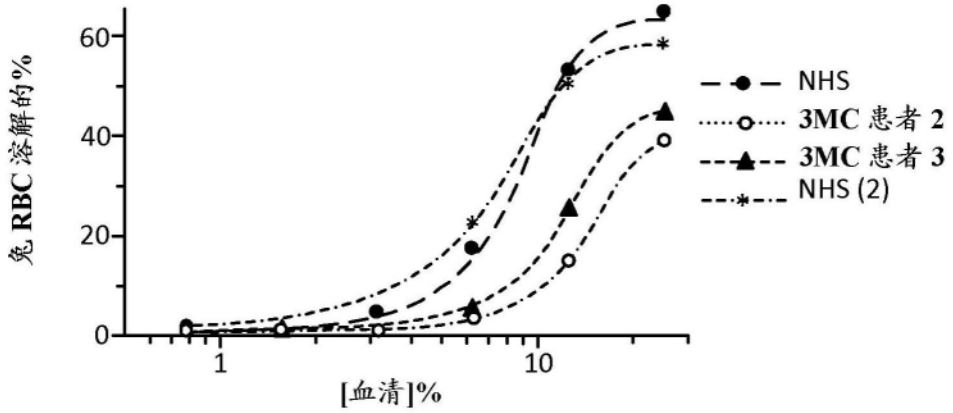

60
40
20
0
1
10
兔 RBC 溶解的%
[血清]%
NHS
3MC 患者 2
3MC 患者 3
NHS (2)

图43

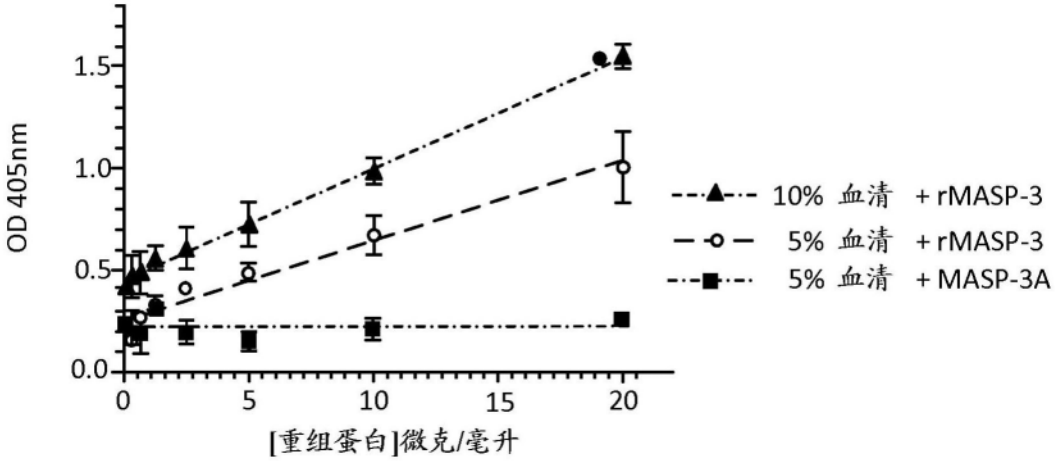

OD 405nm
1.5
1.0
0.5
0.0
0
5
10
15
20
[重组蛋白]微克/毫升
10% 血清 + rMASP-3
5% 血清 + rMASP-3
5% 血清 + MASP-3A

图44

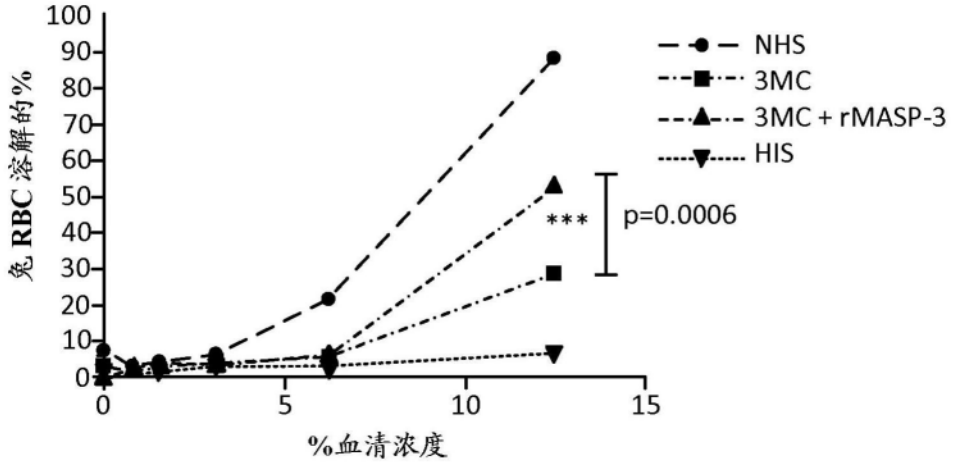

兔 RBC 溶解的%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
5
10
15
%血清浓度
NHS
3MC
3MC + rMASP-3
HIS
***
p=0.0006

图45

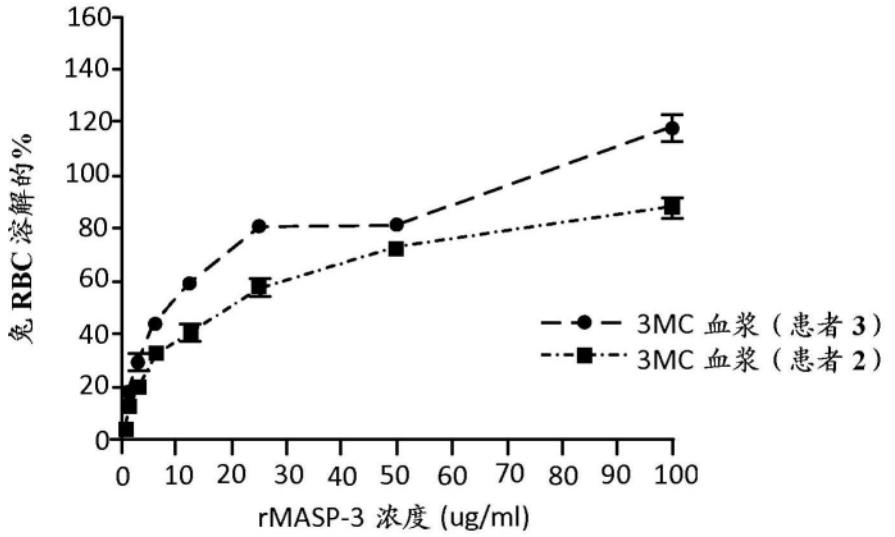

160
140
120
100
80
60
40
20
0
兔 RBC 溶解的%
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
rMASP-3 浓度 (ug/ml)
3MC 血浆（患者 3）
3MC 血浆（患者 2）

图46

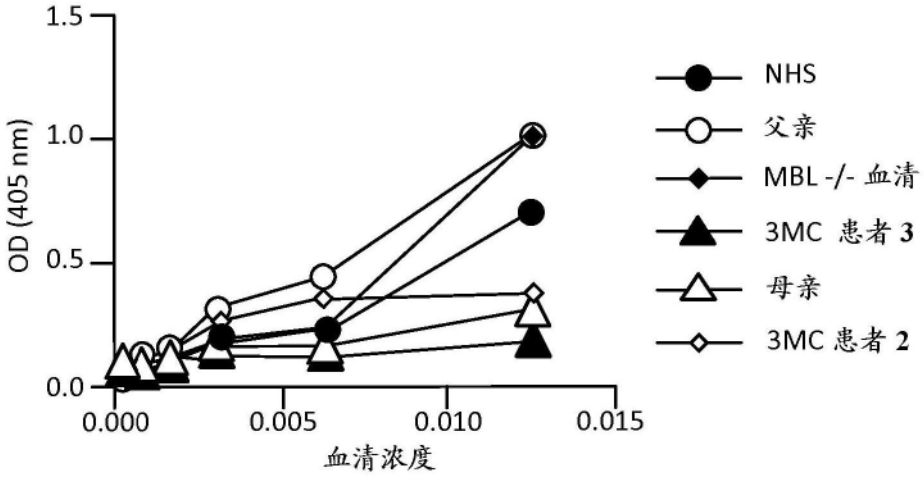

1.5
1.0
0.5
0.0
OD (405 nm)
0.000 0.005 0.010 0.015
血清浓度
NHS
父亲
MBL -/- 血清
3MC 患者 3
母亲
3MC 患者 2

图47

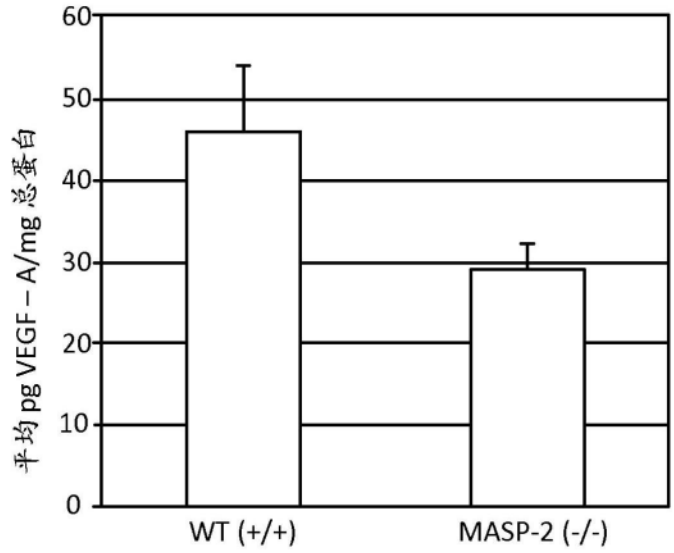

60
50
40
30
20
10
0
平均 pg VEGF – A/mg 总蛋白
WT (+/+)
MASP-2 (-/-)

图48A

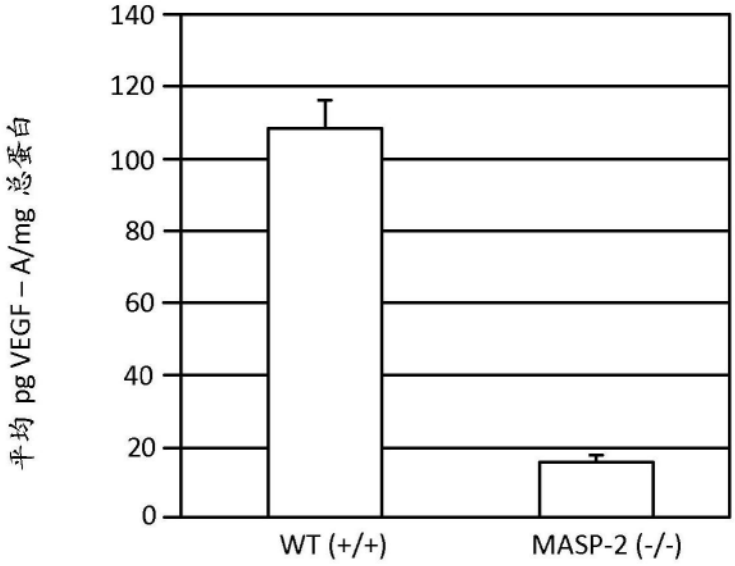

140
120
100
80
60
40
20
0
平均 pg VEGF – A/mg 总蛋白
WT (+/+)
MASP-2 (-/-)

