

·学术速递·

凝血“再平衡”——血友病预防治疗中的创新探索

《抗人活化蛋白C抗体在预防性治疗先天性因子缺乏的临床前模型中的安全性和有效性研究》解读

Coagulation rebalances—Innovative exploration in the prevention and treatment of hemophilia

Comments on “Safety and efficacy of an anti-human APC antibody for prophylaxis of congenital factor deficiencies in preclinical models”

彭龙姣 (Peng Longjiao), 程露 (Cheng Lu)*

上海莱士血液制品股份有限公司, 上海 201401;

Shanghai RAAS Blood Products Co., Ltd., Shanghai 201401, China

【编者按】 本文于2023年09月发表于《Blood》杂志,发表后引起业内广泛关注,在Blood Podcast (Episode 12 Season 6, https://ashpublications.org/blood/pages/blood_podcast)重点介绍并同期发布了述评文章 (Roger J. S. Preston, 2023, 9, 21)。本文文章题录为: Miao Jiang, Fei Yang, Yizhi Jiang, et al. Safety and efficacy of an anti-human APC antibody for prophylaxis of congenital factor deficiencies in preclinical models [J]. Blood, 2023, 142 (12): 1071-1081。该研究基于先前发表的鼠抗体 HAPC1573 进行工程改造, 获得一种可选择性阻断人活化蛋白C (APC) 的抗凝活性而不影响 APC 细胞保护功能的人源化抗体 SR604, 并验证了其治疗先天性因子缺乏的安全性和有效性。该研究为先天性凝血因子缺乏患者提供了通过抑制内源性抗凝途径, 使体内凝血系统与抗凝系统实现“再平衡”的新治疗策略。经通讯作者许可, 再次通过佳文解读的方式来阐述这一研究。

关键词: 血友病; 先天性因子缺乏; 抗凝系统; 活化蛋白C

[中图分类号] R554+.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1009-6213(2024)03-0099-07

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6213.2024.03.002



【专家简介】程露, 博士, 高级工程师, 上海莱士血液制品股份有限公司研发总监, 上海交通大学专业学位研究生行业导师, 上海市奉贤区青年联合会第五届委员。深耕血液制品和生物大分子药物研究十余年, 主要方向为血液制品和血友病等出血性疾病。承担国家十二五计划“重大新药创制”科技重大专项, 国家外经贸发展专项, 上海张江国家自主创新示范区专项发展资金项目等。以第一作者或第一发明人在国内外行业前列期刊 (如 Blood, Blood advances 等) 发表论文和专利 10 多项。获上海市奉贤区“拔尖人才”、奉贤区优秀科技工作者、奉贤区生物科技园“硕果英才”等荣誉称号。

1 研究背景

血友病是由体内缺少凝血因子所引起的血液疾病。主要分为缺乏凝血因子Ⅷ (FⅧ) 的甲型血友病和缺乏凝血因子Ⅸ (FⅨ) 的乙型血友病, 还有少量的其他类型。目前血友病的治疗多采用因子替代的方法, 即注射 FⅧ 或 FⅨ, 增强凝血途径, 这是基于对缺失的凝血因子的替代以恢复止血的平衡。但注射 FⅧ/FⅨ 治疗需要长期静脉注射且注射频率较高, 费用较高体验差, 长期使用 FⅧ/FⅨ 可能会导致 FⅧ/FⅨ 抗体的产生, 导致治疗效果变差, 因此临床上还需要

更好的产品。近年来, 抑制抗凝途径使体内凝血系统与抗凝系统实现“再平衡”是一种新的治疗策略^[1]。作为体内重要抗凝机制的蛋白C途径, 其途径中的活化蛋白C (activated protein C, APC) 成为了治疗出血性疾病的重要靶点。

蛋白C (protein C, PC) 是一种维生素K依赖的丝氨酸蛋白酶原, 是一种糖蛋白, 等电点4.4~4.8。成熟的PC由419个氨基酸组成, 相对分子质量为62 kDa, 由二硫键将一条21 kDa的轻链和一条41 kDa的重链连接。PC在血浆中以无生理活性的酶原形式存在, 浓度为4 μg/mL。当血管破损发生凝

