



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 117120084 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 24

(21) 申请号 202280024112.3

M • 扬

(22) 申请日 2022.01.28

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

(30) 优先权数据

PCT/EP2021/052000 2021.01.28 EP

21189996.8 2021.08.05 EP

专利代理师 刘文娜 黄健

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.09.22

(51) Int.Cl.
A61K 39/12 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/052148 2022.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02022/162203 EN 2022.08.04

(71) 申请人 维肯芬特有限责任公司
地址 德国布赖斯高
申请人 乌尔姆大学

权利要求书5页 说明书80页
序列表15页 附图43页

(72) 发明人 H • 祖玛-韦纳赫特 T • 阿蒙特

(54) 发明名称
用于调节B细胞介导的免疫应答的方法和手段

(57) 摘要
本发明涉及用于通过使B细胞与特定比率的可溶性单一单价抗原和复合多价抗原接触来进行B细胞介导的免疫应答的靶向调节的方法和手段。B细胞免疫的靶向调节可用于哺乳动物中与抗体介导的免疫相关的各种病症的诊断和治疗。此类病症包括增殖性病患诸如癌症、自身免疫病患、病原性感染、炎性疾病、过敏和食物不耐受。本发明基于这样的观察：复合多价抗原结构诱导强IgG型抗体B细胞应答，而令人惊奇的是单价抗原结构具有抑制此类IgG应答的能力，或者甚至在自身抗原的情况下诱导保护性IgM应答。本发明在这方面提供了方法、组合物、治疗剂、诊断剂和食品添加剂。

1. 一种组合物,其包含:

(i) 单价抗原颗粒,其包含抗原部分,所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,和

(ii) 多价抗原颗粒,其包含抗原部分,所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构,并且其中所述多于一种抗原结构是交联的。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中多价抗原颗粒包含多种相同的抗原结构。

3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其中所述单价抗原颗粒进一步包含与所述抗原部分偶联的载体部分,并且其中所述载体不包含所述抗原结构的另一拷贝。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中所述多价抗原颗粒进一步包含与所述抗原部分偶联的载体部分。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述载体部分包含选自下组的结构:多肽、免疫CpG岛、凝血素(KLH)、破伤风类毒素(TT)、霍乱毒素B亚单位(CTB)、细菌或细菌菌影、脂质体、壳质体、病毒体、微球、树突状细胞、颗粒、微颗粒、纳米颗粒或珠子。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述多价抗原颗粒包含所述抗原结构的与彼此空间邻近的至少两个拷贝。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述抗原结构的至少两个拷贝与彼此在3nm至20nm的范围内。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中所述靶抗原包含选自下组的至少一种试剂:核酸、碳水化合物、肽和半抗原。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述多价抗原颗粒包含具有用于蛋白质缀合的交联反应性基团的接头,优选具有用于稳定蛋白质缀合的交联反应性基团的接头。

10. 根据权利要求9所述的组合物,其中所述交联反应性基团是选自羧基至胺反应性基团、胺反应性基团、巯基反应性基团、醛反应性基团和光反应性基团的基团。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述交联反应性基团是选自碳二亚胺、NHS酯、亚氨酸酯、五氟苯酯、羟甲基磷、马来酰亚胺、卤代乙酰基、酰肼、烷氧基胺、二氮丙啶和芳基叠氮化物的基团。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的组合物,其中所述多价抗原颗粒与佐剂连接,优选其中所述多价颗粒与佐剂共价连接,优选其中所述佐剂是IgG。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的组合物,其中单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的比率大于1,优选大于 10^1 ,更优选大于 10^2 ,更优选大于 10^3 ,更优选大于 10^4 。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

15. 一种引发和/或调节体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 使一种或多种B细胞与根据权利要求1至14中任一项所述的组合物接触;和

b) 引发和/或调节体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答包括对所述靶抗原具有特异性的一种或多种抗体和/或B细胞受体和/或其变体。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中所述B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答涉及表达免疫球蛋白 (Ig)M、IgD、IgA或IgG型抗体的B细胞和/或B细胞受体。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答涉及表达免疫球蛋白 (Ig)M、IgA和/或IgG型抗体的B细胞。

19. 根据权利要求15至18中任一项所述的方法, 其中引发的B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答包括引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体。

20. 一种用于获得保护性-调节性抗体的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 根据权利要求19所述的方法引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体; 和

(b) 分离成熟的寡聚抗体, 其中

(i) 相比于所述IgG型抗体, 所述寡聚抗体的结合对于所述靶抗原更具特异性, 优选地其中所述寡聚抗体对于所述靶抗原是单特异性的; 和/或

(ii) 所述寡聚抗体对于所述靶抗原的结合亲和力等于或高于IgG型抗体, 优选地其中所述保护性-调节性抗体以小于 10^{-7} , 优选小于 10^{-8} , 更优选小于 10^{-9} , 并且最优选在约 10^{-10} 至约 10^{-12} 的范围内的 K_d 与所述靶抗原结合,

以获得对所述靶抗原的功能为保护性-调节性的所述保护性-调节性抗体。

21. 一种根据权利要求20所述的方法可获得的保护性-调节性抗体或其变体或片段, 其对所述靶抗原的功能为保护性-调节性。

22. 根据权利要求21所述的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中所述保护性-调节性抗体、变体或片段包含a) 如SEQ ID NO:4中定义的CDR3和包含如SEQ ID NO:7中定义的CDR3的可变轻 (VL) 链; b) 包含如SEQ ID NO:11中定义的CDR3的可变重 (VH) 链和包含如SEQ ID NO:14中定义的CDR3的可变轻 (VL) 链; 或c) 包含如SEQ ID NO:18中定义的CDR3的可变重 (VH) 链和包含如SEQ ID NO:21中定义的CDR3的可变轻 (VL) 链。

23. 根据权利要求22所述的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中所述保护性-调节性抗体、变体或片段包含:

a) 可变重 (VH) 链, 其包含如SEQ ID NO:2中定义的CDR1、如SEQ ID NO:3中定义的CDR2和如SEQ ID NO:4中定义的CDR3; 和可变轻 (VL) 链, 其包含如SEQ ID NO:6中定义的CDR1、如通过序列DAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:7中定义的CDR3;

b) 可变重 (VH) 链, 其包含如SEQ ID NO:9中定义的CDR1、如SEQ ID NO:10中定义的CDR2和如SEQ ID NO:11中定义的CDR3; 和可变轻 (VL) 链, 其包含如SEQ ID NO:13中定义的CDR1、如通过序列GAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:14中定义的CDR3; 或者

c) 可变重 (VH) 链, 其包含如SEQ ID NO:16中定义的CDR1、如SEQ ID NO:17中定义的CDR2和如SEQ ID NO:18中定义的CDR3; 和可变轻 (VL) 链, 其包含如SEQ ID NO:20中定义的CDR1、如通过序列DAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:21中定义的CDR3。

24. 根据权利要求21至23中任一项所述的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中所述保护性-调节性抗体、变体或片段

a) 包含: 可变重 (VH) 链序列, 其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列; 和可变轻 (VL) 链序列, 其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;

b) 包含: 可变重 (VH) 链序列, 其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有

至少90%、优选至少95%序列同一性的序列；和可变轻(VL)链序列，其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列；或者

c) 包含：可变重(VH)链序列，其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列；和可变轻(VL)链序列，其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列。

25. 一种多核苷酸，其编码根据权利要求21至24中任一项所述的保护性-调节性抗体、变体或片段。

26. 一种载体，其包含根据权利要求25所述的多核苷酸。

27. 一种宿主细胞，其包含根据权利要求26所述的多核苷酸。

28. 一种用于产生抗体的方法，所述方法包括培养根据权利要求27所述的宿主细胞。

29. 根据权利要求1至14所述的组合物，其进一步包含根据权利要求21至24所述的保护性-调节性抗体、变体或片段和/或根据权利要求26所述的载体。

30. 一种药物产品，其包含治疗剂和

a) 根据权利要求1至14、29中任一项所述的组合物；

b) 根据权利要求21至24所述的保护性-调节性抗体、变体或片段；

c) 根据权利要求26所述的载体；和/或

d) 单价抗原颗粒，其中所述单价抗原颗粒由抗原部分组成，所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构，

其中所述治疗剂是所述靶抗原。

31. 根据权利要求30所述的药物产品，其中所述治疗剂是治疗性抗体。

32. 根据权利要求1至14、29中任一项所述的组合物，根据权利要求21至24所述的保护性-调节性抗体、变体或片段，根据权利要求26所述的载体，或者根据权利要求30或31所述的药物产品，其用于作为药物使用。

33. 根据权利要求32所述使用的组合物，根据权利要求32所述使用的药物产品，根据权利要求32所述使用的载体，或者根据权利要求32所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段，其用于在治疗和/或预防体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患中使用。

34. 根据权利要求32或33所述使用的组合物，根据权利要求32或33所述使用的药物产品，根据权利要求32或33所述使用的载体，或者根据权利要求32或33所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段，其中所述体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患是自身免疫疾病或病症或者同种免疫疾病或病患，优选其中所述靶抗原是自身抗原。

35. 根据权利要求32至34中任一项所述使用的组合物，根据权利要求32至34所述使用的药物产品，根据权利要求32至34所述使用的载体，或者根据权利要求32至34中任一项所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段，其中所述体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患或者所述自身免疫疾病或病症或者同种免疫疾病或病患是抗体介导的疾病或病症。

36. 根据权利要求35所述使用的组合物，根据权利要求35所述使用的药物产品，根据权利要求35所述使用的载体，或者根据权利要求35所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段，其中所述靶抗原是胰岛素并且所述抗体介导的疾病或病患是胰岛素相关的疾病或病患

37. 根据权利要求36所述使用的组合物，根据权利要求36所述使用的药物产品，或者根

据权利要求36所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中根据权利要求36所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段小于 10^{-7} ,优选小于 10^{-8} ,更优选小于 10^{-9} ,并且最优选在约 10^{-10} 至约 10^{-12} 的范围内的 K_d 与胰岛素结合。

38. 根据权利要求36或37所述使用的组合物,根据权利要求36或37所述使用的药物产品,根据权利要求36所述使用的载体,或者根据权利要求36或37所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中所述胰岛素介导的疾病或病患是糖尿病或其症状。

39. 根据权利要求38所述使用的组合物,根据权利要求38所述使用的药物产品,根据权利要求38所述使用的载体,或者根据权利要求38所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中所述糖尿病选自下组:1型糖尿病、2型糖尿病和妊娠期糖尿病。

40. 根据权利要求39所述使用的组合物,根据权利要求39所述使用的药物产品,根据权利要求39所述使用的载体,或者根据权利要求39所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中所述糖尿病是1型糖尿病。

41. 根据权利要求32或33所述使用的组合物,根据权利要求32或33所述使用的药物产品,根据权利要求32或33所述使用的载体,或者根据权利要求32或33所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中所述靶抗原是癌症相关抗原或病原体相关抗原。

42. 根据权利要求41所述使用的组合物,根据权利要求41所述使用的药物产品,根据权利要求41所述使用的载体,或者根据权利要求41所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中所述体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患是感染,并且其中所述靶抗原是病原体相关抗原,优选其中所述病原体是选自下组的至少一种病原体:寄生虫、单细胞真核生物、细菌、病毒和病毒粒子。

43. 根据权利要求41至42所述使用的组合物或根据权利要求41至42所述使用的药物产品,其中治疗包括在所述多价抗原颗粒之前施用所述单价抗原颗粒。

44. 根据权利要求32至43所述使用的组合物或根据权利要求32至43所述使用的药物产品,其中治疗和/或预防包括至少两个施用时间点。

45. 一种单价抗原颗粒,其中所述单价抗原颗粒由抗原部分组成,所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,根据权利要求1至14、29中任一项所述的组合物,根据权利要求21至24所述的保护性-调节性抗体、变体或片段,根据权利要求26所述的载体,或者根据权利要求30或31所述的药物产品,其用于在治疗和/或预防由以下表征的疾病中使用

(i) 存在与所述靶抗原结合的免疫球蛋白G (IgG) 型抗体,其中所述IgG型抗体的结合降低了所述靶抗原的功能;和/或

(ii) 存在内源多价抗原颗粒,其由包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构的抗原部分组成,并且其中所述多于一种抗原结构是交联的。

46. 根据权利要求45所述使用的单价抗原颗粒、根据权利要求45所述使用的药物产品、或根据权利要求45所述使用的组合物,其中所述治疗和/或预防包括以导致单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的(组织)含量比大于1,优选大于 10^1 ,更优选大于 10^2 ,更优选大于 10^3 ,更优选大于 10^4 的剂量使用所述单价抗原颗粒。

47. 一种多价抗原颗粒,其中所述多价抗原颗粒由抗原部分组成,所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构,并且其中所述多于一种抗

原结构是交联的,根据权利要求1至14、29中任一项所述的组合物,或者根据权利要求30或31所述的药物产品,其用于在治疗和/或预防由以下表征的疾病中使用

(i) 存在与所述靶抗原结合的寡聚抗体,其中所述寡聚抗体的结合保护所述靶抗原的功能;和/或

(ii) 存在单价抗原颗粒,其中所述单价抗原颗粒由抗原部分组成,所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构。

48. 根据权利要求32至47所述使用的载体,根据权利要求32至47所述使用的药物产品,或者根据权利要求32至47所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中待治疗的受试者患有IgD型抗体相关的遗传缺陷。

49. 根据权利要求32至48所述使用的载体,根据权利要求32至48所述使用的药物产品,或者根据权利要求32至48所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中所述待治疗的受试者是儿科受试者,优选是11岁以下的儿科受试者。

用于调节B细胞介导的免疫应答的方法和手段

技术领域

[0001] 本发明涉及用于通过使B细胞与特定比率的可溶性单一单价抗原和复合多价抗原接触来进行B细胞介导的免疫应答的靶向调节的方法和手段。B细胞免疫的靶向调节可用于哺乳动物中与抗体介导的免疫相关的各种病症的诊断和治疗。此类病症包括增殖性病患诸如癌症、自身免疫病患、病原性感染、炎性疾病、过敏和食物不耐受。本发明基于这样的观察：复合多价抗原结构诱导强IgG型抗体B细胞应答，而令人惊奇的是单价抗原结构具有抑制此类IgG应答的能力，或者甚至在自身抗原的情况下诱导保护性IgM应答。本发明在这方面提供了方法、组合物、治疗剂、诊断剂和食品添加剂。

[0002] 说明

[0003] 自我耐受对于通过避免自身免疫反应来维持生理完整性至关重要。目前，绝对中枢和外周耐受据信在B细胞发育期间控制B细胞受体 (BCR) 库，从而阻止自身反应性B细胞的阳性选择[1, 2, 4]。据推测，在骨髓中的早期B细胞发育期间，中枢耐受会迫使自身反应性B细胞缺失[2, 5-7]。此外，逃避克隆缺失的自身反应性B细胞会受到受体编辑，从而产生非自身反应性BCR特异性[8-10]。绕过中枢耐受并迁移到外周的自身反应性B细胞被克隆无能（外周耐受）抵消，主要通过IgM BCR表达下调而导致无应答[1, 11-13]。然而，绝大多数血清IgM具有自身反应性的发现似乎与普遍消除自身反应性的概念形成鲜明对比[14]。事实上，所谓的天然多反应性IgM在体内平衡中发挥着重要作用[15]，反对绝对消除自身反应性抗体。

[0004] 有趣的是，研究表明，疾病特异性自身反应性B细胞存在于免疫前库中，并且在野生型小鼠中可以形成对胰岛素（一种常见自身抗原）具有特异性的生发中心 (GC)，这与中央B细胞耐受的概念相矛盾[16, 17]。

[0005] 在过去的几十年里，B细胞自身免疫研究主要集中在转基因小鼠模型上[1, 2, 5, 18, 19]。由于多种原因，这些模型在研究自身免疫方面的有用性引起了激烈的争论[20]。用高亲和力突变的自身反应性BCR替换种系构型不仅会导致B细胞发育期间的非典型情况，还会产生单特异性库[1, 5, 19]。此外，这些抗原的可用性、效价和形式（可溶性与膜结合性）等特征尚未得到充分解决[5, 18]。此外，抗原本身与已知的自身免疫疾病没有任何相关性[21, 22]。

[0006] 流行病学研究表明，工业化国家高达5%的人口患有自身免疫疾病，诸如类风湿性关节炎 (RA)、系统性红斑狼疮 (SLE) 或1型糖尿病 (T1D) [21]。值得注意的是，自身抗体存在于绝大多数自身免疫疾病中，并且往往是发病机制的驱动力[22]。

[0007] 因此，持续需要开发用于免疫应答的可控调节的方法，以便检测或治疗或避免由受试者中免疫应答的存在或活性诱导或表征的病症。

[0008] 上述技术问题通过本文公开的和如权利要求中定义的实施例来解决。

[0009] 因此，本发明尤其涉及以下实施例：

[0010] 1. 一种组合物，其包含：

[0011] (i) 单价抗原颗粒，其包含抗原部分，该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体

介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,和

[0012] (ii) 多价抗原颗粒,其包含抗原部分,该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构,并且其中该多于一种抗原结构是交联的。

[0013] 2. 根据实施例1所述的组合物,其中多价抗原颗粒包含多种相同的抗原结构。

[0014] 3. 根据实施例1或2所述的组合物,其中该单价抗原颗粒进一步包含与该抗原部分偶联的载体部分,并且其中该载体不包含该抗原结构的另一拷贝。

[0015] 4. 根据实施例1至3中任一项所述的组合物,其中该多价抗原颗粒进一步包含与该抗原部分偶联的载体部分。

[0016] 5. 根据实施例4所述的组合物,其中该载体部分包含选自下组的结构:多肽、免疫CpG岛、减毒蓝素(KLH)、破伤风类毒素(TT)、霍乱毒素B亚单位(CTB)、细菌或细菌菌影、脂质体、壳质体、病毒体、微球、树突状细胞、颗粒、微颗粒、纳米颗粒或珠子。

[0017] 6. 根据实施例1至5中任一项所述的组合物,其中该多价抗原颗粒包含该抗原结构的与彼此空间邻近的至少两个拷贝。

[0018] 7. 根据实施例6所述的组合物,其中该抗原结构的至少两个拷贝与彼此在3nm至20nm的范围内。

[0019] 8. 根据实施例1至7中任一项所述的组合物,其中该靶抗原包含选自下组的至少一种试剂:核酸、碳水化合物、肽和半抗原。

[0020] 9. 根据实施例1至8中任一项所述的组合物,其中该多价抗原颗粒包含具有用于蛋白质缀合的交联反应性基团的接头,优选具有用于稳定蛋白质缀合的交联反应性基团的接头。

[0021] 10. 根据实施例9所述的组合物,其中该交联反应性基团是选自羧基至胺反应性基团、胺反应性基团、巯基反应性基团、醛反应性基团和光反应性基团的基团。

[0022] 11. 根据实施例10所述的组合物,其中该交联反应性基团是选自碳二亚胺、NHS酯、亚氨酸酯、五氟苯酯、羟甲基磷、马来酰亚胺、卤代乙酰基、酰肼、烷氧基胺、二氮丙啶和芳基叠氮化物的基团。

[0023] 12. 根据实施例1至11中任一项所述的组合物,其中该多价抗原颗粒与佐剂连接,优选其中该多价颗粒与佐剂共价连接,优选其中该佐剂是IgG。

[0024] 13. 根据实施例1至12中任一项所述的组合物,其中单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的比率大于1,优选大于 10^1 ,更优选大于 10^2 ,更优选大于 10^3 ,更优选大于 10^4 。

[0025] 14. 根据实施例1至13中任一项所述的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0026] 15. 一种引发和/或调节体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,该方法包括以下步骤:

[0027] a) 使一种或多种B细胞与实施例1至14中任一项所述的组合物接触;和

[0028] b) 引发和/或调节体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答。

[0029] 16. 根据实施例15所述的方法,其中该B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答包括对该靶抗原具有特异性的一种或多种抗体和/或B细胞受体和/或其变体。

[0030] 17. 根据实施例16所述的方法,其中该B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答涉及表达免疫球蛋白(Ig)M、IgD、IgA或IgG型抗体的B细胞和/或B细胞受体。

[0031] 18.根据实施例17所述的方法,其中该B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答涉及表达免疫球蛋白(Ig)M、IgA和/或IgG型抗体的B细胞。

[0032] 19.根据实施例15至18中任一项所述的方法,其中该引发的B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答包括引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体。

[0033] 20.一种用于获得保护性-调节性抗体的方法,该方法包括以下步骤:

[0034] (a) 根据实施例19所述的方法引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体;和

[0035] (b) 分离成熟的寡聚抗体,其中

[0036] (i) 相比于所述IgG型抗体,该寡聚抗体的结合对于该靶抗原更具特异性,优选地其中该寡聚抗体对于该靶抗原是单特异性的;和/或

[0037] (ii) 该寡聚抗体对于该靶抗原的结合亲和力等于或高于IgG型抗体,优选地其中该保护性-调节性抗体以小于 10^{-7} ,优选小于 10^{-8} ,更优选小于 10^{-9} ,并且最优选在约 10^{-10} 至约 10^{-12} 的范围内的 K_d 与所述靶抗原结合,

[0038] 以获得对该靶抗原的功能为保护性-调节性的该保护性-调节性抗体。

[0039] 21.一种根据实施例20所述的方法可获得的保护性-调节性抗体或其变体或片段,其对该靶抗原的功能为保护性-调节性。

[0040] 22.根据实施例21所述的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中该保护性-调节性抗体、变体或片段包含a) 如SEQ ID NO:4中定义的CDR3和包含如SEQ ID NO:7中定义的CDR3的可变轻(VL)链;b) 包含如SEQ ID NO:11中定义的CDR3的可变重(VH)链和包含如SEQ ID NO:14中定义的CDR3的可变轻(VL)链;或c) 包含如SEQ ID NO:18中定义的CDR3的可变重(VH)链和包含如SEQ ID NO:21中定义的CDR3的可变轻(VL)链。

[0041] 23.根据实施例22所述的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中该保护性-调节性抗体、变体或片段包含:

[0042] a) 可变重(VH)链,其包含如SEQ ID NO:2中定义的CDR1、如SEQ ID NO:3中定义的CDR2和如SEQ ID NO:4中定义的CDR3;和可变轻(VL)链,其包含如SEQ ID NO:6中定义的CDR1、如通过序列DAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:7中定义的CDR3;

[0043] b) 可变重(VH)链,其包含如SEQ ID NO:9中定义的CDR1、如SEQ ID NO:10中定义的CDR2和如SEQ ID NO:11中定义的CDR3;和可变轻(VL)链,其包含如SEQ ID NO:13中定义的CDR1、如通过序列GAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:14中定义的CDR3;或者

[0044] c) 可变重(VH)链,其包含如SEQ ID NO:16中定义的CDR1、如SEQ ID NO:17中定义的CDR2和如SEQ ID NO:18中定义的CDR3;和可变轻(VL)链,其包含如SEQ ID NO:20中定义的CDR1、如通过序列DAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:21中定义的CDR3。

[0045] 24.根据实施例21至23中任一项所述的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中该保护性-调节性抗体、变体或片段

[0046] a) 包含:可变重(VH)链序列,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;和可变轻(VL)链序列,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;

[0047] b) 包含:可变重(VH)链序列,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;和可变轻(VL)链序列,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;或者

[0048] c) 包含: 可变重 (VH) 链序列, 其包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 15 具有至少 90%、优选至少 95% 序列同一性的序列; 和可变轻 (VL) 链序列, 其包含 SEQ ID NO: 19 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO: 19 具有至少 90%、优选至少 95% 序列同一性的序列。

[0049] 25. 一种多核苷酸, 其编码根据实施例 21 至 24 中任一项所述的保护性-调节性抗体、变体或片段。

[0050] 26. 一种载体, 其包含根据实施例 25 所述的多核苷酸。

[0051] 27. 一种宿主细胞, 其包含根据实施例 26 所述的多核苷酸。

[0052] 28. 一种用于产生抗体的方法, 该方法包括培养根据实施例 27 所述的宿主细胞。

[0053] 29. 根据实施例 1 至 14 所述的组合物, 其进一步包含根据实施例 21 至 24 所述的保护性-调节性抗体、变体或片段和/或根据实施例 26 所述的载体。

[0054] 30. 一种药物产品, 其包含治疗剂和

[0055] a) 根据实施例 1 至 14、29 中任一项所述的组合物;

[0056] b) 根据实施例 21 至 24 所述的保护性-调节性抗体、变体或片段;

[0057] c) 根据实施例 26 所述的载体; 和/或

[0058] d) 单价抗原颗粒, 其中该单价抗原颗粒由抗原部分组成, 所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,

[0059] 其中该治疗剂是该靶抗原。

[0060] 31. 根据实施例 30 所述的药物产品, 其中该治疗剂是治疗性抗体。

[0061] 32. 根据实施例 1 至 14、29 中任一项所述的组合物, 根据实施例 21 至 24 所述的保护性-调节性抗体、变体或片段, 根据实施例 26 所述的载体, 或者根据实施例 30 或 31 所述的药物产品, 其用于作为药物使用。

[0062] 33. 根据实施例 32 所述使用的组合物, 根据实施例 32 所述使用的药物产品, 根据实施例 32 所述使用的载体, 或者根据实施例 32 所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其用于在治疗和/或预防体液和/或 B 细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患中使用。

[0063] 34. 根据实施例 32 或 33 所述使用的组合物, 根据实施例 32 或 33 所述使用的药物产品, 根据实施例 32 或 33 所述使用的载体, 或者根据实施例 32 或 33 所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中所述体液和/或 B 细胞介导的靶抗原特异性疾病或病症是自身免疫疾病或病患或者同种免疫疾病或病患, 优选其中该靶抗原是自身抗原。

[0064] 35. 根据实施例 32 至 34 中任一项所述使用的组合物, 根据实施例 32 至 34 所述使用的药物产品, 根据实施例 32 至 34 所述使用的载体, 或者根据实施例 32 至 34 中任一项所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该体液和/或 B 细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患或者自身免疫疾病或病患或者同种免疫疾病或病患是抗体介导的疾病或病患。

[0065] 36. 根据实施例 35 所述使用的组合物, 根据实施例 35 所述使用的药物产品, 根据实施例 35 所述使用的载体, 或者根据实施例 35 所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该靶抗原是胰岛素并且该抗体介导的疾病或病患是胰岛素相关的疾病或病患。

[0066] 37. 根据实施例 36 所述使用的组合物, 根据实施例 36 使用的药物产品, 或者根据实施例 36 所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中根据实施例 36 所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段与胰岛素结合的 K_d 小于 10^{-7} , 优选小于 10^{-8} , 更优选小于 10^{-9} , 并且最优选在约 10^{-10} 至约 10^{-12} 的范围内。

[0067] 38. 根据实施例36或37所述使用的组合物, 根据实施例36或37所述使用的药物产品, 根据实施例36所述使用的载体, 或者根据实施例36或37所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该胰岛素介导的疾病或病患是糖尿病或其症状。

[0068] 39. 根据实施例38所述使用的组合物, 根据实施例38所述使用的药物产品, 根据实施例38所述使用的载体, 或者根据实施例38所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该糖尿病选自下组: 1型糖尿病、2型糖尿病和妊娠期糖尿病。

[0069] 40. 根据实施例39所述使用的组合物, 根据实施例39所述使用的药物产品, 根据实施例39所述使用的载体, 或者根据实施例39所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该糖尿病是1型糖尿病。

[0070] 41. 根据实施例32或33所述使用的组合物, 根据实施例32或33所述使用的药物产品, 根据实施例32或33所述使用的载体, 或者根据实施例32或33所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该靶抗原是癌症相关抗原或病原体相关抗原。

[0071] 42. 根据实施例41所述使用的组合物, 根据实施例41所述使用的药物产品, 根据实施例41所述使用的载体, 或者根据实施例41所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患是感染, 并且其中该靶抗原是病原体相关抗原, 优选其中该病原体是选自下组的至少一种病原体: 寄生虫、单细胞真核生物、细菌、病毒和病毒粒子。

[0072] 43. 根据实施例41至42所述使用的组合物或根据实施例41至42所述使用的药物产品, 其中治疗包括在该多价抗原颗粒之前施用该单价抗原颗粒。

[0073] 44. 根据实施例32至43所述使用的组合物或根据实施例32至43所述使用的药物产品, 其中治疗和/或预防包括至少两个施用时间点。

[0074] 45. 一种单价抗原颗粒, 其中所述单价抗原颗粒由抗原部分组成, 所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构, 根据实施例1至14、29中任一项所述的组合物, 根据实施例21至24所述的保护性-调节性抗体、变体或片段, 根据实施例26所述的载体, 或者根据实施例30或31所述的药物产品, 其用于在治疗和/或预防由以下表征的疾病中使用

[0075] (i) 存在与该靶抗原结合的免疫球蛋白G(IgG)型抗体, 其中该IgG型抗体的结合降低了所述靶抗原的功能; 和/或

[0076] (ii) 存在内源多价抗原颗粒, 其由包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构的抗原部分组成, 并且其中多于一种抗原结构是交联的。

[0077] 46. 根据实施例45所述使用的单价抗原颗粒、根据实施例45所述使用的药物产品、或者根据实施例45所述使用的组合物, 其中该治疗和/或预防包括以导致单价抗原颗粒: 多价抗原颗粒的(组织)含量比率大于1, 优选大于 10^1 , 更优选大于 10^2 , 更优选大于 10^3 , 更优选大于 10^4 的剂量使用单价抗原颗粒。

[0078] 47. 一种多价抗原颗粒, 其中所述多价抗原颗粒由抗原部分组成, 所述抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构, 并且其中该多于一种抗原结构是交联的, 根据实施例1至14、29中任一项所述的组合物, 或根据实施例30或31所述的药物产品, 其用于在治疗和/或预防由以下表征的疾病中使用

[0079] (i) 存在与该靶抗原结合的寡聚抗体, 其中该寡聚抗体的结合保护靶抗原的功能;

和/或

[0080] (ii) 存在单价抗原颗粒, 其中该单价抗原颗粒由抗原部分组成, 该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构。

[0081] 48. 根据实施例32至47所述使用的载体, 根据实施例32至47所述使用的药物产品, 或者根据实施例32至47所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中待治疗的受试者患有IgD型抗体相关的遗传缺陷。

[0082] 49. 根据实施例32至48所述使用的载体, 根据实施例32至48所述使用的药物产品, 或者根据实施例32至48所述使用的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该待治疗的受试者是儿科受试者, 优选是11岁以下的儿科受试者。

[0083] 下面将描述本发明的要素。这些要素均以具体实施例列出; 然而, 应当理解, 它们可以以任何方式和任何数量进行组合以创建另外的实施例。各种描述的实例和优选实施例不应被解释为将本发明仅限于明确描述的实施例。该描述应当被理解为支持并涵盖将两个或更多个明确描述的实施例组合或者将一个或更多个明确描述的实施例与任意数量的公开的和/或优选的要素组合的实施例。此外, 除非上下文另有指示, 否则本申请中所有描述的要素的任何排列和组合应被认为由本申请的描述公开。

[0084] 因此, 在一个实施例中, 本发明涉及一种组合物, 其包含: (i) 单价抗原颗粒, 其包含抗原部分, 该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构, 和(ii) 多价抗原颗粒, 其包含抗原部分, 该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构, 并且其中该多于一种抗原结构是交联的。

[0085] 本申请中使用的术语“价”表示分别在抗体或抗原分子中存在指定数量的结合位点。因此, 抗体的结合位点是互补位, 而抗原中的结合位点通常称为表位。例如, 天然抗体或根据本发明的全长抗体具有两个结合位点并且是二价的。抗原蛋白是单价的(当作为单体存在时), 然而, 如果此类抗原蛋白作为多聚体提供, 它们可以包含多于一个相同的表位, 并且因此是多价的, 其可以是二价的、三价的、四价的等。因此, 术语“三价”表示抗体分子中存在三个结合位点。因此, 术语“四价”表示抗体分子中存在四个结合位点。

[0086] 在本文公开的发明的上下文中, 术语“单价抗原颗粒”是指分子或分子复合物, 诸如蛋白质或蛋白质复合物, 其是抗原性的, 并且因此能够刺激脊椎动物中的免疫应答。通常, 单价抗原颗粒由抗原部分组成, 该抗原部分包含能够诱导针对此类抗原结构的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构。如本文所用, 术语“抗原结构”是指保留刺激抗体介导的免疫应答的能力的抗原蛋白的片段。这样的抗原结构被理解为提供抗原决定簇或“表位”, 其指与抗体特异性反应的分子区域, 更具体地与抗体的互补位反应。在本发明的优选实施例中, 本发明的单价抗原颗粒包含抗原结构的一个特定表位的不多于一个拷贝。因此, 优选地, 具有特定互补位的某些抗体种类的仅一个抗体分子可以与根据本发明的单价抗原颗粒结合。

[0087] 在本文公开的发明的上下文中, 术语“多价抗原颗粒”是指分子或分子复合物, 诸如蛋白质或蛋白质复合物, 其是抗原性的, 并且因此能够刺激脊椎动物中的免疫应答。在本发明中, 与单价抗原颗粒不同, 多价抗原颗粒由抗原部分组成, 该抗原部分包含能够诱导抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构。在本发明的优选实施例中, 本发明的多价抗原颗粒包含抗原结构的一个特定表位的多于一个拷贝。因此, 优选地, 具有特定互补位的某些抗

体种类的多于一个抗体分子可以与根据本发明的单价抗原颗粒结合。这样的多价抗原颗粒可以具有多于一种的抗原结构彼此共价或非共价交联的结构。优选地,多价抗原颗粒的抗原部分中包含的多于一种抗原结构包含多种相同的抗原结构。

[0088] 在本发明的上下文中,本发明的单价抗原颗粒通常被称为“可溶性”颗粒或抗原,而多价抗原颗粒被称为“复合”颗粒或抗原。

[0089] 术语“抗原”可以指包含抗原结构的任何分子或结构,优选与疾病相关的分子或结构。优选地,本文所述的抗原是自身抗原、癌症相关抗原或病原体相关抗原。在本发明的一个非常具体的示例性实施例中,抗原是胰岛素并且相关疾病是糖尿病。人胰岛素蛋白以包含c肽、胰岛素B链和活性胰岛素肽的胰岛素原形式产生。氨基酸序列和另外的特征是本领域技术人员众所周知的并且可以在以下登录号下获得:2020年1月27日版本的UniProt数据库中的P01308(<https://www.uniprot.org/uniprot/P01308>)。

[0090] 本发明的靶抗原优选是与疾病或病症、优选受试者患有或疑似患有的疾病或病症相关的抗原。如所提到的,这样的疾病可以是病原体相关的、自身免疫相关的、可能与治疗相关(例如当使用抗原蛋白作为治疗剂诸如治疗性抗体时),或者是癌症相关的等。本发明的靶抗原可以是天然或合成的免疫原性物质,诸如免疫原性物质的完整、片段或部分,并且其中该免疫原性物质可以选自核酸、碳水化合物、肽、半抗原或其任意组合。

[0091] 在本发明的上下文中,单价抗原颗粒与多价抗原颗粒之间是有区别的。每个颗粒被认为是单个分子实体,其可以包含共价或非共价连接的部分。然而,根据本发明,每个颗粒具有针对某种抗原的免疫原性活性。因此,单价抗原颗粒被理解为仅包含能够引发针对抗原的免疫应答的单一抗原结构,而多价抗原颗粒包含这样的抗原结构的多个拷贝。在本发明的上下文中,有时术语“可溶性”抗原也用于单价抗原颗粒,这与用于多价抗原颗粒的“复合”抗原相对。应当理解,在大多数情况下,抗原结构包含引发抗体介导的免疫应答的表位或由其组成,并且依次是在如本文别处定义的细胞介导的免疫应答时产生的抗体的结合位点。换句话说,本发明区分了免疫引发表位作为可溶性单一表位的呈现或在复合阵列中的相同表位的呈递。

[0092] 如本文所用,术语“交联”是指将至少两个抗原结构彼此连接的键,其中交联的复合物具有与分离的抗原结构不同的物理特性。在一些实施例中,交联复合物比分离的抗原结构溶解性更低。在一些实施例中,本文所述的交联包含至少一个共价键。在一些实施例中,本文所述的交联包含至少一个离子键。

[0093] 本发明基于以下令人惊讶的发现:抗原可以诱导不同的免疫应答,这取决于它们是作为可溶性抗原还是作为复合的多价抗原呈递给免疫细胞。后者尤其会导致强烈和记忆性IgG抗体应答,而前者可能会抑制这样的IgG应答并诱导保护性IgM(或IgA)抗体应答。

[0094] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的组合物可以调节针对本文所述的靶抗原的免疫应答。因此,本发明建议调节可溶性与复合免疫应答的比率以控制B细胞免疫的焦点。该方法可用于新型受控疫苗接种治疗或治疗诸如糖尿病的自身免疫疾病。

[0095] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中多于一种抗原结构包含多个相同的抗原结构。

[0096] 在本发明的优选实施例中,本发明的多价抗原颗粒包含抗原结构的一个特定表位

的多于一个拷贝。因此,优选地,具有特定互补位的某些抗体种类的多于一个抗体分子可以与根据本发明的单价抗原颗粒结合。这样的多价抗原颗粒可以具有多于一种的抗原结构彼此共价或非共价交联的结构。因此,在优选的实施例中,多价抗原颗粒包含复合物,所述复合物包含至少两个相同、至少三个或至少四个表位,其允许两种抗体同时与多价抗原颗粒结合。优选地,多价抗原颗粒的抗原部分中包含的多于一种抗原结构包含多种相同的抗原结构。

[0097] 因此,在优选的实施例中,多价抗原颗粒包含含有至少两个、至少三个或至少四个相同表位的复合物,其允许两种抗体同时与多价抗原颗粒结合。

[0098] 本发明包含此类颗粒的组合物(参见例如图2a、图21)可以调节免疫应答(参见例如图18)。

[0099] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:多个连接的相同结构可以调节针对本文所述的靶抗原的免疫应答。

[0100] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中该单价抗原颗粒进一步包含与该抗原部分偶联的载体部分,并且其中该载体不包含该抗原结构的另一拷贝。

[0101] 在本发明的一些实施例中,单价抗原颗粒进一步包含任选地经由接头与抗原部分偶联的载体部分,并且其中载体和任选的接头不包含抗原结构的另一个拷贝,并且其中载体部分和任选的接头不能引发针对靶抗原的细胞介导的免疫应答。在本发明的另一个可替代的或另外的实施例中,多价抗原颗粒进一步包含任选地经由接头与抗原部分偶联的载体部分。本发明上下文中的“接头”可包括可用于将本发明化合物的两个部分彼此共价或非共价连接的任一分子、或多个分子、蛋白质或肽。

[0102] 本文公开的发明上下文中的术语“载体部分”优选涉及呈递或包含本发明颗粒的抗原结构的物质或结构。载体部分优选是选自以下的物质或结构:免疫原性或非免疫原性多肽、免疫CpG岛、减血蓝素(KLH)、破伤风类毒素(TT)、霍乱毒素B亚单位(CTB)、细菌或细菌菌影、脂质体、壳质体、病毒颗粒、微球、树突状细胞、颗粒、微颗粒、纳米颗粒或珠子。

[0103] 优选地,载体部分和任选的接头均不能够引发针对靶抗原(诸如与自身免疫病患相关的抗原)的细胞介导的免疫应答。

[0104] 本发明上下文中的“接头”优选是肽接头,其可具有适合于本发明上下文中给定应用的任何大小和长度。接头的长度可以是1-100个氨基酸,优选2-50个氨基酸。接头可以是具有2、3、4、5、6或更多个重复的典型4GS接头。

[0105] 载体部分可以促进抗原向免疫系统的呈递并提高颗粒的稳定性。

[0106] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:与抗原部分连接的载体可以改善单价抗原颗粒的抗原性、药理学和/或药代动力学特性,并因此影响针对本文所述的靶抗原的免疫应答的调节。

[0107] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中多价抗原颗粒进一步包含与抗原部分偶联的载体部分。

[0108] 载体部分可以促进抗原向免疫系统的呈递并提高颗粒的稳定性。

[0109] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:与抗原部分连接的载体可以改善多价抗原颗粒的抗原性、药理学和/或药代动力学特性,并因此影响针对本文所述的靶抗原的免疫应答的调节。

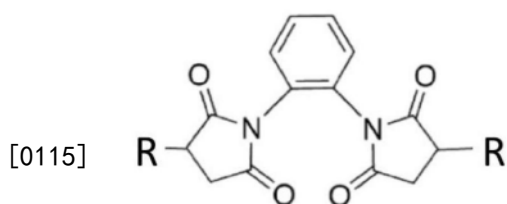
[0110] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中该载体部分包含选自下组的结构:多肽、免疫CpG岛、戚血蓝素(KLH)、破伤风类毒素(TT)、霍乱毒素B亚单位(CTB)、细菌或细菌菌影、脂质体、壳质体、病毒颗粒、微球、树突状细胞、颗粒、微颗粒、纳米颗粒或珠子。

[0111] 载体部分优选是选自以下的物质或结构:免疫原性或非免疫原性多肽、免疫CpG岛、戚血蓝素(KLH)、破伤风类毒素(TT)、霍乱毒素B亚单位(CTB)、细菌或细菌菌影、脂质体、壳质体、病毒颗粒、微球、树突状细胞、颗粒、微颗粒、纳米颗粒或珠子。

[0112] 某些载体部分特别用于将抗原呈递给免疫系统和/或改善颗粒的稳定性,同时具有生物学耐受性。

[0113] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:与抗原部分连接的某些具体载体可以改善单价抗原颗粒的抗原性、药理学和/或药代动力学特性,并因此影响针对本文所述的靶抗原的免疫应答的调节。

[0114] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中多价抗原颗粒包含下式A-L-A的复合物,其中A是包含靶抗原的部分,并且其中L是交联的接头,优选其中L是双马来酰亚胺,并且最优选地,该复合物具有以下结构(I),其中R是包含靶抗原的部分:



(I)。

[0116] 优选地,载体部分以及任选地接头也不能引发针对靶抗原的抗体介导的免疫应答。

[0117] 载体部分可以促进抗原向免疫系统的呈递并提高颗粒的稳定性。

[0118] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:与抗原部分连接的载体可以改善多价抗原颗粒的抗原性、药理学和/或药代动力学特性,并因此影响针对本文所述的靶抗原的免疫应答的调节。

[0119] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中该多价抗原颗粒包含具有用于蛋白质缀合的交联反应性基团的接头。

[0120] 如本文所用,术语“用于蛋白质缀合的交联反应性基团”是指能够在本文所述的抗原颗粒和蛋白质之间产生连接的任何化学基团或结构。此类交联反应基团及其制备是本领域技术人员众所周知的(参见例如Brinkley, M., 1992, Bioconjugate chemistry, 3(1), 2-13; Kluger, R., & Alagic, A, 2004, Bioorganic chemistry 32.6 (2004): 451-472.; Stephanopoulos, N.; Francis, M.B., 2011, Nature Chemical Biology. 7(12): 876-884.)。

[0121] 发明人发现,与本文所述的抗原颗粒(例如多价抗原颗粒)连接并且包含与受试者中的内源蛋白结合的结合的交联反应性基团的接头可以增强免疫应答(参见例如图34-36, 实例12、13、15)。

[0122] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中多价抗原颗粒包含具有用于稳定蛋白质缀合的交联反应性基团的接头。

[0123] 如本文所用,术语“稳定的蛋白质缀合”是指不是S-S结合的共价蛋白质缀合。在一些实施例中,本文所述的稳定的蛋白质缀合物是水解稳定的。在一些实施例中,本文所述的稳定的蛋白质缀合是不可逆的结合。

[0124] 发明人发现与内源蛋白质的稳定结合可以增强针对本文所述的抗原颗粒的免疫应答(实例14)。

[0125] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中交联反应性基团与具有选自下组的至少一个基团的蛋白质偶联:赖氨酸残基、半胱氨酸残基、酪氨酸残基、色氨酸残基、N-末端和C-末端。

[0126] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中该交联反应性基团是选自羧基至胺反应性基团、胺反应性基团、巯基反应性基团、醛反应性基团和光反应性基团的基团。

[0127] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中该交联反应基团是选自碳二亚胺、NHS酯、亚氨酸酯、五氟苯酯、羟甲基磷、马来酰亚胺、卤代乙酰基、酰肼、烷氧基胺、二氮丙啶和芳基叠氮化物的基团。

[0128] 因此,本发明至少部分基于通过与内源蛋白结合来增强免疫应答。

[0129] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中多价抗原颗粒与佐剂连接,优选其中多价颗粒与佐剂共价连接。

[0130] 如本文所用,术语“佐剂”是指不包含靶抗原并且可以增强针对本文所述抗原颗粒的免疫应答的试剂。在一些实施例中,本文所述的佐剂包含至少一种选自下组的佐剂:油(例如石蜡油、花生油)、细菌产物、皂苷、细胞因子(例如IL-1、IL-2、IL-12)、角鲨烯和IgG,优选地其中佐剂包含游离SH-基团。

[0131] 发明人发现,将本文所述的抗原颗粒与佐剂连接可以增强免疫应答,特别是由多价抗体诱导的免疫应答(图36D和36E,图34)。这种与佐剂的连接减少了用显著更大量的非连接佐剂配制本文所述的抗原颗粒的必要性。此外,佐剂可以增加本文所述的抗原颗粒的稳定性。

[0132] 因此,本发明至少部分基于以下发现:本文所述的抗原颗粒与佐剂的连接可以增强引发的免疫应答。

[0133] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中该多价抗原颗粒包含该抗原结构的与彼此空间邻近的至少两个拷贝。

[0134] 本发明的多价抗原颗粒优选包含抗原结构的与彼此空间邻近的至少两个拷贝,优选在选自1nm至10 μ m,更优选1nm至5 μ m、1nm至1000nm、1nm至500nm、1nm至100nm、1nm至50nm和1nm至10nm范围的纳米范围内。

[0135] 如本文所用,术语“空间邻近度”是指位于相同抗原颗粒上并且距离足够存在以调节免疫应答。“足够接近”取决于多价抗原颗粒本身的大小和结构以及抗原结构的大小。在一些实施例中,抗原结构的两个拷贝之间的距离在3nm至20nm的范围内。

[0136] 在一些实施例中,抗原结构的至少两个拷贝空间邻近,范围为约1nm至约1000nm、优选约1nm至约500nm、优选约1nm至约100nm、优选约1nm至约50nm、优选约1nm至约20nm,或优选约3nm至约20nm的范围内。

[0137] 用于测量空间邻近度的方法是本领域技术人员已知的(参见例如F.Schueder等

人,2021,Angew.Chem.Int.Ed.2021,60,716;Erickson,D.等人,2008,Microfluidics and nanofluidics,4(1-2),33-52;Turkowskyd,B.等人,2016,Anal Bioanal Chem 408,6885-6911)。

[0138] 发明人发现,一定大小范围内的多价颗粒对于引发某些免疫应答特别有效。

[0139] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:抗原颗粒的大小和/或空间邻近度可以影响针对本文所述的靶抗原的免疫应答的调节。

[0140] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中该靶抗原包含选自下组的至少一种试剂:核酸、碳水化合物、肽和半抗原。

[0141] 如本文所用,术语“半抗原”是指当连接至载体部分时引发可检测的免疫应答的小分子。本文所述的半抗原还可以包括免疫原性基团。在一些情况下,免疫原性基团包含荧光基团、酶或其片段、肽或其片段、或者生物素。在一些情况下,免疫原性基团选自包含以下的列表:生物素、荧光素、地高辛或二硝基苯基。

[0142] 核酸、碳水化合物、肽和/或半抗原是复制或模拟内源性或病理性抗原模式的有用结构。此外,它们可以被设计为引发特定的免疫应答,而不会产生显著的副作用。

[0143] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:某些抗原类型可以影响针对本文所述的靶抗原的免疫应答的调节。

[0144] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其中单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的比率大于1,优选大于 10^1 ,更优选大于 10^2 ,更优选大于 10^3 ,更优选大于 10^4 。

[0145] 在本发明的上下文中,结果发现特定比率的单价和多价抗原可以调节由B细胞介导的抗体介导的免疫应答。因此,本发明的优选实施例是,包含单价抗原颗粒和多价抗原颗粒的组合物包含特定的抗原比率,该比率优选为单价抗原颗粒与多价抗原颗粒的比率。特别地,在此类优选实施例中,调节受试者中细胞介导的靶抗原特异性免疫应答通过接触使受试者中一种或多种B细胞与包含大于1、优选大于 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 或更多的特定抗原比率的组合物接触对受试者中IgG型(和/或IgM)靶抗原特异性B细胞应答构成控制。在本发明的其他实施例中,使受试者的一种或多种B细胞与组合物接触涉及向受试者施用一定量的单价抗原颗粒,该单价抗原颗粒有效地在受试者中产生特定抗原比率,该特定抗原比率大于1,优选大于 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 或更多。

[0146] 发明人发现,单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的比率可用于调节免疫应答(参见例如图18)。较高的单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的比率可以降低多价抗原颗粒诱导的IgG抗体产生(参见例如图1b、d)并提高保护性-调节性IgM抗体产生的产生(参见例如图7、11)。较高的单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的比率可以保护靶抗原的功能免受免疫应答(参见例如图16)。

[0147] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:对靶抗原的免疫应答的调节取决于单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的比率。

[0148] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其进一步包含药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0149] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体”是指组合物中除一种或多种活性成分之外的成分,其在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒。

[0150] 药学上可接受的载体包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸、柠檬酸和其它有机酸;抗

氧化剂,包含抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化六甲铵;氯化苄甲胺;氯化苄甲氧胺;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟苯甲酸烷基酯,诸如对羟苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖或葡聚糖;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐反离子,诸如钠;金属络合物(例如,Zn蛋白质复合物);和/或非离子型表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的载体进一步包括间质药物分散剂,诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International, Inc.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,描述于US2005/0260186和US2006/0104968中。

[0151] 药学上可接受的载体和/或赋形剂可以促进本发明的组合物的稳定性、递送和/或药代动力学/药效动力学特性。

[0152] 在某些实施例中,本发明涉及一种引发和/或调节体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,该方法包括以下步骤:a)使一种或多种B细胞与本发明的组合物接触;和b)引发和/或调节体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答。

[0153] 本发明上下文中的“细胞介导的靶抗原特异性免疫应答”应指涉及一种或多种B淋巴细胞(B细胞)的免疫应答,并且优选地,B细胞介导的免疫应答。

[0154] 如本文所用,术语“B淋巴细胞”或“B细胞”是指在适应性免疫系统的体液免疫中发挥作用的淋巴细胞,并且其特征存在于细胞表面存在B细胞受体(BCR)。B细胞类型包括浆细胞、记忆B细胞、B-1细胞、B-2细胞、边缘区B细胞、滤泡B细胞和调节性B细胞(B_{reg})。此外,术语“B细胞”(也称为“B淋巴细胞”)是指表达细胞表面免疫球蛋白分子并且在激活后最终分化成分泌抗体的细胞的免疫细胞。因此,这包括例如常规B细胞、CD5⁺ B细胞(也称为B-1细胞和过渡性CD5⁺ B细胞)。“B细胞”还应当理解为涵盖提及B细胞突变体。“突变体”包括但不限于天然或非天然修饰的B细胞,诸如遗传修饰的细胞。提及“B细胞”还应当理解为扩展到表现出对B细胞图像的定型(commitment)的B细胞。这些细胞可能处于发育的任何分化阶段,并且因此可能不一定表达表面免疫球蛋白分子。B细胞定型可能以免疫球蛋白基因重排的开始为特征,或者可能对应于定型的早期阶段,其特征为一些其他表型或功能特征,诸如CD45R、MHCII、CD10、CD19和CD38的细胞表面表达。处于不同分化阶段的B细胞的实例包括早期T祖细胞(early B cell progenitor)、早期原B细胞(early pro-B cell)、晚期原B细胞(late pro-B cell)、前B细胞(pre-B cell)、不成熟B细胞(imature B cell)、成熟B细胞(mature B cell)、浆细胞(plasma cell)和记忆(B)细胞。在本发明的上下文中,B细胞可被视为主要表达IgM型B细胞受体的未成熟B细胞、主要表达IgD型B细胞受体的成熟B细胞或表达IgG型B细胞受体的记忆B细胞。IgM型和IgD型B细胞受体之间的区别在于重链序列的类型,为 μ 型或 δ 型任一者。获得遗传修饰的B细胞的方法是本领域技术人员已知的(参见例如Johnson,M.J.等人,2018,Scientific reports,8(1),1-9)。获得表现出对B细胞图像的定型的细胞的另外的方法是本领域技术人员已知的(参见例如Brudno,J.N.,2018,Journal of Clinical Oncology,36(22),2267)。

[0155] 在本发明的上下文中,术语“细胞介导的靶抗原特异性免疫应答”优选涉及细胞免

疫类型应答,其涉及免疫细胞诸如淋巴细胞、优选B淋巴细胞(B细胞介导的免疫应答),优选其包含和/或表达对靶抗原具有特异性的一种或多种抗体或其变体和/或B细胞受体和/或其变体。优选地,细胞介导的靶抗原特异性免疫应答涉及表达免疫球蛋白(Ig)M、IgD、IgA或IgG型抗体的B细胞和/或B细胞受体。

[0156] 一般而言,术语“接触”应理解为将此类抗原颗粒呈递到受试者的免疫系统,以优选地诱导B细胞介导的免疫应答。

[0157] 在一些实施例中,本发明涉及在受试者中引发和/或调节细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,该方法包括使受试者的一种或多种免疫细胞(诸如B细胞)与包含以下的组合物接触:

[0158] (i) 单价抗原颗粒,其由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,和

[0159] (ii) 多价抗原颗粒,其由包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构的抗原部分组成,并且其中多于一种抗原结构是共价或非共价交联的。

[0160] 在作为第一方面的替代方案的一些实施例中,本发明涉及用于在受试者中引发和/或调节细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的组合物,该组合物包含

[0161] (iii) 单价抗原颗粒,其由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,和

[0162] (iv) 多价抗原颗粒,其由包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构的抗原部分组成,并且其中多于一种抗原结构是共价或非共价交联的;

[0163] 其中通过使受试者的一种或多种免疫细胞与该组合物接触来使用该组合物。

[0164] 在本发明的优选实施例中,使受试者或患者的一种或多种免疫细胞与包含单价抗原颗粒和多价抗原颗粒的组合物接触涉及(i)向受试者施用单价抗原颗粒,(ii)向受试者施用多价抗原颗粒,或(iii)向受试者施用单价抗原颗粒和多价抗原颗粒,其中在(i)、(ii)和(iii)中,受试者的免疫细胞是由于使组合物与单价抗原颗粒和多价抗原颗粒接触施用而产生的。优选地,在(i)中,受试者的特征在于在施用单价抗原颗粒之前存在多价抗原颗粒,并且在(ii)中,受试者的特征在于在施用多价抗原颗粒之前存在单价抗原颗粒。

[0165] 在本发明进一步具体实施例中,该方法是优选的,其中使受试者的一种或多种B细胞与一定量的单价抗原颗粒接触是在有或没有向受试者施用多价抗原颗粒的直接组合物的情况下施用的。

[0166] 在本发明的上下文中,调节受试者中细胞介导的靶抗原特异性免疫应答优选通过使受试者中的一种或多种B细胞与包含小于1、优选小于 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 或更小的特定抗原比率的组合物接触来增加受试者中的IgG型靶抗原特异性B细胞应答。优选地,其中使受试者的一种或多种B细胞与组合物接触涉及向受试者施用一定量的多价抗原颗粒,该多价抗原颗粒有效地在受试者中产生特定抗原比率,该特定抗原比率小于1,优选地小于 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 或更小。

[0167] 优选的是,使受试者的一种或多种B细胞与一定量的多价抗原颗粒接触是在有或没有向受试者施用单价抗原颗粒的直接组合物的情况下施用的。

[0168] 在一些实施例中,本文描述的方法是非治疗性和非手术方法。在该实施例中,本发明的方法不是用于治疗受试者而是用于诱导免疫应答,例如用于产生和分离在后续步骤中分离的新抗体。在该实施例中,受试者是总体健康的受试者,未患有通过实施该方法治疗的任何疾病。在这个方面,受试者优选是非人类脊椎动物。

[0169] 在一些实施例中,本文描述的方法是用于诊断的方法。

[0170] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的组合物可用于调节B细胞免疫应答的方法中。

[0171] 在某些实施例中,本发明涉及引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,其中B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答包括对靶抗原具有特异性的一种或多种抗体和/或B细胞受体和/或其变体。

[0172] 如本文所用,术语“抗体”可以在最广泛的意义上理解为能够结合其表位的任何免疫球蛋白(Ig)。抗体本身是ABP的一种。全长“抗体”或“免疫球蛋白”通常是约150kDa的异四聚体糖蛋白,其由两条相同的轻链和两条相同的重链组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数量在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链都有氨基末端可变结构域(VH),随后是三个羧基末端恒定结构域(CH)。每条轻链都有可变的N末端结构域(VL)和单一的C末端恒定结构域(CL)。VH区和VL区可以进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的超变区,所述超变区散布有更保守的被称作框架区(FR)的区。各VH和VL由三个CDR和四个FR构成,从氨基端至羧基端按以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与细胞或因子的结合,包含免疫系统的不同细胞(例如,效应细胞)以及经典补体系统的第一组分(C1q)。其他形式的抗体包括重链抗体,即仅由两条重链组成且缺乏抗体中常见的两条轻链的抗体。重链抗体包括骆驼科动物(诸如单峰骆驼、骆驼、美洲驼和羊驼)的hcIgG(IgG样)抗体,以及软骨鱼(例如鲨鱼)的IgNAR抗体。其他形式的抗体包括单结构域抗体(sdAb,被开发商Ablynx称为Nanobody),它是由单个单体可变抗体结构域组成的抗体片段。单域抗体通常由重链抗体产生,但也可以源自常规抗体。

[0173] 本发明上下文中讨论的典型抗体Ig变体包括IgG、IgM、IgE、IgA或IgD抗体。

[0174] 如本文所用,术语“B细胞受体”是指B细胞表面上的跨膜蛋白,诸如膜结合抗体。

[0175] 如本文所用,术语“变体”是指与第二试剂(例如亲代分子)相关的第一试剂(例如第一分子)。变体分子(例如变体抗体、B细胞受体变体)可以衍生自、分离自、基于或同源自亲代分子。术语变体可用于描述多核苷酸或多肽。