图48B

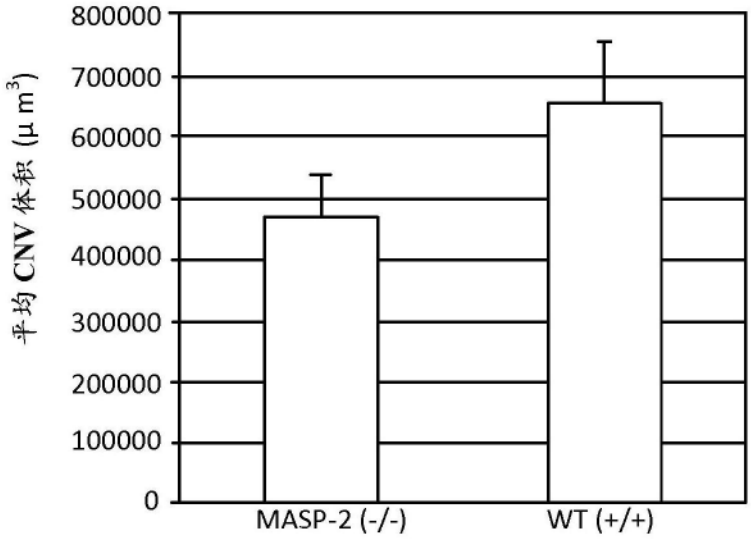

800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
平均 CNV 体积 (μ m³)
MASP-2 (-/-)
WT (+/+)

图49

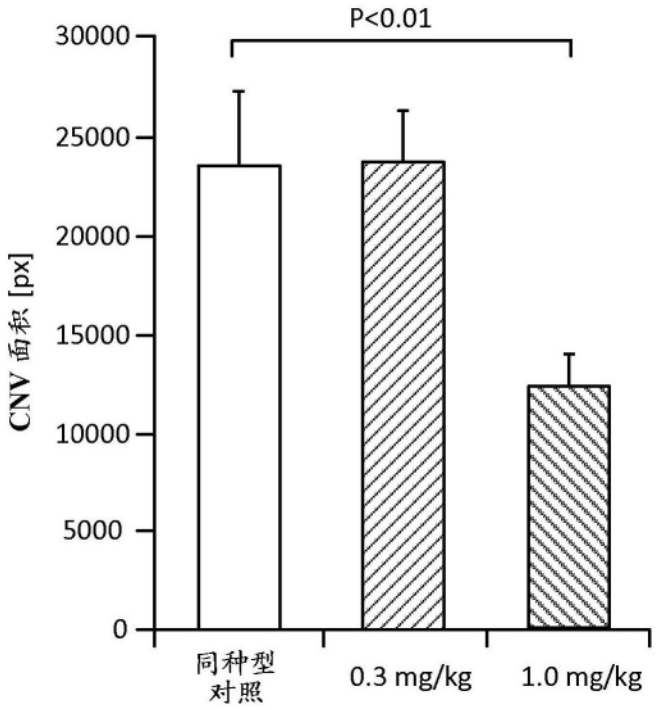

P<0.01
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
CNV 面积 [px]
同种型
对照
0.3 mg/kg
1.0 mg/kg

图50

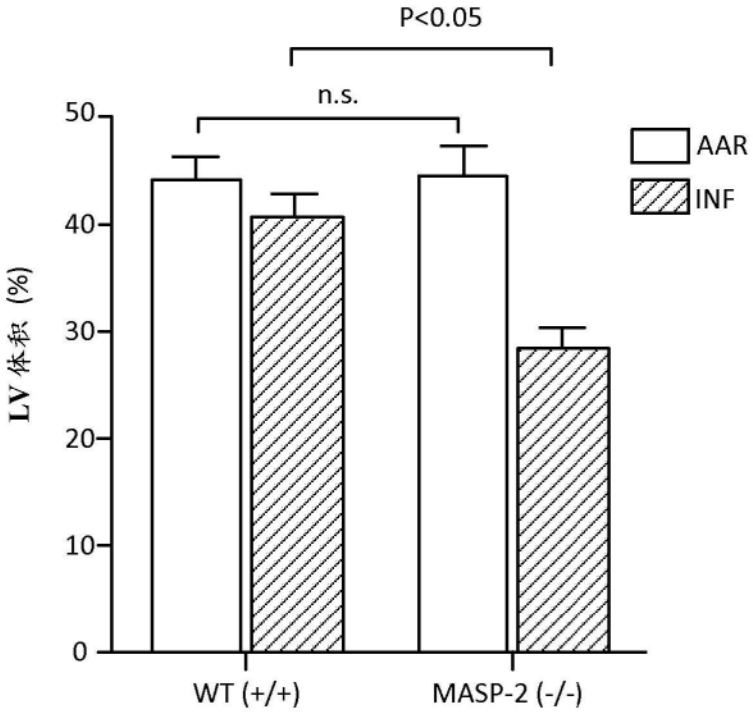

P<0.05
n.s.
AAR
INF
LV 体积 (%)
50
40
30
20
10
0
WT (+/+)
MASP-2 (-/-)

图51A

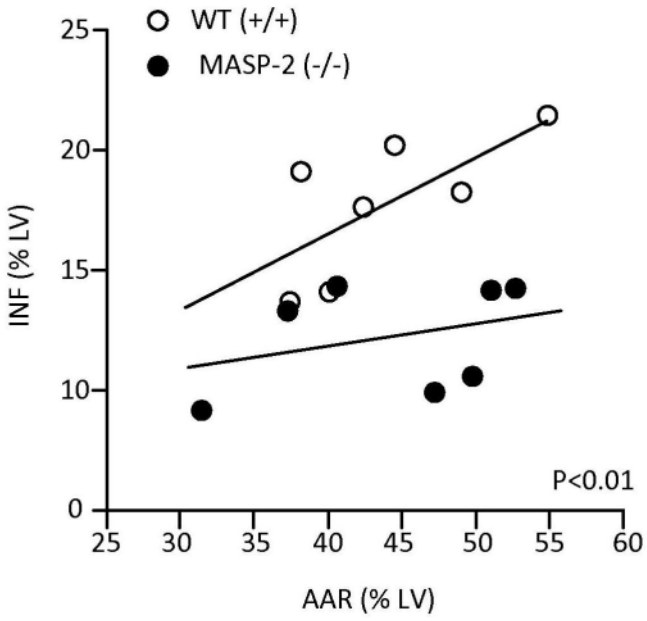

WT (+/+)
MASP-2 (-/-)
INF (% LV)
25
20
15
10
0
P<0.01
25
30
35
40
45
50
55
60
AAR (% LV)

图51B

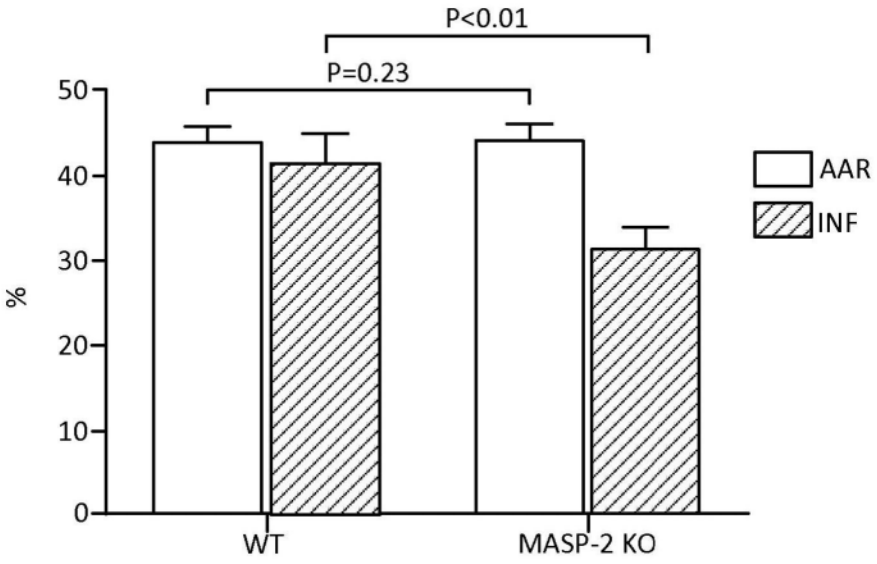

P<0.01
P=0.23
50
40
30
20
10
0
%
AAR
INF
WT
MASP-2 KO

图52A

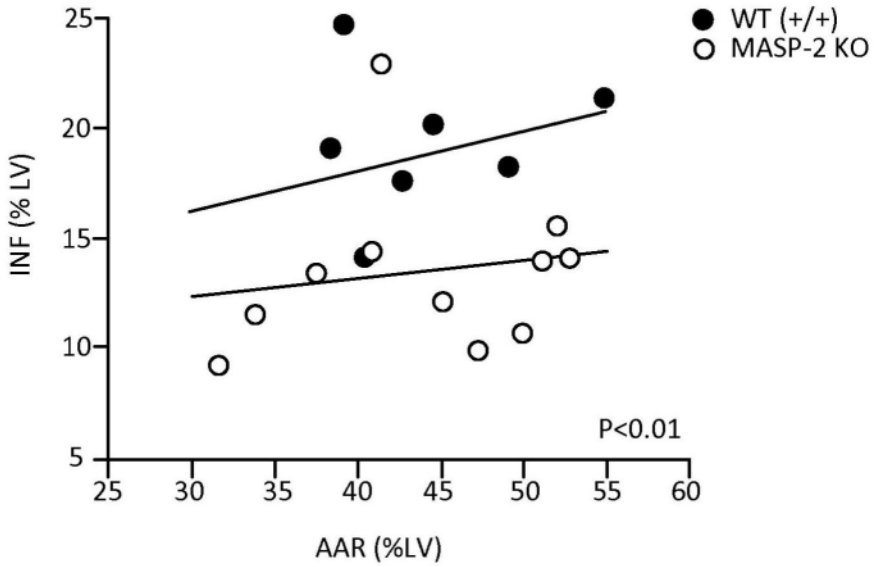

WT (+/+)
MASP-2 KO
25
20
15
10
5
INF (% LV)
P<0.01
25
30
35
40
45
50
55
60
AAR (%LV)