* 通讯作者: 程露, Email: chengl@raas-corp.com

血反应时,产生的凝血酶(thrombin, TB)与内皮细胞表面的血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)结合,形成TB-TM复合物,作用于PC重链N端并水解下一个12个氨基酸片段的小肽后,PC被激活为活化蛋白C(APC),从而发挥其生理抗凝功能^[2]。PC被激活为APC后,APC能在Ca²⁺、蛋白S(protein S, PS)与磷脂的参与下,发挥其蛋白水解酶的作用,水解活化FV(FVa)和活化FVIII(FVIIIa)的重链,从而灭活FVa和FVIIIa,减慢内源性的凝血速度;此外,APC还能灭活内皮细胞和血小板释放的纤溶酶原激活抑制剂(plasminogen activator inhibitor, PAI),从而促进纤溶酶原激活,激活纤溶系统,促进纤维蛋白的降解,因此具有抗凝血和促纤溶的作用^[3]。

APC还有独立于抗凝活性的细胞保护功能,包括内皮屏障保护功能、抗凋亡活性、抗炎特性和修饰基因表达。APC的多种细胞保护功能由几种受体介导,其中最著名的途径是通过S1P和RAC1机制维持内皮屏障的EPCR-APC激活PAR1途径^[4]。此外,在发生炎症反应时,激活NF-κB会促进炎症因子的转录表达,从而促进炎症反应,APC则通过抑制NF-κB的激活发挥抗炎作用^[5]。

血液循环中APC浓度在40 pM(~2.3 ng/mL)左右,这种极低浓度的体内靶点,为单克隆抗体的长效治疗奠定了基础,即通过每月或每两个月的皮下注射进行预防性治疗,与传统的凝血因子替代治疗相比显示出了其优势。其次,APC具有多种生理功能,而其抗凝活性和细胞保护功能区域相对独立,能够开发出特异性抑制APC的抗凝活性,而不影响其细胞保护等功能的单克隆抗体,也是其作为靶点的优势。

2 研究概述

在作者先前的研究中,已证明小鼠单克隆抗体(mAb)HAPC1573选择性抑制人APC的抗凝活性,能在体外促进凝血酶生成,并且能改善血友病小鼠的出血症状,降低死亡率。为开发用于临床研究的APC单抗药物,作者通过工程改造获得人源化HAPC1573抗体(命名为Humab-14),然后对Humab-14进行了亲和力成熟研究,并通过表面等离子共振法进行抗体结合动力学分析,得到了一种亲和力提高了60倍的新型人源化HAPC1573变体(命名为

SR604)。为验证SR604对APC抗凝活性的抑制作用,使用了先前建立的改良APTT凝血测定方法(Protac-APTT法)验证了在体外乏凝血因子血浆中SR604具有缩短凝血时间的作用,并通过人源化蛋白C血友病小鼠的割尾模型及膝损伤模型,验证SR604具有预防和治疗有效性。为验证SR604可以选择性抑制APC的抗凝活性,同时维持APC的非抗凝活性,使用了脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的全身炎症模型及体外内皮细胞屏障通透性模型进行研究^[6]。