[0176] 本发明的方法允许诱导包含不同抗体和/或B细胞受体和/或变体的免疫应答。取决于本发明组合物的特性(例如抗原的类型、颗粒大小、颗粒比率、引发/加强)并且取决于B细胞的特性(细胞类型、成熟阶段、突变),可以改变免疫应答(参见例如图1、2、3、7、8、19、20A)。

[0177] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的组合物可用于调节针对靶抗原的抗体介导的、B细胞受体介导的、和/或变体介导的免疫应答的方法中。

[0178] 在某些实施例中,本发明涉及引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,其中B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答涉及表达免疫

球蛋白 (Ig)M、IgD、IgA或IgG型抗体的B细胞和/或B细胞受体。

[0179] 在某些实施例中,本发明涉及引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,其中B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答涉及表达免疫球蛋白 (Ig)M、IgA和/或IgG型抗体的B细胞和/或B细胞受体。

[0180] 在某些实施例中,本发明涉及引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,其中B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答涉及表达免疫球蛋白 (Ig)M和/或IgG型抗体的B细胞。

[0181] 如本文所用,术语“IgG”具有其在本领域中的通用含义并且指具有重g链的免疫球蛋白。这类免疫球蛋白作为针对抗原的二次免疫应答的一部分产生,其大约占总血清Ig的75%。IgG是唯一一类可以穿过人类胎盘的Ig,并且它主要负责在生命最初几个月期间保护新生儿。IgG是血液、淋巴液、脑脊液和腹膜液中的主要免疫球蛋白,是体液免疫应答的关键参与者。健康人的血清IgG大约占总蛋白质的15%,此外还有白蛋白、酶、其他球蛋白等。在人类、小鼠和大鼠中描述了四种IgG亚类(例如人类中的IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。这些亚类的不同之处在于二硫键的数量以及铰链区的长度和柔性。除其可变区外,一类内的所有免疫球蛋白具有约90%的同源性,但不同类之间的同源性仅为60%。IgG1占IgG主要亚类总量的60%至65%,主要负责针对蛋白质和多肽抗原的胸腺介导的免疫应答。IgG1与吞噬细胞的Fc受体结合,并可经由与C1复合物结合激活补体级联反应。IgG1免疫应答已经可以在新生儿中测量到,并在婴儿期达到其典型浓度。IgG2是第二大IgG同种型,占主要亚类的20%至25%,并且是针对碳水化合物/多糖抗原的普遍免疫应答。“成人”浓度通常在6或7岁时达到。IgG3占总IgG的约5%至10%,并且在针对蛋白质或多肽抗原的免疫应答中发挥重要作用。IgG3的亲和力可以高于IgG1的亲和力。IgG4通常占总IgG的不到4%,其不与多糖结合。在过去,IgG4测试与食物过敏相关,且最近的研究表明,患有硬化性胰腺炎、胆管炎和间质性肺炎的患者血清中IgG4水平升高,这是由IgG4阳性浆细胞浸润引起的。

[0182] 如本文所用,术语“IgM”具有其在本领域中的通用含义并且指具有重m链的免疫球蛋白。哺乳动物血清IgM以五聚体(或六聚体)形式存在,并且大约占正常人血清Ig含量的10%。它在针对大多数抗原的初级免疫应答中占主导地位,且是最有效的补体固定免疫球蛋白。IgM还在B淋巴细胞的质膜上表达为膜相关免疫球蛋白(其可以在膜中组织为多蛋白簇)。在这种形式中,它是B细胞抗原受体,每个H链都含有一个另外的疏水结构域,用于锚定于膜中。血清IgM单体通过二硫键和连接(J,joining)链结合在一起。五聚体结构中的五个单体中的每一个均由两条轻链(κ 或 λ)和两条重链组成。与IgG(以及上面所示的一般结构)中不同,IgM单体中的重链由一个可变区和四个恒定区组成,并用另外的恒定结构域取代铰链区。IgM可以识别入侵微生物上的表位,导致细胞凝集。然后,这种抗体-抗原免疫复合物被补体固定或由巨噬细胞的受体介导的内吞作用破坏。IgM是新生儿合成的第一种免疫球蛋白,并在一些自身免疫疾病的发病机制中发挥作用。免疫球蛋白M是第三种最常见的血清Ig,采用以下两种形式之一:五聚体(或在某些情况下为六聚体),其中所有重链都相同,且所有轻链也相同。膜相关形式是单体(例如,在B淋巴细胞上作为B细胞受体存在),可以在膜上形成多聚体簇。

[0183] IgM是免疫应答期间产生的第一种抗体。它负责凝集和溶细胞反应,因为理论上,其五聚体结构赋予其10个游离抗原结合位点,并且其具有高亲合力。由于10个Fab部分之间

的构象限制,IgM的效价仅为5。此外,IgM的通用性不如IgG。然而,它对于补体激活和凝集至关重要。IgM主要存在于淋巴液和血液中,是疾病早期非常有效的中和剂。水平升高可能是最近感染或暴露于抗原的体征。

[0184] 如本文所用,术语“IgA”具有其在本领域中的通用含义并且指具有重 α 链的免疫球蛋白。IgA大约占健康血清中所有免疫球蛋白的15%。血清中的IgA主要是单体,但在诸如唾液、眼泪、初乳、粘液、汗液和胃液等分泌物中,IgA作为通过连接肽连接的二聚体存在。大多数IgA以分泌形式存在。据信这是由于其通过附着和穿透上皮表面来防止病原体入侵的特性。IgA是非常弱的补体激活抗体;因此,它不会经由补体系统诱导细菌细胞裂解。然而,分泌型IgA与溶菌酶(也存在于许多分泌液中)一起作用,这可以水解细菌细胞壁中的碳水化合物,从而使免疫系统能够清除感染。IgA主要存在于上皮细胞表面,充当中和抗体。人类存在两种IgA亚型:IgA1和IgA2,而小鼠仅有一种亚类。它们的不同之处在于重链的分子量及其在血清中的浓度。IgA1大约占血清中总IgA浓度的85%。尽管IgA1针对多种蛋白酶表现出广泛的抗性,但有一些可以影响/剪接铰链区。IgA1对蛋白抗原以及较小程度的多糖和脂多糖表现出良好的免疫应答。IgA2仅占血清中总IgA的15%,在气道、眼睛和胃肠道的粘膜中对抗多糖和脂多糖抗原发挥着至关重要的作用。它还对蛋白水解和许多细菌蛋白酶表现出良好的抗性,支持IgA2在对抗细菌感染中的重要性。

[0185] 如本文所用,术语“IgD”具有其在本领域中的通用含义并且指具有重 δ 链的免疫球蛋白。IgD是免疫球蛋白,其约占不成熟B淋巴细胞质膜中蛋白质的1%,通常与另一种细胞表面抗体IgM共表达。IgD也以分泌形式产生,在血清中含量极少,占血清中免疫球蛋白的0.25%。分泌型IgD作为单体抗体产生,具有两条 δ 类重链和两条Ig轻链。

[0186] 本发明的方法允许引发和/或调节包含某些抗体类型和/或某些抗体类型比率的免疫应答。取决于本发明组合物的特性(例如抗原的类型、颗粒大小、颗粒比率、引发/加强)并且取决于B细胞的特性(细胞类型、成熟阶段、突变),可以改变免疫应答(参见例如图1、2、3、7、8)。

[0187] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的组合物可用于调节针对靶抗原的由IgM、IgD、IgA或IgG型抗体和/或B细胞受体介导的免疫应答的方法中。

[0188] 在某些实施例中,本发明涉及引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法,其中引发的B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答包括引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体。

[0189] 本发明的方法允许引发和/或调节包含IgG型抗体和IgM型抗体的免疫应答。取决于本发明组合物的特性(例如抗原的类型、颗粒大小、颗粒比率、引发/加强)并且取决于B细胞的特性(细胞类型、成熟阶段、突变),可以改变免疫应答例如,IgG型抗体被抑制而IgM型抗体增加(参见例如图1、2、3、7、8)。

[0190] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的组合物可用于调节针对靶抗原的由IgM或IgG型抗体介导的免疫应答的方法中。

[0191] 在某些实施例中,本发明涉及用于获得保护性-调节性抗体的方法,该方法包括以下步骤:(a)根据引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体;和(b)分离成熟的寡聚抗体,其中该寡聚抗体对于该靶抗原的结合亲和力等于或高于IgG型抗体,以获得对该靶抗原的功能

为保护性-调节性的该保护性-调节性抗体。

[0192] 在这样的实施例中的方法,该方法优选是非医学方法,诸如体外方法。

[0193] 如本文所用,术语“对靶抗原的功能的保护性-调节性”是指调节靶抗原的功能。在一些实施例中,本发明涉及用于获得保护性-调节性抗体的方法,其中靶抗原的功能被保护性-调节性抗体延长(例如通过阻碍降解性免疫应答)。在一些实施例中,本发明涉及用于获得保护性-调节性抗体的方法,其中保护性-调节性抗体通过延长靶抗原的半衰期来延长靶抗原的功能。

[0194] 在某些实施例中,本发明涉及用于获得保护性-调节性抗体的方法,该方法包括以下步骤:(a)根据引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体;和(b)分离成熟的寡聚抗体,其中(i)相比于该IgG型抗体,该寡聚抗体的结合对于该靶抗原更具特异性,以获得对该靶抗原的功能为保护性-调节性的该保护性-调节性抗体。

[0195] 在这样的实施例中的方法,该方法优选是非医学方法,诸如体外方法。

[0196] 在某些实施例中,本发明涉及用于获得保护性-调节性抗体的方法,该方法包括以下步骤:(a)根据引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体;和(b)分离成熟的寡聚抗体,其中(i)相比于该IgG型抗体,该寡聚抗体的结合对于该靶抗原更具特异性,和(ii)该寡聚抗体对于该靶抗原的结合亲和力等于或高于IgG型抗体,以获得对该靶抗原的功能为保护性-调节性的该保护性-调节性抗体。

[0197] 在这样的实施例中的方法,该方法优选是非医学方法,诸如体外方法。

[0198] 在某些实施例中,本发明涉及用于获得保护性-调节性抗体的方法,该方法包括以下步骤:(a)根据引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体;和(b)分离成熟的寡聚抗体,其中(i)该寡聚抗体的结合对于该靶抗原比该IgG型抗体更具特异性,并且其中该寡聚抗体对于该靶抗原是单特异性的;和(ii)该寡聚抗体对于该靶抗原的结合亲和力等于或高于IgG型抗体,以获得对该靶抗原的功能为保护性-调节性的该保护性-调节性抗体。

[0199] 在这样的实施例中的方法,该方法优选是非医学方法,诸如体外方法。

[0200] 在一些实施例中,“寡聚”抗体是IgM型抗体或其衍生的寡聚抗体。在一些实施例中,“寡聚”抗体是IgM型抗体。

[0201] 在某些实施例中,本发明涉及用于获得保护性-调节性抗体的方法,该方法包括以下步骤:(a)根据引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体;和(b)分离成熟的寡聚抗体,其中(i)该寡聚抗体的结合对于该靶抗原比该IgG型抗体更具特异性;和(ii)该寡聚抗体对于该靶抗原的结合亲和力等于或高于IgG型抗体,并且其中该保护性-调节性抗体以小于 10^{-7} ,优选小于 10^{-8} ,更优选小于 10^{-9} ,并且最优选在约 10^{-10} 至约 10^{-12} 的范围内的 K_d 与该靶抗原结合,以获得对该靶抗原的功能为保护性-调节性的该保护性-调节性抗体。

[0202] 在某些实施例中,本发明涉及用于获得保护性-调节性抗体的方法,该方法包括以下步骤:(a)根据引发和/或调节根据本发明的体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的方法引发至少一种IgG型抗体和至少一种寡聚抗体;和(b)分离成熟的寡聚抗体,其中

(i) 相比于该IgG型抗体,该寡聚抗体的结合对于该靶抗原更具特异性,并且其中该寡聚抗体对于该靶抗原是单特异性的;和(ii) 该寡聚抗体对于该靶抗原的结合亲和力等于或高于IgG型抗体,并且其中该保护性-调节性抗体以小于 10^{-7} ,优选小于 10^{-8} ,更优选小于 10^{-9} ,并且最优选在约 10^{-10} 至约 10^{-12} 的范围内的 K_d 与该靶抗原结合,以获得对该靶抗原的功能为保护性-调节性的该保护性-调节性抗体。

[0203] 如本文所用,术语“ K_d ”旨在是指解离常数,其由 K_d 与 K_a 的比率(即 K_d/K_a)获得并表示为摩尔浓度(M)。抗体的 K_D 值可以使用本领域成熟的方法来确定,诸如等离子体共振(BIAcore®)、生物膜干涉测量法(BLI)、ELISA和KINEXA。用于确定抗体的 K_D 的优选的方法是通过使用表面等离子共振,优选地使用生物传感器系统诸如BIAcore®系统或通过ELISA。如本文所用,“ K_a ”(或“ K_{-assoc} ”)广泛地指特定抗体-抗原相互作用的结合速率,而如本文所用,术语“ K_d ”(或“ K_{-diss} ”)指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。另一种优选方法是使用BLI。术语“生物膜干涉测量法”或“BLI”是指分析来自两个表面(生物传感器尖端上的固定蛋白质层和内部参考层)反射的白光的干涉图案的光学分析技术。与生物传感器尖端结合的分子数量的任何变化都会导致可以实时测量的干涉图案的变化。

[0204] 在一些实施例中,基于至少一种特异性评估方法,本文认为抗体“更特异性”。抗体、变体或片段的特异性可以例如通过在常规条件下评估抗体、变体或片段的结合来测试(参见例如Harlow和Lane,1988Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,以及Harlow和Lane,1999using Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press)。这些方法尤其可以包括与结构和/或功能密切相关的分子的结合研究、阻断和竞争研究。这些结合研究还包括FACS分析、表面等离子体共振、分析超速离心、等温滴定量热法、荧光各向异性、荧光光谱学或通过放射性标记配体结合测定。(交叉)特异性可以通过本领域已知的方法和本文所述的方法通过实验确定。此类方法包括但不限于蛋白质印迹、ELISA测试、RIA测试、ECL测试、IRMA测试和肽扫描。

[0205] 如本文所用,抗体上下文中的术语“单特异性”表示具有一个或多个结合位点的抗体,每个结合位点结合相同抗原的相同表位。更重要的是,本发明上下文中的术语“单特异性”涉及这样的抗体,其对一种抗原具有高亲和力并且不特异性结合任何其他抗原。在这个方面,单特异性抗体以小于 10^{-7} nM、优选小于 10^{-8} nM、更优选小于 10^{-9} nM,并且最优选约 10^{-10} nM的 K_D 结合至与自身免疫病患相关的抗原。因此,这样的单克隆IgM不结合无关抗原,该无关抗原除了与自身免疫病患相关的抗原以外的抗原,并且如果本发明因此不包括使用对与自身免疫病患相关的抗原以外的抗原的无关抗原特异的多特异性抗体,则优选地进行该治疗。在一些实施例中,抗体的单特异性被定义为它在ELISA中不识别dsDNA并且在Hep-2载玻片中不显示结合(参见例如实例4、图16C、16D以及材料和方法)。

[0206] 如本文所用,术语“成熟寡聚抗体”是指寡聚抗体,该寡聚抗体a)对靶抗原是单特异性的b)以小于 10^{-7} nM、优选小于 10^{-8} nM,更优选小于 10^{-9} nM,更优选小于 10^{-10} nM,更优选小于 10^{-11} nM,并且最优选约 10^{-12} nM的 K_D 结合靶抗原和/或c)经历了成熟过程。寡聚抗体的成熟过程可以通过B细胞的发育阶段、遗传修饰(例如通过缺乏IgD,参见图25、29)和/或与成熟改变细胞或信号剂接触来调节。在一些实施例中,成熟过程和/或其完成由多个突变定义,与第一代寡聚抗体相比,优选至少1个、至少2个、至少3个突变、至少4个突变、至少50个突变、至少100个突变或至少500个突变的成熟寡聚抗体。在一些实施例中,成熟过程和/或其

完成由某些时间段限定,优选多于7天、多于8天、多于9天、多于10天、多于11天、多于12天、多于13天、多于14天、多于15天、多于16天、多于17天、多于18天、多于19天、多于20天、多于21天、多于22天、多于23天、多于24天、多于25天、多于26天、多于27天、多于28天、多于29天、多于30天、多于31天、多于32天、多于33天、多于34天、多于35天、多于36天、多于37天、多于38天、多于39天、多于40天、多于41天、多于42天、多于43天、多于44天、多于45天、多于46天、多于47天、多于48天、多于49天、多于50天、多于51天、多于52天、多于53天、多于54天、多于55天、多于56天、多于57天、多于58天、多于59天、多于60天、多于61天、多于62天、多于63天、多于64天、多于65天、多于66天、多于67天、多于68天、多于69天、多于70天、多于71天、多于72天、多于73天、多于74天、多于75天、多于76天、多于77天、多于78天、多于79天、多于80天、多于81天、多于82天、多于83天、多于84天或多于85天。

[0207] 用于选择性分离抗体的方法是本领域技术人员已知的(参见例如Huang J,Doria-Rose NA,等人,2013,Nat Protoc.Oct;8(10):1907-15)。

[0208] 可以使用本领域技术人员已知的任何方法来分离成熟的抗体。在一些实施例中,分离本文所述的成熟寡聚抗体包括至少一种选自下组的方法:物理化学分馏、类别特异性亲和力和抗原特异性亲和力。例如,可以如本文材料和方法部分的胰岛素特异性血清免疫球蛋白的分离中所述来分离抗体。

[0209] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的方法可用于获得通过与抗原功能限制性抗原结合剂竞争结合来保护和/或调节抗原功能的抗体变体或片段。

[0210] 在某些实施例中,本发明涉及可根据用于获得根据本发明的保护性-调节性抗体的方法可获得的保护性-调节性抗体或其变体或片段,其对所述靶抗原的功能为保护性-调节性。

[0211] 如本文所用,术语抗体的“片段”是指能够与其抗体对应物一样结合相同抗原的抗体片段。此类片段可以由技术人员简单地鉴定并且包括例如本发明涵盖了Fab片段(例如通过木瓜蛋白酶消化)、Fab'片段(例如通过胃蛋白酶消化和部分还原)、F(ab')₂片段(例如通过胃蛋白酶消化)、Facb(例如通过纤溶酶消化)、Fa(例如通过胃蛋白酶消化、部分还原和重新聚集)以及scFv(单链Fv;例如,通过分子生物学技术)片段。

[0212] 在一些实施例中,本发明的保护性-调节性抗体是寡聚抗体,优选单特异性IgM型抗体。

[0213] 在另一个实施例中,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,优选本发明的单特异性IgM型抗体或其变体不是多克隆抗体,或者抗原结合片段不是多克隆抗体的片段。在更具体的实施例中,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,优选本发明的单特异性IgM型抗体或其变体不是初级(多特异性)IgM型抗体。

[0214] 在一个可替代的且优选的实施例中,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,优选单特异性IgM型抗体或其变体是抗体或其抗原结合片段,并且该抗体是单克隆抗体,或者其中抗原结合片段是单克隆抗体的片段。

[0215] 如本文所用,术语“单克隆抗体”或“mAb”是指从基于其氨基酸序列基本相同的抗体群体获得的抗体。单克隆抗体通常具有高度特异性。此外,与通常包括针对抗原的不同决定簇(例如表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂相反,每种mAb通常针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性之外,mAb的优点还在于它们可以通过不受其他免疫球蛋白污

染的细胞培养物(杂交瘤、重组细胞等)合成。本文的mAb包括例如嵌合、人源化或人类抗体或抗体片段。

[0216] 根据本发明的单克隆IgM抗体可以通过本领域技术人员熟知的方法来制备。例如,可以用感兴趣的抗原(或编码感兴趣的抗原的核酸)连同佐剂来免疫接种小鼠、大鼠、山羊、骆驼、羊驼、美洲驼或兔子。从动物中收集脾细胞,以一定的时间间隔施用多次免疫接种,并进行测试采血以评估血清抗体滴度。制备的脾细胞可以立即用于融合实验,也可以储存在液氮中以供将来的融合使用。然后根据Stewart&Fuller, J. Immunol. Methods 1989, 123: 45-53的程序进行融合实验。通过例如酶联免疫吸附测定(ELISA)来筛选来自具有生长的杂交体的孔的上清液中的mAb分泌物。通过有限稀释或荧光激活细胞分选来克隆ELISA阳性培养物,通常会产生从单菌落建立的杂交瘤。抗体(包括抗体片段或亚片段)与特定抗原结合的能力可以通过本领域已知的结合测定来确定,例如使用感兴趣的抗原作为结合配偶体。可替代地,将与免疫接种抗原结合的脾B细胞分选为单细胞,并且随后从单细胞克隆编码重链和轻链的cDNA。然后将克隆的cDNA用于体外产生单克隆重组抗体,并基于其与免疫接种抗原的特异性和亲和力进一步表征。

[0217] 根据本发明的单特异性寡聚抗体或其变体可以通过遗传免疫接种方法来制备,其中天然蛋白在体内表达并具有正常的转录后修饰,避免抗原分离或合成。例如,裸露质粒DNA表达载体的流体动力学尾部或四肢静脉递送可用于在小鼠、大鼠和兔体内产生感兴趣的抗原,从而诱导抗原特异性抗体(Tang等人, Nature 356:152 (1992); Tighe等人, Immunol. Today 19:89 (1998); Bates等人, Biotechniques, 40:199 (2006); Aldevron-Genovac, Freiburg DE)。这允许有效产生高滴度、抗原特异性抗体,其对于诊断和/或研究目的特别有用。对于这样的遗传免疫接种,可以使用多种基因递送方法,包括将裸露质粒DNA直接注射到骨骼肌、淋巴结或真皮中、电穿孔、弹道(基因枪)递送和病毒载体递送。

[0218] 在进一步优选的实施例中,本发明的单特异性寡聚抗体或其变体是抗体或其抗原结合片段,其中该抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合人抗体,或者其中该抗原结合片段是人抗体、人源化抗体或嵌合人抗体的片段。

[0219] 人类抗体也可以通过体外方法获得。合适的实例包括但不限于噬菌体展示(CAT、Morphosys、Dyax、Biosite/Medarex、Xoma、Yumab、Symphogen、Alexion、Affimed)等。在噬菌体展示中,编码单个Fab或Fv抗体片段的多核苷酸在噬菌体颗粒的表面上表达(参见例如Hoogenboom等人, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks等人, J Mol Biol 222:581 (1991); 美国专利号5,885,793)。“筛选”噬菌体以鉴定那些对靶标具有亲和力的抗体片段。因此,某些此类过程通过在丝状噬菌体表面上展示抗体片段库来模拟免疫选择,并随后通过其与靶标的结合来选择噬菌体。在某些此类程序中,分离出高亲和力功能性中和抗体片段。因此,可以通过从外周血淋巴细胞克隆自然重排的人V基因(参见例如Mullinax等人, Proc Natl Acad Sci (USA), 87:8095-8099 (1990))或通过产生具有人抗体序列的全合成或半合成噬菌体展示文库(参见Knappik等人2000; J Mol Biol 296:57; de Kruif等人, 1995; J Mol Biol 248:97)来产生人抗体基因的完整库。

[0220] 可替代地,本文描述的抗体可以通过利用XenoMouse®技术来制备。此类小鼠能够产生人免疫球蛋白分子和抗体,但缺乏鼠免疫球蛋白分子和抗体的产生。特别地,小鼠和抗体的转基因生产的优选实施例公开于1996年12月3日提交的美国专利申请序列号08/759,

620和1998年6月11日公开的国际专利申请号WO 98/24893和2000年12月21日公开的WO 00/76310中。还参见Mendez等人, Nature Genetics, 15:146-156 (1997)。通过使用这种技术,已经生产出了针对多种抗原的全人类单克隆抗体。本质上,小鼠 XenoMouse®系是用感兴趣的抗原进行免疫接种的,例如从超免疫接种的小鼠中回收的IGSF11 (VSIG3)、淋巴细胞(诸如B细胞),并将回收的淋巴细胞与骨髓型细胞系融合以制备永生杂交瘤细胞系。筛选和选择这些杂交瘤细胞系以鉴定产生对感兴趣的抗原具有特异性的抗体的杂交瘤细胞系。其他“人源化”小鼠也是可商购的:例如Medarex-HuMab小鼠、Kymab-Ky小鼠、Regeneron-Velocimmune小鼠、Kirin-TC小鼠、Trianni-Trianni小鼠、OmniAb-Omni小鼠、Harbour Antibodies-H2L2小鼠、Merus-MeMo小鼠。也可商购的“人源化”的其他物种:大鼠:OmniAb-Omni大鼠、OMT-Uni大鼠。鸡:OmniAb-Omni鸡。

[0221] 根据本发明的术语“人源化抗体”是指免疫球蛋白链或其片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或抗体的其他抗原结合子序列),其含有最少的源自非人免疫球蛋白的序列(但通常仍然是至少一部分)。大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中受体抗体的CDR残基被来自非人物种免疫球蛋白(供体抗体)(诸如具有所需的特异性、亲和力和能力的小鼠、大鼠或兔)的CDR残基取代。因此,所述抗体或其片段的框架序列的至少一部分可以是人共有框架序列。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基需要被相应的非人残基代替以增加特异性或亲和力。此外,人源化抗体可包含既不存在于受体抗体中也不存在于导入的CDR或框架序列中的残基。这些修改是为了进一步完善和最大化抗体效能。通常,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常至少两个可变结构域,其中所有或基本上所有的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区,并且所有或基本上所有的框架区是人免疫球蛋白共有序列的框架区。人源化抗体最佳地还包含免疫球蛋白恒定区(通常是人免疫球蛋白恒定区)的至少一部分,该(例如人)免疫球蛋白恒定区可以被修饰(例如通过突变或糖工程)以优化这样的区域的一种或多种特性和/或改善(例如治疗性)抗体的功能,诸如增加或减少Fc效应子功能或增加血清半衰期。示例性的这样的Fc修饰(例如,Fc工程化或Fc增强)在本文别处描述。

[0222] 人恒定区很可能源自 μ 链序列,然而,其任何变体,诸如Fc区结合减弱例如 γ 链恒定序列,可以用作根据本发明的IgM变体。

[0223] 根据本发明的术语“嵌合抗体”是指其轻链和/或重链基因通常通过遗传工程从免疫球蛋白可变区和恒定区构建的抗体,所述免疫球蛋白可变区和恒定区与不同物种(诸如小鼠和人类)相应的序列相同或同源。可替代地,可变区基因源自特定抗体类别或亚类,而链的其余部分源自相同或不同物种的另一抗体类别或亚类。它还涵盖此类抗体的片段。例如,典型的治疗性嵌合抗体是由来自小鼠抗体的可变或抗原结合结构域和来自人抗体的恒定或效应结构域组成的杂合蛋白,但也可以使用其他哺乳动物物种。

[0224] 特别地,在此类实施例中,本发明的单特异性IgM型抗体或其变体包含抗体的抗原结合结构域,其中该抗原结合结构域是人抗体的。优选地,单特异性寡聚抗体或其变体包含抗体或其抗原结合片段的抗原结合结构域,其是人抗原结合结构域;(ii) 该抗体是单克隆抗体,或者其中该抗原结合片段是单克隆抗体的片段;和(iii) 该抗体是人抗体或人源化抗体,或者其中该抗原结合片段是人抗体、人源化抗体或嵌合人抗体的片段。

[0225] 人抗体的轻链通常分为 κ 轻链和 λ 轻链,每种轻链均含有一个可变区和一个恒定

区。重链通常被分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ 链,并且它们分别将抗体的同种型定义为如上所述的IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。人类IgG具有多种亚型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人类IgM亚型包括IgM。人类IgA亚型包括IgA1和IgA2。在人类中,IgA同种型含有四条重链和四条轻链;IgG和IgE同种型含有两条重链和两条轻链;并且IgM同种型含有十或十二条重链和十或十二条轻链。根据本发明的抗体可以是IgG、IgE、IgD、IgA或IgM免疫球蛋白。

[0226] 在一些实施例中,本发明的单特异性寡聚抗体或其变体是IgM抗体或其片段。优选地,本发明的抗体是、包含或衍生自IgG免疫球蛋白或其片段;诸如人、衍生自人的IgM免疫球蛋白、或衍生自兔或大鼠的IgM。

[0227] 本发明的单特异性寡聚抗体或其变体,其中包含免疫球蛋白恒定区(通常是人免疫球蛋白恒定区)的至少一部分,可以具有这样的(例如人)免疫球蛋白恒定区修饰—例如通过糖工程或突变—以优化这样的区域的一种或多种特性和/或以改善(例如治疗性)抗体的功能,诸如以增加或减少Fc效应子功能或增加血清半衰期。

[0228] 因此,上述本发明的任何ABP可以用不同的抗体同种型或突变体同种型来产生,以控制与不同Fc- γ 受体的结合程度。缺乏Fc区的抗体(例如Fab片段)无法与不同的Fc- γ 受体结合。同种型的选择也会影响与不同Fc- γ 受体的结合。已经确定了各种人IgG同种型对三种不同Fc- γ 受体Fc- γ -RI、Fc- γ -RII和Fc- γ -RIII的各自的亲和力。(参见Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9,457(1991))。Fc- γ -RI是高亲和力受体,其与单体形式的IgG结合,后两者是低亲和力受体,仅与多聚体形式的IgG结合。通常,IgG1和IgG3对所有三种受体都具有显著的结合活性,IgG4对Fc- γ -RI,以及IgG2仅对一种类型的Fc- γ -RII(称为IIaLR)具有显著的结合活性(参见Parren等人,J.Immunol.148,695(1992))。因此,通常选择人同种型IgG1用于与Fc- γ 受体较强的结合,并且通常选择IgG2或IgG4用于较弱的结合。本发明的优选实施例提供了此类抗体,其中Fc受体结合被减少或消除。

[0229] 增加的Fc- γ -R与突变的Fc结合之间的相关性已经使用基于细胞的靶向毒性测定法得到证明(Shields等人,2001,J.Biol.Chem.276:6591-6604;Presta等人,2002,Biochem Soc.Trans.30:487-490)。通过特异性Fc区突变增加ADCC活性的方法包括Fc变体,所述Fc变体在选自由以下组成的组的位置处包含至少一个氨基酸取代:234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、267、269、296、297、298、299、313、325、327、328、329、330和332,其中Fc区中残基的编号是Kabat中的EU索引的编号(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health,Bethesda,Md.1987))。

[0230] 在某些具体实施例中,所述Fc变体包含选自由以下组成的组的至少一个取代: L234D、L234E、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234Y、L234I、L234V、L234F、L235D、L235S、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235Y、L235I、L235V、L235F、S239D、S239E、S239N、S239Q、S239F、S239T、S239H、S239Y、V240I、V240A、V240T、V240M、F241W、F241L、F241Y、F241E、F241R、F243W、F243L、F243Y、F243R、F243Q、P244H、P245A、P247V、P247G、V262I、V262A、V262T、V262E、V263I、V263A、V263T、V263M、V264L、V264I、V264W、V264T、V264R、V264F、V264M、V264Y、V264E、D265G、D265N、D265Q、D265Y、D265F、D265V、D265I、D265L、D265H、D265T、V266I、V266A、V266T、V266M、S267Q、S267L、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296E、Y296Q、Y296D、Y296N、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、Y296H、N297S、N297D、N297E、A298H、

T299I、T299L、T299A、T299S、T299V、T299H、T299F、T299E、W313F、N325Q、N325L、N325I、N325D、N325E、N325A、N325T、N325V、N325H、A327N、A327L、L328M、L328D、L328E、L328N、L328Q、L328F、L328I、L328V、L328T、L328H、L328A、P329F、A330L、A330Y、A330V、A330I、A330F、A330R、A330H、I332D、I332E、I332N、I332Q、I332T、I332H、I332Y和I332A,其中该Fc区中残基的编号是Kabat中的EU索引的编号。

[0231] Fc变体还可选自自由以下组成的组:V264L、V264I、F241W、F241L、F243W、F243L、F241L/F243L/V262I/V264I、F241W/F243W、F241W/F243W/V262A/V264A、F241L/V262I、F243L/V264I、F243L/V262I/V264W、F241Y/F243Y/V262T/V264T、F241E/F243R/V262E/V264R、F241E/F243Q/V262T/V264E、F241R/F243Q/V262T/V264R、F241E/F243Y/V262T/V264R、L328M、L328E、L328F、I332E、L3238M/I332E、P244H、P245A、P247V、W313F、P244H/P245A/P247V、P247G、V264I/I332E、F241E/F243R/V262E/V264R/I332E、F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E、F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E、F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E、S298A/I332E、S239E/I332E、S239Q/I332E、S239E、D265G、D265N、S239E/D265G、S239E/D265N、S239E/D265Q、Y296E、Y296Q、T299I、A327N、S267Q/A327S、S267L/A327S、A327L、P329F、A330L、A330Y、I332D、N297S、N297D、N297S/I332E、N297D/I332E、N297E/I332E、D265Y/N297D/I332E、D265Y/N297D/T299L/I332E、D265F/N297E/I332E、L328I/I332E、L328Q/I332E、I332N、I332Q、V264T、V264F、V240I、V263I、V266I、T299A、T299S、T299V、N325Q、N325L、N325I、S239D、S239N、S239F、S239D/I332D、S239D/I332E、S239D/I332N、S239D/I332Q、S239E/I332D、S239E/I332N、S239E/I332Q、S239N/I332D、S239N/I332E、S239N/I332N、S239N/I332Q、S239Q/I332D、S239Q/I332N、S239Q/I332Q、Y296D、Y296N、F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E、A330Y/I332E、V264I/A330Y/I332E、A330L/I332E、V264I/A330L/I332E、L234D、L234E、L234N、L234Q、L234T、L234H、L234Y、L234I、L234V、L234F、L235D、L235S、L235N、L235Q、L235T、L235H、L235Y、L235I、L235V、L235F、S239T、S239H、S239Y、V240A、V240T、V240M、V263A、V263T、V263M、V264M、V264Y、V266A、V266T、V266M、E269H、E269Y、E269F、E269R、Y296S、Y296T、Y296L、Y296I、A298H、T299H、A330V、A330I、A330F、A330R、A330H、N325D、N325E、N325A、N325T、N325V、N325H、L328D/I332E、L328E/I332E、L328N/I332E、L328Q/I332E、L328V/I332E、L328T/I332E、L328H/I332E、L328I/I332E、L328A、I332T、I332H、I332Y、I332A、S239E/V264I/I332E、S239Q/V264I/I332E、S239E/V264I/A330Y/I332E、S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E、S239D/N297D/I332E、S239E/N297D/I332E、S239D/D265V/N297D/I332E、S239D/D265I/N297D/I332E、S239D/D265L/N297D/I332E、S239D/D265F/N297D/I332E、S239D/D265Y/N297D/I332E、S239D/D265H/N297D/I332E、S239D/D265T/N297D/I332E、V264E/N297D/I332E、Y296D/N297D/I332E、Y296E/N297D/I332E、Y296N/N297D/I332E、Y296Q/N297D/I332E、Y296H/N297D/I332E、Y296T/N297D/I332E、N297D/T299V/I332E、N297D/T299I/I332E、N297D/T299L/I332E、N297D/T299F/I332E、N297D/T299H/I332E、N297D/T299E/I332E、N297D/A330Y/I332E、N297D/S298A/A330Y/I332E、S239D/A330Y/I332E、S239N/A330Y/I332E、S239D/A330L/I332E、S239N/A330L/I332E、V264I/S298A/I332E、S239D/S298A/I332E、S239N/S298A/I332E、S239D/V264I/I332E、S239D/V264I/S298A/I332E和S239D/V264I/A330L/I332E,其中该Fc区中残基的编号是Kabat中的EU索引的编号。还参见

W02004029207,其通过引用并入本文。

[0232] 在具体实施例中,可以在所有同种型中在铰链连接区中的位点上、相邻或附近位点进行突变(例如,用另一残基替换残基234、235、236和/或237),以降低对Fc- γ 受体,特别是Fc- γ -RI受体的亲和力(参见例如US6624821)。任选地,位置234、236和/或237被丙氨酸取代并且位置235被谷氨酸取代。(参见例如US5624821。)人IgG2同种型中缺少位置236。人IgG2的位置234、235和237的示例性氨基酸片段是Ala Ala Gly、Val Ala Ala、Ala Ala Ala、Val Glu Ala和Ala Glu Ala。突变体的优选组合是L234A、L235E和G237A,或者对于人同种型IgG1是L234A、L235A和G237A。本发明的单特异性IgM型抗体的特别优选的变体是具有人同种型IgG1和Fc区的这三种突变之一的抗体。减少与Fc- γ 受体结合的其他取代是E233P突变(特别是在小鼠IgG1中)和D265A(特别是在小鼠IgG2a中)。减少Fc和/或C1q结合的突变和突变组合的其他实例是E318A/K320A/R322A(特别是在小鼠IgG1中)、L235A/E318A/K320A/K322A(特别是在小鼠IgG2a中)。类似地,人IgG4中的残基241(Ser)可以被替换,例如被脯氨酸替换以破坏Fc结合。

[0233] 可以对恒定区进行另外的突变以调节效应子活性。例如,可以对IgG1或IgG2恒定区于A330S、P331S或两者进行突变。对于IgG4,突变可以为E233P、F234V和L235A及G236缺失,或其任意组合。IgG4还可以具有以下突变S228P和L235E之一或两者。例如在W02006118,959和W02006036291中进一步描述了使用破坏的恒定区序列来调节效应子功能。

[0234] 可以对人IgG的恒定区进行另外的突变以调节效应子活性(参见例如W0200603291)。这些突变包括以下取代:(i)A327G、A330S、P331S;(ii)E233P、L234V、L235A、G236缺失;(iii)E233P、L234V、L235A;(iv)E233P、L234V、L235A、G236缺失、A327G、A330S、P331S;(v)人IgG1的E233P、L234V、L235A、A327G、A330S、P331S;或具体地,(vi)L234A、L235E、G237A、A330S和P331S(例如人IgG1的),其中Fc区中残基的编号是Kabat中的EU索引的编号。还参见W02004029207,其通过引用并入本文。

[0235] 抗体对Fc- γ -R的亲和力可以通过突变重链恒定区的某些残基来改变。例如,人IgG1的糖基化位点的破坏可以降低Fc- γ -R结合,从而降低抗体的效应子功能(参见例如W02006036291)。三肽序列NXS和NXT(其中X是除脯氨酸之外的任何氨基酸)是N残基糖基化的酶促识别位点。任何三肽氨基酸的破坏,尤其是IgG的CH2区域,将阻止该位点的糖基化。例如,人IgG1的N297突变防止糖基化并减少Fc- γ -R与抗体的结合。

[0236] 尽管ADCC和CDC的激活对于治疗性抗体来说通常是理想的,但在某些情况下,本发明的单特异性IgM型抗体或其变体不能优先激活效应子功能(例如,本发明的抗体是不可知调制器)。出于这些目的,通常使用IgG4,但近年来它已不再受欢迎,因为该子类具有进行Fab臂交换的独特能力,其中重链可以在体内IgG4之间交换以及残余ADCC活性。因此,Fc工程化方法还可用于确定Fc结构域与Fc- γ 受体和C1q的关键相互作用位点,然后突变这些位置,诸如在本发明的单特异性IgM型抗体或其变体的Fc中,以减少或废除结合。通过丙氨酸扫描,Duncan和Winter(1998;Nature 332:738)首先分离出C1q与覆盖Fc结构域铰链和上部CH2的区域的结合位点。Genmab的研究人员鉴定了突变体K322A、L234A和L235A,它们组合起来足以几乎完全废除Fc- γ -R和C1q结合(Hezareh等人,2001;J Virol 75:12161)。MedImmune后来以类似的方式鉴定了一组三个突变,L234F/L235E/P331S(称为TM),它们具有非常相似的效果(Oganesyan等人,2008;Acta Crystallographica 64:700)。另一种方法

是修饰Fc结构域天冬酰胺297上的糖基化,已知这是最佳FcR相互作用所必需的。在以下中观察到与Fc- γ R结合的丢失:N297点突变(Tao等人,1989;J Immunol 143:2595)、酶促去糖基化Fc结构域(Mimura等人,2001;J Biol Chem 276:45539)中观察到与Fc- γ R的结合丧失。糖基化抑制剂存在下重组表达的抗体(Walker等人,1989;Biochem J 259:347)和细菌中Fc结构域的表达(Mazor等人2007;Nat Biotechnol 25:563)。因此,本发明还包括单特异性寡聚抗体或其变体的实施例,其中此类技术或突变已用于降低效应子功能。

[0237] 由于FcRn介导的再循环,IgG自然会在(例如人)血清中持续较长时间,使其典型的半衰期大约为21天。尽管如此,人们还是做出了许多努力来工程化Fc结构域与FcRn的pH依赖性相互作用,以增加pH 6.0下的亲和力,同时保留pH 7.4下的最小结合。PDL BioPharma的研究人员鉴定了突变T250Q/M428L,该突变导致恒河猴中IgG半衰期增加了约2倍(Hinto等人,2004;J Biol Chem 279:6213),并且MedImmune的研究人员鉴定了突变M252Y/S254T/T256E(称为YTE),导致食蟹猴中IgG半衰期增加了约4倍(Dall'Acqua等人2006;J Biol Chem 281:23514)。M252Y/S254T/T256E突变与点突变H433K/N434F的组合导致类似的效果(Vaccaro等人,2005,Nat Biotechnol. Oct;23(10):1283-8)。本发明的ABP也可以是聚乙二醇化的。PEG化,即与合成聚合物聚乙二醇(PEG)的化学偶联,已成为开发长效生物制剂的公认技术,迄今为止已有约10种临床批准的蛋白质和肽药物(Jevsevar等人,2010;Biotechnol J 5:113)。本发明的单特异性寡聚抗体或其变体还可以进行PAS化,这是PEG化的生物替代方案,用于延长药物活性蛋白的血浆半衰期(Schlapschky等人,2013,Protein Eng Des Sel 26:489,XL-protein GmbH,Germany)。类似地,Amunix的XTEN半衰期延长技术提供了PEG化的另一种生物替代方案(Schellenberger,2009,Nat Biotechnol.;27(12):1186-90.doi:10.1038/nbt.1588)。因此,本发明还包括抗体的实施例,其中此类技术或突变已用于延长血清半衰期,特别是在人血清中。

[0238] 抗体片段包括“Fab片段”,由重链和轻链各自的一个恒定结构域和一个可变结构域组成,通过轻链的相邻恒定区和重链的第一恒定区(CH1)连接在一起链。这些可以通过蛋白酶消化形成,例如用木瓜蛋白酶消化,其来自传统抗体,但类似的Fab片段也可以通过遗传工程化产生。Fab片段包括Fab'、Fab和“Fab-SH”(它们是含有至少一个游离巯基的Fab片段)。

[0239] Fab'片段与Fab片段的不同之处在于,它们在重链第一恒定结构域的羧基末端含有另外的残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'片段包括“Fab'-SH”(它们是含有至少一个游离巯基的Fab'片段)。

[0240] 此外,抗体片段包括F(ab')₂片段,其含有两条轻链和两条重链,其中含有CH1和CH2结构域之间的恒定区的一部分(“铰链区”),从而在两条重链之间形成链间二硫键。因此,F(ab')₂片段由两个Fab'片段构成,所述两个Fab'片段由位于两条重链之间的二硫键保持在一起。F(ab')₂片段可以通过使用在铰链区下方裂解的酶进行蛋白水解裂解,从常规抗体制备,例如,用胃蛋白酶或通过遗传工程化。

[0241] “Fv区”包含来自重链和轻链的可变区,但缺少恒定区。“单链抗体”或“scFv”是Fv分子,其中重链可变区和轻链可变区通过柔性接头连接以形成单个多肽链,所述单个多肽链形成抗原结合区。

[0242] “Fc区”包含两个重链片段,所述重链片段包含抗体的CH2结构域和CH3结构域。两

个重链片段由两个或更多个二硫键并且通过CH3结构域的疏水相互作用保持在一起。

[0243] 因此, 在一些实施例中, 本发明的抗体是选自以下组成的列表的抗体片段: Fab'、Fab、Fab'-SH、Fab-SH、Fv、scFv和F(ab')₂。

[0244] 在优选的实施例中, 本发明的抗体是这样的抗体, 其中所述抗体或其片段的框架序列的至少一部分是人共有框架序列, 例如, 包含人种系编码的框架序列。

[0245] 在其他某些实施例中, 本发明的单特异性寡聚抗体或其变体被修饰以延长血清半衰期, 尤其是在人血清中。例如, 本发明的抗体可以是PEG化的和/或PAS化的, 或者具有T250Q/M428L、H433K/N434F/Y436或M252Y/S254T/T256E/H433K/N434F修饰的Fc区。

[0246] 在优选的实施例中, 本发明的抗体可以包含至少一个抗体恒定结构域, 特别是其中至少一个抗体恒定结构域是CH1、CH2或CH3结构域或其组合。

[0247] 在进一步的此类实施例中, 具有抗体恒定结构域的本发明的抗体包含突变的Fc区, 例如用于减少Fc区与Fc受体(免疫效应细胞上的Fc受体)的相互作用(例如Saxena&Wu; 2016; Front Immunol 7:580)。其实例和实施例在本文别处描述。

[0248] 在其他实施例中, 本发明的单特异性寡聚抗体或其变体可以包含效应基团和/或标记基团。术语“效应基团”意指充当细胞毒剂的任何基团, 特别是与另一分子诸如抗原结合蛋白偶联的基团。合适的效应基团的实例是放射性同位素或放射性核素。其他合适的效应基团包括毒素、治疗性基团或化疗性基团。合适的效应基团的实例包括加利霉素、瑞奥西汀(auristatin)、格尔德霉素、 α -鹅膏蕈毒肽(alpha-amanitine)、吡咯并苯并二氮杂卓和美登素。

[0249] 术语“标记”或“标记基团”是指任何可检测的标记。一般来说, 标记分为多种类别, 取决于要检测它们的测定: a) 同位素标记, 可以是放射性或重同位素; b) 磁性标签(例如磁性颗粒); c) 氧化还原活性部分; d) 光学染料; 酶基团(例如辣根过氧化物酶、 β -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶); e) 生物素化基团; 和f) 由第二报道分子识别的预定多肽表位(例如, 亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签等)。

[0250] 本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段的结合可以恢复、保护、维持和/或延长包含靶抗原的分子的生物学功能(参见例如图16), 因为本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段与功能限制性结合配偶体竞争和/或防止包含靶抗原的分子的降解。在一些实施例中, 本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段与靶抗原可逆地结合。

[0251] 因此, 本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现: 本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段通过与抗原功能限制性抗原结合剂竞争结合来保护和/或调节抗原的功能。

[0252] 在某些实施例中, 本发明涉及本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该保护性-调节性抗体、变体或片段包含a) 如SEQ ID NO:4中定义的CDR3和包含如SEQ ID NO:7中定义的CDR3的可变轻(VL)链; b) 包含如SEQ ID NO:11中定义的CDR3的可变重(VH)链和包含如SEQ ID NO:14中定义的CDR3的可变轻(VL)链; 或c) 包含如SEQ ID NO:18中定义的CDR3的可变重(VH)链和包含如SEQ ID NO:21中定义的CDR3的可变轻(VL)链。

[0253] 在某些实施例中, 本发明涉及本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段, 其中该保护性-调节性抗体、变体或片段包含a) 可变重(VH)链, 其包含如SEQ ID NO:2中定义的CDR1、如SEQ ID NO:3中定义的CDR2和如SEQ ID NO:4中定义的CDR3; 和可变轻(VL)链, 其包含如SEQ ID NO:6中定义的CDR1、如通过序列DAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:7中定义的

CDR3;b) 可变重 (VH) 链,其包含如SEQ ID NO:9中定义的CDR1、如SEQ ID NO:10中定义的CDR2和如SEQ ID NO:11中定义的CDR3;和可变轻 (VL) 链,其包含如SEQ ID NO:13中定义的CDR1、如通过序列GAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:14中定义的CDR3;或者c) 可变重 (VH) 链,其包含如SEQ ID NO:16中定义的CDR1、如SEQ ID NO:17中定义的CDR2和如SEQ ID NO:18中定义的CDR3;和可变轻 (VL) 链,其包含如SEQ ID NO:20中定义的CDR1、如通过序列DAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:21中定义的CDR3。

[0254] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中该保护性-调节性抗体、变体或片段包含a) 包含可变重 (VH) 链序列,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;和可变轻 (VL) 链序列,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;b) 包含可变重 (VH) 链序列,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;和可变轻 (VL) 链序列,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;或者c) 包含可变重 (VH) 链序列,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;和可变轻 (VL) 链序列,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列。

[0255] 相对于参照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”被定义为在比对序列并引入缺口(如果必要)以获得最大百分比序列同一性之后,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,并且不将任何保守置换视为序列同一性的一部分。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以通过本领域技术人员熟知的各种方式实现,例如,使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的合适参数,包括在被比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0256] 在某些实施例中,考虑了本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能需要改进抗体的结合亲和力、特异性和/或其他生物学特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过将适当的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中或通过肽合成来制备。此类修饰包含例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或取代。可以进行缺失、插入和取代的任意组合以得到最终构建体,条件是最终构建体具有所期望的特性,例如抗原结合。

[0257] 在某些实施例中,提供了具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。可以将氨基酸取代引入感兴趣的抗体中,并筛选产物的所需活性,例如保留/改善的靶抗原结合、降低的免疫原性或改变的ADCC或CDC。

[0258] 一种类型的取代型变体涉及取代亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一或多个高变区残基。通常,选定的用于进一步研究的所得变体将相对于亲本抗体在某些生物性质(例如,增加的亲和力、增加的特异性、增加的保护特性、降低的免疫原性)上具有修饰(例如,改进),和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物性质。示例性取代变体是亲和力成熟的抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术诸如本文描述的那些技术方便地产生。简而言之,一个或多个CDR残基被突变,并且变体抗体展示在噬菌体上并筛选具体的生物学活性(例如结合亲和力或特异性)。

[0259] 可以在CDR中进行变更(例如,取代),例如,以改进抗体亲和力。此类变更可以在

CDR“热点”中进行,即由在体细胞成熟过程期间以高频经历突变的密码子编码的残基(参见例如Chowdhury,2008,Methods Mol.Biol.207:179-196)和/或SDR(a-CDR),测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建二级文库和从二级文库中重新选择来进行的亲和力成熟已经在例如Hoogenboom等人,2002 Methods in Molecular Biology 178:1-37中进行了描述。在亲和力成熟的一些实施例中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任何方法将多样性引入到被选择用于成熟的可变基因中。然后产生二级文库。然后对文库进行筛选,以鉴别出具有期望的亲和力的任何抗体变体。用于引入多样性的另一种方法涉及CDR指导的方法,其中若干个CDR残基(例如,一次4-6个残基)被随机化。抗原结合所涉及的CDR残基可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模特异性地鉴别出来。CDR-H3和CDR-L3特别经常成为靶标。在另一个实施例中,通过多维诱变方法使用浏览突变(look-through mutagenesis)来优化抗体亲和力,该方法同时评估和优化所选氨基酸的组合突变(Rajpal,Arvind等人,2005,Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America第102卷,24:8466-71)。

[0260] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个CDR内,只要此类改变基本上不降低抗体与抗原结合的能力即可。例如,可以在CDR中进行基本上不降低结合亲和力和/或特异性的保守变更(例如保守取代)。此类变更可以在CDR“热点”或SDR之外。在以上所提供的变体VH和VL序列的某些实施例中,每个CDR不改变,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0261] 用于鉴定可作为诱变目标的抗体残基或区域的有用方法称为“丙氨酸扫描诱变”,如Cunningham和Wells,1989,Science,244:1081-1085所述。在此方法中,鉴定了一个残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu),并用中性或带负电的氨基酸(例如丙氨酸或多聚丙氨酸)替换,以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在氨基酸位置引入另外的取代,从而证明对初始取代的功能敏感性。可替代地或另外地,使用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和邻近残基可作为取代候选物被靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否包含所需的特性。

[0262] 在某些实施例中,本文提供的抗体被改变以增加或减少抗体糖基化的程度。向抗体添加或缺失糖基化位点可以通过改变氨基酸序列使得一或多个糖基化位点得以产生或去除来方便地完成。

[0263] 当抗体包含Fc区时,与其连接的碳水化合物可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分支的二天线寡糖,其通常通过N-键连接至Fc区的CH2结构域的Asn297。参见例如Wright等人,1997,TIBTECH 15:26-32。寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及连接至二天线寡糖结构的“茎”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可以对本发明的抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改进的特性的抗体变体。

[0264] 在一个实施例中,提供的抗体变体具有缺乏(直接或间接)连接至Fc区的岩藻糖的碳水化合物结构。例如,此类抗体中岩藻糖的量可以从1%至80%、从1%至65%、从5%至65%或从20%至40%。岩藻糖的量是通过计算以下确定的:Asn297糖链内岩藻糖的平均量相对于连接到Asn 297的所有糖结构(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的总和(通过MALDI-TOF质谱法测量的),例如如WO 2008/077546中所述。Asn297指位于Fc区中约位置297

处的天冬酰胺残基(Fe区残基的Eu编号);然而,由于抗体中的微小序列变异,Asn297也可能位于位置297上游或下游约 ± 3 个氨基酸,即位置294和300之间。此类岩藻糖基化变体可能对炎症产生改变的影响(Irvine、Edward B和Galit Alter.,2020,Glycobiology第30卷,4:241-253)。参见例如US 2003/0157108;US2004/0093621。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷”抗体变体相关的出版物的实例包括:US2003/0157108;WO 2000/61739;WO 2001/29246;US2003/0115614;US2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;WO 2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO 2005/053742;WO 2002/031140;Okazaki等人2004J.Mol.Biol.336:1239-1249;Yamane-Ohnuki等人,2004,Biotech.Bioeng.87:614。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人,1986,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545;US2003/0157108;和WO 2004/056312,尤其在实例11处),以及敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因、FUT8、敲除CHO细胞(参见例如Yamane-Ohnuki等人,2004,Biotech.Bioeng.87:614;Kanda,Y.等人,2006,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688;以及WO 2003/085107)。

[0265] 抗体变体进一步提供有二等分的寡糖,例如,其中连接至抗体Fc区的二天线寡糖被GlcNAc二等分。此类抗体变体可能具有改变的岩藻糖基化和/或改变的对炎症的影响(Irvine、Edward B和Galit Alter.,2020,Glycobiology第30卷,4:241-253)。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878;美国专利号6,602,684;及US2005/0123546中。还提供了在连接至Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可能具有改进的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087;WO 1998/58964;和WO 1999/22764。

[0266] 在某些实施例中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体的Fc区中,从而产生Fc区变体。Fc区变体可包含人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区),其包含在一个或多个氨基酸位置处的氨基酸修饰(例如取代)。

[0267] 抗体的半衰期得到增加,并且与新生儿Fc受体(FcRn)的结合得到改善,新生儿Fc受体负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人,1976,J.Immunol.117:587和Kirn等人,1994J.Immunol.24:249),所述抗体描述于US2005/0014934中。这些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,所述取代改善了Fc区与FcRn的结合。此类Fc变体包括在Fc区残基的一个或多个处具有取代的变体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如Fc区残基434的取代(US2006/0194291)。

[0268] 在某些实施例中,可能需要产生半胱氨酸工程化抗体,例如“thioMAb”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基取代。在具体实施例中,取代的残基出现在抗体的可及位点。通过用半胱氨酸取代那些残基,反应性硫醇基团由此定位在抗体的可及位点并且可以用于将抗体缀合至其他部分,诸如药物部分或接头-药物部分,如本文进一步描述的。在某些实施例中,任何一个或多个以下残基可以被半胱氨酸取代:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程抗体可以如例如US 7521541中所述产生。

[0269] 在某些实施例中,本文提供的抗体可以被进一步修饰以含有本领域已知的并且容易获得的另外的非蛋白质部分。适合于抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。水

溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇 (PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚1,3-二氧戊环、聚1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、和葡聚糖或聚(正乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性而在制造中具有优势。聚合物可以具有任何分子量并且可以是支化的或非支化的。连接到抗体的聚合物的数量可以变化,并且如果连接多于一种聚合物,它们可以是相同或不同的分子。一般而言,用于衍生化的聚合物的数量和/或类型可以基于考虑因素来确定,包括但不限于待改善的抗体的具体特性或功能、抗体衍生物是否将用于定义的条件下的疗法等。

[0270] 在某些实施例中,本发明涉及抗体或其抗原结合片段,其包含至少一种上述序列,其中所述抗原结合片段是Fab片段、F(ab')片段或Fv片段。

[0271] 包含本文所述序列的保护性-调节性抗体的结合可以恢复、保护、维持和/或延长胰岛素或其变体或片段的生物学功能,因为本发明保护性-调节性抗体、其变体或片段的结合与功能限制性结合配偶体竞争和/或防止胰岛素或其变体或片段的降解。在一些实施例中,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段与胰岛素或其变体或片段可逆地结合。

[0272] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:包含本文所述序列的本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段通过与抗原功能限制性抗原结合剂竞争结合来保护和/或调节抗原的功能,特别是胰岛素的功能。

[0273] 在某些实施例中,本发明涉及编码本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段的多核苷酸。

[0274] 如本文所用,术语“多核苷酸”是指核酸序列。核酸序列可以是DNA或RNA序列,优选核酸序列是DNA序列。本发明的多核苷酸基本上由前述核酸序列组成或者包含前述核酸序列。因此,它们也可以含有另外的核酸序列。本发明的多核苷酸应优选作为分离的多核苷酸(即从其天然背景分离)或以遗传修饰的形式中任一者提供。本文提及的分离的多核苷酸还涵盖存在于除其天然细胞环境之外的细胞环境中的多核苷酸,即异源多核苷酸。术语多核苷酸涵盖单链以及双链多核苷酸。此外,还包括化学修饰的多核苷酸,包括天然存在的修饰的多核苷酸诸如糖基化或甲基化多核苷酸或人工修饰的多核苷酸诸如生物素化多核苷酸。