图52B

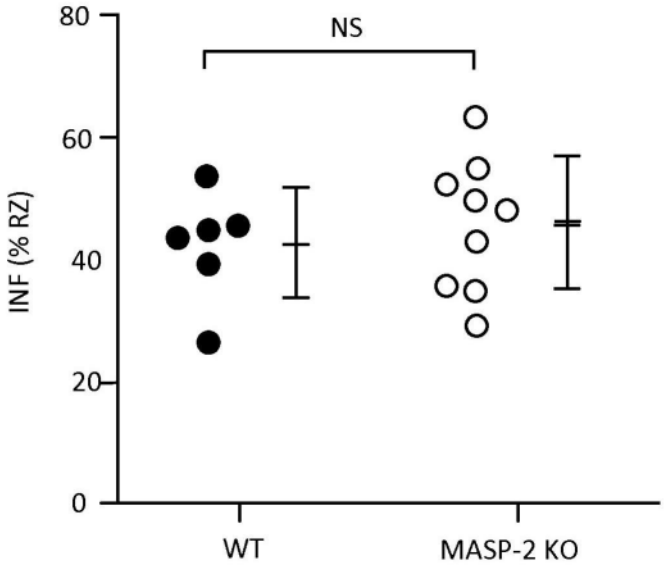

NS
80
60
40
20
0
INF (% RZ)
WT
MASP-2 KO

图52C

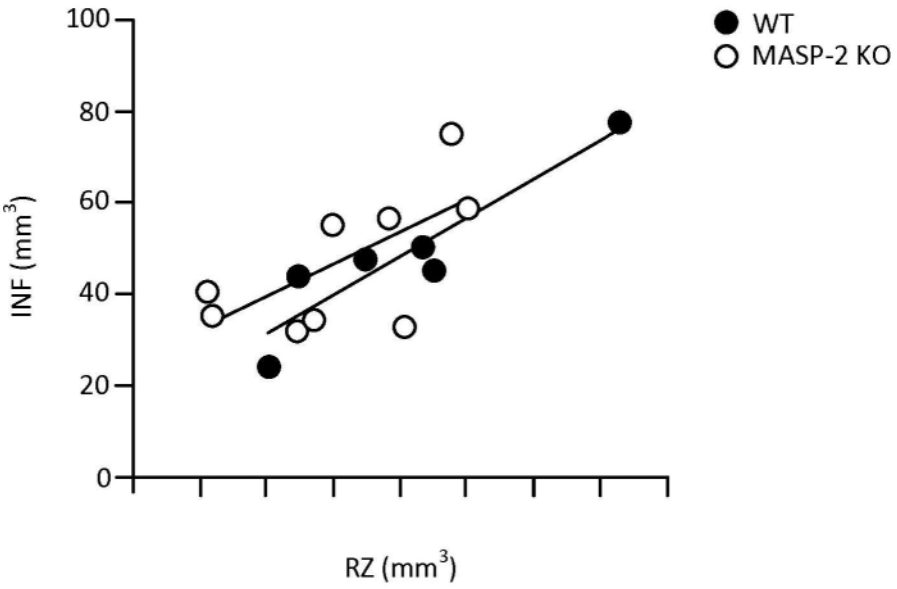

WT
MASP-2 KO
100
80
60
40
20
0
INF (mm3)
RZ (mm3)

图52D

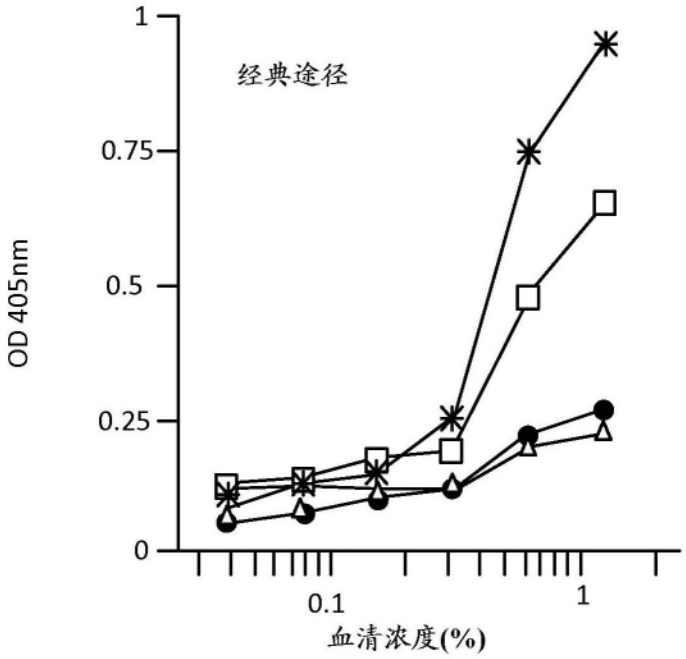

经典途径
OD 405nm
1
0.75
0.5
0.25
0
0.1
1
血清浓度(%)

图53A

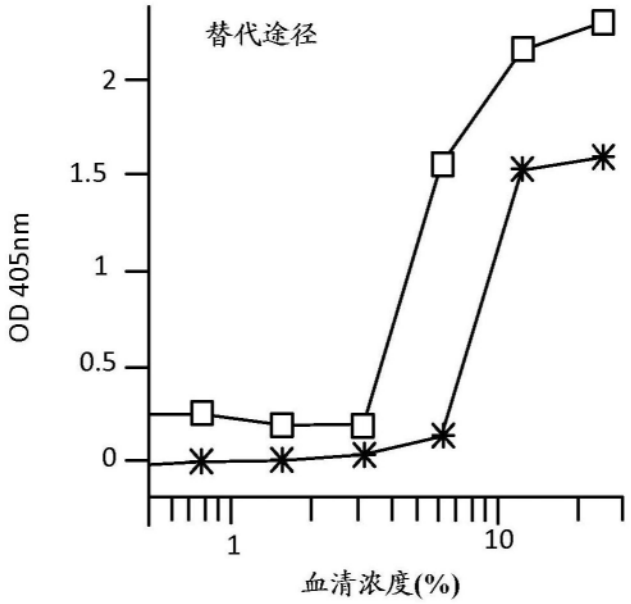

替代途径
OD 405nm
2
1.5
1
0.5
0
1
10
血清浓度(%)

图53B

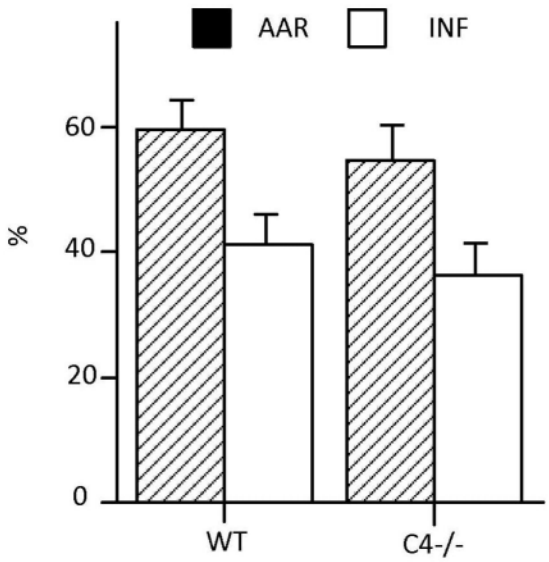

AAR
INF
60
40
20
0
%
WT
C4-/-

图54A

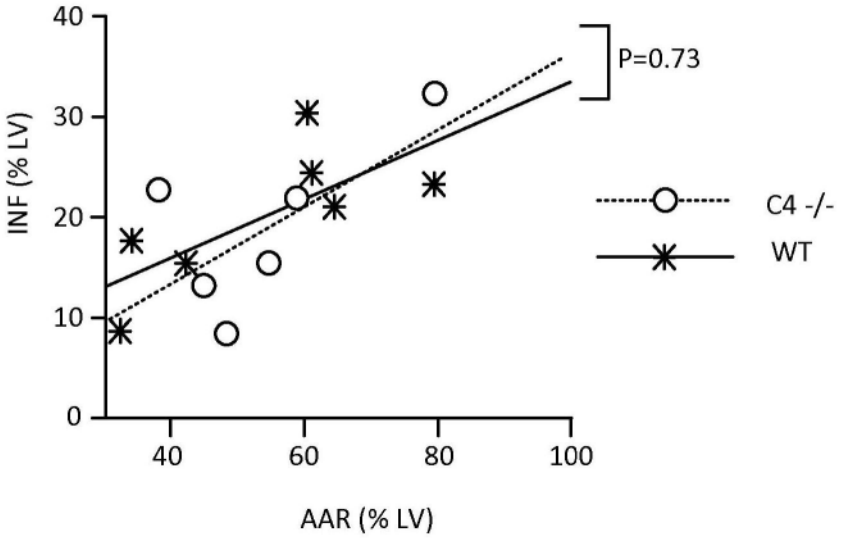

40
30
20
10
0
INF (% LV)
40
60
80
100
AAR (% LV)
P=0.73
C4 -/-
WT

图54B

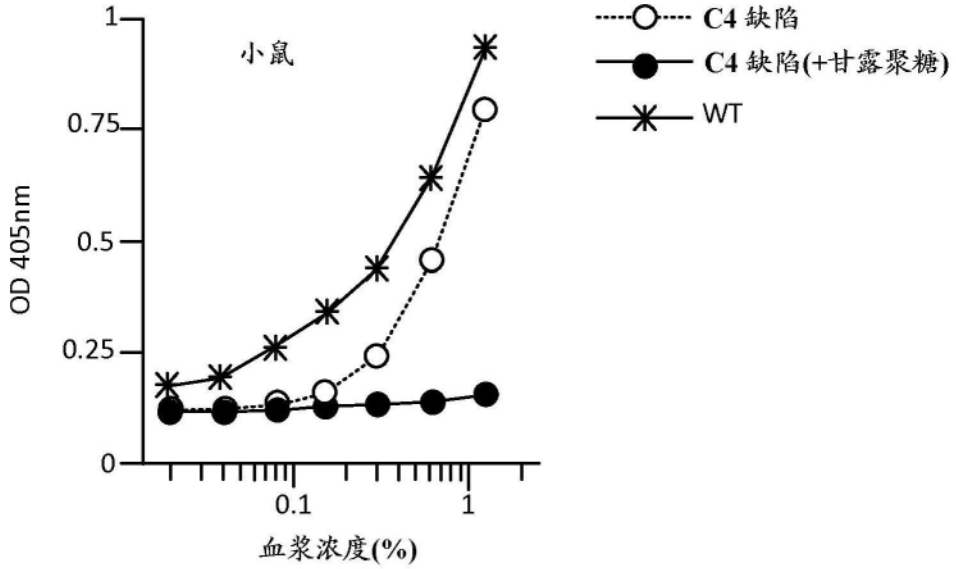

小鼠
C4 缺陷
C4 缺陷(+甘露聚糖)
WT
OD 405nm
1
0.75
0.5
0.25
0
0.1
1
血浆浓度(%)