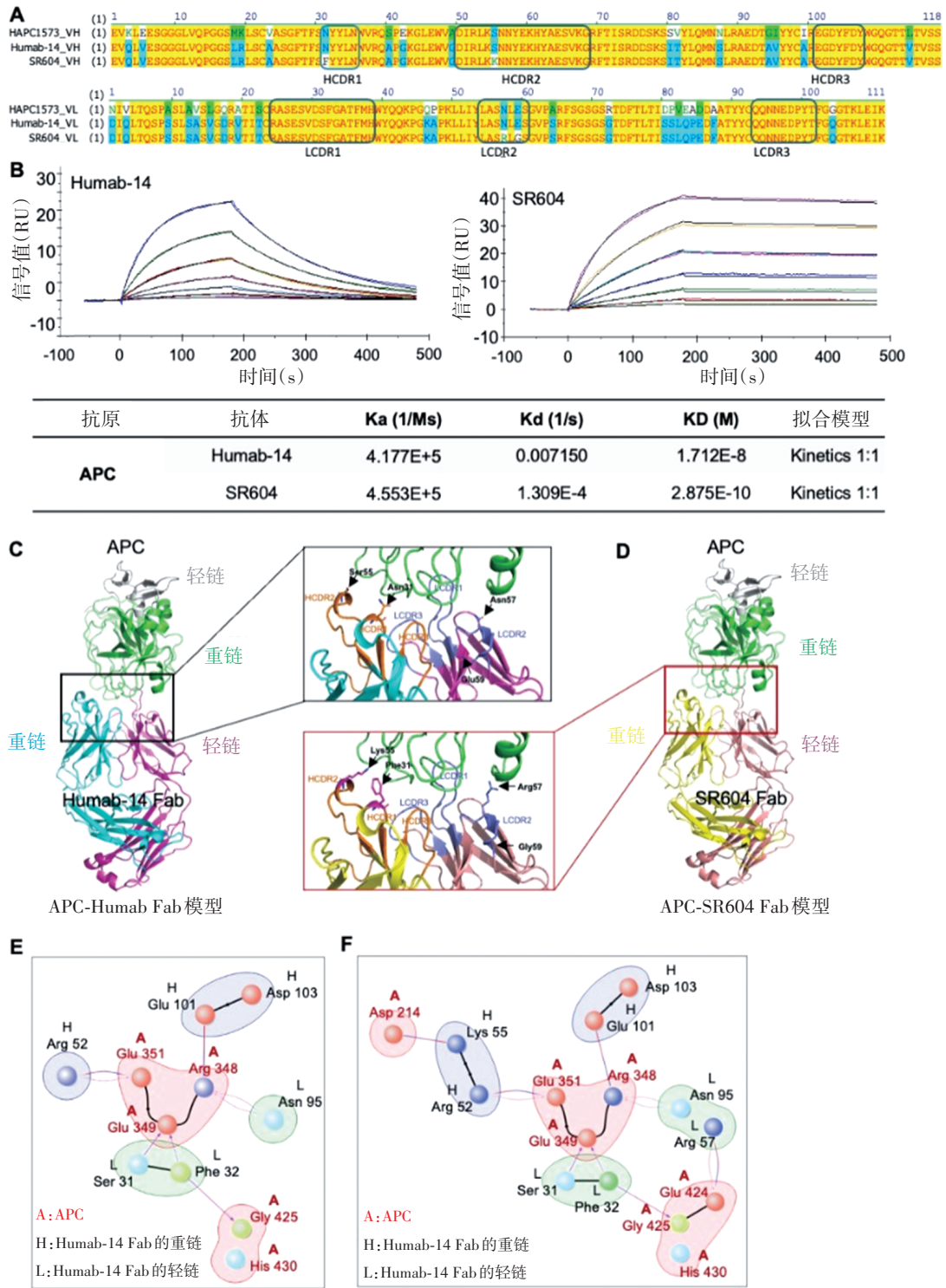
2.1 研究路线

2.1.1 SR604亲和力改善 HAPC1573抗体对APC的亲和力约为10 nM,远高于人血浆中的APC浓度(约40 pM),其亲和力较低,限制了临床的进一步使用。由此,首先构建了HAPC1573的人源化IgG1抗体变体(命名为Humab-14),为改善其药理学活性将人IgG1转换为IgG4;然后对Humab-14互补决定区(complementarity determining region, CDR)中的每个氨基酸进行系统性突变,得到了与人APC结合亲和力提高了60倍的SR604(图1B)。SR604位于重链CDR1和CDR2(HCDR1、HCDR2)中的两个突变以及位于轻链CDR2(LCDR2)中的两个突变有助于对APC的亲和力增强(图1A)。4个突变位于Fab和APC的接合部位,其中,HCDR2中的S55K和LCDR2中的N57R显示其侧链更靠近抗原,并产生新的相互作用(图1D-F)。Fab上S55K和N57R的氨基酸置换是负责增强与APC结合的关键突变。

2.1.2 SR604阻断APC的抗凝活性 在体外,存在蛋白C活化的情况下,SR604能够缩短FV、FVII、FVIII、FIX、FX、FXI和VWF缺乏的人血浆的凝血时间,在FVIII缺乏血浆中对APC抗凝抑制率达到90%(IC90)的浓度为0.25 μg/mL,在FIX缺乏血浆中对APC的IC90浓度为0.49 μg/mL(图2),而90%抑制所需的HAPC1573浓度约为50 μg/mL。

