(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114949187 A
(43)申请公布日 2022.08.30

(21)申请号 202210234712.4

(22)申请日 2015.07.10

(30)优先权数据
1413240.1 2014.07.25 GB

(62)分案原申请数据
201580049441.3 2015.07.10

(71)申请人 汉莎生物制药股份有限公司
地址 瑞典朗德市

(72)发明人 克里斯蒂安·吉尔曼
索菲亚·亚纳姆 丽娜·维斯特

(74)专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理事务所(普通合伙) 44348
专利代理师 何锦标

(51)Int.Cl.
A61K 38/47(2006.01)
A61K 38/48(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C12N 9/52(2006.01)
C12N 9/24(2006.01)
C07K 16/00(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

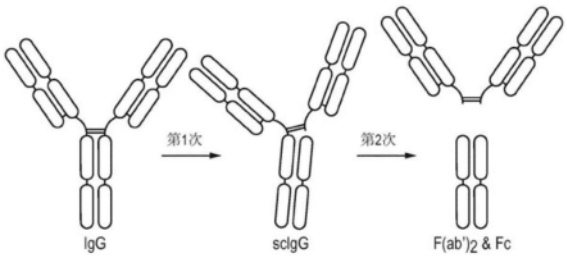
权利要求书4页 说明书55页
序列表6页 附图46页

(54)发明名称

改善疗法或治疗剂的益处的方法

(57)摘要

本发明涉及一种改善疗法或治疗剂对对象的益处的方法。该方法包括向该对象施用降低所述对象的血清IgG分子对Fc受体的结合的试剂；以及随后向所述对象施用所述疗法或所述治疗剂。本发明还涉及降低对象的致病性自身抗体的效果的方法，该方法包括(a)向该对象施用降低所述对象的血清IgG分子对Fc受体的结合的试剂；以及任选地(b)随后使该对象经受去除内源性自身抗体的治疗。本发明还涉及用于实施本发明的方法的试剂盒。



CN 114949187 A

1.一种改善疗法或治疗剂对对象的益处的方法,所述方法包括(a)向所述对象施用降低所述对象的血清IgG分子对Fc受体的结合的试剂;以及(b)随后向所述对象施用所述疗法或所述治疗剂;其中:

- 所述疗法是器官移植或所述治疗剂是抗体;

- 所施用的所述试剂的量足以消除所述对象的血清中实质上所有IgG分子对Fc受体的结合;并且

- 步骤(a)和步骤(b)以足以让所述对象的血清中存在的实质上所有IgG分子对Fc受体的结合被消除的时间间隔隔开。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述试剂选自:

(i)具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质;或

(ii)具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质。

3.根据权利要求2所述的方法,其中:

(i)具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质是来自例如化脓性链球菌的链球菌的IgG半胱氨酸蛋白酶,任选地,其中所述蛋白质是IdeS或MAC2;或者

(ii)具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是来自链球菌、假结核棒状杆菌、粪肠球菌或脑膜脓毒性菌的IgG内切糖苷酶,所述链球菌例如是化脓性链球菌、马链球菌或兽疫链球菌,任选地,其中所述蛋白质是EndoS、CP40、EndoE或EndoF2。

4.根据权利要求2所述的方法,其中

(i)具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质是包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成的蛋白质,或其具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的片段或变体;或

(ii)具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质是SEQ ID NO:2的氨基酸序列或由该氨基酸序列组成的蛋白质,或其具有IgG内切糖苷酶活性的片段或变体。

5.根据前述权利要求的任一项所述的方法,其中所述试剂通过静脉输液施用,并且/或者所施用的所述试剂的量为0.01mg/kg BW至2mg/kg BW、0.04至2mg/kg BW、0.12mg/kg BW至2mg/kg BW、0.24mg/kg BW至2mg/kg BW或1mg/kg BW至2mg/kg BW。

6.根据前述权利要求的任一项所述的方法,其中:

- 步骤(a)和(b)之间的时间间隔的下限选自:至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少4小时、至少5小时或至少6小时;并且

- 步骤(a)和(b)之间的时间间隔的上限选自:最多21天、最多18天、最多14天、最多13天、最多12天、最多11天、最多10天、最多9天、最多8天、最多7天、最多6天、最多5天、最多4天、最多3天、最多2天、最多24小时、最多18小时、最多12小时、最多10小时、最多8小时、最多7小时或最多6小时。

7.根据前述权利要求的任一项所述的方法,其中步骤(a)和(b)之间的时间间隔为30分钟至1小时、30分钟至2小时、30分钟至3小时、30分钟至4小时、30分钟至5小时、30分钟至6小时、1至2小时、1至3小时、1至4小时、1至5小时、1至6小时、2至3小时、2至4小时、2至5小时、2至6小时、3至4小时、3至5小时、3至6小时、4至5小时、4至6小时或5至6小时。

8.根据前述权利要求的任一项所述的方法,其中所述治疗剂是被施用以用来治疗癌症或另一种疾病的抗体,任选地,其中所述癌症是前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾(肾细胞)癌、食管癌、甲状腺癌,淋巴瘤、皮肤

癌,黑色素瘤或白血病。

9.根据权利要求1至7任一项所述的方法,其中所述疗法是一种抗体,该抗体为Abagovomab、Abciximab、Actoxumab、Adalimumab、Adecatumumab、Afelimomab、Afutuzumab、Alacizumab pegol、ALD518、Alemtuzumab、Alirocumab、Altumomab pentetate、Amatuximab、Anatumomab mafenatox、Anrukinzumab、Apolizumab、Arcitumomab、Aselizumab、Atinumab、Atlizumab (= tocilizumab)、Atorolimumab、Bapineuzumab、Basiliximab、Bavituximab、Bectumomab、Belimumab、Benralizumab、 Bertilimumab、Besilesomab、Bevacizumab、Bezlotoxumab、Biciromab、Bimagrumab、Bivatuzumab mertansine、Blinatumomab、Blosozumab、Brentuximab vedotin、Briakinumab、Brodalumab、Canakinumab、Cantuzumab mertansine、Cantuzumab ravtansine、Caplacizumab、Capromab pendetide、Carlumab、Catumaxomab、CC49、 Cedelizumab、Certolizumab pegol、Cetuximab、Ch.14.18、Citatuzumab bogatox、Cixutumumab、Clazakizumab、Clenoliximab、Clivatuzumab tetraxetan、Conatumumab、Concizumab、Crenezumab、CR6261、Dacetuzumab、Daclizumab、Dalotuzumab、Daratumumab、Demcizumab、Denosumab、Detumomab、Dorlimomab aritox、Drozitumab、Duligotumab、Dupilumab、Dusigitumab、Ecromeximab、Eculizumab、Edobacomab、Edrecolomab、Efalizumab、Efungumab、Elotuzumab、Elsilimomab、Enavatuzumab、Enlimomab pegol、Enokizumab、Enoticumab、Ensituximab、Epitumomab cituxetan、Epratuzumab、Erlizumab、Ertumaxomab、Etaracizumab、Etrolizumab、Evolocumab、Exbivirumab、Fanolesomab、Faralimomab Farletuzumab、Fasinumab、FBTA05、Felvizumab、Fezakinumab、Ficlatuzumab、Figitumumab、Flanvotumab、Fontolizumab、Foralumab、Foravirumab、Fresolimumab、Fulranumab、Futuximab、Galiximab,Ganitumab、Gantenerumab、Gavilimomab、Gemtuzumab ozogamicin、Gevokizumab、Girentuximab、Glembatumumab vedotin、Golimumab、Gomiliximab、GS6624、Ibalizumab、Ibritumomab tiuxetan、Icrucumab、Igovomab、Imciromab、Imgatuzumab、Inclacumab、Indatuximab ravtansine、Infliximab、Intetumumab、Inolimomab、Inotuzumab ozogamicin、Ipilimumab、Iratumumab、Itolizumab、Ixekizumab、Keliximab、Labetuzumab、Lampalizumab、Lebrikizumab、Lemalesomab、Lerdelimumab、Lexatumumab、Libivirumab、Ligelizumab、Lintuzumab、Lirilumab、Lodelcizumab、Lorvotuzumab mertansine、Lucatumumab、Lumiliximab、Mapatumumab、Maslimomab、 Mavrilimumab、Matuzumab、Mepolizumab、Metelimumab、Milatuzumab、Minretumomab、Mitumomab、Mogamulizumab、Morolimumab、Motavizumab、Moxetumomab pasudotox、Muromonab-CD3、Nacolomab tafenatox、Namilumab、Naptumomab estafenatox、Narnatumab、Natalizumab、Nebacumab、Necitumumab、Nerelimomab、Nesvacumab、Nimotuzumab、Nivolumab、Nofetumomab merpentan、Ocaratuzumab、Ocrelizumab、Odulimomab、Ofatumumab、Olaratumab、Olokizumab、Omalizumab、Onartuzumab、Oportuzumab monatox、Oregovomab、Orticumab、Otelixizumab、Oxelumab、Ozanezumab、Ozoralizumab、Pagibaximab、Palivizumab、Panitumumab、Panobacumab、Parsatuzumab、Pascolizumab、Pateclizumab、Patritumab、Pemtumomab、Perakizumab、Pertuzumab、Pexelizumab、Pidilizumab、Pinatuzumab

vedotin、Pintumomab、Placulumab、Polatuzumab vedotin、Ponezumab、Priliximab、Pritoxaximab、Pritumumab、PRO 140、Quilizumab、Racotumomab、Radretumab、Rafivirumab、Ramucirumab、Ranibizumab,Raxibacumab、Regavirumab、Reslizumab、Rilotumumab、Rituximab、Robatumumab、Roledumab、Romosozumab、Rontalizumab、Rovelizumab、Ruplizumab、Samalizumab、Sarilumab、Satumomab pendetide、Secukinumab、Seribantumab、Setoxaximab、Sevirumab、Sibrotuzumab、Sifalimumab、Siltuximab、Simtuzumab、Siplizumab、Sirukumab、Solanezumab、Solitomab、Sonepcizumab、Sontuzumab、Stamulumab、Sulesomab、Suvizumab、Tabalumab、Tacatuzumab tetraxetan、Tadocizumab、Talizumab、Tanezumab、Taplitumomab paptox、Tefibazumab、Telimomab aritox、Tenatumomab、Teneliximab、Teplizumab、Teprotumumab、TGN1412、Ticilimumab (= tremelimumab)、Tildrakizumab、Tigatuzumab、TNX-650、Tocilizumab (= atlizumab)、Toralizumab、Tositumomab、Tralokinumab、Trastuzumab、TRBS07、Tregalizumab、Tremelimumab Tucotuzumab celmoleukin、Tuvirumab、Ublituximab、Urelumab、Urtoxazumab、Ustekinumab、Vapaliximab、Vatelizumab、Vedolizumab、Veltuzumab,Vepalimomab Vesencumab、Visilizumab、Volociximab、Vorsetuzumab mafodotin、Votumumab、Zalutumumab、Zanolimumab、Zatuximab、Ziralimumab或Zolimomab aritox。

10.根据权利要求1至7任一项所述的方法,其中所述疗法是器官移植,任选地,其中所述器官是肾脏、肝脏、心脏、胰腺、肺或小肠。

11.根据权利要求10所述的方法,其中所述方法还包括在移植时或紧接在移植前进行的步骤,该步骤包括诱导抑制患者的T细胞和/或B细胞。

12.根据权利要求11所述的方法,其中所述诱导抑制包括施用有效量的以下抗体中的至少一种:Muromonab、Basiliximab、Daclizumab、抗胸腺细胞球蛋白(ATG)抗体、淋巴细胞免疫球蛋白、抗胸腺细胞球蛋白制剂(ATGAM)或Rituximab。

13.一种去除对象的抗体和/或降低对象的抗体的效果的方法,所述方法包括(a)向该对象施用降低该对象的血清IgG分子对Fc受体的结合的试剂;以及,任选地(b)随后使该对象经受去除内源性自身抗体的治疗;其中所述去除内源性自身抗体的治疗是血浆置换或免疫吸附,或是施用阻止血清中抗体借由FcRn受体再循环的试剂从而降低半衰期,并且步骤(a)和(b)间隔至少1周的时间间隔。

14.根据权利要求13所述的方法,所述方法包括以不高于每6个月一次的频率重复步骤(a),任选地其中所述试剂是如权利要求2至4的任一项所定义的试剂。

15.一种根据前述权利要求的任一项所述的方法,其中在步骤(a)之后,并且如果存在步骤(b)的话在步骤(b)之前进行额外的步骤(a1),其中步骤(a1)包括:

(i)向该对象施用特异性结合至由步骤(a)中施用的试剂作用于膜结合IgG而产生的表位的试剂,其中所述施用在步骤(a)后的时间段内但在BCR复合物的完整膜结合IgG水平恢复至步骤(a)之前的相同水平之前进行;或

(ii)向该对象施用特异性结合至完整的膜结合IgG的表位的试剂,其中所述施用在步骤(a)之后的时间段内进行,在该时间段内BCR复合物中的完整膜结合IgG的水平已恢复至与步骤(a)之前类似的水平,但新合成的IgG尚未在血清中再现。

16.根据权利要求15所述的方法,其中步骤(a1)的试剂根据(i)在步骤(a)完成后至多

12小时施用,或者其中步骤(a1)的试剂根据(ii)在步骤(a)完成后12小时至4天之间施用。

17.根据权利要求15或16所述的方法,其中步骤(a)包括施用具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的试剂,该试剂任选地为在权利要求3或4中所定义的,并且其中:

- 步骤(a1)的试剂根据(i)施用,并且是特异性地结合至由步骤(a)的试剂酶切膜结合IgG而产生的膜结合Fc片段的试剂;或者

- 步骤(a1)的试剂根据(ii)施用,并且是特异性地结合至完整的膜结合IgG的表位的试剂,任选地,其中所述试剂是抗独特型的。

18.根据权利要求15至17的任一项所述的方法,其中步骤(a1)的所述试剂是抗体,所述抗体任选地结合至细胞毒素。

19.一种评价取自个体的样品中完整IgG的数量的方法,所述方法包括:

(i)将样品与特异性结合至IgG的$F(ab')_2$部分的第一试剂一起孵育;

(ii)将样品与特异性结合至IgG的Fc部分的第二试剂一起孵育;

(iii)通过测定这两种试剂的存在来测定所述样品中完整IgG的浓度。

20.根据权利要求19所述的方法,其中所述第一试剂结合至IgG的Fc部分,并且所述第二试剂结合至IgG的$F(ab')_2$部分,或反之亦然。

21.根据权利要求19或20所述的方法,其中所述第一试剂固定于一个表面,所述第二试剂游离于溶液中。

22.根据权利要求19至21的任一项所述的方法,其中所述个体或所述样品已被具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的试剂处理,任选地,其中所述试剂是IgG半胱氨酸蛋白酶,所述蛋白酶任选地如在权利要求3或4中所定义的。

23.根据权利要求19至22的任一项所述的方法,其中所述方法被进行的目的是评价所述具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的试剂的效力。

改善疗法或治疗剂的益处的方法

本申请为2017年03月14日进入中国国家阶段、申请号201580049441.3、申请日为2015 年07月10日、发明名称为“一种方法”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0001] 本发明涉及一种改善疗法或治疗剂对对象的益处的方法。该方法包括(a)向该对象施用降低该对象体内血清IgG分子的Fc受体结合的试剂;并且(b)然后向该患者施用所述疗法或所述治疗剂。本发明还涉及一种减少对象体内致病性自身抗体的方法,所述方法包括(a)向该对象施用降低该对象体内血清IgG分子的Fc受体结合的试剂;以及任选地 (b)然后使该对象经受去除内源性自身抗体的治疗。本发明还涉及用于进行本发明的方法的试剂盒。

背景技术

[0002] 抗体是免疫系统的成分,抗体将其他免疫系统成分招募至体内的特定靶点。抗体通过Fab结构域的特异性实现对靶抗原的特异性。抗体通过抗体的可结晶片段(Fc)结构域与免疫细胞表面上表达的Fc受体(FcR)相互作用而招募免疫系统的其他成分。哺乳动物血清中的主要抗体通常是G类免疫球蛋白(IgG):IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。这些抗体结合人FcR:FcγRI、RγIIa、RγIIb、RγIIIa和FcγRn以及补体Fc受体C1q。IgG分子招募细胞免疫系统的功效收到Fc与FcR的亲和力的影响。抗体的Fc结构域与FcR之间的相互作用对于作为治疗剂施用的抗体的作用以及在各种自身免疫疾病(包括抗体介导的移植排斥)中起致病作用的抗体的作用都是重要的。

发明内容

[0003] 本发明的发明人令人惊讶地显示出可以使用一种试剂来完全、快速、暂时并且安全地消除患者的血清中所有或实质上所有的IgG分子对Fc受体的结合。这就创造出一段确定长度的窗口期,在该窗口期内,如果施用了治疗性抗体,它将具有增强的效果,因为它不必与内源性IgG竞争结合Fc受体。因此,在一个实施方式中,该方法可被用来治疗使用治疗性抗体治疗的疾病。

[0004] 该确定长度的窗口期也可被用来施用一种疗法,例如器官移植,这种疗法在其他情况下由于患者血清中存在的抗供体IgG抗体的作用而无效。因此,在一个实施方式中,该方法可被用来在器官移植之前对患者进行脱敏。

[0005] 因此,本发明提供一种改善疗法或治疗剂对对象的益处的方法,该方法包括(a)向该对象施用降低该对象体内血清IgG分子对Fc受体结合的试剂;并且(b)然后向该患者施用所述疗法或所述治疗剂;其中:

[0006] -所述试剂的施用量足以消除该对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合;并且

[0007] -步骤(a)和步骤(b)以足以使该对象血清中存在的实质上所有IgG分子对Fc受体

的结合被消除的时间间隔隔开。

[0008] 所述间隔通常可为至少30分钟，并且最多21天。

[0009] 本发明还可用来去除或减少对象体内的抗体的效应。这对于患有自身免疫疾病的患者可能特别有帮助，该自身免疫疾病完全或部分由致病性自身抗体介导，例如Guillain-Barre综合征或Goodpastures综合征。因此，本发明还涉及去除或减少对象体内的抗体效应的方法，所述方法包括(a)向该对象施用降低该对象体内血清IgG分子的Fc受体结合的试剂；以及任选地(b)然后使该对象经受去除内源性自身抗体的治疗；其中

[0010] -步骤(a)和步骤(b)间隔至少2周的时间间隔；并且

[0011] -所述去除内源性自身抗体的治疗是血浆除去法或免疫吸附法，或是施用阻止基于FcRn受体的血清抗体再循环的试剂(例如抗FcRn抗体)，从而缩短抗体半衰期。

[0012] 本发明还提供一种评估从个体取出的样品中的完整IgG的数量的方法，所述方法包括：

[0013] (i)将该样品与特异性结合至IgG的$F(ab')_2$部分的第一试剂一起孵育；

[0014] (ii)将该样品与特异性结合至IgG的Fc部分的第二试剂一起孵育；

[0015] (iii)通过测定两种试剂的存在量来确定该样品中完整IgG的浓度。

[0016] 本发明还提供用于进行本发明的方法的试剂盒。

附图说明

[0017] 图1.IdeS裂解IgG的示意图。完整的人IgG(无论同种型如何)被IdeS通过两个步骤裂解。第一步生成单次裂解IgG(scIgG)，其带有一个完整的重链。第二步生成完全裂解的产物，由一个$F(ab')_2$片段和一个通过非共价相互作用而保持在一起的人二聚化Fc片段。

[0018] 图2.蛋白尿作为一种安全性评估在整个实施例1的人体研亢中被监测。Multistix(Siemens)在医院中常规使用，在数个对象中检测暂时性蛋白尿，其与IgG裂解相关联。A)给予安慰剂的对象(n＝9)，B)给予单剂量0.24mg/kg BW IdeS的对象(n＝4)。

[0019] 图3.IdeS的血清药效动力学。血清中的IdeS浓度通过LC-MS/MS基于来源于IdeS的四种肽而检测。A)灌注结束之前一分钟时血清IdeS浓度与IdeS剂量水平(0.01、0.04、0.12和0.24mg/kg BW)的关系(对数比例尺：圈点单个浓度)。分析物：肽LFEYFK(n＝20)。B)灌注0.12或0.24mg/kg BW IdeS后，四种肽(AFPYLSTK、AIYVTDSDSNASIGMK、GGIFDAVFTR和LFEYFK)的平均血清浓度值与时间(最长24h)的关系(n＝8)。

[0020] 图4.SDS-PAGE定性药效动力学分析显示IgG快速降解。取自以A)0.12mg/kg BW IdeS和B)0.24mg/kg BW IdeS给药的对象的血清的SDS-PAGE分析显示出在给药之前以及给药后14min、20min、1h、2h、6h和24h时蛋白条带模式。C)从一个在0.24mg/kg BW组的对象中取得的血清在给药之前以及给药后2h、24h、7天、14天、21天、28天和35天时的IgG恢复情况。每个图中的右侧箭头表示含有人IgG、scIgG、$F(ab')_2$和Fc的IgG标记物中的不同条带。每个图中的左侧线条表示kD分子量标准。凝胶显示0.12和0.24mg/kg BW IdeS剂量组的一个代表性对象。

[0021] 图5.ELISA定量药效动力学分析显示IgG的快速降解。利用经验证的ELISA方法测定来自0.24mg/kg BW IdeS剂量组的单个对象的血清IgG水平(检测完整IgG和scIgG)。为了能够看清IgG的早期快速的降解和恢复情况，x轴被一分为二。第一部分的时间以小时显示

(0-24h),第二部分以天显示(7-64天)。

[0022] 图6.IdeS对人血清的体外滴定。健康人体的血清样品被用作IdeS的底物并使用ELISA滴定(n=20;误差棒:均值±SEM)。在体外,最高剂量组(0.24mg/kg BW IdeS)对应约6mg/L IdeS,0.12mg/kg BW对应3mg/L,0.04mg/kg BW对应1mg/L,0.01mg/kg BW对应0.2mg/L IdeS。结果以y轴上的剩余IgG百分数与每个对象的起始值的关系给出。IdeS剂量(mg/L)在x轴上显示。

[0023] 图7.抗原特异性药效动力学。使用抗原混合物(白喉、百日咳、破伤风、脊髓灰质炎和乙型流感嗜血杆菌)检测0.24mg/kg BW组的人血清样品(n=4)中IgG的存在。结果以y轴上的剩余IgG百分数与每个对象的起始值的关系给出。为了能够看清IgG的早期快速的降解和恢复情况,x轴被一分为二。第一部分的时间以小时显示(0-24h),第二部分以天显示(7-64天)。

[0024] 图8.IdeS给药的对象的血清显示受损的细胞吞噬能力。以吞噬至少一个荧光小珠的效应细胞的百分数测定人血清IgG的调理能力(opsonizing capacity)。A)0.24mg/kg BW IdeS给药之前及给药24h后vs.安慰剂处理的对象。每个个体的给药前细胞吞噬水平被设定为100%,背景为不存在血清时小珠的自发摄取,IdeS组中n=4,安慰剂组中n=2。B)显示了0.24mg/kg BW组的一个代表性对象在不同时间的(给药前、2h、6h、24h、48h、4天、7天和14天)血清的吞噬能力动力学。不存在IgG时小珠的自发摄取以空心方框表示。P值利用Mann-Whitney计算,***=P<0.01。

[0025] 图9.在研亢之前以及整个研亢中测定抗IdeS抗体的含量。使用IdeS特异性CAP-FEIA(ImmunoCAP)试验(Thermo Fisher Scientific)中Phadia®250仪器上分析人血清样品。IgG的定量下限(LLOQ)是2mg/L。A)来自130个人供体(参考)的样品被与本研亢中筛选的78个健康男性对象(筛选)比较。突出显示的线条表示参考组的中值(6.1mg/L)和筛选组的中值(10.6mg/L)。B)0.12和0.24mg/kg组(n=8,误差棒:均值±SEM)的平均值的抗IdeS IgG水平的动力学。在14天之前看不出任何对象的抗IdeS IgG的增加。不同组在第14天C)和第182天D)的抗IdeS IgG水平。线条表示每组的平均水平。P值通过Kruskal-Wallis、单因素ANOVA比较和Dunn's多因素比较计算得出,*=P<0.05,**=P<0.02。

[0026] 图10.来自二十个被测试供体(健康志愿者和5期CKD患者)的血清中的IdeS效力。使用ELISA测定用不同浓度IdeS处理人血清后的剩余IgG。图中显示单个人体血清的S型剂量-响应曲线,其中剩余IgG(mg/ml)被相对IdeS剂量(g/L)绘制曲线。计算出的MABEL(0.0031g/L)和MED(0.025g/L)显示在图中(蓝黑色线条)。所选择的患者血清P02、P04、P07、P08和P09以不同颜色显示。

[0027] 图11.IdeS对敏化患者P02号的血清中抗HLA IgG的效力。图表显示在模拟(蓝色)和IdeS(红色)处理后(上图)MHC I类分子(A,B和C)以及(下图)MHC II类分子(DP,DQ和DR)的相对于单个抗原的MFI(原始值)。MFI:平均荧光强度。

[0028] 图12、13、14、15与图11相同,分别测定敏化患者P04、P07、P08和P09。

[0029] 图16.以对象503和504的血清染色(10μl非DTT处理)的Balb/c脾细胞(门P1),血清采集于给药前(黑色)、给予IdeS或安慰剂后24h(红色)、48h(绿色)和96h(蓝色)。使用抗人Fcγ的二级试剂检测结合。对于IdeS图表,给药前曲线在所有三个给药后曲线的右边。因此,在24h血清结合小鼠脾细胞的能力减弱,并且在96h仍维持。

[0030] 图17.给予0.24mg/kg BW的IdeS的健康对象(504)的血清与Balb/c小鼠的脾细胞之间的异种交叉匹配。血清样品收集于给药前以及给药后的所示时间点。使用DTT处理血清以使IgM失活。Terasaki小孔的重叠照片显示出活细胞(绿色/明亮)和死细胞(红色/暗淡)。仅用PBS(无血清)处理的脾细胞被用作对照以显示自发细胞死亡。

[0031] 图18显示EndoS在IgG的Asn-297(Kabat编号)位置对N-连接聚糖的酶切示意图。

[0032] 图19显示两种测定用IdeS治疗的对象(#101)的血清中IgG水平的方法(浊度测定法和PD-ELISA)之间的比较。血清收集于用IdeS处理后的不同时间点,并使用标准p-IgG浊度测定实验在医院测定,使用发明人开发的PD-ELISA试验来区分完整IgG和由IdeS酶切IgG产生的$F(ab')_2$片段。ULN=健康人体IgG的正常值上限,LLN=健康人体IgG的正常值下限。