图55A

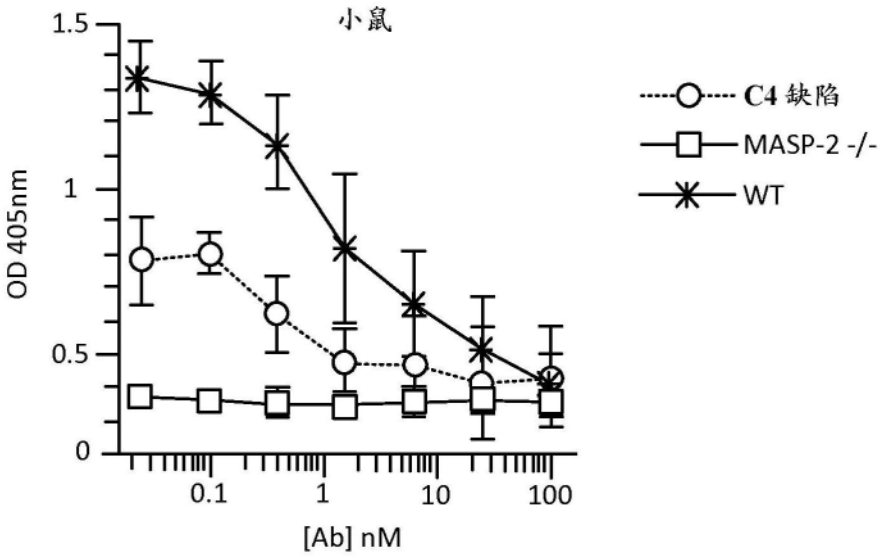

小鼠
C4 缺陷
MASP-2 -/-
WT
OD 405nm
1.5
1
0.5
0
0.1
1
10
100
[Ab] nM

图55B

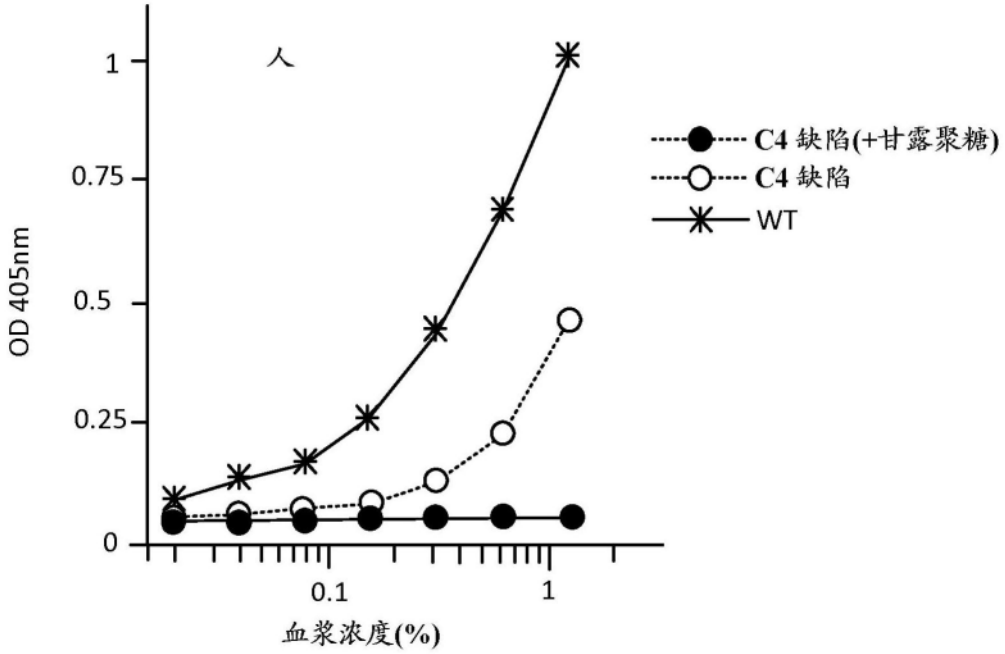

人
1
0.75
0.5
0.25
0
OD 405nm
0.1
1
血浆浓度(%)
C4 缺陷(+甘露聚糖)
C4 缺陷
WT

图55C

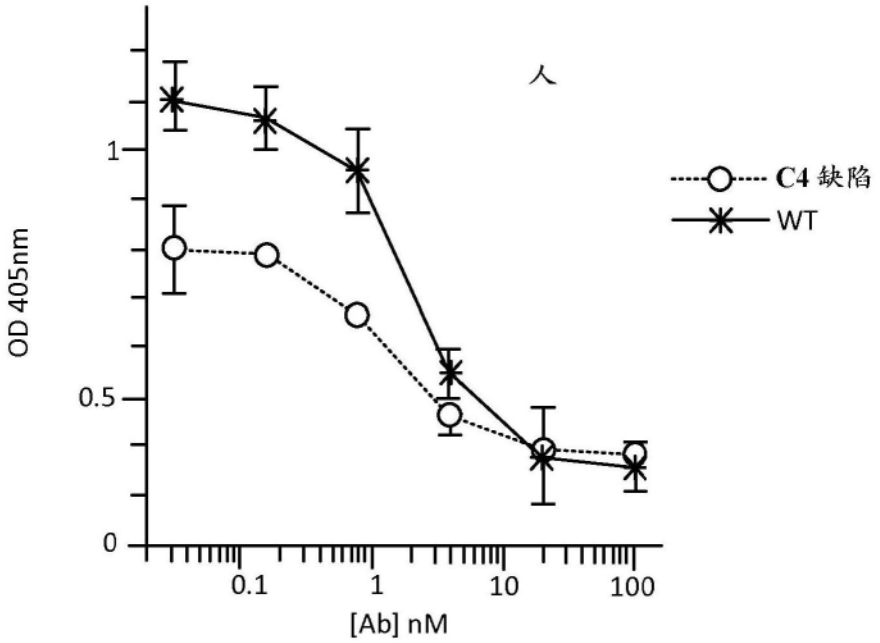

人
1
0.5
0
OD 405nm
0.1
1
10
100
[Ab] nM
C4 缺陷
WT

图55D

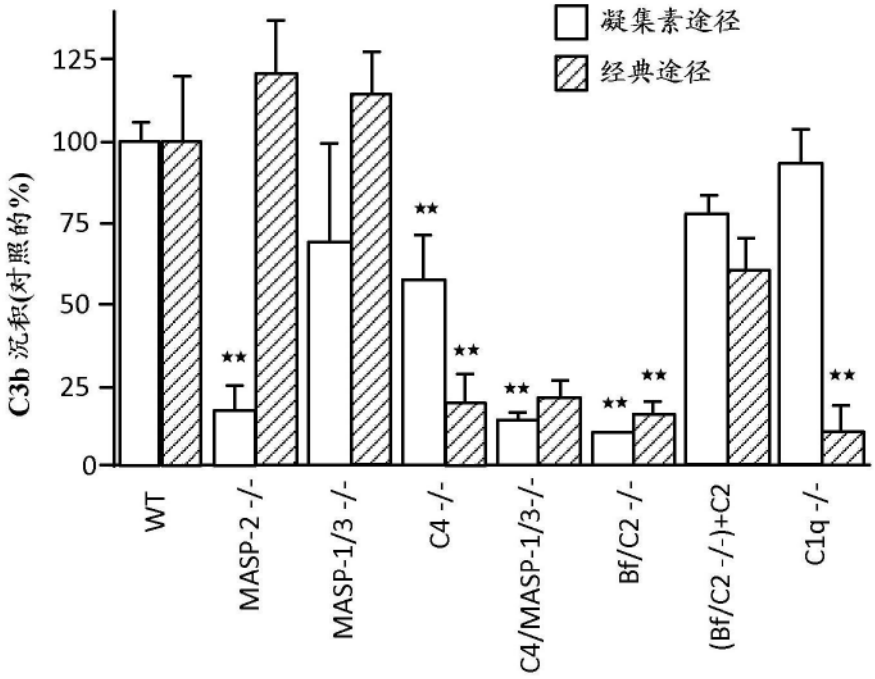

凝集素途径
经典途径
C3b 沉积(对照的%)
125
100
75
50
25
0
**
WT
MASP-2 -/-
MASP-1/3 -/-
C4 -/-
C4/MASP-1/3-/-
Bf/C2 -/-
(Bf/C2 -/-)+C2
C1q -/-