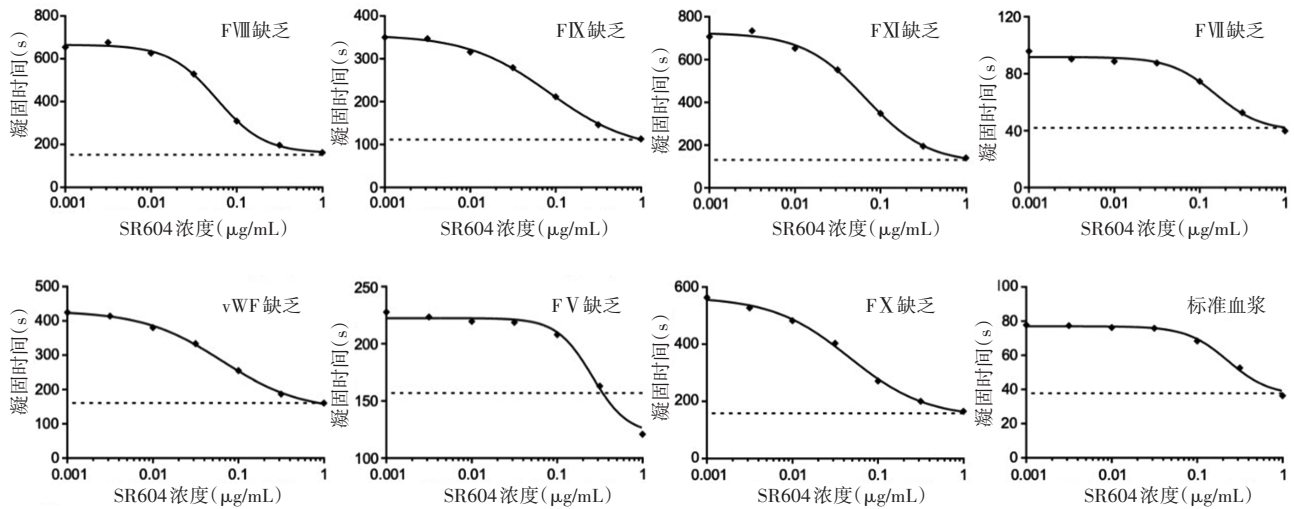
在体内,SR604将血友病小鼠的尾出血纠正至与使用人源性FVIII或PCC相似的程度(图3)。在血友病小鼠膝关节损伤模型中,SR604可改善小鼠的生存情况(图4A),减轻膝关节肿胀程度(图4B)并显著减少小鼠滑膜和基质内衬的炎症和增生(图4C)。

2.1.3 SR604对APC的细胞保护作用无干扰 在体外内皮细胞屏障通透性模型中发现,SR604可维持



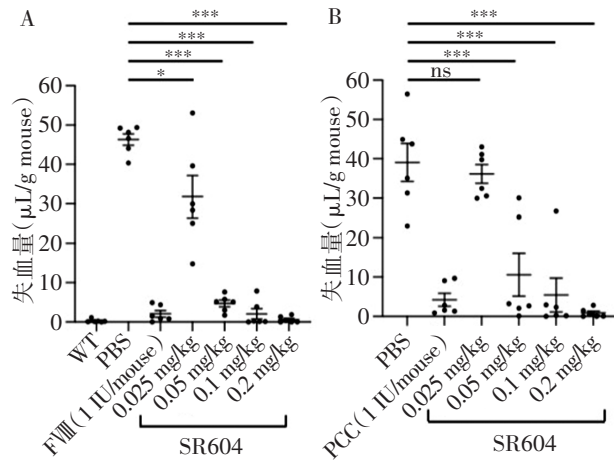
注: A. HAPC1573、Humab-14 和 SR604 可变区的序列比对。CDR 通过 Kabat 编号方案进行注释。B. Biacore 传感图(上图)显示了不同浓度的 Humab-14(左)和 SR604(右)与 APC 结合的结合和解离曲线。下表列出了计算的亲和力参数。RU, 相对单位。C. APC-Humab-14 Fab 复合物模型-通过 Bioluminate 的蛋白质-蛋白质对接模块模拟。D. APC-SR604 Fab 复合物模型。E/F. 通过 Bioluminate(Schrödinger)的蛋白质相互作用分析模块计算 Humab-14 Fab(E)或 SR604 Fab(F)与 APC 之间的蛋白质-蛋白质相互作用。通过 Pymol(Schrödinger)绘制色带和表面图。A, APC; H, 重链; L, 轻链。