[0033] 图20显示IdeS酶切B细胞上的IgG型BCR,而不酶切IgM型BCR。A,用所示量IdeS处理后,表达IgG型(Nu-DUL-1)和IgM型(Daudi)BCR的细胞的抗Fab信号流式细胞分析。Y轴显示FL4中的平均荧光强度。B,用不同量IdeS处理后Nu-DUL-1细胞表面上抗Fab和抗Fc的流式细胞分析。

[0034] 图21显示IdeS以用可溶性IgG相似的效力酶切IgG型BCR。使用PBS或不同量的IdeS处理肝素化的外周血。孵育期后,并在SDS-PAGE凝胶上离析并分离血浆。完整IgG、scIgG和$F(ab')_2$片段示于右侧。B,从相同PBS或IdeS处理的血液中纯化的PBMC被双重染色以显示$CD19^+$和抗Fc或抗Fab。

[0035] 图22显示IdeS酶切记忆B细胞的表面IgG。A,使用RosetteSep的B细胞阴性选择产生了>90%$CD19^+$细胞。B,$CD19^+/CD27^+$细胞的表面IgG的$F(ab')_2$部分被IdeS有效酶切。锚定至细胞膜的Fc表位的量在IdeS处理后没有发生改变。

[0036] 图23显示IdeS处理后细胞的恢复。A,用不同量的IdeS处理后Nu-DUL-1细胞表面上的抗Fab的流式细胞分析。除去IdeS,培养细胞并在1h和24h后进行分析。B,以不同量IdeS或抗恶性细胞增殖对照物质(细胞松弛素D和嘌呤霉素)处理Nu-DUL-1细胞,并在BrdU6小时脉冲时间之前培养24小时。C,用PBS或30μg/mlIdeS处理Nu-DUL-1细胞24小时后,进行基于细胞内氢化酶活性的存活试验(CCK-8)作为读出。

[0037] 图24显示间接体内IdeS处理的PBMC上的IgG型BCR表达的恢复。A,紧接在PBS或IdeS处理(30μg/ml)之后以及在无IdeS培养16小时后$CD19^+$细胞上抗Fab信号的流式细胞分析。在R2中发现双阳性细胞,并以细胞百分率形式表示于门P3中。

[0038] 图25显示在富集的B细胞(RosetteSep,>90%$CD19^+$细胞)上的IgG型BCR的恢复。A,紧接在PBS或IdeS处理(30μg/ml)之后以及在处理后的所示时间点在富集的B细胞上的抗Fab信号的流式细胞分析。B,紧接在PBS或IdeS处理(30μg/ml)之后以及在处理后的所示时间点在富集的B细胞上的抗Fc信号的流式细胞分析。

[0039] 图26显示IdeS不影响B细胞的存活率。在PBS或IdeS处理(30μtg/ml)后将含有>90%$CD19^+$细胞的RosetteSep富集B细胞在培养基中保持几天,使用比色法CCK-8试验测定存活率。

[0040] 图27显示IdeS处理抑制BCR信号传导。在用$F(ab')_2$特异性抗体交联之前使用PBS或IdeS(30μg/ml)处理Nu-DUL-1细胞。A,使用磷酸化特异性抗体在流式细胞仪中测定刺激后不同时间点的ERK1/2磷酸化水平。B,用磷酸化特异性抗体在流式细胞仪中测定刺激后不同时间点的PLC-γ2磷酸化水平。

[0041] 图28显示IdeS特异性阻断产IgG细胞的B细胞成熟。使用IdeS处理PBMC并用重组IL2和R848刺激，从而激活记忆B细胞，并将它们分化为产Ig细胞。评价ELISPOT过滤板的产IgG细胞的数目。A，在第0天，在过滤板接种50000或100000个细胞，并用/不用IdeS以及用/不用rIL2/R848处理。在一组中，在用R848和IL2刺激后第3天添加IdeS。B，在存在或不存在30μg/mlIdeS情况下用rIL2/R848刺激96小时后产IgA细胞、产IgM细胞和产IgG细胞的数量。C，在存在或不存在0.3-30μg/ml IdeS情况下用rIL2/R848刺激72小时后产IgG细胞的数量。D，用0.3-30μg/ml IdeS预处理细胞一个小时，去除IdeS并用rIL2/R848刺激细胞72小时后的产IgG细胞的数量。

[0042] 图29显示单次静脉给予0.24mg/kg BW的IdeS后，健康人体在不同时间点的$CD19^+$/IgG^+细胞的流式细胞分析。使用前侧散射器(P1)门控纯化的PBMC，B细胞($CD19^+$)在P1中被作为M1监测。上图显示CD19的双阳性细胞(FL2)以及给药前直至给药后96h的IgG的Fc部分(FL4)。下图显示CD19的双阳性细胞(FL2)以及给药前直至给药后96h的IgG的Fab部分(FL4)。

[0043] 图30显示IdeS在人体内酶切IgG型BCR。健康人体被给予0.24mg/kg BW IdeS，在给药后不同时间点收集PBMC。使用流式细胞仪分析CD19和$F(ab')_2$双阳性细胞的百分率。给药后的小时数显示于x轴，MFIx细胞频率显示于y轴。

[0044] 图31显示在48小时的试验期内IdeS处理的细胞(上图)和PBS处理的细胞(下图)在抗体交联后的B细胞的存活率。

[0045] 序列说明

[0046] SEQ ID NO:1显示化脓性链球菌(S.Pyogenes)的成熟免疫球蛋白G降解酶(IdeS)的氨基酸序列。该蛋白有时也称为MAC1。包含分泌信号的MAC1的全长序列参见Genbank登陆号WP_010922160.1。

[0047] SEQ ID NO:2显示成熟内切糖苷酶S(EndoS)的氨基酸序列。包含分泌信号的全长序列参见Genbank登陆号AAK00850.1。

[0048] SEQ ID NO:3显示成熟MAC2(IdeS的变体)的氨基酸序列。包含分泌信号的MAC 2全长序列参见Genbank登陆号AFC67907.1。

[0049] 发明详述

[0050] 要理解的是，所公开的方法的不同应用可被调整以适应本领域的具体需求。还要理解的是，本文使用的属于仅为描述本发明的具体实施方式的目的而给出，并非意在限制。

[0051] 此外，如在说明书和权利要求书中所使用的，单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“该(the)”，除非另有明确说明，也包括复数指代。因此，例如“肺”包括“多个肺”，“抗原”包括两个或更多个这样的抗原，“对象”包括两个或更多个这样的对象，等等。术语“患者”和“对象”可互换使用并且通常指人。

[0052] 如本文所使用的，“降低Fc受体结合至血清IgG分子的试剂”是指通过任何适当机制实现此效果的试剂。已知有多种可降低Fc受体与IgG分子相互作用的试剂。这些试剂通常是来源于细菌的蛋白质，并且可经由多种不同方式发挥作用。

[0053] 例如，这种蛋白质可为IgG半胱氨酸蛋白酶，其酶切IgG使得抗原结合域与Fc相互作用结构域彼此分开。在这种情况下，血清IgG分子的Fc受体相互作用被减弱，因为血清中完整IgG的数量降低了。

[0054] 作为另一个例子，这种蛋白质可为IgG内切糖苷酶，其酶切IgG的Fc相互作用结构域上的聚糖结构，特别是在Asn-297位置(Kabat编号)的N-连接双触角(bi-antennary)聚糖。这个聚糖结构在Fc受体结合中其关键作用。因此，当它被蛋白质完全地或部分地移除时，将导致与完整IgG分子相比降低的Fc受体结合。在这种情况下，结合的降低优选导致IgG:FcγR相互作用的结合平衡常数增加至少两倍。优选地，该试剂使得IgG:FcγR相互作用的结合平衡常数增加至少两倍、或至少3倍、或至少4倍、或至少5倍、或至少6倍、或至少7倍、或至少8倍。更优选地，该试剂使得IgG:FcγR相互作用的结合平衡常数增加至少8倍。结合平衡常数的增加代表IgG和FcγR之间(例如IgG和FcγRIIA之间)的结合减少。如本文所使用的，术语“血清IgG分子”是指在实施本发明的方法之前人体组织中存在的任何γ免疫球蛋白(IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)分子。这样的IgG分子可内源性产生自人体的B细胞，或是在实施本发明的方法之前施用至对象的外源性γ免疫球蛋白。

[0055] 如本文所使用的，术语“Fc受体”是指存在于细胞上的Fcγ免疫球蛋白受体(FcγRs)。在人体中，FcγR是指一个、一些或所有该受体家族，包括FcγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32A)、FcγRIIB(CD32B)、FcγRIIIA(CD16a)和FcγRIIIB(CD16b)。如本文所使用的，术语FcγR包括cγRI(CD64)、FcγRIIA(CD32A)、FcγRIIB(CD32B)、FcγRIIIA(CD16a)和FcγRIIIB(CD16b)的天然存在的多态形式。

[0056] 本文引用的所有公开文献、专利和专利申请，无论在上文或下文，都通过引用以它们的完整形式合并至此文。

[0057] 改善疗法或治疗剂的益处的方法

[0058] 本发明提供一种改善疗法或治疗剂对对象的益处的方法。该方法包括两个步骤，在本文中称为步骤(a)和步骤(b)。

[0059] 步骤(a)包括向该对象施用降低该对象中血清IgG分子的Fc受体结合的试剂。所施用的该试剂的量优选足以消除该对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合。

[0060] 步骤(b)包括随后向该对象施用所述疗法或治疗剂。

[0061] 步骤(a)和(b)以特定时间间隔隔开，该时间间隔优选足以让该对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合被消除。所述间隔通常可为至少30分钟，最多21天。

[0062] 本发明还提供降低对象的血清IgG分子的Fc受体结合的试剂以用于本发明的改善疗法或治疗剂对所述对象的益处的方法，所述方法包括：(a)向该对象施用足以消除该对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合的量的该试剂；和(b)随后向该对象施用所述疗法或所述治疗剂，其中骤(a)和步骤(b)以足以让该对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合被消除的时间间隔隔开。所述间隔通常可为至少30分钟，最多21天。

[0063] 本发明还提供降低对象中血清IgG分子的Fc受体结合的试剂在制备用于改善疗法或治疗剂对所述对象的益处的药物中的应用，其中所述改善包括：(a)向该对象施用足以消除该对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合的量的该试剂；和(b)随后向该对象施用所述疗法或所述治疗剂，其中步骤(a)和步骤(b)以足以让该对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合被消除的时间间隔隔开。所述间隔通

常可为至少30分钟，最多21天。

[0064] 步骤(a)和(b)的时序和顺序

[0065] 步骤(a)在步骤(b)之前进行，并且步骤(a)和(b)以足以让对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合被消除的时间间隔隔开。“实质上所有”通常是指血清IgG对Fc受体的结合被降低至低于步骤(a)之前存在水平的5％。例如，如果所施用的试剂是蛋白酶(例如IdeS)，该间隔将是该试剂酶切该对象的至少95％的血清IgG所需的时间，可通过任何合适的试验测定血清IgG含量。所述间隔通常可为至少30分钟，最多21天。

[0066] 步骤(a)和(b)之间的时间间隔的下限由步骤(a)中施用的试剂消除该对象的血清中存在的实质上所有IgG分子对Fc受体的结合所需的时间来确定。这可任选地通过测试个体的血清样品并应用任何合适的试验来确定。一些示例性的合适试验描述于实施例中。

[0067] 这种试验可直接测试血清样品中能够结合一个或多个Fc受体的IgG分子是否存在，例如在ELISA中实现。或者，这样的试验可以是间接的，它可以测试是否存在预期由步骤(a)中施用的试剂处理IgG导致的一个或多个反应产物。例如，当该试剂是酶切IgG蛋白的酶时，可分析血清样品中是否存在完整IgG分子或由酶切产生的IgG片段。这可通过任何合适的方法实现，例如基于分子量分离所述分子和片段，例如质谱或SDS-PAGE，或例如通过ELISA特异性检测所述分子或片段。或者，IgG可通过将对象的血清与表达FcgR的细胞混合并通过流式细胞仪用荧光发色团结合的抗人IgG来监测IgG结合而被检测。

[0068] 评价样品(例如血清样品)中的IgG的量的临床上常规方法依赖于散射测浊法和比浊法，因为这些方法快速、易用且精确。在散射测浊法和比浊法中，光源发射穿过透明容器中的液体样品。比浊法测量光强的降低，而散射测浊法测量光线穿脱样品时光线的散射，其与溶液中的免疫球蛋白的浓度成比例。两种原理都基于添加的抗IgG抗体，其与样品中的抗原反应形成抗原/抗体复合物(凝集)。加入PEG使反应更快速进行至终点，增加灵敏度，并且降低含有过量抗原的样品产生假阴性结果的风险。在IgG分析时，Ig的$F(ab')_2$部分通过抗IgG抗体交联，导致凝集反应。但是，当一些或所有存在的IgG可能不完整时，这种方法可能不适合。例如，如果IgG半胱氨酸蛋白酶(如IdeS)在例如本发明的方法中被施用至样品所采集的对象，或如果这种蛋白酶被加入该样品，那么就可能存在酶切片段，如$F(ab')_2$片段和Fc片段。只要$F(ab')_2$片段仍存在于样品中，那么这不影响常规散射测浊法和比浊法的凝集反应。由于$F(ab')_2$片段的半衰期比完整IgG的短，即使它与样品中存在的完整IgG的量不成比例，凝集也会随着时间而降低。因此，受存在IgG半胱氨酸蛋白酶(如IdeS)影响的样品无法通过常规方法评价。发明人开发出一种新的IgG浓度试验，它兼容受存在IgG半胱氨酸蛋白酶(如IdeS)影响的样品，并且可被用于任何临床机构，包括但不限于与本发明的其他方法结合使用。

[0069] 所述方法能够区分完整IgG和IdeS产生的$F(ab')_2$片段。这可通过利用检测不同片段的抗体(即抗Fab抗体和抗Fc抗体)来实现。试验中使用的抗体必须不能是影响样品的IgG半胱氨酸蛋白酶(通常为IdeS)的底物。这避免了试验试剂受到可能存在于样品中的任何有活性的蛋白酶的影响。这可通过测试不同物种的IgG来实现，或用抗体片段(即Fab片段或$F(ab')_2$片段)取代整个抗体来实现。通常，抗$F(ab')_2$试剂作为捕获剂与样品共孵育。捕获剂通常是固定的，例如固定在试验板的孔中。结合的IgG随后通过与作为检测剂的抗Fc试剂共孵育而被监测。因此，与散射测浊法和比浊法相反，只有含有Fab和Fc部分的IgG会被检测

到。检测剂通常可直接或间接结合至一个部分从而有利于检测，例如荧光染料或与显示底物反应的酶。捕获剂和检测剂可为任何其他特异性识别IgG的Fab部分或Fc部分的分子，并且可以相反顺序使用，即，捕获使用抗Fc，检测使用抗Fab。该试验可以任何适当形式进行，例如常规的ELISA或Meso Scale Discovery形式。

[0070] 在某些情况下，例如当IgG半胱氨酸蛋白酶是IdeS时，样品可包括中间片段，例如scIgG，其中仅一个重链被剪切，而$F(ab')_2$仍连接至另一个完整的重链。此时，scIgG片段可能被该试验错误地识别为完整的IgG。因此，该方法可包括一个评估样品中存在的片段的尺寸的补充步骤。因为在铰链区以下重链之间没有二硫桥，所以scIgG片段的重链Fc部分会在变性条件下与完整重链分离，产生约20-25kDa的蛋白质。利用任何合适的方法，例如SDS-PAGE，可检测并定量不同的片段尺寸。包括该任选的补充步骤的本发明的一个具体实施方式描述于实施例1中(见效力评估)。该方法特别适用于在临床机构评估IdeS的效力。

[0071] 当步骤(a)的试剂是酶切IgG上的聚糖部分的酶时，可分析血清样品是否存在含有正常或截短的聚糖的IgG分子，或分析由酶切形成的聚糖片段。这可通过任何合适的方法实现，例如基于分子量而分离分子和/或片段(如通过质谱或SDS-PAGE)，或特异性检测该分子或片段(如通过ELISA)。

[0072] 步骤(a)和(b)之间的时间间隔的下限可选自：至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时或至少6小时。如果测定到对象的血清中存在的实质上所有的IgG分子对Fc受体的结合已在更早的时间点被消除，那么该下限可短于任何上述值。

[0073] 步骤(a)和(b)之间的时间间隔的上限可独立地选自上述下限值，并且可通过IgG的内源性生产开始替换或完全替换进行方法之前对象的血清中存在的IgG分子所需的时间来确定。这可通过测试该个体的血清样品并实施任何合适的实验来确定，例如以上关于下限所述的试验。新合成的IgG通常在3-4天内开始在血清中再现，全部替换通常需要约3周(21天)完成。

[0074] 步骤(a)和(b)之间的时间间隔的上限可独立地选自上述下限值，并且可选自：最多21天、最多18天、最多14天、最多13天、最多12天、最多11天、最多10天、最多9天、最多8天、最多7天、最多6天、最多5天、最多4天、最多3天、最多2天、最多24小时、最多18小时、最多12小时、最多10小时、最多8小时、最多7小时、最多6小时、最多5小时、最多4小时、最多3天、最多2小时或最多1小时。

[0075] 优选地，步骤(a)和(b)之间的时间间隔为最多24小时，更优选为最多12小时，最优选为最多6小时，从而步骤(a)和(b)可在同一天完成或在同一次去治疗中心期间完成。这是非常有利的，特别是去治疗中心受到限制时。

[0076] 就这点而言，步骤(a)和(b)之间的时间间隔应当足够长，以使步骤(a)中施用的试剂消除存在于对象的对象中的实质上所有的IgG分子对Fc受体的结合，但最多约6小时。因此，步骤(a)和(b)之间的时间间隔优选为30分钟至1小时、30分钟至2小时、30分钟至3小时、30分钟至4小时、30分钟至5小时、30分钟至6小时、1至2小时、1至3小时、1至4小时、1至5小时、1至6小时、2至3小时、2至4小时、2至5小时、2至6小时、3至4小时、3至5小时、3至6小时、4至5小时、4至6小时、或5至6小时。

[0077] 步骤(a)

[0078] 在步骤(a)中,有效量的降低对象中血清IgG分子的Fc受体结合的试剂被施用至该对象。“有效量”是指该试剂的量足以消除该对象的血清中存在的实质上所有的IgG分子对Fc受体的结合。

[0079] 试剂

[0080] 该试剂通常为蛋白质,且通常来源于细菌。该试剂可为具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性的蛋白质,优选酶切免疫球蛋白分子的铰链区。这种蛋白质的一个例子是IdeS(化脓性链球菌的免疫球蛋白G降解酶)。IdeS是具有独特特异性程度的链球菌蛋白酶;它酶切免疫球蛋白G(IgG)抗体,但不将其任何其他底物(包括IgA、IgD、IgE和IgM)。IdeS在铰链区的COOH末端的特定位点将人IgG酶切为$F(ab')_2$片段和Fc片段(见图1)。IdeS的成熟序列见SEQ ID NO:1。该试剂可为包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的蛋白质或由该序列组成的蛋白质,或可为来自替代性细菌的其同源物。

[0081] 或者,该试剂可为IdeS蛋白质的变体,该变体包含与SEQ ID NO:1具有至少80%、85%、90%或95%同一性的任何氨基酸序列或由任何该序列组成,并且具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性。一个优选的变体是蛋白质MAC2,其全长序列见Genbank登陆号AFC67907.1。无信号序列的MAC2序列见SEQ ID NO:3。该试剂可为包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的蛋白质或由该序列组成的蛋白质,或可为来自替代性细菌的其同源物。

[0082] IdeS蛋白质的变体可包含这样的氨基酸序列或由该序列组成:该氨基酸序列相对SEQ ID NO:1的氨基酸序列可具有1、2、3、4、5、10、20、30或更多个氨基酸取代、插入或缺失,条件是该变体具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性。所有氨基酸取代优选是保守性的。保守性取代将氨基酸替换为其他具有相似化学结构、相似化学性质或相似侧链体积的氨基酸。所引入的氨基酸可与被取代的氨基酸具有相似极性、亲水性、疏水性、碱性、酸性、中性或电荷。或者,保守性取代可在原先存在的芳香族或脂肪族氨基酸位置处引入另一个芳香族或脂肪族氨基酸。保守性氨基酸改变在本领域是熟知的,并且可根据在下表1中定义的20种主要氨基酸的性质来选择。当氨基酸具有相似极性时,可通过参考表2中氨基酸侧链的亲水指数(hydropathy scale)来确定。

[0083] 表1-氨基酸的化学性质

[0084]

Ala	脂肪族、疏水、中性	Met	疏水、中性
Cys	极性、疏水、中性	Asn	极性、亲水、中性
Asp	极性、亲水、带电(-)	Pro	疏水、中性
Glu	极性、亲水、带电(-)	Gln	极性、亲水、中性
Phe	芳香族、疏水、中性	Arg	极性、亲水、带电(+)
Gly	芳香族、中性	Ser	极性、亲水、中性
His	芳香族、极性、亲水、带电(+)	Thr	极性、亲水、中性
Ile	脂肪族、疏水、中性	Val	脂肪族、疏水、中性
Lys	极性、亲水、带电(+)	Trp	芳香族、疏水、中性

[0085]

Leu	脂肪族、疏水、中性	Tyr	芳香族、极性、疏水

[0086] 表2-亲水指数

[0087]

侧链	亲水指数
Ile	4.5
Val	4.2
Leu	3.8
Phe	2.8
Cys	2.5
Met	1.9
Ala	1.8
Gly	-0.4
Thr	-0.7
Ser	-0.8
Trp	-0.9
Tyr	-1.3
Pro	-1.6
His	-3.2
Glu	-3.5
Gln	-3.5
Asp	-3.5
Asn	-3.5
Lys	-3.9
Arg	-4.5

[0088] 或者,该试剂可为包含SEQ ID NO:1的或SEQ ID NO:3的片段的蛋白质或由该片段组成,并且具有IgG半胱氨酸蛋白酶活性,优选地,其中所述片段的长度为100至300个氨基酸、150至300个氨基酸或200至300个氨基酸。该片段可通过缺失SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基来产生。可缺失至多1、2、3、4、5、10、20、30、40或50个残基,或更多个残基。所缺失的残基可彼此连续。

[0089] 该试剂可为具有IgG内切糖苷酶活性的蛋白质,优选在IgG的Fc区的Asn-297(Kabat编号)处剪切聚糖部分。这种蛋白质的一个例子是EndoS(化脓性链球菌的内切糖苷酶)。EndoS水解正常糖基化的IgG的天冬酰胺连接的聚糖的β-1,4-二-N-乙酰基壳二糖核心(见图18)。EndoS的成熟序列见SEQ ID NO:2。该试剂可为包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的蛋白质或由该序列组成的蛋白质,或可为来自替代性细菌的其同源物,该替代性细菌例如是马链球菌、兽疫链球菌、或假结核棒状杆菌、粪肠球菌、或脑膜脓毒性菌(Elizabethkingia meningoseptica)。该试剂可为CP40、EndoE或$EndoF_2$。

[0090] 或者,该试剂可为EndoS蛋白质的变体,该变体包含与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%同一性的任何氨基酸序列或由任何该序列组成,并且具有IgG内切糖苷酶活性。EndoS蛋白质的变体可包含这样的氨基酸序列或由该序列组成:该氨基酸序列相对SEQ ID NO:2的氨基酸序列可具有1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90或更多个氨基酸取代、插入或缺失,条件是该变体具有IgG内切糖苷酶活性。所述氨基酸取代优选是保守性的。保守性取代如以上关于SEQ ID NO:1所定义。

[0091] 或者,该试剂可为包含SEQ ID NO:2的片段的蛋白质或由该片段组成,并且具有IgG内切糖苷酶活性,优选地,其中所述片段的长度为400至950、500至950、600至950、700至950或800至950个氨基酸。一个优选的片段由SEQ ID NO:2的第1至409氨基酸组成,其对应于EndoS的酶切活性α-结构域,由链球菌半胱氨酸蛋白酶SpeB酶切产生。该片段可通过缺失

SEQ ID NO:1的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基而获得。可缺失1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500或550个残基，或更多个残基。所缺失的残基可彼此连续。

[0092] SEQ ID NO:2的任何片段或变体优选包括SEQ ID NO:2的第191至199残基，即SEQ ID NO:1的Leu-191、Asp-192、Gly-193、Leu-194、Asp-195、Val-196、Asp-197、Val-198和Glu-199。这些氨基酸构成完整的几丁质酶家族18活性位点，结束于谷氨酸。几丁质酶的活性位点的谷氨酸对于酶切活性是必需的。因此，最优选地，SEQ ID NO:2的变体含有SEQ ID NO:2的Glu-199。SEQ ID NO:2的变体可含有SEQ ID NO:2的具有一个或多个保守性取代的第191至199残基，条件是该变体含有SEQ ID NO:2的Glu-199。

[0093] 给药及剂量

[0094] 在步骤(a)中，该试剂优选通过静脉输液方式给药，但可通过任何合适的途径给药，包括例如皮内、皮下、经皮、肌肉、动脉内、腹腔内、关节腔内、骨内或其他合适给药途径。所施用的所述试剂的量可为0.01mg/kg BW至2mg/kg BW、0.04至2mg/kg BW、0.12mg/kg BW至2mg/kg BW、优选0.24mg/kg至2mg/kg BW、最优选1mg/kg至2mg/kg BW。该试剂可以实质上分离的形式存在。它可与不会干扰预期用途并且该试剂仍被认为呈实质上分离状态的载体或稀释剂(如下所述)混合。它还可以实质上纯化的形式存在，此时它通常构成制剂中至少90％(例如至少95％、98％或99％)的蛋白质。

[0095] 制剂和组合物

[0096] 该试剂优选与一种或多种药学上可接受的载体或稀释剂一起施用，并且任选地与一种或多种其他治疗组分一起施用。载体必须是“可接受的”，是指可与制剂中的其他组分相容并且对受试者无害。通常，注射用载体以及最终制剂是无菌且无热源的。