图56A

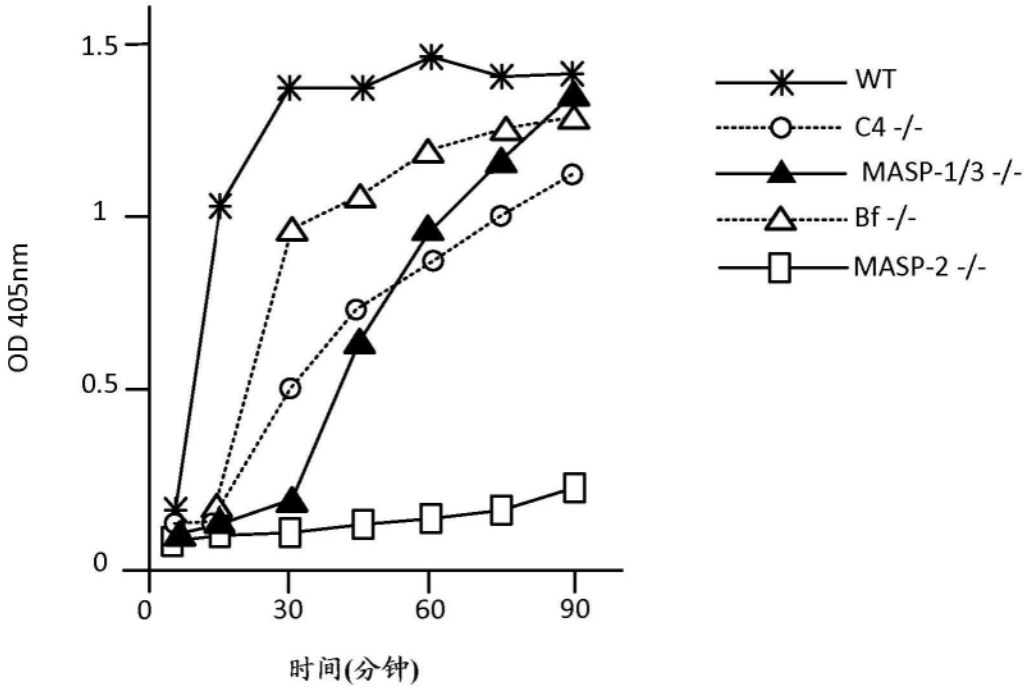

OD 405nm
1.5
1
0.5
0
0
30
60
90
时间(分钟)
WT
C4 -/-
MASP-1/3 -/-
Bf -/-
MASP-2 -/-

图56B

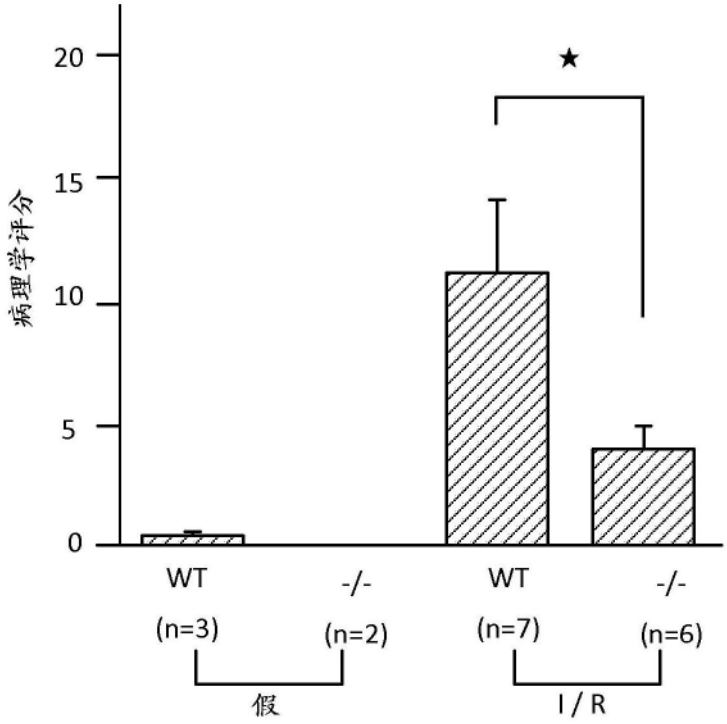

20
15
10
5
0
病理学评分
★
WT
-/-
WT
-/-
(n=3)
(n=2)
(n=7)
(n=6)
假
I / R

图57A

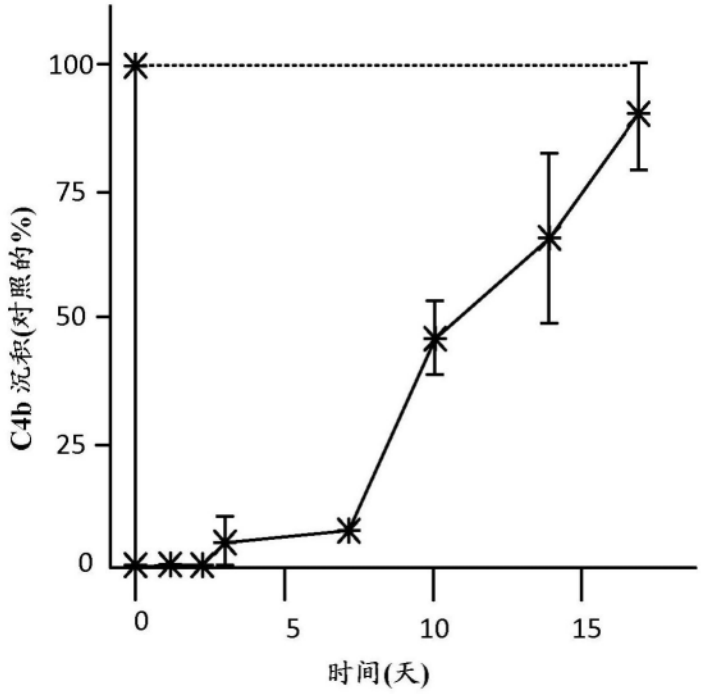

100
75
50
25
0
C4b 沉积(对照的%)
0
5
10
15
时间(天)

图57B

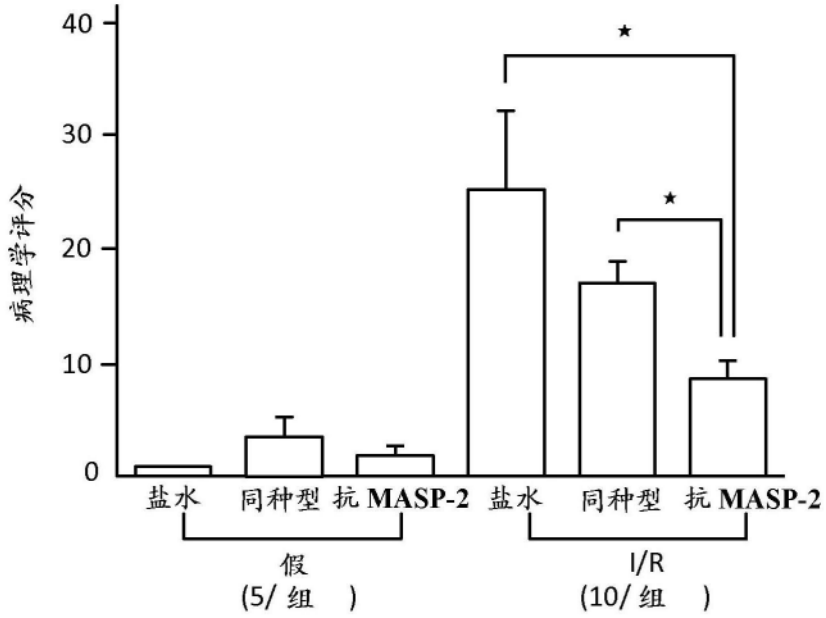

40
30
20
10
0
病理学评分
★
★
盐水
同种型
抗 MASP-2
盐水
同种型
抗 MASP-2
假
(5/ 组)
I/R
(10/ 组)