图1 SR604 显著改善对 APC 的结合亲和力



注:使用不同凝血因子缺乏血浆,在Protac诱导蛋白C活化的情况下,进行的活化部分凝血活酶时间(aPTT)试验测定凝血时间。每项试验中的虚线代表未使用Protac的凝血时间。数据代表重复试验。

图2 SR604可改善凝血因子缺乏人血浆的凝血



注:以小鼠尾巴横切后 20 min 内每克(g)小鼠的失血量(血红蛋白含量)定量尾出血时间。PROC^{+/+};F8^{-/-}(A)和PROC^{+/+};F9^{-/-}小鼠(B)以指定剂量接受PBS或SR604抗体皮下注射。24 h后,测量尾出血 20 min。作为阳性对照,在割尾前 15 min 对一组PROC^{+/+};F8^{-/-}小鼠眼眶静脉注射FVIII(1 IU/只小鼠),对一组PROC^{+/+};F9^{-/-}小鼠注射PCC(1 IU/只小鼠)。误差线代表SEM(每组n=6只小鼠)。*,P<0.05;***,P<0.001。

图3 SR604可使人源化蛋白C血友病小鼠的尾出血时间正常化

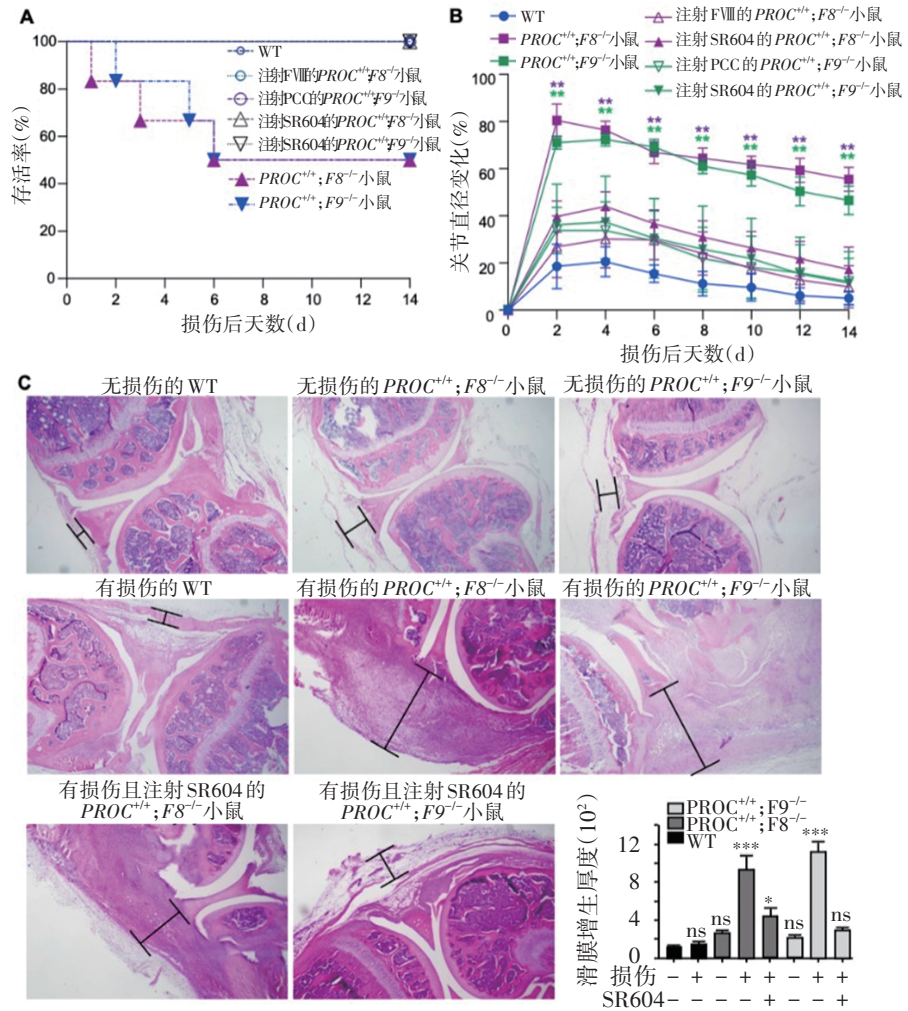
APC对凝血酶诱导的内皮通透性的保护作用(图5),并增强其组蛋白裂解活性(图6)。为进一步评估SR604选择性抑制APC抗凝活性在体内的效果,作者给予人源化蛋白C血友病小鼠亚致死剂量的脂多糖(LPS)。通过HPC4(一种结合蛋白C活化肽以阻断TB/TM激活蛋白C的抗体)抑制蛋白C活化可加重小鼠对亚致死剂量LPS的反应,导致死亡

