



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101437501 B

(45) 授权公告日 2012. 09. 05

(21) 申请号 200780015830. X

A61K 39/395 (2006. 01)

(22) 申请日 2007. 03. 02

A61K 45/06 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 31/16 (2006. 01)

60/778, 859 2006. 03. 02 US

A61P 37/06 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2008. 10. 31

W0 2004019891 A2, 2004. 03. 11, 权利要求书.

(86) PCT申请的申请数据

W0 2005110481 A2, 2005. 11. 24, 说明书第 16 页.

PCT/US2007/005290 2007. 03. 02

(87) PCT申请的公布数据

W0 2005110481 A2, 2005. 11. 24, 说明书 16 页.

W02007/103134 EN 2007. 09. 13

(73) 专利权人 阿莱克申药物公司

YANG JINMING ET AL. LF 15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF-kappaB signaling through inhibition of IKK activity. 《JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY SEP 2003》. 2003, 第 74 卷 (第 3 期), 438-447.

地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 R·P·罗特 尔 王浩 钟震

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 陈润杰

审查员 李钢

(51) Int. Cl.

A61K 31/00 (2006. 01)

A61K 31/573 (2006. 01)

A61K 31/365 (2006. 01)

A61K 38/00 (2006. 01)

A61K 38/13 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 36 页 附图 17 页

(54) 发明名称

通过抑制补体活性延长同种异体移植物的存活

(57) 摘要

本发明提出了延长同种异体移植的细胞、组织或器官存活的方法。这些方法涉及对同种异体移植物受者施用补体活性抑制剂以及一种或多种免疫抑制剂和 / 或免疫抑制方法。补体活性抑制剂长期施用。已经确定这些方法有助于预防同种异体移植物的慢性排斥。这些方法另外可用于其中受者已对同种异体移植物预致敏或其中在同种异体移植物和受者之间存在 ABO 错配的情况。

1. 抑制补体活性的药物、环孢菌素 A 和至少一种其他免疫抑制药物在制备用于延长肾同种异体移植物在哺乳动物中存活的药物或药物包装中的用途,其中所述至少一种其他免疫抑制剂药物不会引起肾毒性。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物并行施用的制剂中。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物连续施用的一种或多种制剂中。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述抑制补体活性的药物处于适于对所述哺乳动物长期施用的制剂中。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物长期施用的制剂中。

6. 抑制补体活性的药物、环孢菌素 A 和至少一种其他免疫抑制药物在制备延长肾同种异体移植物在哺乳动物中存活的药物或药物包装中的用途,其中所述至少一种免疫抑制药物包含 LF15-0195。

7. 权利要求 6 的用途,其中所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物并行施用的制剂中。

8. 权利要求 6 的用途,其中所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物连续施用的一种或多种制剂中。

9. 权利要求 6 的用途,其中所述抑制补体活性的药物处于适于对所述哺乳动物长期施用的制剂中。

10. 权利要求 6 的用途,其中所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物长期施用的制剂中。

11. 一种药物包装,其包含抑制补体活性的药物和多于一种免疫抑制药物,其中所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物配制用于长期施用,其中多于一种免疫抑制药物包含 LF15-0195 和环孢菌素 A。

12. 任意权利要求 1 至 10 的用途,其中所述肾同种异体移植物为 MHC 错配的。

13. 权利要求 12 的用途,其中所述 MHC 错配的同种异体移植物是 HLA 错配的同种异体移植物。

14. 任意权利要求 1 至 10 的用途,其中所述同种异体移植物是 ABO 错配的。

15. 任意权利要求 1 至 10 的用途,其中所述哺乳动物对所述肾同种异体移植物预致敏。

16. 任意权利要求 1 至 10 的用途,其中所述抑制补体活性的药物抑制 C5b 或 C5a 的形成。

17. 权利要求 16 的用途,其中所述抑制 C5b 或 C5a 形成的药物是完整抗体或抗体片段。

18. 权利要求 17 的用途,其中所述完整抗体或抗体片段是人、人源化的、嵌合的或去免疫的抗体或抗体片段。

19. 权利要求 17 或 18 的用途,其中所述完整抗体或抗体片段抑制补体 C5 的断裂。

20. 权利要求 17 至 19 任一项的用途,其中所述抗体片段选自 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体和单链抗体。

21. 权利要求 17 至 19 任一项的用途,其中所述抗体片段是培克珠单抗。

22. 权利要求 17 至 19 任一项的用途,其中所述完整抗体是依库珠单抗。
23. 权利要求 22 的用途,其中所述依库珠单抗每 2 周施用一次。
24. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中所述抑制补体活性的药物选自下组:  
i) 可溶性补体受体、ii) CD59、iii) CD55、iv) CD46 和 v) C5、C6、C7、C8 或 C9 的抗体。
25. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中所述肾同种异体移植物存活所述哺乳动物的剩余寿命。
26. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中所述肾同种异体移植物存活至少三个月。
27. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中所述肾同种异体移植物存活至少六个月。
28. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中所述同种异体移植物存活至少一年。
29. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中所述同种异体移植物存活至少五年。
30. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中长期施用所述抑制补体活性的药物至少 14 天。
31. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中长期施用所述抑制补体活性的药物至少 28 天。
32. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中长期施用所述抑制补体活性的药物至少 3 个月。
33. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中长期施用所述抑制补体活性的药物至少 6 个月。
34. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中长期施用所述抑制补体活性的药物至少 1 年。
35. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中长期施用所述抑制补体活性的药物至少 5 年。
36. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中长期施用所述抑制补体活性的药物持续所述哺乳动物的剩余寿命。
37. 权利要求 1 至 10、12 至 15 任一项的用途,其中至少一种免疫抑制药物长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。

## 通过抑制补体活性延长同种异体移植物的存活

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2006 年 3 月 2 日提交的 U. S. 临时专利申请号 60/778,859 的优先权，其全部公开内容引用在此作为参考。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及延长同种异体移植物在哺乳动物中的存活的方法。具体而言，本公开内容涉及通过施用除免疫抑制性的一种或多种药物或方法之外的补体或末端补体 (terminal complement) 形成抑制剂、尤其是补体 C5 断裂抑制剂来延长同种异体移植物的存活。

[0004] 背景

[0005] 对于大多数慢性器官衰竭的患者，器官移植是优选治疗。尽管肾、肝、肺和心的移植因受者回归更正常的生活方式而提供了康复的极好机会，但是它受限于潜在受者的医疗/手术适应性、供者缺乏增加以及移植的器官功能过早衰竭。

[0006] 细胞、组织和器官的移植已变得十分常见，且经常是挽救生命的程序。对于大多数慢性器官衰竭的患者，器官移植是优选的治疗。尽管抑制排斥的治疗有很大的改进，但是排斥继续成为器官移植成功的唯一最大的障碍。排斥不但包括急性排斥，而且包括慢性排斥。对于移植的肾的一年存活率，对于已死亡供者的肾平均为 88.3%，对于接受自活供者的肾为 94.4%。移植的肾的相应的 5 年存活率为 63.3% 和 76.5% (OPTN/SRTR 年报, 2002)。对于肝，来自已死亡供体和活供体的肝一年存活率分别为 80.2% 和 76.5%。相应的 5 年肝移植存活率为 63.5% 和 73.0% (OPTN/SRTR 年报, 2002)。使用免疫抑制药物、尤其是环孢菌素 A 和最近的他克莫司，已特别通过预防急性排斥而显著提高了器官移植的成功率。但是如上文数字显示，仍然需要提高短期以及特别是长期的成功率。从以上肾和肝移植物的数字可见，这些移植器官的五年衰竭率为 25-35% 量级。仅在 2001 年间，超过 23,000 例患者接受器官移植，其中约 19,000 例为肾或肝移植 (OPTN/SRTR 年报, 2002)。仅对这一年的移植，用现有技术可预期：大约 5,000-6,000 例这些移植的肾和肝将在 5 年内衰竭。这些数字甚至不包括其他移植的器官或移植组织或细胞，如骨髓。

[0007] 有多种类型的移植。这些在 Abbas 等人, 2000 中描述。从一个个体移植至相同个体的移植称为自体移植或自身移植。在两个遗传上相同或同系 (syngeneic) 的个体之间移植的移植称为同系移植。在相同种类的遗传上不同的两个个体之间移植的移植称为异源移植或同种异体移植。在不同种类的个体之间移植的移植称为异基因移植或异种移植。关于同种异体移植被认为是外源的分子称为同种抗原 (alloantigen)，关于异种移植的那些分子称为异种抗原 (xenoantigen)。与同种抗原或异种抗原反应的淋巴细胞或抗体分别描述为同种异体反应性或异种反应性的。

[0008] 目前在美国每年进行超过 40,000 例肾、心、肺、肝和胰腺移植 (Abbas 等人, 2000)。其他可能的移植包括但不限于血管组织、眼睛、角膜、晶状体、皮肤、骨髓、肌肉、结缔组织、胃肠组织、神经组织、骨、干细胞、胰岛、软骨、肝细胞和造血细胞。不幸的是，需要移植的

候补者比供者多得多。为克服这种短缺,所作的主要的努力是研究怎样利用异种移植物。尽管该领域正不断取得进步,但是事实是—目前大多数移植物为同种异体移植物。虽然目前比异种移植物更可能成功,但是同种异体移植物必须克服很多障碍以达到成功。存在受者对抗供体器官而造成的多种类型免疫攻击,这可导致同种异体移植物的排斥。这些包括超急性排斥、急性血管排斥(包括加速体液排斥和新生急性体液排斥)以及慢性排斥。排斥通常是T细胞介导的或体液的抗体攻击,但是可包括另外的二级因素,如补体和细胞因子的效应。

[0009] 需要器官移植的患者数目和可用供者器官数目之间不断增长的缺口已成为全世界的主要问题。Park等人,2003。据说已发展抗HLA抗体的个体是免疫的或致敏的。Gloor,2005。由于产生严重的抗体介导的排斥(ABMR),所以HLA致敏作用是临床移植中最佳利用活供者器官的主要障碍(Warren等人,2004)。例如,等待肾移植的所有个体的超过50%是预致敏的患者(Glotz等人,2002),他们具有升高水平的广泛活性同种异体抗体,由多次输注、先前失败的同种异体移植物或怀孕引起(Kupiec-Weglinski,1996)。因为认识到这种类型排斥可导致同种异体移植物功能的急性或慢性丧失,所以ABMR的作用目前是移植研究最活跃的领域之一。Mehra等人,2003。已报道ABMR的很多例子,包括超急性排斥(HAR)或加速性体液排斥(ACHR),特征在于:对有效的抗T细胞疗法耐受的急性同种异体移植物损伤、循环供者特异性抗体的检测以及移植物中补体成分的沉积。在20-30%急性排斥例子中发生的、具有升高的循环同种异体抗体和补体活化的ABMR,较细胞排斥具有更差的预后。Mauiyyedi等人,2002。

[0010] 显示高水平同种异体抗体的高度预致敏患者通常遭受直接且攻击性的HAR。在临床实践中,随着巨大努力以及技术的显著进步,通过获得移植前淋巴细胞毒性交叉配型,以识别具有对供者HLA抗原具有特异性抗体的致敏患者,来避免HAR。然而,对抗供者HLA或其他非MHC内皮抗原的循环抗体还可能是延缓形式的急性体液排斥的原因,这与移植物丧失发生率增加有关。Collins等人,1999。因此,开发新型预致敏动物模型以模拟临床环境的ABMR将有益于机理研究,并有益于控制预致敏宿主同种异体移植物排斥的亟待需要的进展。

[0011] 一些高度预致敏患者可得益于介入程序,如免疫吸附(Palmer等人,1989;Ross等人,1993;Kriaa等人,1995)、血浆去除术和静脉内免疫球蛋白(Sonnenday等人,2002;Rocha等人,2003),这些已经设计且实施以短暂消除抗供者抗体。然而,除它们的益处外,前述疗法还具有很多缺点,因为一些个体对它们的效应不太敏感(Kriaa等人,1995;Hakim等人,1990;Glotz等人,1993;Tyan等人,1994);它们极其昂贵、耗时且危险(Salama等人,2001)。此外,这些方案的短暂且可变的效应限制了它们的影响。Glotz等人,2002;Kupin等人,1991;Schweitzer等人,2000。因此,开发新的策略以减少预防ABMR的危险和成本将有益于接受同种异体移植物的预致敏受者。

[0012] 发明概述

[0013] 因此,提供了延长移植的细胞、组织或器官存活的方法。具体而言,提供了延长同种异体移植的细胞、组织或器官存活的方法。这些方法涉及使用除补体活性抑制剂之外的一种或多种免疫抑制剂和/或免疫抑制方法。还提供了一种或多种免疫抑制剂和补体活性抑制剂在制备一种或多种药物或药物包装中的用途。这种药物或药物包装可用于延长同种

异体移植植物在受试者哺乳动物中的存活。

[0014] 同种异体移植植物的实例是同种异体移植的细胞、组织或器官,包括但不限于血管组织、眼、角膜、晶状体、皮肤、骨髓、肌肉、结缔组织、胃肠组织、神经组织、骨、干细胞、胰岛(islets)、软骨、肝细胞、造血细胞、心、肝、肺、肾和胰。

[0015] 在某些方面,本发明提供了延长肾同种异体移植植物在受者哺乳动物中存活的方法,所述方法包括对所述哺乳动物施用 a) 抑制补体活性的药物和 b) 至少一种免疫抑制疗法,其中所述疗法选自 i) 至少一种免疫抑制药物或 ii) 免疫调节治疗。

[0016] 在某些实施方案中,所述哺乳动物是人。在某些实施方案中,所述同种异体移植植物是 MHC 错配的。在某些实施方案中,所述 MHC 错配的同种异体移植植物是 HLA 错配的同种异体移植植物。在某些实施方案中,所述受者对所述同种异体移植植物是 ABO 错配的。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物长期施用。

[0017] 在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物抑制 C5b 或 C5a 的形成。在某些实施方案中,所述抑制 C5b 或 C5a 形成的药物是完整抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段是人、人源化的、嵌合的(chimerized) 或去免疫的(deimmunized) 抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段抑制补体 C5 的断裂。在某些实施方案中,所述抗体片段选自 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体(domain antibody) 和单链抗体。在某些实施方案中,所述抗体片段是培克珠单抗(pexelizumab)。在某些实施方案中,所述完整抗体是依库珠单抗(eculizumab)。在某些实施方案中,所述依库珠单抗长期施用。在某些实施方案中,所述依库珠单抗每 2 周施用一次。

[0018] 在某些实施方案中,所述补体活性抑制剂选自下组:i) 可溶性补体受体、ii) CD59、iii) CD55、iv) CD46 和 v) C5、C6、C7、C8 或 C9 的抗体。

[0019] 在某些实施方案中,所述免疫抑制药物抑制了 T- 细胞活性或 B- 细胞活性。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物抑制 T- 细胞活性和 B- 细胞活性。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物选自下组:环孢菌素 A、他克莫司、西罗莫司、OKT3、皮质类固醇、达利珠单抗(daclizumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯、甲氨喋呤、6- 巯嘌呤、抗 T 细胞抗体、环磷酰胺、来氟米特、布喹那(brequinar)、ATG、ALG、15- 脱氧精脒菌素、LF15-0195、CTLA-4-Ig(belatacept)、美罗华(rituxan) 和布雷青霉素。在某些实施方案中,施用多于一种免疫抑制药物。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物和 ii) 环孢菌素 A。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物和 ii) LF15-0195。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物、ii) 环孢菌素 A 和 iii) LF15-0195。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物是抑制补体 C5 断裂的抗体。在某些实施方案中,免疫调节治疗方法、例如血浆去除术、脾切除术或免疫吸附与补体活性抑制剂组合使用。

[0020] 在某些实施方案中,所述同种异体移植植物存活的时间比在没有所述抑制补体活性药物的情况下进行所述方法长至少 20%。在某些实施方案中,所述同种异体移植植物存活的时间比在没有所述抑制补体活性药物的情况下进行所述方法长至少 40%。在某些实施方案中,所述同种异体移植植物存活所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,所述同种异体移植植物存活至少三个月。在某些实施方案中,所述同种异体移植植物存活至少六个月。在某些实施方案中,所述同种异体移植植物存活至少一年。在某些实施方案中,所述同种异体移植

物存活至少五年。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活所述人的剩余寿命。

[0021] 在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 14 天。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 28 天。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 3 个月。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 6 个月。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 1 年。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 5 年。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物持续所述哺乳动物的剩余寿命。

[0022] 在某些实施方案中,至少一种免疫抑制药物长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,至少环孢菌素 A 长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,至少 LF15-0195 长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。

[0023] 在某些方面,本发明提供了延长肾同种异体移植物在受者哺乳动物中存活的方法,其包括对所述哺乳动物施用 a) 抑制补体活性的药物和 b) 至少一种免疫抑制疗法,其中所述疗法选自 i) 至少一种免疫抑制药物或 ii) 免疫调节治疗,其中所述哺乳动物对所述同种异体移植物预致敏。

[0024] 在某些实施方案中,所述哺乳动物是人。在某些实施方案中,所述同种异体移植物是 MHC 错配的。在某些实施方案中,所述 MHC 错配的同种异体移植物是 HLA 错配的同种异体移植物。在某些实施方案中,所述受者对所述同种异体移植物是 ABO 错配的。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物长期施用。

[0025] 在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物抑制 C5b 或 C5a 的形成。在某些实施方案中,所述抑制 C5b 或 C5a 形成的药物是完整抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段是人、人源化的、嵌合的或去免疫的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段抑制补体 C5 的断裂。在某些实施方案中,所述抗体片段选自 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体和单链抗体。在某些实施方案中,所述抗体片段是培克珠单抗。在某些实施方案中,所述完整抗体是依库珠单抗。在某些实施方案中,所述依库珠单抗长期施用。在某些实施方案中,所述依库珠单抗每 2 周施用一次。

[0026] 在某些实施方案中,所述补体活性抑制剂选自下组:i) 可溶性补体受体、ii) CD59、iii) CD55、iv) CD46 和 v) C5、C6、C7、C8 或 C9 的抗体。

[0027] 在某些实施方案中,所述免疫抑制药物抑制 T- 细胞活性或 B- 细胞活性。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物抑制 T- 细胞活性和 B- 细胞活性。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物选自下组:环孢菌素 A、他克莫司、西罗莫司、OKT3、皮质类固醇、达利珠单抗、巴利昔单抗、硫唑嘌呤、霉酚酸酯、甲氨喋呤、6- 巯嘌呤、抗 T 细胞抗体、环磷酰胺、来氟米特、布喹那、ATG、ALG、15- 脱氧精脒菌素、LF15-0195、CTLA-4-Ig (belatacept)、美罗华和布雷青霉素。在某些实施方案中,施用多于一种免疫抑制药物。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物和 ii) 环孢菌素 A。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物和 ii) LF15-0195。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物、ii) 环孢菌素 A 和 iii) LF15-0195。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物是抑制补体 C5 断裂的抗体。在某些实施方案中,免疫调节治疗方法、例如血浆去除术、脾切除术或免疫吸附与补体活性抑制剂组合使用。

[0028] 在其中哺乳动物对同种异体移植物预致敏的某些实施方法中,所述同种异体移植

物存活的时间比在没有所述抑制补体活性药物的情况下进行所述方法长至少 20%。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活的时间比在没有所述抑制补体活性药物的情况下进行所述方法长至少 40%。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少三个月。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少六个月。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少一年。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少五年。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活所述人的剩余寿命。

[0029] 在其中哺乳动物对同种异体移植物预致敏的某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 14 天。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 28 天。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 3 个月。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 6 个月。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 1 年。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 5 年。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物持续所述哺乳动物的剩余寿命。

[0030] 在其中哺乳动物对同种异体移植物预致敏的某些实施方案中,至少一种免疫抑制药物长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,至少环孢菌素 A 长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,至少 LF15-0195 长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。

[0031] 在某些方面中,本发明提供了抑制补体活性的药物和免疫抑制药物在制备用于延长肾同种异体移植物在哺乳动物中存活的药物或药物包装中的用途。在某些实施方案中,多于一种免疫抑制药物包括在所述药物或药物包装中。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物并行 (concurrent) 施用的制剂中。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物连续施用的一种或多种制剂中。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物处于适于对所述哺乳动物长期施用的制剂中。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物长期施用的制剂中。

[0032] 在某些方面,本发明提供了延长同种异体移植物在受者哺乳动物中存活的方法,所述方法包括对所述哺乳动物施用 a) 抑制补体活性的药物和 b) 至少一种免疫抑制疗法,其中所述疗法选自 i) 包含 LF15-0195 的至少一种免疫抑制药物或 ii) 免疫调节治疗。

[0033] 在某些实施方案中,所述哺乳动物是人。在某些实施方案中,所述同种异体移植物是 MHC 错配的。在某些实施方案中,所述 MHC 错配的同种异体移植物是 HLA 错配的同种异体移植物。在某些实施方案中,所述受者对所述同种异体移植物是 ABO 错配的。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物。

[0034] 在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物抑制 C5b 或 C5a 的形成。在某些实施方案中,所述抑制 C5b 或 C5a 形成的药物是完整抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段是人、人源化的、嵌合的或去免疫的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段抑制补体 C5 的断裂。在某些实施方案中,所述抗体片段选自 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体和单链抗体。在某些实施方案中,所述抗体片段是培克珠单抗。在某些实施方案中,所述完整抗体是依库珠单抗。在某些实施方案中,所述依库珠单抗长期施用。在某些实施方案中,所述依库珠单抗每 2 周施用一次。

[0035] 在某些实施方案中,所述补体活性抑制剂选自下组:i)可溶性补体受体、ii)CD59、iii)CD55、iv)CD46和v)C5、C6、C7、C8或C9的抗体。

[0036] 在某些实施方案中,所述免疫抑制药物抑制T-细胞活性或B-细胞活性。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物抑制T-细胞活性和B-细胞活性。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物选自下组:环孢菌素A、他克莫司、西罗莫司、OKT3、皮质类固醇、达利珠单抗、巴利昔单抗、硫唑嘌呤、霉酚酸酯、甲氨喋呤、6-巯嘌呤、抗T细胞抗体、环磷酰胺、来氟米特、布喹那、ATG、ALG、15-脱氧精脒菌素、LF15-0195、CTLA-4-Ig(belatacept)、美罗华和布雷青霉素。在某些实施方案中,施用多于一种免疫抑制药物。在某些实施方案中,所述方法包括施用i)抑制补体活性的药物和ii)环孢菌素A。在某些实施方案中,所述方法包括施用i)抑制补体活性的药物和ii)LF15-0195。在某些实施方案中,所述方法包括施用i)抑制补体活性的药物、ii)环孢菌素A和iii)LF15-0195。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物是抑制补体C5断裂的抗体。在某些实施方案中,免疫调节治疗方法、例如血浆去除术、脾切除术或免疫吸附与补体活性抑制剂组合使用。

[0037] 在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活的时间比在没有所述抑制补体活性药物的情况下进行所述方法长至少20%。在某些实施方案中,所述同种异体移植物比在没有所述抑制补体活性药物的情况下进行所述方法长至少40%。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少三个月。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少六个月。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少一年。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少五年。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活所述人的剩余寿命。

[0038] 在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少14天。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少28天。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少3个月。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少6个月。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少1年。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少5年。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物持续所述哺乳动物的剩余寿命。

[0039] 在某些实施方案中,至少一种免疫抑制药物长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,至少环孢菌素A长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,至少LF15-0195长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。

[0040] 在某些方面,本发明提供了延长同种异体移植物在受者哺乳动物中存活的方法,所述方法包括对所述哺乳动物施用a)抑制补体活性的药物和b)至少一种免疫抑制疗法,其中所述疗法选自i)包含LF15-0195的至少一种免疫抑制药物或ii)免疫调节治疗,其中所述哺乳动物对所述同种异体移植物预致敏。

[0041] 在某些实施方案中,所述哺乳动物是人。在某些实施方案中,所述同种异体移植物是MHC错配的。在某些实施方案中,所述MHC错配的同种异体移植物是HLA错配的同种异体移植物。在某些实施方案中,所述受者对所述同种异体移植物是ABO错配的。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物长期施用。

[0042] 在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物抑制C5b或C5a的形成。在某些实施方案中,所述抑制C5b或C5a形成的药物是完整抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所

述完整抗体或抗体片段是人、人源化的、嵌合的或去免疫的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段抑制补体 C5 的断裂。在某些实施方案中,所述抗体片段选自 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体和单链抗体。在某些实施方案中,所述抗体片段是培克珠单抗。在某些实施方案中,所述完整抗体是依库珠单抗。在某些实施方案中,所述依库珠单抗长期施用。在某些实施方案中,所述依库珠单抗每 2 周施用一次。

[0043] 在某些实施方案中,所述补体活性抑制剂选自下组:i) 可溶性补体受体、ii) CD59、iii) CD55、iv) CD46 和 v) C5、C6、C7、C8 或 C9 的抗体。

[0044] 在某些实施方案中,所述免疫抑制药物抑制 T- 细胞活性或 B- 细胞活性。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物抑制 T- 细胞活性和 B- 细胞活性。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物选自下组:环孢菌素 A、他克莫司、西罗莫司、OKT3、皮质类固醇、达利珠单抗、巴利昔单抗、硫唑嘌呤、霉酚酸酯、甲氨喋呤、6- 巯嘌呤、抗 T 细胞抗体、环磷酰胺、来氟米特、布喹那、ATG、ALG、15- 脱氧精脒菌素、LF15-0195、CTLA-4-Ig (belatacept)、美罗华和布雷青霉素。在某些实施方案中,施用多于一种免疫抑制药物。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物和 ii) 环孢菌素 A。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物和 ii) LF15-0195。在某些实施方案中,所述方法包括施用 i) 抑制补体活性的药物、ii) 环孢菌素 A 和 iii) LF15-0195。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物是抑制补体 C5 断裂的抗体。在某些实施方案中,免疫调节治疗方法、例如血浆去除术、脾切除术或免疫吸附与补体活性抑制剂组合使用。

[0045] 在其中哺乳动物对同种异体移植物预致敏的某些实施方案中,所述同种异体移植物存活的时间比在没有所述抑制补体活性药物的情况下进行所述方法长至少 20%。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活的时间比在没有所述抑制补体活性药物的情况下进行所述方法长至少 40%。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少三个月。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少六个月。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少一年。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活至少五年。在某些实施方案中,所述同种异体移植物存活所述人的剩余寿命。

[0046] 在其中哺乳动物对同种异体移植物预致敏的某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 14 天。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 28 天。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 3 个月。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 6 个月。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 1 年。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物至少 5 年。在某些实施方案中,长期施用所述抑制补体活性的药物持续所述哺乳动物的剩余寿命。