图57C

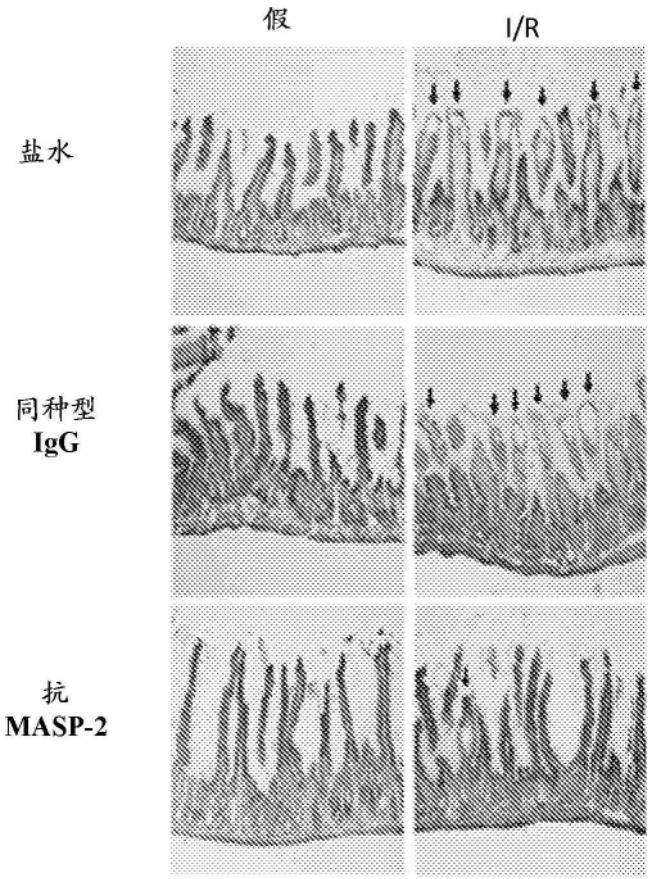

假
I/R
盐水
同种型
IgG
抗
MASP-2

图57D

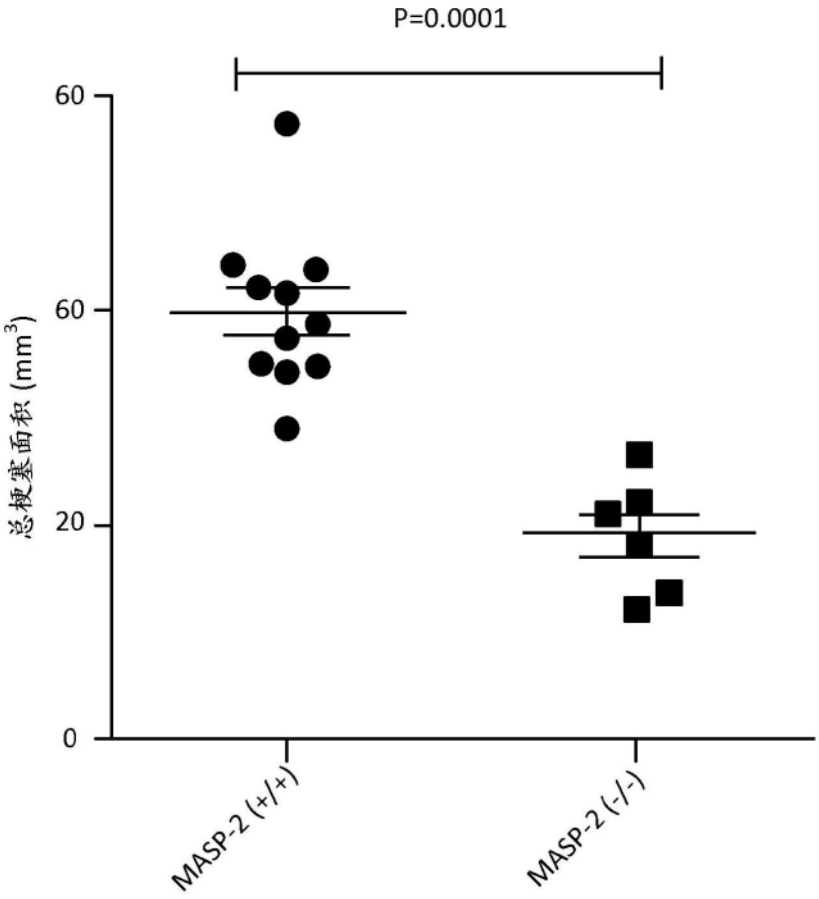


图58

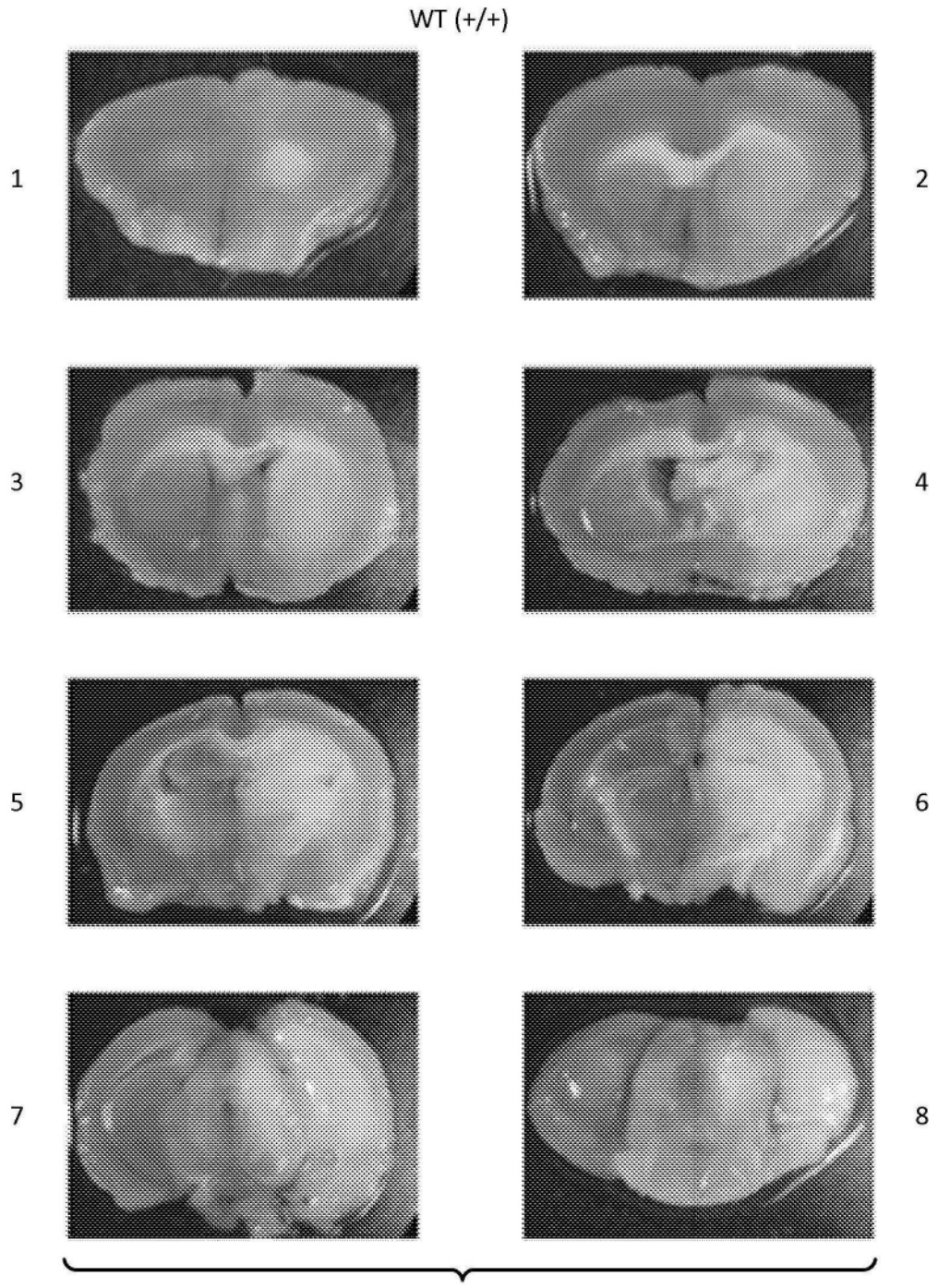


图59A

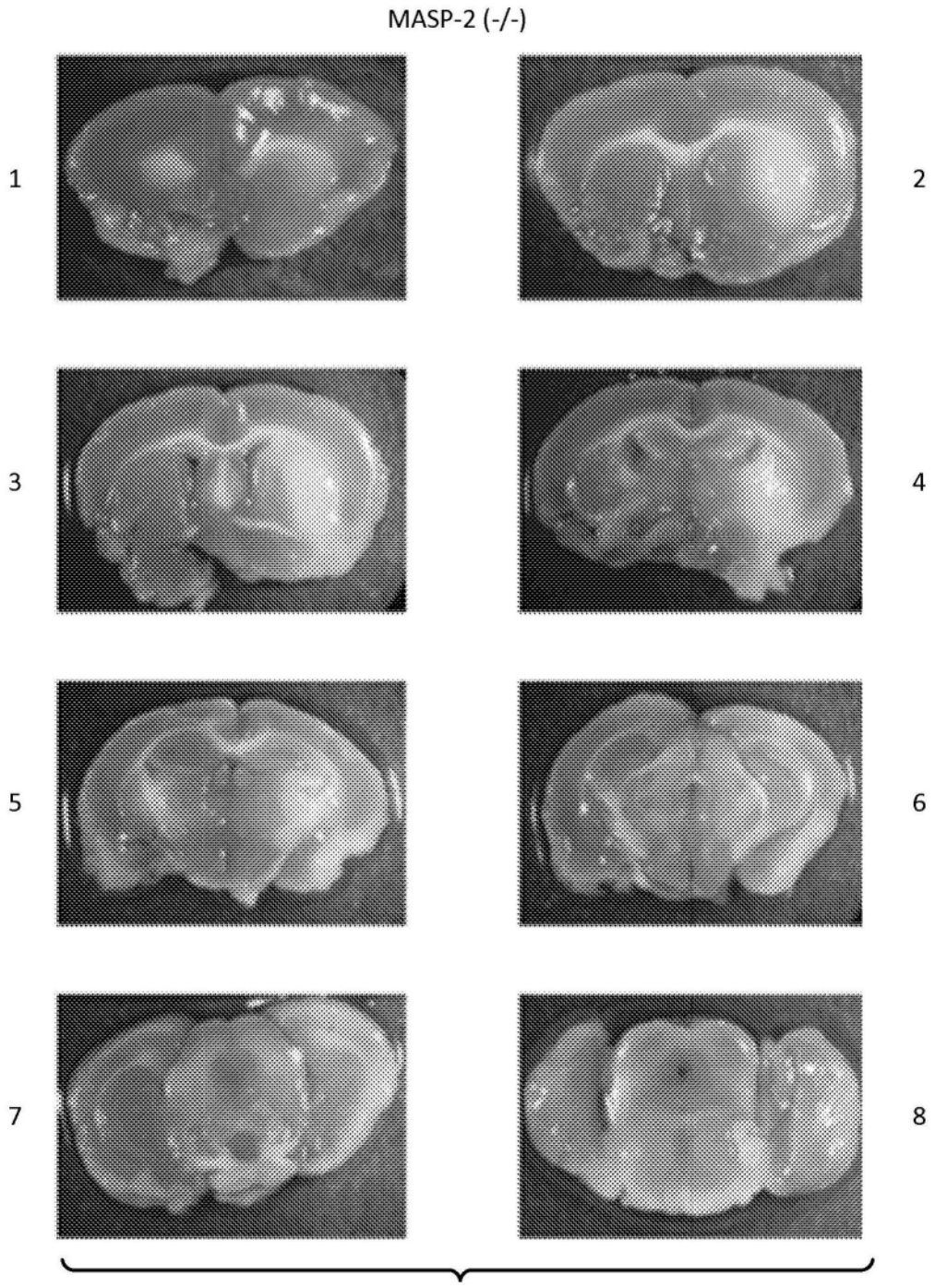


图59B

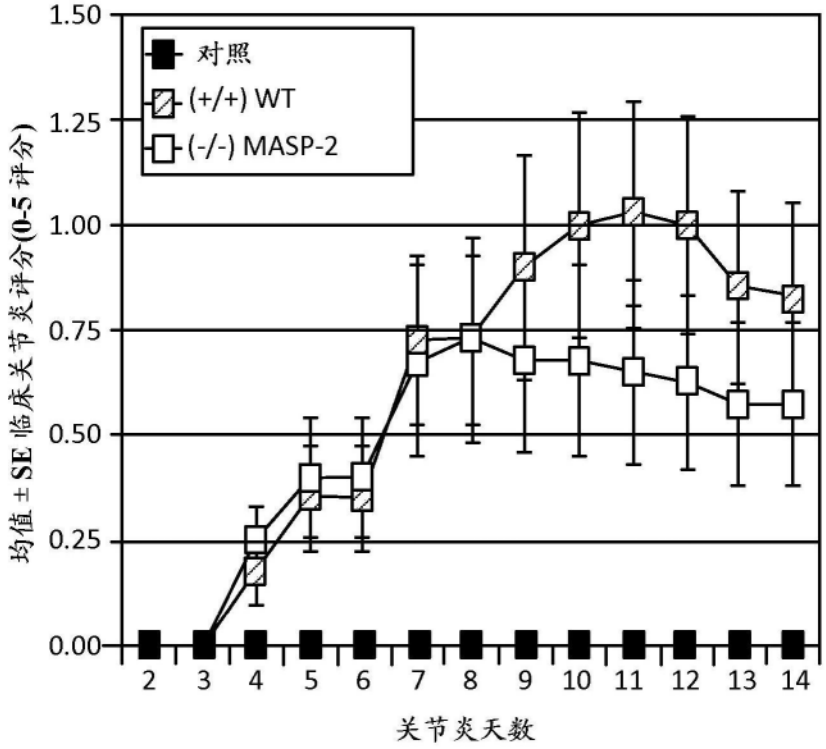

对照
(+/+) WT
(-/-) MASP-2
均值 ± SE 临床关节炎评分(0-5 评分)
1.50
1.25
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
关节炎天数

图60

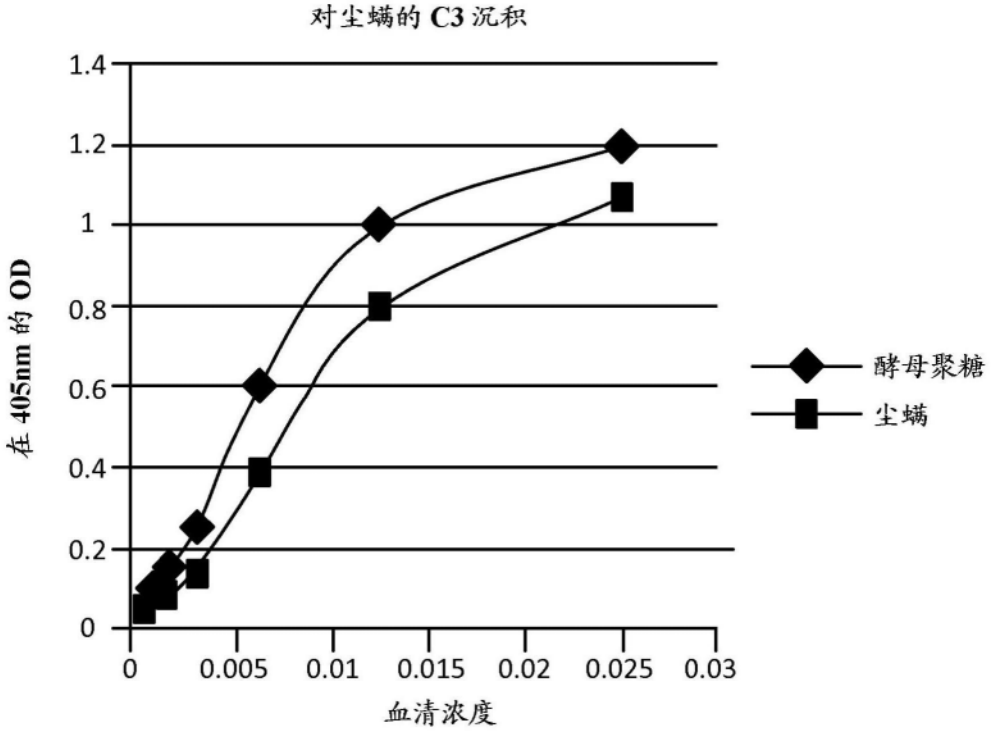

对尘螨的 C3 沉积
在 405nm 的 OD
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0 0.005 0.01 0.015 0.02 0.025 0.03
血清浓度
酵母聚糖
尘螨