(图7A)。相比之下,抑制APC抗凝活性的SR604则并未加重PROC^{+/+};F8^{-/-}或PROC^{+/+};F9^{-/-}小鼠的亚致死LPS反应。在PROC^{+/+};F8^{-/-}或PROC^{+/+};F9^{-/-}小鼠中注射亚致死剂量的LPS可引起全身炎症和器官功能障碍,表现为血浆炎症细胞因子IL-6和器官损伤的血生化标志物(如ALT、AST和LDH)升高(图7B-C)。HPC4使这些参数升高,而SR604没有改变这些参数。此外,H&E染色图像和泛炎症细胞标记物(CD45)免疫染色显示,SR604可减少PROC^{+/+};F8^{-/-}或PROC^{+/+};F9^{-/-}小鼠肺组织切片中LPS诱导的炎症细胞浸润,而HPC4没有此作用(图7D-E)。这些结果表明,SR604对APC的内皮屏障保护功能及抗炎功能均无干扰。

2.2 研究意义

SR604为治疗先天性凝血因子缺乏患者提供了新的治疗方案。APC是凝血级联中的负调节因子。当发生血管损伤时,APC可在局部按需生成,内皮表面将蛋白C转化为APC以防止局部凝血。在血友病患者中,当发生血管损伤时,局部生成的APC可阻止凝血,从而加重出血表型。在血友病这类疾病中抑制APC不应存在血栓形成的副作用风险。作者及其他人已证明,在体外凝血因子缺陷的血浆中,存在蛋白C活化时,即使APC抗凝活性受到最大抑制,凝血时间也不会进一步缩短。

与常规的凝血因子产品每周多次静脉注射相



A. 损伤后的存活率。B. 小鼠膝关节直径的变化,以损伤前后数值差与损伤前的百分比计算。用电子卡尺测量针刺伤前及损伤后每隔一天的膝关节直径。每组 $n=6$ 只小鼠。**, $P<0.01$ 。C. H&E 染色的膝关节组织的显微图像(原始放大倍数 $\times 20$)。标记区域显示了滑膜和基质内衬的炎症和增生。条形图表示的是炎症和增生滑膜和基质内衬厚度的定量结果。每组 $n=3$ 只小鼠。*, $P<0.05$; ***, $P<0.001$