[0097] 合适的组合物的制剂可利用本领域技术人员容易得到的标准药物制剂化学试剂和方法来进行。例如，该试剂可与一种或多种药学上可接受的赋形剂或载体混合。赋形剂或载体中可存在辅助性物质，例如润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。这些赋形剂、载体和辅助物质通常是不会在接收该组合物的个体内引起免疫反应的药学试剂，并且不具有过度毒性。药学上可接受的赋形剂包括但不限于液体(例如水)、盐水、聚乙二醇、透明质酸、甘油、硫代甘油和乙醇。药学上可接受的盐也可被包括在本发明中，例如无机酸盐(如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等)；以及有机酸的盐(例如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等)。药学上可接受载体、赋形剂和辅助物质的详细讨论见Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.Co.,N.J.1991)。

[0098] 这种组合物可以适合单次给药或连续给药的形式制备、包装或销售。可注射组合物可以单位剂量形式制备、包装或销售，例如含有防腐剂的安瓿形式或多剂量容器形式。组合物包括但不限于悬浮液、溶液、油相或水相中的乳剂、糊剂和可植入缓释或生物可降解制剂。这种试剂还可进一步包含一种或多种额外组分，包括但不限于，悬浮剂、稳定剂或分散剂。在肠外给药组合物的一个实施方式中，活性组分以干燥(例如粉末或颗粒)形式提供，以与合适的载体(如无菌无热源水)重配(reconstitution)后肠外给予该重配组合物。该组合物可以无菌可注射水性或油性悬浮液或溶液的形式制备、包装或销售。该悬浮液或溶液可根据本领域已知的方法配制，并且除活性组分外科包含额外的组分，例如本文所描述的分散剂、润湿剂或悬浮剂。这种无菌可注射制剂可使用无毒的肠外可接受稀释剂或溶剂制备，例如水或1,3-丁二醇。其他可接受的稀释剂和溶剂包括，但不限于，林格氏液、等渗的氯化

钠溶液和固定油(如合成单甘油酯或双甘油酯)。

[0099] 其他可用的可肠外给药的组合物包括包含微晶形式的活性组分的脂质体制剂,或作为可生物降解的聚合物系统的成分。用于缓释或植入的组合物可包含药学上可接受的聚合物材料或疏水性材料,例如乳剂、离子交换树脂、难溶性聚合物或难溶性盐的形式。

[0100] 步骤(b)

[0101] 在步骤(b)中,向该对象施用疗法或治疗剂。该疗法或治疗剂通常以与未先进行步骤(a)时完全相同的方式实施或实践。

[0102] 治疗剂

[0103] 在一个实施方式中,治疗剂是被施用以治疗癌症或另一种疾病的抗体。该治疗剂可为静脉注射免疫球蛋白(IVIG)。在该实施方式中,所述方法可被替代性地描述为治疗对象的癌症或另一种疾病的方法,该方法包括(a)向该对象施用降低该对象的血清IgG分子的Fc受体结合的试剂,以及(b)随后向该对象施用治疗有效量的用于治疗所述癌症或所述其他疾病的抗体;其中:

[0104] -施用的所述试剂的量足以消除该对象的血清中存在的实质上所有IgG分子对Fc受体的结合;并且

[0105] -步骤(a)和(b)间隔至少2小时、最多21天的时间间隔。

[0106] 本发明还提供用于这种治疗癌症或另一种疾病的方法中的试剂。本发明还提供这种试剂在制备通过一种方法治疗癌症或另一种疾病的药物中的应用。

[0107] 该癌症可为急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、肾上腺皮质癌、艾滋病相关的癌症、艾滋病相关淋巴瘤、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤、儿童小脑或脑基底细胞癌、肝外胆管癌、膀胱癌、骨癌、骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤、脑干胶质瘤(脑癌)、脑瘤小脑星形细胞瘤、脑瘤脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、脑肿瘤室管膜瘤、脑肿瘤髓母细胞瘤、脑肿瘤幕上原始神经外胚层肿瘤、脑肿瘤视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、支气管腺瘤/类癌、Burkitt淋巴瘤、类癌肿瘤、胃肠道类癌肿瘤、未知原发癌、中枢神经系统淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、星形细胞瘤脑/恶性胶质瘤、宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性粒细胞白血病、慢性骨髓增殖性疾病、结肠癌、皮肤T细胞淋巴瘤、促结缔组织增生性小圆细胞瘤、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌、尤因家族肿瘤中的尤因肉瘤、童年颅外生殖细胞瘤、性腺外生殖细胞瘤、肝外胆道癌、眼癌黑色素瘤眼压、眼癌视网膜母细胞瘤、胆囊癌、胃癌症、胃肠道类癌、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤:颅外、性腺外、或卵巢、妊娠滋养细胞肿瘤、脑干胶质瘤、脑胶质瘤、童年脑星形细胞瘤、儿童视觉通路和下丘脑胶质瘤、胃类癌、毛细胞白血病、头颈癌、心脏癌、肝癌癌、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、下丘脑和视觉通路胶质瘤、眼内黑色素瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉头癌、白血病、急性成淋巴细胞白血病(也称为急性淋巴细胞性白血病)、急性髓细胞性白血病(也称为急性骨髓性白血病),慢性淋巴细胞白血病(也称为慢性淋巴细胞性白血病),慢性髓细胞性白血病(也称为慢性髓性白血病),毛细胞、唇和口腔癌,脂肪肉瘤,肝癌(原发性),肺癌,非小细胞肺癌,小细胞淋巴瘤,淋巴瘤,艾滋病相关,淋巴瘤,Burkitt淋巴瘤,皮肤T细胞淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,非霍奇金氏(除霍奇金外所有淋巴瘤的旧分类法),淋巴瘤,原发性中枢神经系统,巨球蛋白血症,Waldenström,恶性纤维组织细胞瘤骨/骨肉瘤,髓母细胞瘤,黑色素瘤、眼内(眼)黑色素瘤、Merkel细胞癌、间皮瘤、成人恶性间皮瘤、隐匿性原发性转移性鳞癌颈部肿瘤、口腔癌、多发

性内分泌腺瘤综合征、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、蕈样肉芽肿、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性疾病、慢性骨髓性白血病、成人急性粒细胞性白血病、儿童急性髓性白血病、多发性骨髓瘤(骨髓癌)、骨髓增生性疾病、鼻腔及鼻窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤、卵巢癌、卵巢上皮癌(表面上皮间质肿瘤)、卵巢生殖细胞肿瘤、卵巢低度恶性潜能肿瘤、胰腺癌、胰岛细胞胰腺癌、鼻窦和鼻腔癌、甲状旁腺肿瘤、阴茎癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体星形细胞瘤、松果体生殖细胞瘤、幕上原始神经外胚层和成松果体细胞瘤、垂体腺瘤、浆细胞瘤/多发性骨髓瘤、胸膜肺母细胞瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、肾盂和输尿管移行细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤、尤因家族肿瘤、卡波济肉瘤、软组织肉瘤、子宫肉瘤、Sézary综合征、皮肤癌(非黑色素瘤)、皮肤癌(黑色素瘤)、Merkel细胞皮肤癌、小细胞肺癌、小肠肿瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、隐匿性原发性转移性鳞状颈部肿瘤、胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、T细胞淋巴瘤、皮肤癌-见Mycosis Fungoides Sézary综合征、睾丸癌、咽喉癌、胸腺瘤、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、肾盂和输尿管癌、输尿管和肾盂滋养细胞肿瘤、尿道移行细胞癌、子宫移行细胞癌、子宫内膜癌、子宫肉瘤、阴道癌、视觉通路和下丘脑胶质瘤、外阴癌、华氏巨球蛋白血症和Wilms瘤(肾细胞癌)。

[0108] 该癌症优选为前列腺癌、乳癌、膀胱癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、肺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肾(肾细胞)癌、食管癌、甲状腺癌、皮肤癌、淋巴瘤、黑色素瘤或白血病。

[0109] 步骤(b)中施用的抗体优选对于与一种或多种上述癌症类型相关的肿瘤抗原是特异性的。用于该方法的抗体的感兴趣的靶点包括CD2、CD3、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD32、CD33、CD40、CD52、CD54、CD56、CD64、CD70、CD74、CD79、CD80、CD86、CD105、CD138、CD174、CD203、CD227、CD326、CD340、MUC16、GPNMB、PSMA、Cripto、ED-B、TMEFF2、EphA2、EphB2、FAP、av整合素、间皮素、EGFR、TAG-72、GD2、CA1X、5T4、α4β7整合素、Her2。其他靶点可为细胞因子(如白介素IL-1至IL-13)、肿瘤坏死因子α&β、干扰素α、β和γ、肿瘤生长因子β(TGF-β)、集落刺激因子(CSF)和单核粒细胞集落刺激因子(GMCSF)。参见Human Cytokines:Handbook for Basic&Clinical Research(Aggrawaletal.eds.,Blackwell Scientific,Boston,MA1991)。其他靶点可为激素、酶和细胞内或细胞间信使,例如腺苷酸环化酶、鸟苷酸环化酶、磷脂酶C。其他感兴趣的靶点可为白细胞抗原,例如CD20和CD33。药物也可作为感兴趣的靶点。靶点分子可为人的、哺乳动物的或细菌的。其他靶点可为抗原,例如来自微生物病原体(含病毒和细菌)以及肿瘤的蛋白质、糖蛋白和碳水化合物。还有其他靶点参见U.S.4,366,241。

[0110] “另一种疾病”是指可通过施用抗体而治疗的任何其他疾病。该其他疾病可为恶性腹水,此时治疗用抗体通常是Catumaxomab或结合至Catumaxomab相同靶点的抗体。

[0111] 不论治疗的是癌症或是另一种疾病,抗体可直接或间接连接至细胞毒部分或连接至可检测标记物。抗体可通过一种或多种给药途径利用本领域已知的一种或多种方法给药。给药的途径和/或模式根据预期结果而变化。优选的用于抗体的给药途径包括静脉内、肌肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊柱或其他肠外给药途径,例如可通过注射或输液实现。本文使用的词语“肠外给药”是指非肠内和局部给药的给药模式,通常通过注射实现。或者,抗体可通过非肠外途径给药,例如局部、表皮或粘膜给药。局部给药也是优选的,包括肿瘤外周

给药、肿瘤旁给药、肿瘤内给药、病灶内给药、病灶周围给药、腔内输液、膀胱内给药以及吸入。

[0112] 抗体的合适剂量可通过医疗从业人员确定。抗体的实际剂量水平可被改变从而获得能够实现对于特定患者、组合物和给药模式期望的治疗响应的活性组分的量，而不对该患者产生毒性。所选择的剂量水平取决于多个药动学因素，包括所使用的特定抗体的活性、给药途径、给药时间、抗体的排泄速率、治疗持续时间、与所使用的特定组合物结合使用的其他药物、化合物和/或材料、被治疗的患者的年龄、性别、体重、状态、一般健康情况及之前病史以及医学领域熟知的其他类似因素。

[0113] 抗体的合适剂量可为例如约0.1μg/kg至约100mg/kg被治疗患者体重。例如合适的剂量可为每天约1μg/kg至约10mg/kg体重，或每天约10μg/kg至约5mg/kg。

[0114] 给药方案可被调整以提供最优的期望响应(例如治疗响应)。例如，可单次大剂量给药，或者该方法的步骤(b)可包括随时间分成几次给药，或者该剂量可按治疗情况的迫切程度按比例减少或增加，只要不超过步骤(a)和(b)之间所需的时间间隔即可。特别有利的是，配制剂量单元形式的肠胃外组合物，以方便施用和实现剂量的均一性。本文所述的剂量单元形式是指以统一的剂量配制的用于被治疗的对象的物理上分散的单元；每个单元含有预定量的活性化合物和所需的药学载体，该预定量是根据要产生的期望的治疗效果计算出的。

[0115] 步骤(b)的抗体可与化学疗法或放射疗法联合施用。该方法可进一步包括施用额外的抗癌抗体或其他治疗剂，它们可与步骤(b)的抗体以单个组合物形式一起施用，或作为联合疗法的一部分以单独组合物形式一起施用。例如，步骤(b)的抗体可在施用其他药剂之前、之后或同时施用。

[0116] 所述抗体可为Abagovomab、Abciximab、Actoxumab、Adalimumab、Adecatumumab、Afelimomab、Afutuzumab、Alacizumab pegol、ALD518、Alemtuzumab、Alirocumab、Altumomab pentetate、Amatuximab、Anatumomab mafenatox、Anrukinzumab、Apolizumab、Arcitumomab、Aselizumab、Atinumab、Atlizumab(＝tocilizumab)、Atorolimumab、Bapineuzumab、Basiliximab、Bavituximab、Bectumomab、Belimumab、Benralizumab、Bertilimumab、Besilesomab、Bevacizumab、Bezlotoxumab、Biciromab、Bimagrumab、Bivatuzumab mertansine、Blinatumomab、Blosozumab、Brentuximab vedotin、Briakinumab、Brodalumab、Canakinumab、Cantuzumab mertansine、Cantuzumab ravtansine、Caplacizumab、Capromab pendetide、Carlumab、Catumaxomab、CC49、Cedelizumab、Certolizumab pegol、Cetuximab、Ch.14.18、Citatuzumab bogatox、Cixutumumab、Clazakizumab、Clenoliximab、Clivatuzumab tetraxetan、Conatumumab、Concizumab、Crenezumab、CR6261、Dacetuzumab、Daclizumab、Dalotuzumab、Daratumumab、Demcizumab、Denosumab、Detumomab、Dorlimomab aritox、Drozitumab、Duligotumab、Dupilumab、Dusigitumab、Ecromeximab、Eculizumab、Edobacomab、Edrecolomab、Efalizumab、Efungumab、Elotuzumab Elsilimomab、Enavatuzumab、Enlimomab pegol、Enokizumab、Enoticumab、Ensituximab、Epitumomab cituxetan、Epratuzumab、Erlizumab、Ertumaxomab、Etaracizumab、Etrolizumab、Evolocumab、Exbivirumab、Fanolesomab、Faralimomab Farletuzumab、Fasinumab、FBTA05、Felvizumab、Fezakinumab、

Ficlatuzumab、Figitumumab、Flanvotumab、Fontolizumab、Foralumab、Foravirumab、Fresolimumab、Fulranumab、Futuximab、Galiximab、Ganitumab、Gantenerumab、Gavilimomab、Gemtuzumab ozogamicin、Gevokizumab、Girentuximab,Glembatumumab vedotin、Golimumab、Gomiliximab、GS6624、Ibalizumab、Ibritumomab tiuxetan、Icrucumab、Igovomab、Imciromab、Imgatuzumab、Inclacumab、Indatuximab ravtansine、Infliximab、Intetumumab、Inolimomab、Inotuzumab ozogamicin、Ipilimumab、Iratumumab、Itolizumab、Ixekizumab、Keliximab、Labetuzumab、Lampalizumab、Lebrikizumab、Lemalesomab、Lerdelimumab、Lexatumumab、Libivirumab、Ligelizumab、Lintuzumab、Lirilumab、Lodelcizumab、Lorvotuzumab mertansine、Lucatumumab、Lumiliximab、Mapatumumab、Maslimomab、Mavrilimumab、Matuzumab、Mepolizumab、Metelimumab、Milatuzumab、Minretumomab、Mitumomab、Mogamulizumab、Morolimumab、Motavizumab、Moxetumomab pasudotox、Muromonab-CD3、Nacolomab tafenatox、Namilumab、Naptumomab estafenatox、Narnatumab、Natalizumab、Nebacumab、Necitumumab、Nerelimomab、Nesvacumab、Nimotuzumab、Nivolumab、Nofetumomab merpentan、Obinutuzumab、Ocaratuzumab、Ocrelizumab、Odulimomab、Ofatumumab、Olaratumab、Olokizumab、Omalizumab、Onartuzumab、Oportuzumab monatox、Oregovomab、Orticumab、Otelixizumab、Oxelumab、Ozanezumab、Ozoralizumab、Pagibaximab、Palivizumab、Panitumumab、Panobacumab、Parsatuzumab、Pascolizumab、Pateclizumab、Patritumab、Pemtumomab、Perakizumab、Pertuzumab、Pexelizumab、Pidilizumab、Pinatuzumab vedotin、Pintumomab、Placulumab、Polatuzumab vedotin、Ponezumab、Priliximab、Pritoxaximab、Pritumumab、PRO 140、Quilizumab、Racotumomab、Radretumab、Rafivirumab、Ramucirumab、Ranibizumab、Raxibacumab、Regavirumab、Reslizumab、Rilotumumab、Rituximab、Robatumumab、Roledumab、Romosozumab、Rontalizumab、Rovelizumab、Ruplizumab、Samalizumab、Sarilumab、Satumomab pendetide、Secukinumab、Seribantumab、Setoxaximab、Sevirumab、Sibrotuzumab、Sifalimumab、Siltuximab、Simtuzumab、Siplizumab、Sirukumab、Solanezumab、Solitomab、Sonepcizumab、Sontuzumab、Stamulumab、Sulesomab、Suvizumab、Tabalumab、Tacatuzumab tetraxetan、Tadocizumab、Talizumab、Tanezumab、Taplitumomab paptox、Tefibazumab、Telimomab aritox、Tenatumomab、Teneliximab、Teplizumab、Teprotumumab、TGN1412、Ticilimumab(＝tremelimumab)、Tildrakizumab、Tigatuzumab、TNX-650、Tocilizumab(＝atlizumab)、Toralizumab、Tositumomab、Tralokinumab、Trastuzumab、TRBS07、Tregalizumab、Tremelimumab、Tucotuzumab celmoleukin、Tuvirumab、Ublituximab、Urelumab、Urtoxazumab、Ustekinumab、Vapaliximab、Vatelizumab、Vedolizumab、Veltuzumab,Vepalimomab Vesencumab、Visilizumab、Volociximab、Vorsetuzumabmafodotin、Votumumab、Zalutumumab、Zanolimumab、Zatuximab、Ziralimumab或Zolimomab aritox.

[0117] 优选的抗体包括Natalizumab、Vedolizumab、Belimumab、Atacicept、Alefacept,Otelixizumab、Teplizumab、Rituximab、Ofatumumab、Ocrelizumab、Epratuzumab、Alemtuzumab、Abatacept、Eculizumab、Omalizumab、Canakinumab、Meplizumab、Reslizumab、Tocilizumab、Ustekinumab、Briakinumab、Etanercept、Inlfliximab、

Adalimumab、Certolizumab pegol、Golimumab、Trastuzumab、Gemtuzumab、Ozogamicin、Ibrimmomab、Tiuxetan、Tostitumomab、Cetuximab、Bevacizumab、Panitumumab、Denosumab、Ipilimumab、Brentuximab和Vedotin。

[0118] 疗法

[0119] 在另一个实施方式中，该疗法是器官移植。器官可选自肾、肝、心、胰、肺或小肠。

[0120] 优选地，被治疗的对象可为被敏化的或被高度敏化的。“敏化”是指该对象产生了抗人主要组织相容性(MHC)抗原(也称作人白细胞抗原(HLA))的抗体。抗HLA抗体来自同种异体敏化的B细胞，并且通常存在于之前由于输血、器官移植或怀孕而被敏化的患者中(Jordan et al.,2003)。

[0121] 潜在的移植受体是否被敏化可通过任何合适的方法来确定。例如，可使用群体反应性抗体(PRA)实验来确定受体是否被敏化。PRA分值＞30％通常被认为该患者是“高度免疫学风险”或“敏化的”。或者，可进行交叉匹配实验，在该实验中，潜在的移植供体的血液样品被与预期受体的血液样品混合。阳性交叉匹配意味着受体具有与供体样品反应的抗体，表明该受体是敏化的，移植不应当进行。交叉匹配实验通常是作为紧接在移植之前的最后检查而进行的。

[0122] 存在高滴度的抗潜在供体的MHC抗原的抗体(即供体特异性抗体(DSA))是移植的直接禁忌，因为存在急性抗体介导的排斥的风险。简而言之，对供体MHC抗原的敏化反应阻止了合适供体的识别。阳性交叉匹配实验结果是移植的明确障碍。因为近1/3等待肾移植的患者是敏化的，其中高达15％是高度敏化的，所以这导致等待移植的患者的累积。在美国，2001-2002年肾移植的平均等待时间，对于PRA分值09％的患者是1329天，对于PRA 1079％的患者是1920天，对于PRA 80％或更高的患者是3649天(OPTN-database,2011)。

[0123] 克服DSA障碍的一个被接受的策略是实施血浆置换或免疫吸附，这通常结合使用例如静脉丙种球蛋白(IVIG)或Rituximab，以将DSA水平降低至可考虑移植的水平(Jordan et al.,2004;Montgomery et al.,2000;Vo et al.,2008a;Vo et al.,2008b)。但是，血浆置换、免疫吸附和IVIG治疗的缺点在于效率低且需要严格的计划，因为这些方法涉及在长时间段内重复治疗。当有死亡供体的器官可供利用时，器官必须在数小时内被移植，因为延长的冷缺血时间是导致肾移植中移植肾功能延迟恢复和移植失败的最重要的风险因素之一(Ojo et al.,1997)。

[0124] 相反，本发明的方法允许在潜在的移植受体中快速、暂时且安全地移除DSA。紧接在移植之前给予所述试剂能够有效地对高度敏化的患者进行脱敏，从而允许移植并避免急性抗体介导的排斥。在移植之前给予单次该试剂将使数干移植患者具有供体特异性IgG抗体。

[0125] 在该实施方式中，该方法可替代性地被描述为一种治疗对象的器官衰竭的方法，该方法包括(a)向该对象施用降低该对象的血清IgG分子的Fc受体结合的试剂，以及(b)随后将替换器官移植到该对象中；其中：

[0126] -所施用的所述试剂的量足以消除该对象的血清中存在的实质上所有的IgG分子对Fc受体的结合；并且

[0127] -步骤(a)和(b)间隔至少2小时且至多21天的时间间隔。

[0128] 该实施方式可被描述为一种预防对象中移植器官的排斥(特别是急性的抗体介导

的移植排斥)的方法,该方法包括在器官移植之前至少2小时、至多21天,向该对象施用降低该对象的血清IgG分子的Fc受体结合的试剂,其中所施用的所述试剂的量足以消除该对象的血清中存在的实质上所有的IgG分子对Fc受体的结合。将意识到的是,该试剂的施用以及随后的移植以特定时间间隔隔开,该时间间隔与上述替代性措辞的方法中的步骤(a)和(b)之间的时间间隔相等。因此,以上所述的步骤(a)和(b)之间的时间间隔的各种上限值和下限值都可同等地适用于此时间间隔。在该实施方式中,特别优选的是,该时间间隔足够短以允许该方法可在单次去医院期间完成。因此,优选的间隔是1至6小时或1至12小时。

[0129] 本发明还提供该试剂在治疗器官衰竭或预防移植排斥(特别是急性抗体介导的移植排斥)的方法中的应用。本发明还提供该试剂在制备用于治疗器官衰竭或用于预防移植排斥的药物中的应用。

[0130] 在该实施方式中,本发明的方法可额外包括在移植时或紧接在移植之前进行的步骤,该步骤包括在该患者中诱导抑制T细胞和/B细胞。所述诱导抑制通常可包括施用有效量的杀死或抑制T细胞的试剂,和/或施用有效量的杀死或抑制B细胞的试剂。杀死或抑制T细胞的试剂包括Muromonab、Basiliximab、Daclizumab、抗胸腺细胞球蛋白(ATG)抗体和淋巴细胞免疫球蛋白、抗胸腺细胞球蛋白制剂(ATGAM)。已知Rituximab可杀死或抑制B细胞。

[0131] 在对象中去除抗体或降低抗体效果的方法

[0132] 本发明还提供在对象中去除抗体或降低抗体效果的方法。该方法所要影响的抗体通常是致病性自身抗体。该方法包括第一步骤(称为步骤(a))和任选的第二步骤(称为步骤 (b))。

[0133] 步骤(a)包括向该对象施用降低该对象的血清IgG分子对Fc受体的结合的试剂。所施用的试剂的量优选足以消除该对象的血清中存在的实质上所有的IgG分子对Fc受体的结合。

[0134] 如果进行的话,步骤(b)包括在步骤(a)之后使该对象经受去除内源性抗体的治疗;其中去除内源性抗体的治疗是血浆置换或免疫吸附,或是施用阻止血清中抗体借由FcRn 受体再循环的试剂(例如抗FcRn抗体)从而降低半衰期,并且其中步骤(a)和(b)间隔至少2周。

[0135] 该方法可进一步包括重复步骤(a)。优选地,仅在患者具有低水平的抗试剂抗体响应的情况下重复步骤(a)。患者的血清中抗试剂IgG分子的量可通过任何合适的方法测定,例如试剂特异性CAP FEIA(ImmunoCAP)实验。仅在CAP FEIA的结果低于医生确定的阈值时重复步骤(a)。通常,为避免产生过度的抗试剂反应,步骤(a)的重复频率不应高于每6个月一次。

[0136] 该方法所影响的抗体通常可为对自身抗原特异的致病性自身抗体,该自身抗原在完全或部分由自身抗体介导的自身免疫疾病中被靶向。表3列出了这样的疾病和相关的自身抗原。

[0137]

疾病	自身抗原
爱迪生氏病	甾类 21-羟基化酶、17α-羟化酶 (17OH)和侧链裂解酶(P450scc)、甲状腺过氧化物酶、甲状腺球蛋白和H+/K(+)-
抗 GBM 肾小球性肾炎(与 Goodpasteur 相关)	抗肾小球基膜抗体(抗-GBM): α3α4α5(IV)胶原的非胶原(NC1)结构域
抗嗜中性粒细胞细胞质抗体相关性血管炎 (ANCA 相关性血管	髓过氧物酶、蛋白酶 3

[0138]