图61

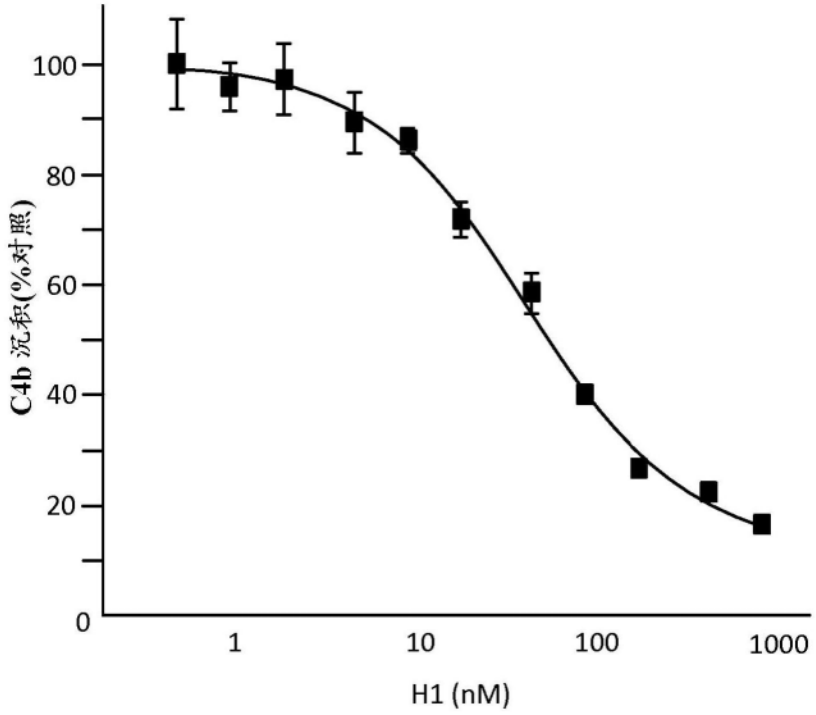

C4b 沉积(%对照)
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
H1 (nM)

图62A

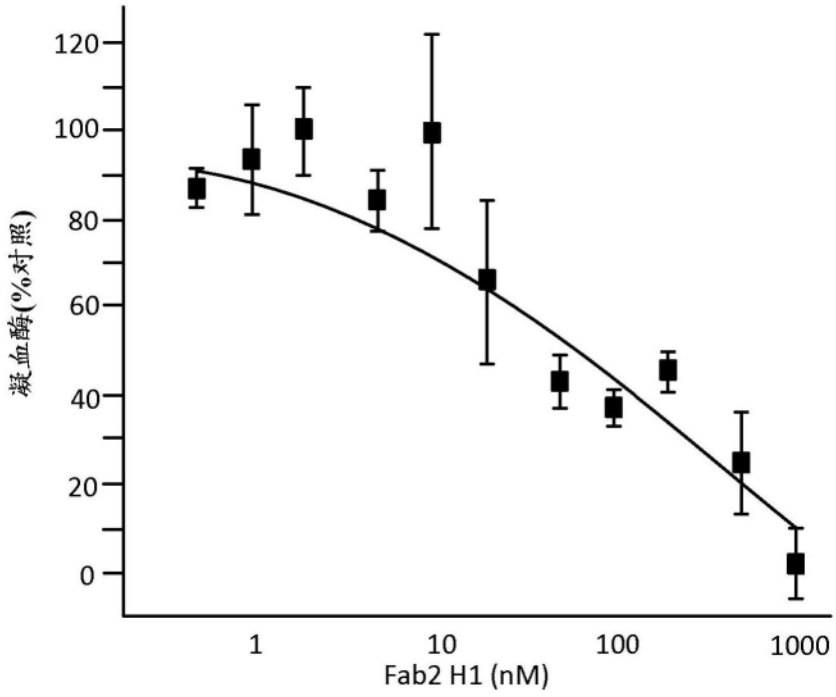

凝血酶(%对照)
120
100
80
60
40
20
0
1
10
100
1000
Fab2 H1 (nM)

图62B

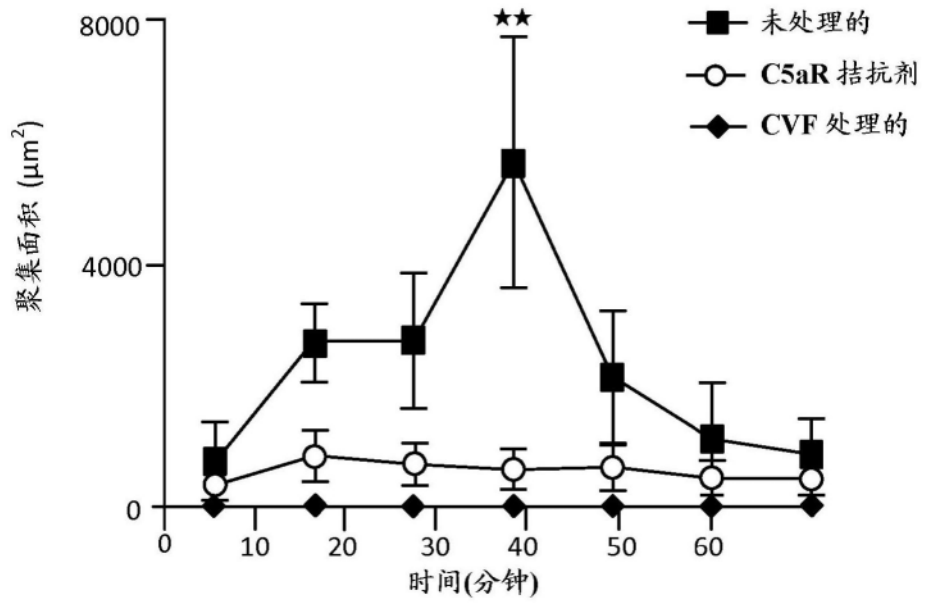

8000
4000
0
聚集面积 (μm²)
★★
未处理的
C5aR 拮抗剂
CVF 处理的
0
10
20
30
40
50
60
时间(分钟)

图63A

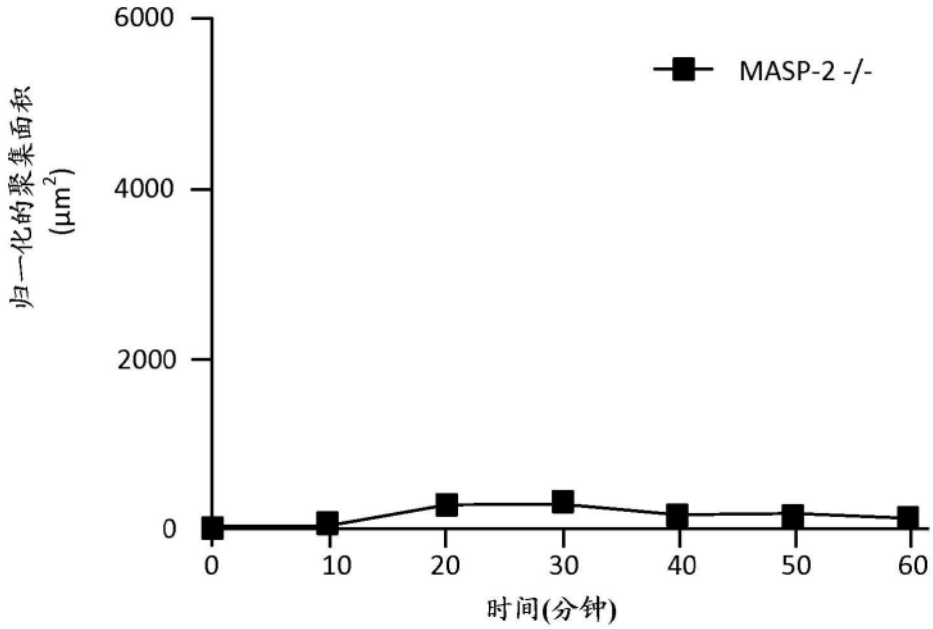

6000
4000
2000
0
归一化的聚集面积
(μm²)
MASP-2 -/-
0
10
20
30
40
50
60
时间(分钟)

图63B

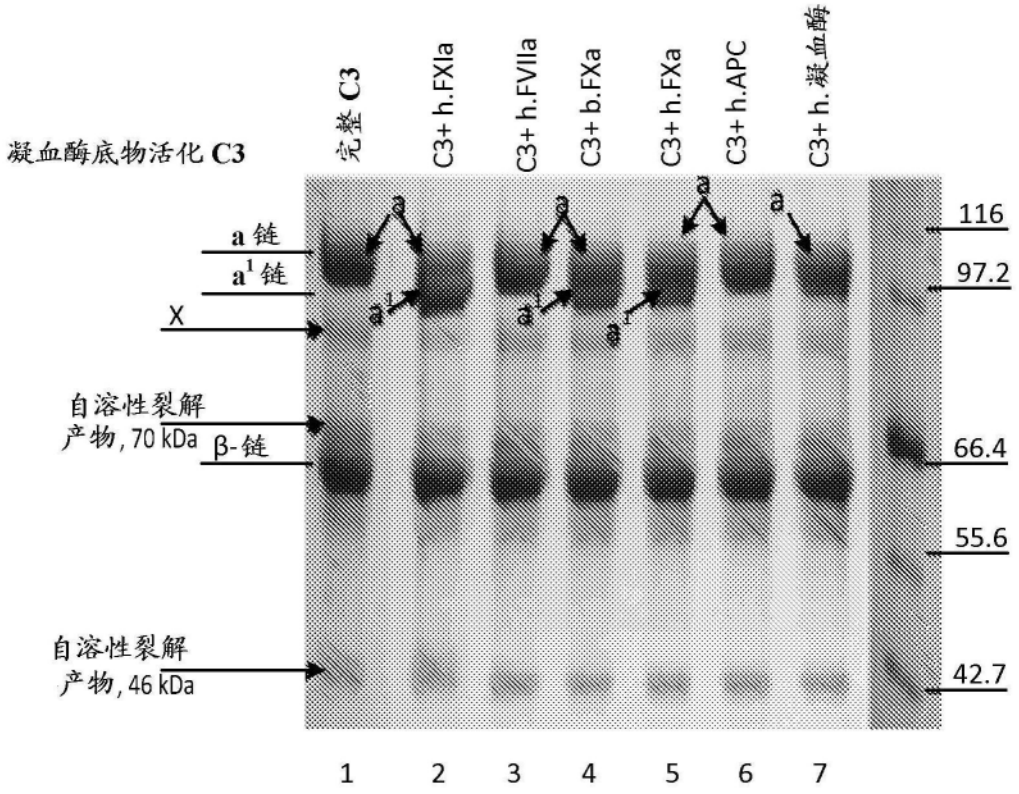

凝血酶底物活化 C3
完整 C3
C3+ h.FXIa
C3+ h.FVIIa
C3+ b.FXa
C3+ h.FXa
C3+ h.APC
C3+ h.凝血酶
a 链
a1 链
X
自溶性裂解
产物, 70 kDa
β-链
自溶性裂解
产物, 46 kDa
116
97.2
66.4
55.6
42.7
1 2 3 4 5 6 7