图4 SR604可显著提高人源化蛋白C血友病小鼠的存活率并改善膝关节损伤处的炎症

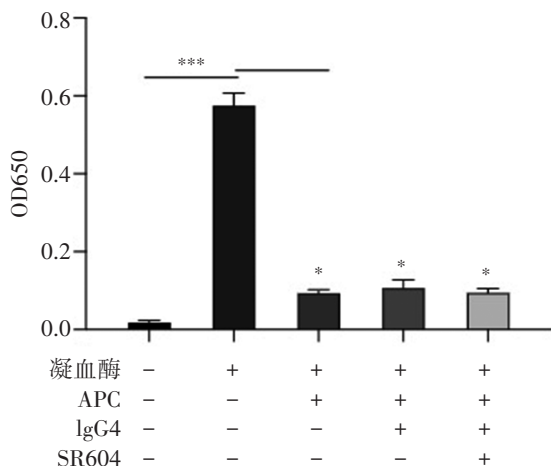


图5 凝血酶诱导的伊文思蓝染料穿过细胞单层的通量

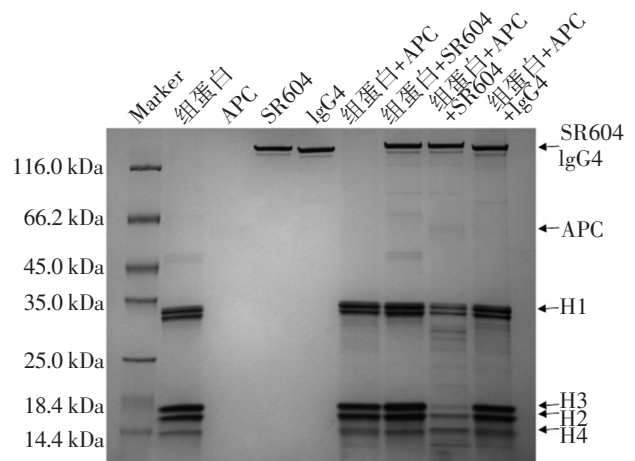
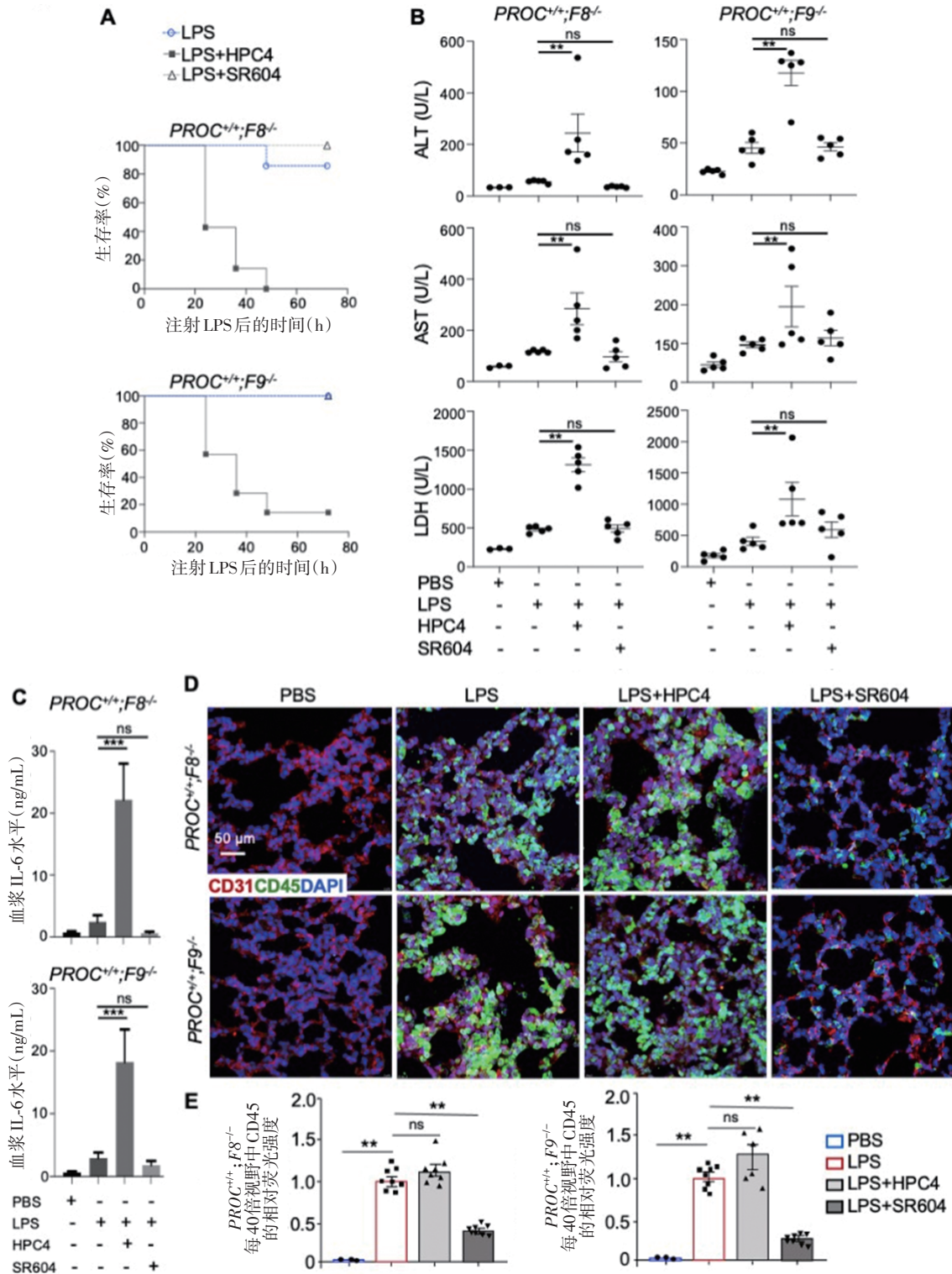