[0047] 在其中哺乳动物对同种异体移植物预致敏的某些实施方案中,至少一种免疫抑制药物长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,至少环孢菌素 A 长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。在某些实施方案中,至少 LF15-0195 长期施用持续所述哺乳动物的剩余寿命。

[0048] 在某些方面,本发明提供了抑制补体活性的药物和免疫抑制药物在制备用于延长同种异体移植物在哺乳动物中存活的药物或药物包装中的用途,其中至少一种免疫抑制药物包含 LF15-0195。在某些实施方案中,多于一种免疫抑制药物包括在所述药物或药物包装

中。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物并行施用的制剂中。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物连续施用的一种或多种制剂中。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物处于适于对所述哺乳动物长期施用的制剂中。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物处于适于对所述哺乳动物长期施用的制剂中。

[0049] 在某些方面,本发明提供了包含抑制补体活性的药物和至少一种免疫抑制药物的药物包装,其中所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物配制用于长期施用,其中至少一种免疫抑制药物包含 LF15-0195。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物是在包含抗体和冻干保护剂(lyoprotectant)的冻干制剂中的抗体。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物处于包含该免疫抑制药物和冻干保护剂的冻干制剂中。在某些实施方案中,所述药物和所述免疫抑制药物处于包含所述药物、所述免疫抑制药物和冻干保护剂的相同冻干制剂中。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物处于包含含有药筒(cartridge)的注射器的注射系统中,其中所述药筒包含在适于注射的制剂中的所述药物。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物处于包含含有药筒的注射器的注射系统中,其中所述药筒包含在适于注射的制剂中的所述免疫抑制药物。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物和所述免疫抑制药物处于包含含有药筒的注射器的注射系统中,其中所述药筒包含在适于注射的制剂中的所述药物和所述免疫抑制药物。在某些实施方案中,所述抑制补体活性的药物以单位剂型存在。在某些实施方案中,所述免疫抑制药物以单位剂型存在。

[0050] 在某些实施方案中,所述抗体抑制末端补体或 C5a 的形成。在某些实施方案中,该抗体是完整抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段是人、人源化的、嵌合的或去免疫的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,所述完整抗体或抗体片段抑制补体 C5 的断裂。在某些实施方案中,所述抗体片段选自 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体和单链抗体。在某些实施方案中,所述抗体片段是培克珠单抗。在某些实施方案中,所述完整抗体是依库珠单抗。

[0051] 本申请涵盖任何上述方面和实施方案的组合。

[0052] 附图简述

[0053] 图 1A-1D 显示在不同处理下预致敏相对未致敏受者的抗供者抗体水平。

[0054] 图 2A 和 2B 显示在预致敏同种异体移植物受者中使用抗 C5 抗体、CsA 和 CyP 的三重疗法和在预致敏同种异体移植物受者中仅使用抗 C5 抗体和 CsA 的组合疗法之间的比较。图 2A 比较了在如所示不同处理下各种受者的心脏-移植物存活。图 2B 显示了例如在不同组受者的心脏同种异体移植物中淋巴细胞浸润的组织学和免疫组织学。

[0055] 图 3 显示与免疫抑制剂相比被抗 C5 抗体阻断的末端补体活性。

[0056] 图 4A-4D 比较了在仅用抗 C5 抗体的单一疗法、抗 C5 抗体和 CsA 的双重组合疗法和抗 C5 抗体、CsA 和 CyP 的三重组合疗法下,同种异体移植物预致敏受者中的抗供者抗体水平。

[0057] 图 5 显示在未处理或不同处理下的同种异体移植物受者中 IgG 同种型的比率的变化。

[0058] 图 6 显示与未处理动物的心脏移植物相比,长期存活的心脏移植物中 Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白质的高水平表达。

[0059] 图 7A-7C 显示来自第一次移植受者的已适应移植物的改善的第二次移植（再移植）。

[0060] 图 8A-8B 显示再移植实验的结果。

[0061] 图 9A-9B 显示再移植实验的结果。

[0062] 图 10A-10D 显示不同处理下预致敏受者相对未致敏受者的抗供者抗体水平。

[0063] 图 11A-11C 显示抗 C5mAb 与 CsA 和 LF 组合在预致敏小鼠中实现无限期 (indefinite) 肾移植存活。

[0064] 图 12 显示补体溶血活性在预致敏 BALB/c 小鼠血清中被完全抑制。

[0065] 图 13A-13B 显示在未处理或不同处理下的异体移植受者中 IgG 同种型比率的变化。

[0066] 图 14 显示在预致敏受者的长期存活肾移植中保护性蛋白质的表达。

[0067] 发明详述

[0068] 综述：移植或移植物的排斥

[0069] 超急性排斥在移植后几分钟至几小时内发生，这是因为预先形成的对所移植组织抗原的抗体。它的特征在于移植脉管系统的出血和血栓性阻塞。抗体与内皮的结合激活补体，且抗体和补体诱发移植内皮的许多变化，所述变化促进血管内血栓形成以及导致血管阻塞，结果是所移植的器官遭受不可逆转的局部缺血损伤 (Abbas 等人, 2000)。

[0070] 超急性排斥经常由预先存在的 IgM 同种异体抗体介导，例如针对在红血细胞上表达的 ABO 血型抗原的那些。由天然抗体介导的这类排斥是异种移植排斥的主要原因。因为通常选择同种异体移植以配合供者和受者 ABO 类型，所以因天然 IgM 抗体所致的超急性排斥不再是同种异体移植的主要问题。ABO 配合的同种异体移植的超急性排斥仍可发生，通常由定向对抗蛋白同种抗原如外来 MHC 分子或对抗定义不太明确的在血管内皮细胞上表达的同种抗原的 IgG 抗体介导。这种抗体可由于因输血而先前暴露于同种抗原、先前移植或多胎妊娠而出现（这种先前暴露被称为“预致敏性”）。Abbas 等人, 2000。

[0071] 急性排斥是通常始于移植第一周后的、由 T 细胞、巨噬细胞和抗体介导的血管和实质损伤的过程。Abbas 等人, 2001。T 淋巴细胞通过响应于血管内皮和实质细胞上存在的同种抗原、包括 MHC 分子而在急性排斥中起重要作用。活化的 T 细胞导致移植细胞的直接溶解，或产生募集和激活炎症细胞的细胞因子，导致坏死。CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞都可促进急性排斥。移植物的同种异基因细胞的破坏是高度特异性的，是 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 淋巴细胞杀死的标志。Abbas 等人, 2000。CD4<sup>+</sup>T 细胞通过分泌细胞因子和诱导移植物的迟发型超敏性反应，可能在介导急性移植排斥中是重要的，一些可用证据表明 CD4<sup>+</sup>T 细胞足以介导急性排斥。Abbas 等人, 2000。在移植受者建立对血管壁抗原的体液免疫反应且所产生的抗体与血管壁结合并激活补体后，抗体也可介导急性排斥。Abbas 等人, 2000。

[0072] 慢性排斥的特征在于：在延长的时期内发生的正常器官结构丧失的纤维化。慢性排斥的发病机理比急性排斥更未充分理解。移植动脉阻塞可由于内膜平滑肌细胞增殖而发生 (Abbas 等人, 2000)。该过程被称为加速或移植动脉硬化，可在移植后 6 个月至 1 年内于任何血管化器官移植中发展。

[0073] 为了移植成功，必须克服几种方式的排斥。利用多种方法以预防排斥。这可能需施用免疫抑制剂，经常是几种类型以预防不同方式的攻击，例如抑制 T- 细胞攻击、抗体

和细胞因子和补体效应。预筛选供者使其与受者相配也是预防排斥、特别是预防超急性排斥的主要因素。移植前抗 HLA 抗体的免疫吸附可减少超急性排斥。在移植之前可对受者或宿主施用抗 T 细胞试剂,例如单克隆抗体 OKT3、抗胸腺细胞球蛋白(ATG)、环孢菌素 A 或他克莫司(FK506)。此外,在移植之前糖皮质激素和 / 或硫唑嘌呤(或其他嘌呤类似物)可施用至宿主。用于辅助预防移植排斥的药物包括但不限于 ATG 或 ALG、OKT3、达利珠单抗、巴利昔单抗、皮质激素、15- 脱氧精脒菌素、LF15-0195、环孢菌素、他克莫司、嘌呤类似物如硫唑嘌呤、甲氨喋呤、霉酚酸酯、6- 巯嘌呤、布雷青霉素、布喹那、来氟米特、环磷酰胺、西罗莫司、抗 CD4 单克隆抗体、CTLA4-Ig、美罗华、抗 CD154 单克隆抗体、抗 LFA1 单克隆抗体、抗 LFA-3 单克隆抗体、抗 CD2 单克隆抗体和抗 CD45。

[0074] 同种异体移植部分通过激活 T 细胞而排斥。移植受者在 CD4<sup>+</sup>T 细胞识别同种异体移植中的外来抗原后实现排斥反应。这些抗原通过主要组织相容性复合物(MHC) 编码。存在 I 类和 II 类 MHC 分子。在人中,I 类 MHC 分子是 HLA-A、HLA-B 和 HLA-C。人的 II 类 MHC 分子称为 HLA-DR、HLA-DQ 和 HLA-DP。在小鼠中,I 类 MHC 分子是 H-2K、H-2D 和 H-2L, 而 II 类 MHC 分子是 I-A 和 I-E。当 CD4<sup>+</sup>T 细胞结合外来 MHC 抗原时,它们被激活并经受克隆增殖。激活的 T 细胞分泌辅助激活单核细胞 / 巨噬细胞、B 细胞和细胞毒性 CD8<sup>+</sup>T 细胞的细胞因子。激活的单核细胞 / 巨噬细胞释放导致组织损伤的活性剂, B 细胞产生导致补体介导的组织破坏的同种抗体, CD8<sup>+</sup>T 细胞通过诱导细胞凋亡和细胞溶解以抗原特异性方式杀死移植细胞。

[0075] 免疫抑制剂

[0076] 用来延缓移植排斥(即延长它们的存活)的很多药物以多种方式作用。免疫抑制剂广泛使用。参见 Stepkowski, 2000, 几种免疫抑制药物作用机理的综述。

[0077] 环孢菌素 A 是最广泛使用的用于抑制移植排斥的免疫抑制药物之一。它是白细胞介素 -2 或 IL-2 的抑制剂(它预防白细胞介素 -2 的 mRNA 转录)。更直接地,环孢菌素抑制通常在 T 细胞受体刺激下发生的钙调磷酸酶激活。钙调磷酸酶脱磷酸化 NFAT(活化的 T 细胞的核因子),使其能够进入核并与白细胞介素 -2 启动子结合。通过阻断该过程,环孢菌素 A 抑制 CD4<sup>+</sup>T 细胞的激活以及否则将发生的所致事件级联。他克莫司是另一种免疫抑制剂,通过抑制白细胞介素 -2 的生成起作用。

[0078] 雷帕霉素(西罗莫司)、SDZ RAD 和白细胞介素 -2 受体阻断剂是抑制白细胞介素 -2 作用的药物,因此可预防上述事件级联。

[0079] 嘌呤或嘧啶生物合成抑制剂也用于抑制移植排斥。这些预防 DNA 合成,因而抑制细胞分裂,包括 T 细胞分裂的能力。结果是通过预防新 T 细胞的形成而抑制 T 细胞活性。嘌呤合成抑制剂包括硫唑嘌呤、甲氨喋呤、霉酚酸酯(MMF) 和咪唑立宾(布雷青霉素)。嘧啶合成抑制剂包括布喹那钠和来氟米特。环磷酰胺是嘌呤和嘧啶合成的抑制剂。

[0080] 抑制 T 细胞激活的另一种方法是用 T 细胞的抗体治疗受者。OKT3 是对抗为 T 细胞受体的 CD3 的鼠单克隆抗体。该抗体抑制 T 细胞受体和抑制 T 细胞激活。

[0081] 很多其他用于延缓同种异体移植排斥的药物和方法为本领域技术人员已知并使用。一种方法是例如通过辐射耗竭 T 细胞。这已经经常用于骨髓移植,特别如果主要 HLA 部分错配。已经使用对受者施用 CD40 配体-CD40 相互作用抑制剂(阻断剂)和 / 或 CD28-B7 相互作用阻断剂(U. S. 专利 6, 280, 957)。公开的 PCT 专利申请 W001/37860 教导

了施用抗 CD3 单克隆抗体和 IL-5 以抑制 Th1 免疫反应。公开的 PCT 专利申请 W000/27421 教导了通过施用肿瘤坏死因子- $\alpha$  拮抗剂来预防或治疗角膜移植排斥的方法。Glotz 等人 (2002) 显示:施用静脉内免疫球蛋白 (IVIg) 可诱导抗 HLA 抗体效价显著且持续地减少,因而允许 HLA- 错配的器官的移植。类似的方案已经包括血浆交换 (Taube 等人,1984) 或与免疫抑制剂偶联的免疫吸附技术 (Hiesse 等人,1992) 或这些的组合 (Montgomery 等人,2000)。Changelian 等人 (2003) 教导了一种模型,其中免疫抑制由口服 Janus 激酶 3 (JAK3) 抑制剂引起,所述 JAK3 是使用共同  $\gamma$  链 ( $\gamma c$ ) 的细胞因子受体 (白细胞介素 -2、-4、-7、-9、-15、-21) 的适当信号传导所必需的酶,结果是抑制 T 细胞激活。在心脏同种异体移植物移植的研究 (Stepkowski, 2000) 中,对抗 ICAM-1 的反义核酸已单独使用或与对白细胞-功能相关抗原 1 (LFA-1) 具有特异性的单克隆抗体组合使用。类似地,抗 ICAM-1 抗体已用于与抗 LFA-1 抗体组合以治疗心脏同种异体移植物 (Stepkowski, 2000)。反义寡核苷酸已另外与环孢菌素联合用于大鼠心脏或肾同种异体移植物模型中,导致延长移植物存活的协同效应 (Stepkowski, 2000)。慢性移植排斥已通过施用涉及于分化、增殖和凋亡的细胞因子 TGF- $\beta$  的拮抗剂来治疗 (美国专利申请公开 US2003/0180301)。

#### [0082] 补体和移植 / 移植排斥

[0083] 补体在移植排斥中的作用是公知的。这在异种移植的情况下尤其正确,但是补体也在同种异体移植排斥中起作用。关于综述,参见 Platt 和 Saadi, 1999。补体作用的一个方面是缺血-再灌注损伤可在器官移植用受者血液再灌注时发生。补体也可引起一些同种异体移植物排斥的表现。

[0084] 补体系统在 U. S. 专利 6, 355, 245 中详细描述。补体系统与身体的其他免疫系统联合作用以防范细胞和病毒病原体的侵入。有至少 25 种补体蛋白质,它们以血浆蛋白质和膜辅助因子的复合物集合存在。血浆蛋白质组成脊椎动物血清球蛋白的约 10%。补体成分通过在一系列复杂但精确的酶断裂和膜结合事件中互相作用而实现它们的免疫防御功能。所致补体级联反应导致具有调理、免疫调节和溶解功能的产物的产生。

[0085] 补体级联反应经由经典途径或替代途径进行。这些途径共用很多组份,尽管它们起始步骤不同,它们汇聚且共用负责激活和破坏靶细胞的相同的“末端补体”组份 (C5 至 C9)。

[0086] 经典补体途径通常通过抗体识别以及结合于靶细胞上的抗原位点来启动。替代途径通常是非抗体依赖性的,并且可通过病原体表面上的某些分子来启动。两种途径聚集在一点,在那里补体组份 C3 通过活性蛋白酶 (其在每种途径中不同) 断裂以生成 C3a 和 C3b。其他激活补体攻击的途径可随后在导致补体功能不同方面的序列事件中起作用。

[0087] C3a 是过敏毒素。C3b 结合于细菌和其他细胞以及某些病毒和免疫复合物,并标记它们以从循环中除去。在这种作用中的 C3b 已知为调理素。C3b 的调理功能被认为是补体系统最重要的抗感染作用。具有阻断 C3b 功能的遗传损伤的患者倾向于被多种病原生物感染,而后来在补体级联反应序列中具有损伤的患者,即具有阻断 C5 功能的损伤的患者,发现仅更倾向于奈瑟球菌属 (*Neisseria*) 感染,因此仅仅在某种程度上更易感 (Fearon, 1983)。

[0088] C3b 还与每种途径特有的其他组份形成复合物,以形成经典或替代的 C5 转化酶,其裂解 C5 为 C5a 和 C5b。因此 C3 被认为是补体反应序列中的重要蛋白质,因为它对替代

和经典两种途径均是必要的 (Wurzner 等人, 1991)。C3b 的该特性通过作用于 C3b 以产生 iC3b 的血清蛋白酶因子 I 来调节。尽管仍然具有调理素功能, 但 iC3b 不能形成活性 C5 转化酶。

[0089] C5 是 190kDa  $\beta$  球蛋白, 在正常血清中以约 75  $\mu$ g/mL (0.4  $\mu$ M) 存在。C5 是糖基化的, 其约 1.5-3 百分比的重量归因于碳水化合物。成熟 C5 是 999 个氨基酸 115kDa  $\alpha$  链与 656 个氨基酸的 75kDa  $\beta$  链二硫键连接的异源二聚体。C5 作为单拷贝基因的单链前体蛋白质产物合成 (Haviland 等人, 1991)。该基因转录的 cDNA 序列预测了 1659 个氨基酸的分泌型前-C5 前体以及 18 个氨基酸引导序列。

[0090] 前-C5 前体在氨基酸 655 和 659 之后断裂, 获得作为氨基末端片段的  $\beta$  链 (氨基酸残基 +1 至 655) 和作为羧基末端片段的  $\alpha$  链 (氨基酸残基 660 至 1658), 其中在两者之间缺失四个氨基酸。

[0091] C5a 通过替代或经典 C5 转化酶从 C5 的  $\alpha$  链断裂, 作为包含  $\alpha$  链前 74 个氨基酸 (即氨基酸残基 660-733) 的氨基末端片段。C5a 的 11kDa 质量的约 20% 归因于碳水化合物。转化酶作用的断裂位点位于氨基酸残基 733 处或与其直接相邻。结合于此断裂位点或与其相邻处的化合物具有阻断 C5 转化酶进入至断裂位点的潜力, 因此作为补体抑制剂起作用。

[0092] C5 还可通过除 C5 转化酶活性之外的方式激活。有限的胰蛋白酶消化 (Minta 和 Man, 1977; Wetsel 和 Koib, 1982) 和酸处理 (Yamamoto 和 Gewurz, 1978; Vogt 等人, 1989) 也可断裂 C5, 产生活性 C5b。

[0093] C5a 是另一种过敏毒素。C5b 与 C6、C7 和 C8 组合以在靶细胞表面形成 C5b-8 复合物。在结合几种 C9 分子后, 形成膜攻击复合物 (MAC、C5b-9、末端补体复合物-TCC)。当足够数目的 MAC 插至靶细胞膜时, 它们造成的开口 (MAC 孔) 介导靶细胞的快速渗透性溶解。更低的非溶解浓度的 MAC 可产生其他效应。特别地, 小数目 C5b-9 复合物膜插入至内皮细胞和血小板可导致有害的细胞激活。在一些情况下, 激活可先于细胞溶解。

[0094] 如上文所述, C3a 和 C5a 是过敏毒素。这些活化的补体组份可触发肥大细胞脱粒作用, 其释放组胺和其他炎症介质, 导致平滑肌收缩、血管渗透性增加、白细胞激活以及其他炎性现象, 包括导致细胞过多的细胞增殖。C5a 也发挥趋化肽功能, 用于吸引促炎症粒细胞至补体激活位点。

[0095] 对供者同种抗原的补体结合性受者抗体被认识是超急性移植排斥的主要原因。由于移植前交叉配合试验, 这种体液排斥表型目前很少观察到 (Regele 等人, 2001)。目前数据显示: 体液免疫机制可能促进其他类型的同种异体移植排斥 (Regele 等人, 2001)。发现表明体液预致敏的高水平群体反应性抗体 (panel reactive antibody) 与较低的肾移植存活相关 (Opelz, 1992), 已报道在移植后阶段同种抗体的出现预示差的移植结果 (Jeannet 等人, 1970; Halloran 等人, 1992), 通过免疫吸附选择性去除受者 IgG 逆转了一些排斥事件, 表明体液免疫机制对排斥的贡献 (Persson 等人, 1995; Böhmig 等人, 2000)。在移植体内的补体激活可能表明抗体介导的移植损伤。补体断裂产物 C4d 是抗体依赖性经典途径激活的标记物。在肾同种异体移植活组织检查中的毛细血管 C4d 沉积物与差的移植结果相关。

[0096] 近来, 不断增加的证据表明: 补体激活显著有助于同种异体移植受者的致敏和发展同种异体移植物的组织损伤 (Platt 等人, 1999)。抗体是研究最彻底的激活经典补体

途径的介体。临床上,已知同种抗体激活补体(Baldwin等人,2001)。Halloran和Collins表明:在肾同种异体移植物的肾小管周围毛细血管中C4d沉积物是急性体液排斥的敏感性和诊断性标记物,其与循环供者特异性抗体的存在强烈相关(Collins等人,1999;Halloran,2003)。进一步支持性证据见于补体抑制(Pratt等人,1996;Pruitt等人,1991;Forbes等人,1978)或缺乏(Pratt等人,2000;Baurer等人,1995)的动物中,其显示炎症损伤显著减少以及抗供者免疫反应降低。在ABMR中,提出补体通过经典途径激活并在发病机理中起重要作用(Collard等人,1997)。尽管补体在异种移植后的HAR或急性血管排斥(AVR)中的作用得到很好地证明(Platt等人,1999),但补体在同种异体移植后ABMR发病机理中的确切机理还不明了。

[0097] 补体的C5组份断裂以形成具有多种促炎症效应的产物,从而代表了免疫介导的炎症反应内补体抑制的具吸引力的靶点。如上所述,C5a是强有力的过敏毒素和趋化因子。通过C5a的细胞激活诱导多种其他炎症介质的释放(Jose等人,1983)。补体激活途径(经典、替代或甘露聚糖-结合的凝集素途径)最终导致细胞溶解膜攻击复合物C5b-9的生成(Kirschfink,2001),C5b-9可介导通过细胞溶解的直接组织损伤和亚溶解剂量的促炎症细胞激活(Saadi等人,1995;Papadimitriou等人,1991)。因此,对于移植之后补体介导的炎症反应的最佳抑制,可能需要同时阻断C5a和C5b-9的产生。同时,抑制C5的补体级联反应不损害C3b的产生,保留了C3b-介导的病原微生物调理作用以及免疫复合物的增溶和清除(Liszewski,1993)。

[0098] 先前已经报道抗C5mAb在几种实验模型中的有益效应,包括心肌再灌注(Vakeva等人,1998)、系统性红斑狼疮(Wang等人,1996)和类风湿性关节炎(Wang等人,1995);以及自身免疫性疾病、心肺动脉分流术和急性心肌梗塞的人临床试验(Kirschfink,2001)。此外,通过功能性阻断抗C5单克隆Ab(mAb)的补体灭活防止了异种移植模型中的HAR(Kroshus等人,1995;Wang等人,1999)。

[0099] 已经测试了通过施用补体抑制剂延缓同种异体移植排斥的方法。公布的PCT专利申请W092/10205公开了环孢菌素和可溶性补体受体(sCR1)的组合抑制预致敏大鼠模型中心脏同种异体移植排斥的用途。补体受体1结合于补体C3b和C4b。补体受体1的可溶形式自然地发生或可经由重组DNA方法产生。这些可溶性补体受体已经在体外抑制补体激活的结果(U.S.专利6,057,131)。在W092/10205中,对已经对它们接受的心脏同种异体移植预致敏的大鼠以10mg/kg/day肌肉施用环孢菌素A,始于移植前两天,并且继续直至移植排斥时。此外,在移植再灌注之前,立即以15mg/kg的单次静脉内快速浓注施用可溶性补体受体1(sCR1)。未经药物处理的对照动物在平均第3.8天排斥移植。那些仅施用环孢菌素A的动物在平均第57天排斥移植(这可变性相当大,其中两只大鼠在第2和4天迅速排斥,而第三只大鼠在第166天排斥)。仅施用sCR1的大鼠在平均第44天排斥移植。那些施用环孢菌素A和sCR1的组合的大鼠在平均第147天排斥移植。观察到长期环孢菌素A和单次快速浓注sCR1的组合导致协同效应,大大延长了直至移植排斥的时间。Pruitt和Bollinger的早期研究(1991)使用了类似的预致敏大鼠同种异体移植模型,显示单独施用sCR1以灭活补体导致移植排斥前的时间增加。

[0100] Sims等人(U.S.专利5,135,916)提出使用补体抑制剂例如CD59或对抗C7或C9的抗体以阻断C5b-9复合物的形成,从而治疗待移植器官和组织的血管内皮。这将预防

C5b-9 引发的细胞坏死。将 C5b-9 灭活剂添加至灌注液或贮存培养基以保护血管衬细胞免于在体外贮存期间的补体激活。此外,保护器官或组织免于移植后启动的补体激活产生的细胞溶解和溶栓效应,从而避免了补体介导的急性排斥。Sims 等人 (U. S. 专利 5, 573, 940 和 U. S. 专利 6, 100, 443) 也教导了在移植组织或器官中表达 CD59 以保护移植器官免于排斥的方法。这可通过转染所移植细胞而实现。

[0101] 尽管迄今为止开发的若干药物与预筛选供者和受者以使供者同种异体移植植物与受者相配的方法的联合已经日益增加了同种异体移植植物存活的时间长度,但是在受者的寿命期间还是有很多同种异体移植植物被排斥。通常而言,现有技术的进展主要涉及克服急性移植排斥。此外,使用特异性靶向 C5 蛋白水平补体级联反应的抑制剂,还未检测出激活的末端补体组份在抗体介导的同种异体移植植物排斥中的作用。本文所述以及实施例中示例的方法通过抑制同种异体移植植物、特别是预致敏受者中同种异体移植植物的慢性排斥,推进了同种异体移植技术的发展。通过使用免疫抑制药物与长期施用的补体抑制剂的正确组合,提出了用于进一步延长同种异体移植植物存活的新方法。

[0102] 方法和用途

[0103] 本文所公开的方法用于延长同种异体移植植物存活。该方法通常包括施用补体活性抑制剂与一种或多种免疫抑制剂的组合。

[0104] 适合的补体抑制剂对本领域技术人员是已知的。可以制备活化补体个别组份的抗体,例如 C5a、C7、C9 等的抗体 (参见例如 U. S. 专利 6, 534, 058 ;公布的 U. S. 专利申请 US2003/0129187 ;和 U. S. 专利 5, 660, 825)。抑制补体介导的溶解的蛋白质是已知的,包括 CD59、CD55、CD46 和其他 C8 和 C9 的抑制剂 (参见例如 U. S. 专利 6, 100, 443)。U. S. 专利 6, 355, 245 教导了结合于 C5 并防止其断裂成 C5a 和 C5b、从而防止不仅 C5a 而且 C5b-9 复合物形成的抗体。称为补体受体且结合补体的蛋白质也是已知的 (参见公布的 PCT 专利申请 W092/10205 和 U. S. 专利 6, 057, 131)。使用补体受体的可溶形式、例如可溶性 CR1 可抑制补体激活的后果,如嗜中性粒细胞氧化爆发、补体介导的溶血以及 C3a 和 C5a 生成。本领域技术人员认识到上述是一些但不是全部抑制补体及其活化的已知方法。