[0275] 在实施例中,本发明的多核苷酸编码根据本发明的保护性-调节性抗体的可变重(VH)链序列和/或可变轻(VL)链序列中的至少一种。

[0276] 在某些实施例中,本发明涉及编码可变重(VH)链序列的多核苷酸序列,所述可变重(VH)链序列包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25。

[0277] 在某些实施例中,本发明涉及编码可变轻(VL)链序列的多核苷酸序列,所述可变轻(VL)链序列包含SEQ ID NO:26的核苷酸序列或与SEQ ID NO:26具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:27、GATGCATCC和SEQ ID NO:28。

[0278] 在某些实施例中,本发明涉及编码以下的多核苷酸序列a) 可变重(VH)链序列,其包含SEQ ID NO:22的核苷酸序列或与SEQ ID NO:22具有至少85%、86%、87%、88%、89%、

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:25;和b)可变轻(VL)链序列,其包含SEQ ID NO:26的核苷酸序列或与SEQ ID NO:26具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:27、GATGCATCC和SEQ ID NO:28。

[0279] 在某些实施例中,本发明涉及编码可变重(VH)链序列的多核苷酸序列,所述可变重(VH)链序列包含SEQ ID NO:29的核苷酸序列或与SEQ ID NO:29具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32。

[0280] 在某些实施例中,本发明涉及编码可变轻(VL)链序列的多核苷酸序列,所述可变轻(VL)链序列包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列或与SEQ ID NO:33具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,优选包含序列SEQ ID NO:34、GGTGCATCC和SEQ ID NO:35。

[0281] 在某些实施例中,本发明涉及编码以下的多核苷酸序列a)可变重(VH)链序列,其包含SEQ ID NO:29的核苷酸序列或与SEQ ID NO:29具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32;和b)可变轻(VL)链序列,其包含SEQ ID NO:33的核苷酸序列或与SEQ ID NO:33具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:34、GGTGCATCC和SEQ ID NO:35。

[0282] 在某些实施例中,本发明涉及编码可变重(VH)链序列的多核苷酸序列,所述可变重(VH)链序列包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列或与SEQ ID NO:36具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39。

[0283] 在某些实施例中,本发明涉及编码可变轻(VL)链序列的多核苷酸序列,所述可变轻(VL)链序列包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列或与SEQ ID NO:40具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性,优选包含序列SEQ ID NO:41、GATGCATCC和SEQ ID NO:42。

[0284] 在某些实施例中,本发明涉及编码以下的多核苷酸序列a)可变重(VH)链序列,其包含SEQ ID NO:36的核苷酸序列或与SEQ ID NO:36具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39;和b)可变轻(VL)链序列,其包含SEQ ID NO:40的核苷酸序列或与SEQ ID NO:40具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列,优选包含序列SEQ ID NO:41、GATGCATCC和SEQ ID NO:42。

[0285] 在一些实施例中,本发明的多核苷酸与另一核酸序列可操作地连接。例如,转录调控序列可操作地连接至本发明的多核苷酸。

[0286] 在某些实施例中,本发明涉及包含本发明的多核苷酸的载体。

[0287] 如本文所用,术语“载体”是指能够转移或运输另一核酸分子的核酸分子。转移的

核酸通常连接至即插入载体核酸分子。载体可以包括指导细胞中自主复制的序列,或者可以包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。有用的载体包括例如质粒(例如DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人工染色体和病毒载体。

[0288] 在一些实施例中,本发明的载体用转染增强剂的支持物进行转染,所述转染增强剂例如选自下组:寡核苷酸、脂质复合物、聚合物囊泡、聚合复合物、树枝状聚合物、无机纳米颗粒和细胞穿透肽。

[0289] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:即本发明的载体能够通过与抗原功能限制性抗原结合剂竞争结合来表达保护和/或调节靶抗原、特别是胰岛素的功能的抗体、变体或片段。

[0290] 在某些实施例中,本发明涉及包含本发明的多核苷酸的宿主细胞。

[0291] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且是指已经引入外源核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,包括原代转化细胞及衍生自其的子代,不考虑传代次数。子代的核酸含量可能与亲代细胞不完全相同,但可能含有突变。本文包括在最初转化细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物活性的突变体子代。

[0292] 在某些实施例中,宿主细胞直接或间接用于疗法(例如细胞疗法)。在某些实施例中,用于细胞疗法的方法包括以下步骤:(i)从受试者获得细胞;(ii)使用包含本发明的多核苷酸的工具(例如载体)转化细胞和/或转化细胞以产生本发明的抗体;和(iii)将转化的细胞施用于受试者。在某些实施例中,细胞疗法的方法的步骤(i)和步骤(iii)中的受试者是同一受试者。在某些实施例中,细胞疗法的方法的步骤(i)和步骤(iii)中的受试者是不同的受试者。在某些实施例中,细胞疗法的方法的步骤(i)和步骤(iii)中的受试者是属于不同物种的不同受试者。在某些实施例中,细胞疗法的方法的步骤(i)中的受试者是来自猪属的受试者,并且细胞疗法的方法的步骤(iii)中的受试者是来自智人种的受试者。

[0293] 在某些实施例中,宿主细胞是干细胞。在其他实施例中,宿主细胞是分化细胞。

[0294] 用于克隆或表达抗体编码载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,抗体可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(参见例如Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 第.248卷(B.K.C.Lo编辑, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第245-254页,描述了抗体片段在大肠杆菌中的表达)。

[0295] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的宿主细胞能够通过与抗原功能限制性抗原结合剂竞争结合来产生保护和/或调节靶抗原、特别是胰岛素的功能的抗体、变体或片段。

[0296] 在某些实施例中,本发明涉及用于产生抗体的方法,该方法包括培养本发明的宿主细胞。

[0297] 在某个实施例中,本发明涉及用于产生抗体的方法,该方法包括培养本发明的宿主细胞,其中该宿主细胞包含本发明的多核苷酸。

[0298] 在具体实施例中,产生抗体的方法包括在适合允许有效产生本发明的抗体的条件下培养本发明的宿主细胞。

[0299] 在一个这样的实施例中,宿主细胞包含(例如,已用以下转化):(1)载体,其包含编

码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含本发明的抗体的VH的氨基酸序列的核酸或(2)第一载体和第二载体,该第一载体包含编码包含本发明的抗体的VL的氨基酸序列的核酸,该第二载体包含编码包含本发明的抗体的VH的氨基酸序列的核酸。在一个实施例中,宿主细胞是真核细胞,例如,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如YO、NSO、Sp20)。在一个实施例中,一种制备抗体的方法,其中该方法包括在适合抗体表达的条件下培养包含编码如上文所提供的抗体的核酸的宿主细胞,并且任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收抗体。

[0300] 为了重组产生根据本发明的抗体(例如保护性-调节性抗体),分离编码例如上文所述的抗体的核酸,并将其插入一个或多个载体中,用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸可以使用常规程序容易地分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。

[0301] 用于克隆或表达抗体编码载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,抗体可以在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如US 5648237、US 5789199和US 5840523;Charlton,2003,Methods in Molecular Biology,第248卷;BKC Lo,2003,Humana Press,第245-254页。表达后,抗体可从细菌细胞糊中以可溶性级分分离并可进一步纯化。

[0302] 除原核生物外,真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是抗体编码载体的合适的克隆或表达宿主,包括其糖基化途径已被“人源化”的真菌和酵母菌株,从而产生具有部分或全部人糖基化模式的抗体。参见Gerngross,2004,Nat.Biotech.22:1409-1414,和Li等人,2006,Nat.Biotech.24:210-215。

[0303] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也源自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴定出许多可与昆虫细胞结合使用的杆状病毒株,特别是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。

[0304] 植物细胞培养物也可以用作宿主。参见例如US 5959177;US 6040498、US 6420548、US 7125978和US 6417429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0305] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,适合在悬浮液中生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例是由SV40(COS-7)转化的猕猴肾CV1系;人胚胎肾系(293或293细胞,例如在Graham等人,1997,J.Gen Viral.36:59中描述的);小鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(TM4细胞,如Mather,1980,Biol.Reprod.23:243-251中描述的);猕猴肾细胞(CV 1);非洲绿猕猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK);水牛大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);TRI细胞,如Mather等人,1982,Annals N.Y Acad.Sci.383:44-68所述;MRC 5细胞;和FS4细胞。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR CHO细胞(Urlaub等人,1980,Proc.Natl.Acad.Sc.USA 77:4216);以及骨髓瘤细胞系,诸如YO、NSO和Sp2/0。对于适合于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见例如Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,第248卷BKC Lo,2003,Humana Press,第255-268页。

[0306] 获得的特异性抗体的量可以使用ELISA进行定量,这也在下文中描述。用于产生抗体的另外的方法是本领域众所周知的,参见例如Harlow和Lane,1988,CSH Press,Cold

Spring Harbor。

[0307] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的产生方法能够通过与其抗原功能限制性抗原结合剂竞争结合来产生保护和/或调节靶抗原、特别是胰岛素的功能的抗体、变体或片段。

[0308] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,其进一步包含本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段和/或本发明的载体。

[0309] 添加本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段和/或本发明的载体可以增强本发明的组合物的效果,减少本发明的组合物的效果的起效时间和/或使得本发明的组合物的效果较少依赖于内源性保护性-调节性抗体的产生。

[0310] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段可以支持本发明的组合物的效果。

[0311] 在某些实施例中,本发明涉及药物产品,其包含治疗剂和a) 本发明的组合物;b) 本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段;c) 本发明的载体;和/或d) 单价抗原颗粒,其中该单价抗原颗粒由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,其中该治疗剂是靶抗原。

[0312] 在某些实施例中,本发明涉及药物产品,其包含治疗剂和a) 本发明的组合物;b) 本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段;和/或c) 本发明的载体,其中该治疗剂是靶抗原。

[0313] 如本文所用,术语“治疗剂”是指在以治疗有效量施用于受试者时向受试者提供治疗益处的化合物。治疗剂可以是用于治疗、控制或预防疾病或医学状况的任何类型的药物、药品、药剂、激素、抗生素、蛋白质、基因、生长因子、生物活性材料。本领域技术人员将理解,术语“治疗剂”不限于已获得监管批准的药物。

[0314] 在一些实施例中,治疗剂可以选自下组:小分子药物、蛋白质/多肽、抗体、具有抗生素活性的分子药物、基于噬菌体的疗法、核酸分子和siRNA。

[0315] 药物产品中包含的抗体、片段或变体的结合或由药物产品的成分诱导的抗体、片段或变体的结合的保护性-调节性作用可以改善治疗剂的药代动力学和药效动力学特性。在一些实施例中,药物产品包含胰岛素或其变体或片段以及保护性-调节性抗体,所述保护性-调节性抗体包含a) 可变重(VH)链,其包含如SEQ ID NO:2中定义的CDR1、如SEQ ID NO:3中定义的CDR2和如SEQ ID NO:4中定义的CDR3;和可变轻(VL)链,其包含如SEQ ID NO:6中定义的CDR1、如通过序列DAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:7中定义的CDR3;

[0316] b) 可变重(VH)链,其包含如SEQ ID NO:9中定义的CDR1、如SEQ ID NO:10中定义的CDR2和如SEQ ID NO:11中定义的CDR3;和可变轻(VL)链,其包含如SEQ ID NO:13中定义的CDR1、如通过序列GAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:14中定义的CDR3;或者

[0317] c) 可变重(VH)链,其包含如SEQ ID NO:16中定义的CDR1、如SEQ ID NO:17中定义的CDR2和如SEQ ID NO:18中定义的CDR3;和可变轻(VL)链,其包含如SEQ ID NO:20中定义的CDR1、如通过序列DAS定义的CDR2和如SEQ ID NO:21中定义的CDR3,更优选地包含d) 包含:可变重(VH)链序列,其包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;和可变轻(VL)链序列,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;e) 包含:可变重(VH)链序列,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少90%、优选至少95%序

列同一性的序列;和可变轻 (VL) 链序列,其包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;或者f) 包含:可变重 (VH) 链序列,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;和可变轻 (VL) 链序列,其包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少90%、优选至少95%序列同一性的序列;或者其 (a)、b)、c)、d)、e) 和/或f) 的) 变体或片段或用于其 (a)、b)、c)、d)、e) 和/或f) 的) 表达的宿主细胞或载体。在向受试者施用后,保护性-调节性抗体的结合可以保护胰岛素、胰岛素变体或胰岛素片段免受受试者的免疫应答。

[0318] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:治疗剂可以如本文所述受到保护和/或调节。

[0319] 在某些实施例中,本发明涉及根据本发明的药物产品,其中该治疗剂是治疗性抗体。

[0320] 如本文所用,术语“治疗性抗体”是指本文所述的治疗剂,其为抗体。

[0321] 在一些实施例中,该治疗抗体是选自下组的至少一种抗体:阿巴戈沃单抗 (Abagovomab)、阿布赛昔单抗 (Abciximab)、阿比妥珠单抗 (Abituzumab)、阿泽奇单抗 (Abrezekimab)、阿利鲁单抗 (Abrilumab)、阿克托舒单抗 (Actoxumab)、阿达木单抗 (Adalimumab)、阿迪妥木单抗 (Adecatumumab)、阿度努单抗 (Aducanumab)、阿法库单抗 (Afasevikumab)、阿非利莫单抗 (Afelimomab)、培戈-阿拉赛珠单抗 (Alacizumab pegol)、阿仑妥珠单抗 (Alemtuzumab)、阿利苏单抗 (Alirocumab)、阿妥莫单抗 (Altumomab)、阿玛妥昔单抗 (Amatuximab)、埃万妥单抗 (Amivantamab)、麻安莫单抗 (Anatumomab mafenatox)、安德利昔单抗 (Andecaliximab)、雷星-阿奈妥单抗 (Anetumab ravtansine)、阿尼鲁单抗 (Anifrolumab)、安舒韦单抗 (Ansuvimab)、安芦组单抗 (Anrukinzumab)、阿珀利珠单抗 (Apolizumab)、伊汀-阿普卢妥单抗 (Aprutumab ixadotin)、阿西妥莫单抗 (Arcitumomab)、阿伐苏单抗 (Ascrinvacumab)、阿瑟利珠单抗 (Aselizumab)、阿特利珠单抗 (Atezolizumab)、阿度尤单抗 (Atidortoxumab)、阿替努单抗 (Atinumab)、阿替韦单抗 (Atoltivimab)、阿托木单抗 (Atorolimumab)、阿维鲁单抗 (Avelumab)、维汀-阿妥昔珠单抗 (Azintuxizumab vedotin)、巴尼韦单抗 (Bamlanivimab)、巴匹奈珠单抗 (Bapineuzumab)、巴司利昔单抗 (Basiliximab)、巴韦妥昔单抗 (Bavituximab)、BCD-100、贝妥莫单抗 (Bectumomab)、贝戈洛单抗 (Begelomab)、玛贝妥单抗 (Belantamab mafodotin)、贝利木单抗 (Belimumab)、贝玛妥珠单抗 (Bemarituzumab)、本雷利珠单抗 (Benralizumab)、贝度尤单抗 (Berlimatoxumab)、贝迈奇单抗 (Bermekimab)、Bersanlimab、柏替利木单抗 (Bertilimumab)、贝西来索单抗 (Besilesomab)、贝伐赛珠单抗 (Bevacizumab)、贝洛托舒单抗 (Bezlotoxumab)、比西单抗 (Biciromab)、比玛卢单抗 (Bimagrumab)、比美吉珠单抗 (Bimekizumab)、泊特埃单抗 (Birtamimab)、比伐珠单抗 (Bivatuzumab)、布来鲁单抗 (Bleselumab)、布利妥莫单抗 (Blinatumomab)、布隆妥维单抗 (Blontuветmab)、布洛索珠单抗 (Blosozumab)、伯考赛珠单抗 (Bococizumab)、布雷库单抗 (Brazikumab)、维汀-布仑妥昔单抗 (Brentuximab vedotin)、布瑞吉努单抗 (Briakinumab)、布洛鲁单抗 (Brodalumab)、布洛赛珠单抗 (Brolucizumab)、布隆妥珠单抗 (Brontictuzumab)、布洛舒单抗 (Burosumab)、卡比利珠单抗 (Cabiralizumab)、Camidanlumab tesirine、坎利珠单抗 (Camrelizumab)、卡

那吉努单抗 (Canakinumab)、莫星-坎妥珠单抗 (Cantuzumab mertansine)、雷星-坎妥珠单抗 (Cantuzumab ravtansine)、卡普赛珠单抗 (Caplacizumab)、卡西瑞单抗 (Casirivimab)、卡普罗单抗 (Capromab)、卡鲁单抗 (Carlumab)、卡罗妥昔单抗 (Carotuximab)、卡妥玛索单抗 (Catumaxomab)、cBR96-阿霉素免疫缀合物、西利珠单抗 (Cedelizumab)、西米普利单抗 (Cemiplimab)、阿姆白介素-瑟妥珠单抗 (Cergutuzumab amunaleukin)、培戈-瑟托利珠单抗 (Certolizumab pegol)、西利单抗 (Cetrelimab)、塞妥昔单抗 (Cetuximab)、赛必妥单抗 (Cibisatamab)、西妥珠单抗 (Cirmtuzumab)、柏托-西他妥珠单抗 (Citatumab bogatox)、西舒妥木单抗 (Cixutumumab)、克拉吉珠单抗 (Clazakizumab)、克立昔单抗 (Clenoliximab)、泰坦-克利妥珠单抗 (Clivatuzumab tetraxetan)、考曲妥珠单抗 (Codrituzumab)、培汀-考非妥珠单抗 (Cofetuzumab pelidotin)、雷星-考妥昔单抗 (Coltuximab ravtansine)、考那妥木单抗 (Conatumumab)、康赛珠单抗 (Concizumab)、考韦昔单抗 (Cosfroviximab)、克瑞奈珠单抗 (Crenezumab)、立赞利珠单抗 (Crizanlizumab)、克罗特度单抗 (Crotedumab)、CR6261、古妥珠单抗 (Cusatuzumab)、达西组单抗 (Dacetuzumab)、达克利珠单抗 (Daclizumab)、达洛妥珠单抗 (Dalotuzumab)、培戈-达匹利珠单抗 (Dapirolizumab pegol)、达雷妥木单抗 (Daratumumab)、德屈库单抗 (Dectrekumab)、登赛珠单抗 (Demcizumab)、玛汀-地宁妥珠单抗 (Denintuzumab mafodotin)、迪诺舒单抗 (Denosumab)、玛汀-迪妥昔珠单抗 (Depatuxizumab mafodotin)、地洛妥单抗生物素 (Derlotuximab biotin)、地莫单抗 (Detumomab)、迪扎米珠单抗 (Dezamizumab)、地努妥昔单抗 (Dinutuximab)、地努妥昔单抗 β (Dinutuximab beta)、地利伏单抗 (Diridavumab)、多玛洛珠单抗 (Domagrozumab)、阿托度莫单抗 (Dorlimomab aritox)、多塔利单抗 (Dostarlimab)、卓齐妥单抗 (Drozitumab)、DS-8201、度利戈妥单抗 (Duligotuzumab)、度匹鲁单抗 (Dupilumab)、度伐鲁单抗 (Durvalumab)、度司妥单抗 (Dusigitumab)、度妥昔珠单抗 (Duvortuxizumab)、依洛美昔单抗 (Ecromeximab)、依库利珠单抗 (Eculizumab)、埃巴单抗 (Edobacomab)、依曲考罗单抗 (Edrecolomab)、依法利珠单抗 (Efalizumab)、依芬谷单抗 (Efungumab)、埃迪鲁单抗 (Eldelumab)、依来努单抗 (Elezanumab)、依更妥单抗 (Elgemtumab)、依洛妥珠单抗 (Elotuzumab)、艾西莫单抗 (Elsilimomab)、依米妥珠单抗 (Emactuzumab)、依玛鲁单抗 (Emapalumab)、依玛妥珠单抗 (Emibetuzumab)、依米赛珠单抗 (Emicizumab)、维汀-恩妥替尼 (Enapotamab vedotin)、依那妥珠单抗 (Enavatuzumab)、维汀-恩弗妥单抗 (Enfortumab vedotin)、培化恩莫单抗 (Enlimomab pegol)、依诺妥珠单抗 (Enoblituzumab)、依诺吉珠单抗 (Enokizumab)、依诺苏单抗 (Enoticumab)、恩司妥昔单抗 (Ensituximab)、艾可瑞妥单抗 (Epcoritamab)、西坦-依匹妥莫单抗 (Epitumomab cituxetan)、依普妥珠单抗 (Epratuzumab)、依普奈珠单抗 (Eptinezumab)、厄瑞努单抗 (Erenumab)、厄利珠单抗 (Erlizumab)、厄妥玛索单抗 (Ertumaxomab)、埃达组单抗 (Etaracizumab)、埃特司韦单抗 (Etesevimab)、艾替利单抗 (Etigilimab)、依卓利珠单抗 (Etrolizumab)、依维苏单抗 (Evinacumab)、依沃苏单抗 (Evolocumab)、埃比韦卢单抗 (Exbivirumab)、法索单抗 (Fanolesomab)、法拉莫单抗 (Faralimomab)、法瑞希单抗 (Faricimab)、法乐妥珠单抗 (Farletuzumab)、法司努单抗 (Fasinumab)、FBTA05、泛维珠单抗 (Felvizumab)、菲扎吉努单抗 (Fezakinumab)、Fibatuzumab、菲拉妥珠单抗 (Ficlatuzumab)、菲吉妥木单抗 (Figitumumab)、非利伏单抗

(Firivumab)、夫兰妥单抗(Flanvotumab)、夫来库单抗(Fletikumab)、伏妥珠单抗(Flotetuzumab)、芳托利珠单抗(Fontolizumab)、福雷芦单抗(Foralumab)、弗雷韦卢单抗(Foravirumab)、瑞玛奈珠单抗(Fremanezumab)、夫瑞利木单抗(Fresolimumab)、弗洛西单抗(Frovocimab)、夫卢维单抗(Frunevetmab)、伏雷努单抗(Fulranumab)、伏妥昔单抗(Futuximab)、伽奈珠单抗(Galcanezumab)、加利昔单抗(Galiximab)、甘妥单抗(Gancotamab)、加尼妥单抗(Ganitumab)、更汀芦单抗(Gantenerumab)、伽妥珠单抗(Gatipotuzumab)、加威利莫单抗(Gavilimomab)、格迪伏单抗(Gedivumab)、奥-吉妥珠单抗(Gemtuzumab ozogamicin)、格沃吉珠单抗(Gevokizumab)、吉维单抗(Gilvetmab)、瑾司鲁单抗(Gimsilumab)、吉仑妥昔单抗(Girentuximab)、维汀-格仑妥木单抗(Glembatumumab vedotin)、戈利木单抗(Golimumab)、鲁昔单抗(Gomiliximab)、戈奈单抗(Gosuranemab)、谷瑟库单抗(Guselkumab)、伊利尤单抗(Ianalumab)、艾巴利珠单抗(Ibalizumab)、信迪利单抗(Sintilimab)、替坦-艾瑞妥莫单抗(Ibritumomab tiuxetan)、艾卢苏单抗(Icrucumab)、艾达赛珠单抗(Idarucizumab)、Ifabotuzumab、伊戈伏单抗(Igovomab)、维汀-伊达珠单抗(Iladatuzumab vedotin)、伊玛鲁单抗(Imalumab)、伊普利单抗(Imaprelimab)、英赛罗单抗(Imciromab)、伊姆德维单抗(Imdevimab)、英加妥珠单抗(Imgatuzumab)、英拉苏单抗(Inclacumab)、雷星-英达妥昔单抗(Indatuximab ravtansine)、维汀-英度妥单抗(Indusatumab vedotin)、英比利珠单抗(Inebilizumab)、英夫利西单抗(Infliximab)、英特妥木单抗(Intetumumab)、艾诺利莫单抗(Inolimomab)、奥星-艾诺妥珠单抗(Inotuzumab ozogamicin)、艾匹利木单抗(Ipilimumab)、Iomab-B、艾雷妥木单抗(Iratumumab)、艾萨妥昔单抗(Isatuximab)、伊卡利单抗(iscalimab)、艾司妥单抗(Istiratumab)、艾托利珠单抗(Itolizumab)、艾塞吉珠单抗(Ixekizumab)、凯利昔单抗(Keliximab)、拉贝妥珠单抗(Labetuzumab)、拉妥珠单抗(Lacnotuzumab)、维汀-拉迪妥珠单抗(Ladiratuzumab vedotin)、兰帕利珠单抗(Lampalizumab)、拉那鲁单抗(Lanadelumab)、兰洛珠单抗(Landogrozumab)、恩星-拉妥昔单抗(Laprituximab emtansine)、拉韦昔单抗(Larcaviximab)、乐瑞吉珠单抗(Lebrikizumab)、乐玛来索单抗(Lemalesomab)、伦达利珠单抗(Lendalizumab)、伦韦单抗(Lenvervimab)、仑兹鲁单抗(Lenzilumab)、乐迪利木单抗(Lerdelimumab)、乐利单抗(Leronlimab)、来索伏单抗(Lesofavumab)、来利珠单抗(Letolizumab)、乐萨妥木单抗(Lexatumumab)、利比韦卢单抗(Libivirumab)、维汀-利法妥珠单抗(Lifastuzumab vedotin)、利格利珠单抗(Ligelizumab)、特司林-朗妥昔单抗(Loncastuximab tesirine)、维汀-罗妥昔珠单抗(Losatuxizumab vedotin)、利洛托单抗(Lilotomab satetraxetan)、林妥珠单抗(Lintuzumab)、利瑞鲁单抗(Lirilumab)、洛迪赛珠单抗(Lodelcizumab)、洛吉维单抗(Lokivetmab)、莫星-洛沃妥珠单抗(Lorvotuzumab mertansine)、鲁卡妥木单抗(Lucatumumab)、培戈-鲁利珠单抗(Lulizumab pegol)、鲁昔单抗(Lumiliximab)、鲁妥珠单抗(Lumretuzumab)、鲁帕妥单抗(Lupartumab)、阿汀-鲁帕妥单抗(Lupartumab amadotin)、鲁吉珠单抗(Lutikizumab)、玛替韦单抗(Maftivimab)、玛帕妥木单抗(Mapatumumab)、玛格妥昔单抗(Margetuximab)、马塔西单抗(Marstacimab)、马司莫单抗(Maslimomab)、玛弗利木单抗(Mavrilimumab)、马妥珠单抗(Matuzumab)、美珀利珠单抗(Mepolizumab)、美特利木单抗(Metelimumab)、米拉妥珠单抗(Milatuzumab)、明瑞妥莫单抗(Minretumomab)、米吉珠单抗(Mirikizumab)、索星-米妥昔单抗(Mirvetuximab)

soravtansine)、米妥莫单抗(Mitumomab)、扎妥昔单抗(Modotuximab)、莫加利珠单抗(Mogamulizumab)、莫那利珠单抗(Monalizumab)、莫罗木单抗(Morolimomab)、莫妥珠单抗(Mosunetuzumab)、莫他韦珠单抗(Motavizumab)、帕舒托-莫塞妥莫单抗(Moxetumomab pasudotox)、紫尿酸胺(Muromonab-CD3)、他托-那考罗单抗(Nacolomab tafenatox)、那米鲁单抗(Namilumab)、埃托-那普妥莫单抗(Naptumomab estafenatox)、恩星-那妥昔单抗(Naratuximab emtansine)、那呐妥单抗(Narnatumab)、那他利珠单抗(Natalizumab)、那赛昔珠单抗(Navicixizumab)、那韦伏单抗(Navivumab)、那昔妥单抗(Naxitamab)、奈巴库单抗(Nebacumab)、奈西妥木单抗(Necitumumab)、奈莫利珠单抗(Nemolizumab)、NEOD001、奈瑞利莫单抗(Nerelimumab)、奈伐苏单抗(Nesvacumab)、尼塔奇单抗(Netakimab)、尼莫妥珠单抗(Nimotuzumab)、尼塞韦单抗(Nirsevimab)、尼沃鲁单抗(Nivolumab)、疏诺莫单抗(Nofetumomab merpentan)、奥托萨昔单抗(Obiltoxaximab)、奥比妥珠单抗(Obinutuzumab)、奥卡妥珠单抗(Ocaratuzumab)、奥瑞利珠单抗(Ocrelizumab)、奥西韦单抗(Odesivimab)、奥度莫单抗(Odulimumab)、奥法妥木单抗(Ofatumumab)、奥拉妥单抗(Olaratumab)、奥来鲁单抗(Oleclumab)、奥仑达利珠单抗(Olendalizumab)、奥洛吉珠单抗(Olokizumab)、奥玛利珠单抗(Omalizumab)、奥博妥单抗(Omburtamab)、OMS721、奥那妥珠单抗(Onartuzumab)、昂妥昔珠单抗(Ontuxizumab)、奥瓦利单抗(Onvatilimab)、奥匹努单抗(Opicinumab)、蒙托-奥珀妥珠单抗(Oportuzumab monatox)、奥瑞戈沃单抗(Oregovomab)、奥替苏单抗(Orticumab)、奥特昔珠单抗(Otelixizumab)、奥替利单抗(Otilimab)、奥乐妥珠单抗(Otlertuzumab)、奥塞鲁单抗(Oxelumab)、奥扎奈珠单抗(Ozanezumab)、奥佐利珠单抗(Ozoralizumab)、帕昔单抗(Pagibaximab)、帕利韦珠单抗(Palivizumab)、潘瑞鲁单抗(Pamrevlumab)、帕尼妥木单抗(Panitumumab)、Pankomab、帕诺巴库单抗(Panobacumab)、帕萨妥珠单抗(Parsatuzumab)、帕考利珠单抗(Pascolizumab)、帕妥昔珠单抗(Pasotuxizumab)、帕特利珠单抗(Pateclizumab)、帕曲妥单抗(Patritumab)、PDR001、帕博利珠单抗(Pembrolizumab)、排姆妥姆单抗(Pemtumomab)、培拉凯珠单抗(Perakizumab)、珀妥珠单抗(Pertuzumab)、培塞利珠单抗(Pexelizumab)、匹地利珠单抗(Pidilizumab)、维汀-匹那妥珠单抗(Pinatuzumab vedotin)、平妥莫单抗(Pintumomab)、普拉鲁单抗(Placulumab)、普瑞鲁单抗(Prezalumab)、洛扎利珠单抗(Plozalizumab)、珀伽利珠单抗(Pogalizumab)、维汀-珀拉妥珠单抗(Polatuzumab vedotin)、珀奈珠单抗(Ponezumab)、珀韦昔单抗(Porgaviximab)、普尼珠单抗(Prasinezumab)、泊洛利珠单抗(Prezalizumab)、普立昔单抗(Priliximab)、瑞托萨昔单抗(Pritoxaximab)、普瑞妥木单抗(Pritumumab)、PRO 140、奎利珠单抗(Quilizumab)、雷考妥莫单抗(Racotumomab)、雷曲妥单抗(Radretumab)、雷非韦卢单抗(Rafivirumab)、雷泮赛珠单抗(Ralpancizumab)、雷姆赛卢单抗(Ramucirumab)、雷奈维单抗(Ranevetmab)、雷尼比珠单抗(Ranibizumab)、雷昔巴库单抗(Raxibacumab)、雷瓦利单抗(Ravagalimab)、雷夫利珠单抗(Ravulizumab)、瑞法奈珠单抗(Refanezumab)、瑞加韦单抗(Regavirumab)、瑞丹维单抗(Regdanvimab)、瑞拉利单抗(Relatlimab)、壬托鲁单抗(Remtolumab)、瑞司利珠单抗(Reslizumab)、瑞洛妥木单抗(Rilotumumab)、利努苏单抗(Rinucumab)、利散吉珠单抗(Risankizumab)、瑞妥昔单抗(Rituximab)、培戈-利伐巴珠单抗(Rivabazumab pegol)、洛巴妥木单抗(Robatumumab)、Rmab、洛来度单抗(Roledumab)、若奇单抗(Romilkimab)、洛莫

索珠单抗 (Romosozumab)、隆他利珠单抗 (Rontalizumab)、洛曼妥珠单抗 (Rosmantuzumab)、特司林-洛伐妥珠单抗 (Rovalpituzumab tesirine)、洛维利珠单抗 (Rovelizumab)、洛利昔珠单抗 (Rozanolixizumab)、卢普利珠单抗 (Ruplizumab)、SA237、戈维替康-沙西妥珠单抗 (Sacituzumab govitecan)、萨玛利珠单抗 (Samalizumab)、维汀-沙马妥单抗 (Samrotamab vedotin)、萨瑞鲁单抗 (Sarilumab)、萨特利珠单抗 (Satralizumab)、喷地肽沙妥莫单抗 (Satumomab pendetide)、瑟库吉努单抗 (Secukinumab)、塞鲁单抗 (Selicrelumab)、瑟瑞妥单抗 (Seribantumab)、瑟托萨昔单抗 (Setoxaximab)、Setrusumab、司韦单抗 (Sevirumab)、西罗珠单抗 (Sibrotuzumab)、SGN-CD19A、SHP647、司法利木单抗 (Sifalimumab)、司妥昔单抗 (Siltuximab)、辛妥珠单抗 (Simtuzumab)、西普利珠单抗 (Siplizumab)、韦斯妥尤单抗 (Sirtratumab vedotin)、司卢库单抗 (Sirukumab)、维汀-索非妥珠单抗 (Sofituzumab vedotin)、索拉奈珠单抗 (Solanezumab)、索利托单抗 (Solitomab)、Sonepcizumab、依匹妥莫单抗 (Sontuzumab)、斯巴达珠单抗 (Spartalizumab)、司达鲁单抗 (Stamulumab)、苏来索单抗 (Sulesomab)、舒他伏单抗 (Suptavumab)、苏替莫单抗 (Sutimlimab)、苏韦珠单抗 (Suvizumab)、苏托舒单抗 (Suvratoxumab)、他巴鲁单抗 (Tabalumab)、替组单抗 (Tacatuzumab tetraxetan)、他多赛珠单抗 (Tadocizumab)、坦昔妥单抗 (Tafasitamab)、塔妥珠单抗 (Talacotuzumab)、他利珠单抗 (Talizumab)、塔奎妥单抗 (Talquetamab)、坦妥维单抗 (Tamtuvetmab)、他奈珠单抗 (Tanezumab)、帕他莫单抗 (Taplutumomab paptox)、他瑞妥单抗 (Tarextumab)、他利昔珠单抗 (Tavolimab)、特立妥单抗 (Teclistamab)、特非巴珠单抗 (Tefibazumab)、阿替莫单抗 (Telimomab aritox)、特立妥珠单抗 (Telisotuzumab)、维汀-特立妥珠单抗 (Telisotuzumab vedotin)、特那妥莫单抗 (Tenatumomab)、特奈利昔单抗 (Teneliximab)、特普利珠单抗 (Teplizumab)、Tepoditamab、特普妥木单抗 (Teprotumumab)、特度鲁单抗 (Tesidolumab)、Tetulomab、特折鲁单抗 (Tezepelumab)、TGN1412、替布利珠单抗 (Tibulizumab)、替曲吉珠单抗 (Tildrakizumab)、替加妥珠单抗 (Tigatuzumab)、替米妥珠单抗 (Timigutuzumab)、替莫鲁单抗 (Timolumab)、替瑞利尤单抗 (Tiragolumab)、Tiragotumab、替雷利珠单抗 (Tislelizumab)、维汀-替索妥单抗 (Tisotumab vedotin)、TNX-650、托西利珠单抗 (Tocilizumab)、托木妥昔单抗 (Tomuzotuximab)、托雷利珠单抗 (Toralizumab)、托萨托舒单抗 (Tosatoxumab)、托司妥莫单抗 (Tositumomab)、托维妥单抗 (Tovetumab)、曲洛吉努单抗 (Tralokinumab)、曲妥珠单抗 (Trastuzumab)、多-曲妥珠单抗 (Trastuzumab duocarmazine)、恩美-曲妥珠单抗 (Trastuzumab emtansine)、TRBS07、曲加利珠单抗 (Tregalizumab)、曲美利木单抗 (Tremelimumab)、曲戈卢单抗 (Trevogrumab)、塞莫白介素-2-妥考妥珠单抗 (Tucotuzumab celmoleukin)、妥韦单抗 (Tuvirumab)、乌利妥昔单抗 (Ublituximab)、乌洛鲁单抗 (Ulocuplumab)、乌瑞鲁单抗 (Urelumab)、厄托萨珠单抗 (Urtoxazumab)、优特吉努单抗 (Ustekinumab)、乌托鲁单抗 (Utomilumab)、他立林-伐达妥昔单抗 (Vadastuximab talirine)、Vanalizumab、维汀-万多妥珠单抗 (Vandortuzumab vedotin)、万替妥单抗 (Vantictumab)、伐努赛珠单抗 (Vanucizumab)、伐帕利昔单抗 (Vapaliximab)、伐利苏单抗 (Varisacumab)、伐立鲁单抗 (Varlilumab)、伐特利珠单抗 (Vatelizumab)、维多利珠单抗 (Vedolizumab)、维妥珠单抗 (Veltuzumab)、维帕利莫单抗 (Vepalimomab)、维森苏单抗 (Vesencumab)、威司利珠单抗 (Visilizumab)、沃巴利珠单抗 (Vobarilizumab)、沃洛赛昔单

抗(Volociximab)、珀伽利珠单抗(Vonlerolizumab)、伏派利单抗(Vopratelimab)、玛汀-沃瑟妥珠单抗(Vorsetuzumab mafodotin)、伏妥莫单抗(Votumumab)、伏那吉珠单抗(Vunakizumab)、珍妥珠单抗(Xentuzumab)、XMAB-5574、扎鲁妥木单抗(Zalutumumab)、扎诺利木单抗(Zanolimumab)、扎妥昔单抗(Zatuximab)、泽妥珠单抗(Zenocutuzumab)、齐拉木单抗(Ziralimumab)、佐妥昔单抗(Zolbetuximab)和佐利莫单抗(Zolimomab)。

[0322] 治疗性抗体可以诱导受试者的免疫应答。药物产品中包含的抗体、片段或变体的结合或由药物产品的成分诱导的抗体、片段或变体的结合的保护性-调节性作用可以通过保护免受免疫应答来改善治疗性抗体的药代动力学和药效动力学特性。

[0323] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:治疗性抗体可以如本文所述受到保护和/或调节。

[0324] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,本发明的载体,或者本发明的药物产品,其进一步包含药学上可接受的载体。

[0325] 包含如本文所述的抗体、其变体或片段、载体、宿主细胞的组合物或药物产品可以通过将具有所需纯度的此类抗体/变体/片段/多核苷酸/宿主细胞与一种或多种任选的药学可接受的载体混合来制备,(Osol等人,1980Remington's Pharmaceutical Sciences第16版),在某些实例中,呈冻干配制品或水溶液的形式。

[0326] 示例性冻干抗体组合物描述于US 6267958中。水性抗体组合物包括US 6171586和WO 2006/044908中描述的那些,后者配制品包括组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0327] 本文所述的组合物/药物产品的活性成分和/或本文所述的抗体/变体/片段/载体/宿主细胞可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合(例如羟甲基纤维素)制备的微胶囊或分别在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中的明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊中。此类技术公开于Osol等人,1980,Remington's Pharmaceutical Sciences第16版中。

[0328] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有本发明的组合物、药物产品、抗体、变体、片段、载体、宿主细胞和/或本发明的多核苷酸的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质的形式为成型制品,例如薄膜或微胶囊。

[0329] 在一些实施例中,本发明的组合物或本发明的药物产品的至少一种成分处于与另一种成分不同的调节释放配制品中。例如,多价抗原颗粒而不是单价抗原颗粒与释放增量剂结合,或反之亦然。

[0330] 在一些实施例中,本发明涉及用于在受试者中引发和/或调节细胞介导的靶抗原特异性免疫应答的组合物,其中通过使受试者的一种或多种免疫细胞与组合物接触使用该组合物。

[0331] 在一些实施例中,本文所述的组合物用于治疗或预防(疫苗接种)受试者或患者的疾病,包括向受试者或患者以治疗或预防有效量施用所述组合物或所述组合物的至少一种单价抗原颗粒或一种多价抗原颗粒。

[0332] 本发明上下文中的治疗有效量是诱导或抑制某种B细胞介导的免疫应答诸如IgG-或IgM-型(或IgA)免疫应答的量。

[0333] 在一些实施例中,本发明涉及用于通过在受试者中接种疫苗来治疗或预防疾病的方法,该方法包括施用有效量的疫苗接种组合物,该疫苗组合物包含:

[0334] (i) 单价抗原颗粒,其由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,和

[0335] (ii) 多价抗原颗粒,其由包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构的抗原部分组成,并且其中多于一种抗原结构是共价或非共价交联的。

[0336] 在该实施例中,可以优选以疫苗接种方案向受试者施用治疗,该疫苗接种方案包括如本文别处公开的引发/加强方案。

[0337] 在一些实施例中,本发明涉及用于治疗或预防受试者的疾病的疫苗接种组合物,该疫苗接种组合物包含:

[0338] (iii) 单价抗原颗粒,其由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,和

[0339] (iv) 多价抗原颗粒,其由包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构的抗原部分组成,并且其中多于一种抗原结构是共价或非共价交联的。

[0340] 在一些实施例中,本发明涉及免疫原性组合物,其包含:

[0341] (v) 单价抗原颗粒,其由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,和

[0342] (vi) 多价抗原颗粒,其由包含能够诱导针对抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构的抗原部分组成,并且其中多于一种抗原结构是共价或非共价交联的。

[0343] 在进一步的实施例中,本文所述的组合物用于在治疗或预防(疫苗接种)受试者或患者的疾病中使用,包括向受试者或患者施用治疗或预防有效量的组合物或组合物的至少(i)或(ii)。在一些实施例中,治疗有效量是诱导或抑制某种B细胞介导的免疫应答诸如IgG-或IgM-型(或IgA)免疫应答的量。

[0344] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,本发明的载体,或者本发明的药物产品,其用于作为药物使用。

[0345] 在一些实施例中,待通过药物治疗的疾病或病症选自特征在于增加或减少的细胞介导的免疫应答有利于治疗的疾病或病症。因此,本发明提供根据本文所述的方法对免疫系统的本文所述的调节作为疾病的治疗,所述疾病或病患诸如选自炎性病患、自身免疫疾病、增殖性病患或感染性疾病。

[0346] 在一些实施例中,本发明的组合物,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,本发明的载体或者本发明的药物产品以符合良好医学规范的方式配制、给药和施用。在本文中要考虑的因素包括所治疗的具体病患、所治疗的具体受试者、个体患者的临床病症、病患的原因、药剂的递送部位、施用方法、施用时间安排、以及医学从业者已知的其他因素。本发明的组合物,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,本发明的载体或本发明的药物产品不需要但任选地与一种或多种当前使用的另外的治疗剂一起配制以预防或治疗相关病患。此类其他试剂的有效量取决于本发明的组合物,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,本发明的载体或者本发明的药物产品的量,病患或治疗的类型、以及上面讨论的其他需要考虑的因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用途径使用,或本文所述剂量的约1%至99%,或以根据经验/临床确定合适的任何剂量和任何途径使用。

[0347] 为了预防或治疗疾病,本发明的组合物,本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,本发明的载体或者本发明的药物产品的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病类型、组合物/抗体/变体/片段/载体/药物产品的类型、疾病的严重性和病程、施用是为了预防或治疗目的、既往疗法、患者的临床病史和对组合物/抗体/变体/片段/载体/药物产品的反应以及主治医师的判断。

[0348] 本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段和/或用作另外的治疗剂的抗体适合一次或在一系列治疗中施用于患者。在一些实施例中,取决于疾病的类型和严重程度,约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ - $10\text{mg}/\text{kg}$)的抗体变体或片段可以是用于施用于患者的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次单独施用还是通过连续输注。一种典型的每日剂量范围可能为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 至 $100\text{mg}/\text{kg}$ 或更多,具体取决于上述考虑因素。对于几天或更长时间的重复施用,根据病症,治疗通常会持续到出现疾病症状的所需抑制。抗体或抗原结合片段的一种示例性剂量将在约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内。因此,可以向患者施用约 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或其任意组合)的一个或多个剂量。此类剂量可以间歇地施用,例如,每周或每三周(例如使得患者接受约二至约二十剂量,或例如约六剂量抗体变体或片段)。可以施用初始较高负荷剂量,随后施用一个或多个较低剂量。然而,其他剂量方案可能是有用的。这种疗法的进展很容易通过常规技术和测定来监测。

[0349] 在一些实施例中,本发明涉及用于在治疗自身免疫病患中使用的单特异性寡聚抗体或其变体,其中该单克隆IgM型抗体是特异性的并且对与自身免疫病患相关的抗原具有高亲和力。

[0350] 在一些实施例中,本发明涉及用于治疗的本发明的组合物、药物产品或载体,其中该载体以在至少 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 、 10^{15} 、 10^{16} 或更多载体基因组每千克受试者体重(vg/kg)的范围的剂量施用,以达到治疗效果。

[0351] 在某些实施例中,本发明涉及用于治疗的本发明的组合物、药物产品或宿主细胞,其中使用的宿主细胞的临床相关数量或群体为每剂量例如至少 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 ,通常多于 10^9 或至少 10^{10} 个细胞。细胞的数量将取决于本发明的组合物、药物产品或宿主细胞的预期用途以及细胞的类型。对于本文提供的用途,细胞的体积通常为一升或更少,可以是500ml或更少,甚至250ml或100ml或更少。因此,所需细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/ml并且通常大于 10^7 个细胞/ml。临床相关数量的宿主细胞可分配到多次输注中,累计等于或多于 10^9 、 10^{10} 或 10^{11} 个细胞。

[0352] 本发明的宿主细胞一个治疗周期的总剂量通常为约 1×10^4 个细胞/kg至 1×10^{10} 个细胞/kg宿主细胞或更多,其取决于上述考虑的因素。

[0353] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法可用于治疗性调节针对本文所述的靶抗原的免疫应答。

[0354] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其用于在治疗和/或预防体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患中使用。

[0355] 如本文所用,术语“B细胞介导的炎性疾病”是指疾病或病患,其中疾病的发病机制和/或进展主要取决于B细胞和/或免疫系统大分子的活性,诸如抗体和补体蛋白。

[0356] 本发明提供了调节体液和/或B细胞介导的免疫应答(例如通过保护性-调节性结

合)的手段和方法。

[0357] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:即本发明的手段和方法可用于治疗性调节针对靶抗原的B细胞介导的免疫应答和/或治疗性调节体液抗原,如本文所述的。

[0358] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患是自身免疫疾病或病患或者同种免疫疾病或病患,优选其中该靶抗原是自身抗原。

[0359] 如本文所用,术语“自身抗原”是指受试者天然的并且在自身免疫疾病或病患或者同种免疫疾病或病患中具有免疫原性的抗原或表位。

[0360] 术语“自身免疫疾病”是指由针对个体自身组织、器官或其表现或由此产生的病症的免疫反应引起的疾病或病患。在一些实施例中,本文所述的自身免疫疾病或病患是由与正常身体组织和/或抗原反应的抗体的B细胞产生自身抗体导致或加剧的病症。在其他实施例中,自身免疫疾病是涉及分泌对自身抗原的表位具有特异性的自身抗体的疾病。

[0361] 在一些实施例中,自身免疫疾病是指选自下组的至少一种疾病或病患:心肌炎、心肌梗塞后综合征、心包切开后综合征、亚急性细菌性心内膜炎、抗肾小球基底膜肾炎、狼疮性肾炎、间质性膀胱炎、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性胆管炎、原发性硬化性胆管炎、抗合成酶综合征、斑秃、自身免疫性血管性水肿、自身免疫性黄体酮皮炎、自身免疫性荨麻疹、大疱性类天疱疮、瘢痕性类天疱疮、疱疹样皮炎、盘状红斑狼疮、获得性大疱性表皮松解症、结节性红斑、妊娠期类天疱疮、化脓性汗腺炎、扁平苔藓、硬化性苔藓、线状IgA病、硬斑病、寻常型天疱疮、急性痘疮样苔藓样糠疹、穆哈病(mucha-habermann disease)、银屑病、系统性硬皮病、白癜风、阿狄森氏病、自身免疫性多腺体综合征(1、2或3型)、自身免疫性胰腺炎、糖尿病、自身免疫性甲状腺炎、奥德氏甲状腺炎(ord's thyroiditis)、格雷夫斯病、自身免疫性卵巢炎、子宫内膜异位症、自身免疫性睾丸炎、干燥综合征、自身免疫性肠病、麸质过敏症、克罗恩病、食管贲门失弛缓症、显微镜下结肠炎、溃疡性结肠炎、抗磷脂综合征、再生障碍性贫血、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性淋巴细胞增生综合征、自身免疫性中性粒细胞减少症、自身免疫性血小板减少性紫癜、冷凝集素病、特发性混合性冷球蛋白血症、埃文斯综合征、恶性贫血、纯红细胞再生障碍性贫血、血小板减少症、痛性肥胖症、成人斯蒂尔病、强直性脊柱炎、肢端硬皮综合征(crest syndrome)、药物性狼疮、附着点炎症相关关节炎、嗜酸性筋膜炎、费尔蒂综合征、IgG4相关疾病、幼年型关节炎、莱姆病(慢性)、混合结缔组织病、回归性风湿病、帕-罗二氏综合征(Parry-Romberg syndrome)、牧师特纳综合征(parsonage-turner syndrome)、银屑病关节炎、反应性关节炎、复发性多软骨炎、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿性关节炎、结节病、施尼茨勒综合征(Schnitzler syndrome)、系统性红斑狼疮、未分化结缔组织病、皮炎、纤维肌痛、包涵体肌炎、肌炎、重症肌无力、神经性肌强直、副肿瘤性小脑变性、多肌炎、急性播散性脑脊髓炎、急性运动性轴索神经病、抗-N-甲基-D-天冬氨酸(抗-nmda)受体脑炎、巴洛同心性硬化(Balo concentric sclerosis)、Bickerstaff脑干脑炎、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病、古兰-巴雷综合征、桥本脑病、特发性炎症脱髓鞘疾病、兰伯特-伊顿肌无力综合征、多发性硬化症、Oshtoran综合征、与链球菌相关的小儿自身免疫性神经精神障碍、进行性炎症性神经病、不宁腿综合征、僵人综合

征、西登哈姆氏舞蹈病、横贯性脊髓炎、自身免疫性视网膜病、自身免疫性葡萄膜炎、Cogan综合征、格雷夫斯眼病、中间葡萄膜炎、木样结膜炎、角膜侵蚀性溃疡、视神经脊髓炎、视性眼阵挛肌阵挛综合征、视神经炎、巩膜炎、Susac综合征、交感性眼炎、痛性眼肌麻痹综合征、自身免疫性内耳病、梅尼埃病、白塞氏病、嗜酸性肉芽肿性多血管炎、巨细胞动脉炎、肉芽肿性多血管炎、IgA血管炎、川崎病、白细胞破碎性血管炎、狼疮性血管炎、类风湿性血管炎、显微镜下多血管炎、结节性多动脉炎、风湿性多肌痛、荨麻疹性血管炎、血管炎和原发性免疫缺陷。

[0362] 如本文所用,术语“同种免疫疾病或病患”是指对来自相同物种成员的非自身抗原的免疫应答。在一些实施例中,同种免疫疾病或病患是选自输血反应、胎儿和/或新生儿溶血病和移植排斥的组的疾病或病患。

[0363] 本发明提供了调节自身免疫应答或同种免疫应答(例如通过保护性-调节性结合)的手段和方法。

[0364] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法可用于治疗性调节针对靶抗原的自身免疫应答和/或同种免疫应答。

[0365] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患或者自身免疫疾病或病患或者同种免疫疾病或病患是抗体介导的疾病或病患。

[0366] 术语“抗体介导的疾病或病患”是指以抗体的存在为特征的自身免疫疾病或病患或者同种免疫疾病或病患。在一些实施例中,抗体介导的疾病或病患中存在的抗体是疾病特异性抗体。

[0367] 在一些实施例中,本文所述的抗体介导的疾病或病患是选自下组的至少一种疾病或病患:阿狄森氏病、强直性脊柱炎、白塞氏综合征、麸质过敏症、先天性肾上腺增生、疱疹样皮炎、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯病、桥本氏病、遗传性血色病、胰岛素依赖型糖尿病、特发性膜性肾小球肾炎、多发性硬化症、重症肌无力、发作性睡病、寻常型银屑病、寻常型天疱疮、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、结节病。

[0368] 本发明提供了调节免疫系统的抗体表达和/或抗体结合的手段和方法,例如通过保护性-调节性结合。

[0369] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法可用于治疗性调节针对靶抗原的抗体介导的自身免疫应答和/或抗体介导的同种免疫应答。

[0370] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中靶抗原是胰岛素,用于治疗与胰岛素相关的疾病或病患。

[0371] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中靶抗原是胰岛素并且抗体介导的疾病或病患是胰岛素相关疾病或病患。

[0372] 如本文所用,术语“胰岛素相关疾病或病患”是指其中胰岛素产生、胰岛素作用、胰岛素信号传导、胰岛素分布、胰岛素代谢和/或胰岛素消除失调的任何疾病或病患。

[0373] 在一些实施例中,胰岛素相关疾病或病患是选自多囊卵巢综合征、代谢综合征和

糖尿病的组的至少一种疾病或病患。

[0374] 在一些实施例中,胰岛素相关疾病或病患是与选自肾上腺素、胰高血糖素、皮质醇、生长抑素的至少一种药剂的水平增加相关的至少一种疾病或病患。

[0375] 在一些实施例中,胰岛素相关疾病或病患是胰岛素调节剂治疗的至少一种副作用。在一些实施例中,胰岛素调节剂选自肾上腺素、胰高血糖素、类固醇和生长抑素的组。

[0376] 本发明提供的手段和方法能够调节针对胰岛素的免疫应答。针对胰岛素的免疫反应可以发生在健康受试者和/或患者中和/或在胰岛素治疗期间。发明人表明,本发明的手段和方法可以影响广泛的胰岛素相关症状(参见例如图11、12、16、20B、20D、20F、22)。因此,这些手段和方法可以改善施用的胰岛素和/或内源胰岛素的效果并减少任何胰岛素相关的疾病或病患。

[0377] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法可用于保护和/或调节胰岛素功能。

[0378] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段与胰岛素结合的 K_d 小于 10^{-7} ,优选小于 10^{-8} ,更优选小于 10^{-9} ,并且最优选在约 10^{-10} 至约 10^{-12} 的范围内。

[0379] 本发明的抗体、变体或片段对胰岛素的高亲和力使得能够与其他抗体(例如免疫系统的多特异性IgG抗体)竞争地有效结合。

[0380] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:即通过本发明的手段和方法实现的高亲和力结合通过与功能限制性胰岛素结合剂竞争来保护和/或调节胰岛素功能。

[0381] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者用于本发明用途的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中胰岛素相关疾病或病患是糖尿病或其症状。

[0382] 如本文所用,术语“糖尿病”是指以高血糖为特征的疾病或病患。在一些实施例中,通过口服葡萄糖耐量试验期间摄入葡萄糖(通常为75g葡萄糖)后2小时葡萄糖水平高于140mg/dl、150mg/dl、160mg/dl、170mg/dl、180mg/dl、190mg/dl、200mg/dl、210mg/dl或220mg/dl来诊断糖尿病。在一些实施例中,通过空腹血糖水平高于100mg/dl或110mg/dl来诊断糖尿病。

[0383] 糖尿病的症状包括但不限于高血糖、低血胰岛素、胰岛素抵抗、多尿、烦渴、体重减轻、酮症酸中毒、糖尿、疲劳、易怒、视力模糊、伤口愈合缓慢、频繁感染(例如牙龈或皮肤感染和阴道感染)以及炎症增加(例如慢性低度炎症)。

[0384] 在某些实施例中,本发明涉及本发明的组合物,本发明的药物产品,本发明的载体或者本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中靶抗原是胰岛素,用于增强胰岛素作用。胰岛素作用还可以在患者或健康受试者中增强,其中胰岛素作用由抗体调节而不一定诱发疾病或病患。例如,本发明的组合物,本发明的药物产品,本发明的载体或本发明的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中靶抗原是胰岛素可以用于增加体重增加,诸如肌肉增加。在一些实施例中,胰岛素作用的增强包括但不限于葡萄糖摄取的增加、DNA复制的增加、蛋白质合成的增加、脂肪合成的增加、脂肪酸的酯化的增加、脂解的减少、糖原合成的诱导、糖异生的减少和糖原分解、蛋白水解减少、自噬减少、氨基酸摄取增加、血流量增加、胃内盐

酸分泌增加、钾摄取增加、肾钠排泄减少。

[0385] 本发明提供的手段和方法能够调节针对胰岛素的免疫应答。针对胰岛素的免疫应答可能发生在所有形式的糖尿病和所有形式的胰岛素治疗中。因此,这些手段和方法可以改善施用的和/或内源性的胰岛素的效果并减少任何胰岛素缺乏相关的症状,例如糖尿病中的症状。

[0386] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法保护和/或调节糖尿病中失调的胰岛素功能。

[0387] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中糖尿病选自下组:1型糖尿病、2型糖尿病和妊娠期糖尿病。

[0388] 如本文所用,术语“1型糖尿病”是指主要特征在于胰岛素产生减少的糖尿病。通常,1型糖尿病的特征在于自身免疫反应,其导致胰腺中产生胰岛素的 β 细胞受损。

[0389] 如本文所用,术语“2型糖尿病”是指主要特征在于胰岛素抗性增加的糖尿病。2型糖尿病通常发生在胰岛素水平正常甚至升高的情况下,并且似乎是由于组织无法对胰岛素做出适当反应所致。大多数2型糖尿病患者都患有肥胖症。

[0390] 如本文所用,术语“妊娠期糖尿病”是指妊娠期间的糖尿病。妊娠期糖尿病。妊娠期糖尿病的症状还包括妊娠相关症状,诸如子痫前期,以及患有妊娠期糖尿病的母亲所生的孩子的症状,包括但不限于生长异常(例如巨大儿)、葡萄糖稳态受损、黄疸、红细胞增多症、低钙血症和低镁血症。在一些实施例中,妊娠期糖尿病是在妊娠期间被诊断的。在一些实施例中,妊娠期糖尿病是在妊娠前被诊断的。