炎)(Wegener 肉芽肿、Churg-Strauss 综合征、显微镜下多血管炎)	
抗磷脂抗体综合征(APS)	带负电磷脂与磷脂结合血浆蛋白复合 (如 β2GPI)、心磷脂、β2-糖蛋白 I、和 β2GPI
自身免疫大疱性皮肤病(Pemphigus)、落叶型天疱疮(PF)、巴西天疱疮(FS)(地方性)、寻常天疱疮(PV)	抗角质细胞 IgG，特异性靶标是桥粒芯蛋白(Dsg) 1 (桥粒钙黏蛋白质类)
自身免疫溶血性贫血(AIHA)	血红细胞上的自身抗原
自身免疫肝炎(AIH)	肌动蛋白、抗核抗体(ANA)、平滑肌抗体 (SMA)、抗肝肾微粒体抗体(LKM-1)、抗可溶性肝抗原抗体(SLA/LP)和抗线粒体抗体(AMA)、CYP2D6、CYP2C9-天尼酸、UGT1A、CYP1A2、CYP2A6、CYP3A、CYP2E1、CYP11A1、CYP17 和 CYP21
自体免疫性白血球不足(AIN)	FcgRIIIb
大疱性类天疱疮(BP)	半桥粒蛋白 BP230 和 BP180 (XVII 型胶原)、层粘连蛋白 5、整合蛋白 α6β4 的 α6 亚单位和 p200
乳糜泻	转谷氨酰胺酶 2 (TG2)、转谷氨酰胺酶 3、肌动蛋白、神经节苷脂、胶原、钙网蛋白和连蛋白、甲状腺、内分泌胰腺抗胃和肝成分、抗核成分、抗网状蛋白、肌动蛋白、平滑肌、钙网蛋白、肌间线蛋白、胶原蛋白、骨、抑制大脑活动、神经节苷脂、神经、血管
慢性荨麻疹	高亲和性 IgE 受体的 α 亚单位、IgE
完全性心脏传导阻滞(CCHB)	Ro (Sjögens 综合征抗原 A (SSA))、La (Sjögens 综合征抗原 B(SSB))
1A 型糖尿病 (T1DM)	胰岛细胞自身抗体(ICA)、胰岛素抗体(IAA)、谷氨酸脱羧酶(GAA 或 GAD)、蛋白质酪氨酸磷酸酶 (IA2 或 ICA512)、胰岛瘤相关肽-2。抗体的数量(而非单个抗体)被认为对显性糖尿病进展最具预测性。
混合性冷凝球蛋白血症	冷沉球蛋白血症必要混合抗原
Goodpasture 氏综合征 (也称 Goodpasture 氏病和抗肾小球基膜疾病	α3(IV)胶原 (=Goodpasture 抗原)
Graves 氏病(Basedow 氏病)、包括甲渗透性眼球突出症和渗透性皮肤病	促甲状腺素受体(TSHR)甲状腺过氧化物酶(TPO)
Guillain-Barré 综合征(GBS)，急性炎症性脱髓鞘多神经病(AIDP)、急性运动轴突性神经病(AMAN)	神经节甘脂 GM1、GM1b、GD1a 和 GalNAc-GD1a、鞘糖脂、髓磷脂蛋白 PMP22 和 P0

血友病-获得性 FVIII 缺陷	VIII 因子
特发性血小板减少性紫癜(ITP)	血小板糖蛋白(GP) IIb-IIIa 和/或 GPIb-IX
Lambert-Eaton 肌无力综合征(LEMS)	电压门控性钙通道
混合性结蒂组织病(MCTD)	抗剪接体 IgG、U1-snRNP
多发性骨髓瘤	多发性骨髓瘤抗原
重症肌无力	乙酰胆碱受体(AchR)、肌肉特异性激酶(MuSK)
心肌炎、扩张型心肌病(DCM)(充血型心肌病)	抗多种抗原(如心肌肌球蛋白)的心脏反应性自身抗体
原发性胆汁性肝硬化(PBC)	丙酮酸脱氢酶复合体(PDC)-E2 和草酸脱氢酶家族的其他成员、糖蛋白-210、p62、sp100
原发性进行性多发性硬化症(PPMS)	髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、髓鞘蛋白脂质蛋白(PLP)、转酮醇酶(TK)、I 型环核苷酸磷酸二酯酶(CNPase I)、脑衰蛋白反应调节蛋白 2、微管蛋白 β4、神经束蛋白
风湿性心脏病(RHD)(风湿热)	心肌肌球蛋白
类风湿性关节炎 (RA)	II 型胶原、瓜氨酸(化蛋白(如(丝相关蛋白、纤维蛋白原、波形蛋白、II 型胶原蛋白,烯醇酶))、G6PI、RFs (抗 Fc/IgG)、波形蛋白、细胞角蛋白
Sjögren 综合征(SS)	Ro (Sjögens 综合征抗原 A (SS-A))、La (Sjögens 综合征抗原 B(SS-B))、p80 螺旋蛋白、抗核抗体、抗甲状腺、抗着丝点抗体(Raynaud 氏现象)、抗碳酸酐酶 II (远端肾小管酸中毒)、抗线粒体抗体(肝脏病理)、冷球蛋白(进化成非 Hodgkin 淋巴瘤). α-和 β 胞衬蛋白、胰岛细胞自身抗原、多聚(ADP)核糖聚合酶(PARP)、NuMA、高尔基体蛋白、NOR-90、M3-毒蕈碱型受体
SLE，包括 Lupus 肾炎	抗核成分(如 dsDNA 和核小体)的自身抗体、dsDNA、PARP、Sm、PCDA、rRNA 核糖体 P 蛋白、C1q
僵人综合征(SPS)	谷氨酸脱羧酶(GAD)、双载蛋白
系统性硬化(硬皮病)	DNA-拓扑异构酶 I (Scl-70)、U3 snRNP、U2 snRNP、7-2 RNP、NOR-90、着丝粒相关蛋白、和核仁抗原 ,抗-Th/To、抗-RNA 聚合酶 I/III、抗-PDGF 受体、抗原纤蛋白-1、M3-毒蕈碱型受体
移植排斥	移植排斥抗原

[0139]

[0140] 在该实施方式中,该方法可被替代性地描述为一种治疗对象的自身免疫疾病的方法,该方法包括(a)向该对象施用降低该对象的血清IgG分子对Fc受体的结合的试剂;以及任选地(b)随后向该对象施用治疗有效量的用于治疗所述癌症或自身免疫疾病的抗体;其中所施用的所述试剂的量足以消除该对象的血清中存在的实质上所有的IgG分子对Fc受体的结合;并且步骤(a)和(b)间隔至少2小时、至多21天。本发明还提供该试剂用于这样的治疗自身免疫疾病的方法中。本发明还提供该试剂在制备用于通过这样的方法治疗自身免疫疾病的药物的应用。

[0141] 该自身免疫疾病优选是完全或部分由自身抗体介导的慢性自身免疫疾病。该自身免疫疾病可为表3中列出的疾病中的一种。

[0142] 任选的额外方法步骤

[0143] 在本发明的方法中，步骤(a)中施用的试剂通常不仅仅作用于血清IgG分子。发明人还惊讶地发现该试剂还可作用于作为B细胞受体复合物(BCR)的一部分存在的膜结合IgG分子。

[0144] BCR含有一个配体结合部分和一个信号转导部分。配体结合部分由具有跨膜结构域的抗体构成，而信号转导部分由称为Ig-α/Ig-β(CD79a/CD79b)的异源二聚体构成。CD79蛋白横跨质膜并且具有含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)的细胞质尾部。连接受体后，ITAM被SRC家族激酶LYN磷酸化，将脾酪氨酸激酶(SYK)招募至受体。SYK的激活导致形成质膜关联信号转导复合物，即信号转导体，其组装信号转导分子，如磷脂酶-Cγ2(PLC γ2)、磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)、布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)、VAV1和接头分子。BCR信号转导级联反应中的两个基础的且深入研亢的中间分子PLCγ2和PI3K产生关键的第二信使，该第二信使又激活IκB激酶(IKK)和细胞外信号调节激酶(ERK1/2;AKA MAPK3和1)。B细胞的命运决定，即增殖、存活、分化和细胞死亡受这些信号转导事件之间的平衡紧密调节。在B细胞发育过程中，刚成熟的B细胞离开骨髓，经历在生发中心(germinalcentres)的体细胞超突变以及类别转换，从而成为高亲和性长寿命血浆细胞和记忆性B细胞，以备在受抗原刺激时猛烈响应。记忆性B细胞通过结合至BCR对抗原做出响应，血清循环中的绝大部分记忆性B细胞具有IgG型BCR。

[0145] 因此，本发明的方法的步骤(a)中施用的试剂也可作用于记忆性B细胞的BCR的IgG部分，并可抑制这些细胞通过配体结合而被正常激活。因此，存在个体中的记忆性B细胞的激活被降低的时间段。该时间段通常在步骤(a)完成后约12小时结束，但可能更长。在该时间段结束时，完整膜结合IgG(以及正常BCR)的水平恢复至正常，通常是由于受影响细胞的膜更新导致的。因此，存在另一个时间段，在该时间段结束时新合成的IgG开始在血清中再现。该时间段通常在步骤(a)完成后约3-4天结束。

[0146] 因此，本发明的方法的步骤(a)中施用的试剂对记忆性B细胞的作用提供了在本发明的任何方法中包括任选的额外步骤的机会。该步骤(称为步骤(a1))在本发明的一个方法的步骤(a)之后进行，并且如果存在步骤(b)，则在步骤(b)之前进行。步骤(b)通常在步骤(a1)之后尽可能快地进行。步骤(a1)可在(i)步骤(a)后的时间段内但在该对象的细胞表面上的完整膜结合IgG的水平恢复之前进行，或(ii)在(i)后的时间段内但在新合成的IgG开始在该对象的血清中再现之前进行。完整的膜结合IgG的水平的恢复或血清IgG的再现可通过任何合适的方法确定。示例性的方法在实施例中描述。

[0147] (i)的时间段通常结束于步骤(a)后的约12小时、16小时或24小时。因此，如果步骤(a1)在时间段(i)内进行，它可在步骤(a)之后至多1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、16小时或24小时的时候进行，优选在步骤(a)之后的至多1小时或2小时的时候进行。

[0148] (ii)的时间段开始于(i)的时间段结束时，并且通常结束于步骤(a)后3或4天。因此，(ii)的时间段通常为步骤(a)后至多12小时至4天(96小时)。因此，如果步骤(a1)在时间段(ii)内进行，它可在步骤(a)之后12小时至96小时之间进行，并且可在步骤(a)之后12小

时至24小时之间、12小时至48小时之间、或12小时至72小时之间进行。为方便该对象，通常优选的是在时间段(ii)内尽快进行步骤(a1)。因此，优选在步骤(a)后12小时至24小时之间进行步骤(a1)。

[0149] 如果步骤(a1)在时间段(i)内进行，它通常包括施用特异性靶向IgG或IgG片段(由于步骤(a)的试剂对B细胞的作用而产生)存在的表位的试剂。例如，步骤(a1)可包括施用特异性结合至膜结合Fc片段(如IdeS的作用所产生的)的试剂或特异性结合至具有改变的糖基化的膜结合IgG(如EndoS的作用所产生的)的试剂。该表位可以是由步骤(a)的试剂的作用而新产生的，或者可为已经存在于完整IgG中的表位，只要它仍被IgG或IgG片段(由于步骤(a)的试剂对B细胞的作用而产生)保留。换句话说，本发明还可提供一种方法，其中额外的步骤(a1)在步骤(a)之后进行，并且如果存在步骤(b)的话，在步骤(b)之前进行，其中步骤(a1)包括向该对象施用特异性结合至由步骤(a)中施用的试剂作用于BCR复合物中的膜结合IgG而产生的表位的试剂，其中所述施用在步骤(a)后的时间段内但在BCR复合物的完整膜结合IgG水平恢复至步骤(a)之前的相同水平之前进行。这即是上述时间段(i)。例如，该表位可为膜结合Fc片段(如IdeS的作用所产生的)。所述方法的步骤(a1)中施用的试剂可为特异性结合至该表位的任何试剂，例如抗体。该试剂的结合通常导致该靶标所在细胞的降低的激活和/或死亡。所述细胞通常是记忆性B细胞。该试剂可任选地结合至细胞毒素(合适的例子包括表4所列的那些)、放射性同位素或其他促进所述细胞的所述降低的激活或死亡的部分。因此，在该实施方式中，步骤(a1)中的试剂的施用通常导致记忆性B细胞的死亡，这些记忆性B细胞具有因步骤(a)的试剂的作用而被改变的IgG分子。因此，将步骤(a1)包括在内可例如通过延长或维持血清IgG分子的缺失而增加本发明的方法的有益效果。

[0150] 表4

[0151]

名称	靶标	作用模式
阿霉素衍生物	拓扑异构酶 IIDNA 复合物	抑制 DNA 重新连接，导致 DNA 双链断裂
美登素类化合物	α-微管蛋白	阻止微管蛋白聚化
Auristatins	α-微管蛋白	阻止微管蛋白聚化
卡利奇霉素类 (Calicheamicins)	DNA 的序列特异性小沟	导致双链 DNA 断裂
CC-1065	DNA 的序列特异性小沟	诱导腺嘌呤甲基化
达卡霉素类 (Duocarmycins)	结合至 DNA 的特异性小沟	降解 DNA 结构中腺嘌呤特异性分子
蒽环类药物	DNA、RNA 复合物	通过嵌入碱基对之间抑制 DNA 和 RNA 合成，阻止复制

[0152] 如果步骤(a1)在时间段(ii)内进行，它通常包括施用特异性靶向完整膜结合IgG的试剂。所述试剂将仅影响记忆性B细胞，BCR复合物中的膜结合IgG的水平已恢复。在该时间段内，所有其他形式的完整IgG(例如，循环IgG或通过细胞膜中Fc受体结合至效应细胞的IgG)已通过步骤(a)中施用的试剂的作用而被去除，由此产生的片段也被清除。因此，步骤(a1)中施用的试剂可被用来靶向所有已恢复完整BCR的记忆性B细胞。或者，该试剂可被用

来靶向对特定抗原特异的记忆性B细胞的BCR的特异性Fab区，即步骤(a1)中施用的试剂可为抗独特型的(anti-idiotypic)。例如，步骤(a1)中施用的试剂可被用来靶向移植受体中的供体特异性抗体的Fab区，或自身免疫疾病患者(例如表3列出的疾病患者)的自身免疫抗原的特异性抗体的Fab区。

[0153] 换句话说，本发明还可提供一种方法，其中额外的步骤(a1)在步骤(a)之后进行，并且如果步骤(b)存在的话，在步骤(b)之前进行，其中步骤(a1)包括向该对象施用特异性结合至完整的膜结合IgG的表位的试剂，其中所述施用在步骤(a)之后的时间段内进行，在该时间段内BCR复合物中的完整膜结合IgG的水平已恢复至与步骤(a)之前类似、实质性相同或相同的水平，但新合成的IgG尚未在血清中再现。这即是上文所述的时间段(ii)。所述方法的步骤(a1)中施用的试剂可为特异性结合至该表位的任何试剂，例如抗体。试剂的结合通常会导致该靶标所在细胞的降低的激活和/或死亡。该试剂可任选地结合至细胞毒素(合适的例子包括表4所列的那些)、放射性同位素或其他促进所述细胞的所述降低的激活或死亡的部分。在该实施方式中，步骤(a1)中的试剂的施用通常导致具有完整膜结合IgG分子的记忆性B细胞的死亡。或者，它仅会导致具有特定特异性的膜结合IgG分子的记忆性B细胞的死亡。在任一种情况下，因此，将步骤(a1)包括在内可增加本发明的方法的有益效果，例如通过延长或维持所有血清IgG分子的缺失来实现，或通过延长或维持对特定靶标具有特异性的特定亚群的血清IgG分子的缺失来实现。后一种情况可能是特别有利的，因为它将允许从该方法所实施的对象的血清的新合成的IgG群体中选择性去除不想要的IgG分子亚群。

[0154] 试剂盒

[0155] 本发明还提供适用于本发明的方法的试剂盒，该试剂盒包含特定量的降低对象的血清IgG分子对Fc受体的结合的试剂，该量足以消除对象的血清中存在的所有或实质上所有IgG分子对Fc受体的结合。

[0156] 本发明的试剂盒还可包括一种或多种其他试剂或说明书，以使上述任一实施方式可被实施。这样的试剂或说明书包括以下所述的一种或多种：治疗有效量的治疗剂，其为抗体、合适的缓冲剂(水性溶液)、以静脉灌注形式将该试剂施用至对象的装置(例如容器或包含针的工具)。试剂可以干燥状态存在于试剂盒中，可用液体样品重悬该试剂。该试剂盒还可任选地包括说明书，以使该试剂盒可被用在本发明的方法中，或包括有关本发明可适用的患者的详细情况。

[0157] 以下实施例示例性阐释了本发明。

[0158] 实施例1

[0159] 临床前研究

[0160] 被设计用来研究GMP生产的IdeS在新西兰白兔体内的毒理学和药理学的符合GLP要求的临床前研究证实，在施用IdeS 5分钟内IdeS酶切了整个血浆的IgG，处理后一天剩余<1％的IgG。IgG水平在IdeS处理后24-48小时达到其最低水平，随后在接下来几天缓慢增加。正常IgG水平在单次IdeS剂量后约3周时恢复。终产物(即$F(ab')_2$片段和Fc片段)与完整IgG相比具有短得多的半衰期，并且在IdeS单次给药后的那天仅检测到低水平。IdeS具有快速的分布，显示出与剂量成比例的药代动力学以及多相消除，兔中血浆半衰期约1小时。根据重复剂量毒性研究，IdeS的未观察到副作用水平(NOAEL)被设定为2mg/kg体重(BW)。数据

未给出。

[0161] IdeS在上述体外和体内实验中的效果是显著的,为在健康人体志愿者中进行进一步研亢提供了基础。

[0162] 人体研亢

[0163] 材料和方法

[0164] 研亢设计

[0165] 这是一个在健康男性对象中进行的双盲、随机、单中心临床实验(EudraCT号:2012-000969-21),实验在瑞典隆德的大学医院I期临床单元进行。在招募之前,实验方案通过当地伦理委员会的批准,并且所有对象在进行任何研亢程序之前都提供了签名的知情同意书。主要目标是评估IdeS在静脉给予单次逐渐升高剂量后的安全性和耐受性。次要目标是评价IdeS在健康人体对象中的有效性(即降低血清IgG)、药代动力学和免疫原性。

[0166] 在该医院药房,使用带有0.2μm过滤器(B.Braun,Germany)的输液器的输液针,在磷酸盐缓冲的等渗盐水中制备按GMP标准生产的IdeS(Hansa Medical AB,Sweden)的稀释输液。所选择的0.010mg/kg BW初始剂量低于临床前确定的最低期望生物效应水平(MABEL)的10倍,低于动物毒性试验确定的未观察到副作用水平(NOAEL)的200倍。研亢设计允许在严密安全性监控下逐渐增加剂量。

[0167] 为满足招募标准,对象必须是体检筛选为健康的,年龄为18至45岁,具有适当的静脉以进行穿刺,体质指数(BMI)为19至30kg/m^2,体重为50至100kg。以下对象被从研亢中排除:具有或曾经具有任何临床上明显的免疫缺陷病(包括但不限于免疫球蛋白A缺陷病),具有升高水平的抗IdeS IgG(>15mg/L),血清乙肝表面抗原阳性,丙肝抗体阳性,人免疫缺陷病毒(HIV)阳性,筛选期间正患肺结核,正患梅毒,正被单纯疱疹病毒或带状疱疹病毒感染。

[0168] 每个对象在临床试验单元具有三天的准入期,随机分至IdeS组或安慰剂组(磷酸盐缓冲盐水)并于准入后的上午给药。每个给药组中的两个对象在第一天给药(一个给予IdeS,一个给予安慰剂),该组其余对象在一周后给药。每个群组之后,数据监测委员会评估安全性数据并决定下一次剂量水平。上一次一个剂量水平至下一次剂量水平开始之间的时间最少为14天。每组中头两个对象的输液在30分钟内完成,该组中剩余对象的输液在15分钟内完成。在准入期内,进行严密的安全性监测和一系列血液采样以检测安全性、药代动力学、药效和耐药性抗体。在第4天获准离开,并进行至少8次中间随访,并进行体检和血液采样,直至第64天研亢结束。

[0169] 参与研亢的所有对象都用抗生素治疗(如果不对β-内酰胺类过敏的话,使用Spektramox)作为预防细菌感染。预防治疗开始于给药那天并持续至血浆IgG水平为>4.5g/L。除非研亢人员开具处方并且认为是患者的安全和健康所需要的,否则不允许同时进行其他药物治疗或疗法(给药后头28天内对乙酰氨基酚治疗除外)。

[0170] 安全性评估

[0171] 从准入时间开始直至整个研亢期间(包括随访期)都收集不良反应事件(AE)。所有关于AE的信息都被记录,包括描述、起止时间、通用毒性标准分级(根据CTCAE)、严重性、因果关系(不可能、可能或很可能)、采取的措施、停药及结果。准入期内及随后所有随访都定期记录生命体征、体温、心跳速率和卧位血压。此外,在输液期间及随后的24小时,使用5通道遥测ECG监测对象。使用常规方法在LabmedicinSkåne,Sweden分析安全性样品的临床化

学、血液学、凝集、安全性生物标记物(IL-6、IL-8和TNFα)和血浆IgG。使用Multistix(Siemens,Germany)进行尿液分析(U-葡萄糖、U-血红蛋白和U-蛋白)。

[0172] 血清样品用于药效、药代动力学和抗IdeS抗体评价

[0173] 用于药效学研亢的血液样品收集于改性CAT血清BD采集管(BD Diagnostics,NJ,USA),该管还有2mM碘乙酸以防止被IdeS进一步酶切裂解。血液采集在以下时间点进行:给药前,输液结束前1分钟(14或29分钟),输液结束后5分钟(20或35分钟)以及输液结束后45分钟(1h或1h又15分钟)。此外,样品在输液开始后2、6、24、48和72小时采集并在输液后第7、14、21、28和64天采集。用于药动学试验的血液样品采集于常规血清BD真空采集管中,采集在以下时间点进行:给药前,输液结束前1分钟,输液结束后5分钟,输液结束后45分钟以及给药后2、6、24、48、72和144小时。用于抗IdeS抗体分析的血液样品采集于常规血清BD真空采集管中,采集在以下时间点进行:第1天(给药前)、第2天(24h)、第3天(48小时)、第4天(72小时)、第7天(1周)、第14天(2周)、第21天(3周)、第28天(4周)和第64天(2个月)。在研亢方案之外,对象被问及是否愿意提供第182天(6个月)和第365天(1年)时的血清样品。所有样品在分析之前存储于-60℃以下。

[0174] 疗效评价

[0175] 使用不同方法研亢IdeS酶切及IgG的加工;酶联免疫吸附(ELISA)被用来测定血清中的IgG和IgG片段,并被用来研亢含Fab及含Fc的片段的动力学。定量试验不能完全区分IdeS酶切产物,即F(ab')$_2$、Fc和单次裂解的IgG(scIgG)(其中一个重链被酶切)。Covance Ltd,UK开发和进行的ELISA测定完整IgG和scIgG。Fab-ELISA测定所有含Fab的IgG片段,即完整IgG、scIgG和F(ab')$_2$;Fc-ELISA测定所有含Fc的片段,即完整IgG、scIgG和游离Fc。

[0176] Covance Ltd,UK进行的试验被正式地验证。简言之,血清样品经ELISA分析,其中IgG被允许结合至捕获抗体,羊抗人IgGF(ab')$_2$(#109-006-097,Jackson ImmunoResearch Labs Inc.,PA,USA)。定量的人血清蛋白校准物(IgG)(X0908,Dako,Denmark)被用来制备标准品和品质样品。结合的IgG通过后续加入过氧化物酶结合的F(ab')$_2$片段羊抗人IgG、特异性Fcγ片段(#109-036-098,Jackson ImmunoResearch Labs)以及显色底物(TMB)。定量下限是5ng/mL(在100%血清中)。血清分析在Covance Laboratories Limited(Harrogate,UK)进行。

[0177] Fc-ILISA实验羊抗人IgG(Fcγ片段特异性)F(ab′)$_2$片段(#109-006-098Jackson ImmunoResearch Labs Inc.,PA,USA)作为捕获抗体以及结合了生物素的羊抗人IgG(Fcγ片段特异性)F(ab′)$_2$片段(#109066098Jackson ImmunoResearch)作为检测剂。在Fab-ELISA中,亲和纯化的鼠抗人IgG,F(ab')$_2$片段特异性抗体(#209-005-097Jackson ImmunoResearch Labs Inc.,PA,USA)被用作捕获抗体,生物素化的CaptureSelect IgG-CH1(#710.3120.100BAC B.V.,Naarden,Netherlands)作为检测剂。链霉亲和素-辣根过氧化物酶结合物(SA-HRP)(#21126Pierce,Thermo Fisher Scientific,Rockford,IL)被用作二级检测。校准物和QC-样品(ULOQ、LLOQ、H-OC、M-QC和L-QC)由人静脉注射丙种球蛋白IVIg(Octagam®)制备。所有稀释在PBS+0.1%BSA中进行,NuncMaxiSorp®平底96孔微孔板(Nunc A/S,Roskilde,Denmark)用含0.05%Tween 20的PBS洗涤。血清样品和QC-样品分析为一式三份。TMB One component HRPMicrowell底物(TMBW-1000-01,BioFx Laboratories Inc.,MD,USA)被用作显色底物,通过加入0.5M H_2SO_4停止酶反应。吸收值在λ=450nm处在ELISA平

板读数仪(Multiscan EX,Thermo Electron Corp.)(软件:Ascent Software v.2.6)中测定。

[0178] 图19显示了血清IgG的Fab-ELISA分析和常规浊度分析之间的对比。如图所示,浊度分析仅检测到完整IgG在IdeS处理后随着时间变化水平变化很小,因为它无法区分F(ab')$_2$和完整IgG。相反,Fab-ELISA显示在相同时间段内IgG水平的几乎完全的去除和恢复。

[0179] 为了进一步评价ELISA的定量数据,还利用定性的SDA-PAGE分析来分析血清样品。SDS-PAGE分析根据生产商说明书进行(Bio-Rad Laboratories,CA,USA)。简言之,0.25μl的血清分离于4-20%Mini-PROTEAN®TGX™预制凝胶上,在还原条件下,在200V电泳40分钟。SeeBlue MW标准物(Life Technologies)和自制的人IgG、scIgG、F(ab')$_2$和Fc混合物被用作标记物。根据生产商说明书以GelCode Blue染色试剂(Pierce,Thermo Fisher Scientific,MA,USA)染色凝胶,并扫描凝胶。