[0105] 适合的免疫抑制剂包括但不限于 ATG 或 ALG、OKT3、达利珠单抗、巴利昔单抗、皮质激素、15- 脱氧精脒菌素、LF15-0195、环孢霉素、他克莫司、硫唑嘌呤、甲氨喋呤、霉酚酸酯、6- 巯嘌呤、布雷青霉素、布喹那、来氟米特、环磷酰胺、西罗莫司、抗 CD4 单克隆抗体、CTLA4-Ig、美罗华、抗 CD154 单克隆抗体、抗 LFA1 单克隆抗体、抗 LFA-3 单克隆抗体、抗 CD2 单克隆抗体和抗 CD45。

[0106] 同种异体移植植物可包括移植的器官、器官的部分、组织或细胞。这些包括但不限于心、肾、肺、胰、肝、血管组织、眼、角膜、晶状体、皮肤、骨髓、肌肉、结缔组织、胃肠组织、神经组织、骨、干细胞、胰岛、软骨、肝细胞和造血细胞。

[0107] 同种异体移植植物衰竭的至少部分原因是同种异体移植植物受者的一个反应是补体的激活。这导致 C5a 和 C5b-9 的形成,其为强促炎症分子,有助于引起移植植物衰竭。不希望受限于任何建议的理论,申请人建立如下理论:抑制 C5a 和 C5b-9 的形成或抑制存在的 C5a 和 C5b-9 有助于预防移植植物衰竭。此外,建立以下理论:只要同种异体移植植物存在,受者将继续尝试形成对移植植物的免疫反应,且这种反应将包括尝试产生 C5a 和 C5b-9。如果不预防,那么这种补体反应将在短期内引起急性血管排斥,并在长期内促进慢性移植排斥。使用

补体活性抑制剂的现有技术方法受限于仅在移植时施用这些抑制剂。这有助于预防急性排斥,但是如本文公开的结果所示,通过在更长的时期内施用这种抑制剂获得改良的结果。这种长期施用有助于预防同种异体移植物的慢性排斥,这与仅有助于预防急性排斥相反。与不施用补体活性抑制剂或仅在同种异体移植物移植时期施用这种抑制剂相比,结果是同种异体移植物存活时间更长。尽管通常期望同种异体移植物存活该受者的剩余寿命,但是也有仅仅短时期需要同种异体移植物的时候,例如桥接器官 (bridge organ) 桥接时间直至受者自身器官能主动恢复,此时该同种异体移植物将不再需要。这种移植物所需的时间长度将变化,但是通常将长于急性排斥发生的时间,并对于慢性排斥发生也足够长。对于桥接移植物,期望的存活期可以是几个月,例如六个月。

[0108] 为证明长期抑制补体活性将延长同种异体移植物存活,进行了实验,其中以长期方式而不仅仅在移植时抑制补体活化。长期治疗意味着在延长的时期内直到同种异体移植物寿命的治疗。这可以是每天治疗,但不限于每天治疗。长期治疗将在同种异体移植物受者中维持有效量的药物。例如,优选的方法是在治疗中包括抗 C5 单克隆抗体依库珠单抗。在对遭受阵发性睡眠性血红蛋白尿症 (PNH) 的人的研究中,已经以 900mg/ 患者的剂量每 12-14 天施用一次依库珠单抗。已发现,这种给药完全地且持续地阻断末端补体活性并且大大抑制了 PNH 的症状 (Hillmen 等人,2004)。在依库珠单抗被灭活或从身体去除之前,该施用的剂量能阻断补体的效应约两星期。因此,依库珠单抗长期治疗可以是例如对同种异体移植物受者施用 900mg、每两星期一次,持续患者的剩余寿命。类似地,其他药物可根据需要长期递送,不论这是基于每天还是需要另一种方案以在同种异体移植物受者中维持有效量的药物。因为熟知移植排斥可不仅仅由补体激活、例如 T 细胞活性导致,所以实验包括免疫抑制剂如环孢菌素以进一步助于预防移植排斥。

[0109] 抑制补体活性的优选方法是使用结合于补体 C5 并防止 C5 断裂的单克隆抗体。这预防 C5a 和 C5b-9 两者的形成,同时允许对受者有益的 C3a 和 C3b 的形成。这种对人补体特异性的抗体是已知的 (U. S. 专利 6, 355, 245)。这些在 U. S. 专利 6, 355, 245 中公开的抗体包括完整抗体或全长抗体 (现称为依库珠单抗) 以及单链抗体 (现称为培克珠单抗)。对抗小鼠 C5 的类似抗体称为 BB5. 1 (Frei 等人,1987)。在下文描述的实验中利用 BB5. 1。抑制补体活性的抗体不必须是单克隆抗体。它们可以是例如多克隆抗体。它们又可以是抗体片段。抗体片段包括但不限于 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、单链抗体、结构域抗体和 Fv。而且,本领域技术人员熟知抗体可以是人源化的 (Jones 等人,1986)、嵌合的或去免疫的。抗体还可以包括突变型 Fc 部分以便突变型 Fc 不会激活补体。用于本发明的抗体可以是这些的任何一种。当同种异体移植物受者是人时,优选使用人源化的抗体。

[0110] 施用和制剂

[0111] 根据本领域技术人员已知的方法进行补体活性抑制剂的施用。这些抑制剂优选在同种异体移植物移植时间前施用,或在移植时以长期方式持续施用。这些抑制剂又可在排斥事件期间施用,如果这种事件确实发生。

[0112] 本发明还提供了抑制补体活性的药物和免疫抑制剂在制备药物或药物包装中的用途。这种药物或药物包装可用于延长同种异体移植物在受者中的存活,特别是同种异体移植物的长期存活。在优选的实施方案中,配制并制备药物或药物包装以使它适于对同种异体移植物的受者长期施用,例如使用稳定的制剂。在某些实施方案中,配制并制备药物或

药物包装以使它适于对同种异体移植物的受者并行施用抑制补体活性的药物和免疫抑制药物。在某些实施方案中,配制并制备药物或药物包装以使它适于对同种异体移植物的受者连续(以任一次序)施用抑制补体活性的药物和免疫抑制药物。

[0113] 本发明的药物包装可包含抑制补体活性的药物和至少一种免疫抑制剂。药物包装可进一步包含用于长期施用的标签。药物包装也可包含用于患者、例如移植物的受者自我施用的标签或用于移植物受者看护者的说明书。在某些实施方案中,药物包装中的药物和试剂处于适于长期施用和/或自我施用的制剂或单独制剂中。

[0114] 本发明也提供了冻干制剂和适于注射的制剂。某些实施方案提供了包含抑制补体活性的抗体和冻干保护剂的冻干抗体制剂。在优选的实施方案中,抗体制剂适于长期施用,例如抗体制剂是稳定的。替代实施方案提供了包含注射器的注射系统;注射器包含含有抗体的药筒,所述抗体抑制补体活性且处于适于注射的制剂中。

[0115] 在本发明各个实施方案中使用的抗体优选抑制末端补体或 C5a 的形成。在某些实施方案中,抑制末端补体或 C5a 形成的抗体是完整抗体或抗体片段。完整抗体或抗体片段可以是人、人源化的、嵌合的或去免疫的抗体或抗体片段。在某些实施方案中,完整抗体或抗体片段可抑制补体 C5 的断裂。在某些实施方案中,抗体片段是 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、结构域抗体或单链抗体。在优选的实施方案中,所述抗体片段是培克珠单抗。在替代优选的实施方案中,完整抗体是依库珠单抗。

[0116] 在某些实施方案中,抑制补体活性的药物如抗体以单位剂型存在,其可特别适于自我施用。类似地,本发明的免疫抑制剂也可以以单位剂型存在。本发明的配制产品可包括在容器内,例如通常是管形瓶、药筒、预填充注射器或一次性使用的(disposable)笔。例如本发明的注射系统也可使用给药器,如在 U. S. 专利 6,302,855 中描述的给药装置。

[0117] 在某些实施方案中,依库珠单抗以下列给药方案递送:起初 4 周每 7±2 天经由 25 至 45 分钟 IV 输注 600mg,继之以随后 7±2 天第五剂量 900mg,此后每 14±2 天 900mg。施用可在 25 至 45 分钟内经由 IV 输注。在施用之前,依库珠单抗可稀释至 5mg/mL 的最终浓度。

[0118] “稳定”制剂是其中的药物(例如抗体)或试剂在贮存下基本上保留其物理和化学稳定性和整体性的制剂。测量蛋白质稳定性的各种分析技术在本领域可利用,且在 Peptide and Protein Drug Delivery,247-301,Vincent Lee Ed.,Marcel Dekker,Inc.,纽约,N.Y., Pubs.(1991) 和 Jones,A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90(1993) 中综述。稳定性可在所选时段的所选温度下测量。例如,在冻干和贮存后的聚集程度可用作蛋白质稳定性的指示剂。例如,“稳定”制剂可以是其中少于约 10% 且优选少于约 5% 的蛋白质以聚集体存在于制剂中的制剂。在其他的实施方案中,在冻干制剂的冻干和贮存后聚集体形成的任何增加可以检测。例如,“稳定”冻干制剂可以是这样一种制剂:其中当冻干制剂在 2-8℃ 贮存至少一年时,其聚集体的增加少于约 5%、优选少于约 3%。在其他实施方案中,蛋白质制剂的稳定性可使用生物活性测定法测量。

[0119] “复原”制剂是通过将冻干蛋白质制剂溶解于稀释剂中以使该蛋白质分散于复原制剂中来制备的制剂。复原制剂适于对用目标蛋白质治疗的患者施用(例如胃肠外施用),在本发明的某些实施方案中,该制剂可适于皮下施用。

[0120] 在某些实施方案中优选等渗的复原制剂。“等渗”是指目标制剂具有基本上与人血

液相同的渗透压。等渗制剂通常具有约 250 至 350mOsm 的渗透压。等渗性可例如使用蒸汽压或冰冻型渗透压计来测量。

[0121] “冻干保护剂”是当与目标药物（例如抗体）组合时显著地预防或减少药物（例如抗体）在冻干和随后贮存下的化学和 / 或物理不稳定性的分子。示例性冻干保护剂包括糖,如蔗糖或海藻糖;氨基酸,如谷氨酸单钠或组氨酸;甲胺,如甜菜碱;易溶 (lyotropic) 盐,如硫酸镁;多元醇,如三元或更高元糖醇,例如丙三醇、赤藓糖醇、甘油、阿糖醇、木糖醇、山梨糖醇和甘露醇;丙二醇;聚乙二醇;Pluronic;及其组合。优选的冻干保护剂是非还原糖,如海藻糖或蔗糖。

[0122] 冻干保护剂以“冻干保护量”添加至预冻干制剂,这意味着在冻干保护剂的冻干保护量存在下冻干药物（例如抗体）后,药物（例如抗体）在冻干和贮存下基本上保留其物理和化学稳定性和整体性。

[0123] 本文的目标“稀释剂”是药学上可接受的（施用至人是安全和非毒性的）且可用于制备复原制剂。示例性的稀释剂包括无菌水、抑菌性注射用水 (BWF1)、pH 缓冲溶液（例如磷酸盐缓冲盐水）、无菌盐水溶液、林格溶液或右旋糖溶液。

[0124] 例如,“防腐剂”是可添加至稀释剂中以基本上减少复原制剂中细菌作用、因而有利于制备多可多次使用复原制剂的化合物。可能的防腐剂的实例包括氯化十八烷基二甲基苄基铵、氯己双铵、苯扎氯铵（其中烷基是长链化合物的氯化烷基苄基二甲基铵的混合物）以及氯化苄乙氧铵。其他类型的防腐剂包括芳族醇如苯酚、丁醇和苄醇、对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯、儿茶酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇和间甲酚。

[0125] “填充剂”是添加质量至冻干混合物且有助于冻干团块物理结构（例如促进保持开孔结构的基本上均匀的冻干团块的产生）的化合物。示例性的填充剂包括甘露醇、甘氨酸、聚乙二醇和山梨醇。

[0126] 因此,稳定的冻干抗体制剂可使用冻干保护剂（优选糖如蔗糖或海藻糖）来制备,其冻干制剂可复原以产生稳定的复原制剂,其具有比预冻干制剂显著更高（例如约 2-40 倍更高,优选 3-10 倍更高,且最优选 3-6 倍更高）的抗体浓度。当制剂用于皮下施用,这种复原制剂的高蛋白浓度被认为特别有用。尽管在复原制剂中蛋白浓度非常高,但是复原制剂可以在 2-8℃ 下至少约 30 天是稳定的（即没有显示显著或不可接受水平的蛋白质的化学或物理不稳定性）。参见 U.S. 专利 6,821,515。在某些实施方案中,复原制剂是等渗的。

[0127] 当用包含防腐剂（如抑菌性注射用水, BWF1）的稀释剂复原时,复原制剂可用作多次使用制剂。例如当受治疗者患者需要频繁施用药物或抗体和 / 或试剂以治疗慢性医疗病状时,这种制剂是有用的。多次使用制剂的优势是它方便了患者的简易使用、通过允许管形瓶内含物的充分使用而减少浪费,并导致制造厂商的明显成本节约,因为多个剂量被包装在单个管形瓶中（较低的填充和装载成本）。

[0128] 本发明也提供了制备制剂的方法,其包括下列步骤:(a) 冻干抗体和冻干保护剂的混合物;和 (b) 将步骤 (a) 的冻干混合物在稀释剂中复原以使该复原制剂是等渗且稳定的。

[0129] 本文也提供了一种制品 (article),其包括:(a) 容纳抗体和冻干保护剂的冻干混合物的容器;和 (b) 用稀释剂将冻干混合物复原至在复原制剂中的所需抗体浓度的说明书。该制品可进一步包含容纳稀释剂（例如包含芳香醇的抑菌性注射用水 (BWF1)）的第二

容器。

[0130] 本发明的注射系统可使用如 U. S. 专利 5, 308, 341 中描述的药物递送笔。已开发药物递送笔以方便药物的自我施用。本发明的药物可以是抑制补体活性的药物、例如对补体 C5 特异性的抗体和 / 或免疫抑制剂。一种药物递送笔包括管形瓶托座 (holder), 其中容纳胰岛素或其他药物的管形瓶。所述管形瓶托座是长形、通常管状的结构, 具有近端和远端。管形瓶托座的远端包括用于啮合双端针状插管的固定装置。近端也包括用于啮合含有驱动器和给药设定装置的笔身的固定装置。用于现有技术管形瓶托座的一次性使用的含药物管形瓶包括具有可刺穿弹性隔膜的远端, 其可被双端针状插管的一端刺穿。这种管形瓶的近端包括与管形瓶的圆柱壁衔接、可滑动放置的塞子。这种药物递送笔是通过将药物管形瓶插入至管形瓶托座中来使用。然后笔身连接至管形瓶托座的近端。笔身包括用于指定通过笔递送的药物剂量的剂量设定装置, 和用于驱动管形瓶的塞子向远端移动相应于所选剂量的距离的驱动装置。

[0131] 笔的使用者将双端针套管安装至管形瓶托座的远端以使针套管的近点刺穿管形瓶的隔膜。然后患者选择剂量并操作笔以向远端驱动塞子递送所选剂量。剂量选择装置在所选剂量注射后回到零。然后患者移除并弃去针套管, 将现有技术药物递送管保持在方便的位置用于随后的所需药物施用。在若干次这样的药物施用后, 管形瓶的药物逐渐耗尽。然后患者将管形瓶托座和笔身分离。空管形瓶可移除并弃去。可将新管形瓶插入至管形瓶托座, 管形瓶和笔身可如上所述重新组合并使用。

[0132] 因此, 药物递送笔通常具有精确给药和容易使用的驱动机构。剂量机构如可旋转的旋钮允许使用者精确调节通过笔从预包装药物管形瓶中注射的药物量。为了注射药物的剂量, 使用者将针插入皮肤下, 压下旋钮至其压低的限度。所述笔可以是完全机械的装置或它可与电子线路组合以精确设定和 / 或指示注射至使用者的药物剂量。参见 U. S. 专利 6, 192, 891。

[0133] 本发明也提出了适于长期和 / 或自我施用药物的控制释放或延长释放制剂。

[0134] 各种制剂可施用于需要药物 (例如本发明的抗体和至少一种免疫抑制剂) 治疗的患者 (如同种异体移植物的受者), 通过快速浓注的静脉内施用或通过在规定时间内连续输注、通过肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部或吸入途径。

[0135] 在某些实施方案中, 制剂通过皮下 (即在皮肤下) 施用至患者。为了这种目的, 制剂可使用注射器注射。然而, 其他施用制剂的装置是可用的, 如注射装置 (例如 **Inject-ease®** 和 **Genject®** 装置); 注射笔 (如 **GenPen®**); 无针装置 (例如 **MediJector®** 和 **BioJector®**); 和皮下贴 (subcutaneous patch) 递送系统。

[0136] 参考下列实施例描述了本方法和用途, 这些实施例通过示例的方式来提供并不是用来以任何方式限制本发明。利用本领域公知的标准技术或下文明确描述的技术。本文使用下列缩写: ABMR, 抗体介导的排斥; ACHR, 加速性体液排斥; ACR, 急性细胞排斥; AVR, 急性血管排斥; CsA, 环孢菌素; CyP, 环磷酸胺; HAR, 超急性排斥; MCP-1, 单核细胞趋化蛋白 1; MST, 平均存活时间; POD, 术后天数。

[0137] 实施例 1

[0138] 方法

[0139] 动物和免疫抑制药物:选择重量为 25-30g 的雄性成年 C3H(H-2<sup>k</sup>) 小鼠和 BALB/c(H-2<sup>d</sup>) 小鼠(Jackson Labs,Bar Harbor,Maine) 分别作为供者和受者。在接受免疫抑制剂的各组中,对受者注射 CsA(15mg/kg/天,皮下(s.c),从第 0 天至终点排斥或直到第 100 天的每天)或 CyP(40mg/kg/天,静脉内(i.v.),在第 0 天和第 1 天)或抗 C5mAb(克隆 BB5.1, Alexion

[0140] Pharmaceuticals Inc.,40mg/kg/天,腹膜内(i.p.),第 0-2 天,然后每周两次,0-60 天)。将动物在常规条件下饲养于西安大略大学的实验动物中心,并且依照由 Canadian Council on Animal Care 建立的指导方针照料。Olfert 等人,1993。

[0141] 皮肤预致敏:取自 C3H 供者的全层皮肤移植物被切成 1×1cm<sup>2</sup> 的方块,并在相同供者的心脏移植前一星期移植至 BALB/c 受者的胸背部。排斥定义为皮肤移植物的完全坏死。

[0142] 腹部和颈心脏移植:皮肤预致敏后七天,通过将供者主动脉与受者主动脉、供者肺动脉与受者下腔静脉吻合,将 C3H 小鼠心脏移植至预致敏 BALB/c 受者的腹部。在再移植的各组中,通过将供者主动脉与受者颈动脉、供者肺动脉与受者颈外静脉(端-至-侧)吻合,将从原始(naive)C3H 小鼠或长期存活的预致敏 BALB/c 受者中获得的第二心脏移植物移植至携带长期存活的第一腹部心脏移植物的受者的颈部区域。每天监控心脏移植物直至排斥,除非另有说明,且排斥定义为搏动的完全停止。

[0143] 试验组:随机将预致敏受者分成八组,每组由八只动物组成:组 1,未处理的小鼠;组 2,用 CsA 处理的小鼠;组 3,用 CyP 处理的小鼠;组 4,用 CsA 加 CyP 处理的小鼠;组 5,用抗 C5mAb 处理的小鼠;组 6,用抗 C5mAb 加 CsA 处理的小鼠;组 7,用抗 C5mAb 加 CyP 处理的小鼠;组 8,用抗 C5mAb 组合 CsA 和 CyP 处理的小鼠。当心搏动不再可触及或在 POD100 时,移除移植物用于常规组织学、免疫组织化学和蛋白印迹分析,收集血清样品用于流式细胞术分析和补体溶血分析。另外放置五只动物,并于 POD3(组 1-5、7 的 MST)时在组 6 和组 8 中处死以允许在均一时间点比较。还在组 8 中于 POD11、21、28 和 60 收集血清样品,用于检测抗供者抗体水平和补体活性的连续变化。此外,当三重疗法处理的预致敏受者携带第一心脏移植物达 100 天时,对它们再移植第二心脏。原始 C3H 心脏或来自另一个预致敏 BALB/c 受者的存活 100 天的 C3H 心脏用作第二心脏。每个再移植组中包括八只动物。

[0144] 移植物组织学:将组织样品在 10%缓冲甲醛中固定。然后将样品嵌入石蜡中,然后切片用于 H&E 染色。由病理学家用盲法检查显微切片的排斥严重性。移植物排斥的标准包括存在血管炎、血栓形成、出血和淋巴细胞浸润。这些变化评分为:0,没有变化;1,极小变化;2,轻微变化;3,中度变化;或 4,明显变化。

[0145] 免疫组织化学:从固定于明胶包被的玻璃载玻片上、嵌在 Tissue-TekO. C. T 凝胶(Optimum Cutting Temperature,Skura Finetek,Torrance,CA)中的组织样品切割 4 微米切片,并使用 Elite Vectastain ABC 试剂盒(Vector Laboratories Inc.,Burlingame,CA)、通过标准间接抗生物素蛋白-生物素免疫过氧化物酶染色法染色。分别用生物素缀合的大鼠抗小鼠 CD4mAb(克隆 YTS191.1.2, Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, 加拿大)和生物素缀合的大鼠抗小鼠 CD8mAb(克隆 53-6.7, Pharmingen, Franklin Lakes, NJ)染色样品的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞。通过用生物素缀合的大鼠抗小鼠 Mac-1mAb(Cedarlane Laboratories Ltd., Hornby, Ontario, 加拿大)染色来检测移植物内单核细胞/巨噬细胞浸润。使用生物素缀合的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗小鼠 IgM(Cedarlane)检测移植物中的

小鼠 IgG 和 IgM 沉积。为了鉴定补体沉积,将切片用山羊抗 C3 或抗 C5 多克隆 Abs (Quidel, San Diego, CA)、生物素化的兔抗山羊 IgG (Vector Laboratories) 和 HRP 缀合的链霉抗生物素蛋白 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) 连续培养。步骤间用磷酸盐缓冲盐水冲洗载玻片,在光学显微镜下检查。略去初级抗体,进行阴性对照。在每个切片的五倍高倍视野下对免疫染色评分,进行五次独立的试验。根据染色强度,将免疫过氧化酶染色的切片从 0 至 4+ 分级:0, 阴性;1+, 不明确 (equivocal);2+, 弱染色;3+, 中等染色;和 4+, 非常强染色。

[0146] 流式细胞术:通过 FACSscan 流式细胞仪在受者血清中评价循环抗供者特异性 IgG 和 IgM 抗体 (Becton Dickinson, Mountain View, CA)。Glotz 等人, (1993);Tyan 等人 (1994)。简言之,分离 C3H 小鼠脾细胞,在 37°C 与原始对照 (**naïve** control) 和实验组的血清培养 30 分钟。为了对总 IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgM 染色,冲洗细胞,并与以下孵育:对小鼠 IgG 的 Fc 部分具有特异性的 FITC 缀合的山羊抗体,或对小鼠 IgM 的  $\mu$  链具有特异性的藻红蛋白缀合的山羊抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), 或 FITC 缀合的山羊抗小鼠 IgG1 (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA) 或 FITC 缀合的山羊抗小鼠 IgG2a (CALTAG) 或 FITC 缀合的山羊抗小鼠 IgG2b (CALTAG)。在 4°C 染色 1 小时后,用 PBS 冲洗细胞,以  $5 \times 10^6$ /mL 重新悬浮,并通过流式细胞术分析平均通道荧光强度,其代表了抗体结合反应性。

[0147] 补体溶血测定:将经纯化的抗 C5mAb 在 GVB<sup>2+</sup> 缓冲液 (明胶佛罗那缓冲盐水:0.1% 明胶、141mM NaCl、0.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.15mM CaCl<sub>2</sub> 和 1.8mM 巴比妥钠) 中连续稀释两倍 (175–0.1  $\mu$ g/mL), 并一式三份 (50  $\mu$ l/孔) 加至 96 孔板。将 BALB/c 小鼠血清用 GVB<sup>2+</sup> 缓冲液稀释至 40% v/v 并加至 (50  $\mu$ l/mL) 相同 96 孔板的各行,以使各孔的 BALB/c 小鼠血清的最终浓度为 20%。然后将板在室温孵育约 30 分钟,同时制备鸡红细胞。鸡红细胞用 GVB<sup>2+</sup> 缓冲液冲洗 5  $\times$  1mL,再悬浮至在 GVB<sup>2+</sup> 中  $5 \times 10^7$ /mL 的最终浓度。4 毫升鸡红细胞通过添加抗鸡 RBC 多克隆抗体 (Intercell Technologies, Hopewell, NJ, 0.1% v/v) 致敏,将细胞在 4°C 孵育 15 分钟,伴频繁涡旋。然后将细胞用 GVB<sup>2+</sup> 洗涤 2  $\times$  1mL,再悬浮至在 GVB<sup>2+</sup> 中 2.4mL 最终体积。将鸡红细胞 (30  $\mu$ l/孔,  $2.5 \times 10^6$  细胞) 添加至如上所述含有血清和抗 C5mAb 的板中,充分混合,在 37°C 孵育 30 分钟。然后将板在 1000  $\times$  g 离心 2 分钟,将 85  $\mu$ l 上清液转移至新 96 孔微量滴定板。使用微板阅读器在 OD415nm 对板读数,使用下式确定溶血百分比:

[0148]

$$\% \text{溶血} = 100 \times \frac{(\text{OD 样品}) - (\text{OD GVB}^{2+} \text{ 对照})}{(\text{OD 100\%溶解的对照}) - (\text{OD GVB}^{2+} \text{ 对照})}$$

[0149] 其中添加含有 0.1% NP-40 的 100  $\mu$ l GVB<sup>2+</sup> 至如上述制备的 30  $\mu$ g/mL 鸡红细胞,获得 100%溶解的对照。

[0150] 蛋白印迹分析:于 4°C 在 RIPA 溶解缓冲液中以 10 秒间隔进行冰冻心脏样品超声达 1 分钟 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), 然后于 4°C 以 13,000rpm 微量离心 10 分钟。使用清洁剂相容的蛋白测定试剂盒 (BIO-RAD), 立即对澄清的上清液一式三份定量蛋白质含量。心脏溶解产物 (10  $\mu$ g 蛋白质/孔) 通过 NuPAGE、4–12% 梯度 Bis-Tris 凝胶和 MES 缓冲系统 (Invitrogen) 分离,使用半干燥转移装置 (BIO-RAD) 转移至聚偏氟乙烯 (PVDF)

膜 (0.45 μm 孔径 ;Invitrogen)。以正确的分子量适当地切割膜以允许产生印记,每个印迹具有两种不同的初级抗体,以使每个印迹暴露于试验抗体和内部对照抗体以确保相等的样品负载。包括抗 Bcl-2(N-19) 兔多克隆血清 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 和抗 Bcl-XS/L(M-125) 兔多克隆血清 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 的试验初级抗体用于检测移植体内 Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白质的表达。抗集钙蛋白兔多克隆血清 (Calbiochem) 用作内部对照初级抗体 (Kobayashi 等人,1999)。如先前描述 (Arp 等人,1996),通过将经洗涤、孵育的印迹暴露于与辣根过氧化物酶缀合的多克隆山羊抗兔 IgG 部分 (HRP ;Roche Laboratories),然后通过暴露适当显色以增强 HRP 缀合的抗体 (Roche Laboratories) 的化学发光,进行初级抗体结合的检测。

[0151] 统计分析 :数据以平均 ±SD 报道。使用 rank-log 检验,比较试验组间同种异体移植物的存活。使用 Mann-Whitney U 试验分析组织学和免疫组织学发现。使用单向 ANOVA 分析流式细胞术数据和蛋白印迹数据。p 值少于 0.05 的差异视为显著。

[0152] 实施例 2

[0153] 用 C3H 供者皮肤移植预致敏在 BALB/c 受者的心脏同种异体移植中诱导抗体介导的 ACHR

[0154] 为了开发适合的模拟临床预致敏患者并研究 ABMR 的小动物模型,通过预致敏小鼠受者,已经开发了一种新的、完全 MHC 错配的小鼠 ABMR 模型。在这种模型中,在相同供者的心脏移植之前一星期,将 BALB/c 受者用 C3H 供者皮肤移植预致敏。供者皮肤预致敏后七天,在预致敏 BALB/c 受者中,抗供者 IgG 但不是 IgM 抗体的血清水平显著提高且达到峰水平 (图 1A)。然后在这些高致敏的受者中进行相同供者的心脏移植。未经免疫抑制, C3H 心脏移植通过 ACHR 在第 3.1±0.4 天迅速排斥,特征是严重的血栓形成、出血和梗塞 (图 1B-a)。相比之下,在未致敏 BALB/c 受者中的相同心脏移植 (平均存活时间 MST 为 8.2±0.8 天) 在术后天数 (POD) 3 时显示正常组织学 (图 1B-b)。当与同一天未致敏 BALB/c 受者比较时,预致敏动物的心脏移植揭示了大量的 IgG 抗体和补体 (C3 和 C5) 沉积,但是极小的 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞浸润 (表 1)。此外,在 POD3 时预致敏受者的循环抗供者 IgG 水平显著高于接受心脏移植物的未致敏相同受者 (P<0.01,图 1C)。然而,抗供者 IgM 在循环 (图 1C) 和心脏移植 (表 1) 中均维持非常低的水平,它显示未致敏和致敏受者之间没有显著差异。而且,在未经处理的预致敏和未致敏心脏受者中显示正常水平的补体溶血活性 (图 1D)。这些数据表明 :这是研究补体在发病机理中起重要作用的预致敏受者中的 ABMR 的理想移植模型。

[0155] 表 1.