[0391] 本发明提供的手段和方法能够调节针对胰岛素的免疫应答。抗体类型的胎盘转移能力不同,因此,本发明的手段和方法能够选择性和/或同时治疗母亲和胎儿。

[0392] 针对胰岛素的免疫应答尤其发生在长期胰岛素治疗期间。因此,这些手段和方法可改善1型糖尿病、2型糖尿病和妊娠期糖尿病的治疗效果。

[0393] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法保护和/或调节1型糖尿病、2型糖尿病和妊娠期糖尿病中失调的胰岛素功能。

[0394] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者用于本发明用途的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中糖尿病是1型糖尿病。

[0395] 本发明提供的手段和方法能够调节针对胰岛素的免疫应答。免疫应答被认为是1型糖尿病病理学的关键因素,而1型糖尿病的治疗尤其依赖于胰岛素。因此,这些手段和方法可改善1型糖尿病的治疗效果。

[0396] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法保护和/或调节1型糖尿病中失调的胰岛素功能。

[0397] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物,本发明使用的药物产品,本发明使用的载体,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中靶抗原是癌症相关抗原或病原体相关抗原。

[0398] 如本文所用,术语“癌症相关抗原”是指由癌细胞表达的蛋白质或多肽抗原。在一些实施例中,本文所述的癌症相关抗原是选自下组的至少一种:癌细胞的表面蛋白或多肽、

核蛋白或糖蛋白或其片段。

[0399] 如本文所用,术语“病原体相关抗原”是指由病原体表达的蛋白质或多肽抗原。本发明的病原体相关抗原可以是在病原体中、表面或由病原体表达的任何抗原,所述病原体诸如病原性病毒或微生物,优选地其中所述病原体选自寄生虫、单细胞真核生物、细菌、病毒或病毒粒子。

[0400] 因此,这些手段和方法可以调节对病理的免疫应答。

[0401] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:这些手段和方法可用于增加和/或调节针对癌症或病原体的免疫应答。

[0402] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的组合物、本发明使用的药物产品、本发明使用的载体或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其中体液和/或B细胞介导的靶抗原特异性疾病或病患是感染,并且其中靶抗原是病原体相关抗原,优选地其中病原体是选自下组的至少一种病原体:寄生虫、单细胞真核生物、细菌、病毒和病毒粒子。

[0403] 如本文所用,术语“寄生虫”是指生活在第二生物体内或之上的生物体。在一些实施例中,本文所述的寄生虫选自下组:外寄生虫、原生动物生物体和蠕虫。

[0404] 如本文所用,术语“病毒”是指仅在生物体的活细胞内复制的传染原。在一些实施例中,本文所述的病毒是选自下组的病毒:腺病毒科(adenoviridae)、指环病毒科(anelloviridae)、沙粒病毒科(arenaviridae)、星状病毒科(astroviridae)、布尼亚病毒科(bunyaviridae)、布尼亚病毒(bunyavirus)、杯状病毒科(caliciviridae)、冠状病毒科(coronaviridae)、丝状病毒科(filoviridae)、黄病毒科(flaviviridae)、嗜肝病毒科(hepadnaviridae)、疱疹病毒科(herpesviridae)、正粘病毒科(orthomyxoviridae)、乳头瘤病毒科(papillomaviridae)、副粘病毒科(paramyxoviridae)、细小病毒科(parvoviridae)、小RNA病毒科(picornaviridae)、肺病毒科(pneumoviridae)、多瘤病毒科(polyomaviridae)、痘病毒科(poxviridae)、呼肠孤病毒科(reoviridae)、逆转录病毒科(retroviridae)、弹状病毒科(rhabdoviridae)、弹状病毒科(rhabdovirus)和披膜病毒科(togaviridae)。

[0405] 在一些实施例中,本文所述的单细胞真核生物选自下组:恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、布氏锥虫(*Trypanosoma brucei*)、十二指肠贾第鞭毛虫(*Giardia duodenalis*)和利什曼原虫(*Leishmania*)物种。

[0406] 如本文所用,术语“病毒粒子”是指具有蛋白质外壳和任选的外部包膜的病毒核酸核心。

[0407] 在一些实施例中,本文所述的细菌是选自下组的属的细菌:芽孢杆菌属(*Bacillus*)、巴尔通体属(*Bartonella*)、博德特氏菌属(*Bordetella*)、包柔氏螺旋体属(*Borrelia*)、布鲁菌属(*Brucella*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、衣原体属(*Chlamydia*)、嗜衣原体属(*Chlamydophila*)、梭菌属(*Clostridium*)、棒状杆菌属(*Corynebacterium*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、埃希菌属(*Escherichia*)、弗朗西丝菌属(*Francisella*)、嗜血菌属(*Haemophilus*)、螺杆菌属(*Helicobacter*)、军团菌属(*Legionella*)、钩端螺旋体(*Leptospira*)、李斯特菌属(*Listeria*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、支原体(*Mycoplasma*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、立克次体(*Rickettsia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、葡萄球菌属

(Staphylococcus)、链球菌属(Streptococcus)、密螺旋体属(Treponema)、脲原体属(Ureaplasma)、弧菌属(Vibrio)和耶尔森菌属(Yersinia)。

[0408] 因此,本发明的手段和方法可用于引发针对传染原的免疫应答(参见例如图18)。

[0409] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:这些手段和方法可用于增加和/或调节针对感染的免疫应答。

[0410] 在某些实施例中,本发明涉及根据本发明使用的组合物或本发明使用的药物产品,其中治疗包括在多价抗原颗粒之前施用单价抗原颗粒。

[0411] 在某些实施例中,本发明的各种实施例的手段和方法可以被视为用于在脊椎动物中产生某些期望的抗体应答的免疫接种方法。在本文中,本发明方法的优选实施例包括受试者的引发/加强免疫接种方案。

[0412] 术语“引发”针对抗原的免疫应答是指向受试者施用免疫原性组合物,与通过施用单一免疫原性组合物所获得的免疫应答相比,在随后施用相同或第二组合物后,所述免疫原性组合物诱导更高水平的针对抗原的免疫应答。

[0413] 针对抗原的术语“加强”免疫应答是指在施用引发免疫原性组合物之后向受试者施用第二加强免疫原性组合物。在一个实施例中,免疫原性组合物的加强施用是在施用引发剂量后约2至27周、优选1至10周、更优选1至5周,并且最优选约3周进行。

[0414] 在本发明的优选的实施例中,用单价抗原颗粒进行引发步骤,该单价抗原颗粒由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,而加强的步骤包括施用多价抗原颗粒,该多价抗原颗粒由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构,并且其中该多于一种抗原结构是共价或非共价交联的。在本发明的此类引发/加强实施例中,用于在引发和加强步骤中诱导免疫应答的抗原结构是相同的抗原结构。

[0415] 在本发明的一些实施例中,加强的步骤可以用单价和多价抗原颗粒的组合物进行,如本文在本发明的第一方面中所描述的。

[0416] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:用单价抗原颗粒引发增强了针对多价抗原颗粒的免疫应答。

[0417] 在某些实施例中,本发明涉及根据本发明使用的组合物或根据本发明使用的药物产品,其中治疗和/或预防包括至少两个施用时间点。

[0418] 因此,本发明的组合物/药物产品的成分可以在不同的时间点施用以实现某种免疫调节(参见例如图19)或者可以重复施用以加强实现增强的效果(参见例如图16a、图3c)。

[0419] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:引发和/或加强调节由本发明的手段和方法诱导的免疫应答改变。

[0420] 在某些实施例中,本发明涉及单价抗原颗粒,其中该单价抗原颗粒由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构,本发明还涉及本发明使用的组合物,本发明使用的载体,本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,或者本发明的药物产品,其用于在治疗和/或预防由以下表征的疾病中使用(i)存在与该靶抗原结合的免疫球蛋白G(IgG)型抗体,其中该IgG型抗体的结合降低了该靶抗原的功能;和/或(ii)存在内源多价抗原颗粒,其由包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的抗原结构的多于一种抗原部分组成,并且其中多于一种抗原结构是交联

的。

[0421] 在本发明的替代性方面,提供了用于治疗或预防受试者中特征在于除对疾病相关抗原具有特异性的IgG的抗体的存在的疾病的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的单价抗原颗粒,其中所述单价抗原颗粒由抗原部分组成,所述抗原部分包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构。替代性第三方面的此类病患可以是例如IgE介导的过敏。

[0422] 特征在于存在对疾病相关抗原具有特异性的免疫球蛋白G (IgG) 型抗体的疾病优选是特征在于受试者血清中存在病理性IgG分子,诸如自身免疫和同种免疫IgG抗体的疾病。因此,术语“IgG介导的疾病”包括自身免疫疾病和同种免疫疾病。如本文所用,术语“同种免疫疾病”是指当存在针对另一个个体的外来抗原(例如,主要或次要组织相容性同种抗原)的宿主免疫应答时,例如当存在宿主抗移植排斥时,可替代地,当存在移植抗宿主病时,其中植入的免疫细胞介导针对接受移植物的宿主的有害作用。

[0423] 在一些实施例中,本发明涉及用于治疗或预防受试者中特征在于存在对疾病相关抗原具有特异性的免疫球蛋白G (IgG) 型抗体的疾病的单价抗原颗粒,其中该单价抗原颗粒由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对疾病相关抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构。

[0424] 在一些实施例中,以存在免疫球蛋白G (IgG) 型抗体为特征的疾病是选自以下的疾病:米库利奇 (Mikulicz) 病、慢性硬化性颌下腺炎、库特纳氏肿瘤 (Küttner's tumour)、IgG4相关眼科疾病、IgG4相关咽炎、IgG4相关甲状腺疾病、IgG4相关下垂体炎、IgG4相关垂体炎、IgG4相关腺垂体炎、IgG4相关毛束漏斗神经垂体炎、IgG4相关硬脑膜炎、IgG4相关软脑膜炎、IgG4相关胰腺炎、IgG4相关肺部疾病、IgG4相关胸膜炎、IgG4相关肝病、IgG4相关硬化性胆管炎、IgG4相关胆囊炎、IgG4相关主动脉炎、IgG4相关主动脉周炎、IgG4相关动脉周围炎、IgG4相关心包炎、IgG4相关纵隔炎、IgG4相关腹膜后纤维化、IgG4相关肠系膜炎、IgG4相关乳腺炎、IgG4相关肾病、IgG4相关前列腺炎、IgG4相关血管周围纤维化、IgG4相关睾旁假瘤、IgG4相关附睾睾丸炎、IgG4相关淋巴结病、IgG4相关皮肤病及IgG4相关神经周围疾病。

[0425] 因此,本文描述的手段和方法的成分可以在其中本发明的组合物的一部分已经存在的疾病中施用(例如基于疾病的病理学)以调节根据图18的免疫应答。因此,在其中存在IgG和/或多价抗原颗粒的疾病中,施用本文所述的单价颗粒和/或保护性-调节性抗体、变体或片段和/或载体可能是足够的。可替代地,包含大量本文所述的单价颗粒和/或保护性-调节性抗体、变体或片段和/或载体的本发明的组合物或药物产品可以是足够的。

[0426] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:单价抗原颗粒可以支持保护性-调节性抗体表达。

[0427] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的单价抗原颗粒、本发明使用的药物产品、或本发明使用的组合物,其中治疗和/或预防包括使用导致单价抗原颗粒:多价抗原颗粒的(组织)含量比大于1,优选大于 10^1 ,更优选大于 10^2 ,更优选大于 10^3 ,更优选大于 10^4 的剂量使用单价抗原颗粒。

[0428] 因此,多价抗原颗粒的(组织)含量通过本领域技术人员已知的任何方法确定。以适当的剂量施用单价抗原颗粒(或包含单价抗原颗粒的组合物/药物产品)以实现所需的

(组织)含量比。可以考虑单价颗粒的药理学和/或药代动力学特性以及多价抗原颗粒相关参数、受试者相关参数和/或疾病相关参数。

[0429] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:高单价抗原颗粒:多价抗原颗粒比率可以支持保护性-调节性抗体表达。

[0430] 在某些实施例中,本发明涉及多价抗原颗粒,其中所述多价抗原颗粒由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的多于一种抗原结构,并且其中多于一种抗原结构是交联的,本发明还涉及本发明使用的药物产品,或者用于本发明使用的组合物,其用于在治疗和/或预防由以下表征的疾病中使用(i)存在与该靶抗原结合的寡聚抗体,其中该寡聚抗体的结合保护了靶抗原的功能;和/或(ii)存在单价抗原颗粒,其中该单价抗原颗粒由抗原部分组成,该抗原部分包含能够诱导针对靶抗原的抗体介导的免疫应答的不多于一种抗原结构。

[0431] 在某些疾病或病患中,内源性IgM抗体的保护性调节作用可能是不需要的(例如,在炎症性疾病中保护细胞因子)。多价抗原颗粒或包含多价抗原颗粒的本发明的手段和方法可用于调节免疫应答以抑制IgM抗体产生或增加竞争性结合抗体。以存在单价抗原颗粒为特征的疾病或病患中的免疫应答可以通过多价抗原颗粒或包含多价抗原颗粒的本发明的手段和方法来调节。

[0432] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:单价抗原颗粒可以支持保护性-调节性抗体表达。

[0433] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的载体、本发明使用的药物产品或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其用于在治疗和/或预防具有IgD型水平降低的受试者的疾病或病患中使用。

[0434] 如本文所用,术语“患者”或“受试者”是指分类为哺乳动物的所有动物,包括但不限于患有病患或疾病的家养动物和农场动物、灵长类动物和人类,例如人类、非人灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类动物。优选地,患者是任何年龄或种族的男性或女性。

[0435] 在具有IgD型抗体表达的受试者中,内源IgM表达和/或成熟降低(参见例如实例8-11)。因此,本发明的手段和方法的效果在该受试者群体中特别显著,特别是如果该手段和方法包含保护性-调节性抗体、变体或片段,或诱导其表达。

[0436] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法可以调节受试者中的免疫应答,从而减少内源性保护性-调节性抗体的产生/成熟。

[0437] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的载体、本发明使用的药物产品或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其用于在治疗和/或预防具有IgD型抗体相关遗传缺陷的受试者的疾病或病患中使用。

[0438] 如本文所用,术语“IgD型抗体相关遗传缺陷”是指其中IgD型抗体表达、产生和/或功能降低的任何疾病或病患。

[0439] 具有IgD型抗体相关遗传缺陷的受试者中内源IgM表达和/或成熟降低(参见例如实例8-11)。因此,本发明的手段和方法的效果在该受试者群体中特别显著,特别是如果该手段和方法包含保护性-调节性抗体、变体或片段,或诱导其表达。

[0440] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法可以调节

受试者中的免疫应答,从而减少内源性保护性-调节性抗体的产生/成熟。

[0441] 在某些实施例中,本发明涉及本发明使用的载体,本发明使用的药物产品,或者本发明使用的保护性-调节性抗体、变体或片段,其用于在治疗和/或预防儿科受试者的疾病或病患,优选11岁以下的儿科受试者的疾病或病患中使用。

[0442] 如本文所用,术语“儿科受试者”是指年龄低于18、17、16、15、14、13、12、11或10岁的受试者。在一些实施例中,儿科受试者是成熟B细胞比率降低的受试者。

[0443] 儿科受试者的内源性IgM表达和/或成熟降低,至少部分是由于所需B细胞种类的不完全发育和/或比率。因此,本发明的手段和方法的效果在该受试者群体中特别显著,特别是如果该手段和方法包含保护性-调节性抗体、变体或片段,或诱导其表达。

[0444] 因此,本发明至少部分基于以下令人惊奇的发现:本发明的手段和方法可以调节内源保护性-调节性抗体产生/成熟发育不完全的受试者中的免疫应答。

[0445] 如本文所用,术语“[本]发明的”、“根据本发明(in accordance with the invention或according to the invention)”等旨在是指代本文中描述和/或要求保护的本发明的所有实施例。

[0446] 如本文所用,术语“包含”应被解释为涵盖“包括”和“由.....组成”,这两种含义都是具体意图的,并且因此单独公开了根据本发明的实施例。当本文使用时,“和/或”被认为是两个指定的特征或组分中的每一个的具体公开,具有或不具有另一个。例如,“A和/或B”应被视为(i) A、(ii) B和(iii) A和B中每一个的具体公开内容,如同将每一个在本文中单独列出一样。在本发明的上下文中,术语“约(about)”和“大约(approximately)”表示本领域技术人员将理解以仍然确保所讨论特征的技术效果的精度范围。该术语通常表示与所指示的数值的偏差为 $\pm 20\%$ 、 $\pm 15\%$ 、 $\pm 10\%$,以及例如 $\pm 5\%$ 。如本领域普通技术人员将理解的,对于给定技术效果的数值的具体这样的偏差将取决于技术效果的性质。例如,自然或生物技术效果通常可能比人造或工程化技术效果具有更大的偏差。如本领域普通技术人员将理解的,对于给定技术效果的数值的具体这样的偏差将取决于技术效果的性质。例如,自然或生物技术效果通常可能比人造或工程化技术效果具有更大的偏差。当提及单数名词时使用不定冠词或定冠词时,例如“一(a)”、“一个(an)”或“该(the)”,这包括该名词的复数,除非另有特别说明。

[0447] 应当理解,将本发明的教导应用于特定问题或环境,以及包括本发明或其附加特征的变型(诸如另外的方面和实施例)将在本领域普通技术人员根据本文所包含的教导的能力范围内。

[0448] 特别地,所提供的各个定义以及在本发明的一个方面的上下文中所描述的具体实施例将同样适用于本发明的其他方面。

[0449] 除非上下文另有指示,否则上述特征的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施例,并且同样适用于所描述的所有方面和实施例。

[0450] 除非另有说明,本文描述的一般方法和技术可以根据本领域众所周知的常规方法以及如本说明书通篇引用和讨论的各种一般性和更具体的参考文献中描述的进行。参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y. (1989)和Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,Greenlee Publishing Associates(1992),以及Harlow和Lane

Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)。

[0451] 本文引用的所有参考文献、专利和出版物均通过引用整体并入本文。

附图说明

[0452] 图1:显示可溶性半抗原抑制半抗原-载体复合物诱导的抗体免疫应答。a:表达IgM(绿色)和IgD(黄色)B细胞受体的野生型B细胞示意图。b:在指定天数通过ELISA测量的NP-KLH免疫接种小鼠(红色和绿色)和CI小鼠(灰色)的血清抗NP-Ig滴度。所示比率是指可溶性NP与复合NP的摩尔比(sNP:cNP)。点代表小鼠,平均值±SD。c:在指定天数通过ELISA测量的血清抗KLH-IgG滴度。点代表小鼠,平均值±SD。d:ELISpot测定显示产生NP特异性免疫球蛋白的细胞。n=2/组,平均值±SD。e:IgD BCR敲除B细胞示意图。f:在指定天数通过ELISA(IgD-/-小鼠)测量的NP-KLH免疫接种小鼠(红色和绿色)和CI小鼠的血清抗NP-Ig滴度。点代表小鼠,平均值±SD。CI:对照免疫接种。

[0453] 图2:显示可溶NP与复合NP的比率非常高,可抑制抗原特异性IgM应答。a:显示4-羟基-3-硝基苯乙酰基半抗原可溶或与匙孔血蓝蛋白(KLH)缀合的方案。b:显示使用可溶/复合NP和CpG-ODN1826的免疫接种时间表的方案。c:经由ELISA分析NP价注射小鼠的抗体滴度。将血清一式两份施加于NP-BSA包被的板上,并按1:3系列稀释。

[0454] 图3:显示自身抗体的诱导取决于自身抗原价并受其比率调节。a:胰岛素原衍生的全长CP与KLH载体偶联的方案。b:比较人与鼠CP和胰岛素-A链氨基酸序列的表。用作肽的序列用下划线显示,保守氨基酸以粗体显示。c:免疫接种时间表示意图。d-e:在指定天数通过ELISA测量的CP-SAV免疫接种小鼠(红色和绿色)和CI小鼠(灰色)的血清抗CP-Ig滴度。第42天的加强无需CpG(e)。点代表小鼠,平均值±SD。f:ELISpot测定显示第14天时产生CP特异性免疫球蛋白的脾源性细胞。顶部泳道显示孔的代表性图片。n=4只小鼠/组,平均值±SD。g:通过ELISA测量的CP-SAV免疫接种小鼠(红色和绿色)和CI IgD-/-小鼠(灰色)的血清抗CP-Ig滴度。点代表小鼠,平均值±SD。CP:C肽,KLH:匙孔血蓝蛋白,SAV:链霉亲和素,CI:对照免疫接种。

[0455] 图4:显示可溶性抗原干扰浆细胞分化。a:来自C肽(CP)免疫接种小鼠的脾细胞的流式细胞术分析(FACS)。数据代表两个独立实验(n=4)。X轴上的比率是指单价(sCP)与多价(cCP)CP的摩尔比。CD138⁺和B220⁺细胞被鉴定为浆细胞。上图显示0:1注射的小鼠,并且下图显示20:1注射的小鼠。b:所提供的FACS数据的统计学分析。平均值±SD。c:对C肽(CP)免疫接种的小鼠的脾细胞进行流式细胞术(FACS)分析。数据代表两个独立实验(n=4)。X轴上的比率是指单价(sCP)与多价(cCP)CP的摩尔比。上图显示0:1注射的小鼠,并且下图显示20:1注射的小鼠。右图:量化。d:以C肽(CP)小鼠血清作为初级抗体对胰腺裂解物进行蛋白质印迹。胰岛素原(15kD)。e:经由ELISA测量C肽(CP)免疫接种小鼠的链霉亲和素(载体)特异性IgG滴度。将CP:SAV免疫接种小鼠的血清一式两份施加于CP包被的ELISA板上,并按1:3系列稀释。

[0456] 图5:显示复合天然胰岛素(InsNat)引起自身反应性IgG应答,从而在野生型小鼠中诱导自身免疫糖尿病症状。a:在指定天数通过ELISA测量的InsNat免疫接种小鼠和CI小鼠的血清抗胰岛素Ig滴度。点代表小鼠,平均值±SD。b:血液流式细胞分析显示野生型(左)

和B细胞缺陷型(右)小鼠的B细胞(CD19+Thy1.2-)和T细胞(Thy1.2+CD19-)。细胞在淋巴细胞上进行预门控。代表三个独立实验。c:在免疫接种后指定天数评估InsNat免疫接种小鼠(红色:WT,黄色:B细胞缺陷型)和CI小鼠(灰色)的血糖水平。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。d:在免疫接种后指定天数监测InsNat免疫接种小鼠(红色)和CI小鼠(灰色)的尿葡萄糖水平。左图显示葡萄糖标准品的可视化(顶部泳道)和测试动物的代表性图片(中间和底部泳道)。右图显示量化。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。e:从第21天到第26天监测CI和InsNat免疫接种小鼠的水摄入量。f:第27天对InsNat免疫接种小鼠(红色)和CI小鼠(灰色)的胰腺进行流式细胞术分析。左图显示在活细胞上预门控的胰腺巨噬细胞(CD11b+Ly6G-)、中性粒细胞(Ly6G+CD11b+)和B细胞(CD19+)。右图显示胰岛素结合(顶部)和链霉亲和素(SAV)结合(底部)的直方图。代表两个独立实验,n=5/组。g:InsNat免疫接种小鼠(红色)和CI小鼠(灰色)的ELISpot显示产生胰岛素特异性IgG的脾源性细胞(第27天)。显示了代表性的孔(顶部泳道)。n=3/组,平均值 $\pm$ SD。h:InsNat免疫接种小鼠血清IgG纯化后总(红色)和胰岛素特异性(橙色)IgG的定量。i:考马斯染色的SDS-page显示InsNat免疫接种小鼠(红色)和CI小鼠(灰色)在还原(β -ME)条件下(左部泳道)和非还原条件(右部泳道)的纯化血清IgG。HC:重链,LC:轻链。代表两个独立实验。j:静脉(i.v.)注射的WT小鼠的血糖水平。注射后指定小时来自InsNat免疫接种小鼠(红色)或CI小鼠(灰色)的20 μ g纯化血清IgG。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。CI:对照免疫接种,InsNat:复合天然胰岛素, β -ME: β -巯基乙醇。

[0457] 图6:显示使用自身抗原的免疫接种不会改变脾B细胞区室。a:对来自InsNat免疫接种小鼠和CI小鼠的脾细胞进行流式细胞术分析。上图:淋巴细胞和单细胞单细胞的门控策略。中图显示在淋巴细胞上预门控的B细胞。下图显示B细胞上的IgM和IgD表达。左:对照免疫接种(CI),右:InsNat免疫接种(复合天然胰岛素)。n=3/组。

[0458] 图7:显示自身抗原特异性IgM与IgG的比率控制自身免疫应答的危害并诱导保护性IgM。a:在指定天数通过ELISA测量的InsA肽免疫接种小鼠(红色和绿色)和CI小鼠(灰色)的血清抗胰岛素Ig滴度。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。b:在指定天数评估InsA肽免疫接种小鼠(红色和绿色)和CI小鼠(灰色)的血糖水平。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。c:在免疫接种后指定天数监测InsA肽免疫接种小鼠(红色和绿色)和CI小鼠(灰色)的尿葡萄糖水平。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。d:针对抗原摩尔比绘制的ELISA值得出的IgG与IgM的比率。n=5/组,平均值 $\pm$ SD。e:来自InsA肽免疫接种小鼠的胰岛素特异性血清IgG的蛋白质印迹分析。上图(绿色):100:1血清,下图(红色):0:1血清(sInsA:cInsA)。黑色实心箭头:胰岛素原(12kD),黑色非实心箭头:胰岛素(6kD)、 β -肌动蛋白(42kD,上样对照)。代表两个独立实验。f:InsA肽免疫接种小鼠(红色)和CI小鼠(灰色)于第14天的ELISpot,显示产生胰岛素特异性IgG的脾源性细胞。显示了代表性的孔(顶部泳道)。n=4/组,平均值 $\pm$ SD。g:根据ELISA值绘制的IgG与IgM的比率,绘制在二维图表上,相对于血糖水平(左图)和尿糖水平(右图)。n=5/组,平均值 $\pm$ SD。h:在指定天数通过ELISA测量的 γ/μ 比率 <0.1 (黑色)和CI小鼠(灰色)的InsA肽免疫接种小鼠的血清抗胰岛素Ig滴度。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。i:在免疫接种后指定天数评估InsA肽免疫接种小鼠($\gamma/\mu<0.1$;黑色)和CI小鼠(灰色)的血糖水平。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。j:通过ELISA测量指定天数的InsA-肽免疫接种小鼠(左图)和病毒肽免疫接种小鼠(右图)的胰岛素特异性IgM亲和力成熟。k:用cInsA(红色)和cInsA加pIgM静脉注射(橙色)免疫接种的小鼠的血糖和尿糖水平。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。CI:对照免疫接种,cInsA:复

合胰岛素-A肽。

[0459] 图8:显示单价可溶病毒衍生肽抗原调节由相应复合抗原诱导的IgG相对于IgM抗体应答。a:病毒肽特异性血清免疫球蛋白滴度的确定。将病毒-肽免疫接种小鼠的血清一式两份地施加于病毒-肽-生物:链霉亲和素(SAV)包被的板上,按1:3系列稀释。平均值 $\pm$ SD。b-c:确定KLH(载体)特异性血清IgG滴度。X轴上所示的比率是指可溶性病毒肽与复合病毒肽的分子比率。平均值 $\pm$ SD。

[0460] 图9:显示用自身抗原而非外源抗原免疫接种后IgM高/IgD低阳性区室增加,并且胰腺巨噬细胞经由IgG结合InsA肽。a-b:对病毒或胰岛素肽免疫接种小鼠的脾细胞进行流式细胞术分析。上图(a)显示在淋巴细胞上预门控的B细胞(CD19+B220+)。下图(b)显示B细胞亚群:成熟B细胞(IgDhi IgMlo)、移行/边缘区B细胞(IgDlo IgMhi)。细胞在B细胞上进行预门控。左:PBS(灰色),中:病毒肽(紫色),右:胰岛素肽(青色)。右外侧显示量化,平均值 $\pm$ SD。c:胰腺细胞的流式细胞术分析。左图显示细胞(上)和巨噬细胞(下)的门控策略。右图显示了所示的InsA肽和肽对照结合的直方图。

[0461] 图10:显示cInsA-肽免疫接种小鼠中脾巨噬细胞结合胰岛素特异性IgG。a:cInsA-肽免疫接种小鼠的脾细胞的流式细胞术分析(FACS)。左图显示巨噬细胞(CD11b+CD19-)的门控策略。上图显示对照免疫接种小鼠(黑色)和cInsA免疫接种小鼠(红色)的IgG结合直方图。下图显示巨噬细胞的InsA肽结合。三个独立实验的代表性数据。

[0462] 图11:显示通过用cInsA复合物重复重新攻击后通过增加IgM来防止葡萄糖代谢失调。a:胰岛素特异性血清免疫球蛋白滴度的确定。将InsA肽免疫接种小鼠的血清一式两份地施加于天然胰岛素包被的ELISA板上,按1:3系列稀释。左图显示第49天的抗胰岛素IgM,右图显示任意单位(AU)的抗胰岛素IgG。X轴上所示的比率是指可溶InsA肽与复合InsA肽的分子比率。平均值 $\pm$ SD。b:通过试纸带监测尿葡萄糖水平。平均值 $\pm$ SD。

[0463] 图12:显示由InsA肽免疫接种诱导的多反应性IgM根据抗原价和天数导致糖尿病症状。a:通过AccuCheck系统(Roche)监测血糖水平。从尾静脉新鲜抽取的血液施加在试纸上,并以mmol/L为单位测量血糖。平均值 $\pm$ SD。b:通过Combur M带(Roche)监测尿葡萄糖水平。将新鲜获得的尿液涂在试纸带的葡萄糖区域上并根据制造商的标准进行分析。绿色条表示100:1(可溶:复合)InsA肽。平均值 $\pm$ SD。点代表本研究中使用的小鼠。

[0464] 图13:显示通过增加单价抗原(100:1,sInsA:cInsA)的比率产生自身反应性IgM,保护免受复合抗原(0:1,sInsA:cInsA)诱导的葡萄糖代谢失调。a:通过AccuCheck系统(Roche)监测血糖水平。从尾静脉新鲜抽取的血液施加在试纸上,并以mmol/L为单位测量血糖。平均值 $\pm$ SD。b:通过Combur M带(Roche)监测尿葡萄糖水平。将新鲜获得的尿液涂在试纸带的葡萄糖区域上并根据制造商的标准进行分析。绿色条表示100:1(可溶:复合)InsA肽。平均值 $\pm$ SD。点代表小鼠。c:胰岛素特异性血清免疫球蛋白滴度的确定。将InsA肽免疫接种小鼠的血清一式两份地施加于天然胰岛素包被的ELISA板上,按1:3系列稀释。(a)显示第59天的抗胰岛素IgM,而(b)显示任意单位(AU)的抗胰岛素IgG。X轴上所示的比率是指可溶InsA肽与复合InsA肽的分子比率。平均值 $\pm$ SD。

[0465] 图14:显示用cInsA复合物重复再攻击导致胰岛素特异性IgM+B细胞的积累。a:cInsA免疫接种(第71天)的WT小鼠的脾细胞(第79天)的流式细胞术分析(FACS)。左图显示带有淋巴细胞门控的前向和侧向散射。中图对淋巴细胞进行预门控,显示B细胞(CD19+B220

+)。右图B细胞上预门控显示了InsA-肽结合的直方图。红色: $\text{g}/\mu\text{L}<0.1$;黑色: $\text{g}/\mu\text{L}<0.1$ SAV仅对照。

[0466] 图15:显示静脉内施用纯化的血清pIgM不会导致自身免疫血糖异常。a:考马斯染色的SDS-page,显示在还原(b-ME)条件下(左部泳道)和非还原条件下(右部泳道)InsA肽(第49天)免疫接种小鼠(红色)和CI小鼠(灰色)的纯化血清IgM。HC:重链,LC:轻链。代表两个独立实验。b-c:静脉注射 $20\mu\text{g}$ CI IgM(灰色)或InsA IgM(黑色)的小鼠的血糖水平。点代表小鼠,平均值 $\pm$ SD。CI:对照免疫接种,pIgM:保护性IgM。d:通过ELISA测量的抗KLH-IgM血清滴度。

[0467] 图16:显示初级与记忆IgM对照自身免疫应答的亲合力和特异性的差异。a:腹腔使用复合Ins-A肽(cInsA)和48小时周期内静脉注射(i.v.)胰岛素特异性保护性IgM(PR-IgM)的免疫接种方案的示意图。*监测:仅在仅使用cInsA的组中观察到糖尿病症状。b:用复合InsA肽(cInsA)(红色, $n=5$)和cInsA加静脉注射(i.v.)pIgM(橙色, $n=5$)免疫接种的野生型小鼠在第7天的血糖和尿糖水平。点代表个体小鼠,平均值 $\pm$ SD。c:通过ELISA测量的胰岛素-A-肽免疫接种小鼠在第7天($n=8$)和第85天($n=4$)的血清抗-dsDNA-IgM滴度。点代表个体小鼠,平均值 $\pm$ SD。d,f:对照免疫接种(CI, $n=3$)、胰岛素-A-肽免疫接种小鼠在第7天($n=3$)和第85天($n=3$)的血清抗核IgM(ANA)和经由HEp-2载玻片分析总血清或胰岛素特异性IgM(同种型对照: $n=3$,第7天: $n=3$,第85天: $n=3$)。比例尺: $10\mu\text{m}$ 。绿色荧光表示与核结构结合的IgM e:考马斯染色的SDS-page显示初级(cInsA第7天)和记忆(cInsA第85天)胰岛素特异性IgM与胰岛素/DNA一起孵育后的,并以 10.000kD (是指 $>/<104\text{kD}$)为截断值进行尺寸排阻。IgM重链: 69kD ,IgM轻链: 25kD ,J区段: 15kD 。呈现的数据代表三个独立实验。g:胰岛素下拉后静脉注射IgM同种型对照(灰色, $n=6$)、记忆PR-IgM(黑色,保护性胰岛素-IgM第85天, $n=5$)或初级胰岛素-IgM(红色,第7天, $n=4$)的野生型小鼠的血糖水平。

[0468] 图17:显示cInsA免疫接种含有胰岛素反应性IgM小鼠的血清的胰岛素特异性下拉。a:cInsA免疫接种小鼠血清的胰岛素特异性下拉的蛋白质印迹分析。CI:对照免疫接种。上图(绿色)显示IgM重链(IgM HC, 69kD),并且下图显示IgG重链(IgG HC, 55kD)。b:经由ELISA测量对照免疫接种小鼠针对DNA(左)和胰岛素(右)的血清IgM。平均值 $\pm$ SD。点代表个体小鼠。

[0469] 图18:显示了胰岛素情况下的图形摘要。胰岛素特异性B细胞的反应性由抗原价控制,导致在生理条件下产生可诱导的保护性自身反应性IgM。pIgM:保护性IgM,s胰岛素:可溶性(单价),c胰岛素:复合物(多价)。

[0470] 图19:使用SARS-CoV-2衍生的RBD免疫接种后的抗体应答。在免疫接种前两周按照指示对小鼠进行预处理。随后,在第1天和第21天对小鼠进行免疫接种。在免疫接种浓缩液后第28天收集血清并用于ELISA以确定Ig浓度。

[0471] 图20:用c胰岛素免疫接种小鼠诱导急性炎症性胰腺炎。

[0472] A) FACS测量显示结合天然胰岛素的生发中心B细胞。

[0473] B) ELISA测量显示血清胰脂肪酶,该酶被用作胰腺损伤的标志物。与多价胰岛素诱导的自身免疫应答一致,检测到血清胰脂肪酶显著增加,这是器官损伤的明显迹象。

[0474] C) 胰岛素与IgM结合的竞争测定。用cInsA免疫接种的野生型小鼠的血清与BSA(未处理的对照,UT)或 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 小牛胸腺dsDNA(+DNA)一起预孵育。数据显示,与dsDNA预孵育

后,胰岛素与初级IgM(第7天)的结合相对减少,这表明dsDNA与胰岛素竞争与初级IgM的结合,初级IgM与PR-IgM相比具有多特异性。

[0475] D) 亲和力测量的定量数据直接胰岛素的干涉测定: IgM相互作用显示初级IgM与PR-IgM相比的亲和力差异。

[0476] E) 用c胰岛素(n=3)或对照免疫接种(n=3)免疫接种的小鼠的胰腺上清液的基于流式细胞术的珠阵列。细胞因子珠(左)和细胞因子检测(右)的代表性直方图。

[0477] F) FACS珠阵列对指定细胞因子的定量。点代表个体小鼠。

[0478] 图21:胰岛素四聚体(c胰岛素)和CP四聚体(cCP)的示意图。

[0479] 图22:针对InsA肽的自身抗体应答的启动不需要CpG佐剂。a:通过ELISA(包被:胰岛素)测量注射复合胰岛素-A肽(cInsA,n=5)或对照注射(PBS,n=3)的小鼠的血清抗胰岛素IgM滴度。点代表个体小鼠。平均值 $\pm$ SD,采用Mann-Whitney-U检验计算统计显著性。b:用商业血糖监测装置监测注射复合胰岛素-A肽(cInsA,n=5)或对照注射(PBS,n=3)的小鼠的血糖水平。点代表个体小鼠。平均值 $\pm$ SD,使用Mann-Whitney-U检验计算统计显著性。

[0480] 图23: IgD缺陷型小鼠在免疫接种一天后出现加强的多反应性IgM应答。

[0481] A-B:通过ELISA测量的NP-KLH(IgD缺陷型n=5,WT n=4)和CpG ODN1826(对照免疫接种:CI,IgD缺陷型n=4,WT n=2)注射小鼠的血清免疫球蛋白滴度。第1天和第3天(A)以及第7天(B)的NP反应性IgM。平均值, $\pm$ SD。

[0482] C:经由HEp2载玻片测试的对注射NP-KLH和CI的IgD缺陷型小鼠和WT小鼠的自身分子(DNA/RNA)具有反应性的血清免疫球蛋白。荧光显微镜图像代表三个独立实验。比例尺:10 μ m。

[0483] D:通过ELISA测量的NP-KLH(IgD缺陷型n=5,WT n=4)和CI注射小鼠(IgD缺陷型n=4,WT n=2)的血清免疫球蛋白滴度。免疫接种后第7天的dsDNA反应性IgM。使用Welch校正的学生t检验来比较一项实验中的两组。平均值, $\pm$ SD。

[0484] 图24: IgD类BCR是防止针对自身抗原的快速免疫应答并诱导亲和力成熟所必需的。

[0485] A:胰岛素A链衍生肽(InsA)多价复合物与匙孔血蓝蛋白(KLH)的示意图。InsA的氨基酸序列如图所示。B: IgD缺陷型和WT小鼠在第0天注射InsA-KLH+CpG ODN1826,并且在第21天和第42天注射InsA-KLH的免疫接种时间表。C:通过ELISA测量的用InsA-KLH或CI(n=3)免疫接种的IgD缺陷型(n=4)和WT(n=10)小鼠的天然胰岛素具有反应性的血清免疫球蛋白滴度。天数如图所示。平均值, $\pm$ SD。D:经由HEp2载玻片测试的对InsA-KLH和CI注射的IgDko(n=5/天)和WT(n=5/天)小鼠的自身分子(DNA/RNA)具有反应性的血清免疫球蛋白。荧光显微镜图像代表三个独立实验。比例尺:10 μ m。使用Welch校正的学生t检验来比较一项实验中的两组。

[0486] 图25: IgD类BCR是胰岛素-IgM亲和力成熟所必需的,以起到保护作用并预防自身免疫病理。

[0487] A:通过肽比率ELISA测量IgM对cInsA(InsA-KLH+CpG ODN1826)免疫接种的IgDko(n=4)、WT(n=5)和CI(n=3)小鼠的InsA肽的亲和力。包被板的链霉亲和素带有一个(InsA(1))或四个(InsA(4))生物素结合位点。平均值, $\pm$ SD。B:通过商购尿试纸(Roche)测量的用InsA-KLH或CI(n=3)免疫接种的IgD缺陷型(n=4)和WT(n=5)小鼠的尿葡萄糖值(mmol/

L)。平均值, $\pm$ SD。C: 用InsA免疫接种的IgD缺陷型 ($n=4$) 和WT ($n=5$) 小鼠的血糖值 (mmol/L)。在第0天 (InsA-KLH+CpG ODN1826)、第21天 (InsA-KLH)、第42天 (InsA-KLH) 进行注射。D: 考马斯染色的SDS-page显示cInsA和对照免疫接种小鼠的还原 ($+\beta$ -ME) 和非还原 ($-\beta$ -ME) IgM。经由HiTrap IgM柱分离总血清IgM (cInsA第85天是指PR-IgM)。IgM单体: 150kD, IgM HC: 70kD, IgM LC: 25kD。E: 用InsA-KLH免疫接种的IgD缺陷型小鼠 ($n=9$)、WT对照免疫接种小鼠 ($n=4$) 和用InsA-KLH免疫接种并静脉注射PR-IgM的IgD缺陷型小鼠的血糖值 (mmol/L) ($n=5$)。平均值, $\pm$ SD。F: 经由HEp2载玻片测试的对从InsA-KLH免疫接种小鼠分离的IgM (PR-IgM和第7天初级IgM) 的自身分子 (DNA/RNA) 具有反应性的血清免疫球蛋白。荧光显微镜图像代表三个独立实验。比例尺: 10 μ m。G: 干涉测定法以确定IgM对胰岛素的亲和力。用cInsA免疫接种的IgD缺陷型 (上图) 和WT (下图) 小鼠的胰岛素特异性分离IgM。不同天的IgM亲和力以 μ m显示。图表代表三个独立实验。

[0488] 图26: IgD类BCR控制快速反应CD21⁺CD23⁺B细胞群, 该细胞群能够在免疫接种后24小时分泌自身抗体。

[0489] A-E: 用InsA-KLH+CpG ODN1826或CpG ODN1826 (C1) 免疫接种的IgD缺陷型 ($n=4$ /组) 和WT ($n=4$ /组) 小鼠的流式细胞术分析。所有图均显示淋巴细胞 (FSC/SSC)、单细胞 (SSC-H/SSC-W) 和活细胞 (FVD) 上预门控的代表性图。A: 左图显示用于对淋巴细胞门控内的B细胞 (CD19⁺) 进行门控的CD19表达直方图。右图显示B细胞门控内放大 (激活) 的IgM⁺B细胞 (FSC⁺ B220⁺)。B: 柱状图显示通过在IgM⁺B细胞上预门控CD69表达而激活的B细胞。C: 代表图显示边缘区B细胞 (CD21^{hi} CD23⁺)、滤泡B细胞 (CD21⁺CD23^{hi}) 和CD21⁺CD23⁺ (双阴性) B细胞群。D: 左图显示CD21⁺CD23⁺B细胞IgM表达的直方图。右图显示CD21⁺CD23⁺B细胞IgD表达的直方图。E: 显示IgM⁺脾B细胞的CD23表达的直方图。

[0490] 图27: CD21/CD23阴性B细胞群是IgD类BCR控制下的IgM分泌细胞的主要来源。

[0491] A-D: ELISpot分析显示注射24小时后InsA-KLH+CpG ODN1826或对照 (CpG ODN1826) 免疫接种 (CI) 小鼠的脾细胞分泌IgM。(A) 分泌总脾细胞的IgM, (B) 分泌CD21/CD23负分选B细胞的IgM, (C) 分泌CD23⁺滤泡B细胞的IgM, (D) 所示细胞和基因型的ELISpot孔的代表性图像。进行了两次独立实验, CI为 $n=3$ /组, 并且InsA-KLH为 $n=6$ /组。平均值, $\pm$ SD。使用Welch校正的学生t检验来比较一项实验中的两组。

[0492] 图28: 初级IgM具有抗原特异性和多反应性, 但不具有交叉反应性。

[0493] A、C: 用NP-KLH+CpG和对照 (CpG-ODN1826) (A) 免疫接种或用InsA-KLH+CpG和对照 (C) 免疫接种的IgD缺陷型小鼠和WT小鼠的血糖水平 (mmol/L)。平均值, $\pm$ SD。B、D: 通过ELISA测量的对dsDNA具有反应性的用NP-KLH+CpG和对照 (B) 或InsA-KLH+CpG和对照 (D) 免疫接种的IgD缺陷型和WT小鼠的血清免疫球蛋白滴度。平均值, $\pm$ SD。E、F: 通过ELISA测量的对胰岛素具有反应性的用NP-KLH+CpG或InsA-KLH+CpG和对照免疫接种的IgD缺陷型小鼠和WT小鼠的血清免疫球蛋白滴度 (上图), 或者对NP具有反应性的用InsA-KLH+CpG和对照免疫接种的小鼠的血清免疫球蛋白滴度 (下) (E) 以及对NP或胰岛素具有反应性相同小鼠的血清免疫球蛋白滴度 (F)。平均值, $\pm$ SD。

[0494] 图29: 图形概要: IgM成熟需要IgD。

[0495] 图30: IgD缺陷型小鼠需要多次加强免疫以控制自身反应性。

[0496] a) 注射cInsA (KLH+CpG ODN1826) 的IgD^{-/-} ($n=5$) 和WT ($n=5$) 小鼠的免疫接种时

间表。方案中标明了注射和加强的天数。

[0497] b) 用cIsA(InsA-KLH+CpG ODN1826)和对照(CI,CpG ODN1826)免疫接种的IgDko和WT小鼠的血糖滴度。

[0498] 图31: IgD缺陷型小鼠需要多次加强以促进胰岛素特异性IgM的亲和力成熟。通过肽比率ELISA测量IgM对cInsA(InsA-KLH+CpG ODN1826)免疫接种的IgD^{-/-} (n=4)、WT(n=5)和CI(n=3)小鼠的InsA肽的亲和力(Shimizu等人2004)板用带有一个(InsA(1))或四个(InsA(4))生物素结合位点的链霉亲和素包被。平均值±SD。

[0499] 图32: 免疫接种一天后, IgD缺陷型小鼠显示CD21⁺CD23⁺B细胞群内活化的B细胞。

[0500] A: 本研究中使用的一般门控策略。上图显示带有淋巴细胞门控的总脾细胞。中图显示带有单细胞门控的淋巴细胞。下图显示带有活细胞门控的单细胞(固定活力染料(FVD)阴性)。B-C: 对InsA(InsA-KLH+CpG ODN1826)免疫接种的WT和IgD^{-/-}小鼠的脾B细胞进行流式细胞术分析。直方图显示在CD21⁺CD23⁺B细胞(C)和CD23⁺F0(滤泡)B细胞(C)上进行预门控FSC(细胞大小)。显示的数据代表两个独立实验。

[0501] 图33: IgD类BCR控制腹膜腔中的浆细胞分化。

[0502] A: 对cInsA(InsA-KLH+CpG ODN1826)和对照(ctrl)免疫接种小鼠的腹膜腔细胞进行流式细胞术分析。图显示CD138⁺浆母细胞和浆细胞。显示的数据代表两个独立实验, n=3/组。

[0503] 图34A) 1,2,-亚苯基-双马来酰亚胺RBD二聚体B) 活化的RBD单体C) 与半胱氨酸反应D) 与IgG连接E) 与IgG聚合F) 与内源蛋白复合的示意图。

[0504] 图35通过RBD化学交联模拟免疫复合物可产生加强的抗体应答。

[0505] A. 通过ELISA测定用于中和测定的样品中RBD特异性IgM(左)、IgG(中)和总Ig(右)的浓度。

[0506] B-C. 在用cRBD*MM免疫接种的小鼠血清中测量的中和电位。将结果与RBD预处理后用cRBD-SAV免疫接种的小鼠中确定的中和能力进行比较。

[0507] IgM并不是实现病毒中和所必需的-→通过主要含有IgG的样品也可以实现。RBD特异性总Ig浓度较高与有效的中和能力相关。

[0508] cRBD MM: RBD与马来酰亚胺(MM)的复合物。

[0509] 图36活化的抗原形成加强的免疫应答的IgG复合物。

[0510] A. SARS-CoV-2刺突蛋白的示意图以及受体结合域(RBD)的定位。

[0511] B. 化学交联的反应方案。于pH 6.5-7.5下, 1,2-亚苯基双马来酰亚胺与蛋白质半胱氨酸残基上的巯基基团发生氧化, 以形成稳定的硫醚键。

[0512] C. 1,2-亚苯基双马来酰亚胺(双马来酰亚胺)复合的RBD的考马斯染色。RBD表示没有交联的天然RBD。

[0513] D. 和E. 用RBD免疫接种。

[0514] 图37需要自身抗体来平衡小鼠的体内平衡。

[0515] A: 经由ELISA测量的不同IgG下拉的胰岛素特异性IgG浓度(包被: 天然胰岛素)。总计: 经由蛋白G的总IgG下拉(n=5), 胰岛素特异性: 经由胰岛素诱饵柱的IgG下拉(n=5), 对照IgG(n=3)。B: 考马斯染色的SDS page显示总IgG(从血清中下拉)和IgG对照(去除抗胰岛素IgG的总IgG)。所呈现的图像代表三个独立实验。左侧的标记以千道尔顿(kD)为单位显

示。C:通过ELISpot测量的天然野生型和B细胞缺陷型(B cell-def)小鼠的分泌抗胰岛素IgG的脾细胞(包被:天然胰岛素)。细胞以300,000个细胞/孔接种并孵育48小时。D:用商业血糖监测仪测量的天然野生型和B细胞缺陷型小鼠的血糖水平(mmol/L)。E:在指定时间测量的野生型和B细胞缺陷型小鼠静脉注射200 μ g总IgG(耗尽抗胰岛素IgG的IgG)的血糖水平。F:野生型(WT)和B细胞缺陷型(B cell-def)小鼠的运动功能通过线悬挂测试(以线上秒为单位)测量。灰色:WT未经处理,蓝色:B细胞缺陷型未经处理,绿色:B细胞缺陷型注射了200 μ g总IgG。G:通过ELISA在指定时间点测量的注射100 μ g商业人IVIg的B细胞缺陷型(B cell-def)小鼠的胰岛素滴度。H:通过商业血糖监测仪(mmol/L)在指定时间测量的注射200 μ g商业人IVIg(黑色)和消耗抗胰岛素IgG的商业人IVIg(灰色)的野生型小鼠的血糖水平。I:与健康供体(HD)对照相比,在治疗前(pre)和治疗后(post)接受(500mg/kg)IVIg的免疫缺陷患者(常见变异性免疫缺陷,CVID)的血清葡萄糖水平。

[0516] J:通过生物膜干涉测量法(BLI)确定的人抗胰岛素IgG的胰岛素结合亲和力。Kd(解离常数)使用Ka(结合常数)计算:1/Ka。显示的数据代表三个独立实验。

[0517] 图38人类中存在中和和PR-IgM。

[0518] A:经由ELISA测量年轻(<30岁)和老年(>65岁)个体的血清抗胰岛素IgM浓度(包被:天然胰岛素)。女性(年轻):n=25,女性(老年):n=11,男性(年轻):n=15,男性(老年):n=12。平均值 $\pm$ SD,使用Kruskal-Wallis检验计算统计显著性。B:显示胰岛素特异性IgM分级为低亲和力级分和高亲和力级分的基于柱的纯化的方案。C:考马斯染色的SDS page显示纯化后的低亲和力抗胰岛素IgM(红色)和高亲和力抗胰岛素IgM(绿色)。所呈现的图像代表三个独立实验。左侧标记以千道尔顿(kD)为单位显示,HC(重链):70kD,LC(轻链):25kD,J(J区段):15kD。D:HEp2载玻片显示胰岛素特异性IgM下拉的抗DNA反应性IgM。黑色:单克隆IgM对照(n=6),红色:低亲和力抗胰岛素IgM(n=6),绿色:高亲和力抗胰岛素IgM(n=6)。比例尺:10 μ m。绿色荧光表明HEp2细胞结合。图像代表三个独立实验。E:通过ELISA测量的胰岛素特异性IgM下拉的抗dsDNA-IgM浓度(包被:小牛胸腺DNA)。IgM对照(ctrl1,n=3)、IgM低(n=3)、IgM高(n=3)。平均值 $\pm$ SD,使用Kruskal-Wallis检验计算统计显著性。F:通过生物膜干涉测量法(BLI)确定的人抗胰岛素IgM下拉的胰岛素结合亲和力。Kd(解离常数)使用Ka(结合常数)计算:1/Ka。显示的数据代表三个独立实验。大写字母是指亲和力分数。G:静脉注射100 μ g人胰岛素特异性IgM(大写字母是指亲和力分数)和人IgM对照的野生型小鼠的血糖水平。H、I:静脉注射100 μ g人胰岛素特异性IgM(大写字母是指亲和力分数)和人IgM对照以及500ng天然胰岛素(H)和100 μ g人抗胰岛素IgG(I)的野生型小鼠的血糖水平。J:通过ELISA确定的年轻(<30岁)和老年(>65岁)个体的胰岛素特异性IgM比率。实验前经由胰岛素诱饵柱分离胰岛素特异性IgM。

[0519] 图39内源性胰岛素复合物在鼠中诱导加强的自身免疫。

[0520] A:经由1,2-亚苯基-双-马来酰亚胺通过硫醇基介导的二硫键交联生成胰岛素四聚体(c胰岛素)的示意图。黑线:内源二硫键,灰线:诱导二硫键。B:考马斯染色的SDS page显示胰岛素(左部泳道)和交联胰岛素(右部泳道;左图)以及用10kD尺寸排阻柱纯化后的c胰岛素复合物(右图)。所呈现的图像代表三个独立实验。左侧的标记以千道尔顿(kD)为单位显示。C:第0天腹腔注射PBS(对照注射;CI,n=5)、c胰岛素(n=5)、胰岛素:SAV(n=5)的野生型小鼠的血糖水平。平均值 $\pm$ SD,使用重复测量ANOVA检验计算统计显著性。D:通过

ELISA在指定天数测量在第0天腹腔注射PBS(对照注射;CI,n=5)和c胰岛素(n=3)的野生型小鼠的血清抗胰岛素-IgM浓度(包被:天然胰岛素)。平均值±SD,使用Kruskal-Wallis检验计算统计显著性。E:第0天和第21天腹腔注射PBS(对照注射;CI,n=5)和c胰岛素(n=5)然后第22天静脉注射100μg抗胰岛素IgM(高亲和力)或100μg IgM对照的野生型小鼠的血糖水平。F:腹腔注射PBS(n=5)和c胰岛素(n=5/组)以及静脉注射100μg抗胰岛素IgM(高亲和力)或100μg IgM对照的小鼠的流式细胞术分析。图显示胰腺巨噬细胞(CD11b+)和中性粒细胞(Ly6G+)在活细胞上进行预门控。图像代表三个独立实验。G:腹腔注射PBS(n=5)和c胰岛素(n=5/组)以及静脉注射100μg抗胰岛素IgM(高亲和力)或100μg IgM对照的野生型小鼠的血清胰腺脂肪酶水平。H:用于评估吞噬活性的巨噬细胞测定的示意图。I:使用高或低亲和力鼠抗胰岛素IgM进行的基于珠的吞噬测定的流式细胞术分析。左图显示了在低或高亲和力IgM存在的情况下吞噬巨噬细胞百分比的代表性FACS图。右图显示吞噬巨噬细胞百分比的定量分析。

[0521] 图40单克隆人胰岛素-IgM能够在体内保护胰岛素。

[0522] A:考马斯染色的SDS page显示纯化后的单克隆抗胰岛素IgM和IgG。所呈现的图像代表三个独立实验。左侧的标记以千道尔顿(kD)为单位显示。B:通过生物膜干涉测量法(BLI)确定的单克隆人抗胰岛素Ig的胰岛素结合亲和力。Kd(解离常数)使用Ka(结合常数)计算:1/Ka。显示的数据代表三个独立实验。C:通过ELISA测量的胰岛素特异性IgM下拉的抗dsDNA-IgM浓度(包被:小牛胸腺DNA)。IgM对照(ctrl1,n=4)、IgMMY(n=4)、IgGMY(n=4)。D:HEp2载玻片显示抗DNA反应性单克隆IgMMY(n=6)和IgGMY(n=6)。比例尺:10μm。绿色荧光表明HEp2细胞结合。图像代表三个独立实验。E:第0天和第21天腹腔注射PBS(对照注射;CI,n=5)和c胰岛素(n=5)然后第22天静脉注射100μg抗胰岛素IgM(高亲和力)或100μg IgM对照的野生型小鼠的血糖水平。F:第0天和第21天腹腔注射PBS(对照注射;CI,n=5)和c胰岛素(n=5)然后第22天静脉注射100μg抗胰岛素IgM(高亲和力)或100μg IgM对照的野生型小鼠的血糖水平。G:第0天和第21天腹腔注射PBS(对照注射;CI,n=5)和c胰岛素(n=5)然后第22天静脉注射100μg抗胰岛素IgM(高亲和力)或100μg IgM对照的野生型小鼠的尿糖水平。

[0523] 图41mb1缺陷型小鼠中没有分泌抗体的细胞。

[0524] A:对野生型和B细胞缺陷型小鼠的血液进行流式细胞术分析。左图显示细胞前向和侧向散射。中图和右图显示在淋巴细胞上预门控的细胞。

[0525] B:通过ELISpot测量的野生型和B细胞缺陷型小鼠的IgG分泌脾细胞。每孔接种50,000个脾细胞。

[0526] C、D:通过ELISA测量的野生型和B细胞缺陷型小鼠的血清总IgG(C)和总IgM(D)滴度。

[0527] 实例

[0528] 现在将通过实例并参考本文阐述的描述、附图和表格来说明本发明的某些方面和实施例。本发明的方法、用途和其他方面的此类实例仅是代表性的,并且不应被视为将本发明的范围仅限于此类代表性实例。

[0529] 实例显示:

[0530] 实例1:免疫接种实验和抗体应答

[0531] 可溶性半抗原的存在抑制IgG产生:为了测试体内B细胞相对反应性的概念,使用NP(4-羟基-3-硝基苯乙酰基)作为半抗原与KLH(匙孔咸血蓝素)作为载体偶联进行免疫接种实验(图2a和2b)。为此,向野生型小鼠组注射NP作为可溶性化合物(sNP)或NP-KLH(称为多价复合抗原(cNP)),以与NP的等摩尔比(图1a)。在免疫接种后第7天(IgM)和第14天(IgG)确定抗体应答(图1b)。与缺乏所研究抗原(CI)的对照免疫接种(CI)类似,仅注射可溶半抗原(sNP:cNP,1:0)未能诱导明确的IgM或IgG抗体应答,而注射cNP作为多价抗原(sNP:cNP,0:1)能够诱导两者。以不同摩尔比向cNP添加sNP会干扰抗体应答。有趣的是,sNP与cNP的比率已经达到100:1,IgG应答受到显著阻碍。使用较高比率sNP与cNP(>10.000:1)也能够显著抑制IgM抗体对NP半抗原的抗原(图2c)。重要的是,无论可溶性半抗原的量如何,对载体(KLH)的IgG应答都是相似的(图1c)。

[0532] 为了进一步证实这些发现,进行了ELISpot测定以直接评估抗体分泌细胞的比率。与血清免疫球蛋白数据一致,ELISpot结果表明,以100:1的比率将可溶性半抗原与半抗原偶联载体结合,减少了IgG分泌细胞的数量,而IgM分泌细胞不受影响(图1d)。这些数据与发明人的概念一致,即可溶单价抗原抑制对相同抗原的复杂形式的免疫应答。与IgM相比,在较低浓度的可溶单价抗原下观察到对IgG免疫应答的抑制作用。

[0533] 一个重要的部分表明,IgD型BCR的存在对于这种调节很重要。因此,通过在缺乏IgD型BCR的IgD敲除小鼠中进行NP免疫接种实验来测试IgD的作用。当cNP免疫接种中添加可溶性NP时,IgD敲除小鼠没有表现出抑制作用(图1e,1f;图2c)。

[0534] 总之,这些数据表明成熟B细胞能够根据抗原决定簇的密度微调其免疫应答,从而导致对同一抗原的不同表位产生不同的IgM和IgG应答。

[0535] 可溶性肽的存在增强了IgM抗体应答:在测试半抗原特异性抗体应答后,测试了该概念是否适用于自身抗原,从而可能为B细胞的选择和自我破坏性免疫应答的控制提供不同的方案。为了避免使用人工携带表达特定BCR(识别转基因产物或内源结构)的单特异性B细胞的转基因小鼠,选择胰岛素相关自身抗原作为自身免疫疾病的生理相关系统。在胰腺的生物合成期间,胰岛素原被裂解成众所周知的激素胰岛素和所谓的C肽(CP),并且两者都分泌到血流中。虽然胰岛素在血液中以纳摩尔量存在,并且在血糖水平和糖尿病的调节中发挥着关键作用,但C肽几乎检测不到,并且在血液中以低皮摩尔量存在,并且似乎不具有稳态功能[30]。使用全长C肽或胰岛素衍生肽,应研究自身反应性抗体对丰富且功能重要的自身抗原(胰岛素)的应答,并与几乎检测不到的没有生理功能的自身抗原(C肽)进行比较(图3a)。此外,与胰岛素相反,C肽并不保守(图3b)。

[0536] 通过孵育复合的生物素化C肽与链霉亲和素(SAV)一起使用。可替代地,KLH用作与C肽偶联的载体,以产生多价复合抗原(cCP)。C肽(sCP)的非复合形式用作可溶性抗原。与NP半抗原一样,向野生型小鼠注射sCP、cCP或其组合,以测试它们诱导自身反应性抗体应答的潜力(图3c)。正如预期的那样,sCP没有诱导可检测的IgM或IgG免疫应答,而多价形式cCP分别第7天和第14天测量时诱导IgM和IgG(图3d)。除了ELISA实验外,还使用免疫接种小鼠的血清来确定所产生的抗体应答的特异性。使用小鼠血清进行的蛋白质印迹分析显示,用cCP免疫接种的小鼠对识别胰腺C肽的IgG抗体呈阳性(图4a)。这与半抗原免疫接种完全一致,并表明可溶肽(单独无法诱导可检测的免疫应答)可阻止IgG记忆B细胞的产生。事实上,在第21天用相同抗原进行后续攻击导致与仅用cCP(sCP:cCP比率0:1)免疫接种的小鼠相

比,用sCP:cCP比率20:1免疫接种的小鼠中IgG应答较弱(图3d,第14天和第28天IgG)。为了确认针对C肽作为自身抗原的记忆应答,在第42天使用cCP(不含佐剂CpG)进行回忆免疫接种(recall immunization),并在仅用0:1的sCP:cCP比率免疫接种的小鼠中检测到针对C肽的加强IgG应答(图3e)。

[0537] 与IgG相比,在20:1比率的sCP:cCP回忆免疫接种后,可诱导C肽特异性IgM抗体应答(图3d,第28天IgM)。脾B细胞的FACS分析显示不同组小鼠之间没有显著差异(补充图3b、3c)。此外,针对C肽载体的IgG应答没有检测到差异(图4d)。

[0538] 这些数据表明可溶性单价抗原调节免疫应答并决定免疫应答期间抗体分泌细胞的IgG:IgM比率。通过进行ELISpot分析以确定不同小鼠组中IgG或IgM分泌细胞的数量,证实了这一结论。与血清Ig结果完全一致,ELISpot实验表明,与用cCP(sCP:cCP比率为0:1)免疫接种的小鼠相比,用20:1比率的sCP:cCP免疫接种的小鼠具有增加的IgM分泌细胞的数量,而IgG分泌细胞的数量减少(图3f)。

[0539] 为了测试是否与NP免疫接种实验类似,IgD是通过sCP:cCP比率调节B细胞反应性所必需的,在IgD敲除小鼠中进行了C肽免疫接种。IgD敲除小鼠普遍表现出IgG应答降低,并且在用0:1比率的sCP:cCP免疫接种的小鼠中观察到可溶性肽对IgG抗体应答没有调节作用(图3g)。

[0540] 总之,这些数据表明抗体应答可以直接针对自身抗原,这表明各自的自身反应性B细胞既没有被中枢耐受性克隆缺失,也没有被无反应性功能沉默。最重要的是,无论自身或非自身抗原,结果表明B细胞应答是由多价抗原诱导并由可溶性对应物调节,从而调节B细胞反应性和产生的抗体的同种型。这导致了与当前观点完全不同的动态且关键的B细胞功能。

[0541] 实例2:针对胰岛素的自身抗体应答

[0542] 多价天然胰岛素诱导有害的抗胰岛素IgG应答:由于C肽在血液中很难检测到,并且没有已知的生理相关性,因此不排除针对如此极低浓度的自身抗原可能产生自身抗体应答。因此,测试了针对胰岛素的自身抗体应答。首先,测试了基本假设,即自身反应性B细胞自然存在于外周,并且不会像当前观点所提出的那样被中枢耐受性缺失或因无反应而变得无反应。根据这一概念,自身抗原复合物的形成会触发自然存在的自身反应性外B细胞分泌自身反应性抗体。为了测试这一点,通过将生物素化的天然鼠胰岛素与链霉亲和素(Ins^{Nat})一起孵育来产生自身抗原复合物。重要的是,生物素化的鼠胰岛素具有生物活性,因为当以可溶形式注射时,其与未生物素化的内源性对应物类似地调节葡萄糖代谢(数据未显示)。向野生型小鼠注射10 μ g Ins^{Nat}复合物,并监测随着时间的推移血清中抗胰岛素抗体的存在。同时,通过监测血液和尿液中的葡萄糖水平来测试免疫接种小鼠是否出现类似糖尿病的葡萄糖代谢失调。在第7天检测到大量的抗胰岛素IgM,而在注射复合胰岛素后第14天检测到抗胰岛素IgG(图5a)。加强免疫接种(第21天)后于第28天检测到两种同种型。重要的是,小鼠显示出明显的糖尿病迹象,如通过以下测量的:从第7天开始增加(数据未显示),持续到第14天,并在第26天加强(第21天)后进一步增加的血糖浓度(图5c)。为了显示血糖水平升高取决于自身抗体的产生,将10 μ g Ins^{Nat}复合物注射到B细胞缺陷型小鼠(缺乏BCR成分Ig α 也称为CD79A的mb-1敲除小鼠)中并监测血糖(图5b、5c)。有趣的是,在B细胞缺陷型小鼠中没有观察到血糖升高,这表明B细胞的存在和自身抗体分泌对于野生型小鼠中观察到

的糖尿病症状的发展至关重要(图5c)。此外,注射复合Ins^{Nat}的野生型小鼠的血糖增加,伴随尿液中可检测到葡萄糖(图5d)。与糖尿病的发展一致,注射复合Ins^{Nat}的野生型小鼠的水消耗量显著增加(图5e)。由于糖尿病症状出乎意料的严重,在第27天处死小鼠并分析胰腺和脾脏。

[0543] 与对照小鼠相比,复合Ins^{Nat}免疫接种小鼠的胰腺中巨噬细胞、中性粒细胞和B细胞的募集量显著增加(图5f)。此外,Ins^{Nat}复合物免疫接种小鼠的IgG+巨噬细胞显示出天然胰岛素的结合(图5f)。因此,表明胰腺存在自身抗体介导的急性炎症过程。虽然FACS分析显示对照小鼠和用复合Ins^{Nat}免疫接种的小鼠之间的脾B细胞没有差异(图6),但ELISpot分析显示,在注射复合Ins^{Nat}的小鼠中,分泌抗胰岛素IgG的脾B细胞数量显著增加(图5g)。

[0544] 为了测试分泌的IgG是否与糖尿病症状有关,使用注射了复合Ins^{Nat}和对照免疫接种的小鼠血清进行了IgG下拉实验(图5h、5i)。由于IgG纯化预计会导致内源性胰岛素从血清胰岛素特异性IgG中解离(参见方法部分),因此我们在纯化后确定了总IgG中的抗胰岛素IgG。结果发现,从Ins^{Nat}小鼠中分离出的IgG高达40% (0.4mg/mg) 对胰岛素具有反应性,这表明直接血清IgG测量由于与内源性胰岛素结合而无法检测到整个胰岛素特异性IgG(比较图5a和5h)。为了测试分离的抗胰岛素IgG的致病性,将来自对照免疫接种的等量IgG静脉注射或将复合胰岛素注射到野生型动物体内并监测血糖。结果发现,注射含有2μg抗胰岛素IgG的总IgG足以诱导受体小鼠血糖升高,这表明注射复合胰岛素的小鼠的IgG会引起糖尿病症状(图5j)。

[0545] 这些数据表明,识别关键代谢激素的自身反应性B细胞既没有被缺失,也没有在功能上被沉默,而是存在于外周,并且当自身抗原的平衡转向多价形式时,可以诱导严重的自身免疫。

[0546] 胰岛素衍生表位诱导有害的抗胰岛素IgG应答:为了进一步证实上述发现,使用胰岛素A链衍生肽序列进行免疫接种实验,称为InsA(图3b),这是针对胰岛素的自身抗体应答中经常报道的表位[32]。来自HIV gp12033的病毒衍生肽被列为无关外来肽(病毒肽)。至于C肽,将选定的肽与载体KLH偶联以产生复合多价抗原(cInsA),然后将其单独或与可溶性肽(sInsA)组合用于免疫接种实验。随后,测量针对免疫原、InsA肽或天然胰岛素的抗体应答以确认有害自身抗体应答的诱导。结果发现,InsA诱导识别天然胰岛素的IgM和IgG自身抗体应答(图7a)。加强接种(第21天)一周后在第28天,单独的多价胰岛素衍生肽(sInsA:cInsA比率0:1)很容易诱导抗胰岛素IgG的产生,而添加可溶性肽(sInsA:cInsA比率100:1)导致第28天时这种自身反应性IgG显著减少(图7a)。重要的是,自身反应性抗胰岛素IgG的量很可能高于直接血清ELISA中检测到的量,因为与内源性胰岛素结合的抗胰岛素IgG逃脱了如上所述的检测(图5a,5i)。

[0547] 值得注意的是,可溶性InsA的存在导致第28天时加强的胰岛素特异性IgM产生,而单独用多价肽(sInsA:cInsA比率0:1)免疫接种的小鼠中,胰岛素特异性IgM产生略有减少,在第28天显示出可检测到的抗胰岛素IgM(图7a)。在用病毒肽免疫接种的小鼠中没有观察到这一点(图8a、8b)。与对照肽相比,胰岛素在生物体中的存在量相对较高,这表明内源性可溶性胰岛素的存在可能调节多价InsA的免疫应答,从而导致自身反应性加强IgM应答的增加。综合起来,数据表明多价与单价抗原的比率反映在加强免疫接种后第28天的抗原特异性IgG与IgM(γ/μ比率)抗体应答的比率(图7b)。

[0548] 与在可溶性肽(sInsA:cInsA比率100:1)存在下免疫接种小鼠的血清IgG相比,仅用多价肽(sInsA:cInsA比率0:1)免疫接种的小鼠的血清IgG很容易通过蛋白质印迹分析检测到天然胰岛素(图7c)。此外,使用cInsA免疫接种的小鼠的脾B细胞进行ELISpot分析,证实各小鼠中自身反应性IgG分泌细胞的存在增加(图7d)。

[0549] 为了确认增加的抗胰岛素IgG与有害的自身免疫应答相关,测试了用cInsA(sInsA:cInsA比率为0:1)免疫接种的小鼠是否表现出糖尿病迹象。结果发现,在第28天加强免疫接种(第21天)约一周后,这组小鼠在第27天至第33天表现出血糖和水摄入量增加(图7e和图10)。此外,还测试了用多价胰岛素肽(sInsA:cInsA,0:1)免疫接种的小鼠尿液中的葡萄糖浓度是否也增加。完全一致的是,自身反应性抗胰岛素IgG的增加导致尿葡萄糖浓度增加(图7f)。与自身反应性IgG相比,在加强免疫接种中自身反应性抗胰岛素IgM量增加的小鼠中没有观察到可检测到的自身免疫糖尿病迹象(图7e和7f)。

[0550] 通过FACS分析证实了免疫接种后第28天抗原特异性B细胞的存在(图9a和9b)。与对照相比,仅用复合肽(sInsA:cInsA比率0:1)免疫接种的小鼠显示胰腺中结合自身反应性IgG的巨噬细胞比率增加,如通过增加的InsA肽结合来确定(图9c)。在脾脏中观察到类似的结果(图10)。

[0551] 总之,数据表明,复合多价自身抗原比率的增加会导致野生型动物中自身反应性IgG量的增加以及随后的自我破坏性自身免疫应答。

[0552] 实例3:InsA肽免疫接种后保护性抗胰岛素IgM表达

[0553] 单价自身抗原通过保护性IgM诱导免疫耐受:除了自身反应性IgG的自我破坏性作用之外,前面提到的数据还表明自身反应性IgM在糖尿病中具有保护性作用。事实上,结果表明,与相应的抗胰岛素IgG相比,高抗胰岛素IgM可以防止InsA免疫接种小鼠的葡萄糖代谢失调和糖尿病(图7a-7f)。完全一致的是,胰岛素反应性IgG与IgM比率较低($\gamma/\mu < 0.1$)的小鼠在第28天时免受糖尿病影响(图7g)。第42天的第二次InsA加强免疫接种导致抗胰岛素IgM,但当包括单价肽(sInsA:cInsA比率100:1)时不导致IgG,并且相应的小鼠在第42天和第49天之间没有显示糖尿病迹象(图11a和11b)。

[0554] 为了直接测试自身反应性抗胰岛素IgM比率的增加是否可以抵消自身反应性抗胰岛素IgG诱导的葡萄糖代谢的负面影响,最初在单价InsA肽(sInsA:cInsA比率100:1)存在下免疫接种的小鼠在第51天时仅用多价抗原(sInsA:cInsA,0:1)攻击。有趣的是,从第14天到第28天诱导自身免疫糖尿病的治疗(图12,第7天与第14天)仅产生自身反应性抗胰岛素IgM应答,但在第51天到第59天既没有产生抗胰岛素IgG,也没有产生葡萄糖代谢失调(图13a-13c)。

[0555] 这些数据表明,用存在单价InsA肽(sInsA:cInsA比率100:1)的初次免疫接种诱导了针对用多价InsA(sInsA:cInsA比率0:1)的病原性免疫接种的耐受性。此外,研究结果表明,这种独特的耐受机制通过引发和维持保护性自身反应性IgM(pIgM)的产生,创造了一类新型的免疫应答。为了进一步测试这一点,监测抗胰岛素IgM浓度随时间的下降,然后监测抗胰岛素回忆应答(图7h)。发明人表明,抗胰岛素IgM持续数周,并且在第71天加强cInsA免疫接种仅诱导IgM,但不诱导IgG,没有任何葡萄糖代谢失调的迹象(图7h、7i和图14)。由于抗体对抗原亲和力的增加通常与记忆应答相关,因此进行ELISA实验来比较不同时间点胰岛素特异性抗体的亲和力。结果发现,与第7天收集的初级IgM相比,InsA加强免疫接种后产

生的IgM显示出更高的抗胰岛素亲和力(图7j)。此外,为了检查pIgM的保护性作用,从第0天开始每48小时用cInsA或cInsA免疫接种小鼠并静脉注射含有5 μ g pIgM的50 μ g纯化IgM(图15a,15b)。有趣的是,胰岛素特异性pIgM的存在减轻了自身免疫血糖异常,并完全预防了糖尿,正如在仅用cInsA免疫接种的小鼠中观察到的那样(图7k)。排除pIgM静脉注射中和了免疫原(cInsA,腹腔注射),进行抗载体-ELISA。正如所预期的,在第7天没有观察到抗KLH-IgM水平的差异(图15c)。

[0556] 由于胰岛素和特别是InsA肽在小鼠和人之间高度保守(图3b),因此数据不仅提出了B细胞耐受的新颖且动态的概念,而且还引入了一个基本动物模型,用于了解由人抗胰岛素抗体引发的自身免疫糖尿病。

[0557] 实例4:保护性记忆抗胰岛素IgM是单特异性的

[0558] 上述结果表明自身反应性初级IgM和PR-IgM之间存在意想不到的根本差异。事实上,初级抗胰岛素IgM诱导糖尿病症状,尽管其产生量比记忆PR-IgM低得多,记忆PR-IgM具有较高的胰岛素亲和力,但不诱导病理。为了直接测试自身反应记忆PR-IgM对自我破坏性自身免疫的保护性功能,从第0天开始每48小时对小鼠用cInsA单独免疫接种或用cInsA免疫接种与静脉注射含有5 μ g抗胰岛素记忆PR-IgM的50 μ g总IgM一起(图16a和16b)。有趣的是,与单独使用cInsA免疫接种的小鼠相比,胰岛素特异性PR-IgM的存在减轻了自身免疫血糖异常并在第7天完全预防了糖尿(图16b)。为了排除PR-IgM注射中和了注射的cInsA,我们进行了抗载体(KLH)ELISA,发现在第7天两组之间的抗KLH-IgM水平没有差异(图15C)。这些数据表明,记忆抗胰岛素PR-IgM可防止初级抗胰岛素IgM消耗胰岛素,从而防止糖尿病的发生。对自身反应性初级和记忆PR-IgM之间差异的一种解释可能是,初级IgM具有多反应性,并且可能由B1 B细胞产生,作为第一道免疫保护线。据推测,这种多反应性导致含有多种自身抗原的高分子量联合免疫复合物允许吞噬细胞消除,从而耗尽结合的胰岛素。相反,自身反应性记忆PR-IgM可能对自身抗原具有单特异性,并且因此可能在结合后释放自身抗原而不形成免疫复合物。为了测试这一点,分析了初级IgM与记忆PR-IgM相比的多反应性潜力。抗DNA ELISA(图16c)和使用HEp-2载玻片的间接免疫荧光(图16d)表明,与初级IgM相比,记忆PR-IgM不具有多反应性,而是特异性结合胰岛素(图16c和16d)。

[0559] 为了表明抗胰岛素IgM特异性地导致所观察到的效果,发明人使用来自InsA免疫接种小鼠的血清进行了胰岛素特异性下拉测定。正如针对胰岛素的蛋白质印迹分析所揭示的,下拉产生了纯胰岛素特异性IgM(图17)。我们使用纯化的初级抗胰岛素IgM或记忆抗胰岛素PR-IgM在HEp-2载玻片上进行抗DNA ELISA(图16e)和间接免疫荧光(图16f)。结果证实了以下发现:与初级IgM相比,纯化的抗胰岛素PR-IgM不具有多反应性并且特异性地与胰岛素结合(图16e和16f)。为了直接检验初级抗胰岛素IgM形成大的免疫复合物而PR-IgM不形成的假设,我们将抗胰岛素初级IgM或PR-IgM与胰岛素和DNA一起孵育,并使用尺寸排阻离心柱确定免疫复合物的形成。与PR-IgM相反,我们发现初级抗胰岛素IgM主要形成>104kD的大复合物(图16g)。为了证明纯化的初级抗胰岛素IgM是导致葡萄糖代谢失调的原因,我们静脉注射5 μ g纯化的抗胰岛素初级IgM或PR-IgM并监测血糖。与PR-IgM相反,我们观察到注射纯化的初级抗胰岛素IgM后血糖急剧升高(图16h)。有趣的是,与总初级IgM相比,注射纯化的抗胰岛素初级IgM后血糖增加更快(图16h)。

[0560] 总之,这些数据表明,增加对自身抗原的特异性对于自身反应性记忆PR-IgM在免

疫应答期间发挥保护作用非常重要(图18)。此外,诱导产生自身反应性PR-IgM很可能是B细胞耐受的关键步骤。

[0561] 实例5:免疫接种方案

[0562] 使用源自引起Covid-19的SARS-CoV-2冠状病毒的病原体特异性抗原测试了本发明的免疫接种概念对于疫苗设计的影响。在感染期间,SARS-CoV-2冠状病毒经由受体结合域(RBD)与宿主细胞表面的血管紧张素转换酶2(ACE2)结合。因此,触发阻断RBD/ACE2相互作用的抗体应答被认为是预防冠状病毒感染的关键。因此,发明人使用来自SARS-CoV-2的RBD来研究抗原形式在免疫接种期间免疫应答中的作用。

[0563] 结果发现,用复合RBD(cRBD)免疫接种(对于与链霉亲和素和生物素化RBD的复合比率为4:1。对于与1,2-亚苯基双马来酰亚胺复合,每100 μ g RBD至少20 μ g的1,2-PBM)与可溶性RBD(sRBD)相比,可诱导更强的IgG免疫应答。为了产生RBD,将编码六组氨酸标签版本的RBD的表达载体瞬时转染至HEK293-6E细胞中(Amanat,F.,等人,2020,Nature Medicine, 26(7),1033-1036)。转染后5天,通过镍基固定化金属亲和层析(TaKaRa)从上清液中纯化出可溶RBD。然而,抗体浓度不足以使用体外感染实验来中和病毒。因此,我们测试了在免疫接种前用sRBD预处理小鼠是否可以加强免疫应答。事实上,在免疫接种前两周用可溶性RBD预防治疗小鼠可大大增强免疫应答(图19)。重要的是,预处理小鼠的血清在体外表现出极高的预防SARS-CoV-2感染的能力。

[0564] 此外,结果发现免疫接种混合物组合中sRBD与cRBD的不同比率会导致免疫球蛋白同种型(即IgG与IgM)的不同比率,从而可以精确控制免疫接种后的免疫应答。

[0565] 实例6:IgD缺陷型小鼠中加速的初级免疫应答

[0566] 为了进一步研究IgD缺陷型小鼠免疫应答的动态,我们监测了早期抗体的产生。与WT小鼠相比,IgD缺陷型小鼠在免疫接种后第1天就已经显示出NP反应性IgM应答(图23A)。该应答在第3天进一步放大并在第7天达到峰值(图23B)。相比之下,WT小鼠在第1天没有观察到抗体应答。到第3天,WT小鼠表现出轻微的NP反应性IgM应答,该反应在第7天达到峰值,但仍略弱于IgD缺陷型小鼠中第7天的NP反应性IgM应答(图1A、1B)。为了进一步表征诱导抗体应答的特异性,我们进行了经典的自身反应测定,该测定包括HEp-2载玻片上的间接免疫荧光(IF)和抗双链DNA(dsDNA)的ELISA。这些实验表明,在IgD缺陷型小鼠的第1天至第7天或在WT小鼠的第7天检测到的初级IgM抗体是通过核结构识别确定的自身反应性(图23C、23D)。重要的是,与未免疫接种的小鼠相比,仅使用佐剂CpG的对照免疫接种显示没有诱导抗dsDNA抗体(图23C,数据未显示)。此外,为了排除CpG在自身反应性IgM产生中的作用,我们用对照免疫接种的血清制作了HEp-2载玻片。在单独使用PBS或CpG的对照免疫接种中,IgD缺陷型小鼠和WT小鼠均未显示出自身反应性IgM水平升高。

[0567] 总之,这些结果表明初级IgM应答是自身反应性的,并且IgD缺陷型允许快速初级免疫应答。

[0568] 实例7:IgD缺陷型小鼠中对持续的对自身抗原的初级免疫应答

[0569] 在测试半抗原特异性抗体应答后,我们研究了使用自身抗原时IgD缺陷型小鼠中自身反应性一抗的产生是否有所不同。为了避免使用人工携带表达特定BCR(识别转基因产物或内源结构)的单特异性B细胞的转基因小鼠,我们选择胰岛素相关自身抗原作为自身免疫疾病的生理相关系统(Amendt和Jumaa,正在修订中)。

[0570] 为此,我们使用胰岛素A链衍生肽(称为InsA)进行免疫接种实验,InsA是针对胰岛素的自身抗体应答中最丰富的表位。将所选肽共价偶联至载体KLH以产生复合多价抗原(InsA-KLH),然后将其用于免疫接种实验(图24A)。随后,我们监测了针对InsA肽和天然胰岛素的抗体应答,以确认有害自身抗体应答的诱导。我们发现InsA-KLH在免疫接种后第1天就已诱导识别天然胰岛素的IgM抗体应答(图24B)。WT小鼠在第1天没有表现出胰岛素反应性IgM。到第7天,WT小鼠表现出抗胰岛素IgM,然而,与IgD缺陷型小鼠相比,抗胰岛素IgM减少(图24B)。到第28天,在IgD缺陷型小鼠和WT小鼠中均检测到相当数量的胰岛素反应性IgM。然而,仅WT小鼠表现出胰岛素特异性IgG的显著增加(图24B,右图)。这种IgG是导致这些小鼠中检测到的血糖升高的原因。

[0571] 为了评估引发的抗胰岛素IgM的多反应性潜力,我们制作了HEp-2载玻片。数据显示抗胰岛素IgM在整个28天中保持多反应性(在第21天加强),而WT小鼠的抗胰岛素IgM不再是多反应性的(图24C)。重要的是,分别用1:100的InsA-KLH和可溶性InsA肽的混合物进行免疫接种导致第1天血糖高度升高,并且因此停止。

[0572] 总之,我们的数据表明,IgD缺陷型的B细胞会引发快速而强烈的初级免疫应答,与WT小鼠相比,该应答持续时间更长。因此,在IgD缺陷型小鼠中,向次级、成熟免疫应答的转变被延迟。有趣的是,成熟B细胞的标志物IgD是免疫应答从初级阶段到次级阶段的成熟所必需的。

[0573] 实例8:IgD缺陷型小鼠中亲和力成熟延迟与持续的自身免疫相关

[0574] 我们进行了ELISA以确定胰岛素特异性抗体与高价或低价抗原的结合效率。为此,我们使用单价和多价链霉亲和素以及生物素化的InsA肽来生成单价InsA(1)和多价InsA(4)链霉亲和素复合物。我们的实验表明,对于IgD缺陷型小鼠,初次(第7天)和二次(第28天)免疫接种之间胰岛素反应性IgM抗体的亲和力没有显著增加。然而,WT小鼠的胰岛素反应性IgM显示InsA(1)/InsA(4)比率明显增加,这是亲和力成熟的特征(图25A)。我们通过检查WT和IgD缺陷型小鼠不同天数胰岛素特异性IgM的直接结合亲和力证实了这些结果。干涉测定显示WT小鼠在第52天时已经达到高亲和力胰岛素-IgM,而IgD缺陷型小鼠在第72天晚些时候达到该亲和力水平(图25G)。有趣的是,IgD缺陷型小鼠和WT小鼠通过尿液中的葡萄糖含量和血糖升高检测到明显的糖尿病迹象。然而,与WT小鼠相比,IgD缺陷型小鼠的糖尿病症状在第1天就更加严重和明显(图25B、25C)。重要的是,WT小鼠中血糖的增加在重复加强免疫接种后逐渐下降,并且在第42天第二次加强免疫接种后不久,WT小鼠对InsA诱导的糖尿病产生抗性(图25C)。相反,IgD缺陷型小鼠在免疫接种后的整个第60天内表现出持续的糖尿病症状(图25C)。事实上,IgD缺陷型需要在第70天进行第三次加强才能产生对InsA诱导的糖尿病的抗性(图30)。

[0575] 为了证明二次加强免疫接种期间产生的高亲和力IgM负责控制InsA免疫接种诱导的糖尿病,我们在二次免疫接种后从WT小鼠中分离出胰岛素特异性IgM,并在用InsA-KLH免疫接种后不久将其注射到IgD缺陷型小鼠体内。结果显示分离的高亲和力IgM保护IgD缺陷型小鼠在第1天免于患糖尿病,因此我们将该IgM称为保护性IgM(PR-IgM)(图25E)。我们进行间接IF以确认亲和力成熟导致PR-IgM,其对胰岛素高度特异性而不结合其他自身抗原(图25F)。

[0576] 这些数据表明,IgD缺陷型小鼠中的亲和力成熟缺陷(图31)导致保护性高度特异

性IgM的产生不足,从而导致持续的自身免疫病患。

[0577] 实例9:免疫接种后IgD缺陷型B细胞的快速激活

[0578] 为了检查免疫接种后B细胞的早期变化,我们进行了FACS实验来分析InsA-KLH免疫接种后的淋巴器官分析。该分析揭示,与WT小鼠相比,免疫接种在第1天诱导IgD缺陷型小鼠中脾B细胞的显著扩增(图26A)。值得注意的是,IgD缺陷型小鼠中脾B细胞的扩增与细胞大小增加相关,如IgD缺陷型小鼠中的前向散射(FSC)所示(图26A)。完全一致的是,在用InsA-KLH免疫接种的IgD缺陷型小鼠后,相当一部分(>21%)B细胞表达激活标记物CD69。与仅用CpG对IgD缺陷型小鼠进行对照免疫接种类似,仅用InsA-KLH或CpG免疫接种的WT小鼠显示有限比率(约2%-5%)的CD69表达细胞(图5B)。

[0579] 进一步表征揭示,与免疫接种的WT对应物或来自对照免疫接种的IgD缺陷型小鼠相比,用InsA-KLH免疫接种的IgD缺陷型小鼠中CD23⁻/CD21⁻细胞群增加(图26C)。CD23⁻/CD21⁻对应于激活的B细胞(图32),其在WT中主要表达IgM BCR和中间量的IgD(图26D)。特别地,与对照相比,在第1天InsA-KLH免疫接种的IgD缺陷型小鼠中B细胞上的CD23表达大大下调(图26E)。这与表明B细胞激活后CD23下调的现有数据一致。

[0580] 因此,我们的结果表明,IgD缺陷型的B细胞在免疫接种后迅速激活,并且反应细胞是IgM BCR水平升高的CD23⁻/CD21⁻。

[0581] 实例10:CD23⁻/CD21⁻细胞分泌抗体

[0582] 我们最近的数据表明CD23⁻/CD21⁻细胞是抗体分泌细胞。因此,我们研究了免疫接种后第1天脾细胞的抗体分泌情况。ELISpot分析表明,当使用总脾细胞时,IgD缺陷型小鼠中抗体分泌细胞的比率略有增加(图27A)。然而,当在FACS分选CD23⁻/CD21⁻细胞或CD23⁺滤泡B细胞后进行ELISpot分析时,我们发现抗体分泌主要与CD23⁻/CD21⁻细胞相关(图27B)。InsA-KLH免疫接种的IgD缺陷型小鼠中CD23⁻/CD21⁻比率的增加与抗体分泌细胞比率的增加相关(图27B)。有趣的是,只有一小部分来自WT小鼠的滤泡CD23⁺B细胞发育成抗体分泌细胞,并且在第1天没有观察到免疫接种效果,而IgD缺陷型的滤泡CD23⁺B细胞显示抗体分泌细胞增加(图27C,27D)。

[0583] 有趣的是,腹膜腔中IgD缺陷型的B细胞在免疫接种后第1天进一步显示CD138⁺细胞增加,而WT对应物保持不变(图33)。

[0584] 总之,这些数据表明免疫接种导致IgD缺陷型小鼠一天内发育的CD23⁻/CD21⁻抗体分泌细胞增加。

[0585] 实例11:初级免疫应答具有有限的多反应性

[0586] 上述结果表明,无论使用何种抗原,初次免疫应答都是自身反应性的。事实上,初级抗NP以及初级抗胰岛素IgM在HEp-2载玻片中显示核染色,表明了多反应行为。完全一致的是,初级抗NP IgM也在ELISA实验中显示出抗dsDNA结合(图23D)。随后,我们测试了以下假设:初级IgM免疫应答是否可能总是诱导同一类自身反应性B细胞,这些细胞在自身抗原结合方面可能是无所不能的。为此,我们测试了抗NP初级免疫应答是否会因与胰岛素结合而诱发糖尿病症状。然而,尽管多反应性增加,但IgD缺陷型小鼠和WT小鼠在NP免疫接种过程中均未表现出血糖的任何变化(图28A、28B)。此外,InsA-KLH免疫接种的WT和IgD^{-/-}小鼠显示出预期的血糖增加(图28C)。通过抗-dsDNA ELISA确定,这些小鼠的初级IgM也显示出显著的多反应性(图28D)。然而,在NP免疫接种后,在IgD^{-/-}缺陷型或WT小鼠的血清中没有

观察到抗胰岛素结合增加(图28E,上)。反之亦然,InsA-KLH免疫接种小鼠没有表现出NP结合增加(图28E,下)。

[0587] 总之,这些数据表明,尽管IgD缺陷型小鼠和WT小鼠的初次IgM免疫应答对核结构和dsDNA的自身反应性增加,但它们不具有无限的多反应性。总之,初次IgM应答似乎具有广泛的多反应性和自身反应性,但仍对其同源抗原保持某种特异性。

[0588] 实例12化学交联的RBD引发的抗体具有高中和能力

[0589] RBD的化学交联可能为生产SARS-CoV 2疫苗提供一种实用的方法,因为重组RBD可以很容易地生产并用于典型疫苗接种中的初次和二次免疫接种。因此,我们测试了所得抗体是否可以预防病毒感染(方法描述于Hoffmann,M.等人,2021,Cell,184(9),2384-2393)。结果表明,用化学交联的RBD免疫接种的小鼠在使用假病毒制剂的中和测定中具有高能力(图35)。

[0590] 这些数据表明,RBD的化学交联允许简单地设计针对SARS-CoV 2的有效疫苗。

[0591] 实例13活化的抗原形成加强免疫应答的IgG复合物

[0592] 我们分析了RBD的序列,并鉴定了不参与分子内二硫键的单个SH基团。我们提出RBD或其他蛋白质的双马来酰亚胺治疗可能导致双马来酰亚胺的饱和结合,使得双马来酰亚胺分子不能交联另外的蛋白质(图36B,中)。然而,双马来酰亚胺治疗可能导致由双马来酰亚胺结合的单体RBD,其中仍然存在游离的马来酰亚胺基团(图36B,下)。

[0593] RBD*与每100 μ g RBD 20 μ g双马来酰亚胺复合,而RBD**表示与每100 μ g RBD 100 μ g复合(图36C)。

[0594] 使用50 μ g非复合天然RBD(nRBD,n=3)、50 μ g与10 μ g双马来酰亚胺复合的RBD(RBD*,n=3)或50 μ g与10 μ g双马来酰亚胺复合的RBD,在25 μ g多克隆鼠IgG(RBD*IgG)存在的情况下在WT C57BL6/J小鼠中进行免疫接种。在所有条件下均使用50 μ g CpG-ODN#1826作为佐剂。使用IgM或IgA同种型代替IgG来用RBD*IgM和RBD*IgA进行免疫接种。初次免疫后21天,用相同的免疫接种混合物对小鼠进行加强免疫。第28天收集血清用于分析。(图36D)。

[0595] 对用50 μ g非复合天然RBD+CpG-ODN(nRBD,n=3)、50 μ g与10 μ g双马来酰亚胺+CpG-ODN复合的RBD(RBD*,n=3)或50 μ g与10 μ g双马来酰亚胺复合的RBD(存在25 μ g鼠IgG但不存在CpG-ODN的情况下)(RBD*IgG,n=2)免疫接种WT小鼠。

[0596] 这导致激活的RBD可以在体外或体内与其他蛋白质进行生物缀合。重要的是,增加双马来酰亚胺的量导致单体RBD的减少,这表明更多的双马来酰亚胺导致更多的蛋白质复合物(图36C)。为了测试形成异质复合物的潜力,同时研究免疫球蛋白在随机形成的复合物中的作用,我们在交联反应中包括了IgM、IgA和IgG。

[0597] 有趣的是,结果表明,虽然IgM和IgA未能加强免疫应答,但RBD和IgG的交联导致RBD特异性免疫应答的显著增强(图36D)。重要的是,在终止双马来酰亚胺介导的交联后添加IgG并不会加强免疫应答,这表明双马来酰亚胺介导的交联对于IgG介导的增强很重要。

[0598] IgG观察到的增强促使我们测试IgG是否可以作为佐剂替代常规佐剂(诸如明矾或CpG)。为此,我们比较了在CpG或IgG作为佐剂存在的情况下注射复合RBD产生的免疫应答。结果表明,在缺乏激活TLR的CpG或明矾等常规佐剂的情况下,含有免疫复合物的IgG能够诱导加强的抗体应答。总之,数据表明,通过在体外交联IgG和特定抗原,或在体外与含有两个反应性基团的双功能交联剂一起孵育后注射抗原,在体内产生含有IgG的免疫复合物。此类

激活的抗原代表了开发和生产有效疫苗的简单而有效的方法。

[0599] 实例14

[0600] 在体外用半胱氨酸处理双马来酰亚胺交联的免疫复合物会导致仍然可用的反应性马来酰亚胺基团的淬灭和抗原激活的逆转,从而减少抗体的产生(图34)。为了淬灭,将1 μ l新鲜制备的2M L-半胱氨酸溶液(Sigma-L-半胱氨酸BioUltra, $\geq 98.5\%$ 30089-25G)添加到100 μ g (150 μ l体积)激活的RBD中,并在室温下孵育过夜。为了去除未结合的半胱氨酸和马来酰亚胺,在4 $^{\circ}$ C下持续搅拌下通过1x PBS透析来澄清样品(Thermo Fisher Scientific Slide-A-LyzerTM 10K MWC0 66381)。

[0601] 数据显示,马来酰亚胺(RBD**)的增加会导致抗体应答增加,并且用半胱氨酸(RBD**C)淬灭马来酰亚胺处理的抗原会显著降低抗体应答。这表明马来酰亚胺治疗导致了活化抗原的产生,该抗原能够在体内产生复合物,并且这种能力对于免疫应答很重要。

[0602] 因此,通过使其与自身抗原上的SH基团反应来激活抗原,从而放大免疫应答。在抗原激活中包括总IgG会导致模拟免疫复合物的蛋白质复合物的生成,从而诱导有效的抗体应答。

[0603] 实例15

[0604] 通过生物素化并随后与链霉亲和素(SAV)一起孵育生成抗原(Ag)复合物。复合抗原诱导抗体应答。多价取决于每个分子的生物素数量。多个生物素基团允许多个SAV结合和更高的分子复合物。与SAV交联可产生更高的分子复合物和有效的免疫应答(图34)。

[0605] 实例16:抗胰岛素IgG调节血糖浓度

[0606] 我们注意到从野生型(WT)小鼠中分离的大量总IgG对胰岛素具有反应性(图37A和37B)。为了证实这些数据,我们进行了ELISpot测定并发现分泌抗胰岛素IgG的B细胞存在于WT小鼠的脾脏中(图37C)。当我们测量不能产生抗体的WT和B细胞缺陷型小鼠的血糖浓度时,我们发现了令人惊奇的差异。出乎意料的是,与WT对照相比,B细胞缺陷型小鼠表现出异常降低的血糖水平(图37D)。

[0607] 为了测试这种异常减少是否是由抗体缺陷引起的,我们将来自WT小鼠的总IgG或相同总IgG的抗胰岛素IgG耗尽对照静脉注射到B细胞缺陷型小鼠中。我们发现血糖浓度随着总鼠IgG的增加而增加,但不随着抗胰岛素IgG耗尽对照的增加而增加(图37E)。为了测试稳态血糖降低对健康的影响,我们进行了线悬挂测试来评估运动功能,并发现B细胞缺陷型小鼠与WT对照组相比,线悬挂时间显著减少。重要的是,静脉注射总鼠IgG后,这种线悬挂时间的缺陷型得到恢复(图37F)。此外,B细胞缺陷型小鼠在旋转训练后也表现出血糖水平失调。

[0608] 由于来自健康供体的总IgG制剂通常用作静脉注射免疫球蛋白(IVIg)注射剂来治疗免疫缺陷,因此我们测试了这些制剂中是否存在抗胰岛素IgG。所有制剂均含有大量的抗胰岛素IgG。然而,如果原产国是美国,则抗胰岛素IgG浓度似乎会增加。由于胰岛素在人与小鼠之间高度保守,因此我们将人IVIg注射到B细胞缺陷型小鼠中并检测到胰岛素浓度降低(图37G)。此外,向WT小鼠注射50 μ g人IVIg导致血糖升高,并且这种效果需要抗胰岛素IgG,因为人IVIg中抗胰岛素IgG的消耗防止了IVIg诱导的血糖升高(图37H)。

[0609] 为了测试IVIg注射是否在患有抗体缺乏的人患者中显示出相似的结果,我们监测了IVIg注射前后的血糖。与B细胞缺陷型小鼠类似,抗体缺陷型患者与健康供体相比,血糖

浓度降低。重要的是,注射IVIg后血糖浓度增加并达到正常水平(图37I)。此外,显示接受IVIg的免疫缺陷型患者的血清胰岛素水平降低。

[0610] 为了证明IVIg中存在的抗胰岛素IgG对胰岛素具有特异性,我们经由生物膜干涉测量法(BLI)确定了亲和力。 10^{-11} 的解离常数表明抗-IgG对胰岛素具有高度特异性(图37J)。

[0611] 这些数据表明健康个体中存在抗胰岛素IgG,并且可能是调节血糖浓度所必需的。

[0612] 实例17:抗胰岛素IgM对血糖的调节

[0613] 为了进一步证实我们关于健康个体中存在抗胰岛素抗体的发现,我们评估了不同年龄组血液中的抗胰岛素IgG和IgM。我们发现年轻人和老年人的抗胰岛素IgG相似,而男性和女性的抗胰岛素IgM似乎随着年龄的增长而下降(图38A)。有趣的是,人抗胰岛素IgM可识别胰岛素上的多个表位。

[0614] 与高特异性相一致的是,在HEp-2细胞的间接免疫荧光测定(IIFA)中,抗胰岛素IgG未显示与任何细胞结构结合,IIFA是检测抗核抗体的常用方法。然而,抗胰岛素IgM由两个级分组成,可以根据其对胰岛素的亲和力进行生化分离。与需要酸性条件($\text{pH}=2.8$)进行洗脱的高亲和力抗胰岛素IgM相比,低亲和力抗胰岛素IgM在较高 pH (5)下从胰岛素柱洗脱(图38B、38C)。低亲和力IgM显示多反应性,如通过IIFA中与核结构的结合和ELISA中dsDNA结合检测到的,而高亲和力IgM在这些测定中实际上是阴性的(图38D、38E)。此外,我们通过进行BLI测定证实了亲和力的差异,并发现高亲和力和低亲和力IgM分别具有 10^{-10} 和 10^{-7} 的解离常数(图38F)。为了测试不同IgM级分对葡萄糖代谢的影响,我们向WT小鼠注射了等量的胰岛素反应性IgM高和IgM低。在接受IgM低的小鼠中注射后两小时内观察到血糖增加,而IgM高没有显著改变血糖水平(图38G)。此外,我们还测试了IgM高在可能导致低血糖的胰岛素浓度异常升高的条件下是否发挥调节作用。为此,我们注射了 $0.1\mu\text{g}$ 胰岛素与IgM高或非特异性IgM同种型对照的组合。引人注目的是,抗胰岛素IgM高(而非IgM同种型对照)的存在阻止了胰岛素注射后立即发生的血糖急剧下降(图38H)。为了进一步测试IgM高在保护胰岛素免受IgG介导的降解中的调节作用,我们将抗胰岛素IgM高与从IVIg制剂中纯化的抗胰岛素IgG合并。数据显示抗胰岛素IgM高充当PR-IgM,防止IgG介导的胰岛素中和,从而导致血糖水平增加(图38I)。这些数据表明,抗胰岛素IgM高对于调节葡萄糖代谢非常重要,这是通过保护胰岛素免受IgG介导的中和并通过结合过量的胰岛素从而防止胰岛素浓度急剧下降实现的。胰岛素反应性IgM随着年龄的增长而减少(图37A),促使我们测试抗胰岛素IgM高或IgM低是否受到这种减少的影响。我们确定了年轻和老年健康供体中抗胰岛素IgM高或IgM低的量,并发现抗胰岛素IgM高的比率随着年龄的增长而增加(图38J)。

[0615] 总之,这些数据表明葡萄糖代谢受到不同类别的抗体的调节,并且抗胰岛素IgM高充当PR-IgM,其通过调节胰岛素稳态来调节葡萄糖代谢,这似乎随着年龄的增长而尤为重要。

[0616] 实例18:通过胰岛素复合物诱导抗胰岛素抗体

[0617] 为了研究复合自身抗原是否能够独立于任何佐剂诱导自身反应性抗体应答,我们将胰岛素与典型的同型双功能交联剂1,2-亚苯基双马来酰亚胺一起孵育,该交联剂与蛋白质中的游离巯基共价结合,从而交联感兴趣的蛋白(图39A)。重要的是,据报道含巯基的药物可诱导抗胰岛素自身抗体。此外,增加的胰腺活性和升高的胰岛素产量导致胰岛素肽之

间二硫键的异常形成,这可能产生异常的胰岛素形式,其在氧化应激条件下更容易发生巯基介导的交联,从而形成复合物。在SDS page中测试胰岛素与1,2-亚苯基-双马来酰亚胺的同双功能交联,并且使用排除单体和二聚胰岛素的尺寸排阻旋转柱纯化交联的胰岛素(图39B)。将胰岛素复合物透析并注射到WT小鼠中,每只小鼠5 μ g,无需任何另外的佐剂。作为对照,我们使用CpG作为佐剂和链霉亲和素作为外来载体进行典型的免疫接种。我们发现,与免疫接种相似,胰岛素复合物在治疗第7天导致血糖和抗胰岛素IgM增加(图39C、39D)。此外,在第14天和第26天通过ELISA可检测到胰岛素反应性IgG。在第37天重复注射胰岛素复合物导致葡萄糖代谢的进一步失调(图39E)。因此,我们在第38天(注射胰岛素复合物一天后)注射抗胰岛素IgM高。我们发现抗胰岛素IgM高能够预防注射胰岛素复合物引起的血糖失调(图39E)。

[0618] 此外,我们发现抗胰岛素IgM高可预防胰腺炎症和损伤,如胰腺中巨噬细胞(CD11b+/LY6G+)和中性粒细胞(LY6G+)浸润的减少以及血液中血清胰脂肪酶的减少所示(图39F、39G)。

[0619] 作为抗胰岛素IgM高与抗胰岛素IgM低相比的保护作用机制,我们提出后者的多反应性(也与dsDNA结合)诱导可被巨噬细胞吞噬的免疫复合物的形成,而抗胰岛素IgM高对胰岛素具有高度特异性,因此不会形成容易被巨噬细胞吞噬的大型免疫复合物。为了测试这一点,我们在基因组dsDNA存在的情况下将抗胰岛素IgM高或抗胰岛素IgM低与胰岛素一起孵育(图39H)。我们发现与抗胰岛素IgM高相比,抗胰岛素IgM低的结合/吞噬作用增加(图39)。此外,IgM高能够保护胰岛素免于降解,因为与抗胰岛素IgM高抗体相比,含有抗胰岛素IgM低的上清液中胰岛素的下降更大。

[0620] 这些数据表明,抗胰岛素抗体可以在激活胰岛素复合物形成的条件下产生,从而导致葡萄糖代谢失调,而这种失调可以通过充当PR-IgM的抗胰岛素IgM高来抵消。

[0621] 实例19重组抗胰岛素IgM能够调节血糖

[0622] 上述结果表明,胰岛素特异性PR-IgM可能具有巨大的治疗意义,因为它可以调节胰岛素稳态,并可能预防胰腺功能障碍,这两者对于正常生理和预防糖尿病都至关重要。根据我们的数据,如果抗胰岛素IgM对胰岛素具有高亲和力并且对自身抗原(诸如dsDNA或IIFA中的核结构)不具有反应性,则它可以充当PR-IgM。我们假设人胰岛素特异性IgG抗体可以通过交换恒定区转化为胰岛素特异性PR-IgM。

[0623] 因此,我们克隆并表达了已公开的人胰岛素特异性抗体(Ikematsu,H.等人,1994, J. Immunol. 152, 1430-1441)作为IgG1(抗胰岛素IgGrec)和IgM(抗胰岛素IgMrec)(图40A)。为了测试我们体外产生的抗体的质量,我们通过PNGaseF处理评估了它们的糖基化,与未经治疗的对照相比,其分子量降低,这表明糖基化具有功能性。我们确定IgG和IgM的亲和力均为 10^{-9} (图40B)。与总人血清IgM相比,在ELISA中几乎没有观察到dsDNA结合,并且在IIFA中没有观察到核染色(图40C、40D)。此外,我们还测试了单体抗胰岛素IgM是否能够保护胰岛素免于降解。抗胰岛素IgG导致血糖升高,当存在单体抗胰岛素IgM时,血糖升高被消除(图40E)。

[0624] 为了测试所得的重组人抗胰岛素IgMrec是否具有保护性调节性功能,我们将其与胰岛素共同注射,并发现抗胰岛素IgMrec防止过量胰岛素引起的葡萄糖浓度急剧下降(图40F)。此外,抗胰岛素IgMrec保护胰岛素免受抗胰岛素IgGrec介导的中和,因为它防止抗胰

胰岛素IgGrec诱导的血糖增加(图40G)。此外,抗胰岛素IgMrec阻止葡萄糖漏入尿液中(图40H)。

[0625] 这些数据表明,以IgM形式表达高亲和力胰岛素特异性抗体可调节胰岛素稳态,防止血糖浓度失调,并为治疗胰岛素相关疾病和病患提供新策略。

[0626] 材料和方法

[0627] 用于实例1-15的小鼠

[0628] 对8-30周龄的C57BL/6小鼠和B细胞缺陷型小鼠使用13-50 μ g抗原与50 μ g CpG-ODN1826(Biomers)于1x PBS中的混合物进行腹腔注射免疫接种。对照免疫接种(CI)小鼠接受PBS和CpG-ODN1826(50 μ g/小鼠)。天然生物素化鼠胰岛素购自BioEagle。

[0629] 用于实例16-19的小鼠

[0630] 对8-15周龄雌性C57BL/6小鼠和mb1小鼠45使用10 μ g抗原(c胰岛素或胰岛素-bio:SAV)于1x PBS中的混合物进行腹腔(i.p.)注射。对照注射(CI)小鼠接受总体积为100 μ L/小鼠的PBS。动物实验是根据德国图宾根地区委员会的动物测试许可证1484进行的。本研究中使用的所有小鼠或是在乌尔姆大学的动物设施中在无特定病原体的条件下繁殖和饲养的,或是在6周龄时从Jackson公司获得。所有动物实验均按照德国法律的指导进行,并得到乌尔姆大学动物护理和委员会以及当地政府的批准。

[0631] 肽和免疫原

[0632] 将C-肽肽(RoyoBiotech,上海)、胰岛素和病毒衍生肽(SEQ ID NO:43;SEQ ID NO:44)(Peptides&Elephants,柏林)根据其水溶性溶解在纯水、1%DMSO或1%二甲基甲酰胺(DMF)。将病毒衍生的肽(SEQ ID NO:43;SEQ ID NO:44)分别与生物素或KLH偶联。购买1mg的量并溶解在1ml的体积中。使用10至50 μ g KLH偶联肽经由腹腔注射对小鼠进行免疫接种。为了将肽与匙孔血蓝蛋白(KLH)共价偶联,添加了N末端半胱氨酸。通过在N末端添加生物素来将肽与链霉亲和素(SAV,ThermoScientific)偶联。将C末端保留有OH基团,以便更好地处理。将胰岛素A链衍生肽(InsA)(Peptides&Elephants,柏林)根据其在水中的溶解度进行溶解。与KLH(NP(30)KLH)或BSA(NP(15)BSA)偶联的4-羟基-3-硝基苯乙酰基购自Biosearch Technologies。

[0633] 天然胰岛素和InsA肽的交联

[0634] 将天然人胰岛素(Merck)在PBS中预稀释至1mg/mL。使用10 μ g/mL的1,2-苯二胺双马来酰亚胺(Santa Cruz,13118-04-2)进行化学硫醇交联,并且然后通过使用10kD截断旋转柱(Abcam,ab93349)去除。纯化的胰岛素复合物(c胰岛素)用于腹腔注射,每只小鼠10 μ g,总体积100 μ L。

[0635] 流式细胞仪

[0636] 用多克隆大鼠IgG-UNLB(2,4G2;BD)封闭细胞悬浮液的Fc受体,并根据标准方案进行染色。使用链霉亲和素Qdot605(Molecular Probes;Invitrogen)检测生物素缀合的肽/抗体。通过使用Fixable Viability Dye eFluor780(eBioscienc)将活细胞与死细胞区分开。在Cato II流式细胞仪(BD)上采集细胞。如果没有另外说明,图中的数字表示各个门控中的百分比,而直方图中的数字表示平均荧光强度(MFI)。

[0637] 酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0638] 将96孔板(Nunc,Maxisorp)包被有天然胰岛素(Sigma-Aldrich,目录号91077C)、

链霉亲和素 (ThermoScientific, 目录号21125) 或小牛胸腺DNA (ThermoScientific, 目录号15633019), 含10 μ g/mL或抗IgM、抗IgG抗体 (SouthernBiotech)。将生物素化肽 (2, 5 μ g/mL) 加载到SAV板上, 并在1%BSA封闭缓冲液 (Thermo Fisher) 中进行封闭。使用1:3IgM或IgG抗体 (SouthernBiotech) 的系列稀释液作为标准品。相对浓度以任意单位 (AU) 表示, 分别经由通过碱性磷酸酶 (AP) 标记的抗IgM/抗IgG (SouthernBiotech) 检测来确定。添加二乙醇胺缓冲液中的对硝基苯磷酸酯 (pNPP; Genaxxon), 并使用Multiskan FC ELISA酶标仪 (Thermo Scientific) 于405nm处采集数据。所有样品均重复测量。

[0639] 为了分析亲和力成熟, 将用肽 (1) 或肽 (4) 包被的板的结果通过用肽 (1) 除以肽 (4) 来计算。因此, 结果在图中以相对单位 [RU] 表示。

[0640] 酶联免疫斑点测定 (ELISpot)

[0641] 总脾细胞以300,000个细胞/孔一式三份进行测量。ELISpot板预包被有天然胰岛素 (Sigma-Aldrich, 目录号91077C) 或C-肽 (RoyoBiotech)。将细胞在37 $^{\circ}$ C孵育12-24小时后, 经由抗IgM-bio:SAV-AP或抗IgG-bio:SAV-AP (Mabtech) 检测抗原特异性IgM或IgG。板的处理和抗体浓度是根据制造商的建议进行的。

[0642] HEp-2载玻片和荧光显微镜

[0643] 使用HEp-2载玻片 (EUROIMMUN, F191108VA) 用于评估血清IgM对核抗原 (ANA) 的反应性。将免疫接种后第7天和第85天的胰岛素A肽免疫接种小鼠的血清稀释为等浓度的IgM (两个免疫接种样品中的抗胰岛素IgM均约为300ng/mL), 并涂在HEp-2载玻片上。使用抗IgM-FITC (eBioscience, 目录号11-5790-81) 以检测ANA-IgM。使用荧光显微镜Axioskop 2 (Zeiss) 和DMi8软件 (Leica) 分析染色的HEp-2载玻片。

[0644] 血糖水平监测

[0645] 使用Combur 10M试纸 (Roche Diagnostics, Mannheim) 评估尿糖水平。在日常小鼠处理期间使用无菌试纸, 并将测试后显示的颜色与制造商的葡萄糖水平标准 (mmol/L) 进行比较。使用AccuCheck (Roche Diagnostics, Mannheim) 血糖监测仪以测量小鼠的血糖水平。从任食饲养的小鼠的尾静脉中采血并转移到无菌试纸上。在图中所示的天数中测量每组每只小鼠的葡萄糖水平 (mmol/L)。用同窝仔猪进行对照免疫接种, 并在一天中的相似时间进行测量。

[0646] SDS page、考马斯和蛋白质印迹

[0647] 处死后立即取出器官, 并在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂 (50mM TrisHCl, pH 7.4, 1%NP-40, 0.25%脱氧胆酸钠, 150mM NaCl, 1mM EDTA (pH 8), 1mM正钠钒酸盐、1mM NaF) 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma-Aldrich) 的RIPA缓冲液中裂解。将样品在10%-20% SDS聚丙烯酰胺凝胶上分离, 然后印迹到PVDF膜 (Millipore) 上或与考马斯 (考马斯亮蓝R-250, ThermoFisher) 一起孵育45分钟并且随后脱色。随后, 将膜在室温下在5% BSA PBS中封闭一小时, 同时不断搅拌。将一抗在5% BSA PBS (BIOMOL Research Laboratories) 中稀释。将二抗在5% BSAPBS中稀释。薄膜的开发和数据的记录是用光学系统Fusion SL (Vilber) 完成的。

[0648] 总血清免疫球蛋白的下拉

[0649] 安乐死后立即采集免疫接种小鼠的血清并纯化IgM或IgG中任一者。通过血清的重复冻融循环和洗脱52期间的pH变化可去除与抗体结合的抗原。对于IgG, 根据制造商方案使

用蛋白G琼脂糖珠 (Thermo Fisher), 并在10倍样品体积的1x PBS中透析过夜。对于IgM, 根据制造商方案使用HiTrap IgM柱 (GE Healthcare, Sigma-Aldrich), 并在10倍样品体积的1x PBS中透析过夜。经由SDS page和考马斯对分离的免疫球蛋白进行质量检查, 并经由ELISA确定胰岛素特异性免疫球蛋白的量。最后, 静脉注射20-50 μ g (1-10 μ g胰岛素特异性Ig)。

[0650] 胰岛素特异性血清免疫球蛋白的分离

[0651] 安乐死后立即采集InsA和对照免疫接种小鼠的血清, 并准备用于胰岛素特异性免疫球蛋白的分离。向链霉亲和素珠柱 (Thermo-Scientific, 目录号: 21115) 加载10 μ g生物胰岛素 (BioEagle)。将血清在室温下孵育90分钟, 以确保胰岛素特异性抗体与珠子的结合。使用制造商的洗脱和中和溶液通过pH变化来分离胰岛素抗体。经由考马斯和蛋白质印迹分析使用抗IgM重链 (Thermo-Scientific, 目录号62-6820) 和抗IgG重链 (Cell Signaling Technologies, 目录号7076) 抗体检测分离的免疫球蛋白的质量。为了进一步的体内实验, 对分离的抗体进行透析。

[0652] 干涉测量法

[0653] 干涉测定 (BLItz装置, ForteBio) 用于确定蛋白质-蛋白质相互作用的亲和力。在这里, 我们使用胰岛素特异性IgM (参见胰岛素特异性免疫球蛋白的分离) 和胰岛素生物 (ThermoFisher) 作为靶标。将靶标加载到链霉亲和素生物传感器 (ForteBio) 上。IgM与胰岛素的结合亲和力以nm为单位获得。随后, 计算出的亲和力值 (K_a) 用于确定解离常数 (K_d): $K_d = 1/K_a$ 。使用以下方案: 30秒基线、30秒加载、30秒基线、240秒缔合、60秒解离。为了缓冲样品、靶标和探针, 使用了制造商的样品缓冲液 (ForteBio)。

[0654] 用于小鼠炎症细胞因子的流式细胞术珠阵列

[0655] 为了确定用胰岛素c免疫接种或对照免疫接种的小鼠的胰腺上清液炎症细胞因子水平, 我们进行了BD细胞术珠阵列 (Mouse Inflammation, BD Biosciences, 目录号: 552364, 批号: 005197)。根据制造商的方案稀释样品。将IL-12p70、TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-10和IL-6APC标记的珠子与PE标记的检测试剂一起使用。该测定在FACS Canto II上测量并经由FlowJo10软件进行分析。相对细胞因子水平与PE通道内每个细胞因子珠的平均荧光强度相关。

[0656] 生物膜干涉测量法 (BLI)

[0657] 干涉测定 (BLItz装置, ForteBio) 用于确定蛋白质-蛋白质相互作用的亲和力 (Kumaraswamy, S. & Tobias, R. Label-free kinetic analysis of an antibody-antigen interaction using biolayer interferometry. in Protein-Protein Interactions: Methods and Applications: 第二版第1278卷165-182 (Springer New York, 2015))。在这里, 我们使用胰岛素特异性IgM (参见胰岛素特异性免疫球蛋白的分离) 和胰岛素生物 (ThermoFisher) 作为靶标。将靶标加载到链霉亲和素生物传感器 (ForteBio) 上。IgM与胰岛素的结合亲和力以nm为单位获得。随后, 计算出的亲和力值 (K_a) 用于确定解离常数 (K_d): $K_d = 1/K_a$ 。使用以下方案: 30秒基线、30秒加载、30秒基线、240秒缔合、120秒解离。为了缓冲样品、靶标和探针, 使用了制造商的样品缓冲液 (ForteBio)。

[0658] 线悬挂测试

[0659] 线性线悬挂测试用于评估小鼠的运动强度和功能。将单独小鼠放在笼子上方36厘

米高的水平线上,随后小鼠尝试利用爪子和肌肉力量停留在线上。记录每只小鼠停留在线上的时间(秒)能力。设置的最大持续时间为240秒。每只小鼠连续进行三次测试。根据测量数据计算平均值。在测试之前和之后确定血糖值。

[0660] 统计分析

[0661] 使用GraphPad Prism(版本6.0h)软件创建图表并进行统计分析。单个重复或小鼠的数量(n)在图或图例中注明。P值是通过相应图例中所述的检验计算的。使用Welch校正的学生t检验来比较一项实验中的两组。P值>0.05被认为具有统计显著性(n.s.=不显著;*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001,****p<0.0001)。

[0662] 参考文献

[0663] 1.Goodnow,C.C.等人Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice.Nature 334,676-682(1988)。

[0664] 2.Nemazee,D.&Buerki,K.Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86,8039-8043(1989)。

[0665] 3.Lahtela,J.T.,Knip,M.,Paul,R.,Antonen,J.&Salmi,J.Severe antibody-mediated human insulin resistance:Successful treatment with the insulin analog lispro:Acase report.Diabetes Care 20,71-73(1997)。

[0666] 4.Benschop,R.J.,Brandl,E.,Chan,A.C.&Cambier,J.C.Unique Signaling Properties of B Cell Antigen Receptor in Mature and Immature B Cells: Implications for Tolerance and Activation.J.Immunol.167,4172-4179(2001)。

[0667] 5.Hartley,S.B.等人Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens.Nature 353, 765-769(1991)。

[0668] 6.Nossal,G.J.V.&Pike,B.L.Mechanisms of clonal abortion tolerogenesis: I.Response of immature hapten-specific B lymphocytes*.J.Exp.Med.148,1161-1170 (1978)。

[0669] 7.Wardemann,H.等人Predominant autoantibody production by early human B cell precursors.Science.2003年9月5日;301(5638):1374-7

[0670] 8.Gay,D.,Saunders,T.,Camper,S.&Weigert,M.Receptor editing:An approach by autoreactive B cells to escape tolerance.J.Exp.Med.177,999-1008(1993)。

[0671] 9.Tiegs,S.L.,Russell,D.M.&Nemazee,D.Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells.J.Exp.Med.177,1009-1020(1993)。

[0672] 10.Zhang,Z.等人Contribution of VH gene replacement to the primary B cell repertoire.Immunity 19,21-31(2003)。

[0673] 11.Nossal,G.J.V.&Pike,B.L.Clonal anergy:Persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.77,1602-1606(1980)。

[0674] 12.Brink,R.等人Immunoglobulin M and D Antigen Receptors are Both Capable of Mediating B Lymphocyte Activation,Deletion,or Anergy After

Interaction with Specific Antigen.J.Exp.Med.176,991-1005(1992) .