图64

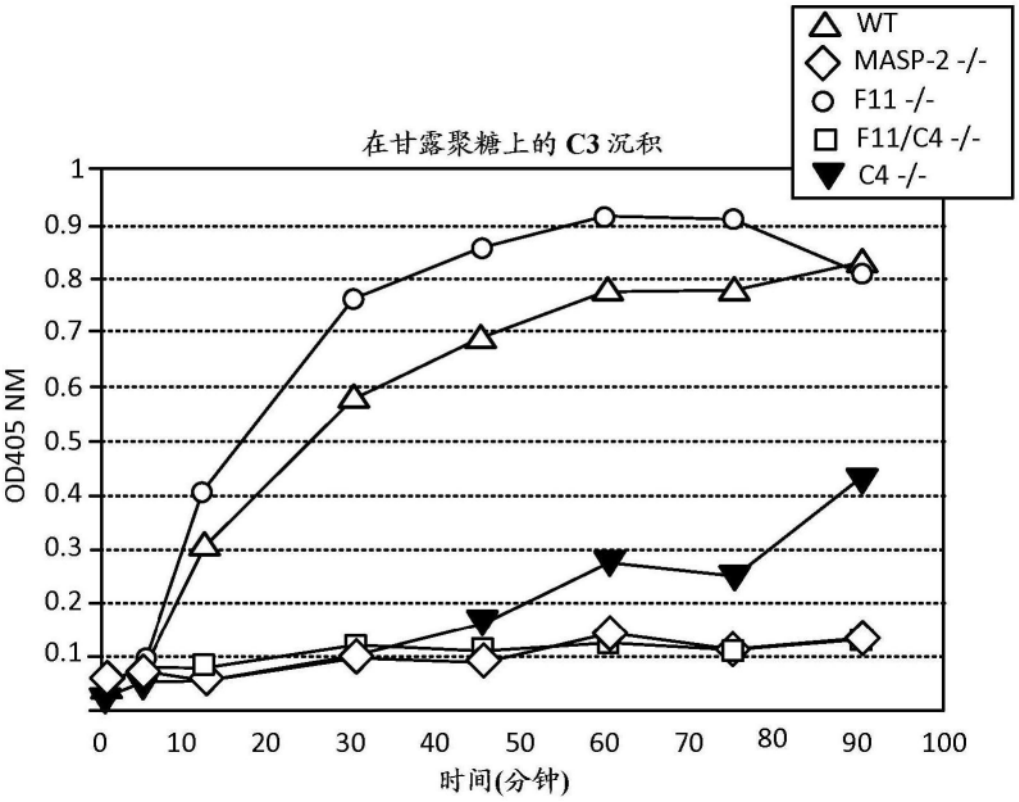

WT
MASP-2 -/-
F11 -/-
F11/C4 -/-
C4 -/-
在甘露聚糖上的 C3 沉积
OD405 NM
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
时间(分钟)

图65

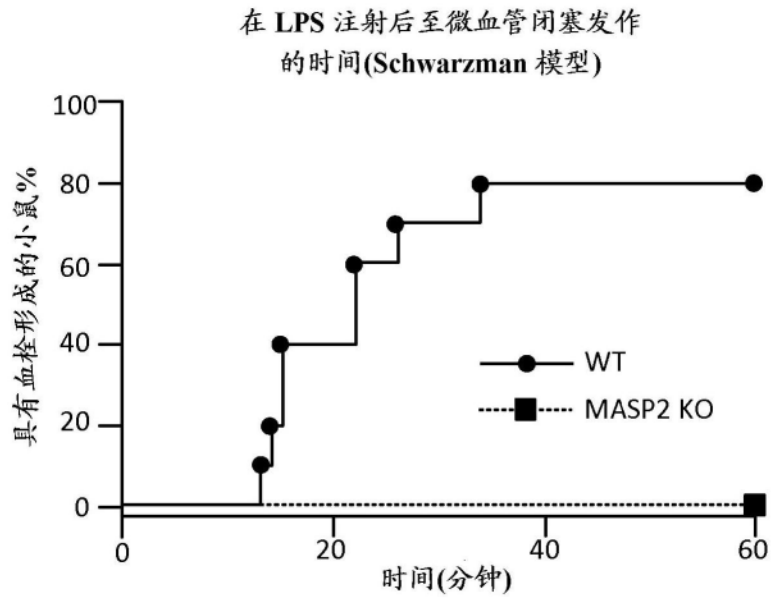

在 LPS 注射后至微血管闭塞发作
的时间(Schwarzman 模型)
具有血栓形成的小鼠%
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
时间(分钟)
WT
MASP2 KO

图66

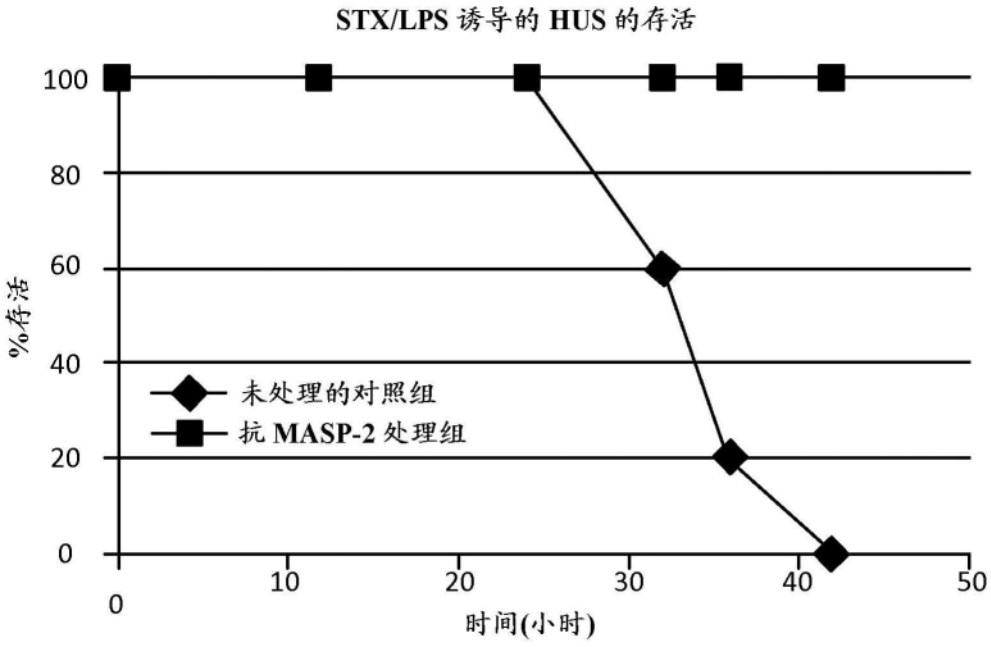

STX/LPS 诱导的 HUS 的存活
%存活
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
时间(小时)
未处理的对照组
抗 MASP-2 处理组

图67

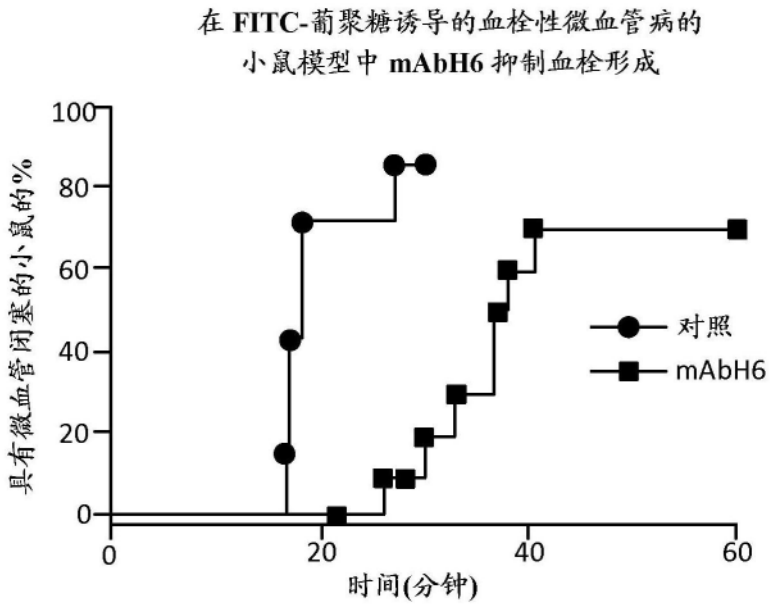

在 FITC-葡聚糖诱导的血栓性微血管病的
小鼠模型中 mAbH6 抑制血栓形成
具有微血管闭塞的小鼠的%
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
时间(分钟)
对照
mAbH6

图68

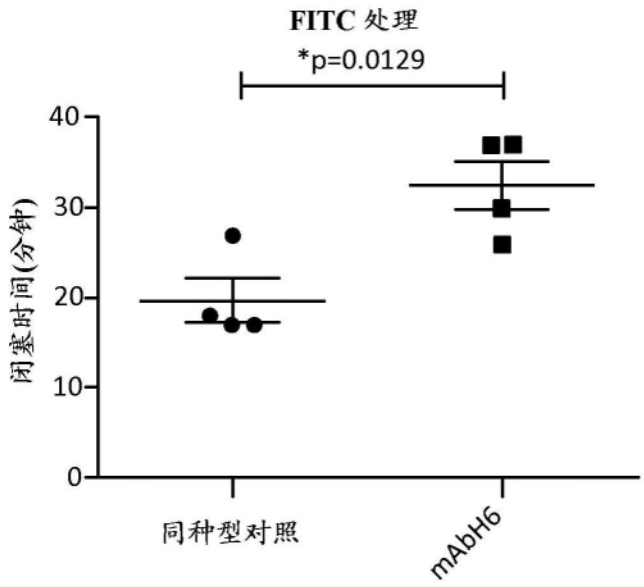

FITC 处理
*p=0.0129
闭塞时间(分钟)
40
30
20
10
0
同种型对照
mAbH6

图69

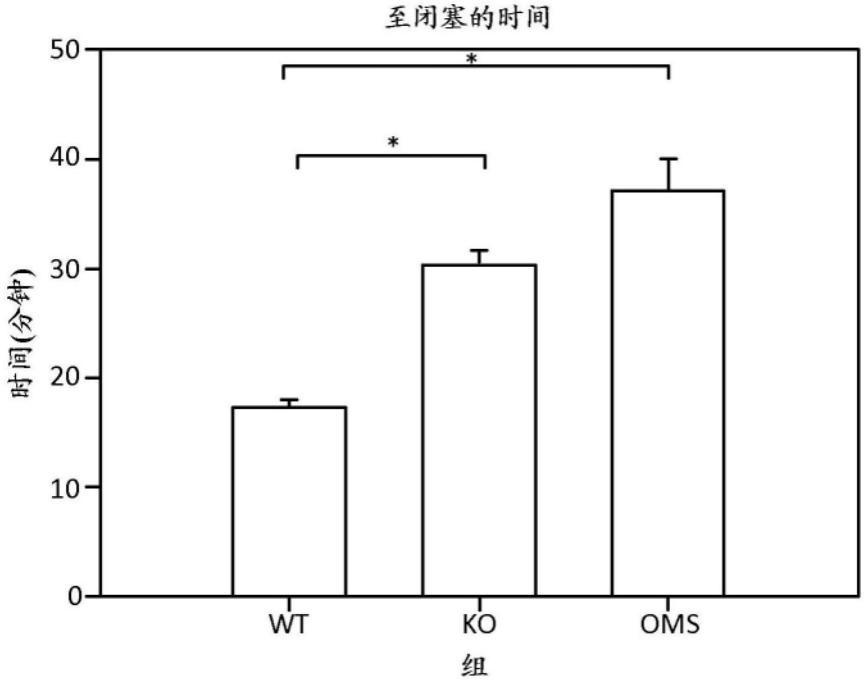


图70