[0156] POD3 时未致敏和预致敏 BALB/c 受者中 C3H 心脏同种异体移植物的免疫组织学变化比较

[0157]

| 组   | 未致敏 | 预致敏 |
|-----|-----|-----|
| IgG | 1+  | 4+  |
| IgM | 1+  | 1+  |
| C3  | 2+  | 3+  |
| C5  | 2+  | 3+  |
| CD4 | 0   | 1+  |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| CD8 | 0 | 1+ |
|-----|---|----|

[0158] 免疫过氧化物酶染色的分级 :0, 阴性 ;1+, 不明确 ;2+, 弱 ;3+, 中等 ;4+, 强。

[0159] 抗 C5mAb 与 CsA 和 CyP 的组合在预致敏小鼠受者中预防 ABMR 并实现无限期同种异体移植存活

[0160] 已经显示补体在 ABMR 中起重要作用。然而,在高致敏受者中在 C5 水平功能性阻断末端补体级联反应的抑制效应是未知的。在本文提出的研究中,预致敏模型用于研究抗 C5mAb 单独或与 CsA 和 / 或 CyP 组合在预防 ABMR 中的功效。如图 2A 所示,用 CsA 或 CyP 或两种药物组合的处理并未预防 ABMR, 移植植物分别在 3.0±0.0 天、3.3±0.5 天和 3.5±0.6 天排斥,伴有 ACHR 的典型病理学特征,包括血管内血栓形成和间质出血 (图 2B-b、c、d),这与未处理预致敏 BALB/c 受者的心脏移植植物难以分辨 (图 2B-a)。抗 C5 单一疗法或与 CyP 组合不能提高移植植物存活,心脏移植植物分别在 3.5±0.6 天和 3.2±0.4 天被 ACHR (图 2B-e、f) 排斥 (图 2A)。尽管抗 C5mAb 和 CsA 的组合疗法,即能诱导未致敏动物长期心脏同种异体移植植物存活的方案,在一定限度内延长了移植植物在这种预致敏模型中的存活,但是心脏移植植物在 11.9±1.8 天被严重体液排斥所排斥 (图 2A),伴有血管炎、血栓形成、出血和轻微细胞浸润 (图 2B-g)。相比之下,抗 C5mAb 与 CsA 和 CyP 组合的三重疗法在预致敏动物中实现超过 100 天的无限期心脏移植植物存活 (图 2A) (P<0.01, 相对于未处理动物或用任一单一疗法或两种药物组合处理的动物),而没有排斥迹象 (图 2B-h)。在这种预致敏小鼠模型中,如表 2 所示,在 3 天内排斥其心脏移植植物的受者中观察到只有少量移植植物内 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞浸润。然而,如果心脏移植植物在抗 C5mAb 加 CsA 处理受者排斥时存活得更长 (POD11) 以及在三重疗法处理受者移植植物存活早期 (例如 POD11),那么这些 T 细胞的数目略微增加。此外,在三重疗法组中用 CsA 连续处理,POD60 和 100 时在长期存活心脏移植植物中 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞浸润得到抑制。此外,在未处理和 CsA、CyP 或 CsA 加 CyP 处理的动物中,发现中度的移植植物内 Mac-1<sup>+</sup> 细胞浸润,包括单核细胞和巨噬细胞,而这些细胞的浸润在抗 C5mAb 处理的动物中显著减少 (表 2)。这些结果表明 :功能性阻断抗 C5mAb 使得免疫抑制剂能够发挥用途和功效,从而在预致敏受者中预防 ABMR 并实现无限期心脏移植植物存活。

[0161] 表 2.

[0162] 尸检时预致敏小鼠受者的心脏同种异体移植物的免疫过氧化物酶染色等级

[0163]

| 组 | 样品收集     | C3 | C5 | CD4 | CD8 | Mac-1 | IgG | IgM |
|---|----------|----|----|-----|-----|-------|-----|-----|
|   | 日期 (POD) |    |    |     |     |       |     |     |

|                 |     |    |    |    |    |    |    |    |
|-----------------|-----|----|----|----|----|----|----|----|
| 未处理             | 3   | 3+ | 3+ | 1+ | 1+ | 3+ | 4+ | 1+ |
| CsA             | 3   | 3+ | 3+ | 1+ | 1+ | 3+ | 4+ | 1+ |
| CyP             | 3   | 3+ | 3+ | 1+ | 1+ | 3+ | 3+ | 1+ |
| CsA+CyP         | 3   | 3+ | 3+ | 1+ | 1+ | 3+ | 3+ | 1+ |
| 抗 C5mAb         | 3   | 3+ | 0  | 1+ | 1+ | 2+ | 4+ | 1+ |
| 抗 C5mAb+CsA     | 11  | 3+ | 0  | 2+ | 2+ | 2+ | 4+ | 1+ |
| 抗 C5mAb+CyP     | 3   | 3+ | 0  | 1+ | 1+ | 2+ | 3+ | 1+ |
| 抗 C5mAb+CsA+CyP | 3   | 3+ | 0  | 1+ | 1+ | 2+ | 3+ | 1+ |
| 抗 C5mAb+CsA+CyP | 11  | 3+ | 0  | 2+ | 2+ | 1+ | 3+ | 1+ |
| 抗 C5mAb+CsA+CyP | 60  | 3+ | 0  | 1+ | 1+ | 0  | 2+ | 1+ |
| 抗 C5mAb+CsA+CyP | 100 | 3+ | 2+ | 0  | 0  | 0  | 2+ | 1+ |

[0164] 分级 :0, 阴性 ;1+, 不明确 ;2+, 弱 ;3+, 中等 ;4+, 强。

[0165] 抗 C5mAb 在接受心脏同种异体移植物的预致敏受者中完全抑制总补体溶血活性和局部 C5 沉积

[0166] 之前显示抗 C5mAb 阻断补体蛋白质 C5 断裂成促炎症分子 C5a 和 C5b-9 (Kxoshus 等人, 1995), 并完全且始终阻断小鼠的末端补体活性 (Wang 等人, 1999)。在目前研究中, 末端补体活性通过评价受者小鼠血清溶解抗体预致敏的鸡红细胞的能力来测量, 并在相同时间点比较 (POD3)。用 CsA 或 CyP 或两种药物组合处理小鼠对末端补体活性没有影响, 而用单独的抗 C5mAb 或其与 CsA 或 / 和 CyP 的组合处理则完全抑制这种活性 (图 3 ; $P < 0.01$ , 相对于原始和未处理动物, 以及 CsA、CyP 或 CsA 加 CyP 处理的动物)。此外, 在几个早期时间点从抗 C5mAb 处理的动物获得的血清显示类似降低的溶血活性, 这表明 :血清末端补体在整个治疗期被抑制。而且, 在抗 C5mAb 处理的预致敏受者中而非在未处理或 CsA、CyP 和 CsA 加 CyP 处理的预致敏动物中, 心脏移植中的局部 C5 沉积被完全防止 (表 2)。如所预测, 抗 C5mAb 处理没有防止在移植中的 C3 沉积 (表 2)。这些结果表明 :抗 C5 疗法完全阻断了高致敏受者心脏同种异体移植后的总补体活性。

[0167] 预致敏动物中长期存活的心脏移植耐受低水平抗供者抗体和补体存在下的体液损伤——适应状态

[0168] 为了进一步研究抗 C5mAb 在体液排斥中的作用, 在不同组中通过流式细胞术测量了受者血清中抗供者抗体水平, 使用免疫染色技术测定移植内的抗体沉积。图 4A 显示在 POD3 时未处理预致敏 BALB/c 受者具有高水平的循环抗供者 IgG 抗体。当接受单一疗法或 CsA 和 / 或 CyP 两种药物组合的预致敏受者部分下调循环抗供者 IgG 水平时, 用单独的抗 C5mAb 或其与 CsA 或 CyP 组合处理没有进一步影响同一天的抗供者抗体水平。相比之下, 使用抗 C5mAb、CsA 和 CyP 的三重疗法, 高水平的循环抗供者 IgG 逐渐被下调并在 POD60 时达到低水平, 此后保持这种水平直至第 100 天 (图 4B)。与不同处理组中循环抗体的水平类似, 表 2 显示 :强烈的抗小鼠 IgG 沉积存在于未处理或用单一疗法或两种药物组合疗法处理的预致敏动物的快速排斥的心脏移植中。有趣的是, 在三重疗法下, POD100 时 IgG 抗体沉积在长期存活心脏移植中逐渐减弱至轻微水平 (图 4C-a, 表 2)。在这种模型中, IgM 在处理或为处理预致敏受者的循环中 (图 4A, B) 或移植的心脏移植中 (图 4C-b, 表 2) 保持非常低的水平。此外, 抗 C5mAb 处理将补体活性消除至不可检测水平直至第 60 天, 接着在接受三重疗法的预致敏小鼠受者中中断抗 C5 疗法后, 于 POD100 时渐进恢复至预消耗水

平（图 4D）。此外，在 100 天存活的预致敏动物中也检测到移植物内 C5 沉积（表 2）。这些数据证明：尽管存在抗移植物抗体和补体激活，进行中的移植适应在三重疗法处理的预致敏受者中发生。

[0169] 抗 C5mAb 与 CsA 和 CyP 的组合在具有已适应移植物的受者中减少了 IgG1/IgG2a 比率并导致 IgG 亚类至 IgG2b 的转换

[0170] 为了检测是否基于抗 C5mAb 的三重疗法可诱导可与适应相关的 IgG 亚类的转换，在未处理受者和具有已适应心脏移植物受者之间比较了抗供者 IgG 亚类 IgG1、IgG2a 和 IgG2b 的血清水平。未处理受者的血清包含占优势的 IgG1 同种型，这通过 IgG1/IgG2a 的高比率所示（图 5A）。相比之下，在携带已适应移植物的受者中观察到 IgG1/IgG2a 比率显著下降（图 5A,  $P < 0.01$ ）。此外，与具有排斥移植物的相同受者比较，具有已适应心脏移植物的预致敏受者显示抗供者 IgG2b 水平增加（图 5B,  $P < 0.01$ ）。此外，在用单一疗法或两种药物组合处理的受者中，IgG 同种型的模式与未处理动物难以分辨。这些数据表明：抗供者 IgG1 同种型可与移植物排斥相关，而抗供者 IgG2b 亚类的产生可作为保护性抗体起作用，并且在诱导适应中起重要作用。

[0171] 抗 C5mAb 与 CsA 和 CyP 的组合诱导移植物内 Bcl-2 和 Bcl-x1 在高致敏小鼠受者中的表达

[0172] 为了确定在该模型中保护性蛋白的移植物内表达和对体液损伤的移植物抵抗之间是否存在因果关系，使用蛋白印迹分析来检测高致敏小鼠受者的心脏移植物组织中的目标蛋白质。于 POD100 时发现长期存活心脏移植物表达高水平的 Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白质，并且早在心脏移植后 12 天，在接受基于抗 C5mAb 的三重疗法的高致敏受者中检测到这些蛋白质（图 6）。相比之下，在未处理动物或用单一疗法或两种药物组合疗法处理的动物的心脏移植植物上没有 Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白表达（图 6）。该结果提示：在无限期存活动物中对体液损伤的移植物抵抗与该预致敏模型中 Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白提供的保护相关。

[0173] 具有适应中的第一心脏移植物的预致敏受者接受第二已适应的心脏移植物，但是排斥相同供者的第二原始心脏移植物

[0174] 已适应移植物抵抗排斥的能力还没有在其中原始移植物在同种异体移植后经历排斥的病理生理学条件下测定。在这种模型中，为了确定是否具有适应中的第一心脏移植物的预致敏受者将接受第二已适应的移植物但排斥第二原始移植物，进行了再移植试验。在已适应的 C3H 心脏移植物已存活至 100 天后，在所述时间点在用基于抗 C5mAb 的三重疗法处理的预致敏 BALB/c 受者中检测到低水平的同种抗体（图 4B）且补体活性已回到预处理水平（图 4D），使这些受者接受第二心脏移植物。具体而言，将原始的（图 7A）或来自另一个预致敏 BALB/c 受者的已适应 100 天的 C3H 心脏（图 7B）移植至携带适应中的第一 C3H 心脏的预致敏受者的颈部中。这些受者在  $6.6 \pm 1.1$  天以严重 AVR（图 8B-a）排斥第二原始心脏（图 8A），而第一个心脏继续存活。相比之下，当已经在不同预致敏小鼠中存活 100 天的已适应的心脏用作第二移植物时，这些移植物被携带适应中的第一心脏移植物的预致敏受者接受（图 8A）。在第二次移植后 90 天，在那些已适应的第二心脏移植植物中没有排斥征兆（图 8B-b）。这些数据表明：已适应的移植物对通常介导这些预致敏受者的同种异体移植物排斥的抗供者抗体和补体的效应变得有耐受性。此外，已适应移植物的宿主排斥新移植物的事实表明：适应包括对移植物的改变。

[0175] 用 CsA 处理的预致敏受者排斥已适应的心脏移植物

[0176] 进行另一再移植以确定是否在该预致敏模型中的适应是由移植物和 / 或受者的改变引起。具体而言,在 C3H 心脏移植物已在预致敏 BALB/c 小鼠中适应 100 天后,然后将已适应的心脏移植物再移植至用单独 CsA 处理的第二个预致敏 BALB/c 受者中(图 7C),这是能预防细胞排斥但不能预防新鲜 C3H 心脏在预致敏受者中加速性体液排斥的疗法。已适应的 C3H 心脏移植物在 CsA 处理的预致敏 BALB/c 受者中被迅速排斥。再移植后,已适应的心脏移植物的病理学从正常(图 9A)改变至具有大量间质出血但很少细胞浸润的严重 ACHR(图 9B)。此外,在这些接受已适应的 C3H 心的受者中,高水平的抗供者 IgG 和正常水平的补体溶血活性与接受原始 C3H 心脏的 CsA 处理的预致敏受者的那些类似。该结果进一步表明:由基于抗 C5mAb 的三重疗法诱导的适应可起源于涉及不仅移植物而且受者的改变的机理。

### [0177] 实施例 3

[0178] 心脏移植模型中的急性血管排斥

[0179] 进行了试验来确定是否包括末端补体形成抑制剂将减弱急性血管排斥以及是否使用这种抑制剂与免疫抑制剂的组合将实现长期同种异体移植物存活。在这组试验中,抗 C5 单克隆抗体与环孢菌素组合使用。所用模型是从 C3H 小鼠至 BALB/c 小鼠的同种异体移植物异位心脏移植。该模型是严格的急性血管排斥模型,其中 C3H 和 BALB/c 小鼠是强 MHC 错配的。如 Wang 等人(2003)所述进行移植和其他方法。

[0180] 异位心脏移植

[0181] 如先前 Wang 等人(2003)所述进行腹部内异位心脏移植。简言之,对供者进行正中胸骨切开术,通过下腔静脉和主动脉用 1.0ml 冷肝素化林格乳酸盐溶液缓慢地原位灌注心脏移植物,然后结扎并分开上腔静脉和肺静脉。横切升主动脉和肺动脉,从供者中移除移植物。然后使用 11-0 尼龙缝线以端-至-侧吻合在供者肺动脉与受者下腔静脉以及供者主动脉和受者腹主动脉之间进行移植物的血管再通。通过直接腹部触诊,每天监控移植心脏的跳动。脉动的程度评分为:A,搏动强烈;B,脉动强度显著下降;或 C,心脏搏动完全停止。当心脏搏动不再可触知时,除去移植物用于常规组织学检查。在某些情况中,将其中移植物仍起作用的小鼠处死以进行组织学检查。

[0182] 结果

[0183] 将小鼠(重量 25-30g 的雄性 8-12 周龄小鼠)分成六个试验组,每组六至八只小鼠。在第 0 天时进行移植。在终点(终点是移植物衰竭)或在移植物衰竭前处死小鼠的一些情况下检查组织学改变。从先前研究已知所施用 BB5.1 剂量(40mg/kg 体重,每周三次),以完全抑制末端补体活性。

[0184] 组 1' (对照)-小鼠在第 -1、0、1 和 2 天腹膜内施用 0.75mL 盐水。随后这些小鼠用 0.75mL 盐水腹膜内处理,每周三次(星期一、星期三、星期五)直至终点。

[0185] 组 2' (单独环孢菌素 A)-小鼠每天皮下施用 15mg/kg 体重的环孢菌素 A,从第 0 天开始(移植当天)直至终点。

[0186] 组 3' (单独抗补体抗体)-小鼠在第 -1、0、1 和 2 天以 40mg/kg 体重腹膜内施用抗小鼠 C5 抗体 BB5.1(Frei 等人,1987),然后以 40mg/kg 体重每周三次施用(星期一、星期三、星期五)直至终点。

[0187] 组 4' (抗补体抗体直至移植后第 14 天 + 环孢菌素 A) - 小鼠在第 -1 天至第 14 天以 40mg/kg 体重静脉内施用抗小鼠 C5 抗体 BB5.1, 同时每天以 15mg/kg 体重施用环孢菌素 A, 从第 0 天开始直至终点。注意这与其他组不同, 因为 BB5.1 是静脉内且每天施用。

[0188] 组 5' (抗补体抗体直至移植后第 28 天 + 环孢菌素 A) - 小鼠在第 -1、0、1 和 2 天以 40mg/kg 体重腹膜内施用抗小鼠 C5 抗体 BB5.1, 然后以 40mg/kg 体重每周三次施用 (星期一、星期三、星期五) 直至第 28 天, 同时每天以 15mg/kg 体重施用环孢菌素 A, 从第 0 天开始直至终点。

[0189] 组 6' (抗补体抗体长期直至第 100 天 + 环孢菌素 A) - 小鼠在第 -1、0、1 和 2 天以 40mg/kg 体重腹膜内施用抗小鼠 C5 抗体 BB5.1, 然后以 40mg/kg 体重每周三次施用 (星期一、星期三、星期五) 直至第 100 天, 同时每天以 15mg/kg 体重施用环孢菌素 A, 从第 0 天开始直至第 100 天。

[0190] 该试验的结果在表 3 和 4 中所示。表 3 显示移植物的存活时间。表 4 列出组织学评分。

[0191] 表 3

[0192] 同种异体移植植物存活

[0193]

| 组 (处理)                           | 个体存活 (天数)                   | 平均存活时间 (天数) |
|----------------------------------|-----------------------------|-------------|
| 1' . 盐水                          | 8、8、8、8、9                   | 8.3 ± 0.5   |
| 2' . 环孢菌素 A                      | 14、15、15、16、16、16、17        | 15.5 ± 1.1  |
| 3' . BB5.1                       | 7、8、8、8、8、9                 | 8.0 ± 0.6   |
| 4' . BB5.1 直至第 14 天<br>+ 环孢菌素 A  | 35、38、43、45、46、47           | 42.3 ± 4.8  |
| 5' . BB5.1 直至第 28 天<br>+ 环孢菌素 A  | 77、80、80、81、82              | 80 ± 1.9    |
| 6' . BB5.1 直至第 100 天<br>+ 环孢菌素 A | >100 天 (7 只小鼠 ; 1 只处死用于组织学) | >100 天      |

[0194] 表 4

[0195] 尸检时心脏同种异体移植物的组织学改变的中值评分

[0196]

| 组                                     | Vasc * | Infar | Lymph | Throm | Hemo | Fibrin | PMN |
|---------------------------------------|--------|-------|-------|-------|------|--------|-----|
| 1' . 盐水 (终点)                          | 3.0    | 3.0   | 1.0   | 4.0   | 3.0  | 3.0    | 3.0 |
| 2' . 环孢菌素 A (终点)                      | 2.0    | 1.0   | 2.0   | 3.0   | 2.0  | 2.0    | 3.0 |
| 3' . BB5.1 (终点)                       | 2.0    | 1.0   | 2.0   | 2.0   | 1.0  | 0.0    | 0.0 |
| 4' . BB5.1 直至第 14 天<br>+ 环孢菌素 A       | N/A    | N/A   | N/A   | N/A   | N/A  | N/A    | N/A |
| 5' . BB5.1 28 天 +<br>环孢菌素 A (术后第 8 天) | 0.0    | 0.0   | 0.0   | 0.0   | 0.0  | 0.0    | 0.0 |
| 5' . BB5.1 28 天 +<br>环孢菌素 A (终点)      | 0.0    | 0.0   | 1.0   | 1.0   | 2.0  | 1.0    | 0.0 |

|                          |     |     |     |     |     |     |     |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 6' . BB5.1 直至第 100 天 + 环 |     |     |     |     |     |     |     |
| 孢菌素 A( 术后第 100 天 )       | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

[0197] 中值评分 :0- 正常 ;1- 变化极小 ;2- 变化轻微 ;3- 变化中度 ;4- 变化明显。N/A- 不可得到。

[0198] \* Vasc- 血管炎 ;Infar- 梗塞 ;Lymph- 淋巴细胞浸润 ;Throm- 血栓形成 ;Hemo- 出血 ;Fibrin- 纤维蛋白沉积 ;PMN- 多形核细胞浸润

[0199] 结果显示了除免疫抑制剂外使用补体抑制药物的协同效应。在未处理小鼠中, 移植物在约 8 天排斥。长期每天使用单独的免疫抑制剂环孢菌素 A 导致移植物存活增加直至约移植后 15 天。使用抗 C5 抗体 BB5.1 抑制末端补体生成对其本身没有任何影响, 如在对照组中移植物排斥在移植后第 8 天发生 ( 组 1' )。BB5.1 通过移植后第 28 天加环孢菌素 A 的组合显示了协同效应, 移植物存活延长直至约第 80 天。更令人惊奇的结果是组 5' 的结果, 其中移植后 BB5.1 和环孢菌素 A 各自长期施用。在这种情况下, 移植物存活超过 100 天 ( 目前可用的尽可能多的数据 )。此外, 表 4 中所示的组织学结果表明 : 同时施用 BB5.1 和环孢菌素 A 保护了移植物不改变, 比单独 BB5.1 或环孢菌素 A 更成功, 且长期施用 BB5.1 和环孢菌素 A 保护移植物以使其甚至在移植后第 100 天在植入的心脏中没有观察到组织学改变。在这些模型中 100 天的存活时间被视为是最佳标准。在这种模型中存活 100 天被认为表明了同种异体移植物将无限期存活。当 BB5.1 施用在第 28 天后停止时, 移植物受到保护, 但是大约第 80 天时, 它们确实开始显示一些极小至轻微的组织学变化, 此时移植物衰竭发生。

[0200] 组 4' 小鼠的处理不同, 因为它们每天静脉内施用 BB5.1。这些动物变得患病, 显示体重减轻和尿潴留, 并在移植的心脏仍跳动但它们的功能已经下降时处死。这是研究的第一组小鼠, 但为何观察到这些不良作用并不清楚。当以每周三次的方案腹膜内施用 BB5.1 时, 未观察到这些不良作用。如以下实施例 4 中所述, 经由腹膜内途径每天施用 BB5.1 不会导致不良作用。而且, 静脉内施用并不必然是这些动物患病的原因。在 PNH 的研究中, 已经成功地静脉内施用依库珠单抗 (BB5.1 的人等效抗体, 因为其结合于人 C5), 而对人没有不良作用 (Hillmen 等人, 2004)。补体抑制剂可通过除静脉内和腹膜内之外的其他途径施用, 其中所有这些途径为本领域技术人员公知。