[0675] 13.O'Neill,S.K.等人Monophosphorylation of CD79a and CD79b ITAM motifs initiates a SHIP-1 phosphatase-mediated inhibitory signaling cascade required for B cell anergy.Immunity 35,746-756(2011) .

[0676] 14.Lobo,P.I.Role of natural autoantibodies and natural IgM anti-leucocyte autoantibodies in health and disease.Frontiers in Immunology第7卷(2016) .

[0677] 15.Grönwall,C.,Vas,J.&Silverman,G.J.Protective roles of natural IgM antibodies.Frontiers in Immunology第3卷(2012) .

[0678] 16.Hannum,L.G.,Ni,D.,Haberman,A.M.,Weigert,M.G.&Shlomchik,M.J.A disease-related rheumatoid factor autoantibody is not tolerized in a normal mouse:Implications for the origins of autoantibodies in autoimmune disease.J.Exp.Med.184,1269-1278(1996) .

[0679] 17.Wan,X.等人Pancreatic islets communicate with lymphoid tissues via exocytosis of insulin peptides.Nature 560,107-111(2018) .

[0680] 18.Goodnow,C.C.,Crosbie,J.,Jorgensen,H.,Brink,R.A.&Basten,A.Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes.Nature 342,385-391(1989) .

[0681] 19.Nemazee,D.A.&Bürki,K.Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes.Nature 337,562-566(1989) .

[0682] 20.Shlomchik,M.J.Sites and Stages of Autoreactive B Cell Activation and Regulation.Immunity 第28卷18-28(2008) .

[0683] 21.Cooper,G.S.&Stroehla,B.C.The epidemiology of autoimmune diseases.Autoimmunity Reviews第2卷119-125(2003) .

[0684] 22.Suurmond,J.&Diamond,B.Autoantibodies in systemic autoimmune diseases:Specificity and pathogenicity.J.Clin.Invest.125,2194-2202(2015) .

[0685] 23.Übelhart,R.等人Responsiveness of B cells is regulated by the hinge region of IgD.Nat.Immunol.16,534-543(2015) .

[0686] 24.Setz,C.S.等人Pten controls B-cell responsiveness and germinal center reaction by regulating the expression of IgD BCR.EMBO J.38,(2019) .

[0687] 25.Nitschke,L.,Kosco,M.H.,Kohler,G.&Lamers,M.C.Immunoglobulin D-deficient mice can mount normal immune responses to thymus-independent and-dependent antigens.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.90,1887-1891(1993) .

[0688] 26.Kim,Y.M.等人Monovalent ligation of the B cell receptor induces receptor activation but fails to promote antigen presentation.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.103,3327-3332(2006) .

[0689] 27.Yang,J.&Reth,M.Oligomeric organization of the B-cell antigen receptor on resting cells.Nature 467,465-469(2010) .

- [0690] 28.Maity,P.C.等人B cell antigen receptors of the IgM and IgD classes are clustered in different protein islands that are altered during B cell activation.Sci.Signal.8,(2015) .
- [0691] 29.Gasparrini,F.等人Nanoscale organization and dynamics of the siglec CD 22cooperate with the cytoskeleton in restraining BCR signalling.EMBO J.35, 258-280(2016) .
- [0692] 30.Zhu,S.等人Monitoring C-Peptide Storage and Secretion in Islet b-Cells In Vitro and In Vivo.Diabetes 65,699-709(2016) .
- [0693] 31.Yang,Z.wen,Meng,X.xiao&Xu,P.Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis.J.Cell.Mol.Med.19,2513-2520(2015) .
- [0694] 32.Padoa,C.J.等人Epitope analysis of insulin autoantibodies using recombinant Fab.Clin.Exp.Immunol.140,564-571(2005) .
- [0695] 33.Acharya,P.,Lusvarghi,S.,Bewley,C.A.&Kwong,P.D.HIV-1gp120 as a therapeutic target:Navigating a moving labyrinth.Expert Opinion on Therapeutic Targets第19卷765-783(2015) .
- [0696] 34.Roes,J.&Rajewsky,K.Immunoglobulin D(IgD)-deficient mice reveal an auxiliary receptor function for IgD in antigen-mediated recruitment of B cells.J.Exp.Med.177,45-55(1993) .
- [0697] 35.Gutzeit,C.,Chen,K.&Cerutti,A.The enigmatic function of IgD:some answers at last.European Journal of Immunology第48卷1101-1113(2018) .
- [0698] 36.Thi Cuc,B.,Pohar,J.&Fillatreau,S.Understanding regulatory B cells in autoimmune diseases:the case of multiple sclerosis.Current Opinion in Immunology第61卷26-32(2019) .
- [0699] 37.Tokarz,V.L.,MacDonald,P.E.&Klip,A.The cell biology of systemic insulin function.Journal of Cell Biology第217卷1-17(2018) .
- [0700] 38.Pavithran,P.V.等人Autoantibodies to insulin and dysglycemia in people with and without diabetes:An underdiagnosed association.Clinical Diabetes第34卷164-167(2016) .
- [0701] 39.Hu,X.&Chen,F.Exogenous insulin antibody syndrome(EIAS):A clinical syndrome associated with insulin antibodies induced by exogenous insulin in diabetic patients.Endocr.Connect.7,R47-R55(2018) .
- [0702] 40.Uchigata,Y.,Hirata,Y.&Iwamoto,Y.Insulin autoimmune syndrome(Hirata disease):Epidemiology in Asia,including Japan.Diabetol.Int.1,21-25(2010) .
- [0703] 41.Uchigata,Y.,Eguchi,Y.,Takayama-Hasumi,S.&Omori,Y.Insulin autoimmune syndrome(Hirata Disease):clinical features and epidemiology in Japan.Diabetes Research and Clinical Practice第22卷89-94(1994) .
- [0704] 42.BERSON,S.A.,YALOW,R.S.,BAUMAN,A.,ROTHSCHILD,M.A.&NEWERLY,K.Insulin-I131 metabolism in human subjects:demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects.J.Clin.Invest.35,170-

190(1956) .

[0705] 43.Fineberg,S.E.,Kawabata,T.,Finco-Kent,D.,Liu,C.&Krasner,A.Antibody response to inhaled insulin in patients with type 1 or type 2 diabetes.An analysis of initial phase II and III inhaled insulin(Exubera) trials and a two-year extension trial.J.Clin.Endocrinol.Metab.90,3287-3294(2005) .

[0706] 44.Koyama,R.等人Hypoglycemia and hyperglycemia due to insulin antibodies against therapeutic human insulin:Treatment with double filtration plasmapheresis and prednisolone.Am.J.Med.Sci.329,259-264(2005) .

[0707] 45.Ganz,M.A.等人Resistance and allergy to recombinant human insulin.J.Allergy Clin.Immunol.86,45-51(1990) .

[0708] 46.Asai,M.等人Insulin lispro reduces insulin antibodies in a patient with type 2diabetes with immunological insulin resistance.Diabetes Res.Clin.Pract.61,89-92(2003) .

[0709] 47.Gupta,S.&Gupta,A.Selective IgM deficiency-An underestimated primary immunodeficiency.Frontiers in Immunology第8卷1056(2017) .

[0710] 48. Köhler,F.等人Autoreactive B Cell Receptors Mimic Autonomous Pre-B Cell Receptor Signaling and Induce Proliferation of Early B Cells.Immunity 29,912-921(2008) .

[0711] 49.Herzog,S.&Jumaa,H.Self-recognition and clonal selection: Autoreactivity drives the generation of B cells.Current Opinion in Immunology 第24卷166-172(2012) .

[0712] 50.Wintersteiner.Isoelectric Point of Insulin.473-478(1933) .

[0713] 51.Amir,S.等人Peptide mimotopes of malondialdehyde epitopes for clinical applications in cardiovascular disease.J.Lipid Res.53,1316-1326 (2012) .

[0714] 52.Tsiantoulas,D.,Gruber,S.&Binder,C.J.B-1cell immunoglobulin directed against oxidation-specific epitopes.Front.Immunol.3,1-6(2012) .

[0715] 53.Benedict,C.L.&Kearney,J.F.Increased junctional diversity in fetal B cells results in a loss of protective anti-phosphorylcholine antibodies in adult mice.Immunity 10,607-617(1999) .

[0716] 54.Nakamura M,Burastero SE,Ueki Y,Larrick JW,Notkins AL,C.P.Probing the Normal and Autoimmune B Cell Repertoire With Epstein-Barr Virus.Frequency of B Cells Producing Monoreactive High Affinity Autoantibodies in Patients With Hashimoto's Disease and Systemic Lupus Erythematosus-PubMed.Journal of Immunology <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2848890/>(1988) .

[0717] 55.Kaneko,Y.,Nimmerjahn,F.&Ravetch,J.V.Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation.Science(80-.).313,670-673 (2006) .

[0718] 56.Reverberi,R.&Reverberi,L.Factors affecting the antigen-antibody

reaction.Blood Transfus.5,227-240(2007) .

序列表

<110> 维肯芬特有限责任公司 (Vaccinvent GmbH)

乌尔姆大学 (Universität Ulm)

<120> 用于调节B细胞介导的免疫应答的方法和手段

<130> AE1593 PCT BS

<150> EP21 189 996.8

<151> 2021-08-05

<150> PCT/EP2021/052000

<151> 2021-01-28

<160> 48

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb13 HCVD

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val

35 40 45

Ser Arg Ile Asn Ser Asp Gly Ser Thr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Asp Arg Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Ile Ile Leu Phe

100 105 110

Gly Phe Leu Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb13 HCDR1

<400> 2

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb13 HCDR2

<400> 3

Ile Asn Ser Asp Gly Ser Thr Thr

1 5

<210> 4

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb13 HCDR3

<400> 4

Ala Arg Asp Asp Arg Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Ile Ile Leu Phe

1 5 10 15

Gly Phe Leu Asp Leu

20

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb13 LCVD

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Leu Cys Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asn Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Ser Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50	55	60															
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Leu	Glu	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Ser	Asn	Trp	Pro	Gln		
				85					90						95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys							
			100					105									

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> mAb13 LCDR1
 <400> 6
 Gln Asn Val Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> mAb13 LCDR3
 <400> 7
 Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Gln Thr
 1 5
 <210> 8
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> mAb48 HCVD
 <400> 8
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Asp Ser Lys Phe Thr Val Val Val Ala Arg Arg Arg Tyr Tyr		
100	105	110
Tyr Tyr Asp Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser		
115	120	125

Ser

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb48 HCDR1

<400> 9

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Gly

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb48 HCDR2

<400> 10

Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Asn Lys

1 5

<210> 11

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb48 HCDR3

<400> 11

Ala Arg Asp Ser Lys Phe Thr Val Val Val Ala Arg Arg Arg Tyr Tyr

1 5 10 15

Tyr Tyr Asp Met Asp Val

20

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb48 LCVD

<400> 12

Glu	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn
			20					25						30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
			35				40						45		
Tyr	Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Glu	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser
65					70					75				80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Tyr	Asn	Arg	Leu	Pro	Pro
				85					90					95	
Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Arg	Val	Glu	Ile	Lys				
			100					105							

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb48 LCDR1

<400> 13

Gln	Thr	Ile	Ser	Ser	Asn
1				5	

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb48 LCDR3

<400> 14

Gln	His	Tyr	Asn	Arg	Leu	Pro	Pro	Trp	Thr
1				5				10	

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb49 HCVD

<400> 15

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ser
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		
Thr	Ile	Ser	Trp	Val	Gln	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Val	Gly	Ile	Ile	Pro	Ile	Phe	Gly	Thr	Ala	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe
	50					55				60					
Gln	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Glu	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Ser	Lys	Val	Asn	Phe	Ser	Gly	Trp	Tyr	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
		115				120									

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb49 HCDR1

<400> 16

Gly	Gly	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Thr
1				5			

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb49 HCDR2

<400> 17

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala

1 5

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb49 HCDR3

<400> 18

Ala Arg Ser Lys Val Asn Phe Ser Gly Trp Tyr Tyr Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb49 LCVD

<400> 19

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Ala Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Thr Trp Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb49 LCDR1

<400> 20

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb49 LCDR3

<400> 21

Gln Gln Arg Ser Thr Trp Pro Trp Thr

1 5

<210> 22

<211> 384

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb13 HCVD

<400> 22

gaggtgcagc tgggtggagtc cggggggaggc ttagttcagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctactgga tgcactgggt ccgccaagct 120

ccagggaagg ggctgggtgtg ggtctcacgt attaatagtg atgggagtag cacaaggtac 180

gcggactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa tacgctgtat 240

ctgcaaatga acagtctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc aagagatgat 300

aggggggatta ctatgggttcg gggaattatt ctattcgggt tcctcgatct ctggggccgt 360

ggcaccctgg tcactgtctc ctca 384

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb13 HCDR1

<400> 23

ggattcacct tcagtagcta ctgg 24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> mAb13 HCDR2

<400> 24	
attaatagtg atgggagtac caca	24
<210> 25	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb13 HCDR3	
<400> 25	
gcaagagatg ataggggat tactatggtt cggggaatta ttctattcgg gttcctcgat	60
ctc	63
<210> 26	
<211> 322	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb13 LCDV	
<400> 26	
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccatc ctgtctttgt gtccaggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gaatgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctctgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttactctca ccatcaacaa cctggagcct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcagac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggagatcaa ac	322
<210> 27	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb13 LCDR1	
<400> 27	
cagaatgtta gcagctac	18
<210> 28	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb13 LCDR3	
<400> 28	

cagcagcgta gcaactggcc tcagacg	27
<210> 29	
<211> 387	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb48 HCVD	
<400> 29	
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggta tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaaataa taaatactat	180
acagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa caccctatat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagattcc	300
aaatttacag tagtggttgc acggcgacgg tactactact acgatatgga cgtctggggc	360
caagggacca cggtcaccgt ctcctca	387
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb48 HCDR1	
<400> 30	
ggattcacct tcagtaacta tggt	24
<210> 31	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb48 HCDR2	
<400> 31	
atatggtatg atggaaataa taaa	24
<210> 32	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb48 HCDR3	
<400> 32	
gcgagagatt ccaaatttac agtagtggtt gcacggcgac ggtactacta ctacgatatg	60

gacgtc	66
<210> 33	
<211> 325	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb48 LCVD	
<400> 33	
gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gactatttag agcaacttag cctgggtacca gcagaaacct	120
ggccaggctc ccaggtcctc catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagct	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactetca ccatcagcag cctggagtct	240
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacac tataataggc tgcctccgtg gacgttcggc	300
caagggacca ggggtggaaat caaac	325
<210> 34	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb48 LCDR1	
<400> 34	
cagactatta gcagcaac	18
<210> 35	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb48 LCDR3	
<400> 35	
caacactata ataggctgcc tccgtggacg	30
<210> 36	
<211> 360	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb49 HCVD	
<400> 36	
caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60
tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatacta tcagctgggt gcaacaggcc	120

cctggacaag ggcttgagtg gatggtaggg atcatcccta tctttggtac agcaaactac	180
gcacagaagt tccagagcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac	240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagatcgaaa	300
gttaattttca gtggctggta ctactactgg ggccaggga ccctggtcac cgtctcctca	360
<210> 37	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb49 HCDR1	
<400> 37	
ggaggcacct tcagcageta tact	24
<210> 38	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb49 HCDR2	
<400> 38	
atcatcccta tctttggtac agca	24
<210> 39	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb49 HCDR3	
<400> 39	
gcgagatcga aagttaattt cagtggctgg tactactac	39
<210> 40	
<211> 322	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb49 LCVD	
<400> 40	
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaagct	120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag gctagagcct	240

gaagatttttg cagtttatta ctgtcagcag cgtacacact ggccgtggac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa ac	322
<210> 41	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb49 LCDR1	
<400> 41	
cagagtgtta gcagctac	18
<210> 42	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> mAb49 LCDR3	
<400> 42	
cagcagcgta gcacctggcc gtggacg	27
<210> 43	
<211> 26	
<212> PRT	
<213> 病毒	
<220>	
<223> SARS-CoV-2 #1	
<400> 43	
Val Glu Gly Phe Asn Cys Tyr Phe Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln	
1 5 10 15	
Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr Gln Pro Tyr	
20 25	
<210> 44	
<211> 30	
<212> PRT	
<213> 病毒	
<220>	
<223> SARS-CoV-2 #2	
<400> 44	
Lys Val Gly Gly Asn Tyr Asn Tyr Leu Tyr Arg Leu Phe Arg Lys Ser	
1 5 10 15	
Asn Leu Lys Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Glu Ile Tyr	

	20		25		30
<210>	45				
<211>	31				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<220>					
<223>	C肽				
<400>	45				
Glu Ala Glu Asp Leu Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro					
1 5 10 15					
Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln					
20 25 30					
<210>	46				
<211>	29				
<212>	PRT				
<213>	小家鼠				
<220>					
<223>	C肽				
<400>	46				
Glu Val Glu Asp Pro Gln Val Glu Gln Leu Glu Leu Gly Gly Ser Pro					
1 5 10 15					
Gly Asp Leu Gln Thr Leu Ala Leu Glu Val Ala Arg Gln					
20 25					
<210>	47				
<211>	21				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<220>					
<223>	胰岛素A链				
<400>	47				
Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu					
1 5 10 15					
Glu Asn Tyr Cys Asn					
20					
<210>	48				
<211>	21				
<212>	PRT				
<213>	小家鼠				
<220>					

<223> 胰岛素A链

<400> 48

Gly Ile Val Asp Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu

1

5

10

15

Glu Asn Tyr Cys Asn

20

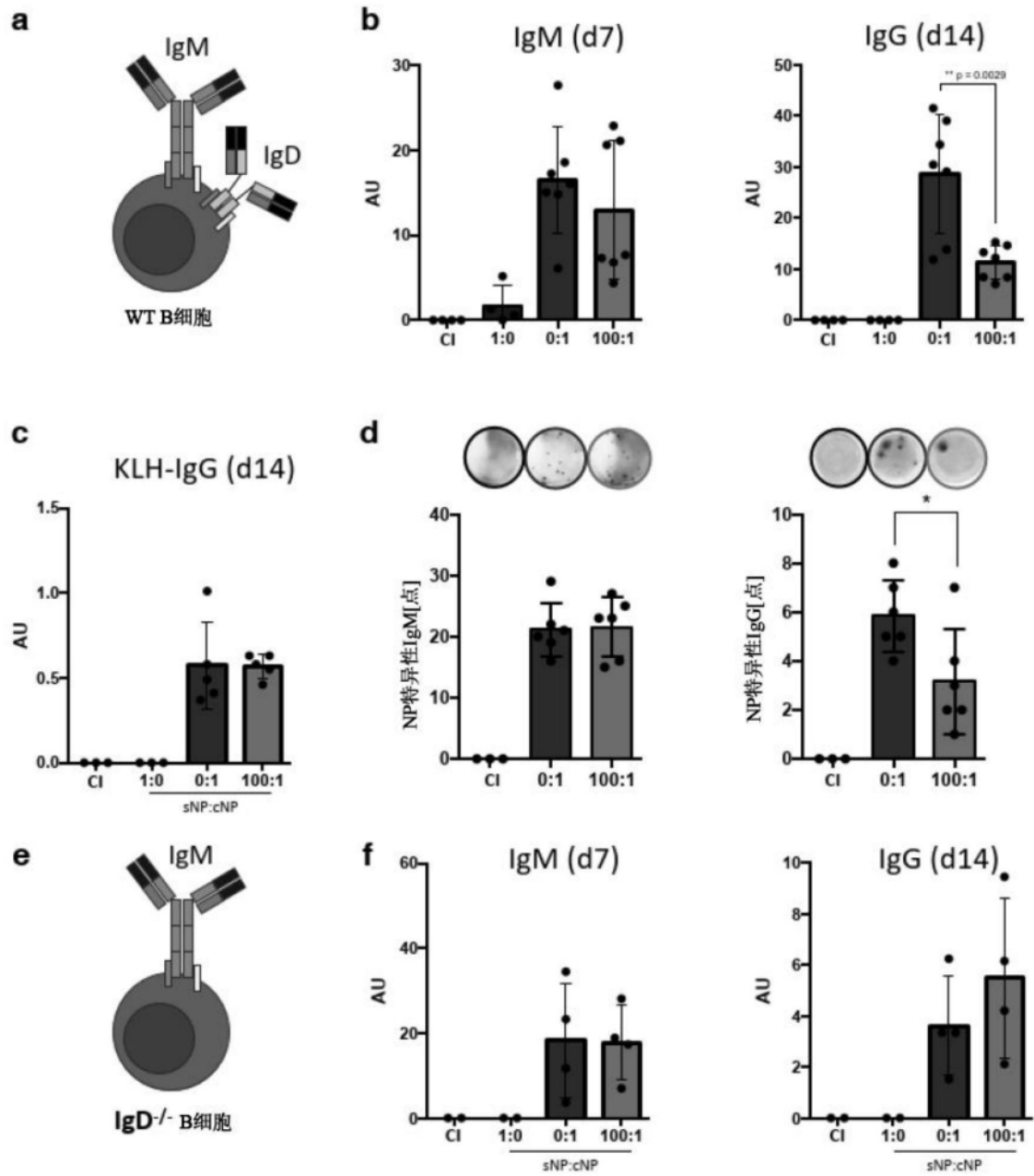


图1

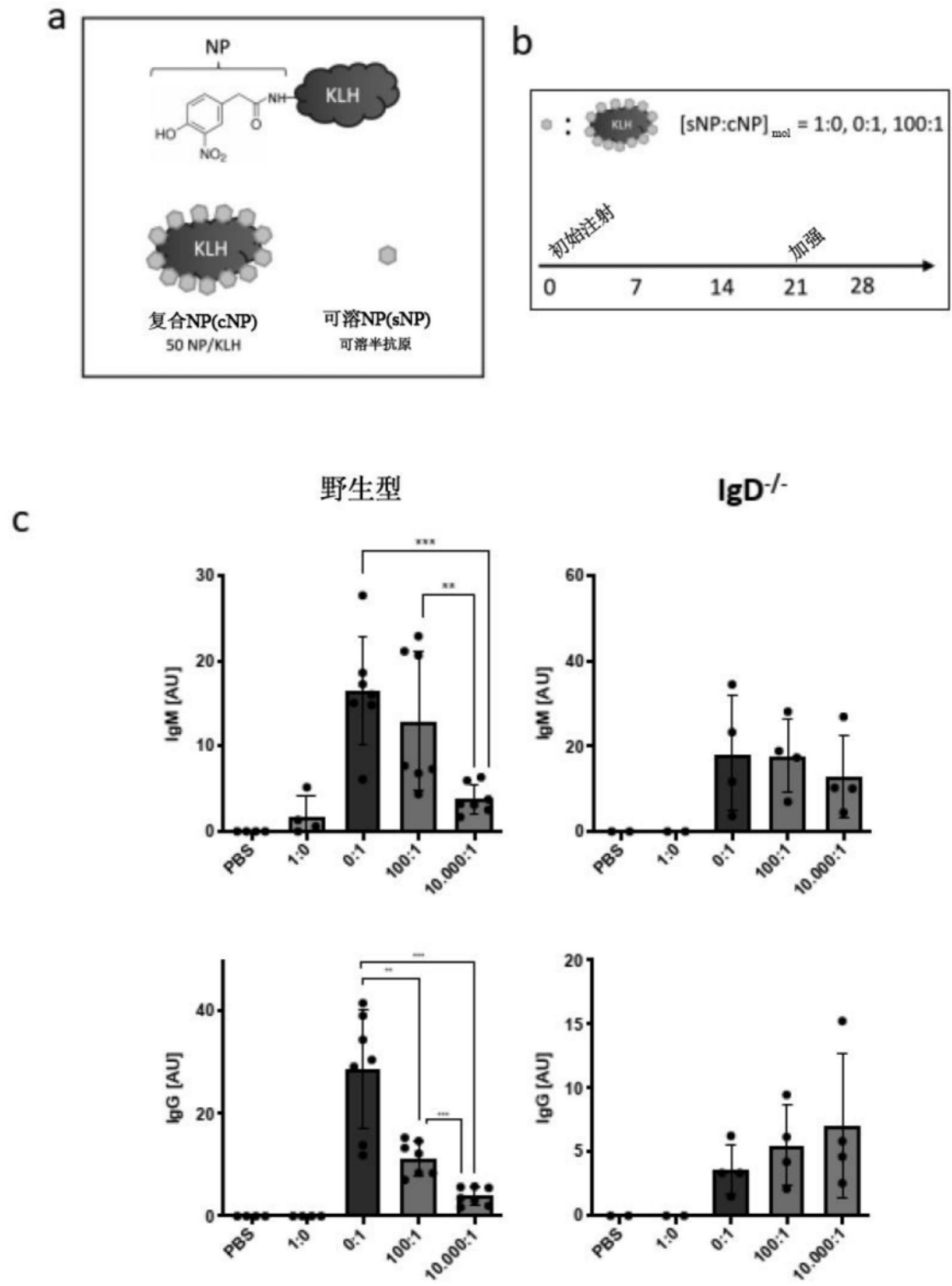


图2

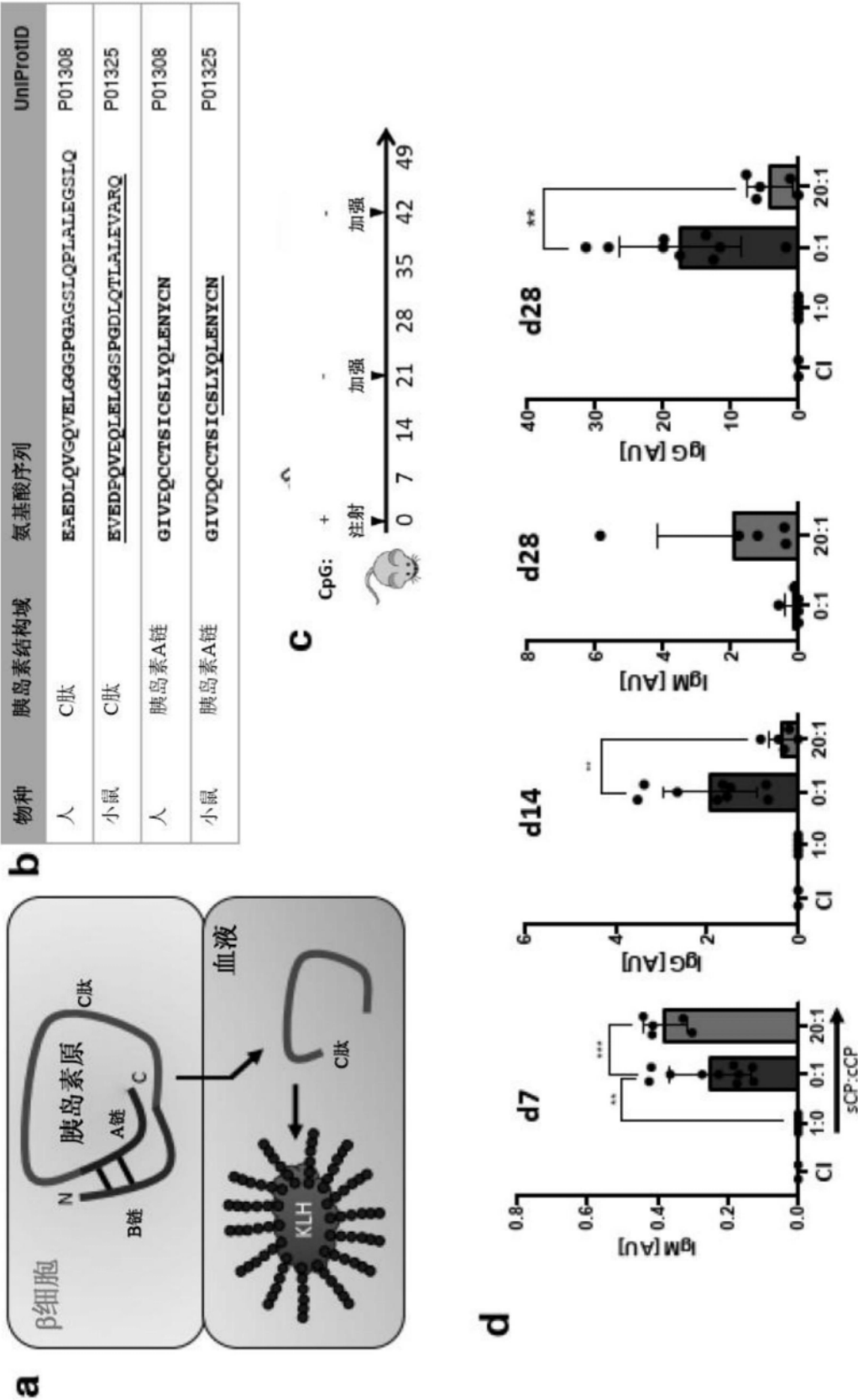


图3

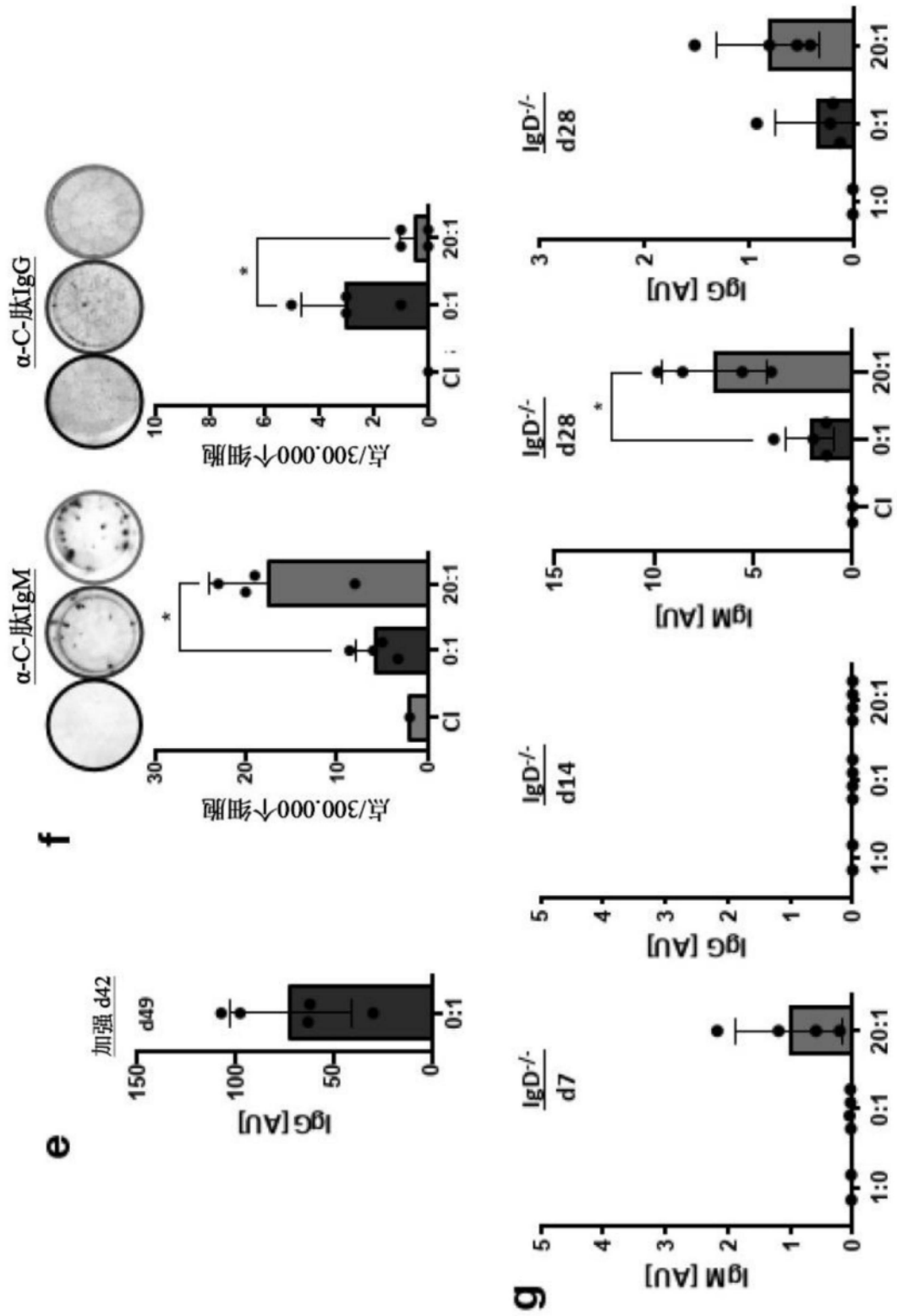


图3(续)

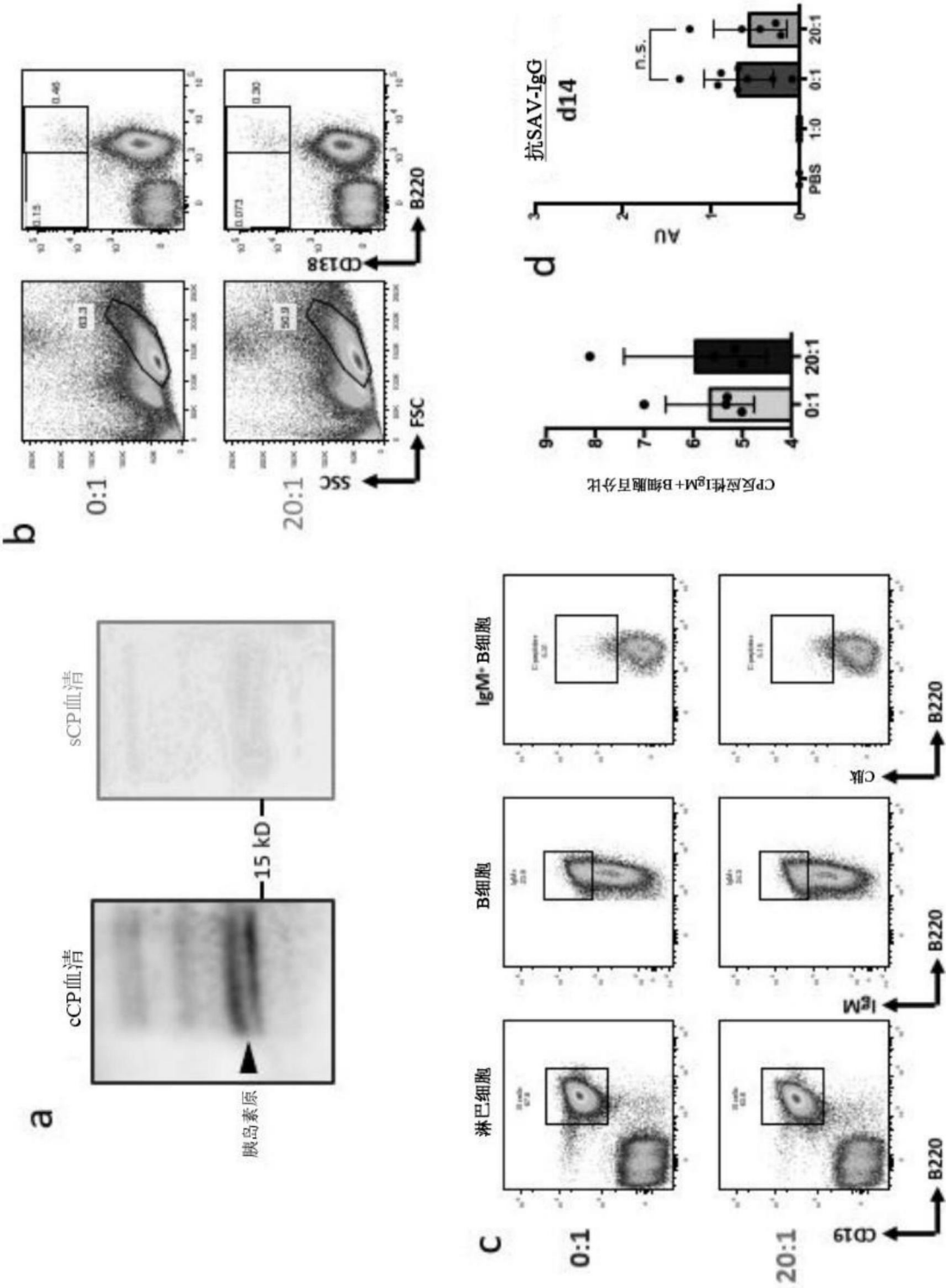


图4

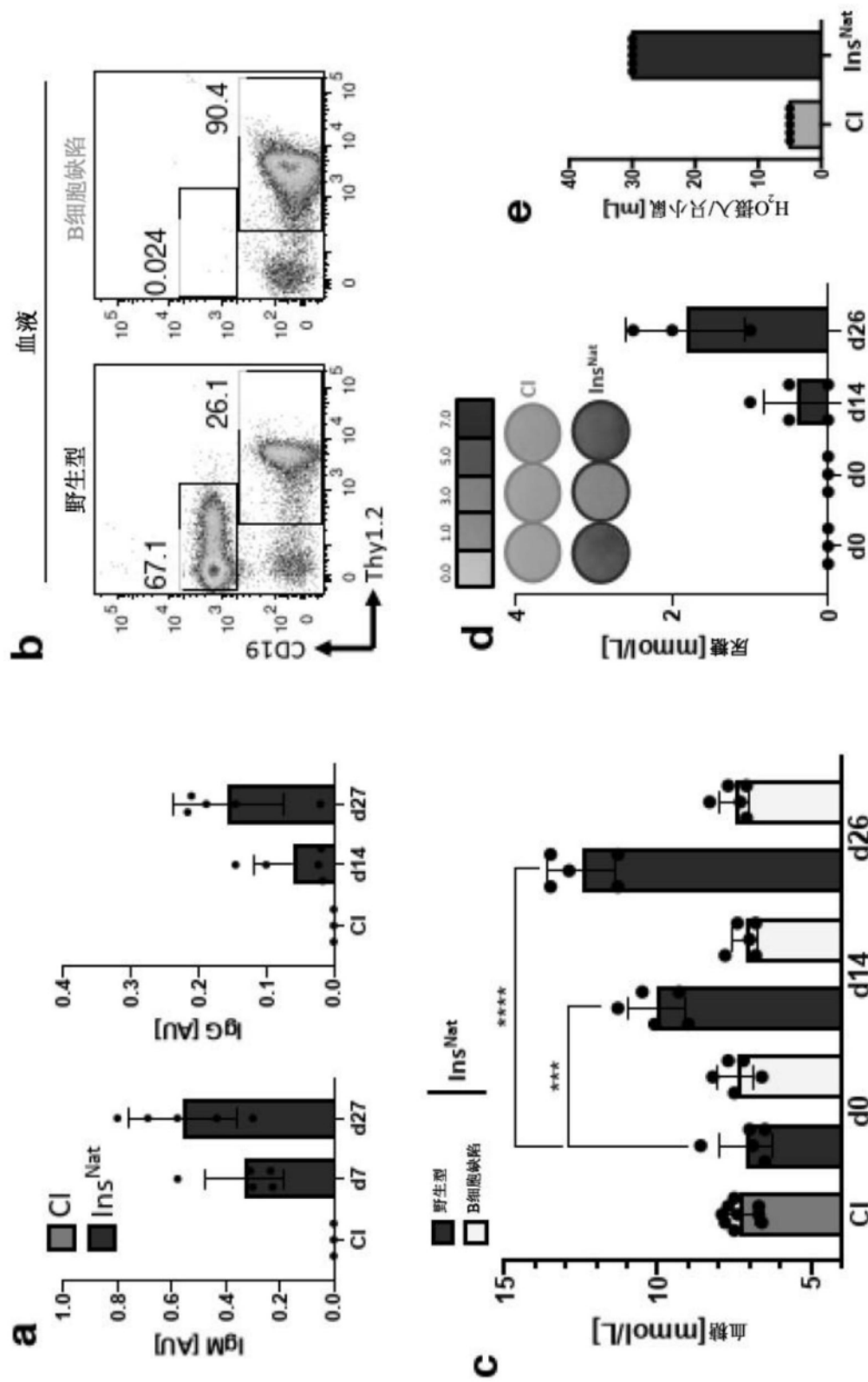


图5

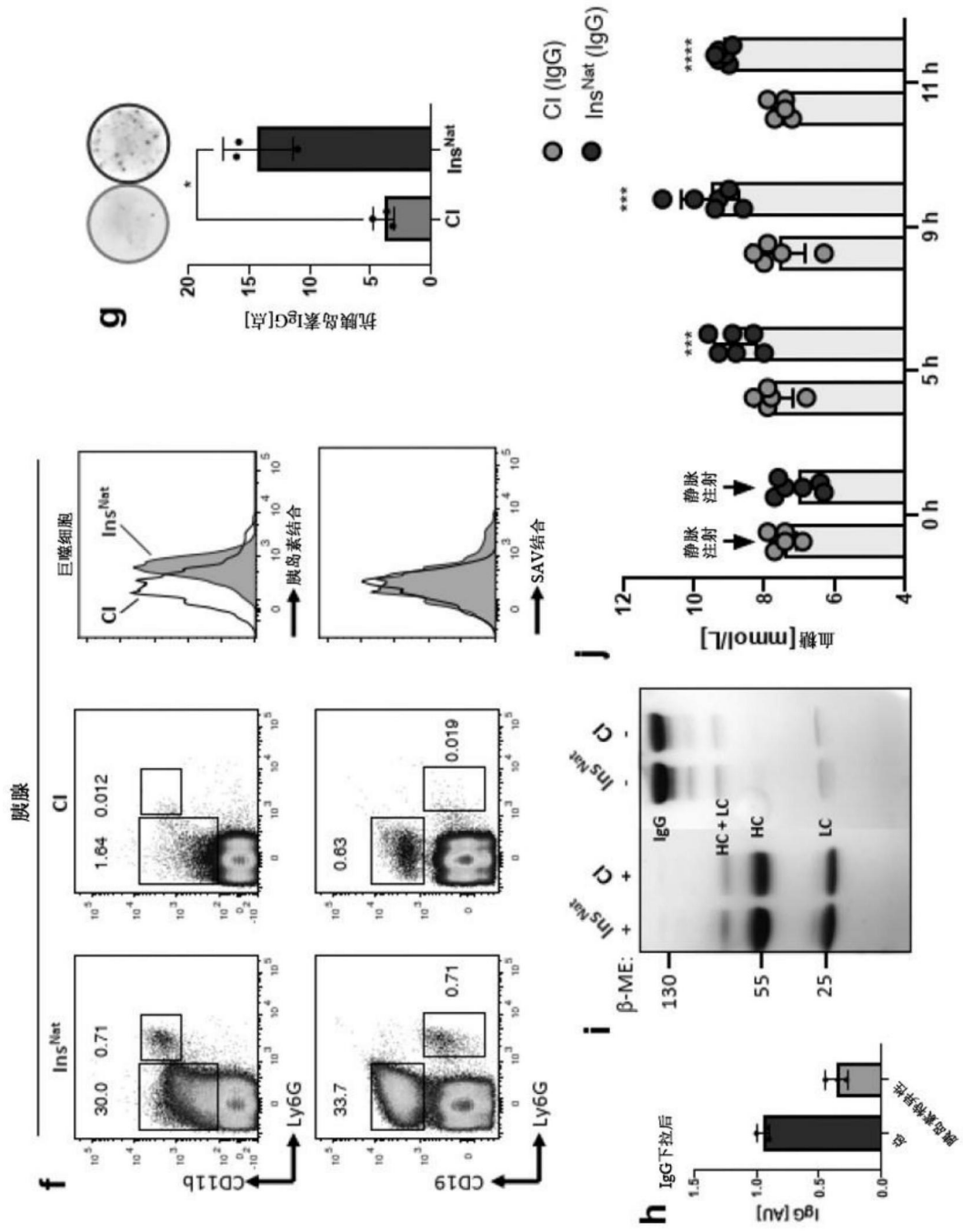


图5(续)

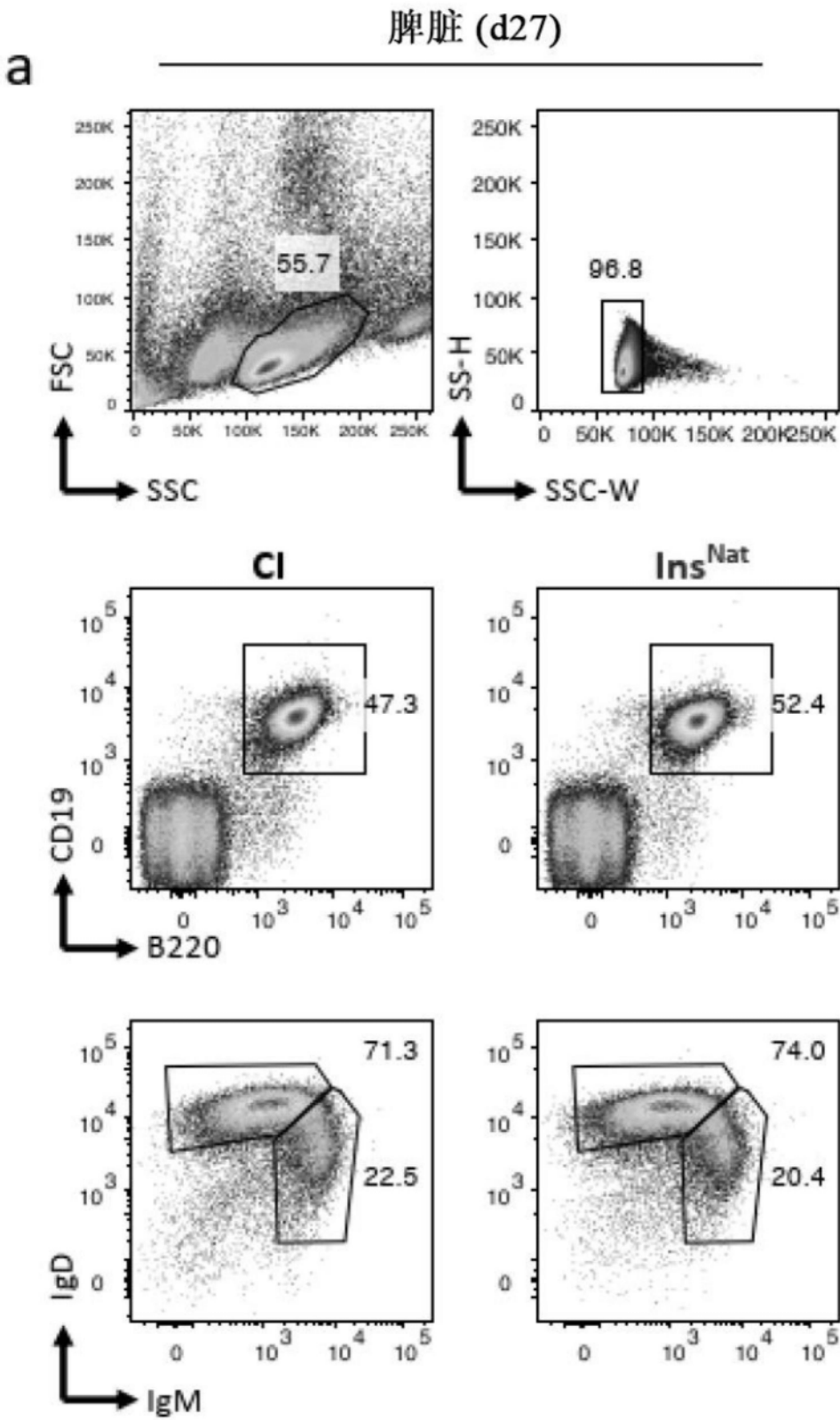


图6

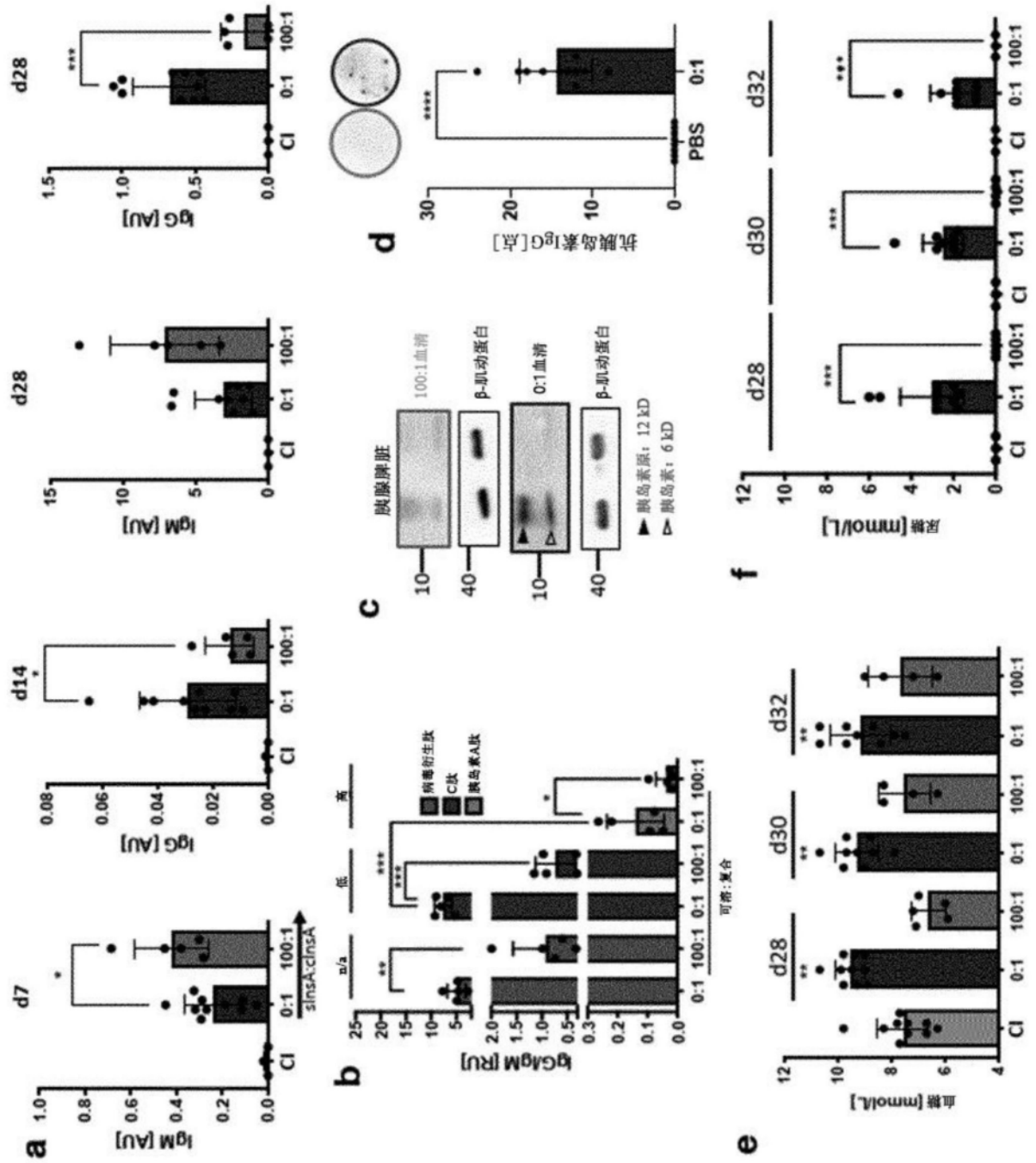


图7

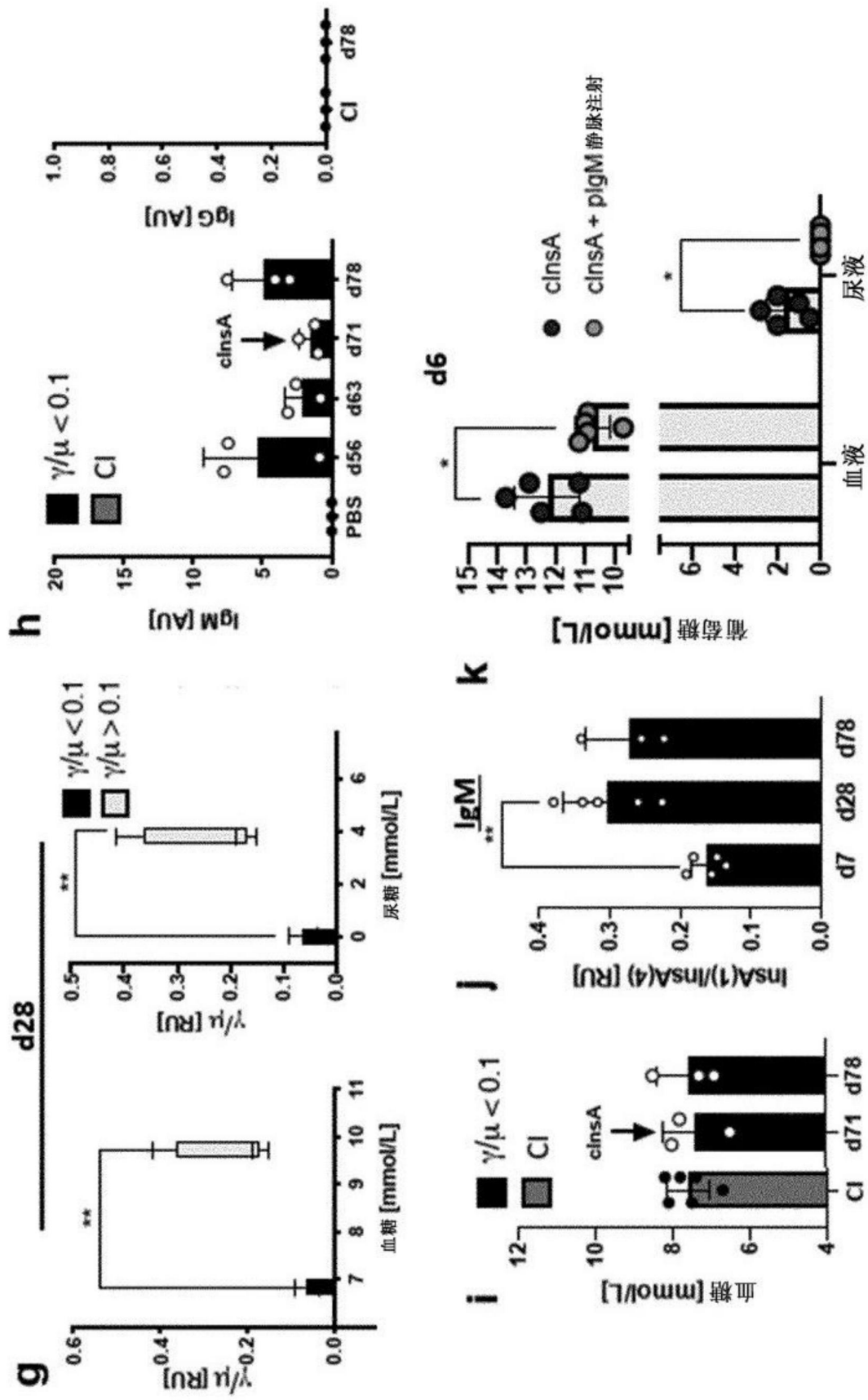


图7(续)