[0180] 药代动力学评价

[0181] 通过合格的LC-MS/MS试验分析血清样品中四种IdeS来源的肽,即AFPYLSTK、AIYVTDSDSNASIGMK、GGIFDAVFTR和LFEYFK(Karlsson et al.2012)。按先前描述制备样品进行MS分析(Karlsson et al.2012)。选择反应监测(SRM)测量在TSQ Vantage三重四极杆质谱仪(Thermo Fisher Scientific,MA,USA)上进行,该质谱仪配备装填了Reprosil-PUR C18的PicoChip柱(New Objective,MA,USA)和Easy-nLC II系统(Thermo Fisher Scientific)。初始数据使用SRM分析软件Skyline来处理和分析(MacLean et al.2010),对结果进行人工验证和检查。注射体积为1μl,对应于12.5nl血清(即1μg总蛋白质)。IdeS处理的血清的未归一化的肽总峰面积被用来拟合线性回归曲线(无标记蛋白定量)。未知人样品中的单个肽的浓度从该线性回归中估算。商购的来自6种牛蛋白的等摩尔胰蛋白酶混合物(6Bovine Tryptic Digest Equal Molar Mix,Michrom Bioresources)被用作QC样品,每4-6个分析样品操作一次(Teleman et al.2012)。

[0182] 血清浓度随时间变化的数据通过非房室分析(NCA)在PhoenixTMWinNonlin®6.3版,build 6.2.0.495(Pharsight®,St.Louis,Missouri,USA)中分析。因为未观察到标称和实际的取样时间和剂量之间的大的偏差(>20%),所以标称的取样时间和剂量被用来进行NCA计算。LC-MS/MS实验未经验证,因而未定义正式的最低检测限(LLOQ)。对于所有四种肽和个体,PK计算的截止值被设定为给药后24小时。

[0183] 抗IdeS IgG评价

[0184] 在Uppsala,Sweden的Thermo Fisher Scientific(Phadia®)开发了CAP-FEIA(ImmunoCAP)实验,其用于定量抗IdeS特异性IgG。初始实验显示使用该实验可得到3-对数的测量范围,并且IgG IdeS特异性CAP-FEIA试验的检测限(LOD)要比推荐的试验低截止值(即,2.0mg/L)低7倍。临床样品的分析使用该实验在Phadia®250仪器上进行,根据Phadia®250用户手册,该实验重复仅一次。该实验仅用于研亢目的。

[0185] 抗原特异性效力

[0186] Hansa Medical AB开发出研亢级的ELISA试验,以阐释研亢结束时的抗原特异性效力。对象对于瑞典儿童免疫方案中的一种疫苗的IgG响应被用作I期研亢中健康对象的缺

少自身抗原的标准。简言之，DTaP-IPV//PRP～T疫苗(Pentavac®/Pentaxim®-Sanofi Pasteur)在PBS中稀释100倍，再于4℃涂覆MaxiSorp平板(Nunc)。正常人IgG(IVIg，Octagam®)被用作校准物，羊抗人Fc特异性的结合生物素-SP的$F(ab')_2$(Jackson#109-066- 098)被用作检测剂。而且，使用SA-HRP(Pierce#21126)，信号用TMB One component HRP Microwell Substrate(BioFX Laboratories#TMBW-1000-01)显示，0.5M H_2SO_4终止反应，在 450nm读数。

[0187] 体外功能试验

[0188] 对(Ackerman et al.,2011)进行改进开发出吞噬试验。使用0.1mg/ml的生物素化抗IgG CH1(CaptureSelect,#710.3120.100BAC B.V.,Naarden,Netherlands)包被荧光中性抗生物素小珠(#F8776,Molecular Probes)。CaptureSelect试剂对人重链IgG上的CH1结构域具有特异性，即完整IgG、scIgG和$F(ab')_2$片段(IgM除外)可被该蛋白捕获。洗涤被包被的小珠，并与1:100稀释的研究对象血清混合，在37℃孵育2小时，以使血清中的IgG结合被包被的小珠。对照通过将包被小珠与稀释缓冲液(含0.1％BSA的PBS)混合而制备。所有样品都制备双份。孵育后，洗涤含IgG小珠并以75000THP-1细胞/样品混合，在37℃于CO_2-孵育箱中孵育1.5-3小时。孵育后，样品固定于冰冷的2％磷酸盐缓冲的甲醛水溶液中，使用Accuri C6流式细胞仪监测THP-1细胞的荧光吸收。

[0189] 数据分析

[0190] 使用GraphPad Prism 6软件(GraphPad Software,CA,USA)进行平均值、中位数、标准偏差和基础统计学分析。

[0191] 结果

[0192] 研究描述

[0193] 经瑞典调控和伦理委员会批准，进行单次逐渐升高剂量的IdeS的I期人体随机双盲研究。研究目的在于评价静脉给药后IdeS在健康人体中的安全性、有效性、药代动力学和免疫原性。

[0194] 共29位健康对象，被分为四个给药组。每个给药组的对象被随机化，并给予IdeS或安慰剂。每组中头两个对象被静脉输液30分钟，其他对象静脉输液15分钟。起始剂量为0.01mg/kg BW(N_{IdeS}:8,$N_{安慰剂}$:4)，经数据监测委员会评估后，剂量逐步增加至0.04mg/kg BW(N_{IdeS}:4,$N_{安慰剂}$:2)，0.12mg/kg BW(N_{IdeS}:4,$N_{安慰剂}$:1)，最终为0.24mg/kg BW(N_{IdeS}:4,$N_{安慰剂}$:2)。给药后，对对象进行监测直至第64天，第一周期间更加严格地监测。所有对象都是男性高加索人，平均年龄为23岁(范围20-41岁)，体重76kg(范围:59-100kg)，BMI为23(范围:20-30)kg/m^2，各组间人口统计学无统计学显著差异。

[0195] 安全性评价

[0196] 在29名对象中，24人观察到了共77次不良事件(AE)，其中39次AE(发生在14个对象中)被分类为相关(即可能或很可能)(表1.1)。在该39次AE中，35次的通用毒性标准分级为1。四次AE为2级并且都来自同一对象(506)，该对象经历了很可能是输液反应。在用抗组胺药(2mg Tavegyl i.v.)和糖皮质激素(8mg Betapred i.v.)处理后症状在15分钟内消除，IdeS输液未中断。没有一个AE被报道为严重，达到任何剂量限制毒性标准，或导致研究药物撤除。

[0197] 在该77次AE中，最常见的是鼻咽炎、头痛和疲劳。在20个IdeS对象中有10个发生鼻

咽炎，在9个安慰剂对象中有6个发生鼻咽炎。七个对象在九种情况下(所有都是IdeS对象)报道了头痛，而六个对象(五个IdeS对象，一个安慰剂对象)报道了七次疲劳事件。

[0198] 没有发现临床上显著的血液学、临床化学或凝血方面的变化。但是，在给予导致IgG显著酶解的IdeS剂量的对象中，给药后24-48小时观察到了一过性蛋白尿(图2)。该峰值可能反映出IgG酶解产物从血液循环中清除。因为IdeS降解IgG抗体，所以最初担心研亢对象的感染风险会升高，并且在被包括在本研亢之前，筛选出不具有获得性免疫球蛋白疾病(例如IgA缺陷型疾病)的对象。而且，还担心研亢对象可能是细菌(例如肺炎球菌)的亚临床型携带者，由于血浆IgG降低而使感染风险增加。因此，对象都接受抗生素预防，直至血清IgG水平恢复至＞4.5g/L。所有研亢对象都进行了抗生素治疗，没有迹象显示感染率增加。

[0199] 表1.1每个对象报道的不良事件汇总

[0200]

剂量	对象	AE 开始				相关性	动作	结果
		0-24 小时	2-7 天	8-21 天	22-64 天			
0.01	103	鼻咽炎(1)		疲劳(1) 白日梦(1) 耳鸣(1)		可能	无	解决
	106	鼻咽炎(1)	鼻出血(1) 胸部不适(1) 噩梦(1)			可能	无	解决
	206			头痛(1) 疲劳(1) 恶心(1) 头晕(1)		可能	无	解决
0.04	303	恶心(1) 脸红(1)				可能	无	解决
	304		口咽痛(1) 鼻咽炎(1)			可能	无	解决
	305		水疱(1) 头痛(1)			可能	无	解决
0.12	404		腹泻(1) 腹胀(1)			可能	无	解决
0.24	501	头痛(1) 腹部不适(1)	鼻咽炎(1)			可能	无	解决
	504			虚弱(1)		可能	无	解决
	506	脸红(2) 窦性心搏过速(1) 胸部不适(2) 咽部水肿(2) 鼻塞(1)	咽喉刺激(1)	口咽痛(1) 肌痛(2)		很可能 可能	Tavegyl Betapred 无	解决
安慰剂	101	四肢发冷(1) 输液相关反应(1)	疲劳(1)			可能	无	解决
	104	味觉障碍(1)	鼻塞(1)			可能	无	解决
	201		单纯疱疹(1)			可能	无	解决
	302		发冷(1)			可能	无	解决

[0201] IdeS的药代动力学

[0202] 通过LC-MS/MS基于来源于IdeS的四种肽来测定血清中IdeS浓度，并且通过非房室分析来分析血清浓度随时间变化的数据。药代动力学参数计算至给药后24小时，因为剩余的浓度在该方法的预估定量范围左右或以下。

[0203] 在29个对象中，9个接收安慰剂，20个接收IdeS，剂量组为0.01、0.04、0.12和0.24mg/kg BW。在给药前样品或9个安慰剂对象的样品中没有检测到任何一个被分析的肽。但是，在20个给予IdeS的对象的样品中可检测到IdeS，从而确认了给药。IdeS的浓度随剂量

升高而升高,输液结束前一分钟的血清浓度的增加与剂量成比例(图3A)。

[0204] 在剂量为0.12和0.24mg/kg BW的对象中,给药后1周内每个对象收集到共10个血液样品。IdeS血清浓度可被描述为多相消除曲线,其中主要暴露部分在给药后的首个24小时内消除。在给药后首个6小时内,0.12mg/kg BW剂量组的平均t1/2是4.1(±2.6)小时,而0.24mg/kg BW剂量组的平均t1/2是4.9(±2.8)小时。0.12mg/kg BW剂量组的C_{max}是5.0(±2.5)mg/L,而0.24mg/kg BW剂量组的C_{max}是8.3(±3.7)mg/L(图3B)。

[0205] IdeS的药效学和药代动力学

[0206] 通过SDS-PAGE分析以及对象的血清样品的ELISA分析来评价IdeS的IgG酶解的药效学和药代动力学。IdeS通过两个步骤酶解IgG(Ryan et al.,2008;Vindebro et al.,2013)。第一个反应是非常快速和有效地酶解两个重链中的一个,生成单个酶解的IgG(scIgG),两个重链中仍有一个是完整的。scIgG不那么敏感,但仍是一个有功能的IdeS底物,这个第二次酶切产生$F(ab')_2$片段和Fc片段。

[0207] SDS-PAGE分析显示,在所有给予0.12或0.24mg/kg BW的8个对象中,IdeS在6小时内具有充分作用或接近充分的作用,即IgG转化为$F(ab')_2$片段和Fc片段(图4A和4B)。这种作用非常迅速,在给药期间(开始给药后14min,即给药完成前1min)IgG已经转化为scIgG,在所有对象中最大作用都在给药后2-6小时内达到。新合成的完整IgG可在给药后两周在血清中检测到,并且给药后三周,完整IgG的水平进一步增加并构成血清的主要IgG组分(图4C)。

[0208] 使用单Fab-和单Fc特异性ELISA方法来分析血清中的含Fab和含Fc片段的动力学。ELISA不能完全区分不同的IgG种类,即$F(ab')_2$,Fc,scIgG和完整IgG。Fab-ELISA测定所有的含Fab IgG片段,即完整IgG,scIgG和$F(ab')_2$,而Fc-ELISA测定所有的含Fc片段,即完整IgG,scIgG和游离Fc。

[0209] $F(ab')_2$片段和Fc片段在给药后一至七天达到最低水平,之后由于完整IgG的合成,其水平在所有对象中都升高(数据未显示)。Fc片段的消除比$F(ab')_2$片段的消除快一点,在给药后一天已达到平台期。SDS-PAGE检测到人IgG快速酶切为$F(ab')_2$和Fc,这也被ELISA证实(图5),图5显示给药后2-6小时达到低于5%剩余信号的低平台水平。得出的结论是该信号主要来自scIgG。人对象中的IgG降解与之前酶切在20个人健康对象的血清样品的IgG所需的IdeS滴定浓度有很好的关联性(图6)。

[0210] IdeS抗体和抗原特异性IgG抗体

[0211] 大多瑞典人具有抗DTaP-IPV//PRP～T(Pentavac®)疫苗(白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎和B型流感嗜血杆菌)的抗原成分的IgG抗体。疫苗是瑞典儿童免疫计划的一部分,大多数个体已接收了该疫苗或类似疫苗的多次注射。该疫苗被用在一项探索性研亢,在该研亢中测定了抗这些抗原的预先存在的IgG。这些结果显示,IdeS对抗原特异性IgG的作用显示出与对每个个体中总IgG相同的模式。此外,这些抗原特异性IgG抗体的再现与总IgG的再现类似(图7)。

[0212] IdeS处理和细胞吞噬活性

[0213] 为评价给予IdeS后剩余IgG的功能活性,在吞噬试验中测试对象的血清。来自在给药前和给予IdeS后不同时间点收集的血清样品的IgG被捕获于荧光小珠上,洗涤并于效应细胞混合,吞噬作用被测定为含有至少一个被吞噬的小珠的效应细胞的百分数。作为实验

的背景，无血清小珠被用于监测效应细胞对空白小珠的自发摄取。细胞吞噬试验显示所有给予0.24mg/kg BW IdeS的对象在给药后24小时达到了背景吞噬水平(图8A)。该图进一步显示，用0.24mg/kg BW IdeS处理的对象的血清中剩余的IgG或IgG片段在两小时取样点时就已经具有显著降低的吞噬能力，并且该吞噬能力的降低维持七天(图8B)。

[0214] IdeS和免疫原性

[0215] 先前的工作已显示大部分人群具有抗IdeS的预先形成的IgG抗体(Åkesson et al.,2004)。可以假设具有预先形成的IdeS抗体的个体对IdeS具有增加的高敏反应/输液样反应的风险。因此，开发出特异性的体外实验，以用于定量测定IdeS特异性抗体。该实验是一种CAP荧光酶免疫分析试验(CAP-FEIA/ImmunoCap)，它可用来在招募前筛选研亢对象。具有升高的IgG抗体滴定度(＞15mg/L)的对象被排除在本研亢之外。在研亢开始之前，使用该实验筛选一个130个人体对象的参照组。结果显示在图9A中(第一栏)。130个人中有10个具有低于截止值(＜2mg/L)的IdeS特异性IgG。抗IdeS IgG的中间水平是6.1mg/L(范围值＜2-78mg/L;n＝130)，80％在15mg/L。在本研亢中筛选出的78个健康男性对象在处理之前都具有可检测到的抗IdeS IgG。结果显示于图9A第二栏。抗IdeS IgG的中间水平是10.6mg/L(范围2.1-90.8mg/L)。28％的被测试个体具有高于15mg/L的抗IdeS IgG滴定度，因而被排除在本研亢之外。

[0216] 大部分研亢对象对抗IdeS IgG的增加有反应。该响应在给药后一周无法检测到，但在给药后两周接近达到峰值水平，随后缓慢降低(图9B)。抗IdeS IgG的给药前中间水平(所有对象)是5.3mg/L(范围:2.0-10.6mg/L)，在第14天，所有给予IdeS的对象的中间水平是104mg/L(范围:3.1-1744mg/L)。给药后两个月，抗IdeS IgG的水平在大多数个体中开始降低，给予IdeS的所有对象的平均抗IdeS IgG水平是87.8mg/L(范围:10.5-764mg/L)。虽然个体的抗IdeS IgG反应的变化幅度很大，但与接收0.01或0.04mg/kg IdeS的对象相比，接收0.12或0.24mg/kg BW IdeS的对象明显具有更强的反应(图9C)。在第182天，20个给予IdeS的个体中有19个的抗IdeSIgG水平处于先前分析的对象的正常范围(范围＜2-90.8mg/L;N＝208)(图9D)。仅有一个对象在第182天仍具有稍微高于正常范围的抗IdeS IgG水平(101mg/L)。该对象在0.01mg/kg剂量组，并且在第365天，该对象的抗IdeS IgG水平处于正常范围内(40.5mg/L)。可以得到的结论是，抗IdeS IgG反应的动力学和幅度与对其他细菌来源的蛋白药物(链激酶和葡激酶)所报道的反非常相似。

[0217] 过论

[0218] 该一类临床研亢显示IdeS在给药后仅数分钟内即将血浆IgG转化为单次酶切的IgG(scIgG)。scIgG已被证实具有受损的效应功能，对Fcγ-受体的结合降低，并且具有降低的Fc介导的细胞毒性(Brezski et al.,2009)。虽然本研亢中的健康对象中缺乏致病性自身抗体，但是正常IgG可被作为生物标记物来监控，IdeS在所测试的剂量范围内在IgG酶解方面显示出令人印象深刻的效力。在所有给予0.12和0.24mg/kg BW IdeS的对象中观察到了充分的或接近充分的对总IgG的作用，即转化成$F(ab')_2$和Fc片段，并且研亢药物显示出有利的安全性。仅在给药后六小时，血液中仅检测到低浓度的IgG(＜5％)，并且IgG在多于一周时间持续保持低水平，直至新合成的IgG重新出现在血浆中。这些结果可与通常使用例如血浆交换法获得的结果比较，在血浆交换法中，单次血浆容量交换导致IgG降低至原始水平的约35％，并且血浆交换24小时后，IgG水平升高至60％，这主要是由于淋巴引流至血管

空间所致(Ismail et al.,2001)。

[0219] 由于IdeS是细菌蛋白质,并且大多数人都曾接触过链球菌,因此所有对象都具有预先形成的抗IdeS IgG抗体,并且如预期一样出现响应,IgG响应在IdeS输液后2-3周达到峰值。虽然观察到剂量依赖性模式,但抗药物响应的幅度在个体之间差异明显。给药后的6至12个月,所有对象的抗IdeS抗体水平都恢复至正常范围(即＜2-91mg/L),考虑到可能的中和抗体以及安全性方面的因素,预期IdeS处理可在6-12个月后重复。当考虑重复给药时,与此临床实验平行进行的IdeS特异性CAP FEIA实验可能是指导临床医生的有价值的工具。

[0220] 除了总血浆IgG之外,该试验还研亢了IdeS对被用作疫苗的特异性生物标记物的作用,这些疫苗包括瑞典儿童免疫计划内的抗白喉、破伤风、百日咳、脊髓灰质炎、乙型流感嗜血杆菌的疫苗。结果显示,IdeS对总IgG的效力在抗原特异性方面没有大的差别,所有对象在整个IgG库恢复时都完全恢复了它们的抗原特异性IgG。

[0221] 该试验还在吞噬试验中评价了使用IdeS酶切IgG的功能相关性,其中与Fcγ-受体的相互作用被认为起主要作用。该试验显示,IdeS给药后数小时,剩余IgG/IgG片段的吞噬效果在所有测试对象中都显著降低,该效果持续至7天后。该结果显示IdeS具有在人体内使Fc介导的效应器失活的能力。

[0222] 综上所述,本文提供的数据证实,单次给予IdeS能够安全、快速和有效地使人体IgG失活,并且该效果维持数周。IdeS单独和/或与其他B细胞减弱药物(如Rituximab或Bortezumib)一起对于许多IgG自身免疫抗体是致病原因的疾病是非常有吸引力的治疗途径。虽然每年一至两次的重复治疗是很可能可以的,但IdeS的免疫原性最可能使其不必长期治疗。但是,通过将高效的IdeS与其他药物或技术(如免疫吸附或血浆交换)组合使用来实施明智的治疗途径,应当可以将致病性抗体的低血浆水平维持延长的时间段。通过IdeS去除IgG是暂时的,表明其最佳用途是用于单致病因素疾病,例如抗体介导的移植排异。目前正使用IdeS对此进行临床II期研亢。

[0223] 参考文献

[0224] Ackerman,M.E.,B.Moldt,R.T.Wyatt,A.S.Dugast,E.McAndrew,S.Tsoukas,S.Jost,C.T.Berger,G.Sciaranghella,Q.Liu,D.J.Irvine,D.R.Burton,and G.Alter.2011.A robust,high-throughput assay to determine the phagocytic activity ofclinical antibody samples.J Immunol Methods 366:8-19.

[0225] Agniswamy,J.,B.Lei,J.M.Musser,and P.D.Sun.2004.Insight of host immune evasion mediated by two variants of group a Streptococcus Mac protein.J Biol Chem 279:52789-52796.

[0226] Brezski,R.J.,O.Vafa,D.Petrone,S.H.Tam,G.Powers,M.H.Ryan,J.L.Luongo,A.Oberholtzer,D.M.Knight,and R.E.Jordan.2009.Tumor-associated and microbial proteases compromise host IgG effector functions by a single cleavage proximal to the hinge.Proc Natl Acad Sci USA106:17864-17869.

[0227] Carapetis,J.R.,A.C.Steer,E.K.Mulholland,and M.Weber.2005.The global burden of group A streptococcal diseases.Lancet Infect Dis5:685-694.

[0228] Collen,D.,F.De Cock,E.Demarsin,S.Jenne,I.Lasters,Y.Laroche,P.Warmerdam,and L.Jespers.1997.Recombinant staphylokinase variants with

altered immunoreactivity.III:Species variability of antibody binding patterns.Circulation 95:455-462.

[0229] Declerck,P.J.,S.Vanderschueren,J.Billiet,H.Moreau,and D.Collen.1994.Prevalence and induction of circulating antibodies against recombinant staphylokinase.Thromb Haemost71:129-133.

[0230] Ismail,N.,R.Neyra,and R.Hakim.2001.Plasmapheresis.In Handbook of dialysis,3rd edn.J.T.Daugirdas,P.G.Blake,and T.S.Ing,editors.Lippincott Williams Wilkins,Philadelphia.231-262.

[0231] Iyer,S.P.,L..E.Nikkel,K.K.Nishiyama,E.Dworakowski,S.Cremers,C.Zhang,D.J.McMahon,S.Boutroy,X.S.Liu,L.E.Ratner,D.J.Cohen,X.E.Guo,E.Shane,and T.L.Nickolas.2014.Kidney Transplantation with Early Corticosteroid Withdrawal:Paradoxical Effects at the Central and Peripheral Skeleton.J Am Soc Nephrol

[0232] Johansson,B.P.,O.Shannon,and L.Björck.2008.IdeS:a bacterial proteolytic enzyme with therapeutic potential.PLoS One 3:e1692.

[0233] Jordan,S.C.,D.Tyan,D.Stablein,M.McIntosh,S.Rose,A.Vo,M.Toyoda,C.Davis,R.Shapiro,D.Adey,D.Milliner,R.Graff,R.Steiner,G.Ciancio,S.Sahney,and J.Light.2004.Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal diseasc:report of the NIH IG02trial.J Am Soc Nephrol15:3256-3262.

[0234] Karlsson,C.,L.Malmstrom,R.Aebersold,and J.Malmstrom.2012.Proteome-wide selected reaction monitoring assays for the human pathogen Streptococcus pyogenes.Nat Commun3:1301.

[0235] MacLean,B.,D.M.Tomazela,N.Shulman,M.Chambers,G.L.Finney,B.Frewen,R.Kern,D.L.Tabb,D.C.Liebler,and M.J.MacCoss.2010.Skyline:an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments.Bioinformatics26:966-968.

[0236] Mainet,D.,M.del Rosario,A.Toruncha,P.Prats,C.Valenzuela,and P.Lopez Saura.1998.Similar,more than 6-months persisted,antibody and neutralizing activity responses in patients with acute myocardial infarction treated with recombinant or natural streptokinase.Fibrinolysis Proteol12:301-309.

[0237] Montgomery,R.A.,A.A.Zachary,L.C.Racusen,M.S.Leffell,K.E.King,J.Burdick,W.R.Maley,and L.E.Ratner.2000.Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients.Transplantation 70:887-895.

[0238] Nandakumar,K.S.,B.P.Johansson,L.Björck,and R.Holmdahl.2007.Blocking of experimental arthritis by cleavage of IgG antibodies in vivo.Arthritis Rheum

56:3253-3260.

[0239] Ojo,A.O.,R.A.Wolfe,P.J.Held,F.K.Port,and R.L.Schmouder.1997.Delayed graft function:risk factors and implications for renal allograft survival.Transplantation 63:968-974.

[0240] Ryan,M.H.,D.Petrone,J.F.Nemeth,E.Bamathan,L.Björck,and R.E.Jordan.2008.Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes in vitro and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid.Mol Immunol45:1837-1846.

[0241] Teleman,J.,S.Waldemarson,J.Malmstrom,and F.Levander.2013.Automated quality control system for LC-SRM setups.JProteomics95:77-83.

[0242] Tradtrantip,L.,N.Asavapanumas,and A.S.Verkman.2013.Therapeutic cleavage of anti-aquaporin-4autoantibody in neuromyelitis optica by an IgG-selective proteinase.Mol Pharmacol83:1268-1275.

[0243] Wenig,K.,L.Chatwell,U.von Pawel-Rammingen,L.Björck,R.Huber.and P.Sondermann.2004.Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS,a cysteine proteinase with strict specificity for IgG.ProcNatl Acad Sci USA101:17371-17376.

[0244] Vincents,B.,U.von Pawel-Rammingen,L.Björck,and M.Abrahamson.2004.Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase,IdeS,reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding.Biochemistry43:15540-15549.

[0245] Vindebro,R.,C.Spoerry,and U.von Pawel-Rammingen.2013.Rapid IgG heavy chain cleavage by the streptococcal IgG endopeptidase IdeS is mediated by IdeS monomers and is not due to enzyme dimerization.FEBS Lett 587:1818-1822.

[0246] Vo,A.A.,M.Lukovsky,M.Toyoda,J.Wang,N.L.Reinsmoen,C.H.Lai,A.Peng,R.Villicana,and S.C.Jordan.2008a.Rituximab and intravenous immune globulin for desensitization during renal transplantation.NEngl JMed 359:242-251.

[0247] Vo,A.A.,E.A.Wechsler,J.Wang,A.Peng,M.Toyoda,M.Lukovsky,N.Reinsmoen,and S.C.Jordan.2008b.Analysis of subcutaneous(SQ)Alemtuzumab induction therapy in highly sensitized patients desensitized with IVIG and rituximab.Am J Transplant 8:144-149.

[0248] von Pawel-Rammingen,U.,B.P.Johansson,and L.Björck.2002a.IdeS,a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G.EMBO J 21:1607-1615.

[0249] von Pawel-Rammingen,U.,B.P.Johansson,H.Tapper,and L.Björck.2002b.Streptococcus pyogenes and phagocytic killing.Nat Med 8:1044-1045;author reply 1045-1046.