图6 SR604增强APC裂解组蛋白



注:对 8 周龄雄性 PROC^{+/+};F8^{-/-}和 PROC^{+/+};F9^{-/-}小鼠静脉注射 SR604(0.5 mg/kg)或 HPC4(0.5 mg/kg),然后腹腔注射 LPS(10 mg/kg)。A.不同组小鼠的生存率。每 12 h 检查一次小鼠,连续检查 3 d,并记录 LPS 刺激后生存率。B/C.小鼠血浆中 ALT、AST、LDH 和 IL6 的浓度水平。*,*P*<0.05;**,*P*<0.01;***,*P*<0.001。D/E.肺冷冻切片免疫荧光染色的代表性共聚焦图像。CD31 标记内皮细胞。CD45 标记炎性细胞。DAPI,核染色。使用 ImageJ 软件定量 CD45 阳性细胞。

图 7 SR604 对人源化蛋白 C 血友病小鼠 APC 的细胞保护和内皮屏障功能无干扰

比,SR604 不依赖某个凝血因子的治疗途径,在有抑制物的血友病患者中应该也会有效。基于抗体治疗血友病方法(如舒友立乐或 Marstacimab)的一个主要优势是其皮下注射的间隔更长。然而,在局部皮下注射部位存在一过性高浓度的非凝血因子促凝剂,可能触发不必要的局部凝血,并在注射部位的周围引发血栓形成的副作用。基于 SR604 特异性抑制 APC 抗凝活性的作用机制,在凝血因子缺乏或缺陷的血友病患者中,皮下注射高浓度的 SR604 不会引发不必要的血栓副作用。

血友病患者的预防性治疗是一个终身治疗过程。这些患者可能无法避免感染和炎症,而 SR604 保留了 APC 的细胞保护作用,预计长期使用 SR604 不会影响血友病患者对炎症性疾病的抵抗性。

在体外实验中,SR604 增强 APC 裂解组蛋白的活性,这是急性感染期间 APC 的重要抗炎功能之一,表明 SR604 也可能是研究 APC 这种抗炎活性机制的有效工具^[7]。

作者贡献声明 彭龙姣负责撰写文章;程露负责修改文章语言并监督此项目

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李天逸,江淼,夏利军. 治疗血友病的新策略:抑制抗凝系统[J]. 血栓与止血学,2022,28(05):1181-1186.
- [2] Esmon C T. Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway[J]. *Semin Thromb Hemost*, 2006, 32 Suppl 1:49-60.
- [3] Esmon C T. Coagulation and inflammation[J]. *J Endotoxin Res*, 2003, 9(3):192-198.
- [4] Christiaans S C, Wagener B M, Esmon C T, et al. Protein C and acute inflammation: a clinical and biological perspective [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305(7): L455-L466.
- [5] Esmon C T. The protein C pathway [J]. *Chest*, 2003, 124 (3 Suppl):26S-32S.
- [6] Jiang M, Yang F, Jiang Y, et al. Safety and efficacy of an anti-human APC antibody for prophylaxis of congenital factor deficiencies in preclinical models [J]. *Blood*, 2023, 142(12): 1071-1081.
- [7] Preston R. New targeted therapy for hemophilia [J]. *Blood*, 2023, 142(12):1032-1034.

(收稿日期:2024-03-19)

(本文编辑:钱婷婷;本文审校:叶絮)