#### [0201] 实施例 4

[0202] 在预致敏心脏移植模型中的加速排斥

[0203] 进行类似于实施例 3 的第二组试验, 但是受者小鼠对供者器官预致敏。在这些试验中, 通过预先移植皮肤移植物引起预致敏。通常, 预致敏不仅可因为已接受早期同种异体移植物发生, 而且可因已接受多次血液输注或在已妊娠的妇女中引起。除这类预致敏方法之外, ABO 错配的同种异体移植物将由于预先形成的 ABO 抗原的抗体而被迅速攻击并排斥, 除非采取步骤来预防这种攻击。

[0204] 对这些研究中的一些小鼠除 BB5.1 和 / 或环孢菌素 A 之外施用环磷酰胺。对于这些试验, 在从相同供者心脏移植之前一周, 用 C3H 皮肤移植物使 BALB/c 受者小鼠预致敏 ( 使用 Pruitt 和 Bollinger, 1991 的方法 )。该模型设计用于模拟尤其是与加速性体液排斥相关的人预致敏移植。将受者小鼠分成八组, 每组六至八只小鼠。处理如下。

[0205] 组 1 " (对照)-小鼠 (重量 25-30g 的雄性 8-12 周龄小鼠) 每天腹膜内施用 0.75mL 盐水, 从第 -1 天开始并持续直至终点 (移植排斥)。

[0206] 组 2 " (单独环孢菌素 A)-小鼠以 15mg/kg 体重的剂量皮下施用环孢菌素 A, 从第 0 天开始 (移植当天) 直至终点。

[0207] 组 3 " (单独 BB5.1)-小鼠每天以 40mg/kg 体重的剂量腹膜内递送施用抗小鼠补体单克隆抗体 BB5.1, 从第 -1 天开始并持续直至终点。

[0208] 组 4 " (单独环磷酰胺)-小鼠在第 0 天和 1 天以 40mg/kg 体重的剂量静脉内施用环磷酰胺。

[0209] 组 5 " (BB5.1 加环孢菌素 A)-小鼠每天以 40mg/kg 体重的剂量腹膜内施用 BB5.1, 从第 -1 天开始并持续直至终点。这些小鼠每天以 15mg/kg 体重的剂量皮下另外施用环孢菌素 A, 从第 0 天开始并持续直至终点。

[0210] 组 6 " (BB5.1 加环磷酰胺)-小鼠每天以 40mg/kg 体重的剂量腹膜内施用 BB5.1, 从第 -1 天开始并持续直至终点。这些小鼠另外在第 0 天和 1 天以 40mg/kg 体重的剂量静脉内施用环磷酰胺。

[0211] 组 7 " (环孢菌素 A 加环磷酰胺)-小鼠每天以 15mg/kg 体重的剂量皮下施用环孢菌素 A, 从第 0 天直至终点。这些小鼠另外在第 0 天和 1 天以 40mg/kg 体重的剂量静脉内额外施用环磷酰胺。

[0212] 组 8 " (BB5.1 加环孢菌素 A 加环磷酰胺)-小鼠每天以 40mg/kg 体重的剂量腹膜内施用 BB5.1, 从第 -1 天开始并持续直至第 100 天。同时这些小鼠每天以 15mg/kg 体重的剂量皮下施用环孢菌素 A, 从第 0 天直至第 100 天。这些小鼠另外在第 0 天和 1 天以 40mg/kg 体重的剂量静脉内施用环磷酰胺。该组的两只小鼠在第 60 天处死用于组织学研究 (还未发生排斥), 直至第 100 天四只剩余的小鼠还未排斥它们的移植物。

[0213] 另外, 测试了对照组小鼠, 其未经预致敏且仅如组 1 " 接受盐水处理。

[0214] 这些试验的结果如表 5 和表 6 所示。表 5 列出移植物的存活时间, 表 6 总结组织学结果。

[0215] 表 5

[0216] 同种异体移植存活

[0217]

| 组 (处理)                        | 个体存活 (天数)               | 平均存活时间 (天数) |
|-------------------------------|-------------------------|-------------|
| 未预致敏                          | 8、8、8、8、9               | 8.3±0.5 *   |
| 1 " . 皮肤预致敏                   | 3、3、3、3、3、4             | 3.1±0.4     |
| 2 " . 环孢菌素 A                  | 3、3、3、3                 | 3.0±0.0     |
| 3 " . BB5.1                   | 3、3、4、4                 | 3.5±0.6     |
| 4 " . 环磷酰胺                    | 3、3、3、4                 | 3.3±0.5     |
| 5 " . BB5.1+ 环孢菌素 A           | 10、10、11、11、12、12、14、15 | 11.9±1.8 ** |
| 6 " . BB5.1+ 环磷酰胺             | 3、3、3、3、3、4             | 3.2±0.4     |
| 7 " . 环孢菌素 A+ 环磷酰胺            | 3、3、3、4、4、4             | 3.5±0.6     |
| 8 " . BB5.1+ 环孢菌素 A<br>+ 环磷酰胺 | >100 天 (4 只小鼠)          | >100 ***    |

[0218] \* P<0.01 组 1 " 相对于未预致敏

[0219] \*\* P<0.01 组 5 " 相对组 1' -4 " 和 6 " -7 "。

[0220] \*\*\*  $P < 0.01$  组 8 " 相对组 1 " -7 "。

[0221] 表 6

[0222] 尸检时心脏同种异体移植物的组织学改变的中值评分

[0223]

| 组                                          | Vasc * | Infar | Lymph | Throm | Hemo | Fibrin | PMN |
|--------------------------------------------|--------|-------|-------|-------|------|--------|-----|
| 未预致敏 ( 终点 )                                | 3.0    | 3.0   | 1.0   | 4.0   | 3.0  | 3.0    | 3.0 |
| 1 " . 皮肤预致敏 ( 终点 )                         | 0.0    | 4.0   | 1.0   | 4.0   | 3.0  | 0.0    | 0.0 |
| 2 " . 环孢菌素 A ( 终点 )                        | 0.0    | 4.0   | 0.0   | 3.0   | 3.0  | N/A    | N/A |
| 3 " . BB5.1 ( 终点 )                         | 2.0    | 2.0   | 2.0   | 2.0   | 3.0  | N/A    | N/A |
| 4 " . 环磷酰胺 ( 终点 )                          | 2.0    | 4.0   | 0.0   | 3.0   | 2.0  | N/A    | N/A |
| 5 " . BB5.1+ 环孢菌素 A<br>( 术后第 3 天 )         | 0.0    | 1.0   | 1.0   | 0.0   | 0.0  | 0.0    | 0.0 |
| 5 " . BB5.1+ 环孢菌素 A ( 终点 )                 | 2.0    | 2.0   | 2.0   | 2.0   | 2.0  | 0.0    | 0.0 |
| 6 " . BB5.1+ 环磷酰胺 ( 终点 )                   | 1.0    | 3.0   | 0.0   | 3.0   | 2.0  | N/A    | N/A |
| 7 " . 环孢菌素 A+ 环磷酰胺 ( 终点 )                  | 0.0    | 1.0   | 1.0   | 2.0   | 3.0  | N/A    | N/A |
| 8 " . BB5.1+ 环孢菌素 A+ 环磷酰胺<br>( 术后第 3 天 )   | 0.0    | 0.0   | 1.0   | 0.0   | 0.0  | N/A    | N/A |
| 8. BB5.1+ 环孢菌素 A+ 环磷酰胺<br>( 术后第 12 天 )     | 0.0    | 0.0   | 1.0   | 0.0   | 0.0  | N/A    | N/A |
| 8 " . BB5.1+ 环孢菌素 A+ 环磷酰胺<br>( 术后第 60 天 )  | 0.0    | 0.0   | 1.0   | 0.0   | 0.0  | N/A    | N/A |
| 8 " . BB5.1+ 环孢菌素 A+ 环磷酰胺<br>( 术后第 100 天 ) | N/A    | N/A   | N/A   | N/A   | N/A  | N/A    | N/A |

[0224] 中值评分 :0- 正常 ;1- 变化极小 ;2- 变化轻微 ;3- 变化中度 ;4- 变化明

[0225] 显。N/A- 不可得到。

[0226] \* Vasc- 血管炎 ;Infar- 梗塞 ;Lymph- 淋巴细胞浸润 ;Throm- 血栓形成 ;Hemo- 出血 ;Fibrin- 纤维蛋白沉积 ;PMN- 多形核细胞浸润

[0227] 表 5 所示的结果表明了预致敏小鼠模型与如实施例 3 所用的未预致敏小鼠模型之间的差异。该结果表明 :不存在预致敏时,在没有用任何药物处理时移植物在约 8 天内排斥。将动物预致敏则引起更快速的排斥,在没有任何药物处理时,预致敏动物的移植物在约 3 天内排斥。用单独的 BB5.1、环孢菌素 A 或环磷酰胺处理对移植物存活没有效应,在每一这些动物组中移植物在约 3-4 天内排斥。BB5.1 和环孢菌素 A 的组合显示了一些效应,排斥在约第 12 天发生。BB5.1 和环磷酰胺的组合显示没有保护性效应,排斥在约第 3 天发生。类似地,环孢菌素 A 和环磷酰胺的组合基本上没有保护性效应,排斥在第 3-4 天发生。非常令人惊奇的是,所有三种药物的组合 ( 长期施用 BB5.1 和环孢菌素加上在移植时施用环磷酰胺 ) 显示了高度协同效应,所有小鼠存活超过 100 天。同样,在该模型中存活 100 天被认为是最佳标准且假设是无限期存活。

[0228] 这些结果以及表 6 中所示的组织学结果表明 :补体抑制剂和免疫抑制剂如环孢菌素 A 的长期组合处理在治疗预致敏小鼠中导致加速性排斥的少许减弱。另外用环磷酰胺在

移植时及移植后第 1 天处理这些动物导致存活更长的时间,至少在第 100 天没有观察到排斥。

#### [0229] 实施例 5

[0230] 预致敏 BALB/c 受者中 C3H 肾同种异体移植屈服于 ABMR

[0231] 开发了一种新的小鼠 ABMR 模型,其具有准确模拟高预致敏患者中肾同种异体移植临床环境的特征。受者 BALB/c 小鼠用完全同种异体的 C3H 供者皮肤移植物进行预致敏。预致敏后,循环抗供者 IgG 水平显著提高,在皮肤移植后七天达到峰水平(图 10A)。此时,将来自相同供者系(C3H)的肾同种异体移植物移植至预致敏受者;这些移植物在所有动物中于第  $8.5 \pm 1.3$  天快速排斥(图 11A)。被排斥的移植物显示与加速性体液排斥一致的组织学特征,包括 1) 间质中血管炎、出血和水肿以及肾小球和肾小管坏死的迹象(图 10B-a); 2) 广泛的移植物内 IgG(图 10B-c)、C3(图 10B-e)和 C5(图 10B-g)沉积;3) 术后同一天评价时,循环抗供者 IgG 水平比未预致敏受者中观察到的显著更高( $p < 0.01$ ;图 10C);4) 补体活性的正常水平(图 10D)和 5) 大量的 Mac-1<sup>+</sup> 细胞、包括单核细胞和巨噬细胞的移植物内浸润(图 10B-i)。相比之下,在第  $55.2 \pm 5.6$  天内未预致敏 BALB/c 小鼠排斥 C3H 肾移植物,在 POD8 时显示正常移植物组织学(图 10B-b),没有可检测的 IgG 沉积(图 10B-d)、很少或没有 Mac-1<sup>+</sup> 细胞浸润(图 10B-j)以及仅有轻微的 C3(图 10B-f)和 C5(图 10B-h)沉积。用供者皮肤预致敏并未增加循环抗供者 IgM 水平(图 10C)或血清补体活性(图 10D)。这些数据提示:这种新型肾同种异体移植物模型提供了研究补体在高预致敏受者的抗体介导的肾同种异体移植物排斥中的潜在作用的极好工具。

[0232] 抗 C5mAb 与 CsA 和 LF 的组合在预致敏小鼠受者中预防 ABMR 并且实现无限期肾同种异体移植物存活

[0233] 在开发该模型期间进行的初始试验评价了 CsA 和环磷酰胺(CyP)在延长肾移植物存活中的免疫抑制效应。然而,CyP 处理与明显的肾毒性相关,阻止了进一步评价(数据未显示)。用 LF 简短处理与肾毒性不相关,进一步的模型构建使用这种试剂作为试验性免疫抑制方案的一部分。

[0234] 对于是否单独或与 CsA 和短期 LF 处理组合的抗 C5mAb 能够防止接受肾同种异体移植物的预致敏小鼠受者的 ABMR 进行了评价。如图 11A 所示,在用 CsA 或 LF 单一疗法或用两种药物组合处理的预致敏受者中的移植物分别在第  $9.3 \pm 2.5$  天、 $6.0 \pm 1.0$  天和  $11.7 \pm 2.1$  天被排斥。此外,抗 C5mAb 单一疗法或抗 C5 与 CsA 或 LF 的组合不能提高移植物存活,排斥分别在第  $7.0 \pm 1.0$  天、 $7.0 \pm 1.0$  天和  $8.3 \pm 3.2$  天发生(图 11A)。这些被排斥的肾移植物也产生了典型的抗体介导的体液排斥的病理学特征(数据未显示),排斥模式事实上与在未处理预致敏 BALB/c 受者中观察到的相同(图 10B-a)。相比之下,由抗 C5mAb、CsA 和短期 LF 处理组成的三重疗法有效地防止了移植物排斥,并实现了预致敏动物中 >100 天的无限期肾同种异体移植物存活(图 11A)。进一步,长期存活的肾移植物验证了正常肾功能,如血清肌酸酐水平在正常范围内所示(图 11B; $p < 0.01$ ,相对于与未处理小鼠或用 CsA 或 LF 单一疗法或两种药物组合处理的那些小鼠)。在 POD100 时,在三重疗法处理的预致敏受者中的肾同种异体移植物具有正常的组织学(图 11C-a),没有可检测的 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 或 Mac-1<sup>+</sup> 细胞浸润(图 11C-b、c、d)。此外,大量的移植物内 Mac-1<sup>+</sup> 细胞浸润在未处理和 CsA、LF 或 CsA 加 LF 处理的动物中发现,而这些细胞的浸润在抗 C5mAb 处理的动物中显著减少

(表 7)。这些结果表明:用功能性阻断抗 C5mAb 以及 CsA 和短期 LF 处理可防止高致敏受者中的 ABMR 并允许无限期肾同种异体移植物存活。

[0235] 抗 C5mAb 处理完全抑制了接受肾同种异体移植物的预致敏受者中的末端补体活性和局部 C5 沉积

[0236] 为了确定抗 C5mAb 处理在该模型中的全身和局部效力,如通过体外血清溶血测定法测量,评价了在相同时间点时 (POD7) 不同治疗组的小鼠中的补体活性。用 CsA 或 LF 或两种药物组合处理小鼠,对末端补体活性没有抑制效应,然而用单独抗 C5mAb 或其与 CsA 和 / 或 LF 的组合处理则完全抑制了血清补体活性 ( $p < 0.01$ , 相对于原始小鼠、未处理预致敏小鼠或 CsA、LF 或 CsA 加 LF 处理的动物) (图 12)。在 POD60 停止处理后,到 POD100 时补体溶血活性恢复至正常水平 (图 12)。此外,局部 (移植物内) C5 沉积在抗 C5mAb 处理的预致敏受者中被完全阻止,但是在未处理或 CsA、LF 以及 CsA 加 LF 处理的预致敏动物中明显 (表 7)。如所预测,抗 C5mAb 疗法并未阻止移植物内 C3 沉积 (表 7)。这些结果表明:抗 C5mAb 疗法完全阻断了末端补体活性,但是保存预致敏受者同种异体肾移植后的早期补体组份。

[0237] 长期存活的肾移植物通过适应抵抗预致敏受者中的体液损伤

[0238] 为了研究是否这些肾移植物的长期存活与适应的发展相关,测量了排斥时不同处理组小鼠的循环抗供者抗体水平、血清补体活性和移植物内抗体与补体沉积。未处理的、预致敏的 BALB/c 受者产生高水平的循环抗供者 IgG 抗体 (图 13A), 其在用单独 CsA 或 LF 或其组合处理后部分降低。将抗 C5 添加至 CsA 或 LF 单一疗法并没有进一步减弱抗供者抗体水平。在抗 C5mAb、CsA 和 LF 的三重疗法下,循环抗供者 IgG 水平被显著抑制,并且在 POD100 时保持低水平 ( $* p < 0.01$ , 相对于未处理预致敏动物或用单一疗法或两种药物组合处理的那些动物)。然而,这种低抗体水平仍高于原始动物 ( $** p < 0.05$ , 相对于用三重疗法处理的预致敏动物)。与处理对循环抗供者抗体水平的效应一致,在未处理预致敏受者或接受 CsA 或 LF 单一疗法或两种药物组合的那些受者中观察到显著的移植物内 IgG 沉积 (表 7)。有趣的是,在 POD100 时,三重疗法处理动物的长期存活肾移植物也验证了轻微的 IgG 沉积 (图 11C-e, 表 7)。此外,在预致敏动物的存活 100 天的肾移植物中检测到 C3 和 C5 的轻微至中等沉积 (图 11C-f、g, 表 7)。无论是否处理,在所有预致敏受者中循环 (图 13A) 或移植的肾移植物 (表 7) 中的抗供者 IgM 保持低水平。总之,这些数据证明:基于抗 C5mAb 的三重疗法预防 ABMR, 尽管存在可验证的移植物内 IgG 和补体沉积,提示通过适应过程已实现长期移植物存活。

[0239] 在携带已适应肾移植物的长期存活预致敏受者中 IgG 亚类转换至 IgG2b

[0240] 为了确定是否基于抗 C5mAb 的三重疗法与 IgG 亚类的转换相关,在未处理预致敏受者与携带已适应肾移植物的受者的抗供者 IgG 亚类的血清水平之间进行比较。未处理预致敏受者的血清包含占优势的 IgG1、IgG2a 和 IgG3 抗供者抗体 (图 13B)。在用 CsA、LF 或两种药物组合处理的预致敏受者中观察到相同的模式 (数据未显示)。相比之下,在携带已适应移植物的预致敏受者中 (POD100), 主要的抗供者 IgG 亚类是 IgG2b (图 13B,  $p < 0.01$ )。这些数据提示抗供者 IgG2b 抗体的产生可能与移植物适应的诱导相关。

[0241] 保护性蛋白质 Bcl-2 和 Bcl-x1 在已适应的肾移植物上表达

[0242] 假设已适应的移植物对低水平同种抗体和补体的耐受性可能与保护性蛋白质如 Bcl-x1 和 Bcl-2 的移植物内表达相关, 先前报道所述蛋白质在异种移植模型的已适应移植

物的脉管系统中上调 (Bach 等人, 1997)。在接受基于抗 C5mAb 的三重疗法的预致敏受者中评价了这些蛋白质的表达。在 POD100 时, 来自用基于抗 C5mAb 的三重疗法处理的预致敏受者的已适应的肾移植物表达高水平的 Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白质 (图 14)。相比之下, 这些蛋白质的表达在未处理预致敏动物 (图 14) 或用 CsA 或 LF 单一疗法或两种药物组合处理的预致敏动物 (数据未显示) 的被排斥的肾移植物中检测不到。这些结果提示: 已适应的移植物对这些预致敏动物的体液损伤的耐受性可能与 Bcl-2 和 Bcl-x1 蛋白质提供的保护相关。

[0243] 表 7

[0244] 尸检时在预致敏小鼠受者的肾同种异体移植物的免疫过氧化物酶染色<sup>\*</sup>

[0245]

| 组              | IgG | IgM | C3 | C5 | Mac-1 |
|----------------|-----|-----|----|----|-------|
| 未处理            | 4+  | 1+  | 3+ | 3+ | 4+    |
| CsA            | 4+  | 1+  | 3+ | 3+ | 4+    |
| 抗 C5mAb        | 4+  | 1+  | 3+ | 0  | 2+    |
| LF             | 3+  | 1+  | 3+ | 3+ | 4+    |
| 抗 C5mAb+CsA    | 4+  | 1+  | 3+ | 0  | 2+    |
| 抗 C5mAb+LF     | 3+  | 1+  | 3+ | 0  | 2+    |
| CsA+LF         | 3+  | 1+  | 3+ | 3+ | 4+    |
| 抗 C5mAb+CsA+LF | 2+  | 1+  | 3+ | 2+ | 0     |

[0246] <sup>\*</sup> 移植物在排斥时或移植后 POD100 时 (对于三重疗法组) 收集。染色强度评分如下: 0, 阴性; 1+, 不明确; 2+, 弱; 3+, 中等; 4+, 强。

[0247] 实施例 6

[0248] 实施例 5 的方法

[0249] 动物: 选择重量 25-30g 的雄性成年 C3H(H-2<sup>k</sup>) 小鼠和 BALB/c(H-2<sup>d</sup>) 小鼠 (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine) 分别作为供者和受者。将动物在常规条件下饲养于西安大略大学的实验动物中心, 并且依照由 Canadian Council on Animal Care 建立的指导方针照料。

[0250] 皮肤预致敏: 取自 C3H 供者的全层皮肤移植物被切成 1×1cm<sup>2</sup> 的方块, 并移植至 BALB/c 受者的背部。排斥定义为皮肤移植物的完全坏死。

[0251] 同位肾移植: 皮肤预致敏后七天, 使用 11-0 尼龙缝线、通过将供者与受者主动脉、供者肾动脉与受者下腔静脉吻合, 将 C3H 小鼠肾移植至预致敏 BALB/c 受者的腹部。使用 10-0 缝线还将供者输尿管缝合至受者膀胱。移植后立即摘除原始肾脏。导致宿主死亡的移植排斥用作肾移植物排斥的终点。

[0252] 试验组: 将预致敏受者随机分成八组, 每组由五只动物组成: 组 1, 未处理小鼠; 组 2, 用 CsA 处理的小鼠 (15mg/kg/ 天, s. c, 从第 0 天至研究终点 (移植物排斥或术后天数 (POD) 100); 组 3, 用抗 C5mAb 处理的小鼠 (克隆 BB5.1, Alexion Pharmaceuticals, Inc., 40mg/kg/ 天, i. p., 第 0-14 天每天, 然后每周两次直至第 60 天); 组 4, 用 LF15-0195 处理的小鼠 (LF, 2mg/kg/ 天, s. c, 第 0-14 天); 组 5, 用抗 C5mAb 加 CsA 处理的小鼠; 组 6, 用抗 C5mAb 加 LF 处理的小鼠; 组 7, 用 CsA 加 LF 处理的小鼠; 组 8, 用抗 C5mAb、CsA 和 LF 组成的三重疗法处理的小鼠。在排斥时, 移除移植物用于常规组织学、免疫组织化学和蛋白印迹分析, 并收集血清样品用于评价抗供者抗体水平和补体活性。

[0253] 测量血清肌酸酐:肾移植后,在研究终点时(排斥时间或 POD100)获得血清样品。使用 Sigma Diagnostics (Sigma, St. Louis, MO) 程序在 10  $\mu$  L 样品中定量血清肌酸酐水平,所述程序通过 Jaffe 反应的动态修正测量肌酸酐 (Junge 等人, 2004)。

[0254] 移植组织学:尸检时,处理组织样品用于苏木精和曙红 (H&E) 染色 (Wang 等人, JI2003), 并评价血管炎、血栓形成、出血和淋巴细胞浸润;改变评分为:0, 没有;1, 极小;2, 轻微;3, 中度或 4, 与正常组织比较明显。

[0255] 免疫组织化学:将嵌在 Optimum Cutting Temperature (O. C. T.) 凝胶 (Skura Finetek, Torrance, CA) 中的组织样品切片,并使用 Elite Vectastain ABC 试剂盒 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) 用于 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> 和 Mac-1<sup>+</sup> 浸润细胞以及用于 IgG、IgM、C3 和 C5 沉积染色。初级生物素化抗体包括抗 CD4 (YTS191.1.2, Cedarlane Laboratories Ltd., Homby, Ontario, 加拿大)、抗 CD8 (53-6.7, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 和抗 Mac-1 (Cedarlane)。移植体内 IgG 和 IgM 沉积使用生物素化的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗小鼠 IgM (Cedarlane) 检测。在用山羊抗小鼠 C3 或抗小鼠 C5 多克隆 Abs (Quidel, San Diego, CA)、生物素化兔抗山羊 IgG (Vector Laboratories) 和 HRP 缀合的链霉抗生物素蛋白 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) 系列孵育后,检测补体沉积。通过略去初级抗体进行阴性对照。使用每一试验组五只动物的组织样品,在每个切片的五倍高倍视野下对免疫染色评分。根据染色强度将免疫反应性从 0 至 4+ 分级:0, 阴性;1+, 不明确;2+, 弱;3+, 中度;和 4+, 非常强染色。

[0256] 流式细胞术:通过流式细胞术评价受者血清中的循环抗供者特异性 IgG 和 IgM 抗体。简言之,分离 C3H 小鼠脾细胞并在 37°C 与在指定时间点从各处理组小鼠中获得的血清样品孵育 30 分钟。为染色总 IgG 或特异性抗体亚类,将洗涤的细胞在 4°C 与对小鼠 IgG、小鼠 IgG1、小鼠 IgG2a、小鼠 IgG2b 或小鼠 IgG3 的 Fc 部分有特异性的 FITC 缀合的山羊抗小鼠抗体(所有来自 (CALTAG Laboratories, Burlingame, CA)) 或对小鼠 IgM 有特异性的藻红蛋白缀合的山羊抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) 孵育 1 小时,洗涤,在 FACSscan 流式细胞计数器上分析 (Becton Dickinson, Mountain View, CA) (Collins 等人, 1999; Pratt 等人, 1996)。结果表示为平均通道荧光强度,其作为样品中每一抗供者同种型的水平的量度。

[0257] 补体溶血测定:如先前描述,通过标准方法确定受者小鼠血清的末端补体活性,以评价血清溶解用红细胞特异性抗体预致敏的鸡红细胞的能力 (Wang 等人, 1999)。

[0258] 蛋白印迹分析:对冷冻的肾样品超声,通过电泳法分离,并转移至聚偏氟乙烯 (PVDF; Invitrogen) 膜。分别使用多克隆血清 N-19 和 M-125 (SantaCruz Biotechnology, Inc.) 检测 Bcl-2 和 Bcl-X<sub>S/L</sub> 的移植体内表达。多克隆抗集钙蛋白 (Calbiochem) 用作样品载荷对照 (Kobayashi 等人, 1999)。抗体结合通过辣根过氧化物酶缀合的山羊抗兔 IgG 和增强的化学发光显像检测 (Roche Laboratories) (Arp 等人, 1996)。