[0250] Yang,R.,M.A.Otten,T.Hellmark,M.Collin,L.Björck,M.H.Zhao,M.R.Daha,and M.Segelmark.2010.Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS,IgG-degrading streptococcal enzymes.Nephrol Dial Transplant 25:2479-2486.

[0251] Åkesson,P.,M.Rasmussen,E.Mascini,U.von Pawel-Rammingen,R.Janulczyk,M.Collin,A.Olsen,E.Mattsson,M.L.Olsson,L.Björck,and B.Christensson.2004.Low antibody levels against cell wall-attached proteins of Streptococcus pyogenes predispose for severe invasive disease.J Infect Dis 189:797-804.

[0252] 实施例2

[0253] 介绍

[0254] 在存在供体特异性抗体(DSA)的情况下进行移植风险很大,会导致超急性抗体介导的排斥,导致急性移植失败。实施例1中的研亢证实IdeS是安全的,并且耐受量达0.24mg/kg BW。在该剂量,IdeS在输液开始后14分钟内完全酶切了血浆IgG库。完整IgG的水平降低至低于原始水平的5%。这些数据清晰地显示,单次给予IdeS相比于血浆置换和免疫吸附在血浆IgG降低的效率和速率方面都要优越。

[0255] 因此,紧接在移植之前对敏化的肾病患者进行IdeS处理应会快速和有效地将IgG酶切为F(ab')$_2$片段和Fc片段,从而将具有细胞毒性的DSA的血清水平降低至活体或已故供体(LD和DD)移植是可能的水平。移植时间点的血液循环中仍存在的供体特异性F(ab')$_2$片段也可组织例如低亲和性IgM或残留IgG与移植物的结合,从而进一步保护器官不被排斥。该研亢的目的是为了研亢临床上相关剂量的IdeS的治疗是否能够利用敏化的患者的血清而将阳性交叉匹配实验结果转为阴性,并研亢总IgG和对HLA I和II类特异的IgG的水平降低之间的关联。

[0256] 材料和方法

[0257] 血清样品

[0258] 被研亢的患者被诊断有5期CKD,并在等待肾移植。这些患者都是敏化的,并且对抗HLA呈阳性。患者由瑞典马尔默的SkåneUniversity Hospital的肾病科及移植部门移植单位的H.Ekberg教授和瑞典乌普萨拉的Uppsala University Hospital移植手术科G.Tufveson教授招募。患者接收了书面的患者信息书并在进行任何研亢相关手续之前签署了告知同意书。根据医院程序从10ml静脉血中分离出血清。为保证私密性,主要研亢人员通过分配给血清样品识别号(PXX)使进行研亢的科学家不能得知患者身份。样品被送至乌普萨拉的University Hospital的临床免疫部门存储,每份血清的一部分随后被送至位于朗德的Hansa Medical AB进行IdeS相关分析。

[0259] IdeS在患者血清中的酶切

[0260] 使用IdeS(批号BX1001865;9.9g/l)处理五个患者(P02、P04、P07、P08和P09)的血清(100μl)。在PBS/0.1%BSA中制备6g/l的IdeS储备液。100μL加至12μl 0.1M HCl以调节血清pH至生理水平(pH 7.4),随后加入2.4μl IdeS储备液(6g/l),至终浓度为125μg/ml IdeS,体积为115μl。所有制备在冰上进行。酶切在37℃(Thermomixer;Eppendorf)进行2小时,通过将样品置于冰箱中(-20℃)而停止反应,直至进一步分析时取出。每个患者的对照血清以稀释缓冲液(PBS/0.1%BSA)取代IdeS同法处理。

[0261] 人IgG的定量

[0262] 血清样品送至位于瑞典朗德的SkåneUniversity Hospital的临床化学部进行总IgG浓度测定。使用Hansa MedicalAB开发的ELISA试验分析用IdeS处理的人血清样品中的完整IgG。在碳酸盐缓冲液(pH 9.6)中于+4-8℃使用100ng/孔的AffiniPure F(ab′)$_2$片段羊抗人F(ab′)$_2$片段(Jackson#109-006-097)包覆MaxiSorp 96孔ELISA平板,反应过夜。平板以PBS+Tween20(0.05%)洗涤,并用PBS+2%BSA在室温下封闭一小时。校准物和样品稀释于PBS+0.1%BSA(稀释缓冲液)。洗涤后,稀释的校准物(M-1,来自健康志愿者的血清;浓度11.2g/l)和血清样品被加至平板上,并在室温孵育一小时。平板再次洗涤,并加入在稀释缓冲液中以1:20 000稀释的50μl生物素-SP-AffiniPure F(ab′)$_2$片段羊抗人IgG,Fcγ片段特异性(Jackson#109-066-098),并孵育30分钟。再次洗涤后,加入50μl的在稀释缓冲液中以1:40000稀释的SA-HRP(Pierce#21126),30分钟孵育后,洗涤平板,使用TMB(BioFX Laboratories#TMBW-1000-01)显影,用0.5M H_2SO_4终止反应,在λ=450nm读数。校准物在所分析的范围内形成一个四参数逻辑拟合曲线(y=b+(a-b)/(1+xc)^d),优选使用OD值与标准曲线的IC50值尽可能近的样品稀释液来进行定量。

[0263] IdeS效力及免疫原性评价

[0264] 用于IdeS效力的ELISA试验如实施例1中那样进行,用于IdeS特异性抗体反应的CAP FEIA(ImmunoCap)试验也如实施例1中那样进行。结果仅用于与实施例1中的结果作比较,因而并未示出。

[0265] 补体依赖的细胞毒作用(CDC)和单抗原小珠(SAB)分析(Luminex)

[0266] 使用SAB分析来分析IdeS和安慰剂处理的血清中抗一系列MHC I和II类抗原(LABScreen Single Antigen,One Lambda)的抗HLA IgG抗体。在来自23个供体的T和B细胞上进行补体依赖的细胞毒作用(CDC)筛选测试,来测试和评估血清的反应性。分别使用CD8和MHC II类磁珠(Dynal)来富集T细胞和B细胞。利用经验证的方法,由瑞典乌普萨拉University Hospital的Rudbeck实验室放射学与临床免疫学肿瘤科临床免疫学部门的Mats Bengtsson博士在临床机构中进行SAB和CDC分析。根据International Workshop procedure(Fuller et al.,1982)对CDC反应进行评分。

[0267] 补体依赖性淋巴毒交叉匹配(CDC-CXM)实验

[0268] 从Balb/c小鼠中通过Ficol分离制备脾细胞。细胞在PBS(x2)中洗涤并在添加了0.1%热失活BSA的DMEM:F12(Difco)中重悬至2x10^{6}个细胞/ml。用DTT处理血清样品使IgM失活:将45μl血清与5μl 50mM DTT混合,并在37℃孵育30-45分钟。将1μl细胞悬液(即2000个细胞)与1μl样品(即血清或对照品)一起加至60孔Terasaki平板(Nunc)进行CXM测试。在室温下孵育30分钟后,加入幼兔补体(5μl)(Cedarlane),混合物在室温下进一步孵育60分钟。向每个孔中加入FluoroQuench AO/EB Stain Quench(5μl)(One Lambda inc.),混合物在室温下孵育15分钟。通过荧光光谱仪对细胞毒性进行计分(分值1-8)和记录。

[0269] 数据处理

[0270] 使用Mac OS X版GraphPad Prism version 5.0d来构建图表,该软件来自GraphPad Software,San Diego California USA,www,graphpad.com。

[0271] 结果和讨论

[0272] 患者血清的IdeS处理

[0273] 血清收集自12位等待肾移植的5期CKD的敏化患者。在每份血清中剂量滴定IdeS以测定IdeS处理的效力，虽然达到最大效果所需的IdeS的最小浓度存在个体差异(图10)，但可以总结说，在所测试的浓度范围内，IdeS能有效地酶切所有患者血清中的IgG。分析了患者血清中的总IgG水平，发现都在正常范围内(中间值:9.3g/L;范围6.5-16.2g/L)。而且，使用IdeS-ImmunoCAP分析来测定抗IdeS水平，所有12份血清都含有低水平(中间值:4.5mg/L;范围＜2-14.8mg/L)的抗IdeS IgG(HMed Doc.No:2012-041)。个体抗IdeS水平之间或者总IgG水平及IdeS效力之间没有明显相关性。五份代表性血清，即P02、P04、P07、P08和P09被选择用于进一步的抗HLA抗体的分析。

[0274] 血清用IdeS或安慰剂(PBS)在37℃处理两小时，并使用所述ELISA进行剩余IgG分析。作为比较，我们使用Protein-A琼脂糖进行彻底的免疫吸附，并与IdeS处理的样品平行地分析剩余IgG。结果证实，IdeS处理使IgG水平从7.5-15.9g/L降低至0.17-0.4g/L(表2.1)。免疫吸附总体来说没那么有效，剩余IgG为0.18-1.5g/L。

[0275] 表2.1IdeS、PBS处理的或免疫吸附(IA)处理的五位患者(P02、P04、P07、P08和P09)的血清。IgG单位g/L。

[0276]

	P02	*P04*	*P07*	*P08*	*P09*
PBS	11,0	7,5	11,6	15,9	12,0
IdeS	0,22	0,21	0,17	0,40	0,34
IA	0,50	0,31	0,18	1,5	0,80

[0277] 这些结果应当与通常利用例如血浆置换法获得的结果比较，在血浆置换法中，单次的血浆容量替换导致IgG降低至原始水平的约35％，血浆替换24h后，IgG水平升高至60％，这主要是由于淋巴引流至血管内导致的(Ismail et al.,2001)。即使重复高达五个循环的血浆置换，IgG水平也只在程序结束时的10％至下一次程序之前的20-25％之间徘徊。实施例1中描述的临床前研亢证实在兔子中单次静脉注射IdeS导致完整IgG快速(1h内)降低至原始水平的2-3％，并且IgG水平在处理后的数天内维持低水平。在实施例1所述的临床I期实验中，在向健康人体给予IdeS后获得了相似的结果。在给予0.24mg/kg BW的IdeS期间(输液开始后14分钟)，血浆IgG库完全被转化为scIgG，给药后2小时，IgG已被进一步转化为$F(ab')_2$和Fc。这些数据显示，在给药后2-6小时内已可达到原始水平的＜5％，大多由scIgG组成，并且需要花费数日该水平才开始缓慢增加。

[0278] CDC-分析

[0279] 对IdeS和安慰剂处理的患者P02、P04、P07、P08和P09血清进行抗一组T细胞(即富含CD8+的细胞)和B细胞(即富含MHC II类+的细胞)的血清筛选CDC实验，所述T细胞和B细胞来源于经选择并充分表征的供体。结果见表2.2和2.3(同时见下文单个患者结果的汇总)，其明确地证实了IdeS处理能够完全去除由含供体特异性IgG的血清介导的补体依赖性细胞毒性。在T细胞实验中，其主要针对抗MHC I类抗体，IdeS处理可完全使患者P02、P04、P07和P09脱敏，并且明显改善患者P08的敏化等级(表2.2)。在B细胞试验中，其针对抗MHC I类和II类抗体，IdeS处理改善了所有患者的敏化等级(表2.3)。可以总结说，IdeS处理明显降低了针对潜在供体的CDC反应性，从而增加了所有实验患者找到合适供体的机会。从本文给出的数据还可明显看出，IdeS处理能够将阳性的预移植交叉匹配结果转阴，从而使得敏化患者移植变得可行。

[0280] 抗HLA分析

[0281] 为了证实IdeS处理后总IgG的降低反映在来自敏化患者的血清中抗HLA抗体的水平降低方面,对IdeS或安慰剂处理的样品进行SAB分析。阵列包括188个MHC等位变体,包括97个MHC I类抗原(HLA-A,-B和-C)和91个MHC II类抗原(HLA-DP,-DQ和-DR)。结果证实了IdeS处理可降低来自敏化患者的血清中的抗HLA IgG的水平,并且可以总结说,IdeS处理后,所有被测试的患者的血清对单个I类和II类MHC分子的反应性都显著降低(图11-15、附件I和II)。当考虑敏化患者的移植时,MFI(原始值)>1000(有时>2000)的阈值通常被作为对特异性HLA抗原有严重反应性的截止值。IdeS处理明显能够在所有测试患者中,在MHC I类和II类水平,将HLA抗原的数量降低至大于这些阈值(表2.4和2.5;附件I-II)。

[0282] IdeS处理能够将阳性CXM转阴

[0283] 天然的抗[Galα-1,3-Gal]结构的抗体(抗Gal抗体)是非人体阻止的人超急性排斥(HAR)的主要效应分子。不像大多数哺乳动物,人缺少功能性α-1,3-半乳糖基转移酶(GalT)基因,产生大量的抗Gal抗体,推测其可相应GalT+肠细菌(Ding et al.,2008和Pierson 2009)。该实验目的在于研亢灵长类和非灵长类抗Gal活性是否可被用来作为伪标记物(pseudo marker)以使用来自实施例1的I期临床研亢的临床血清样品来分析IdeS的效果。

[0284] 使用经验证的PD-ELISA方法测定在向健康人体对象给予0.24mg/kg IdeS之前和之后收集的连续血清样品中的IgG水平。数据证实,在给药后两小时IgG的水平降低了约10倍,在IdeS给药后24小时IgG降低了约20倍。PD-ELISA无法区分完整的全功能IgG和具有减弱的Fc效应功能的scIgG。SDS-PAGE分析显示,scIgG构成了这些血清中剩余IgG的主要部分,表明全功能IgG的水平在IdeS处理后的数分钟内已然很低(见实施例1)。

[0285] 表2.2.IdeS或安慰剂(PBS)处理的敏化患者(P02、P04、P07、P08和P09)的血清抗来自一组供体(N=23)的T细胞的血清筛选实验。通过分配数字1-8来给反应性计分,其中1对应于0%细胞毒性,8对应于>80%细胞毒性。

[0286]

	P02		P04		P07		P08		P09	
	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
PC:8	1	1	1	1	8	1	8	1	4	1
PC:10	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1
PC:19	6	1	8	1	1	1	8	8	8	1
PC:20	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1
PC:9B	8	1	1	1	8	1	8	8	1	1
PC:11	1	1	1	1	8	1	8	8	1	1
PC:24B	6	1	1	1	8	1	8	1	8	1
PC:25	1	1	1	1	4	6	8	1	8	1
PC:27	1	1	1	1	1	1	8	8	1	1
PC:29	1	1	1	1	1	1	8	2	1	1
PC:15	1	1	6	1	8	1	8	1	8	1
PC:4	1	1	1	1	8	1	8	1	8	1
PC:14	2	1	6	1	8	1	8	1	1	1
PC:30	1	1	8	1	8	1	8	6	1	1
PC:28	1	1	1	1	1	1	8	1	8	1
PC:26	1	1	1	1	8	1	8	8	1	1
PC:21	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1
PC:22	1	1	1	1	8	1	8	1	1	1
PC:12	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1
PC:17	1	1	8	1	8	1	8	8	1	1
PC:18	1	1	1	1	8	1	8	6	8	1
PC:13	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1
PC:16	1	1	1	1	1	1	8	1	1	1
平均值	*1*	*1*	*1*	*1*	*8*	*1*	*8*	*1*	*1*	*1*
T-PRA (%)	*17*	*0*	*22*	*0*	*70*	*4*	*100*	*39*	*35*	*0*

[0287] 表2.3.IdeS或安慰剂(PBS)处理的敏化患者(P02、P04、P07、P08和P09)的血清抗来自一组供体(N＝23)的B细胞的血清筛选实验。通过分配数字1-8来给反应性计分，其中1对应于0％细胞毒性8对应于＞80％细胞毒性。

[0288]

	P02		P04		P07		P08		P09	
	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
PC:8	8	1	1	1	8	1	8	1	8	1
PC:10	8	1	1	1	8	1	8	6	8	4
PC:19	1	1	8	1	8	1	8	8	8	1
PC:20	1	1	1	1	8	8	8	8	8	1
PC:9B	8	6	2	4	8	6	8	8	8	4
PC:11	8	1	8	4	8	6	8	8	8	1
PC:24B	8	1	1	1	8	1	8	8	8	1
PC:25	1	1	1	1	6	4	8	1	8	1
PC:27	6	1	1	1	1	1	8	8	8	1
PC:29	1	1	2	2	1	1	8	6	8	1
PC:15	6	1	4	1	8	2	8	6	8	4
PC:4	2	1	1	1	8	6	8	6	8	1
PC:14	8	1	8	4	8	6	8	8	8	2
PC:30	8	1	4	2	8	2	8	8	8	1
PC:28	8	1	4	2	4	6	8	1	8	1
PC:26	6	4	8	1	8	6	8	8	8	4
PC:21	1	1	1	1	8	8	8	4	1	1
PC:22	8	1	8	4	8	4	8	4	8	4
PC:12	1	2	1	1	4	1	8	1	8	1
PC:17	8	1	8	1	8	1	8	8	8	1
PC:18	8	1	8	1	8	2	8	8	8	1
PC:13	8	1	8	1	1	2	8	1	6	1
PC:16	1	1	1	1	1	1	8	8	8	1
平均值	8	1	2	1	8	2	8	8	8	1
B-PRA (%)	70	13	57	30	83	61	100	78	96	26

[0289] 表2.4.31种HLA-A、50种HLA-B和16种HLA-C抗原的SAB分析。表格给出了每个患者给予IdeS前后MFI(初始值)高于1000或高于2000的抗原数量。患者为P02、P04、P07、P08和P09。

[0290]

		HLA-A		HLA-B		HLA-C	
		+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
P02	>1000	12	0	38	9	4	0
	>2000	12	0	33	0	4	0
P04	>1000	9	0	44	18	12	2
	>2000	5	0	42	3	8	0
P07	>1000	0	0	34	0	0	0
	>2000	0	0	34	0	0	0
P08	>1000	29	3	48	0	16	4
	>2000	24	1	44	0	16	0
P09	>1000	20	0	7	0	1	0
	>2000	17	0	0	0	1	0

[0291] 表2.5.26种HLA-DP、29种HLA-DQ和36种HLA-DR抗原的SAB分析。表格给出了每个患者给予IdeS前后MFI(初始值)高于1000或高于2000的抗原数量。患者为P02、P04、P07、P08

和P09。

[0292]

		HLA-DP		HLA-DQ		HLA-DR	
		+PBS	*+IdeS*	*+PBS*	*+IdeS*	*+PBS*	*+IdeS*
P02	>1000	8	0	19	0	23	2
	>2000	7	0	14	0	23	0
P04	>1000	0	0	7	0	16	2
	>2000	0	0	7	0	11	0
P07	>1000	0	0	0	0	13	0
	>2000	0	0	0	0	12	0
P08	>1000	7	0	27	23	33	23
	>2000	1	0	27	16	33	2
P09	>1000	0	0	22	7	23	0
	>2000	0	0	16	3	20	0

[0293] 表2.6.使用测定完整IgG(及scIgG)的经验证的PD-ELISA方法测定给予安慰剂(503)或IdeS(504-506)的健康对象的血清样品中的IgG水平。

[0294]

	[IgG] (g/l)		
	给药前	*2h*	*24h*
503	10.6	14.1	12.6
504	12.8	1.6	0.53
505	8.9	0.91	0.62
506	9.5	0.81	0.65

[0295] 为了研亢人血清样品是否含有结合至鼠抗原的IgG(即抗gal),小鼠脾细胞被染色以进行FACS分析,利用在向健康人体给予0.24mg/kg IdeS之前及给药后不同时间点收集到的未稀释的连续血清样品进行实验。使用hFcγ-特异性试剂检测IgG是否结合至细胞。数据证实,IdeS处理后24小时有明显的位移,并且持续至处理后96小时(图16的代表性图片),这与所证实的总IgG降低的结果一致。酶切产物,即$F(ab')_2$片段和Fcγ片段,会从血液循环中快速消除,并且在IdeS处理后1-2天达到低平台水平(见实施例1)。因此,预期剩余完整IgG和$F(ab')_2$片段之间可能的对靶抗原的竞争性结合在该试验中不明显。因此,I期临床实验中收集的给药前样品含有结合鼠细胞的IgG并且IdeS处理降低了这种反应性。

[0296] 已证实,人血清具有抗Gal抗原的反应性,Gal抗原来自补体结合IgG和IgM(Pierson,2009)。这通过证实人血清在补体依赖性交叉匹配实验(CDC-CXM)(Terasaki实验)中与来自小鼠(Balb/c)的脾细胞强烈反应而得到确认(数据未示出)。因为IdeS对IgG特异性非常高,所有样品都以DTT处理以使存在于测试血清中的IgM失活。使用来自给予0.24mg/kg BW的三个健康对象(504、505和506)给药前及给药后2小时和24小时的连续血清样品在CDC-CXM中进行抗Balb/c小鼠脾细胞的实验。所有给药前样品都强烈反应(8分),而在IdeS处理后2小时和24小时收集的样品完全呈阴性(1分)(表2.7,图17)。

[0297] 表2.7.使用给予0.24mg/kg IdeS的健康对象(504-506)的血清以及Balb/c小鼠脾细胞进行异种交叉匹配实验。反应性通过分配数字1-8来计分,其中1代表无细胞毒性,8代表最大细胞毒性。

[0298]

	给药前	2h	24h
504	8	1	1
505	8	1	1
506	8	1	1

[0299] 总而言之，得出的结论是IdeS处理可以降低能够结合小鼠细胞表面靶标的特异性IgG的血清水平，并且这种效果在IdeS处理后几天内持续。IgG不会再IdeS处理后的头几日恢复的事实明确地表明IdeS不仅酶切血浆IgG而且酶切位于血管系统之外的IgG，即在间质液中的IgG。而且，用0.24mg/kg IdeS处理的对象的IdeS处理后2小时和24小时收集的血清不能介导抗小鼠靶细胞的补体依赖性细胞毒性(CDC)，明确地证实了IdeS可以将阳性CMX结果转为阴性结果。

[0300] 单个患者结果汇总

[0301] 患者P02

[0302] 患者P02的血清证实了抗4个供体T细胞的CDC反应性，并且IdeS处理可完全中和这种反应性(分值:1)(表2.2)。此外，预处理的血清与23个B-细胞供体中的16个反应，处理后仅对两个供体维持(降低的)反应性(表2.3)，而剩余供体都是阴性(分值:1)。SAB分析证实，IdeS处理前，该患者血清对HLA-A，-B和-C抗原以及HLA-DP，-DQ和-DR抗原都有反应性(即MFI＞1000)(表2.4和2.5，图11)。IdeS处理降低了对所有抗原的反应性，很少几个(即两个HLA-DR抗原)具有高于MFI:1000的反应性(无高于MFI:2000)(表2.4和2.5;图11)。总体的结论是IdeS可接近于完全使患者P02的血清脱敏。

[0303] 患者P04

[0304] 患者P04的血清在T细胞CDC实验中与5个供体反应，IdeS处理可完全中和这种反应性(即分数:1)(表2.2)。MHC I类SAB分析证实了主要与HLA-B抗原强烈反应，但也与某些HLA-A和HLA-C抗原反应(表2.4;图12)。IdeS处理后，对某些HLA-B抗原的反应性降低但仍明显。值得注意的是，供体PC:17具有基因型HLA-B*35:01，P04血清在CDC试验中与该供体强烈反应(MFI:21463)(附件I)。但是，IdeS处理完全中和了与PC:17供体的反应性(分值由8降至1)，即使与HLA-B*35:01抗原的反应性在SAB试验中仍然是最高值之一(MFI:2517)。

[0305] 在B细胞CDC实验中，该血清与所测试23个供体中的8个强烈反应(即分值:8)，IdeS处理降低了与所有这些供体的反应性(表3)。患者P04的血清在SAB试验中对HLA-DQ和HLA-DR抗原呈阳性(表2.5;图12)。但是，IdeS处理是非常有效地，处理后仅有两个被测试的HLA-DR抗原具有明显的反应性。总体结论是IdeS处理在降低患者P04的血清的抗HLA反应性方面是高度有效的。

[0306] 患者P07

[0307] 患者P07的血清在CDC实验中具有广泛的反应性，并且在T细胞CDC试验中证实其对23个测试供体中的15个有强烈的反应性(即CDC分数:8)。IdeS处理完全中和(即分数:1)了对所有15个供体的反应性(表2.2)。MHC I类SAB分析证实其对34个所测试HLA-B抗原具有强烈反应性，但对HLA-A或-C抗原没有反应性(表2.5;图13和附件I)。IdeS处理后，没有一个MHC I类抗原具有明显信号，即测得的MFI都低于1000。

[0308] 在B细胞CDC实验中，血清与所测试23个供体中的16个强烈反应(即CDC分值:8)，仅有一个例外(供体PC:19)，它们与T细胞CDC中呈强烈阳性的是相同的供体(表2.2和2.3)。这

表明大多数反应性可归因于MHC I类反应性，因为B细胞是I类和II类都呈阳性的。有趣的是，虽然IdeS降低了对大多数的所测试供体的反应性分值，IdeS没有像在相应T细胞CDC中那样有效。有两个供体(PC:20和PC:21)，在T细胞CDC中IdeS完全中和了分数，而在B细胞CDC中没有效果。可能的解释是例如抗II类抗原具有很高的滴度或者该患者具有非常高的抗II类抗原的IgM抗体。但是，SAB分析明确地证实该患者不具有抗HLA-DP或-DQ的抗体(表2.5;图13和附件II)。该患者对13个所测试的HLA-DR抗原具有低到中等(即MFI 1200-6500)反应性，并且这种反应性被IdeS处理完全中和(MFI＜160)。因此，难以用对II类抗原具有高滴度来解释B细胞试验中的剩余反应性。IdeS处理在T细胞CDC中完全有效但在B细胞CDC中无效的两个供体(PC:20和PC:21)携带以下HLA-DR等位基因:PC:20-DRB1*11:01,DBR3*02:02以及PC:21-DRB1*01:01,DBR1*16:01:01,DRB5*0202。所有这些抗原都存在于SAB阵列上。患者P07的血清与DRB1*11:01具有中等反应性(MFI:4552)，与DBR3*02:02具有弱反应性(MFI:1203)，但IdeS处理后，对于两种抗原信号都低于100。该血清无论在IdeS处理之前或之后对DRB1*01:01DRB1*16:01:01或DRB5*0202都没有反应性。结论是抗MHC II类抗原的IgG无法解释使用这些供体进行B细胞CDC为何无效，这有可能与IgM有关。总体结论是IdeS在降低患者P07的血清的抗HLA抗体的水平方面是高度有效的。