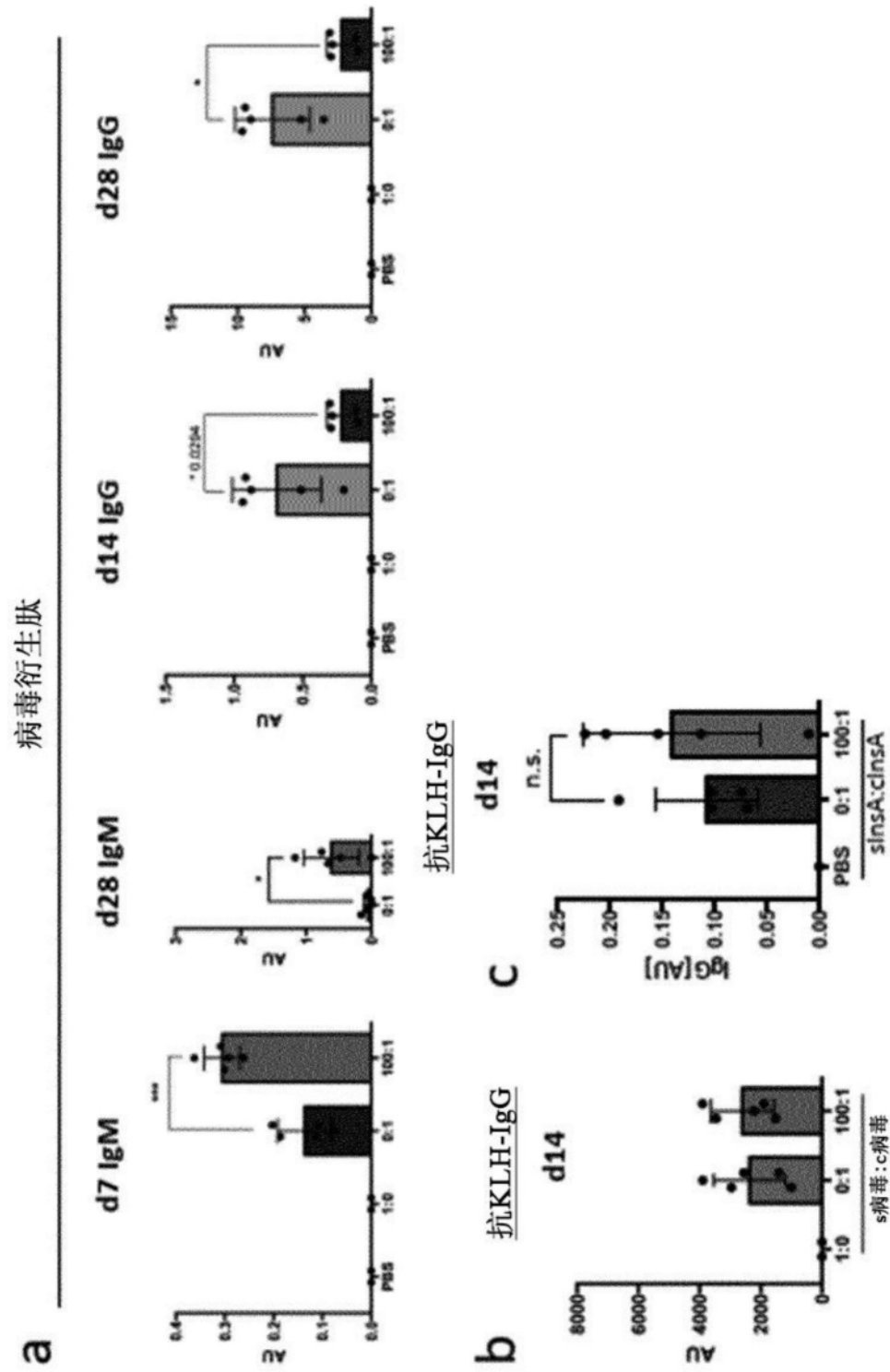


图8

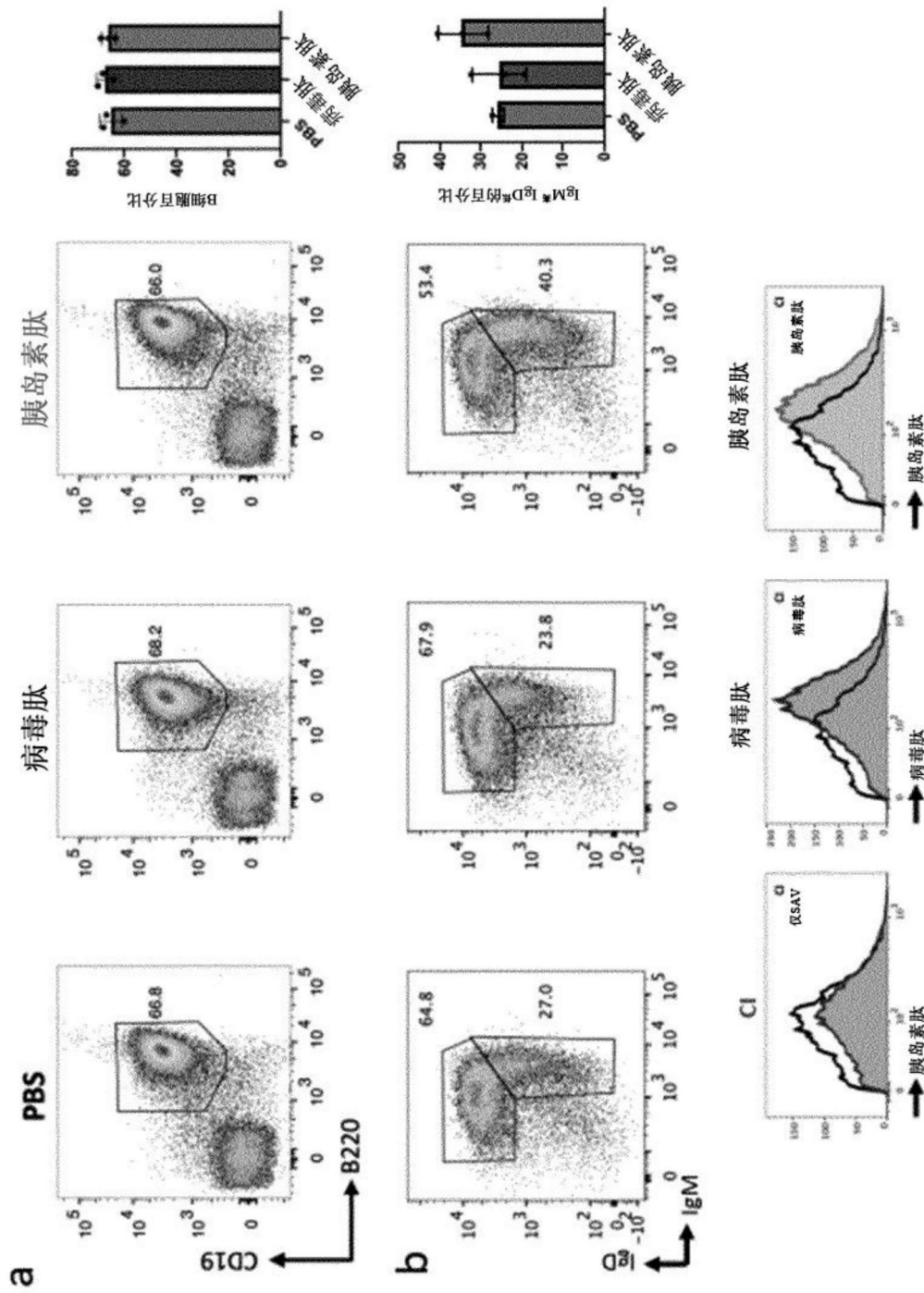


图9

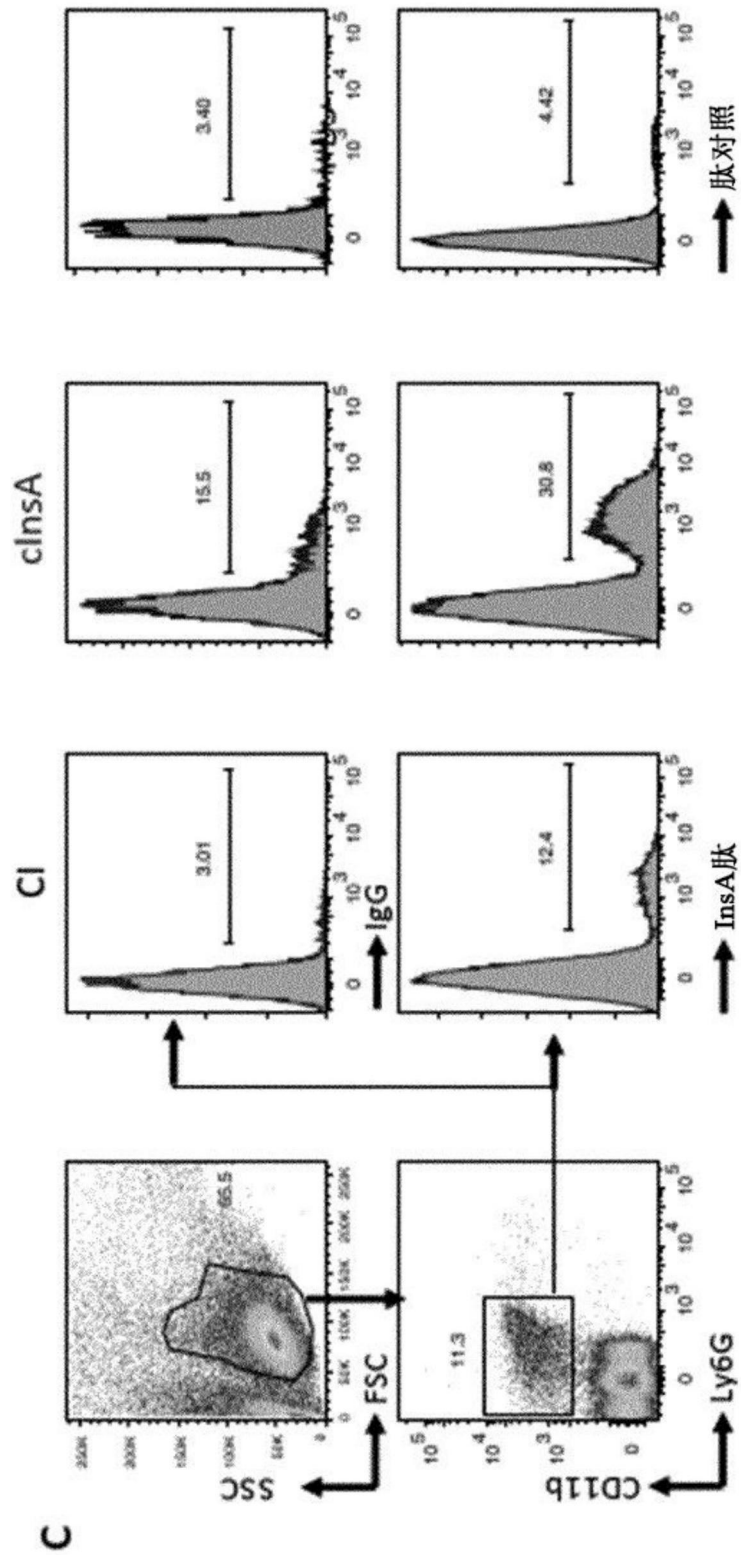


图9(续)