[0259] 统计分析:数据以平均  $\pm$  标准偏差 (SD) 报道。使用时序检验 (log-ranktest) 比较试验组间的同种异体移植存活。使用秩 ANOVA 分析组织学和免疫组织学发现。使用单向 ANOVA 分析流式细胞术数据和蛋白印迹数据。p 值少于 0.05 的差异视为显著。

[0260] 应理解,本发明的方法和组合物可以以多种实施方案的形式并入,仅其中一些实施方案在本文公开。对本领域技术人员明显的是:存在其他实施方案并且不偏离本发明的

精神。因此,所描述的实施方案为示例性的,不应该解释为限制性的。

[0261] 参考文献列表

[0262] 本文说明发明背景所用的出版物和其他材料以及特别是提供关于实施的附加细节的实例的全部内容并入本文作为参考;为了方便在文中引用作者和日期,并分别总结在下述参考文献的列表中。

[0263] Abbas AK 等人 (2000).“细胞和分子免疫学”(第 4 版),363-383 页 (W. B. Saunders Company, 纽约)。

[0264] Arp 等人 (1996). J. Virol. 70:7349-7359。

[0265] Baldwin 等人 (2001). Immunity 14:369-376。

[0266] **Böhmig** GA 等人 (2000). Am. J. Kidney Dis. 35:667-673。

[0267] Brauer 等人 (1995). Transplantation 59:288-293。

[0268] Changelian PS 等人 (2003). Science 302:875-878。

[0269] Collard 等人 (1997). Circulation 96:326-333。

[0270] Collins 等人 (1999). J. Am. Soc. Nephrol. 10:2208-2214。

[0271] Fearon (1983). In Intensive Review of Internal Medicine. 第 2 版, Fanta 和 Minaker 编辑, Brigham and Women' s and Beth Israel Hospitals。

[0272] Forbes 等人 (1978). Lab. Invest. 39:463-470。

[0273] Frei Y 等人 (1987). Mol. Cell. Probes 1:141-149。

[0274] Gloor (2005). Contrib. Nephrol. 146:11-21。

[0275] Glotz 等人 (1993). Transplantation 56:335-337。

[0276] Glotz D 等人 (2002). Am. J. Transplant. 2:758-760。

[0277] Hakim 等人 (1990). Am. J. Kidney Dis. 16:423-431。

[0278] Halloran PF 等人 (1992). Transplantation 53:550-555。

[0279] Halloran (2003). Am. J. Transplant. 3:639-640。

[0280] Haviland DL 等人 (1991). J. Immunol. 146:362-368。

[0281] Hiesse C 等人 (1992). Nephrol. Dial. Transplant. 7:944-951。

[0282] Hillmen P 等人 (2004). New Engl. J. Med. 350:552-559。

[0283] Jeannet M 等人 (1970). New Engl. J. Med. 282:111-117。

[0284] Jones PT 等人 (1986). Nature 321:522-525。

[0285] Jose 等人 (1983). J. Exp. Med. 158:2177-2182。

[0286] Junge 等人 (2004). Clin Chim Acta. 344(1-2):137。

[0287] Kirschfink (2001). Immunol. Rev. 180:177-189。

[0288] Kobayashi 等人 (1999). J. Biol. Chem. 274:28660-28668。

[0289] Kriaa 等人 (1995). Nephrol. Dial. Transplant. 10Suppl. 6:108-110。

[0290] Kroshus 等人 (1995). Transplantation 60:1194-1202。

[0291] Kupiec-Weglinski (1996). Ann. Transplant. 1:34-40。

[0292] Kupin 等人 (1991). Transplantation 51:324-329。

[0293] Liszewski (1993). Fundamental Immunology 917-939 页。

[0294] Mauiyyedi 等人 (2002). Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 11:609-618。

- [0295] Mehra 等人 (2003). *Curr. Opin. Cardiol.* 18:153-158。
- [0296] Minta JO 和 Man DP (1977). *J. Immunol.* 119:1597-1602。
- [0297] Montgomery RA 等人 (2000). *Transplantation* 70:887-895。
- [0298] Olfert 等人 (1993) “实验动物管理和使用指南” (Vol. 1). 渥太华:加拿大大学联盟 1。
- [0300] Opelz G (1992). *Transplant. Proc.* 24:2342-2355。
- [0301] OPTN/SRTR 年报 (2002), 由器官移植受者科学登记系统 (SRTR) 联合器官获取和移植网络 (OPTN) 提出的年报第一章, 参见 [http://www.unos.org/data/ar2002/ar02\\_chapter one.htm](http://www.unos.org/data/ar2002/ar02_chapter_one.htm)。
- [0302] Palmer 等人 (1989). *Lancet* 1:10-12。
- [0303] Papadimitriou 等人 (1991). *J. Immunol.* 147:212-217。
- [0304] Park WD 等人 (2003). *Am. J. Transplant* 3:952-960。
- [0305] Persson NH 等人 (1995). *Transplant. Proc.* 27:3466。
- [0306] Platt 等人 (1999). *Mol. Immunol.* 36:965-971。
- [0307] Pratt 等人 (1996). *Am J Pathol* 149:2055-2066。
- [0308] Pratt 等人 (2000). *Am. J. Pathol.* 157:825-831。
- [0309] Pruitt 等人 (1991). *J. Surg. Res.* 50:350-355。
- [0310] Regele H 等人 (2001). *Nephrol. Dial. Transplant.* 16:2058-2066。
- [0311] Rocha 等人 (2003). *Transplantation* 75:1490-1495。
- [0312] Ross 等人 (1993). *Transplantation* 55:785-789。
- [0313] Saadi 等人 (1995). *J. Exp. Med* 182:1807-1814。
- [0314] Salama 等人 (2001). *Am. J. Transplant.* 1:260-269。
- [0315] Schweitzer 等人 (2000). *Transplantation* 70:1531-1536。
- [0316] Sonnenday 等人 (2002). *Transplant. Proc.* 34:1614-1616。
- [0317] Stepkowski SM (2000). *Exp. Rev. Mol. Med.* 6 月 21 日, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/00001769h.htm>。
- [0318] Tau be DH 等人 (1984). *Lancet* 1:824-828。
- [0319] Tyan 等人 (1994). *Transplantation* 57:553-562。
- [0320] Vakeva 等人 (1998). *Circulation* 97:2259-2267。
- [0321] Vogt W 等人 (1989). *Molec. Immunol.* 26:1133-1142。
- [0322] Wang 等人 (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8955-8959。
- [0323] Wang 等人 (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:8563-8568。
- [0324] Wang 等人 (1999). *Transplantation* 68:1643-1651。
- [0325] Wang H 等人 (2003). *J. Immunol.* 171:3823-3836。
- [0326] Warren 等人 (2004). *Am. J. Transplant.* 4:561-568。
- [0327] Wetsel RA 和 Kolb WP (1982). *J. Immunol.* 128:2209-2216。
- [0328] Wurzner R 等人 (1991). *Complement Inflamm.* 8:328-340。
- [0329] Yamamoto KI 和 Gewurz G (1978). *J. Immunol.* 120:2008-2015。
- [0330] PCT 专利申请公布 WO 92/10205

- [0331] PCT 专利申请公布 WO 00/27421
- [0332] PCT 专利申请公布 WO 01/37860
- [0333] U. S. 专利申请公布 US 2003/0129187
- [0334] U. S. 专利申请公布 US 2003/0180301
- [0335] U. S. 专利 5,133,916
- [0336] U. S. 专利 5,573,940
- [0337] U. S. 专利 5,660,825
- [0338] U. S. 专利 6,057,131
- [0339] U. S. 专利 6,100,443
- [0340] U. S. 专利 6,192,891
- [0341] U. S. 专利 6,280,957
- [0342] U. S. 专利 6,302,855
- [0343] U. S. 专利 6,355,245
- [0344] U. S. 专利 6,534,058
- [0345] U. S. 专利 6,821,515
- [0346] 本文引用的所有参考文献的内容全部引入作为参考。