[0309] 患者P08

[0310] 患者P08的血清在T细胞和B细胞CDC实验中对所有测试供体都有很高的反应性(表2.2和2.3)。在T细胞试验中，有14个供体IdeS可完全中和反应性，有6个供体IdeS没有可检测到的效果。在B细胞试验中，有5个供体IdeS可完全中和反应性，因为IdeS在使用相同供体的T细胞实验中也具有完全的活性，因此推测这种反应性仅归因于MHC I类反应性。有很多供体IdeS无论在T或B细胞实验中都无效果，或者IdeS仅仅在这些实验中有部分效果。但是，也有3个供体(PC:14,PC:16和PC:20)IdeS在T细胞实验中有完全的效果，而在B细胞实验中没有可检测到的效果。

[0311] SAB分析明确地证实患者P08具有抗HLA-A、-B和-C以及抗HLA-DP、-DQ和-DR的抗体。在IdeS处理前，血清在所测试的血清中具有广泛的反应性(表2.4和2.5;图14)。此外，SAB分析表明，该患者在所测试的患者中具有最高滴度的抗HLA抗体(图15和附件I和II)。虽然反应性仍然明显(即MFI＞1000)，但处理后，IdeS可以明确地降低抗较高比例的HLA-DQ和-DR抗原的MHC I类和II类抗体的水平。值得注意的是，当测量剩余总IgG时(0.4g/L)，IdeS在P08血清中最无效果，这自然反映在剩余抗HLA抗原的水平上。

[0312] 患者P09

[0313] 患者P09的血清对来自7个供体的T细胞具有强烈的CDC反应性(即CDC分值:8)，IdeS处理可完全中和这种反应性(表2.2)。此外，该血清与23个B细胞供体中的22个反应，处理后仍维持与6个供体(降低的)反应性(表2.3)。SAB分析证实，在IdeS处理前，患者血清主要对HLA-A抗原以及HLA-DQ和-DR抗原具有反应性(即MFI＞1000)(表2.4和2.5;图15)。IdeS降低了对所有抗原的反应性，仅少数HLA-DQ抗原在处理后具有高于MFI:1000的反应性。总体结论是IdeS可以接近于完全使患者P09的血清脱敏。

[0314] 结论

[0315] 使用临床上相关剂量的IdeS处理来自5期CKD敏化患者的血清能够快速和实质性地降低总IgG的水平。而且，这种活性直接反映在这些患者血清中特异性和/或广泛反应性

抗HLA IgG的水平的降低上。SAB分析明确地证实，IdeS处理降低了抗来自所有分析患者的血清的经测试呈阳性的所有MHC抗原的IgG抗体的水平。在大多数病例中，IdeS处理后对单个MHC抗原的反应性都低于临界MFI，即低于1000。在抗来自假设供体的T细胞和B细胞的CDC-DXM中，IdeS可降低所有测试患者血清样品的反应性，并且能够将阳性交叉匹配结果转阴。而且，收集自健康对象以0.24mg/kg IdeS处理之前的血清在CDC-CXM中与小鼠靶细胞强烈反应，而在IdeS处理后两小时和24小时收集的血清却为阴性，这进一步证明IdeS处理能够将阳性CXM转阴。总而言之，这些数据明确显示出，紧接在移植之前使用IdeS处理具有使高度敏化患者脱敏的潜力，从而允许移植并避免急性的抗体介导的排斥。

[0316] 实施例2-附件I-MFI原始数据-MHC I类抗原

[0317] 表A.使用SAB实验测定的与单个HLA-A抗原反应的MFI(原始值)

[0318]

	P02		P04		P07		P08		P09	
等位基因特异性	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
A*01:01,-,-,-,-	64	12	258	19	368	16	23322	2047	3670	131
A*11:02,-,-,-,-	76	12	1170	38	155	28	1012	46	647	30
A*11:01,-,-,-,-	95	14	772	34	117	17	1127	40	332	30
A*02:01,-,-,-,-	14010	754	471	28	123	16	377	25	4416	176
A*02:06,-,-,-,-	13081	724	419	27	119	16	682	29	4549	184
A*02:03,-,-,-,-	14679	848	336	22	93	12	3313	54	6714	266
A*23:01,-,-,-,-	6931	184	140	21	170	18	20719	892	3438	118
A*24:02,-,-,-,-	5720	163	146	22	167	19	18660	747	6522	261
A*24:03,-,-,-,-	7963	218	147	23	134	17	3296	118	4950	171
A*25:01,-,-,-,-	16017	708	5330	154	116	15	3941	110	214	29
A*26:01,-,-,-,-	70	15	1792	60	156	19	11061	359	230	33
A*29:01,-,-,-,-	237	19	498	46	179	20	16918	574	1055	67
A*29:02,-,-,-,-	347	23	405	39	174	22	16535	551	763	53
A*03:01,-,-,-,-	481	19	180	22	104	15	2809	114	98	24
A*30:01,-,-,-,-	99	14	155	21	131	16	19053	697	181	26
A*30:02,-,-,-,-	96	11	167	17	219	13	18951	642	156	25
A*31:01,-,-,-,-	108	13	191	21	126	15	20556	975	1473	48
A*32:01,-,-,-,-	15853	659	490	36	154	22	16963	377	378	41
A*33:03,-,-,-,-	130	17	1432	47	114	22	5081	140	7330	243
A*33:01,-,-,-,-	2084	40	297	25	117	18	4557	125	3851	101
A*34:02,-,-,-,-	115	13	2330	63	147	15	12354	241	4128	130
A*34:01,-,-,-,-	122	17	989	49	152	20	8166	164	3602	99
A*36:01,-,-,-,-	97	13	258	26	190	19	21627	1463	1139	54
A*43:01,-,-,-,-	169	19	1343	55	158	22	12911	445	304	33
A*66:02,-,-,-,-	130	15	256	29	155	22	1733	51	4878	163
A*66:01,-,-,-,-	107	16	6368	171	130	17	1510	47	2815	87
A*68:02,-,-,-,-	3975	131	2415	80	166	18	2659	93	12805	656
A*68:01,-,-,-,-	3940	124	2818	75	167	18	3653	110	13413	665
A*69:01,-,-,-,-	10448	484	280	26	132	20	1798	55	12645	611
A*74:01,-,-,-,-	107	13	271	26	115	16	14934	338	722	38
A*80:01,-,-,-,-	82	14	279	27	182	19	21455	1273	3102	76
总计	117431	5325	32402	1349	4728	564	311736	12941	110522	4671
反应性(%)	100%	5%	100%	4%	100%	12%	100%	4%	100%	4%

[0319] 表B.使用SAB实验测定的与单个HLA-B抗原反应的MFI(原始值)

[0320]

等位基因特异性	P02		P04		P07		P08		P09	
	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
-,-,B*13:01,-,-,-	6568	239	2156	96	11940	415	5049	134	612	52
-,-,B*13:02,-,-,-	10690	467	2597	102	14834	625	6532	140	602	43
-,-,B*18:01,-,-,-	13289	640	17859	955	9574	282	4412	116	1011	64
-,-,B*27:05,-,-,-	82	12	156	23	471	17	10312	295	609	36
-,-,B*27:08,-,-,-	74	13	152	21	283	18	6053	120	288	29
-,-,B*35:01,-,-,-	14040	735	21463	2517	14472	566	6441	146	175	62
-,-,B*37:01,-,-,-	6773	187	12918	476	8835	228	17098	655	206	60
-,-,B*38:01,-,-,-	14695	712	7209	189	11384	337	5136	90	307	55
-,-,B*39:01,-,-,-	625	21	10465	304	12569	424	5273	77	177	33
-,-,B*41:01,-,-,-	1423	40	2978	89	16496	839	3424	78	128	33
-,-,B*42:01,-,-,-	1565	51	422	29	123	16	7160	174	128	33
-,-,B*44:03,-,-,-	7408	286	4611	151	14513	614	17506	446	1576	62
-,-,B*44:02,-,-,-	12112	541	3225	108	11467	396	14585	306	318	52
-,-,B*45:01,-,-,-	905	25	7774	291	17110	907	20330	605	462	48
-,-,B*46:01,-,-,-	4880	123	16562	1035	169	30	17200	673	222	79
-,-,B*47:01,-,-,-	1700	41	1045	56	13404	535	2187	62	1193	58
-,-,B*48:01,-,-,-	2621	53	16060	597	14815	569	16613	811	1493	78
-,-,B*49:01,-,-,-	19412	1338	18626	1265	16059	743	10511	178	169	53
-,-,B*50:01,-,-,-	8854	343	20304	1509	17500	932	7763	155	121	48
-,-,B*51:01,-,-,-	19766	1510	20906	1895	9227	240	3099	72	159	73
-,-,B*51:02,-,-,-	20506	1611	20995	2547	13718	515	3801	86	183	87
-,-,B*52:01,-,-,-	19436	1585	20028	1726	10231	275	3682	71	160	61
-,-,B*53:01,-,-,-	18707	1261	21303	2272	12708	410	7582	160	267	86
-,-,B*54:01,-,-,-	770	28	12971	405	632	28	14088	316	835	71
-,-,B*55:01,-,-,-	2044	64	7628	186	691	22	16497	397	162	39
-,-,B*56:01,-,-,-	6751	224	17712	1039	385	22	3469	110	247	43
-,-,B*57:03,-,-,-	18455	1192	17761	1170	150	24	4147	107	274	59
-,-,B*57:01,-,-,-	19337	1338	18733	1350	136	21	4007	110	342	58
-,-,B*58:01,-,-,-	16725	911	15316	856	170	23	8670	196	294	55
-,-,B*59:01,-,-,-	15856	819	6399	177	8852	274	14144	330	653	80
-,-,B*40:01,-,-,-	372	19	8620	267	15827	738	14576	630	735	42
-,-,B*40:02,-,-,-	318	17	10941	289	16694	856	890	34	1354	55
-,-,B*40:06,-,-,-	304	26	5967	119	14189	594	2623	69	1283	60
-,-,B*15:01,-,-,-	9919	349	19678	1672	14553	640	529	33	337	63
-,-,B*15:16,-,-,-	17630	1094	16364	993	190	27	9578	210	199	63
-,-,B*14:01,-,-,-	7479	218	3726	105	5556	136	7704	162	292	62
-,-,B*14:02,-,-,-	8348	280	2889	81	3724	102	8668	175	256	68
-,-,B*67:01,-,-,-	1276	50	8260	329	219	30	13904	365	393	65
-,-,B*07:02,-,-,-	79	12	221	23	129	14	4083	89	93	29
-,-,B*15:10,-,-,-	10301	389	18614	1329	12626	454	1122	46	262	77
-,-,B*15:03,-,-,-	8867	311	18677	1297	13782	579	2173	38	126	48
-,-,B*73:01,-,-,-	95	16	1842	65	825	32	14648	466	789	51
-,-,B*15:11,-,-,-	10379	411	18185	1319	10037	356	3259	78	286	79
-,-,B*15:02,-,-,-	11482	478	19823	1615	12558	423	1327	39	287	59
-,-,B*15:12,-,-,-	2830	54	9906	508	12454	501	19323	713	843	52
-,-,B*15:13,-,-,-	18141	1108	18294	1317	10436	287	1812	55	241	69
-,-,B*78:01,-,-,-	15049	865	20478	1730	7461	217	1111	38	116	61
-,-,B*08:01,-,-,-	1581	36	168	23	7192	163	12749	426	181	35
-,-,B*81:01,-,-,-	81	13	10132	236	134	17	15231	590	1194	54
-,-,B*82:01,-,-,-	166	21	407	28	439	24	14058	267	227	47
总计	410769	22178	559523	36782	421945	16539	416138	11738	22865	2830
反应性(%)	100%	5%	100%	7%	100%	4%	100%	3%	100%	12%

[0321] 表C.使用SAB实验测定的与单个HLA-C抗原反应的MFI(原始值)

[0322]

等位基因特异性	P02		P04		P07		P08		P09	
	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
-,-,-,-,C*01:02,-	144	27	10024	280	275	27	23683	1730	2036	89
-,-,-,-,C*03:02,-	4722	140	15280	894	193	32	2261	65	131	41
-,-,-,-,C*03:04,-	2668	75	16963	1176	222	31	2719	85	153	46
-,-,-,-,C*12:03,-	148	25	4439	133	166	24	16059	463	479	42
-,-,-,-,C*14:02,-	122	32	6994	177	166	29	21253	1035	780	51
-,-,-,-,C*15:02,-	5524	181	1606	70	277	34	21755	859	953	56
-,-,-,-,C*16:01,-	141	29	2493	97	217	37	14945	414	347	64
-,-,-,-,C*17:01,-	181	36	228	34	189	37	19817	1256	231	45
-,-,-,-,C*18:02,-	159	31	1037	50	188	32	19501	786	651	61
-,-,-,-,C*02:02,-	186	28	239	32	198	31	12090	269	558	50
-,-,-,-,C*04:01,-	186	38	337	37	209	37	11939	315	293	49
-,-,-,-,C*05:01,-	164	26	1046	42	177	28	15526	424	435	46
-,-,-,-,C*06:02,-	170	32	1701	62	169	31	17296	491	598	50
-,-,-,-,C*07:02,-	173	33	396	37	204	31	23743	1643	599	54
-,-,-,-,C*08:01,-	145	21	8555	244	155	25	18497	558	650	49
-,-,-,-,C*03:03,-	2107	59	19947	1599	270	35	2816	84	148	64
总计	16941	812	91284	4964	3274	500	243901	10477	9039	856
反应性(%)	100%	5%	100%	5%	100%	15%	100%	4%	100%	9%

[0323] 实施例2-附件II-MFI原始数据MHCII类抗原

[0324] 表D.使用SAB实验测定的与单个HLA-DP抗原反应的MFI(原始值)

[0325]

等位基因特异性	P02		P04		P07		P08		P09	
	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*01:01,-	256	28	426	45	273	32	499	31	177	42
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:03,-,DPB1*01:01,-	184	35	215	39	175	36	649	35	156	43
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*10:01,-	591	26	253	32	122	23	439	27	97	34
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:05,-,DPB1*11:01,-	707	39	367	41	144	33	773	47	509	49
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:03,-,DPB1*11:01,-	283	42	434	56	184	41	1252	59	234	66
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:05,-,DPB1*13:01,-	303	39	323	46	148	43	1576	57	252	52
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*13:01,-	123	22	152	26	115	24	380	26	99	29
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*14:01,-	5844	156	305	40	148	30	558	31	115	33
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*15:01,-	198	37	571	103	236	53	583	66	172	87
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*17:01,-	6441	177	291	34	128	25	498	29	295	40
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*18:01,-	155	21	188	33	94	24	2631	21	94	29
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:04,-,DPB1*18:01,-	189	26	260	42	114	28	506	55	219	39
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:05,-,DPB1*18:01,-	213	28	529	69	184	34	575	40	151	48
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:03,-,DPB1*19:01,-	1084	64	921	147	216	51	920	55	183	64
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:03,-,DPB1*02:01,-	308	32	324	118	158	35	531	37	156	43
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*23:01,-	914	80	457	72	235	73	791	70	210	89
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*28:01,-	306	58	414	83	240	57	669	67	182	71
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:05,-,DPB1*28:01,-	283	38	373	60	166	40	1303	38	137	49
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:05,-,DPB1*03:01,-	5508	155	315	44	145	34	563	38	204	47
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:03,-,DPB1*03:01,-	6101	168	284	39	124	28	502	29	209	38
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*03:01,-	5481	148	352	46	173	34	1259	43	128	42
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:03,-,DPB1*04:02,-	250	27	613	72	232	24	317	41	127	54
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*01:03,-,DPB1*04:01,-	156	18	359	43	152	37	474	28	90	36
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*05:01,-	170	28	265	37	162	31	1319	41	173	39
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*06:01,-	5980	162	373	42	149	35	1342	42	359	55
-,-,-,-,-,-,-,DPA1*02:01,-,DPB1*09:01,-	7300	220	186	24	89	19	452	19	77	23
总计	49327	1874	9549	1435	4306	924	21360	1073	4806	1242
反应性(%)	100%	4%	100%	15%	100%	21%	100%	5%	100%	26%

[0326] 表E.使用SAB实验测定的与单个HLA-DQ抗原反应的MFI(原始值)

[0327]

等位基因特异性	P02		P04		P07		P08		P09	
	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
-,-,-,-,DQA1*05:01,-,DQB1*02:01,-,-,-,-,-	133	15	147	20	221	20	21824	3652	20118	3389
-,-,-,-,DQA1*02:01,-,DQB1*02:02,-,-,-,-,-	127	18	5588	206	99	23	20701	2023	16486	1044
-,-,-,-,DQA1*02:01,-,DQB1*02:01,-,-,-,-,-	112	14	4347	161	92	17	22333	1826	15483	844
-,-,-,-,DQA1*04:01,-,DQB1*02:01,-,-,-,-,-	124	23	162	26	120	26	22318	2785	18755	1598
-,-,-,-,DQA1*03:01,-,DQB1*02:01,-,-,-,-,-	114	18	112	18	103	20	22232	3023	19425	1575
-,-,-,-,DQA1*02:01,-,DQB1*04:02,-,-,-,-,-	1331	49	5717	212	145	28	21762	1109	374	60
-,-,-,-,DQA1*02:01,-,DQB1*04:01,-,-,-,-,-	1473	49	5509	175	157	31	23347	1009	453	59
-,-,-,-,DQA1*04:01,-,DQB1*04:02,-,-,-,-,-	1235	43	220	26	102	20	20977	1724	14869	702
-,-,-,-,DQA1*03:03,-,DQB1*04:01,-,-,-,-,-	2215	69	243	30	97	24	22189	2769	636	139
-,-,-,-,DQA1*01:02,-,DQB1*05:02,-,-,-,-,-	1250	52	191	25	122	27	331	29	2641	69
-,-,-,-,DQA1*01:01,-,DQB1*05:01,-,-,-,-,-	2344	78	266	24	102	21	660	19	6670	146
-,-,-,-,DQA1*01:01,-,DQB1*06:02,-,-,-,-,-	4501	77	281	34	182	25	18442	380	234	47
-,-,-,-,DQA1*01:03,-,DQB1*06:03,-,-,-,-,-	7767	181	286	32	136	38	17789	983	9668	281
-,-,-,-,DQA1*01:02,-,DQB1*06:04,-,-,-,-,-	4760	127	280	59	192	55	21132	724	357	115
-,-,-,-,DQA1*01:02,-,DQB1*06:09,-,-,-,-,-	5321	100	164	25	158	24	20512	1107	543	103
-,-,-,-,DQA1*01:02,-,DQB1*06:02,-,-,-,-,-	4236	68	234	37	169	31	21040	358	189	46
-,-,-,-,DQA1*01:03,-,DQB1*06:01,-,-,-,-,-	8661	192	304	25	167	35	20774	1892	8624	290
-,-,-,-,DQA1*02:01,-,DQB1*03:01,-,-,-,-,-	328	27	7971	330	164	31	22290	2390	1494	234
-,-,-,-,DQA1*06:01,-,DQB1*03:01,-,-,-,-,-	642	21	203	18	89	17	22598	3231	17969	1575
-,-,-,-,DQA1*03:01,-,DQB1*03:01,-,-,-,-,-	225	37	325	145	151	30	22928	2696	1477	274
-,-,-,-,DQA1*05:03,-,DQB1*03:01,-,-,-,-,-	216	22	594	37	169	27	22888	3371	20671	2742
-,-,-,-,DQA1*05:05,-,DQB1*03:01,-,-,-,-,-	222	26	529	35	161	27	22683	3319	20511	2678
-,-,-,-,DQA1*02:01,-,DQB1*03:02,-,-,-,-,-	2123	46	5785	212	141	30	21968	1912	1342	197
-,-,-,-,DQA1*01:01,-,DQB1*03:02,-,-,-,-,-	1509	41	195	32	143	30	21810	2125	1192	204
-,-,-,-,DQA1*03:01,-,DQB1*03:02,-,-,-,-,-	2522	39	158	23	109	22	22088	2364	1367	222
-,-,-,-,DQA1*03:02,-,DQB1*03:02,-,-,-,-,-	5925	85	145	24	102	28	22349	3391	3207	486
-,-,-,-,DQA1*03:02,-,DQB1*03:03,-,-,-,-,-	6583	91	424	21	84	17	22488	3351	2651	441
-,-,-,-,DQA1*02:01,-,DQB1*03:03,-,-,-,-,-	6720	109	10667	469	94	23	22211	2934	2710	464
-,-,-,-,DQA1*03:01,-,DQB1*03:03,-,-,-,-,-	2768	82	197	26	117	23	22331	2422	1364	243
总计	75489	1800	51244	2505	3891	767	586994	58920	211481	20264
反应性(%)	100%	2%	100%	5%	100%	20%	100%	10%	100%	10%

[0328] 表F.使用SAB实验测定的与单个HLA-DR抗原反应的MFI(原始值)

[0329]

等位基因特异性	P02		P04		P07		P08		P09	
	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
DRB1*01:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	17110	487	675	42	115	20	431	25	255	32
DRB1*01:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	18574	696	402	31	106	17	340	23	107	24
DRB1*10:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	21681	1351	327	28	691	26	23510	849	188	54
DRB1*01:03,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	16759	508	2850	51	82	18	487	21	116	22
DRB1*11:04,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	216	37	1575	66	5395	140	22704	1252	3740	513
DRB1*11:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	159	20	705	33	4552	95	21697	956	3207	380
DRB1*12:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	8815	293	7903	139	3381	63	23939	1668	2763	366
DRB1*12:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	9541	322	13327	341	3622	67	23623	1761	2803	344
DRB1*13:03,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	207	16	4923	104	6523	156	23331	1541	4764	550
DRB1*13:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	409	22	269	22	5257	119	22827	1247	4399	430
DRB1*14:54,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	5152	115	319	55	4412	114	22371	1320	3796	471
DRB1*14:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	6374	115	203	23	5847	135	23061	1611	4316	577
DRB1*14:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	2374	70	253	45	3609	96	21144	978	3310	336
DRB1*15:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	289	16	2435	68	94	16	22630	715	600	79
DRB1*15:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	363	18	3604	87	87	15	22151	929	845	102
DRB1*15:03,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	988	37	1943	72	150	35	22653	766	620	90
DRB1*16:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	322	29	1946	70	151	30	22645	782	868	130
DRB1*16:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	374	31	2495	80	142	28	22465	686	829	112
DRB1*03:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	264	20	182	22	6129	134	23891	2299	7907	778
DRB1*03:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	592	40	268	38	4394	104	22857	1681	5032	524
DRB1*04:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	13287	377	970	45	920	33	21202	1269	2770	330
DRB1*04:03,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	11768	304	927	79	762	41	22904	1174	2415	321
DRB1*04:05,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	13364	356	306	36	786	36	21299	1151	2439	318
DRB1*04:04,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	14417	431	1125	67	933	35	21760	1426	2682	369
DRB1*04:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	13713	413	807	60	897	36	21712	1323	2723	381
-,-,DRB5*01:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	13374	364	679	48	194	27	12086	140	147	37
-,-,DRB5*02:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	15426	490	1677	47	99	16	8798	241	692	37
-,-,DRB3*03:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	8925	415	927	95	667	103	22575	1013	1211	249
-,-,DRB3*01:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	8394	284	270	36	572	40	20467	1862	4190	479
-,-,DRB3*02:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	295	25	441	41	1203	45	22652	1251	1561	226
-,-,DRB4*01:03,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	21616	1327	247	32	104	32	23348	2341	439	213
-,-,DRB4*01:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	19130	944	686	64	304	22	23279	1917	870	196
DRB1*07:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	16524	691	25134	1957	107	16	24193	1793	2057	301
DRB1*08:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	171	29	2716	59	4588	100	22391	1101	4075	543
DRB1*09:01,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	17862	712	15740	648	199	42	22643	1466	1650	257
DRB1*09:02,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-,-	20587	820	19870	1099	133	28	23199	1416	3767	351
总计	319416	12223	119123	5831	67208	2080	723269	41992	84154	10522
反应性(%)	100%	4%	100%	5%	100%	3%	100%	6%	100%	13%

[0330] 参考文献

[0331] Ding JW,Zhou T,Zeng H,Ma L,Verbeek JS,Yin D,m.fl.Hyperacute rejection by anti-Gal IgG1,IgG2a,and IgG2b is dependent on complement and Fc-gamma

receptors.J Immunol.01januari 2008;180(1):261-8.

[0332] Jordan SC,Vo A,Bunnapradist S,Toyoda M,Peng A,Puliyanda D,Kamil E,Tyan D.Intravenous immune globulin treatment inhibits crossmatch positivity and allows for successful transplantation of incompatible organs in living-donor and cadaver recipients.Transplantation 2003Aug;76(4):631-636.

[0333] Moll S and Pascual M.Humoral rejection of organ allografts.Am.J.Transplant 2005Nov;5(11):2611-2618.

[0334] Montgomery RA,Hardy MA,Jordan SC,Racusen LC,Ratner LE,Tyan DB,Zachary AA.Consensus opinion from the antibody working group on the diagnosis,reporting,and risk assessment for antibody-mediated rejection and desensitization protocols.Transplantation 2004Jul;78(2):181-185.

[0335] Organ Procurement and Transplantation Network(OPTN)Database.US Department of Health and Human Services,Health Resources and Services Administration;May 11,2011.

[0336] Thomas B.Martins.Development of Internal Controls for the Luminex Instrument as Part of a Multiplex Seven-Analyte Viral Respiratory Antibody Profile

[0337] Patel R,Terasaki PI.Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation.N.Engl.J.Med.1969Apr;280(14):735-739.

[0338] Pierson RN 3rd.Antibody-mediated xenograft injury:mechanisms and protective strategies.Transpl Immunol.juni2009;21(2):65-9.

[0339] Terasaki PI,Ozawa M.Predicting kidney graft failure by HLA antibodies:a prospective trial.Am.J.Transplant 2004Mar;4(3):438-443.

[0340] Vo AA,Petrozzino J,Yeung K,Sinha A,Kahwaji J,Peng A,m.fl.Efficacy,outcomes,and cost-effectiveness of desensitization using IVIG and rituximab.Transplantation.27Mars2013;95(6):852-8.

[0341] von Pawel-Rammingen U,Johansson BP,BjörckL.IdeS,a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G.EMBO J2002Apr;21(7):1607-1615.

[0342] ÅkessonP,Moritz L,Truedsson M,Christensson B,von Pawel-Rammingen U.IdeS,a highly specific immunoglobulin G(IgG)-cleaving enzyme from Streptococcus pyogenes,is inhibited by specific IgG antibodies generated during infection.Infect.Immun 2006Jan;74(1):497-503.