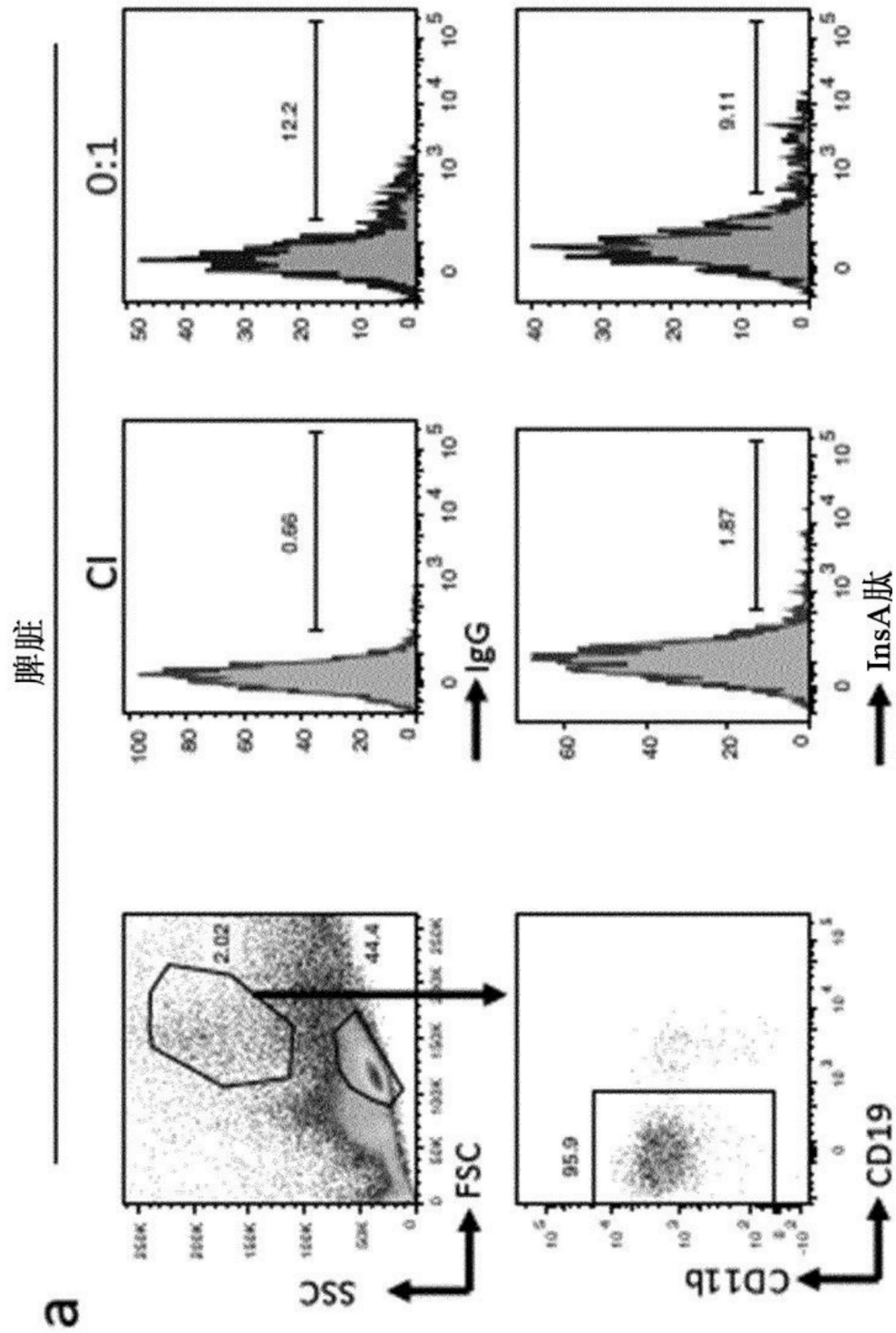


图10

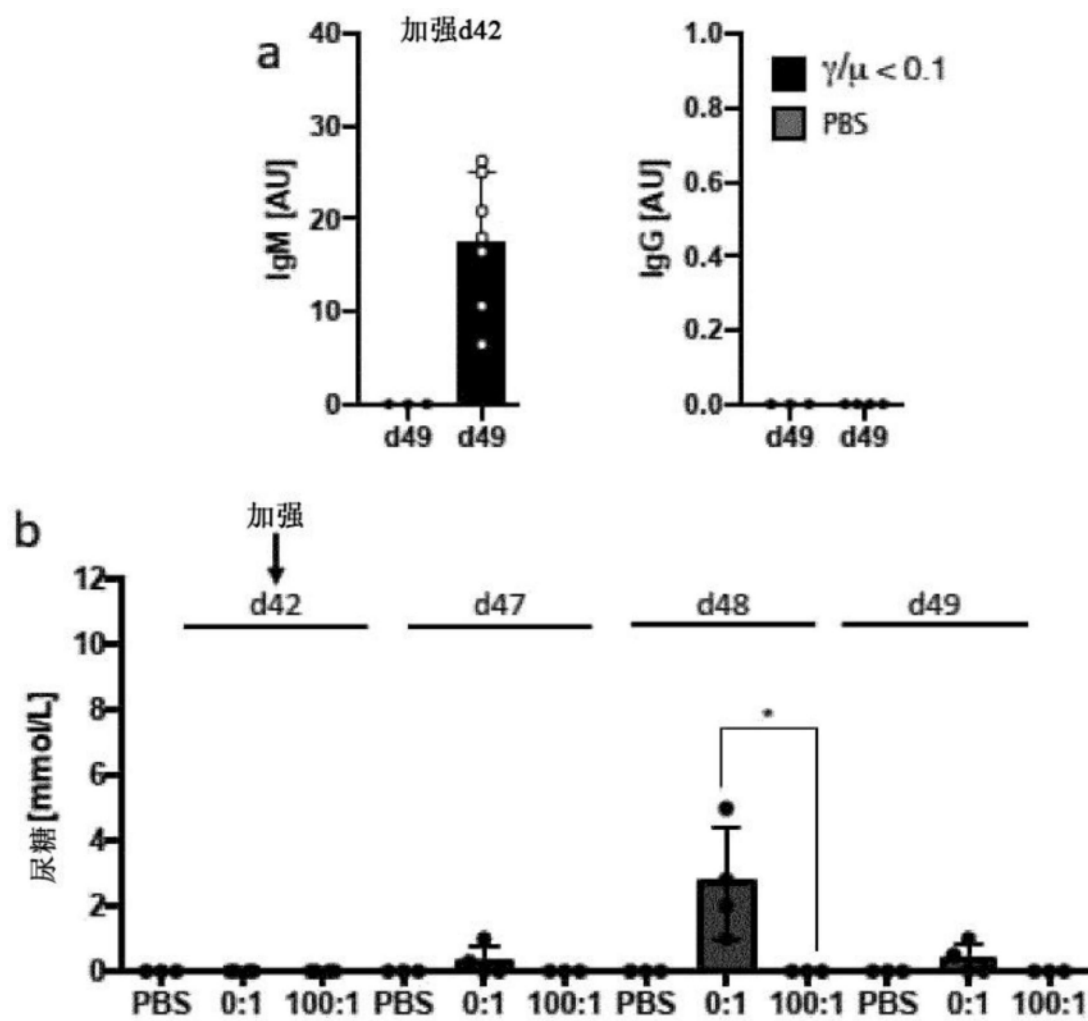


图11

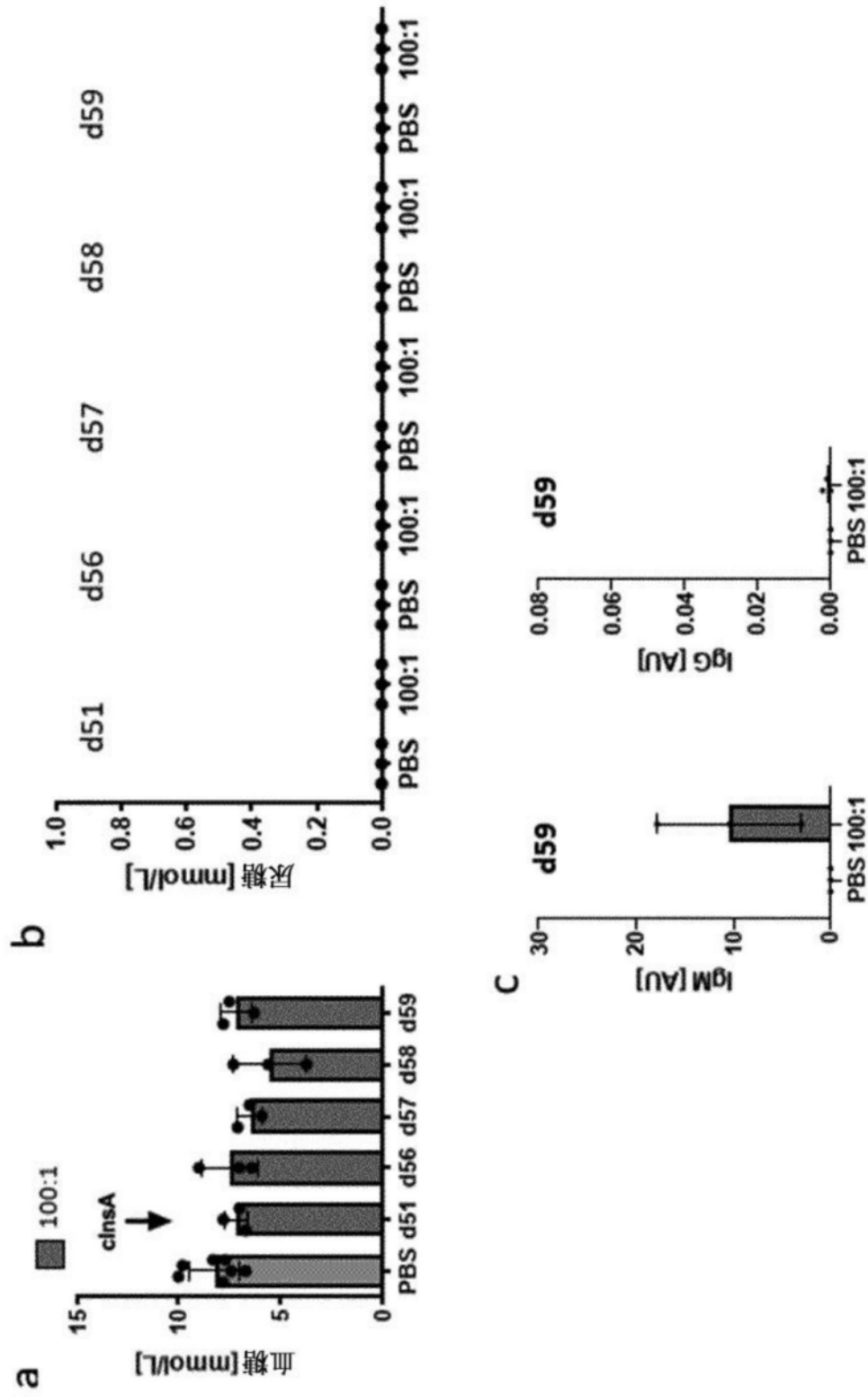


图13

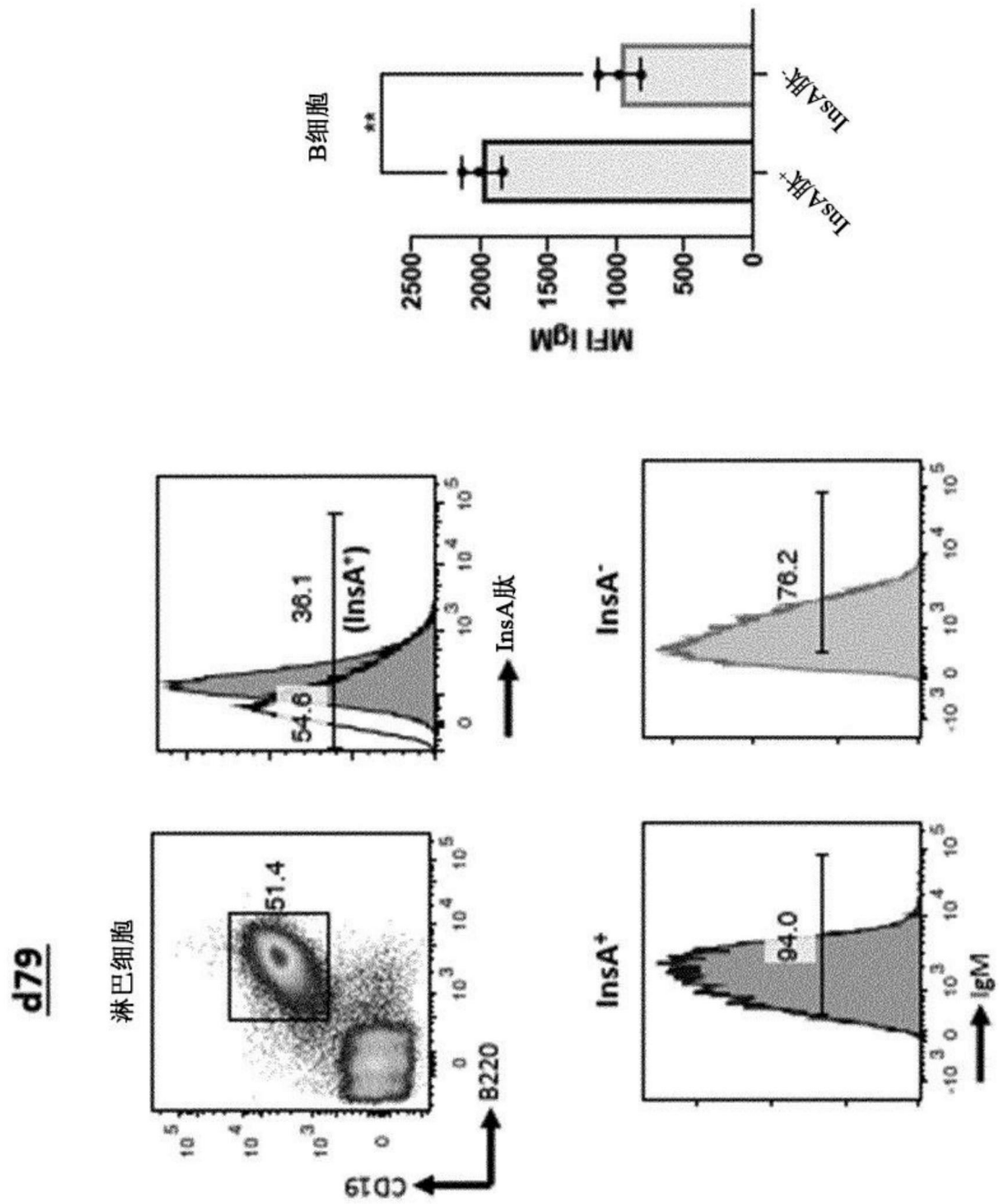


图14

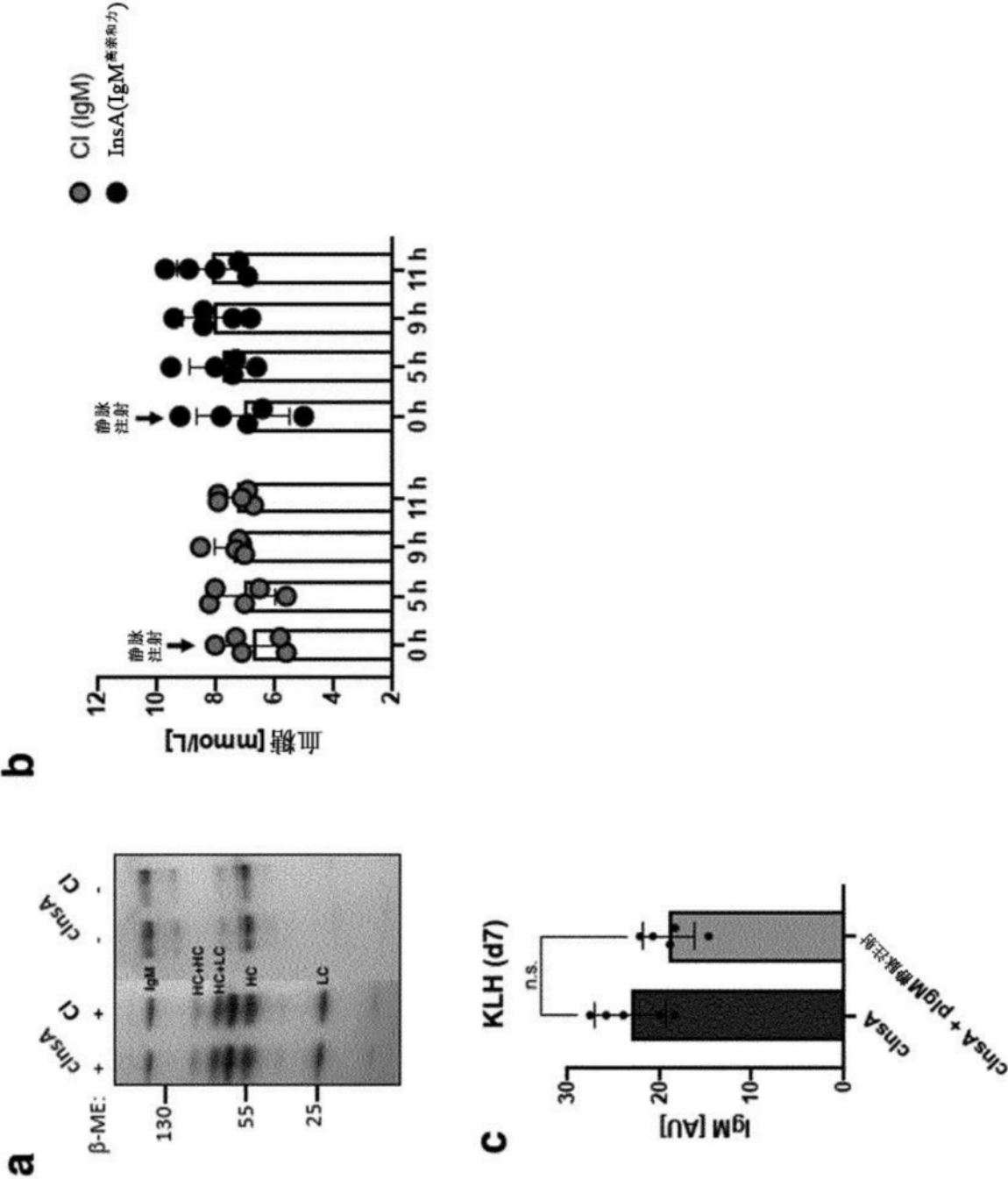


图15

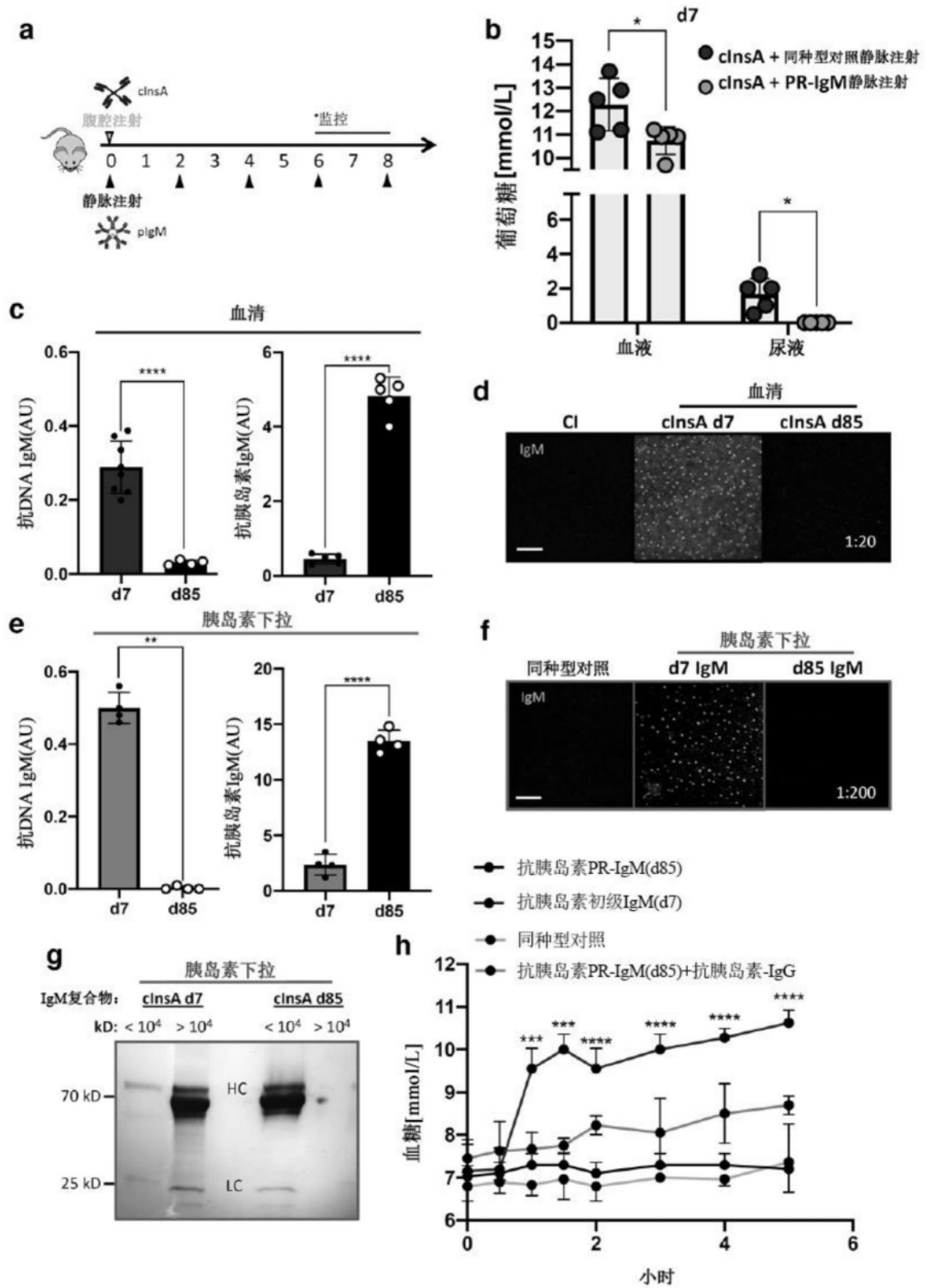


图16

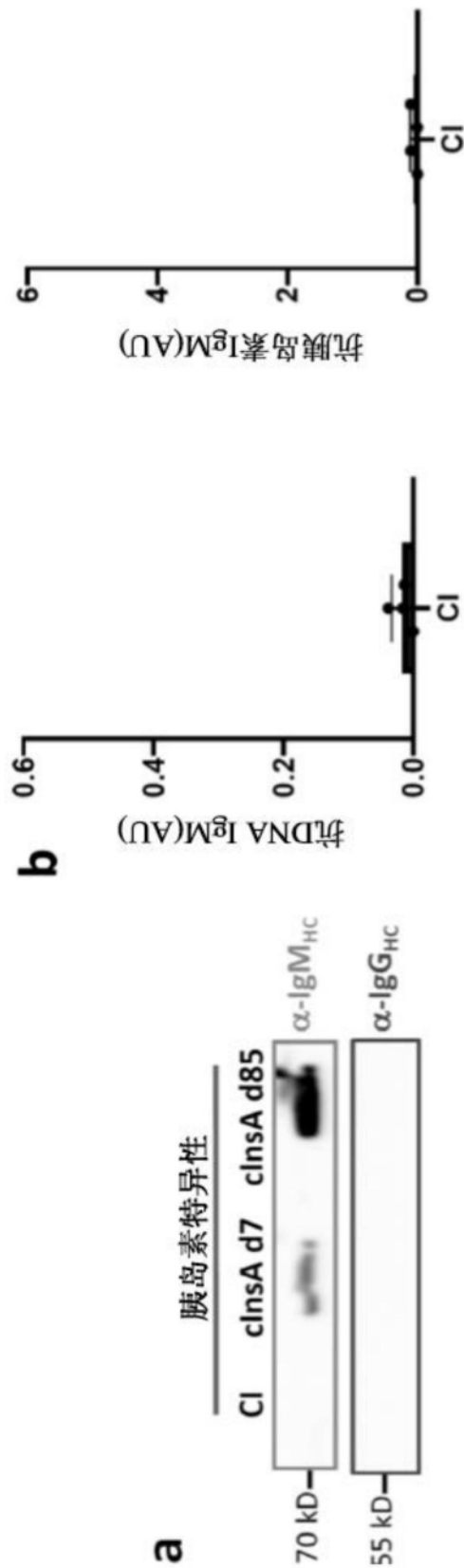


图17

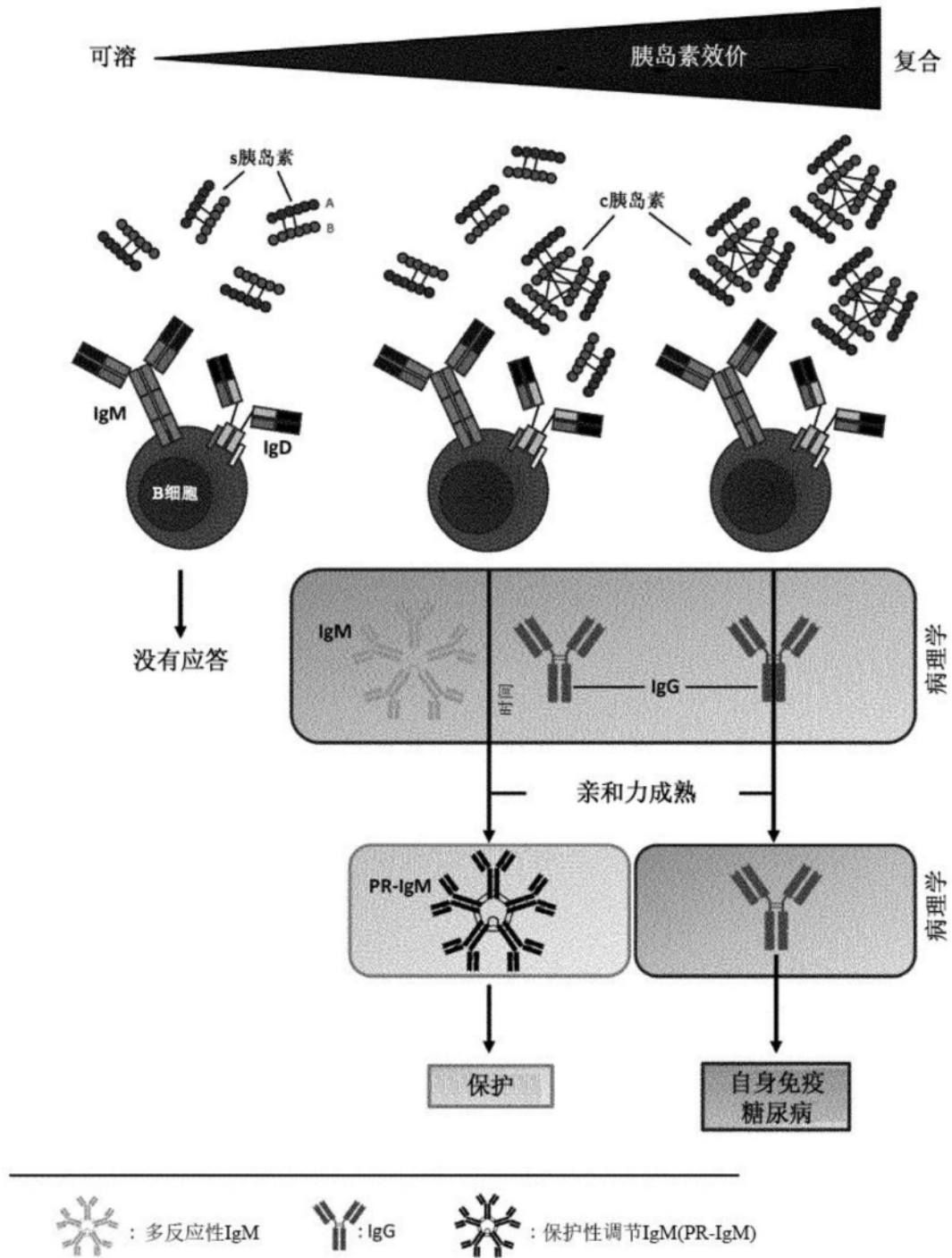


图18

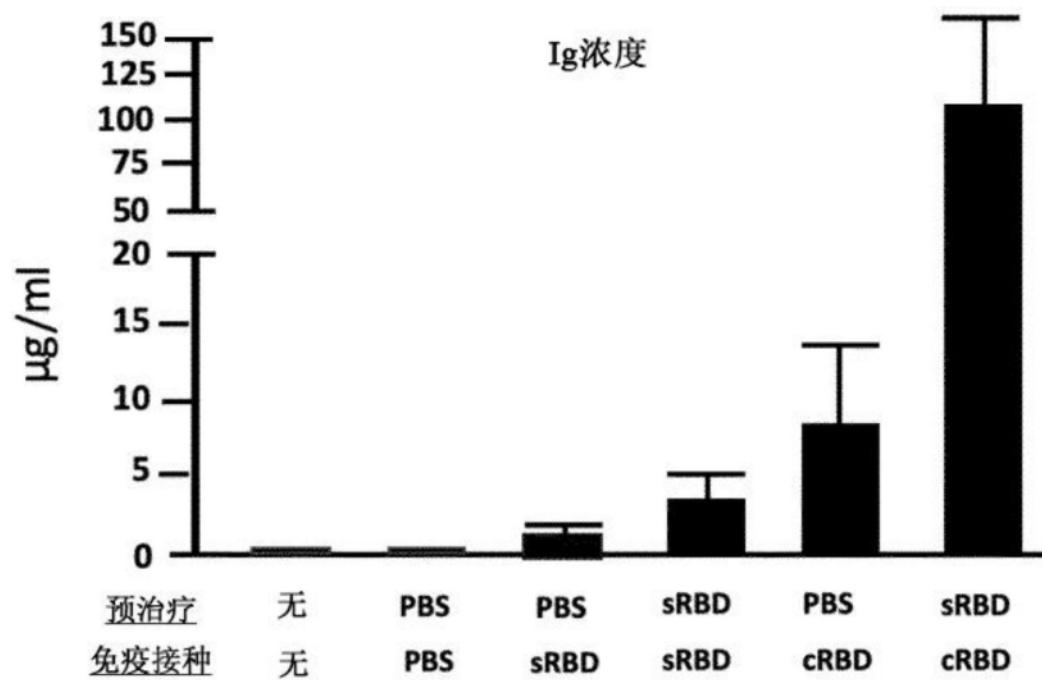


图19

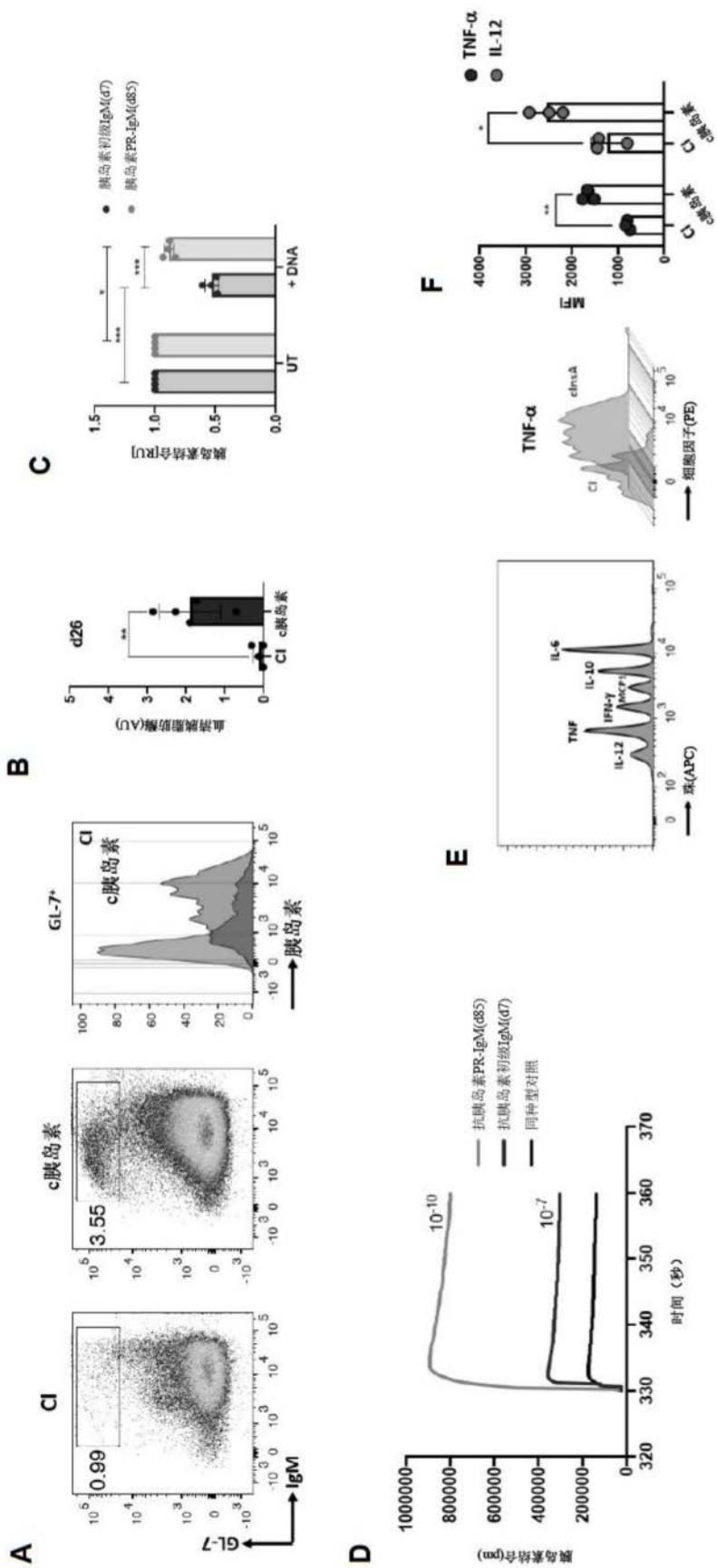


图20

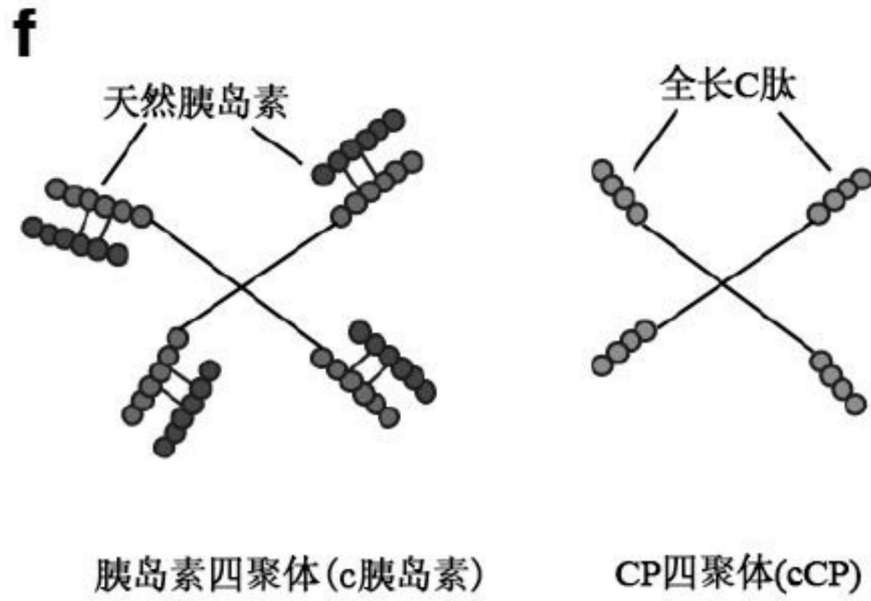


图21

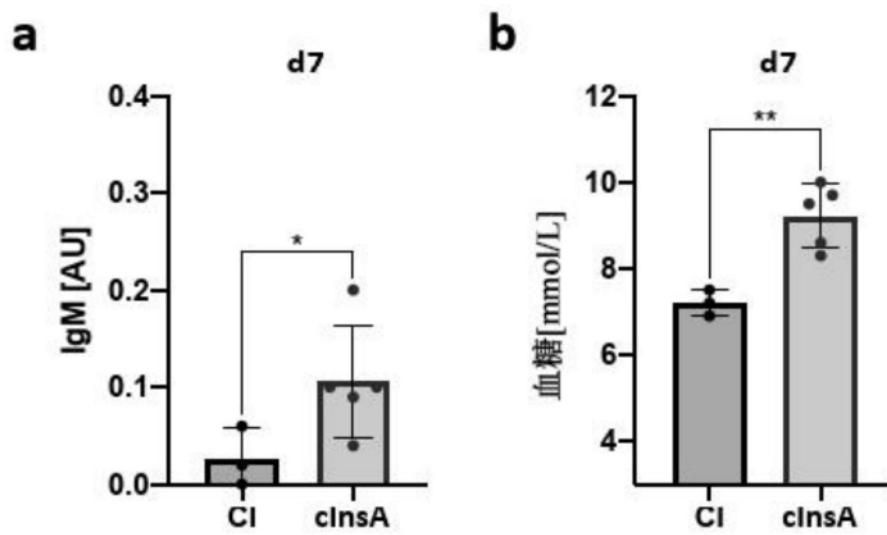


图22

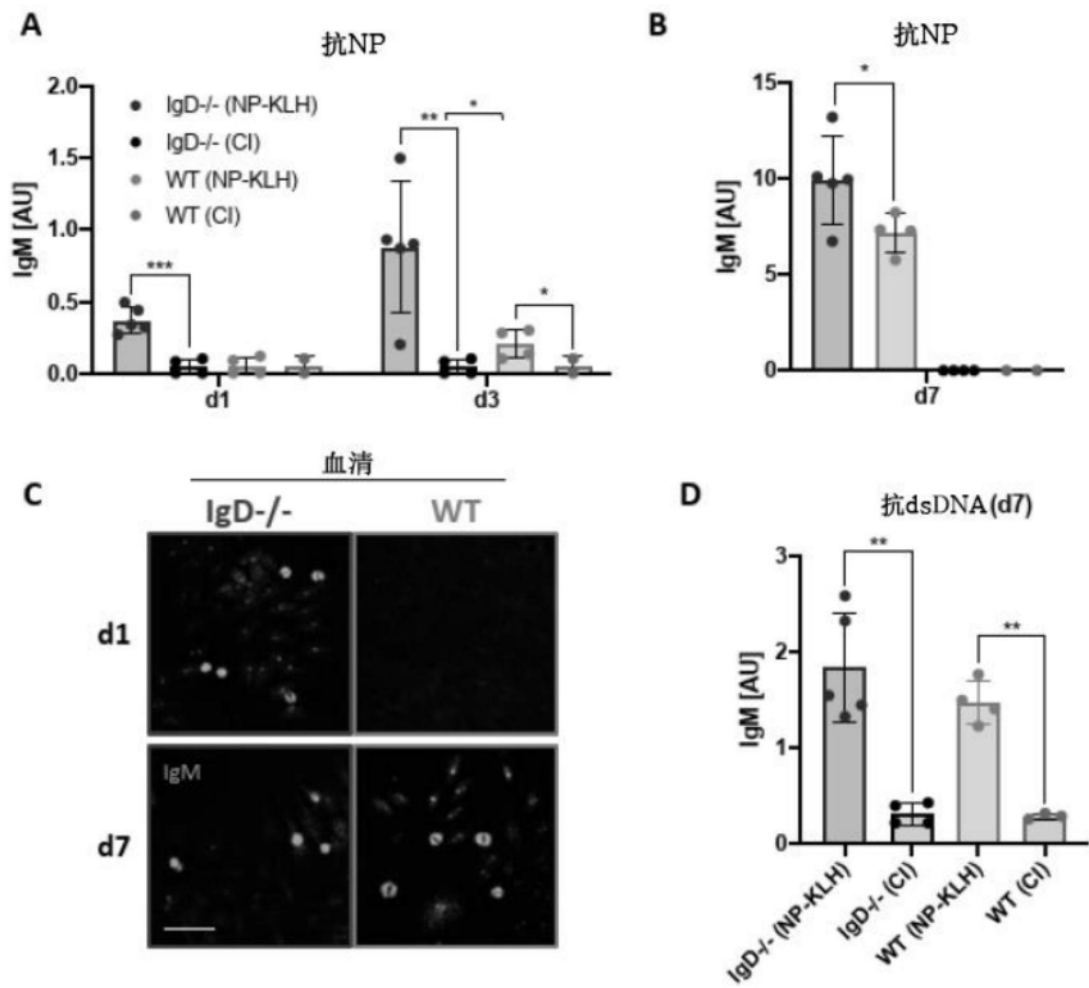


图23

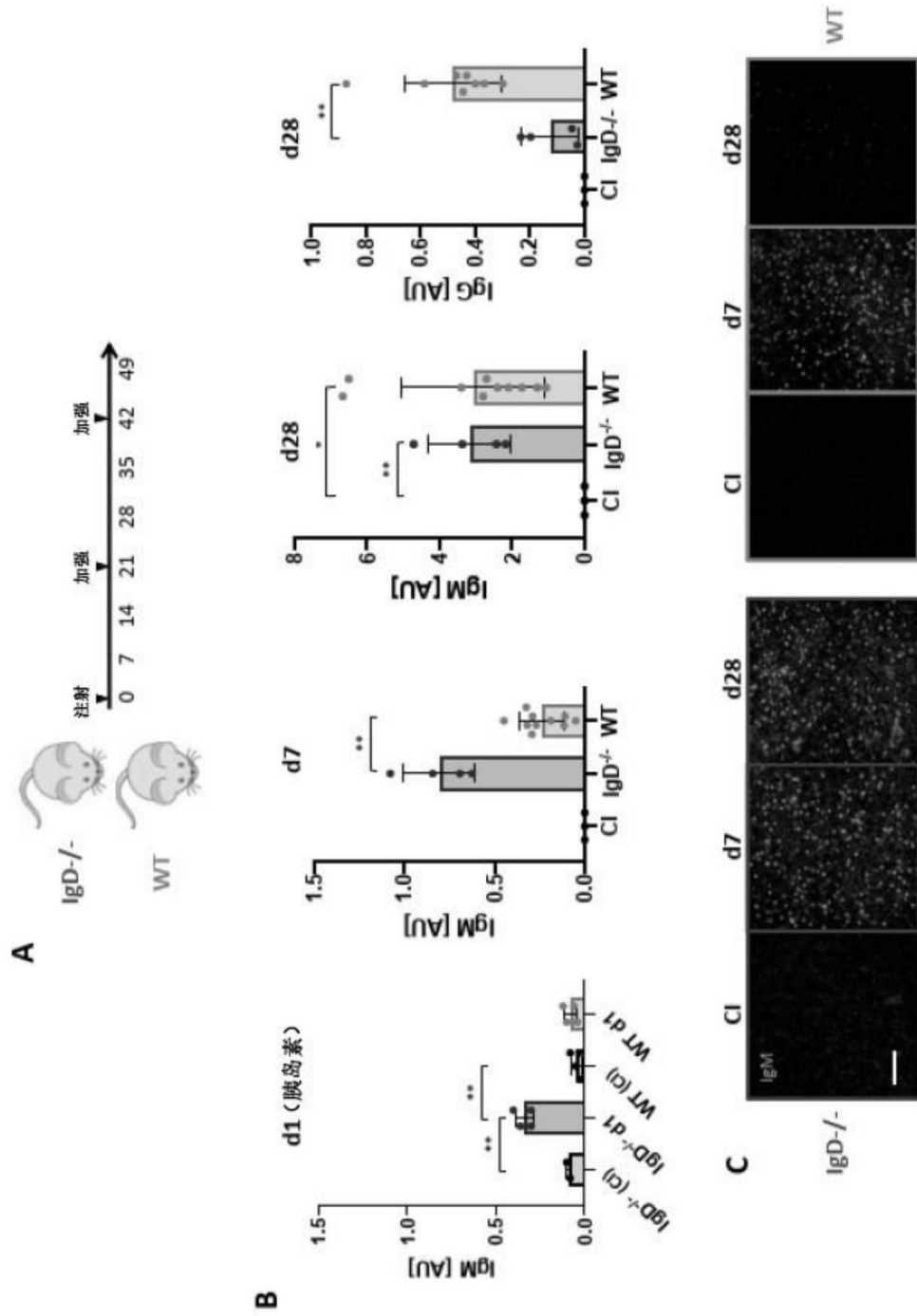


图24

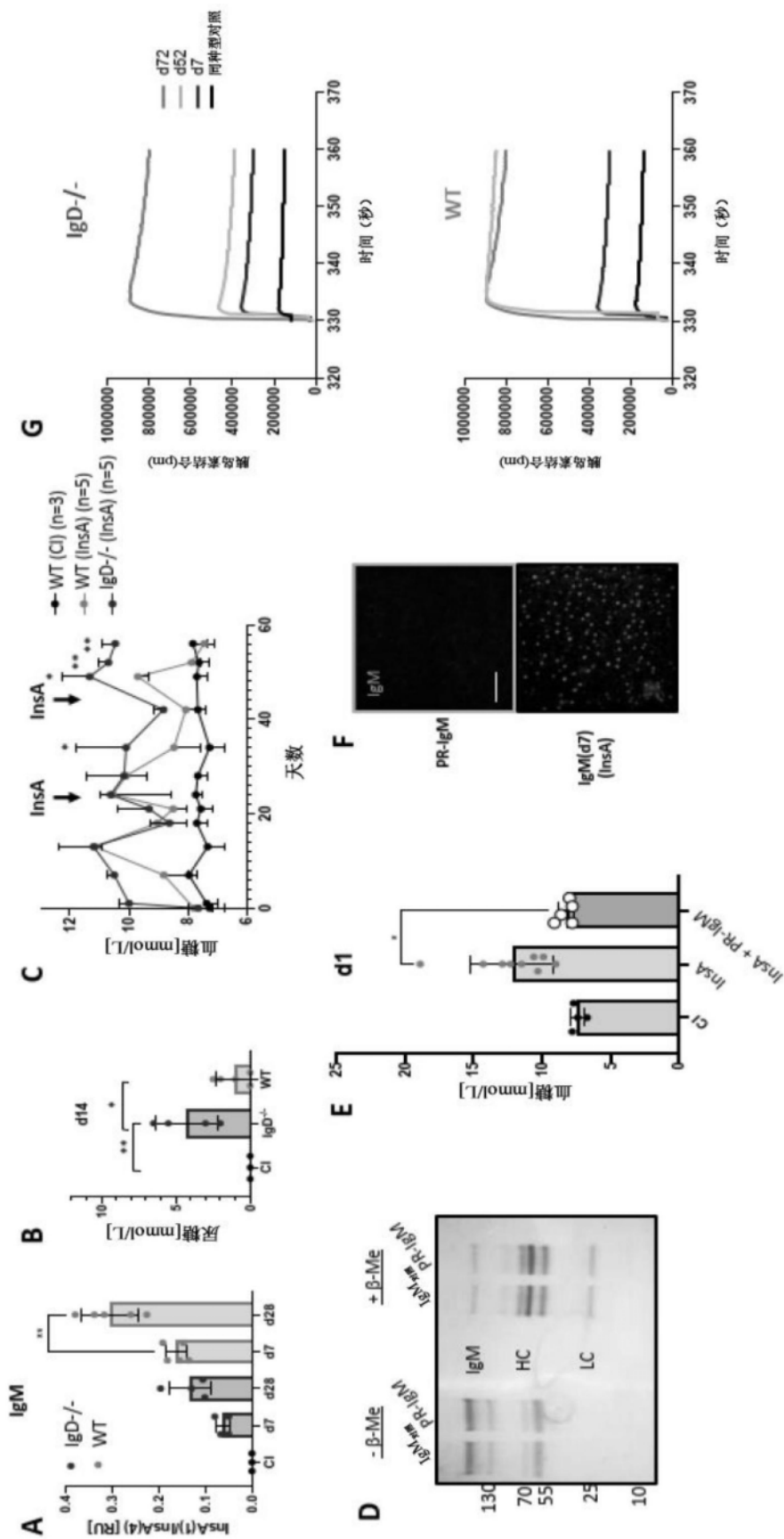


图25

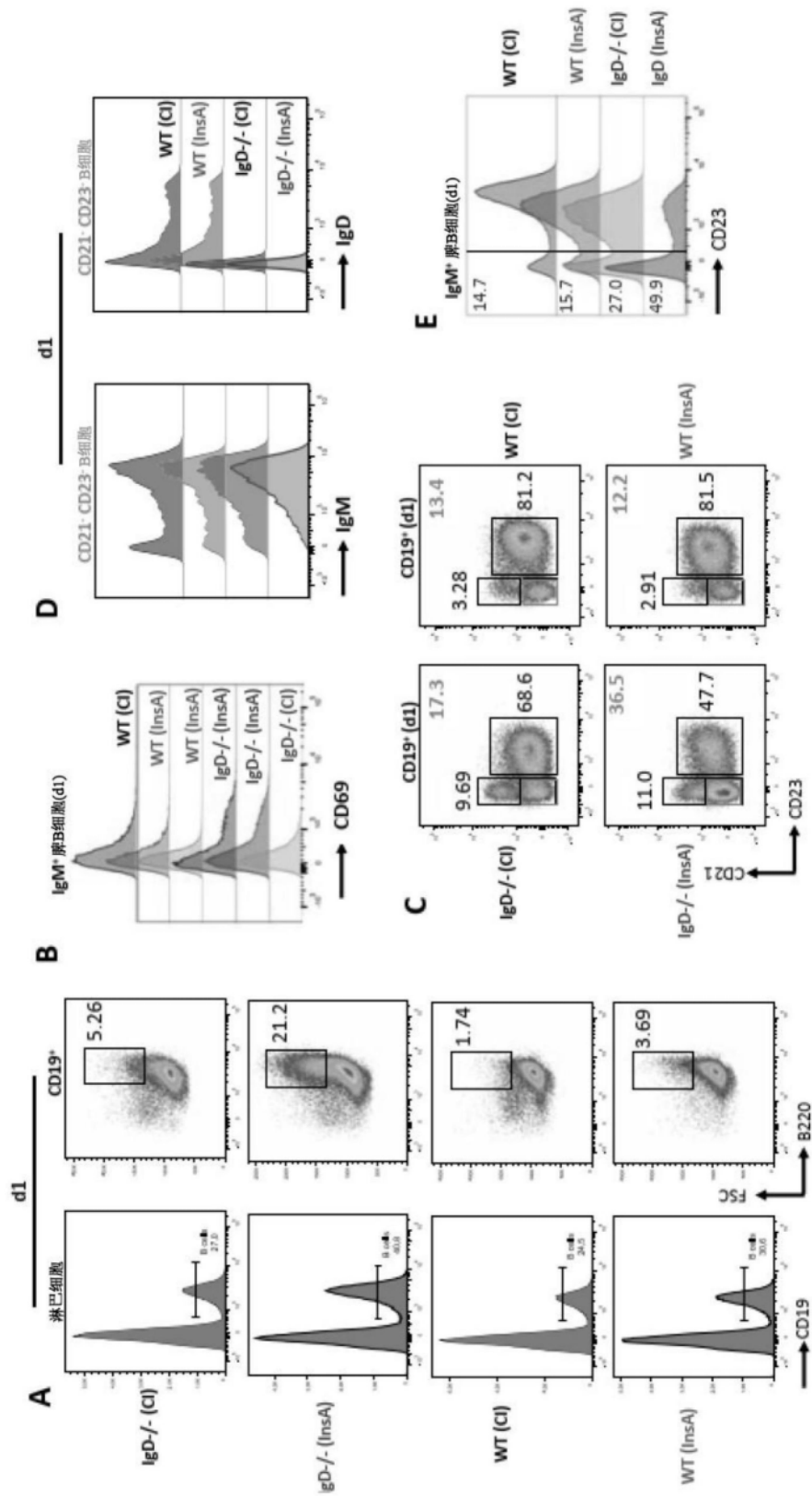


图26

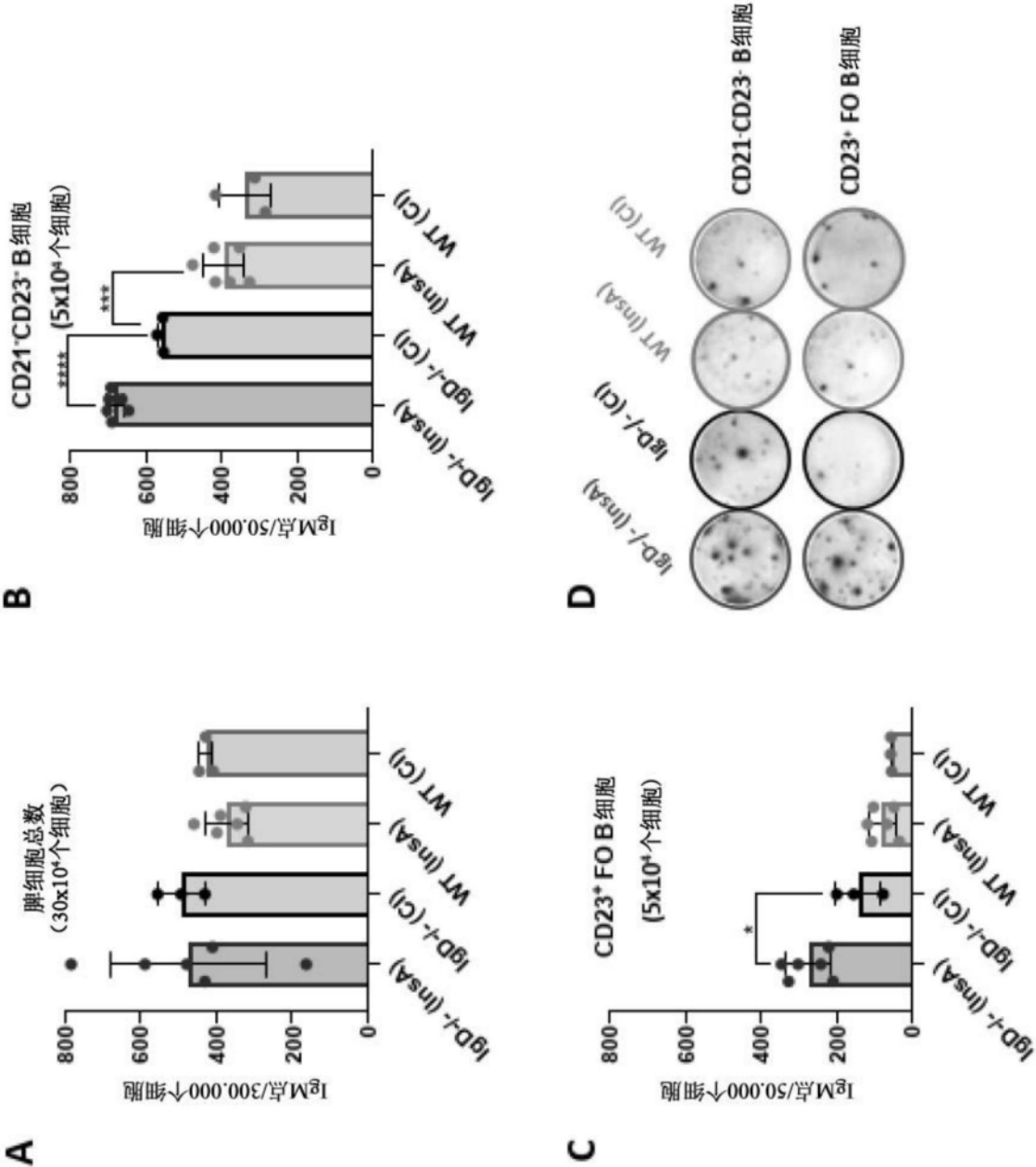


图27

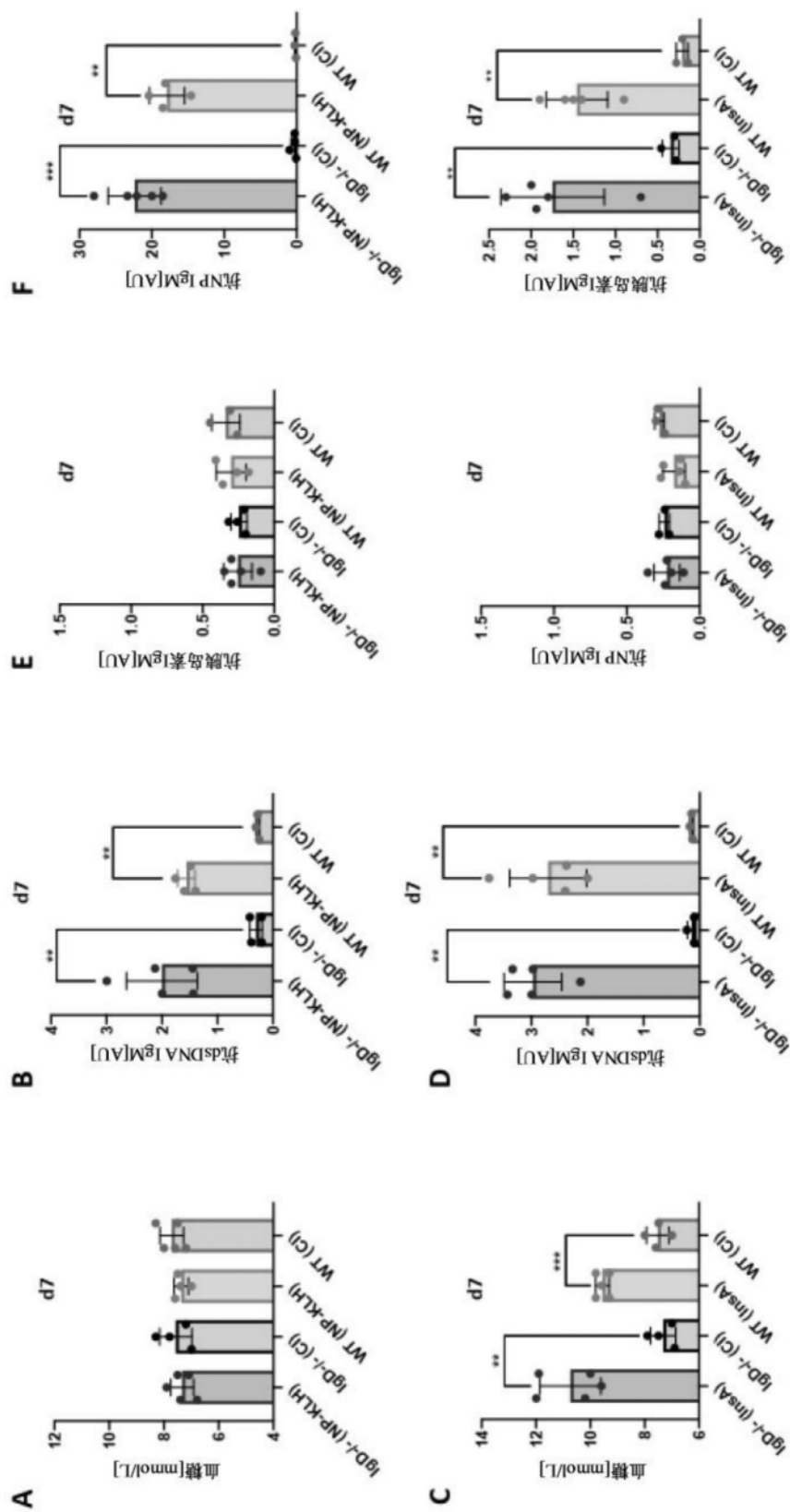


图28

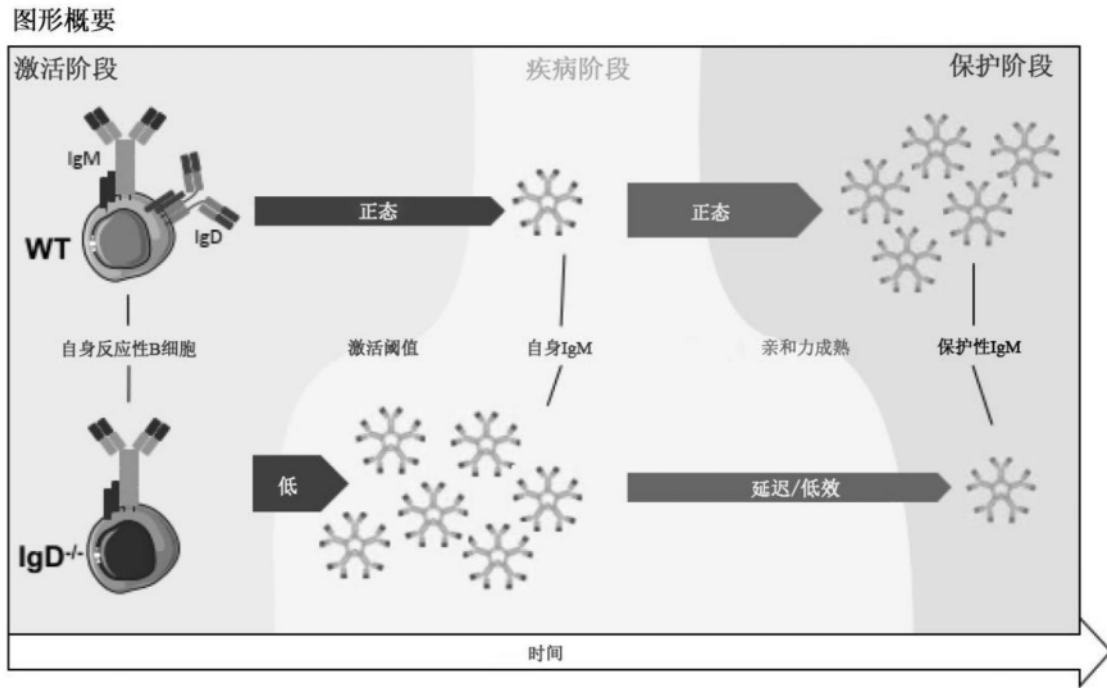


图29

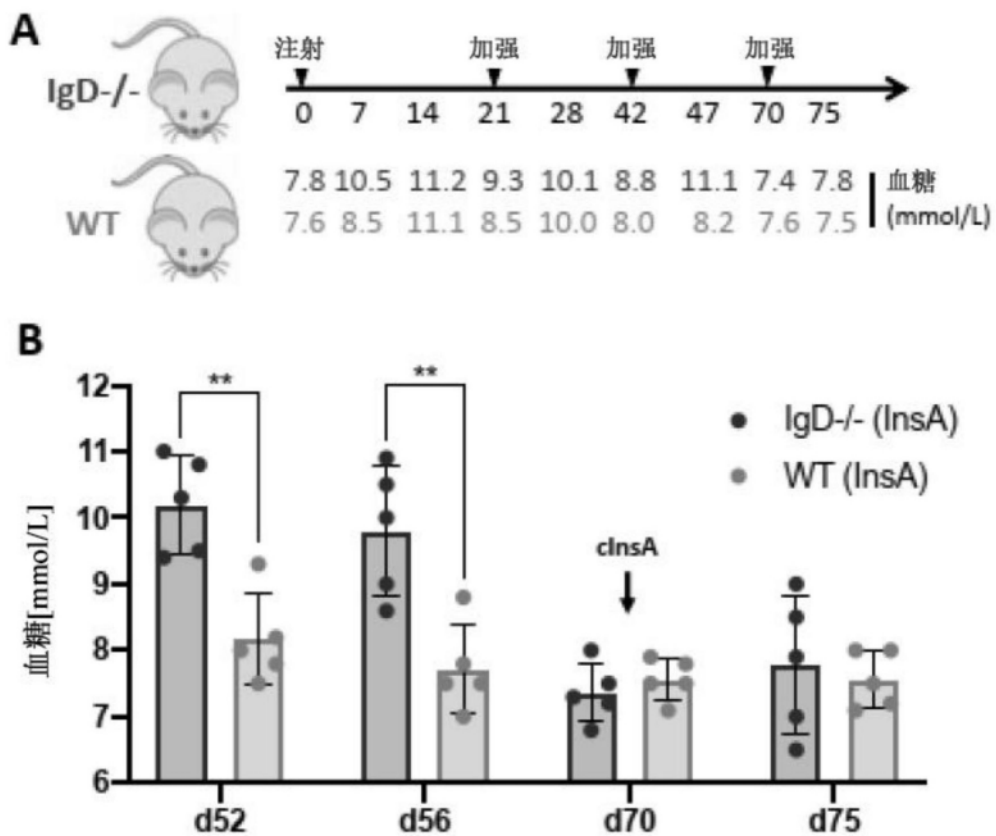


图30

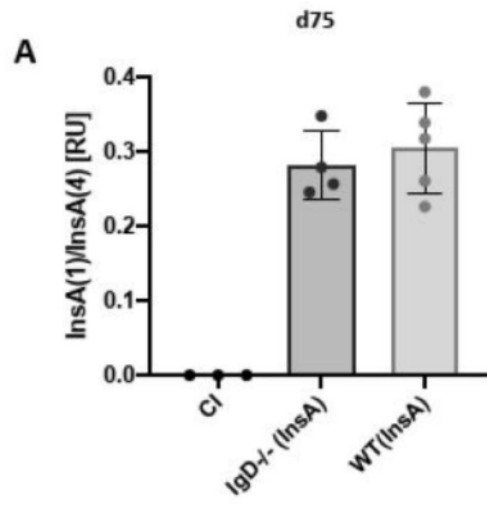


图31

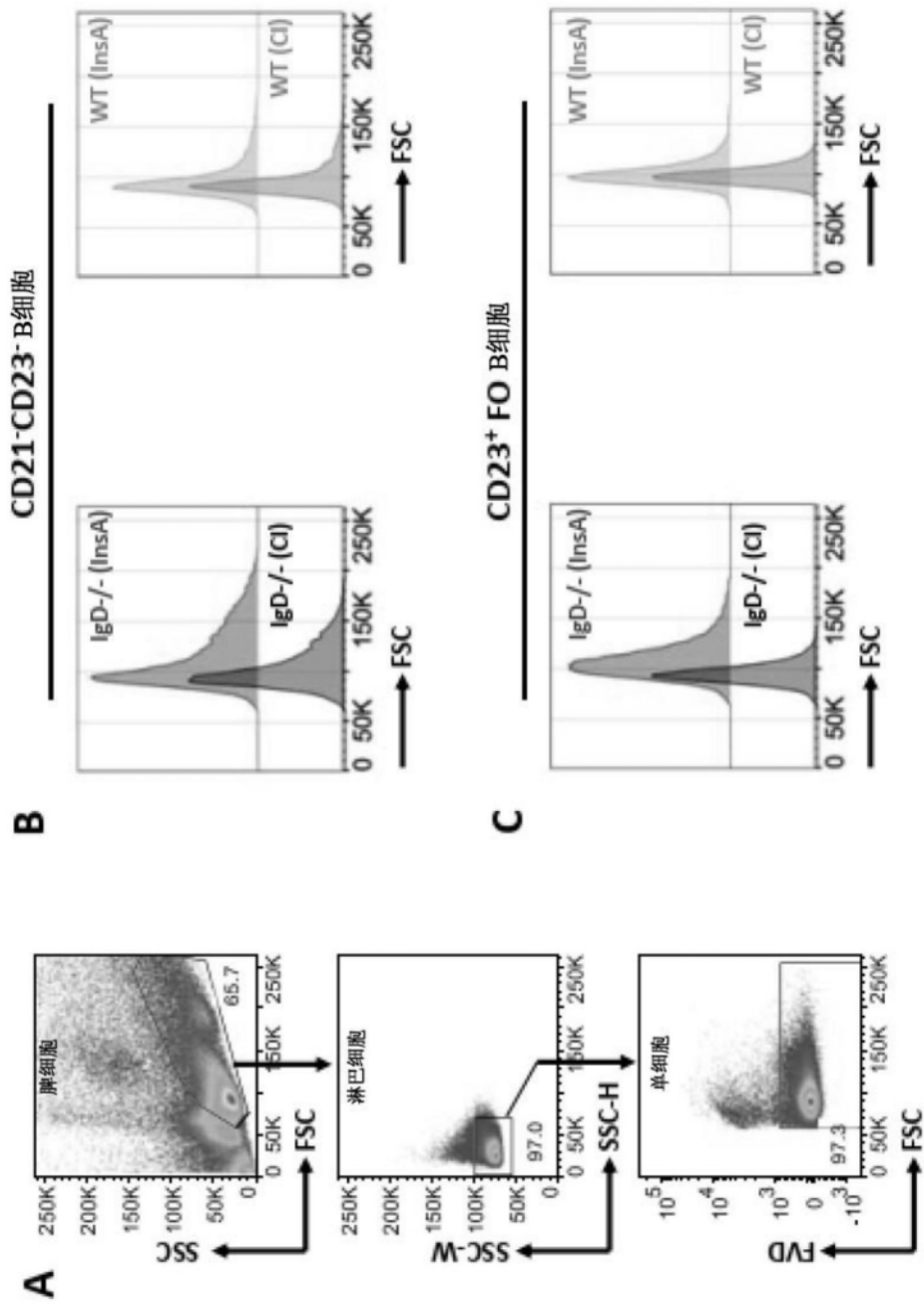


图32

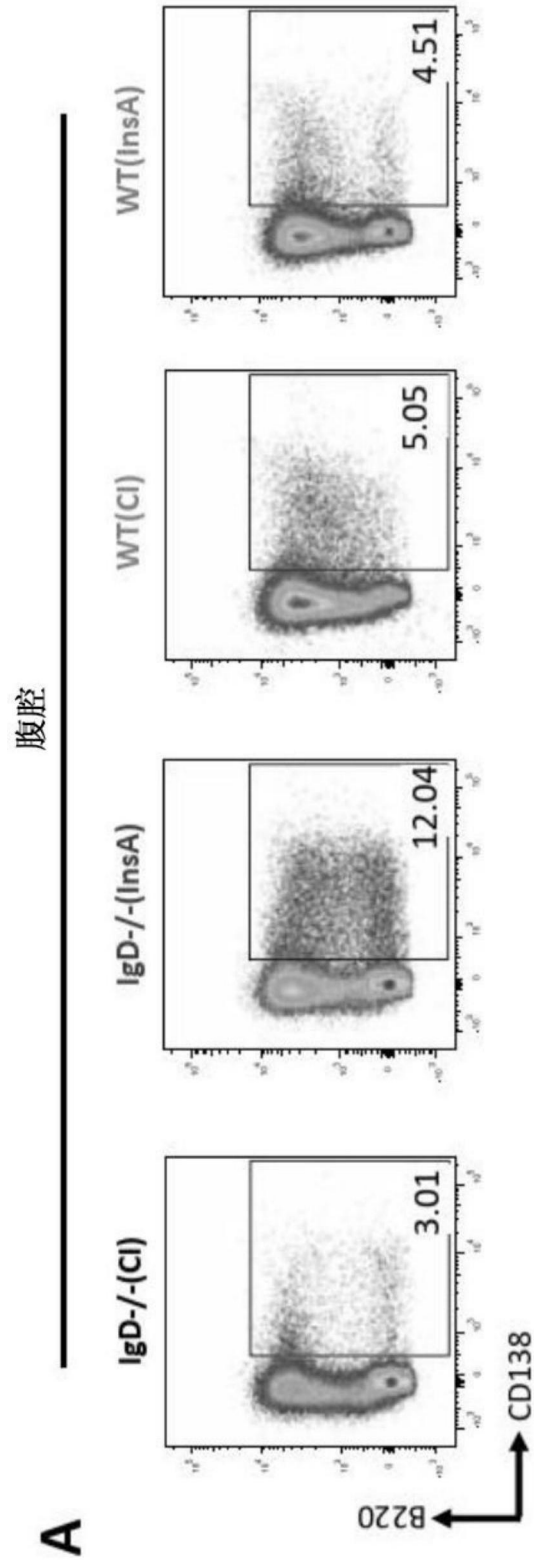


图33

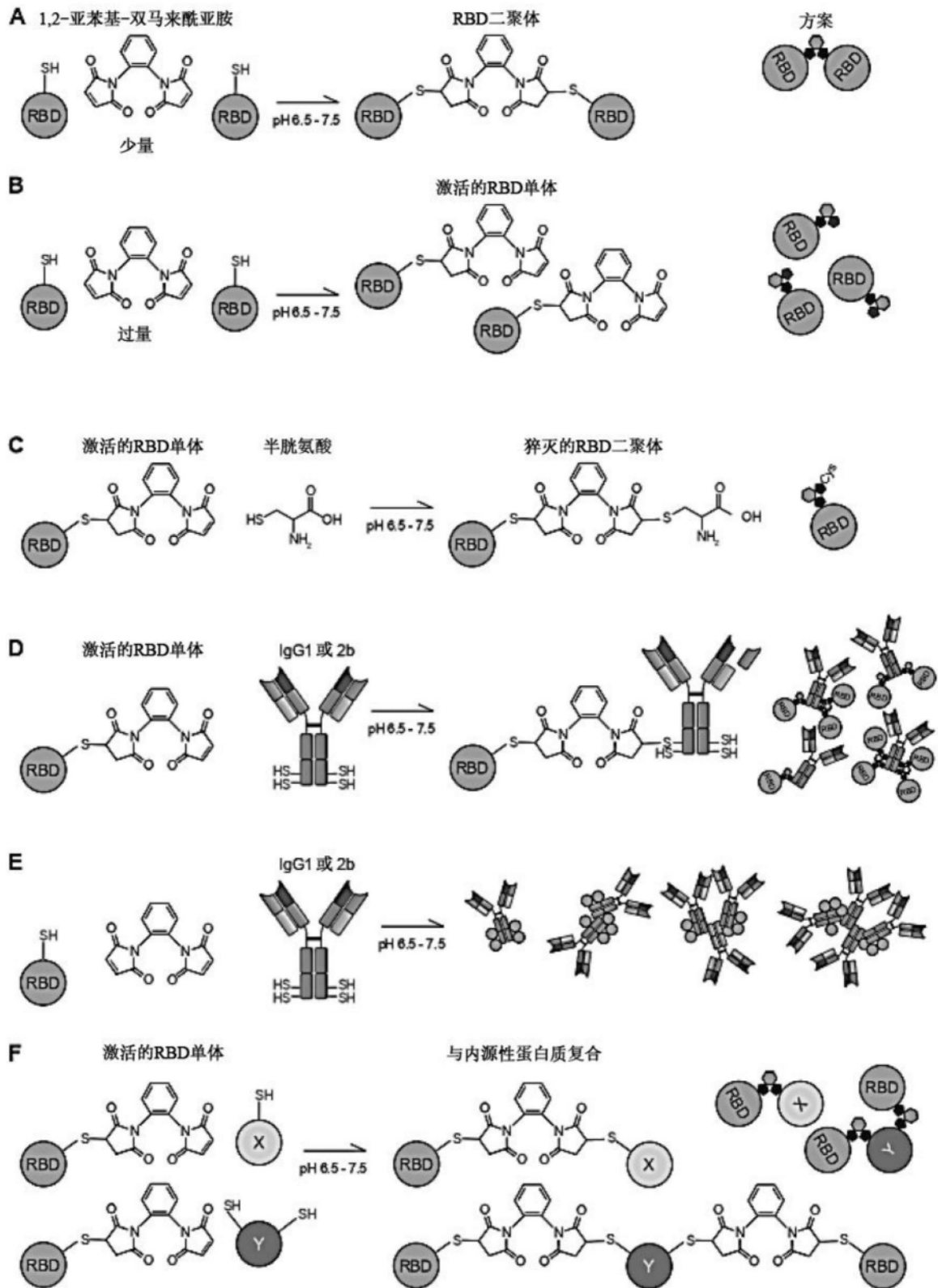


图34

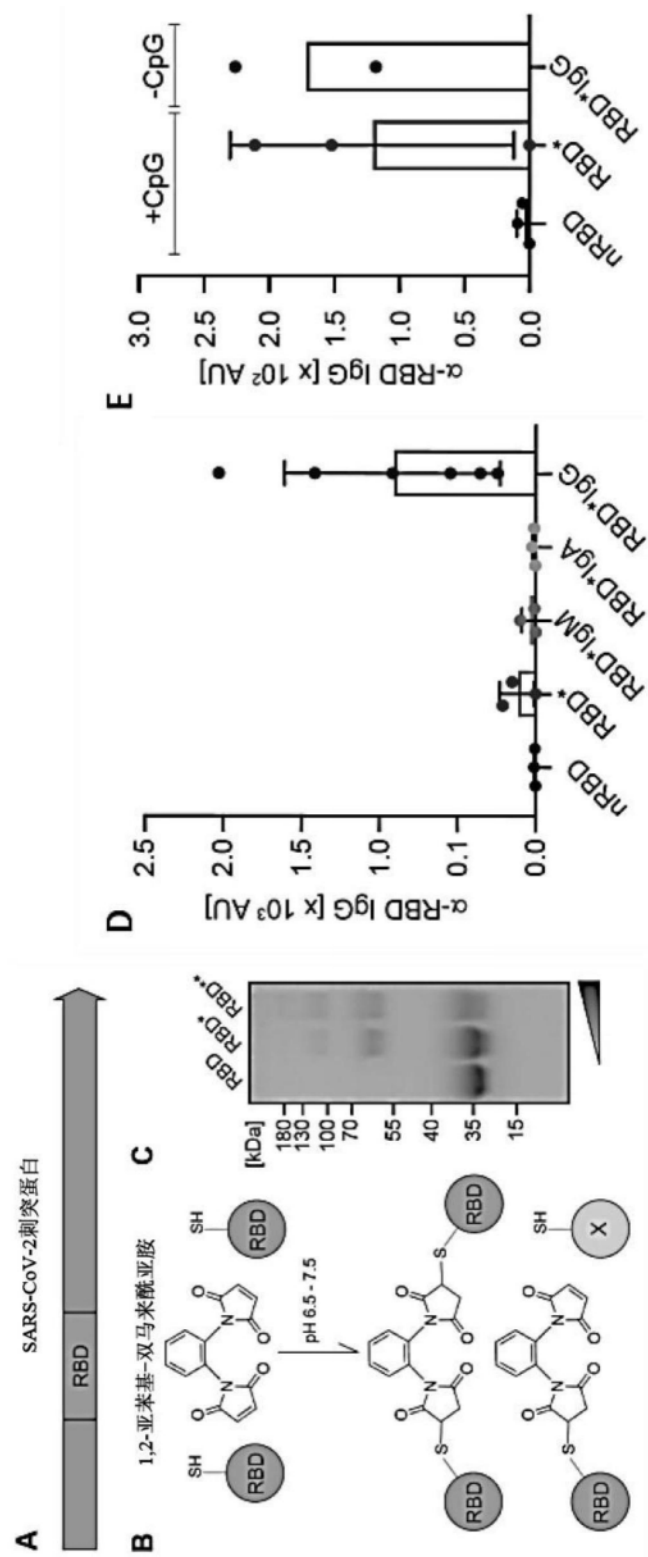


图35

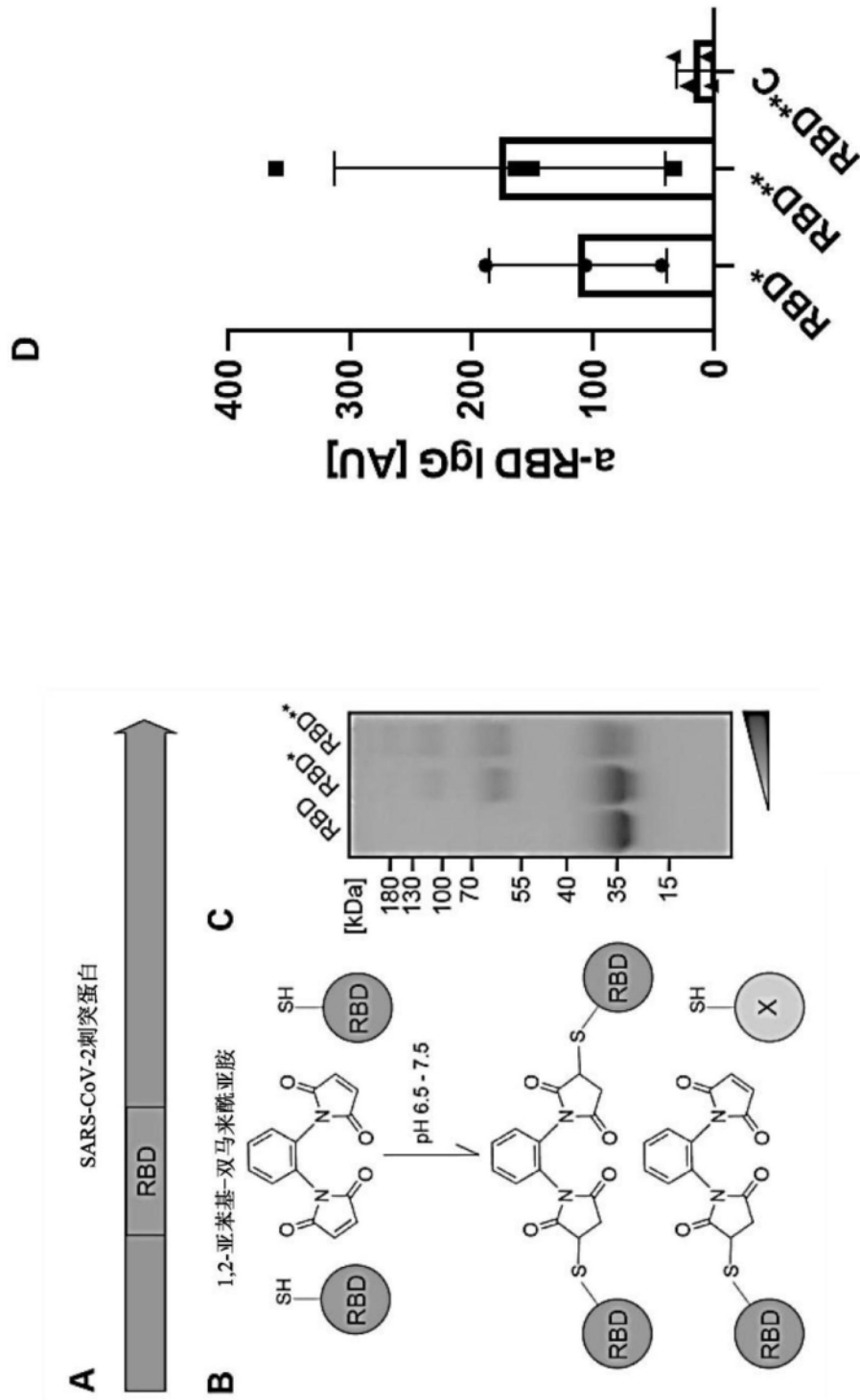


图36

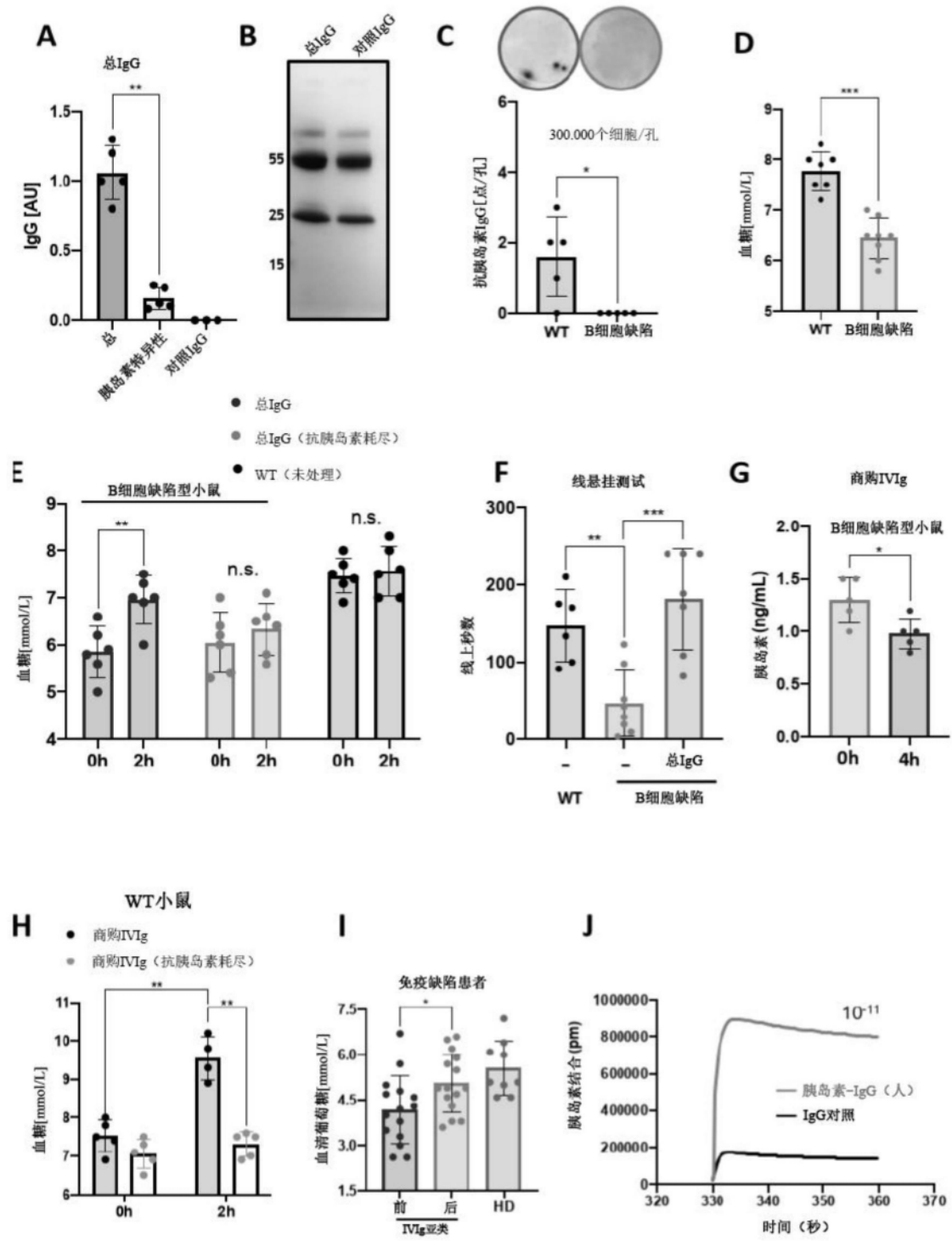


图37

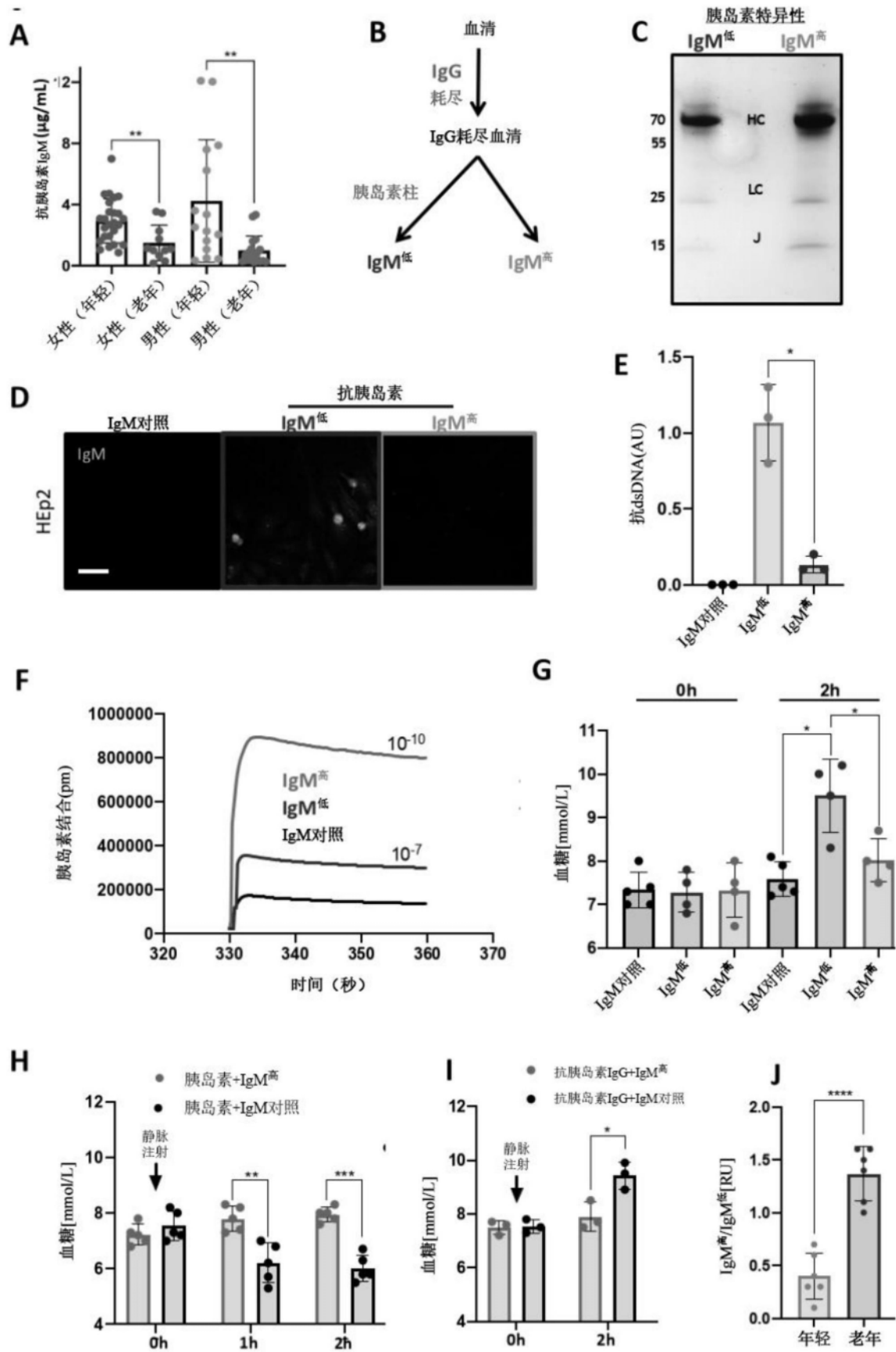


图38

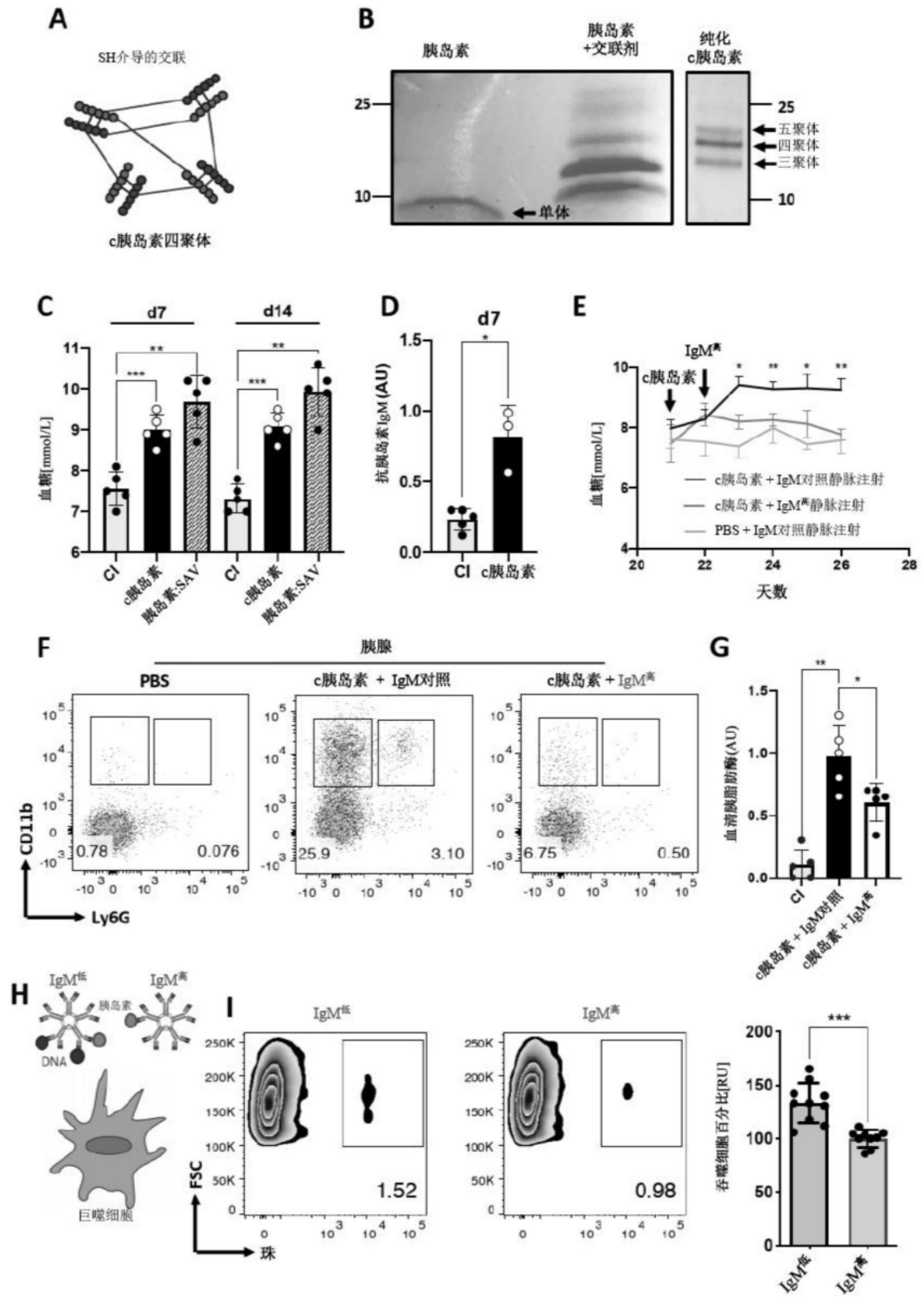


图39

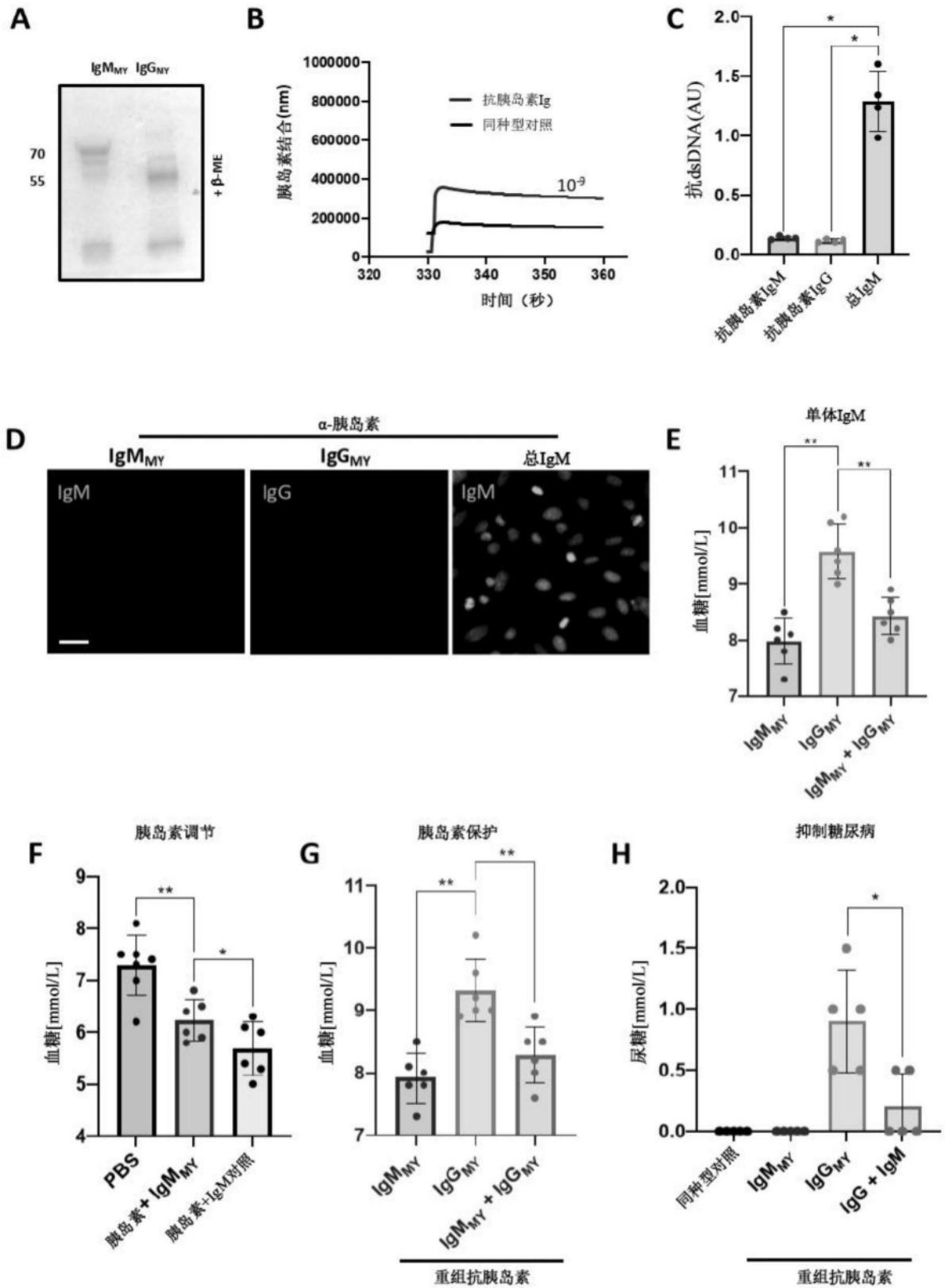


图40

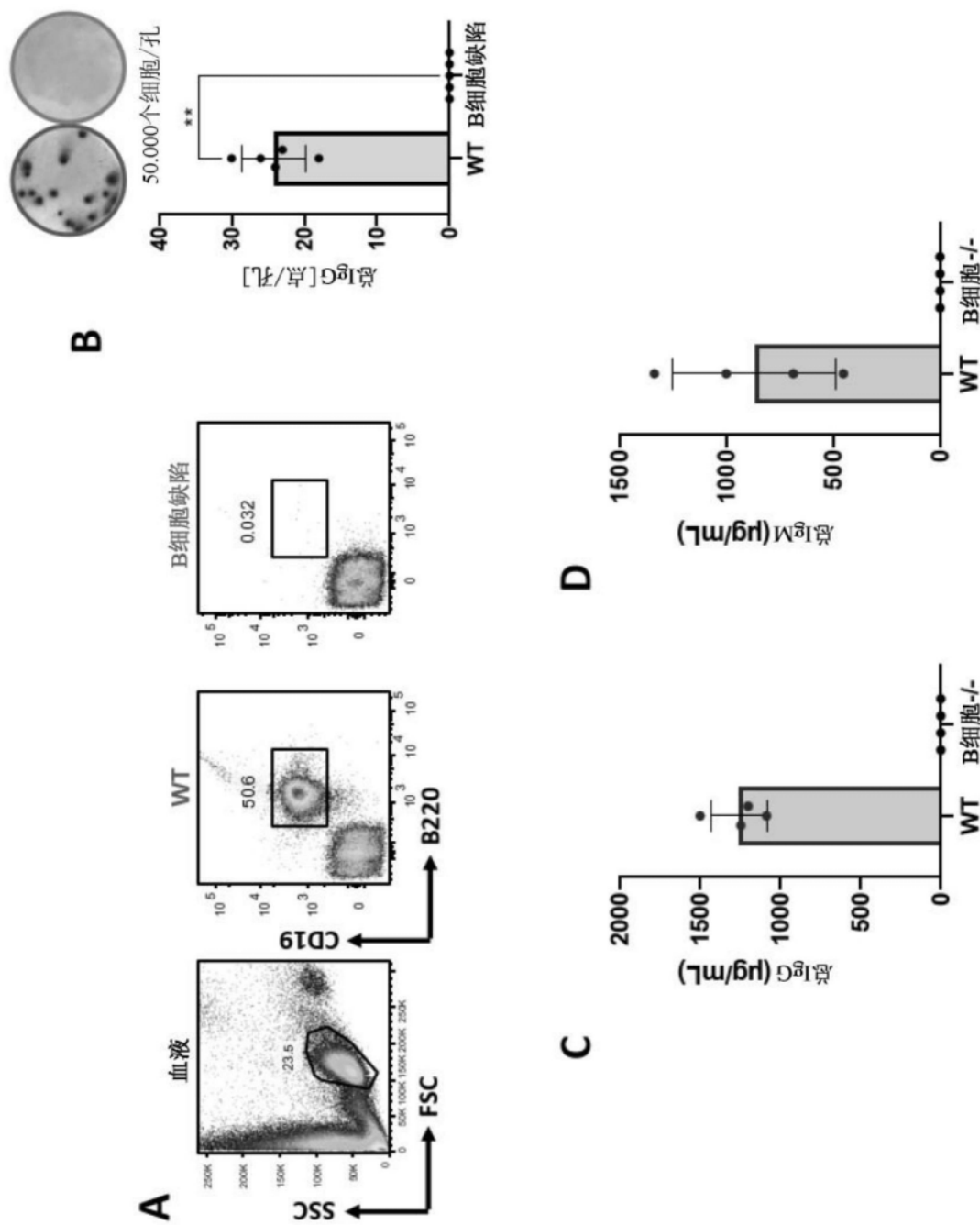


图41