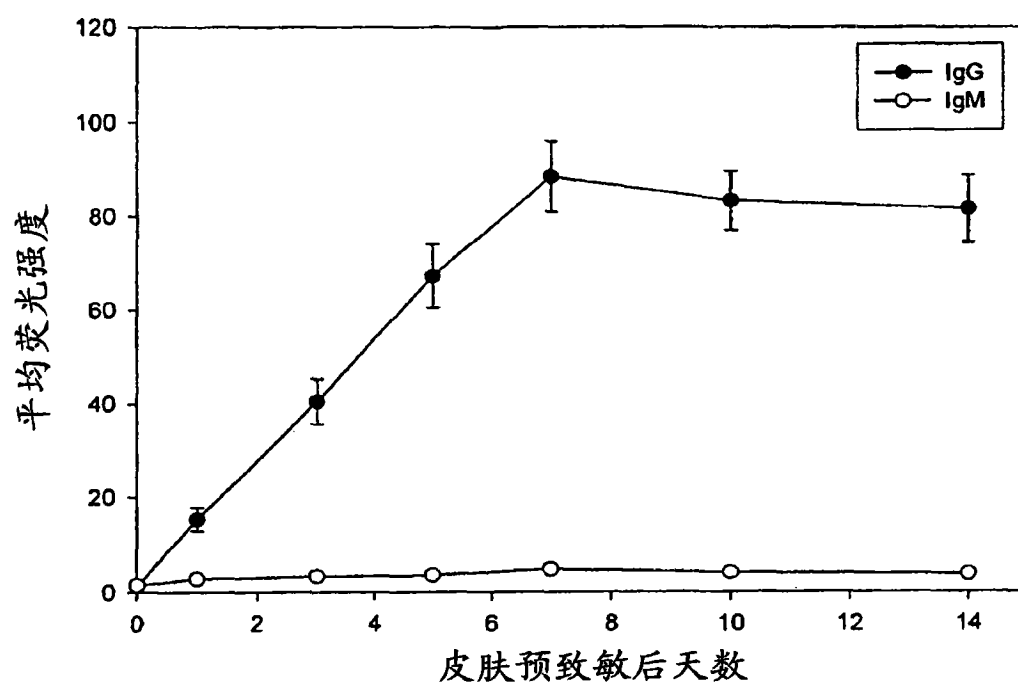


图 1A

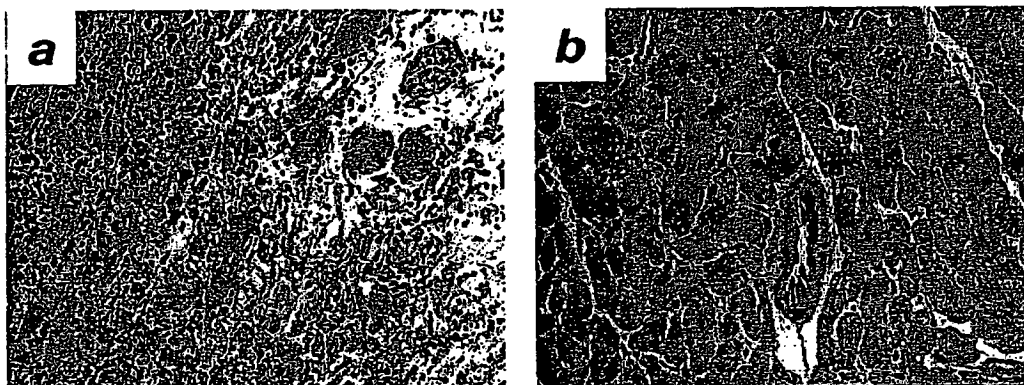


图 1B

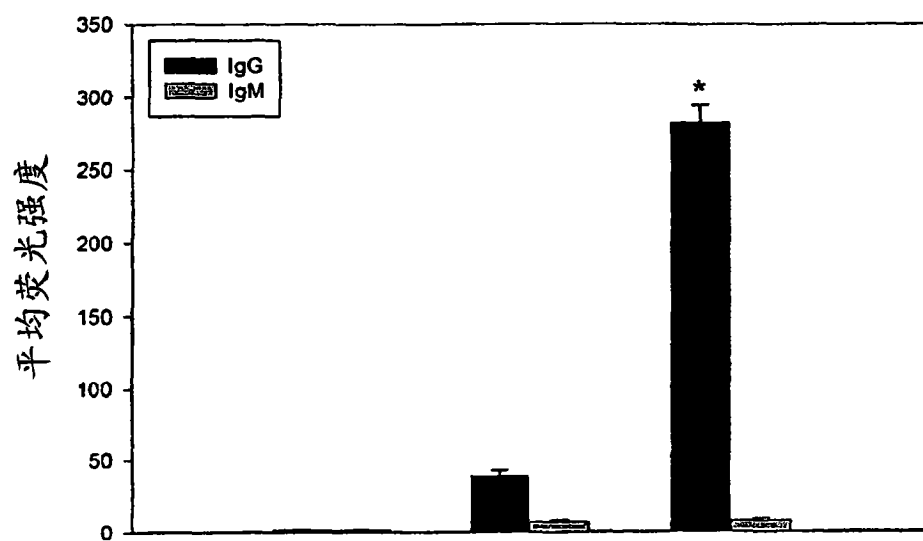


图 1C

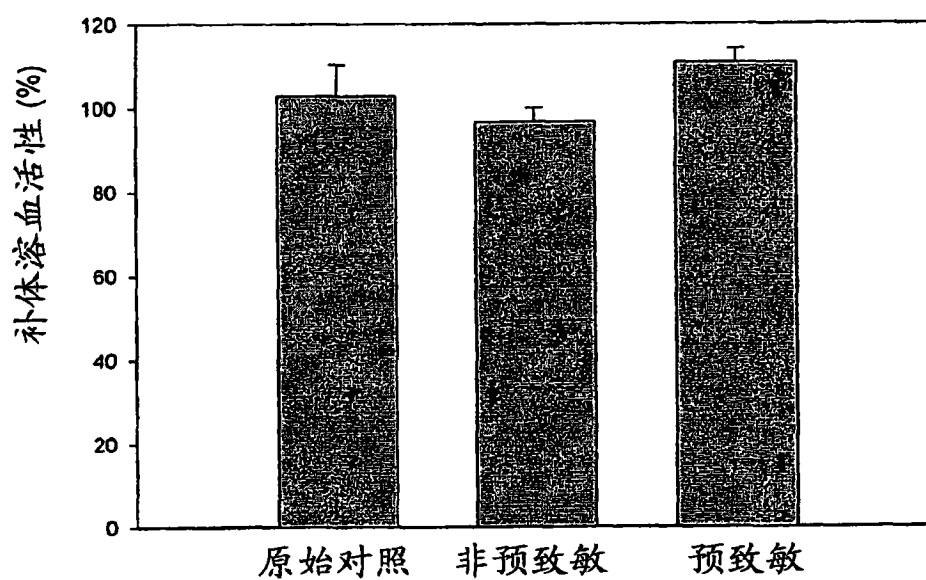


图 1D

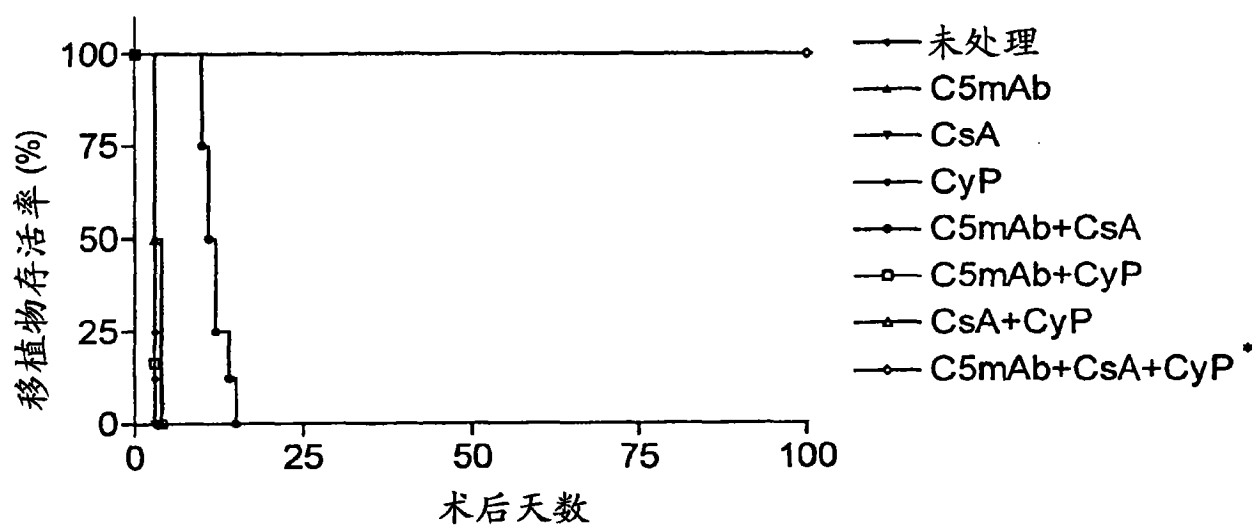


图 2A

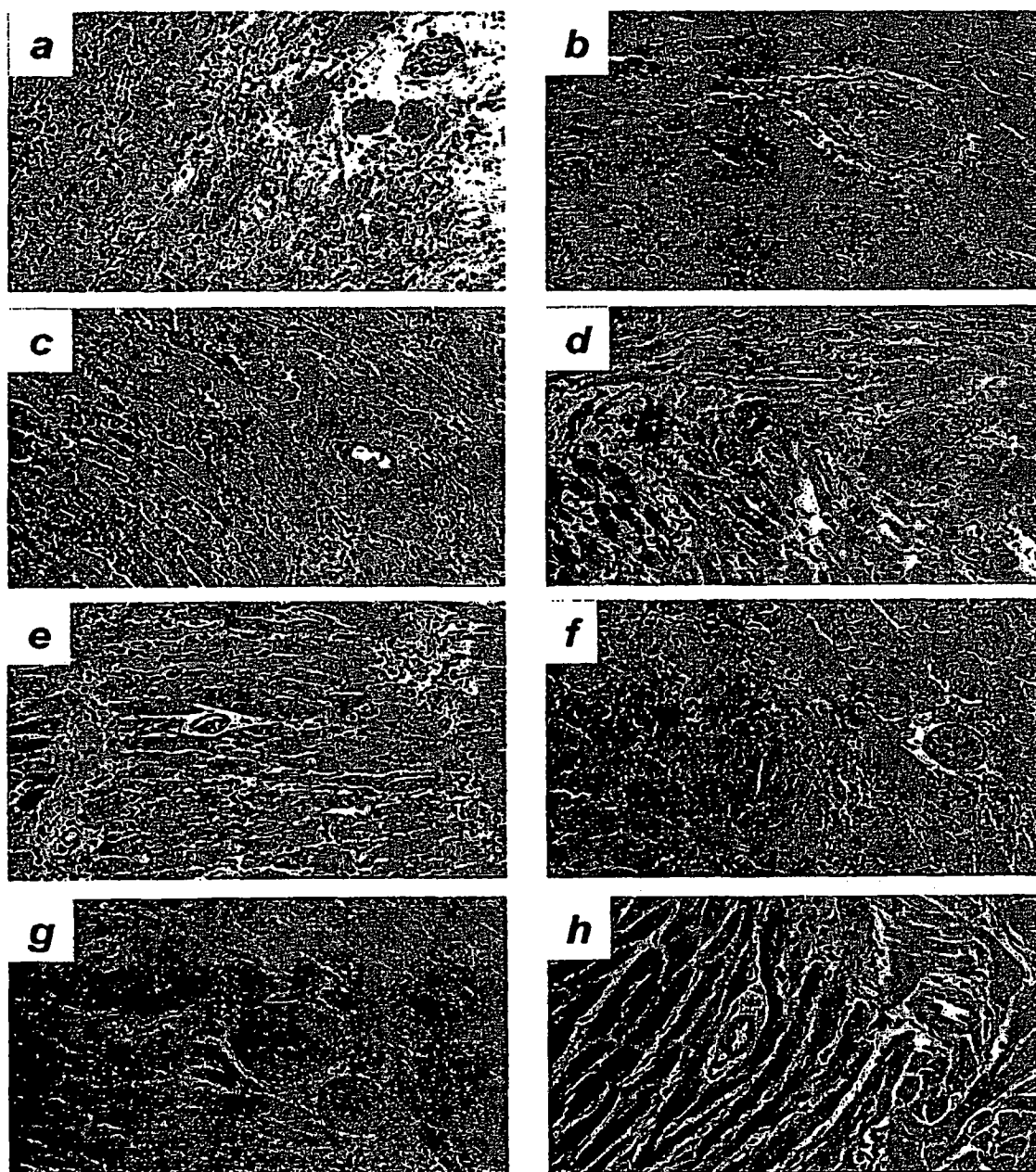


图 2B

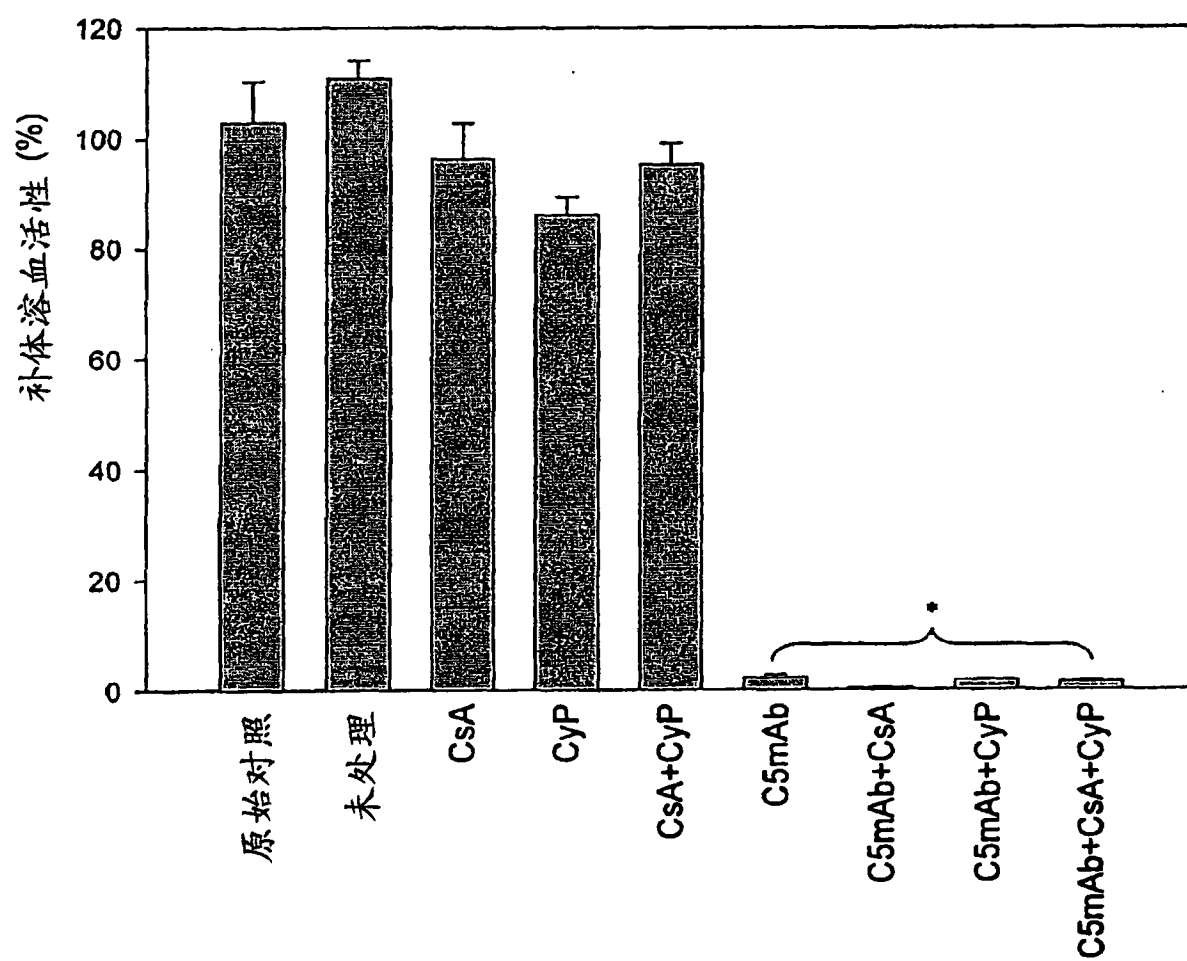


图 3

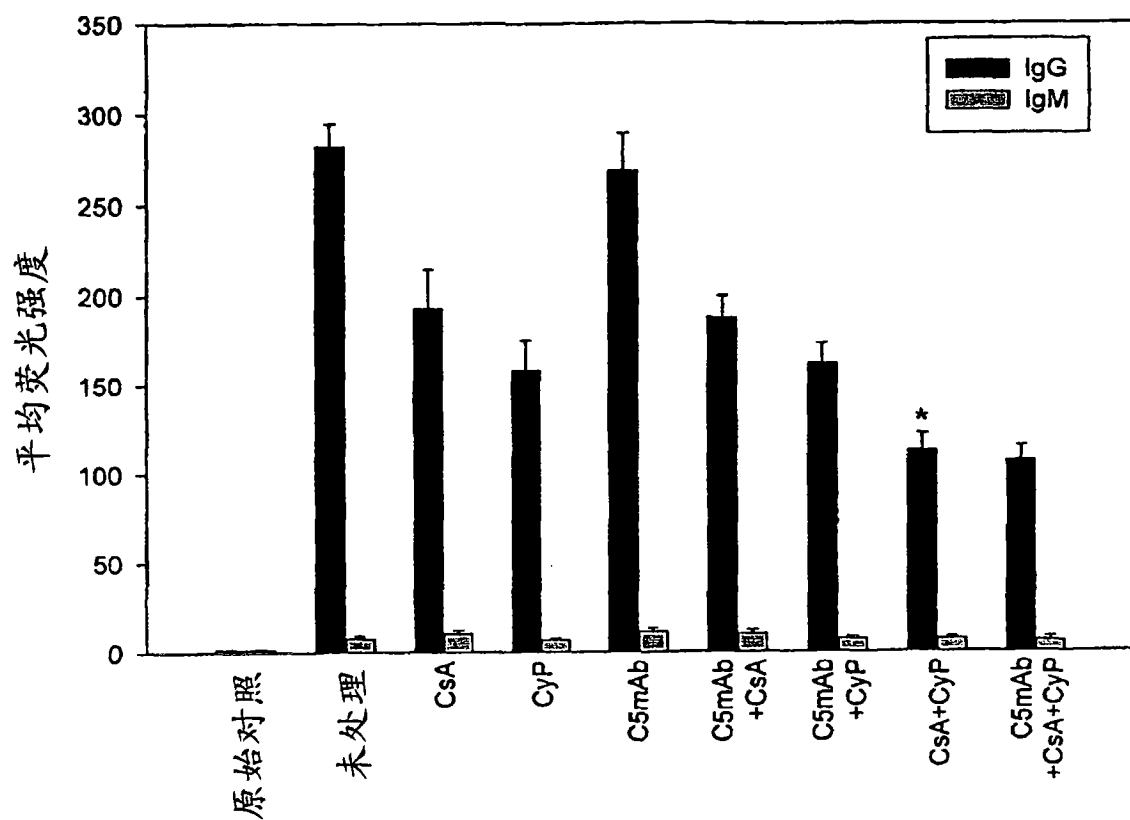


图 4A

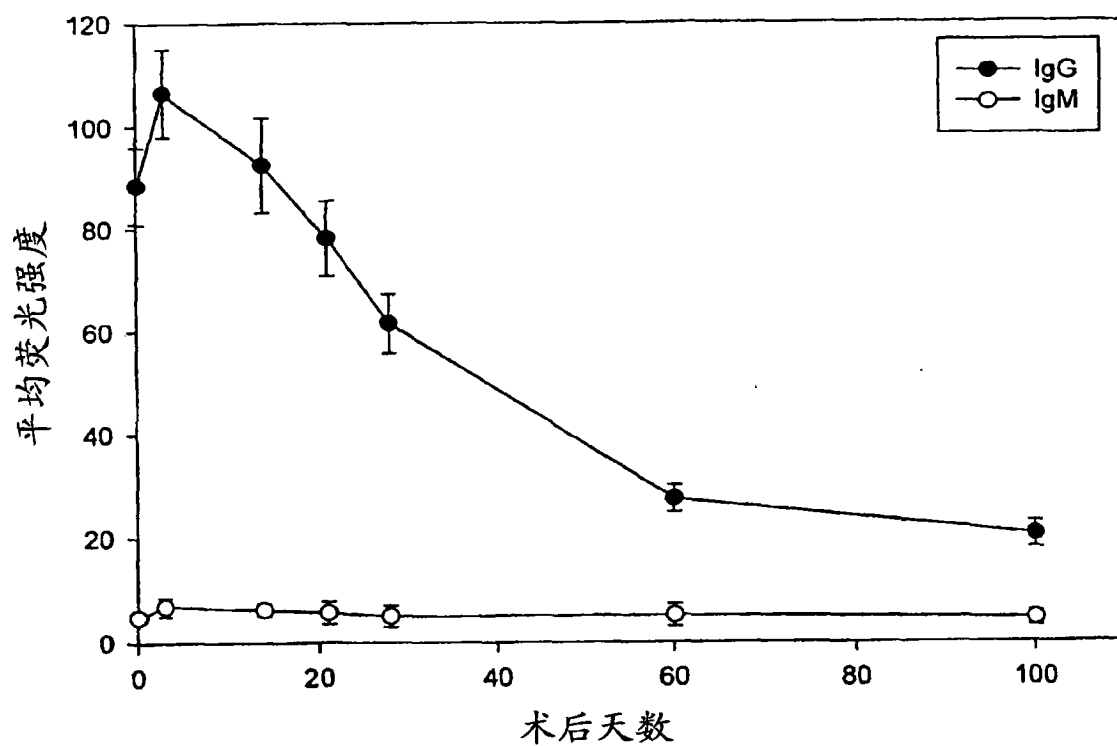


图 4B

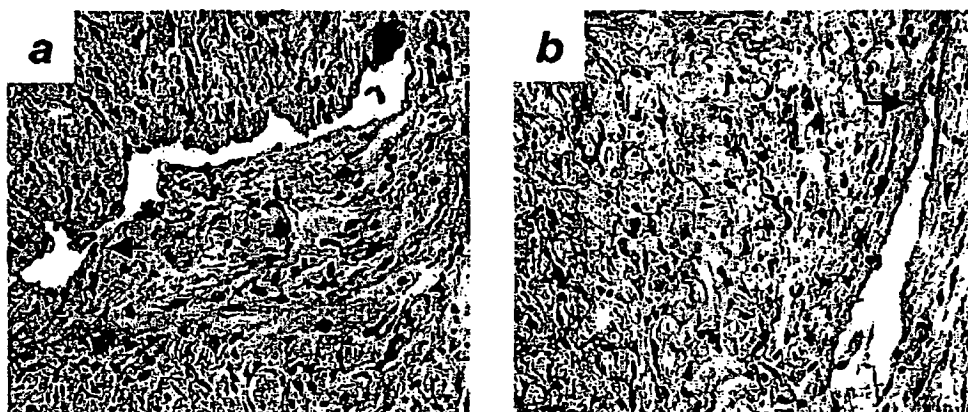


图 4C

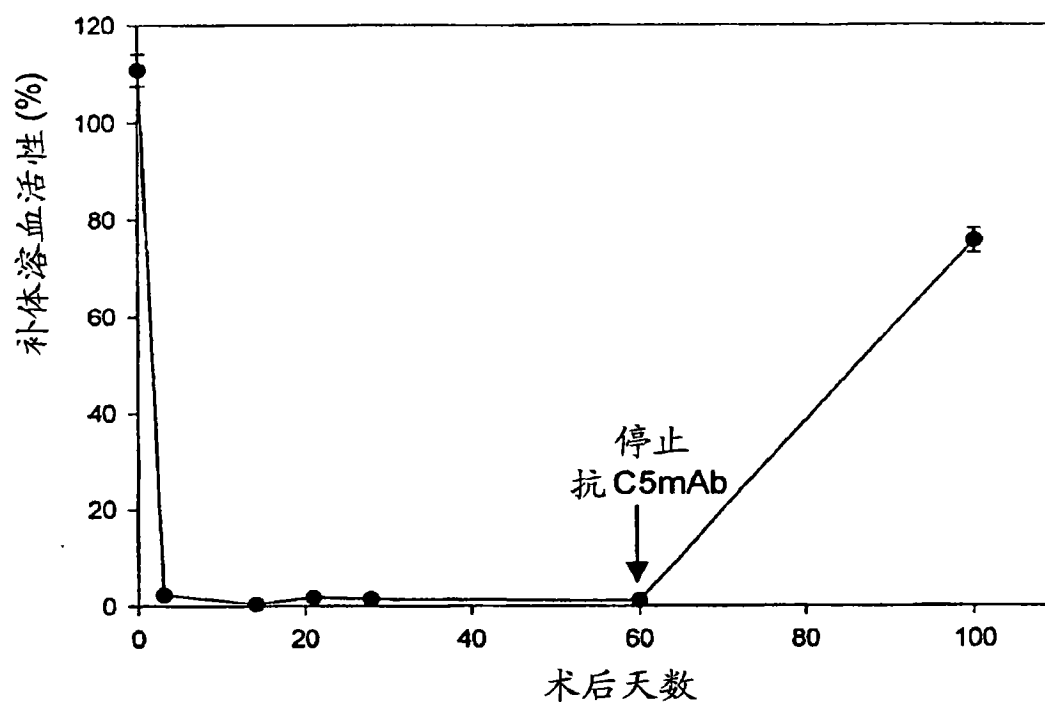


图 4D

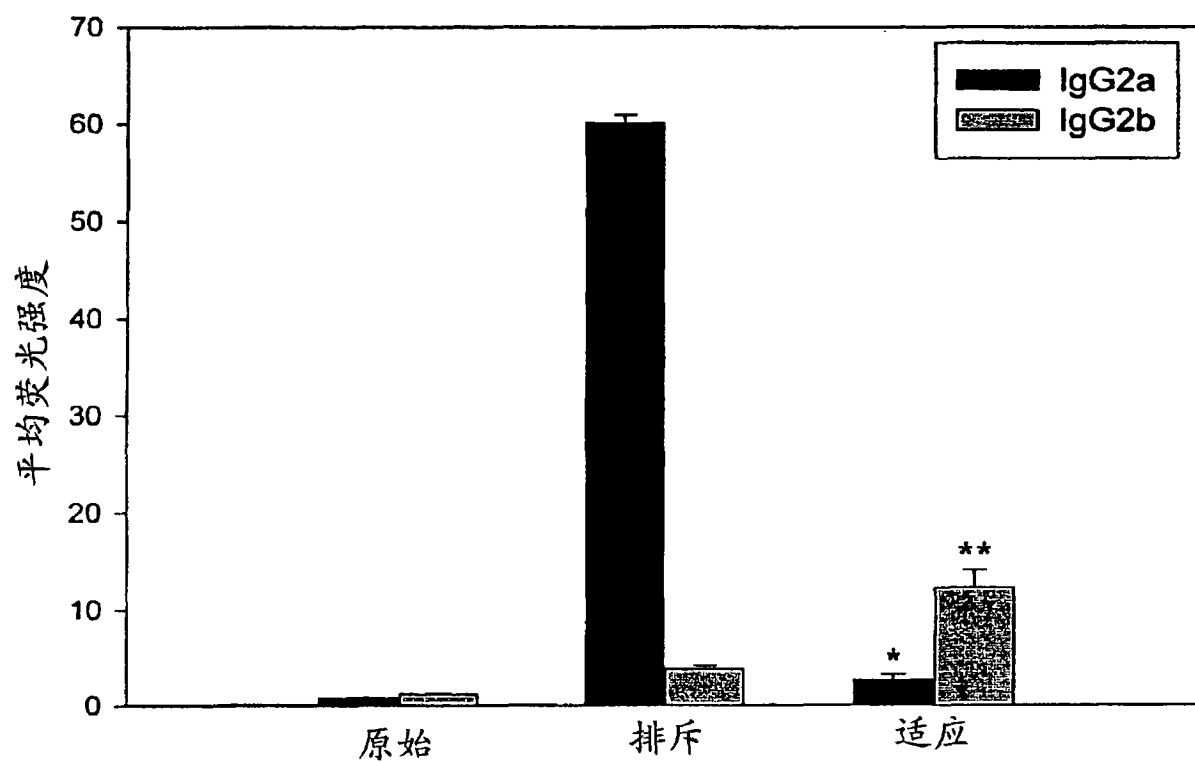


图 5

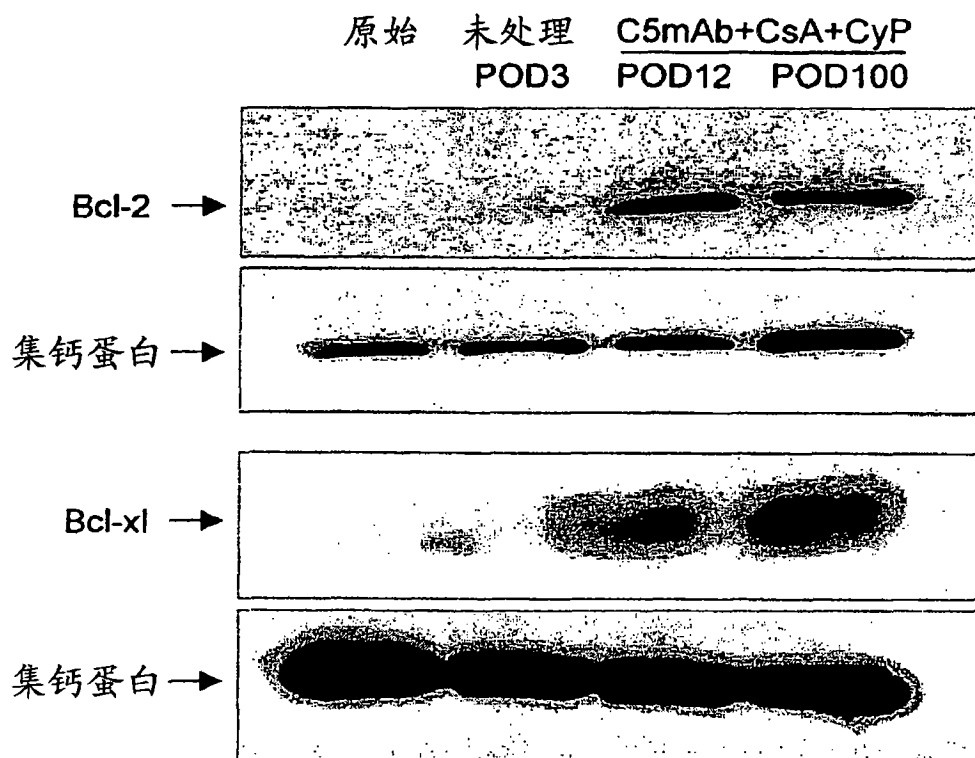


图 6

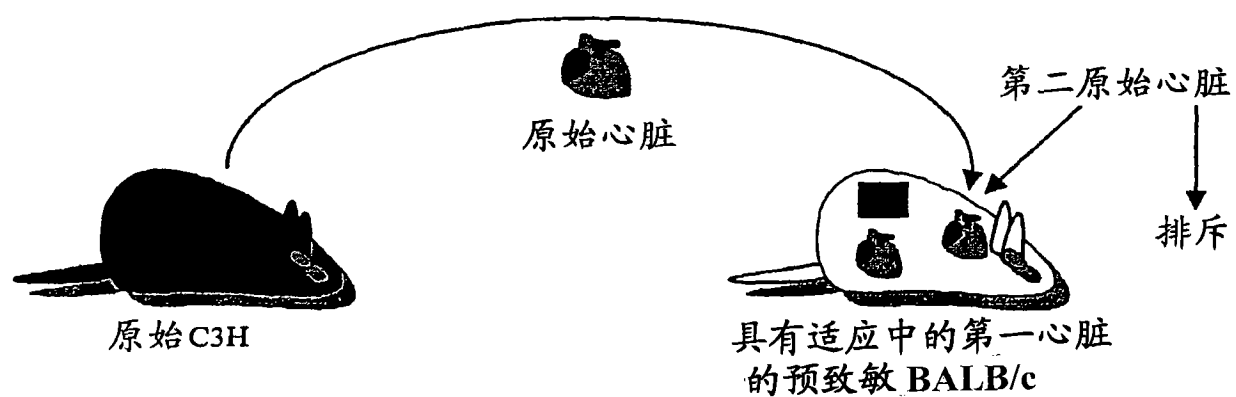


图 7A

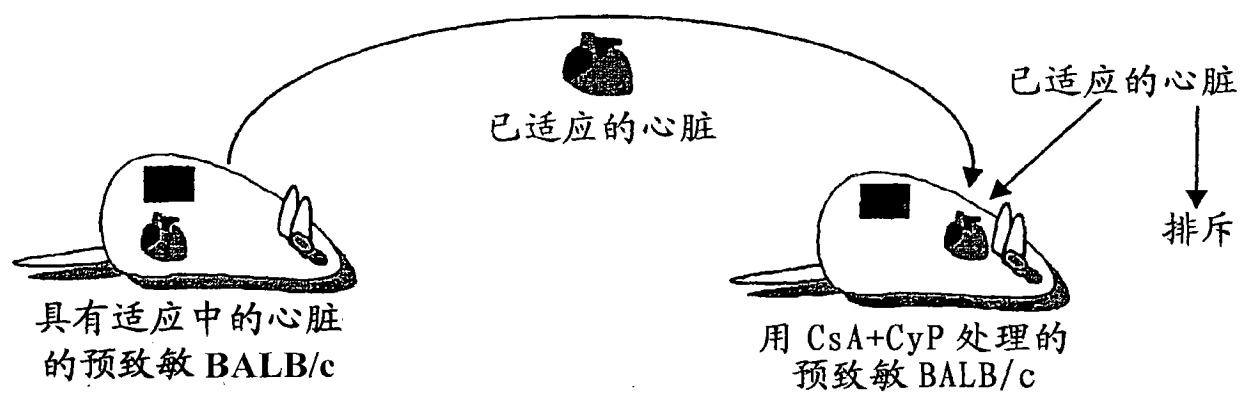


图 7B

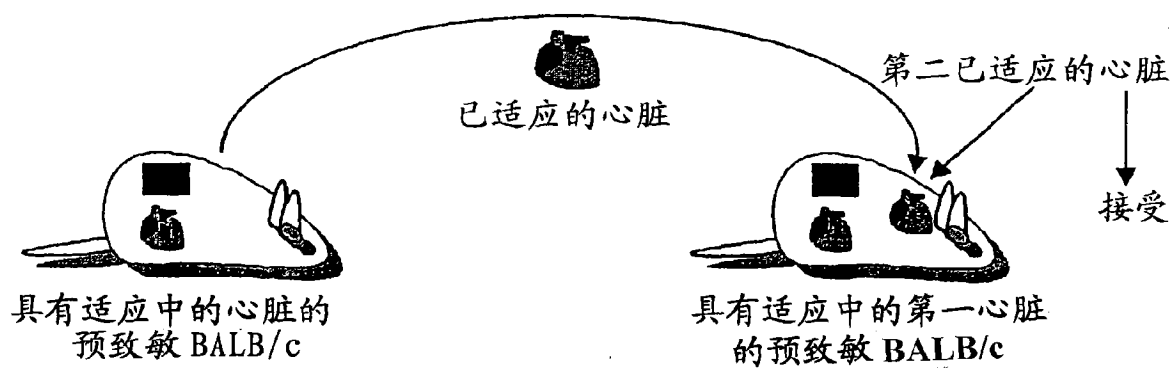


图 7C

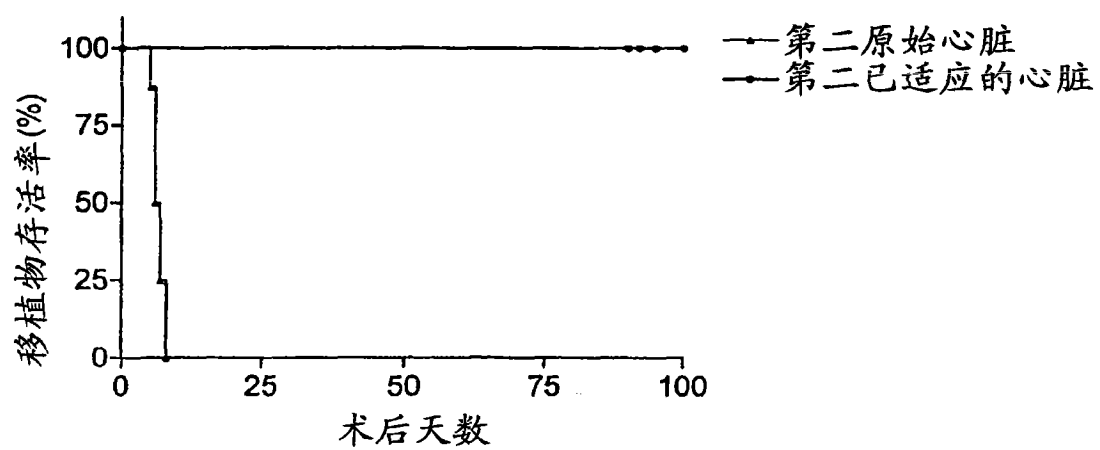


图 8A

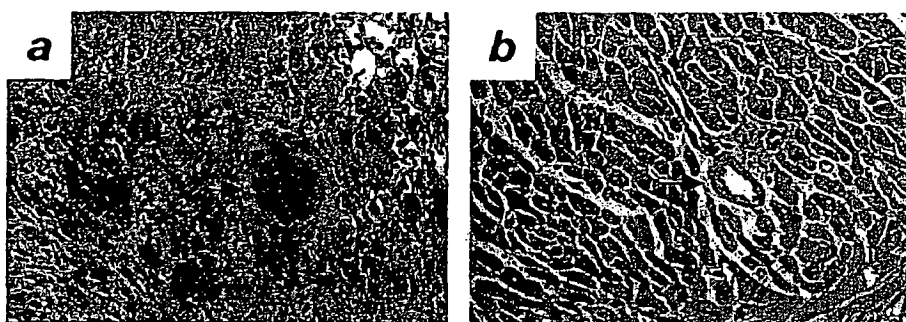


图 8B

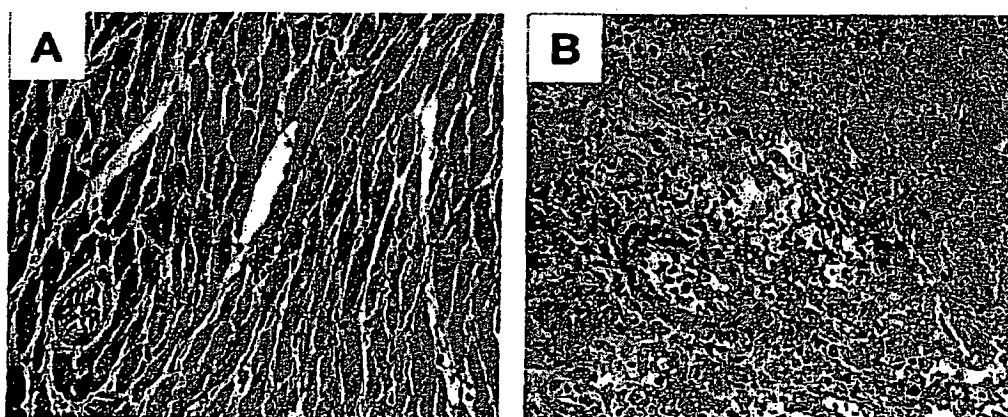


图 9

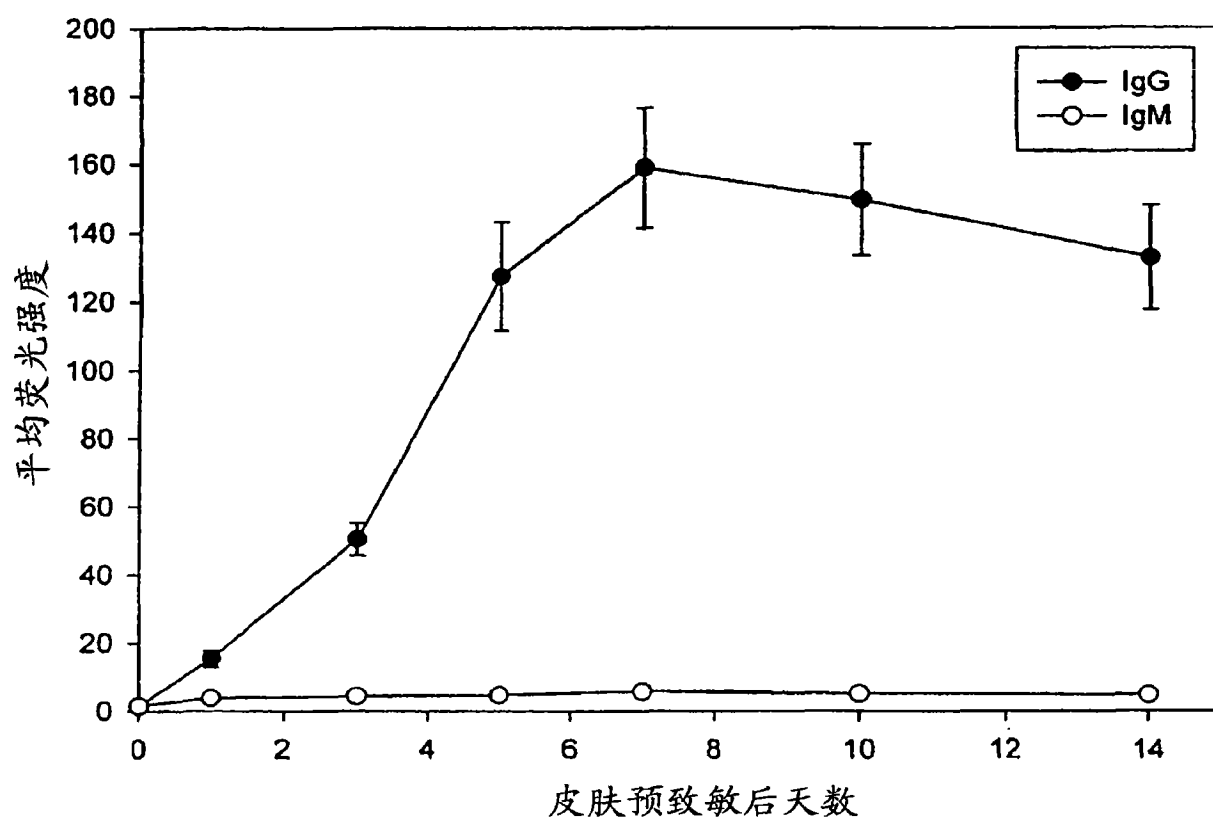


图 10A

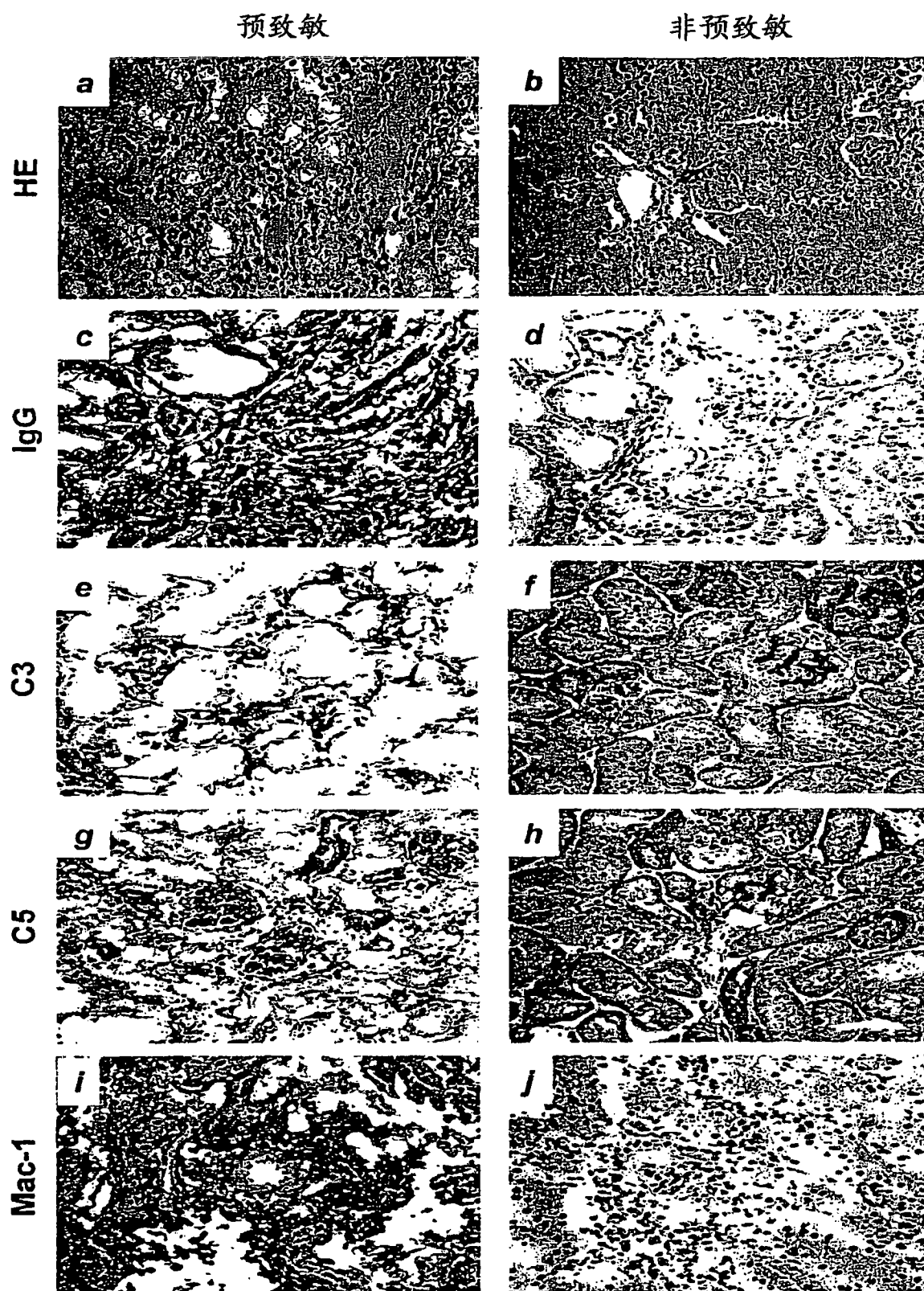


图 10B

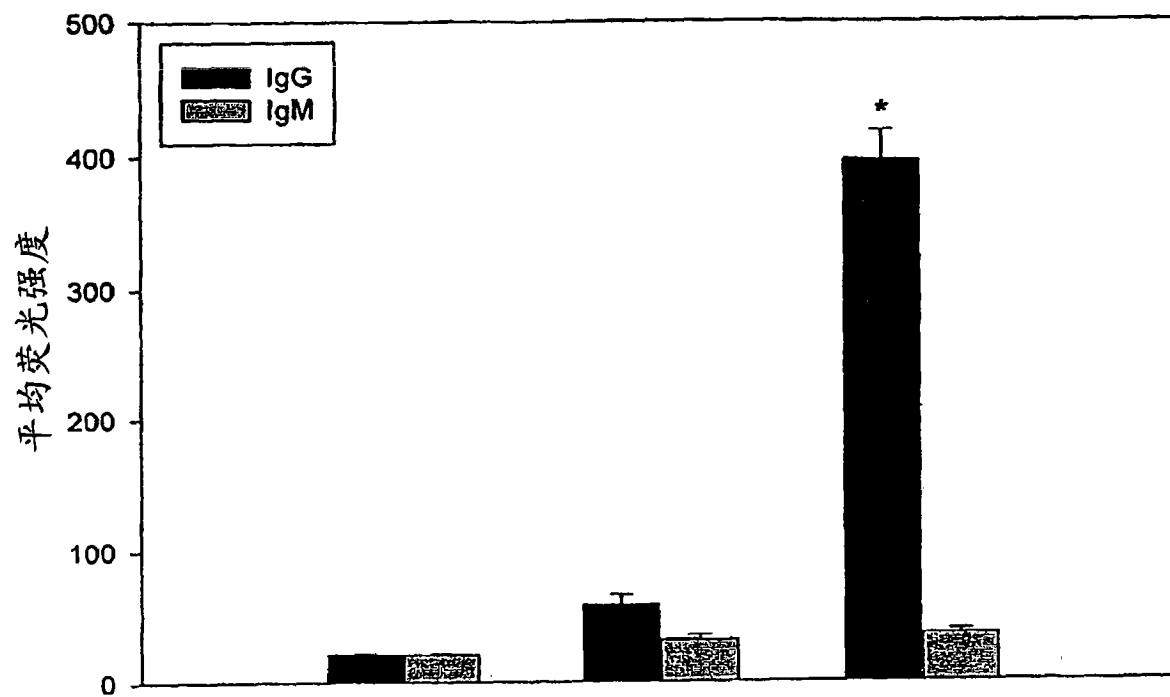


图 10C

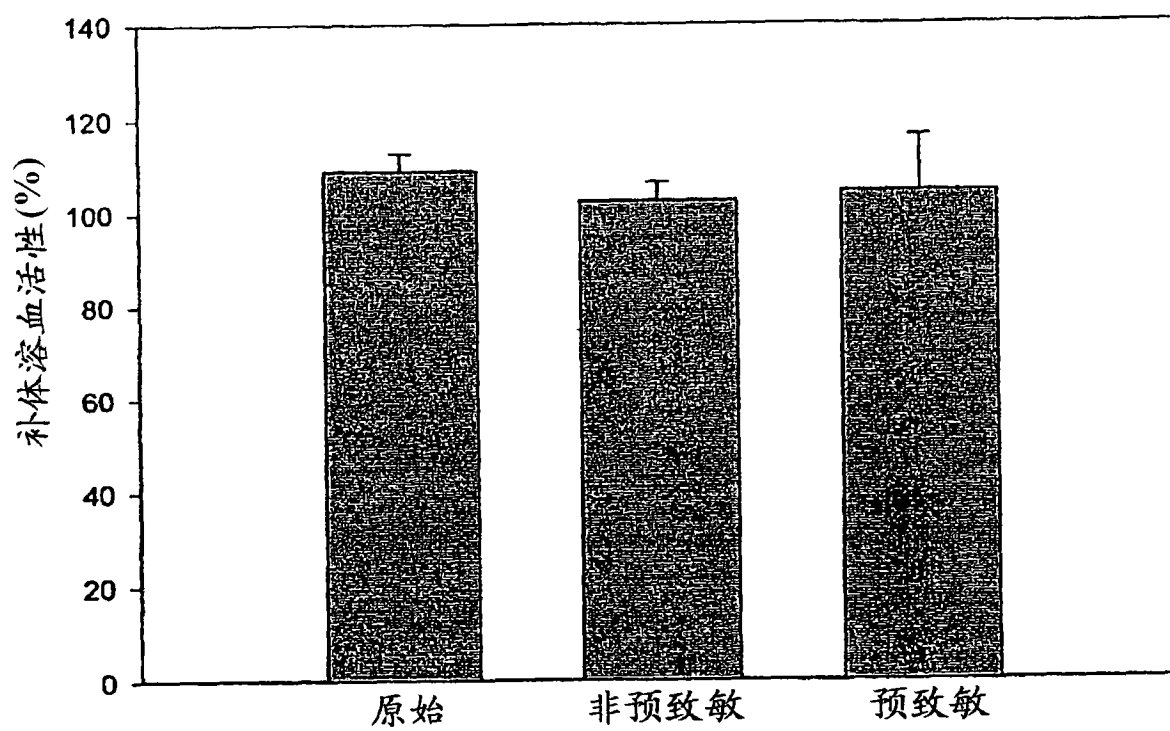


图 10D

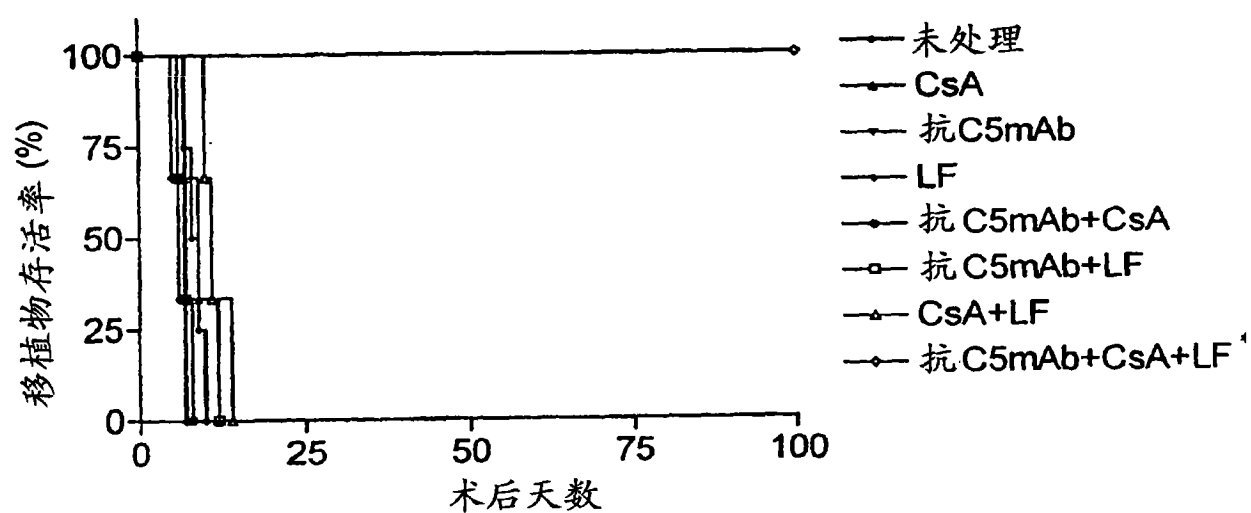


图 11A

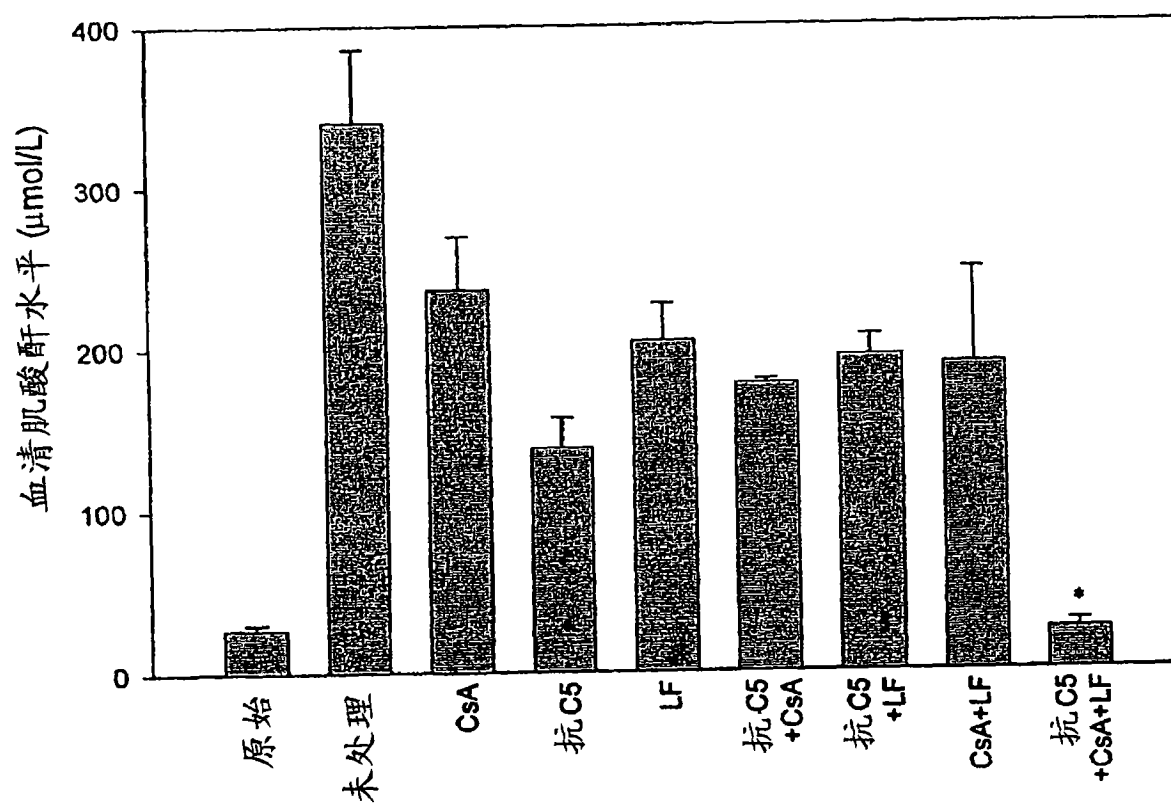


图 11B

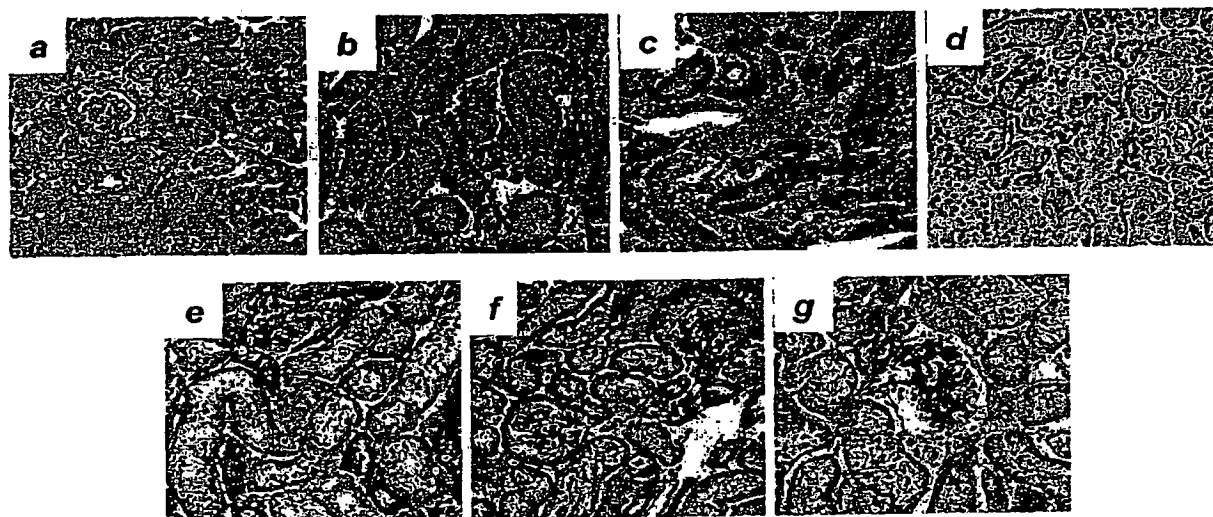


图 11C

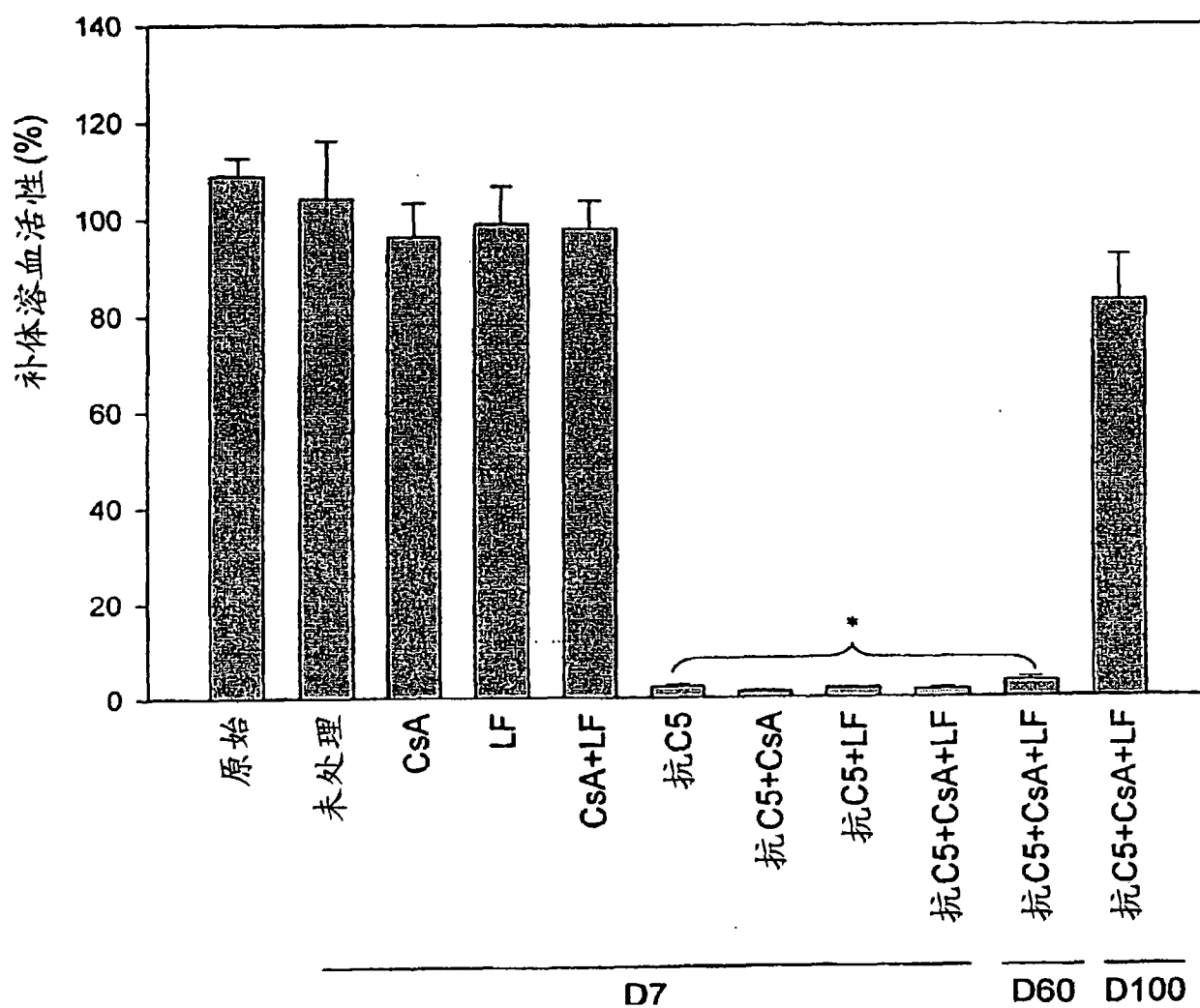


图 12

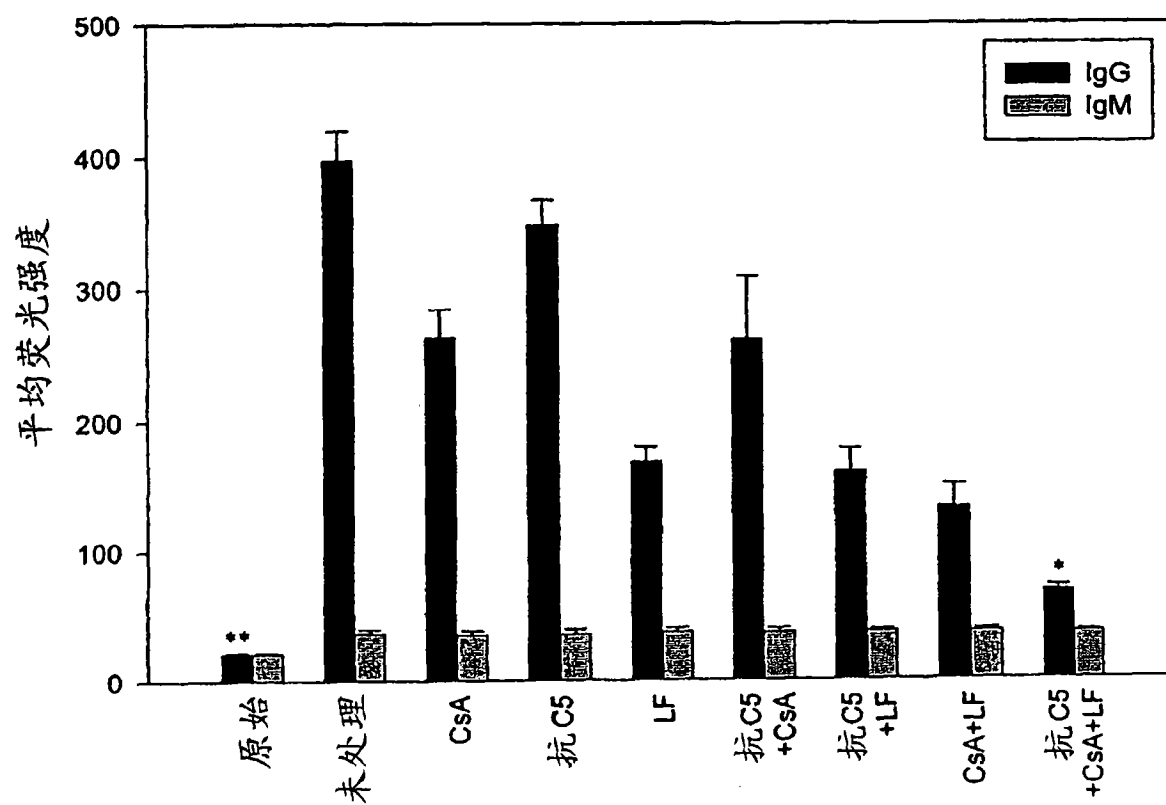


图 13A

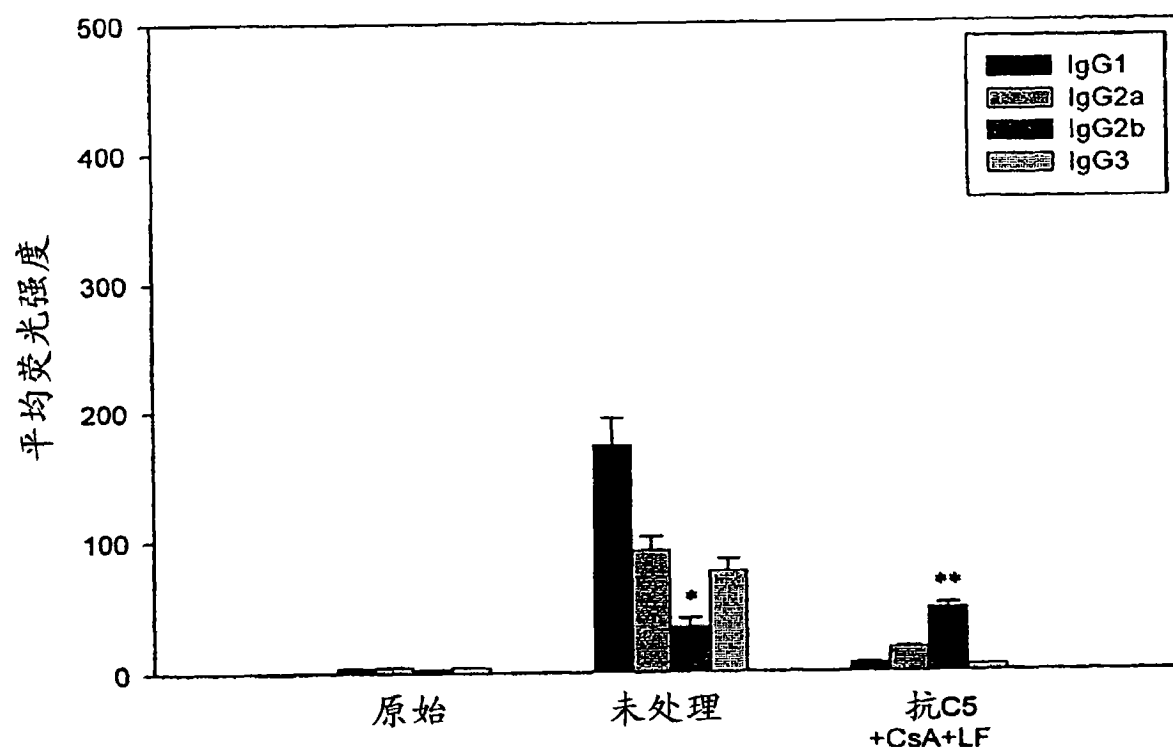


图 13B

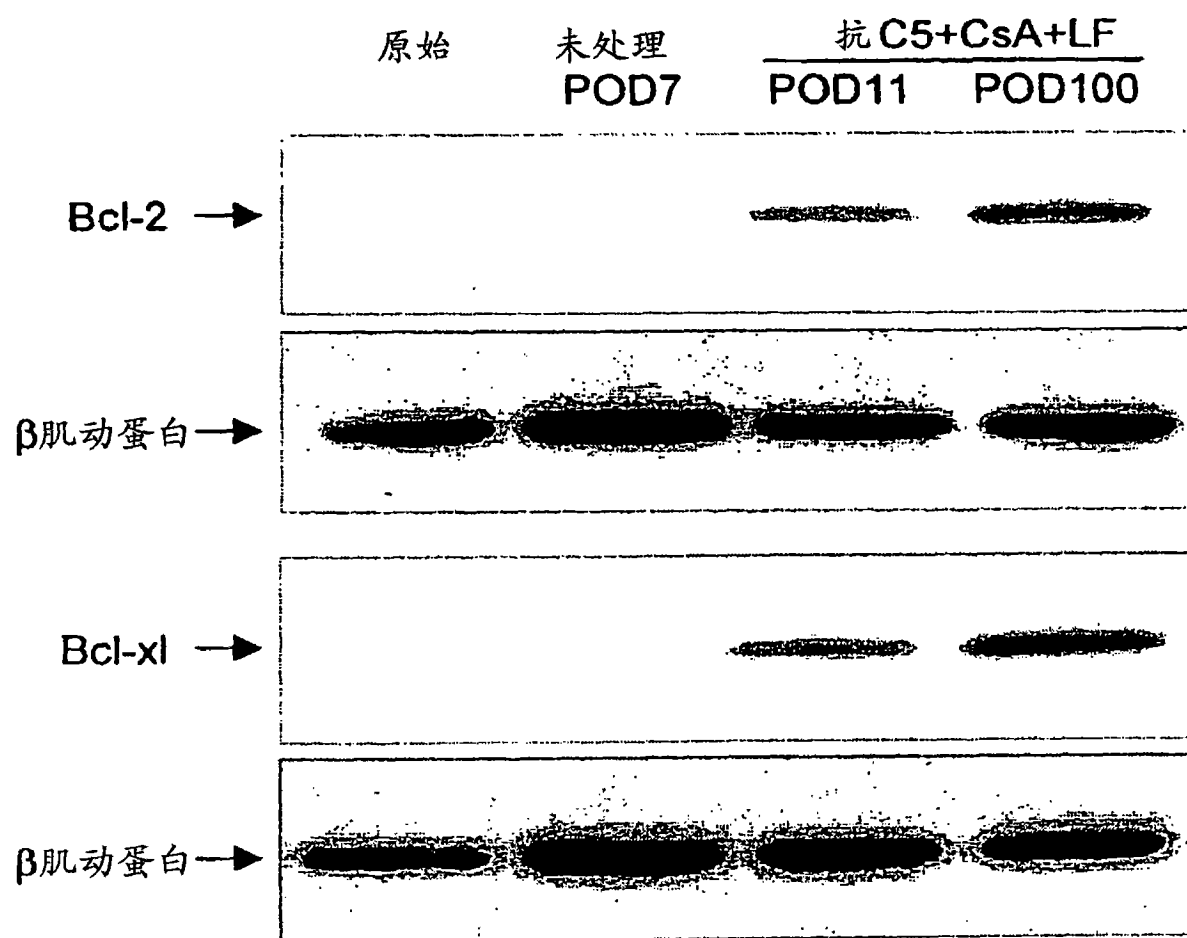


图 14