[0343] 实施例3

[0344] 介绍

[0345] 如实施例1和2中所证实的,IdeS在静脉内给予人体后快速地酶切所有血浆IgG。以下体外和间接体内数据显示IdeS不仅如之前所示那样酶切可溶性IgG,而且还从表面IgG阳性B细胞上切除B细胞受体复合物的$F(ab')_2$部分。IdeS对BCR的截断对从R848和IL-2激活的CD27阳性记忆性B细胞诱导分泌型IgG具有强烈的抑制效果,而表面IgM阳性BCR细胞的IgM

分泌并未受IdeS处理而降低。这表明以IdeS处理具有供体特异性抗体的患者不仅去除了所述抗体，而且使供体特异性记忆性B细胞(至少在最初阶段)无法对供体抗原做出响应。因此，记忆性B细胞的任何初始活化以及能够产生更多供体特异性抗体的血浆细胞的生成也受到影响。

[0346] 材料和方法

[0347] 筛选表面免疫球蛋白的细胞系

[0348] 不同的人B细胞淋巴细胞瘤系，即U-2940(ACC634)，NU-DUL-1(ACC579)，Raji(CCL-86)和Daudi(CCL-213)，被筛选以确认是否存在膜结合IgG或IgM。简言之，细胞培养于RPMI1640中，37℃，5％CO_2，培养基补充有10％FCS和PEST。细胞在37℃以PBS或不同浓度IdeS处理30分钟，再以酸(0.1M甘氨酸pH 2.7，0.5MNaCl)在冰上洗涤5分钟。酸洗去除了存在于FcγR中的或结合至抗原的抗体，而保持跨膜分子完整(Gilden et al.，1978，Jennings et al.，2011)。细胞用对IgG或IgM(GM-80A，ICL)的$F(ab')_2$部分(#109-066-097，Jackson，与所有免疫球蛋白亚类的轻链交叉反应)和Fc部分(#109-066-098，Jackson，IgG重链特异性)特异的生物素结合抗体染色。链霉亲和素-APC(#016-130-084，Jackson)被用于使用Accuri C6流式细胞仪来监测FL4中的细胞。

[0349] 细胞增殖率与存活率试验

[0350] 增殖率通过加入BrdU而测定。细胞用PBS或不同浓度IdeS处理，在96孔板中接种细胞($5x10^4$个细胞/孔)，培养24小时。向细胞中加入BrdU，在测定增值率之前孵育6小时，测定根据制造商建议进行(细胞增殖ELISA，BrdU比色法，Roche#11 647 229 001)。不同浓度的细胞松弛素D(C2618，Sigma)和嘌呤霉素(Invitrogen)被用作抗增殖对照。

[0351] 灵敏比色试验(CCK-8)被用来测定细胞存活率。细胞用PBS或30μg/ml IdeS处理，$2x10^4$个细胞/孔被接种于96孔板并培养24小时。加入CCK-8(CCK-8细胞计数试剂盒8，Dojindo Laboratories，Japan)，在不同时间点测定450nm处吸收值。在用Nu-DUL-1细胞的试验中，细胞用PBS或30μg/ml IdeS处理，不同量的细胞被接种于96孔板，并在加入CCK-8之前培养24小时。在用富集的B细胞的试验中，外周血采集于肝素管中，加入30μg/ml IdeS或PBS，并在37℃、5％CO_2条件下孵育30分钟。向5ml血液中加入250μl RosetteSep® 人B细胞富集混合液(#07905，StemCell Technologies)，混匀并在室温孵育20分钟。样品用等体积的加有2％的FCS的PBS稀释，再进行密度梯度离心(Ficoll-PaquePLUS)。对收集的B细胞进行计数，并用加入了10％FCS和PEST的RPMI1640调整至$20x10^4$个细胞/ml。将$2x10^4$个细胞/孔接种于96孔板，重复三份，在加入CCK-8之前培养24小时。SDS-PAGE测定IdeS在血浆中的效力

[0352] 在对PBS或不同量IdeS处理的肝素血液进行密度梯度离心过程中收集的血浆被用来证实IdeS对可溶性IgG的效力。SDS-PAGE分析根据制造商说明书进行(Bio-Rad Laboratories，CA，USA)。简言之，将1μl血浆在非还原条件下于4-20％ Mini-PROTEAN® TGX™预制凝胶(Bio-Rad)上分离40分钟(200V)。根据制造商说明，对凝胶以GelCodeBlue染色试剂(Pierce，Thermo Fisher Scientific，MA，USA)染色，并扫描凝胶。

[0353] 酶切BCR的回收

[0354] 在37℃，用PBS或不同量的IdeS处理Nu-DUL-1细胞1小时，再充分洗涤以除去任何剩余的IdeS。细胞接种于含加入了10％FCS和PEST的RPMI1640培养基的96孔板。一个板立即用于流式细胞分析，以分析完整IgG，另一个板在分析之前培养(37℃，5％CO_2)24小时。细胞

用对F(ab')$_2$部分特异的生物素化抗体(#109-066-097,Jackson)染色,再以链霉亲和素-APC(#016-130-084,Jackson)染色,使用Accuri C6流式细胞仪在FL4中监测细胞。

[0355] 从健康志愿者中采集外周血于肝素管(BD Vacutainer,#367876)中,并以30μg/ml IdeS或PBS在37℃处理1小时,再通过密度梯度离心(Ficoll-PaquePLUS)分离PBMC。收集PBMC层,以PBS洗涤,并重悬于培养基(含10%FCS和PEST的RPMI1640)。对PBMC进行计数,并调整至2x10^{6}个细胞/ml,移走一个样品,固定于PFA,以含0.1%BSA的PBS洗涤,并保存于4℃直至进行流式细胞分析。培养剩余细胞,移走样品并在所示时间点用PFA固定。对于IgG的F(ab')$_2$部分的检测,使用生物素化的抗CH1-IgG(#710.3202.100,BAC),对于IgG的Fc部分的检测,使用羊抗人Fc特异性F(ab')$_2$片段(#109-066-098,Jackson)。细胞进一步用结合了PE的抗CD19(#IP-305-T100,ExBio)和链霉亲和素-APC(#016-130-084,Jackson)双染色。使用前向散射器门控淋巴细胞群,使用Accuri C6流式细胞仪在FL2和FL4中监测双阳性细胞。

[0356] 细胞内磷光特异性流式细胞术(BCR信号转导)

[0357] Nu-DUL-1细胞在无血清培养基中培养过夜,以使背景磷酸化程度最小化,再开始信号转导实验。第二天,加入PBS或30μg/ml IdeS,细胞在37℃,5%CO_2培养30分钟。移除1x10^{6}个细胞,在PFA中固定5分钟,再于70%乙醇中在冰上透化10分钟。细胞在含0.1%BSA的PBS中洗涤,并存储于4℃直至分析(零样品)。收集零样品后,加入10μg/ml羊抗人F(ab')$_2$特异性F(ab')$_2$(Jackson#109-006-097)交联剩余细胞的BCR,在不同时间点收集、固定和透化细胞样品。固定的细胞被结合了APC-的磷光特异性ERK1/2(#17-9109-42,eBioscience)以及结合了PE的磷光特异性PLC-γ2(#558490,BD)染色,以进行流式细胞分析。使用AccuriC6流式细胞仪在FL2和FL4中监测细胞。

[0358] 记忆性B细胞分化

[0359] 从健康志愿者采集外周血于肝素管(BD Vacutainer,#367876),使用密度梯度离心(Ficoll-PaquePLUS)分离PBMC。收集PBMC层,用PBS洗涤,并重悬于培养基(含10%FCS和PEST的RPMI1640)。调节PBMC至2x10^{6}个细胞/ml,并接种于IdeS(终浓度0.3,3and 30μg/ml)或PBS。根据制造商建议(MabTech),使用R848和rIL-2的混合物刺激细胞,并培养72-96小时。用于短时处理的细胞被留在含PBS或IdeS的管中,并在37℃培养1小时,再用PBS洗涤3x12ml,再用培养基洗涤1x12ml。接种这些细胞,并用R848/rIL-2按上法处理。

[0360] 用70%乙醇预处理ELISpot滤板,并用灭菌水洗涤,在4℃用捕获抗体(ELISpotPLUS Mabtech kit#3850-2HW-Plus用于监测产IgG细胞,ELISpotPLUS Mabtech kit#3845-2HW-Plus用于监测产IgM细胞,ELISpotBASIC Mabtech kit#3860-2H用于监测产IgA细胞)孵育过夜。在接种细胞之前,使用培养基洗涤并封闭ELISpot滤板至少30分钟。

[0361] 细胞转移至15ml管中,充分洗涤,计数并调整至0.5x10^{6}个细胞/ml,制备2倍稀释液,再在将细胞接种于制备号的ELISpot滤板并培养24小时。洗涤ELISpot板,并在室温下与用于总IgG、IgM和IgA分析的生物化检测抗体(在各试剂盒内)一起孵育2小时。洗涤滤板,并在室温下与亲和链霉素-HRP孵育1小时,再以TMB现成溶液洗涤和培养,并显影直至出现清晰的点。在自来水下洗涤滤板并在黑暗中晾干。对滤板进行照相,对点进行人工计数。

[0362] B细胞富集和流式细胞术

[0363] 对于B细胞富集,将外周血收集于含30μg/ml IdeS或PBS的肝素管中,在37℃,5%CO_2条件下培养30分钟。向5ml血液中加入250μl RosetteSep® 人B细胞富集混合液(#07905,

StemCell Technologies)，混匀并在室温下孵育20分钟。样品以等体积含2%FCS PBS稀释，再进行密度梯度离心(Ficoll-PaquePLUS)。计数收集的B细胞，并在含2%FCS的PBS中调整至15x10^{4}个细胞/ml，再接种于V形96孔板中进行流式细胞染色。板以1500rpm离心3分钟，去除上清液。为测定IgG的F(ab')$_2$部分，使用10μg/ml生物素化的抗CH1-IgG(#710.3202.100,BAC)，为测定IgG的Fc部分，使用羊抗人Fc特异性F(ab')$_2$片段(#109-066-098,Jackson)。细胞进一步用结合PE的抗CD19(#IP-305-T100,ExBio)或结合PE的抗CD27(#555441,Pharmingen)以及Streptavidin-APC((#016-130-084,Jackson)双染色。使用Accuri C6流式细胞仪在FL2和FL4中监测细胞。

[0364] IdeS在首次人类临床实验中酶切IgG型BCR

[0365] 经瑞典调控和伦理委员会批准，进行单次逐渐升高剂量的IdeS的I期人体随机双盲研究(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01802697)，该研究在朗德的I期部门进行。所有对象在任何研究相关程序启动之前都签署了知情同意书。作为该研究的探索性部分，监测了在用0.12或0.24mg/kg BW IdeS静脉处理后的不同时间点的CD19$^+$细胞上IgG型BCR的完整性。外周血采集于肝素管中，在2小时内利用密度梯度离心(Ficoll-PaquePLUS)从收集物中分离出PBMC。收集PBMC层，以PBS洗涤，并在PFA中于冰上固定30分钟。使用含0.5%BSA的PBS洗涤并存储细胞，直至在所有时间点都收集。细胞用10μg/ml生物素化的抗-CH1-IgG(#710.3202.100,BAC)染色以检测IgG的F(ab')$_2$部分。为检测IgG的Fc部分，使用0.5μg/ml羊抗人Fc特异性F(ab')$_2$片段(#109-066-098,Jackson)。细胞进一步用结合了PE的抗CD19(#21270194,Immunotools)和Streptavidin-APC(#016-130-084,Jackson)双染色。每个个体的给药前样品中门控淋巴细胞群，该门随后用于该对象的所有时间点。在FL2中监测CD19$^+$细胞，在FL4中监测F(ab')$_2$/Fc信号。在M1(FL2)中监测CD19$^+$细胞，在抗Fc和抗Fab染色后，这些细胞被进一步监测是否存在信号(FL4)。在每个样品中，收集右上方(UR)的细胞计数以及平均荧光强度(MFI)。

[0366] 而且，使用以下公式计算双阳性细胞的频率：

[0367] $$\frac{\text{UR 中 MFI} \times \text{UR 中细胞计数}}{\text{M1 中细胞计数}}$$

[0368] 该公式用于在UR中仅存在很少细胞计数时能够区别MFI的差别。

[0369] 结果

[0370] IdeS以酶切可溶性IgG相似的效力酶切IgG型BCR

[0371] 利用流式细胞仪，筛选四种不同的B淋巴瘤细胞系是否存在跨膜IgG或IgM，包括用酸洗步骤去除未经跨膜结构域结合至膜的IgG或IgM(Gilden et al.,1978,Jennings et al.,2011)。在证实细胞系上存在IgG型或IgM型BCR后，Nu-DUL-1(IgG型BCR)和Daudi(IgM型BCR)被选择作为模型用于进一步分析。Fab片段特异性F(ab')$_2$抗体被用来检测是否存在BCR的Fab部分，因为该抗体与存在于IgG和IgM中的轻链交叉反应。为检测是否存在Fc部分，使用抗IgG的Fc部分的抗体。在高于约4μg/ml的IdeS浓度时，细胞表面检测不到完整的膜结合IgG。具有IgM型BCR的Daudi细胞即使在高浓度的IdeS下也不受影响(图20A)。Nu-DUL-1细胞用不同浓度的IdeS处理，并在FACS染色之前在37℃孵育30分钟。IdeS能够有效地去除存在于BCR中的IgG的F(ab')$_2$部分，留下被酶切的Fc部分连接至膜(图20B)。

[0372] 我们随后研究了在从健康志愿者纯化的PBMC上的BCR酶切。由于Fab特异性抗体与

IgM上轻链的交叉反应性，因而使用抗IgG-CH1结构域特异性CaptureSelect片段来染色异源PBMC细胞群。收集于肝素管的血液用不同浓度IdeS处理30分钟(37℃)。IdeS处理后密度梯度离心分离PBMC，并收集血浆和PBMC。血浆在SDS-PAGE上分析以确认IdeS在可溶性IgG上的效力(图21A)。scIgG在0.9μg/ml IdeS就已产生，完全酶切在9μg/ml时实现。

[0373] 因为CD19是B细胞系的标志性特征，所以PBMC用抗CD19和抗Fab或抗Fc抗体双染色以检测在B细胞上是否存在完整的IgG-BCR。流式细胞仪显示IdeS可从$CD19^+$细胞去除IgG的$F(ab')_2$部分，而将Fc部分保留在膜上(图21B)。因为存在于BCR中的单次酶切膜结合IgG仍连接至膜，只要scIgG产物存在并连接至膜，通过流式细胞仪就无法完全看出效果。在9μg/mlIdeS时能够对膜结合IgG显示出完全效果。因此，这些结果第一次显示出IdeS对游离IgG的效力与对对应存在于B细胞受体中的膜结合IgG的效力之间的直接关联性。

[0374] 为了进一步确定IdeS对B细胞记忆性亚群的效果，我们研亢了对$CD19^+/CD27^+$记忆性B细胞的效果。$CD19^+$B细胞仅占总PBMC细胞群的几个百分比。因此，使用阴性选择(RosetteSep)来富集$CD19^+$B细胞，其产生＞90％$CD19^+$细胞(图22A)。在IdeS处理之前，染色表明约10％的此细胞群呈表面IgG和CD27双阳性(图22B)。IdeS处理后，染色表明少于1％的$CD19^+/CD27^+$细胞呈细胞表面IgG阳性(图22B)。因此，这些数据第一次显示出类别切换记忆性B细胞(即$CD19^+/CD27^+$/表面IgG^+细胞)上的BCR被IdeS有效地酶切。

[0375] 酶切的BCR快速地在两种细胞系以及PBMC上再生并且对细胞存活率无影响

[0376] 为了研亢IgG型BCR的更新，以不同浓度的IdeS处理Nu-DUL-1细胞，洗涤并出去IdeS，进行细胞培养。处理后1和24小时，移除一部分细胞，流式细胞仪分析膜结合IgG。处理后1小时，IdeS浓度＞4μg/ml组没有检测到IgG，但处理后24小时，Fab特异性信号恢复至原始水平，表明膜结合IgG已恢复(图23A)。通过加入BrdU来分析Nu-DUL-1细胞的增殖能力，即使IdeS处理持续超过24小时，在酶切IgG型BCR之后增殖能力没有变化(图23B)。已知具有抗增殖能力的物质(嘌呤霉素和细胞松弛素D)对细胞具有强烈的抗增殖作用。Nu-DUL-1细胞的存活率还通过用高剂量的IdeS(30μg/ml)处理细胞24小时来研亢，使用CCK-8试验来分析存活率，IdeS处理后对细胞存活率没有影响(图23C)。

[0377] IgG型BCR在高增殖性淋巴瘤细胞系上在24小时内再生的发现可被预期到，因为增殖性细胞的膜转换率通常很高。健康志愿者的PBMC被相似地处理以进一步研亢原代细胞上IgG型BCR的转换率。血液采集于肝素管中，并用高剂量(30μg/ml)IdeS处理。处理血液后，在Ficoll上分离出PBMC。用大量缓冲液洗涤PBMC以在培养前除去所有IdeS。在不同的时间点移除一部分细胞，固定并用用于B细胞谱系的抗CD19染色，进一步用抗Fab或抗Fc染色以监测IgG-BCR。IgG型BCR也在正常人$CD19^+$细胞上快速再生，并且在酶切后16小时内抗Fab阳性细胞的数量就已恢复至处理前水平(虽然未达到完全MFI)。这表明，IdeS处理PBMC之后16小时，虽然不是所有IgG-BCR都被替换，但细胞重新在表面上具有完整IgG-BCR(图24A)。抗Fc信号不受处理的影响，表明IdeS处理将$F(ab')_2$与IgG型BCR分离(图24B)。因为B细胞仅占总PBMC细胞群的少数百分比，我们还使用了B细胞富集试剂盒(RosetteSep)，其产生＞90％$CD19^+$细胞。使用$F(ab')_2$和Fc特异性试剂染色表明，约20％的CD19富集细胞群呈IgG阳性(图25)。细胞表面恢复实验使用这些纯化的细胞来重复，IdeS处理有效地将膜结合IgG的$F(ab')_2$部分去除，留下完整的Fc部分(图25A和25B)。实验再次证明，转换很快速，并且处理后16小时，细胞表面IgG已恢复(图25A)。使用CCK-8试验检测数天内的细胞存活率以评价具

有或缺少完整BCR的原生人B细胞的生存率。当通过IdeS处理临时地从CD19富集细胞上除去IgG型BCR时，细胞存活率没有受明显影响。IdeS处理抑制BCR信号转导

[0378] BCR信号转导在B淋巴细胞的活化、生存和分化方面是重要的。BCR结合后的最初事件是Lyn和Syk的活化，随后是PLC-γ2和ERK1/2的活化。所描述的实验清晰地显示出IdeS能够酶切IgG型BCR，其应当对BCR信号转导有影响。为证实这一点，我们监测了PLC-γ2和ERK1/2的磷酸化以作为BCR信号级联的下游指标。在一系列实验中，使用$F(ab')_2$特异性抗体交联Nu-DUL-1细胞上的BCR，结果显示这些细胞在IdeS处理后无法通过BCR进行信号转导(图27A和27B)。IdeS处理后，使用$F(ab')_2$特异性抗体交联BCR，PLC-γ2或ERK1/2都没有磷酸化。空白组细胞正常响应。这些数据表明，IdeS处理得到的具有被酶切的IgG型BCR的细胞不能对抗原刺激做出响应。

[0379] IdeS阻断B细胞成熟

[0380] 由于发现IdeS不影响细胞系或原代B细胞的存活率，但使它们不能响应抗原，我们决定进一步探索原代记忆性B细胞的功能。因此，收集PBMC，用IdeS处理，并用充足IL2和R848刺激，以活化记忆性B细胞并使其分化成Ig生成细胞(Jahnmatz et al.,2013)。72-96小时后，充分洗涤细胞以除去IdeS并分析Ig生成细胞的频率。IdeS在IL2/R848培养的第三天被加入以作为额外的对照。在该时间点，不可能使IL2/R848分化的B细胞停止分泌IgG。该对照还显示出，信号的丧失不是因为IdeS干扰ELISPOT试验的抗体的延滞效应导致(图28A)。在多少试验中，IdeS存在于整个刺激期间(96小时)并且结果表明IdeS处理抑制了记忆性B细胞分化以及IgG生成细胞的数量，而它对IgM生成细胞或IgA生成细胞的成熟没有效果(图28A和28B)。在从0.3至30μg/ml的所有测试IdeS浓度下，B细胞分化都受明显影响(图28C)。另一组实验中，IdeS在用IL2和R848刺激之前被洗去，结果表明IgG生成细胞的数量也显著减少(图28D)，表明IgG-BCR的抗原结合部分的最初移除是抑制记忆性B细胞活化为IgG生成细胞的重要步骤。

[0381] IdeS在人体内酶切IgG型BCR

[0382] IdeS已在近期被首次于人体实验内进行测试，在该实验中健康的人对象被给予单次逐渐升高静脉内剂量(ClinicalTrials.gov Identifier:NCT01802697)(提交手册)。给予四个对象的最高测试剂量是0.24mg/kg BW。该临床实验的探索性部分是分析IdeS给药后不同时间点的循环$CD19^+$淋巴细胞上IgG型BCR的完整性。在给药前及给药后2h、24h、48h和96h采集外周血并纯化PBMC。细胞被立即固定以防止进一步的细胞代谢并被存储，直至来自对象的所有时间点样品都可被分析。PBMC被双染色以显色CD19和$F(ab')_2$，利用流式细胞仪进行分析。该方法可测定表面具有$F(ab')_2$(即完整IgG型BCR)和Fc的细胞的频率和平均荧光强度。但是，该方法不能却别完整BCR和单次酶切BCR。

[0383] 结果证实，$F(ab')_2$阳性的CD19+细胞的数量在IdeS处理(0.24mg/kg BW IdeS)后2小时即降低，而Fc阳性细胞的数量没有降低(图29)。这清晰地表明，IdeS在体内酶切$CD19^+$细胞上的表面IgG。来自四个对象以及两个安慰剂对象的数据证实，IdeS在人体内有效地酶切IgG型BCR，并且表面IgG阳性的$CD19^+$细胞的频率在处理后的数天内逐渐恢复(图30)。

[0384] 过论

[0385] 本文呈现的数据清楚地表明，IdeS酶切IgG型BCR并且在受体酶切后完全抑制BCR信号转导。因此，具有IdeS酶切的IgG型BCR的B细胞不能进行抗原结合，导致不发生受体酶

切下游主要细胞事件,即内化、加工和MHC II类分子的提呈。B细胞是非常有效地抗原提呈细胞(Lanzavecchia 1990,Avalos&Plough 2015),并且能够以高的效率在特异性BCR介导的内吞作用后提呈HLA上的抗原,因此IdeS酶切后BCR的抗原结合片段的丧失很可能对向$CD4^+$T细胞的抗原提呈有影响。

[0386] 酶切IgG型BCR对细胞存活率没有影响,无论是在细胞系或从健康人体纯化的B细胞都是如此(图23、24和26)。但是,在体内,细胞显得比在体外稍慢地从处理中恢复过来(图30)。由于I期临床研亢能够用于分析的细胞数量很有限,在该探索性研亢中无法测定其他B细胞标记物。因此,无法得出有关任何B细胞具体亚群的命运的结论。这些证据与我们已在体外观察到的通过膜转换实现的酶切细胞的IgG型BCR的恢复一致,但不能排除体内观察到的稍慢的恢复是由于新B细胞的成熟导致的,而不仅仅是膜转换导致的。

[0387] 本文呈现的结果显示,如果IdeS在多重刺激(IL2和R848)活化之前使用,那么IdeS阻断IgG分泌细胞的发育,而不能阻断IgA或IgM抗体分泌细胞的发育。但是,如果IdeS在之后使用,那么它没有阻断效果。在体外刺激培养基内的PBMC后,结合至BCR上的抗原被内化,并加载至MHC II类分子上,提呈至T细胞,后者诱导B细胞的增殖与分化(Tangye& Tralington 2009)。在缺少抗原刺激的情况下,即与IgG-BCR被IdeS酶切的情况相同,B细胞无法得到另一个信号并增殖。

[0388] 此外,这表明了IgG-BCR复合物在响应刺激时的重要作用(即使在缺乏抗原的情况下),即维持紧张信号(tonic signal)。已公开文献表明,BCR的CD79b的胞外区单个氨基酸突变会导致血中丙球蛋白贫乏(Dobbs et al.,2007)。这个发现表明,BCR中胞外部分的蛋白之间的相互作用对于细胞活化是重要的,我们推测CD79a/b和IgG之间的相互作用对于响应外界刺激而产生合适的信号转导体是重要的。此理论的进一步的支持来自于另一篇报道,其中使用非裂解性抗体靶向CD79b细胞外结构域(Hardy et al.,2014)。他们发现,在体内和体外,结合至CD79b导致B细胞免疫失能并且丧失IgG生成细胞。我们推测,通过酶切IgG的$F(ab')_2$部分,BCR的分拆导致对抗原依赖性活化无响应性,这是由于缺失了合适的细胞内蛋白组装和未产生功能性信号转导体造成的。

[0389] IdeS目前正被开发用于使等待肾移植的高度敏化患者脱敏。这些患者已具有抗大多供体的抗体,很难有机会寻找到匹配的供体。通过利用IdeS在移植之前移除供体特异性抗体(DSA),患者可适合移植,而不论其在处理之前具有阳性的交叉匹配结果。IdeS处理的另一个作用是从DSA快速产生游离的但仍保留结合能力的$F(ab')_2$片段。这些$F(ab')_2$片段可结合并阻断移植物上的抗原,因为$F(ab')_2$片段已丧失它们的Fc介导的功能,例如补体固定(CDC)、抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),$F(ab')_2$片段可能能够阻断IgM和新形成的IgG DSA,从而提供对移植物的额外保护作用。本文呈现的结果显示,IdeS也酶切$CD27^+$阳性记忆性B细胞上的IgG型BCR,导致它们不能应答抗原刺激。因此,IdeS不仅移除了DSA,而且DSA特异性记忆性B细胞也在最初阶段无法应答供体抗原。这可能潜在地对移植物存活具有长期效果,因为记忆性B细胞的初始激活以及长寿命血浆细胞的生成都可能受到IdeS处理的影响。

[0390] 参考文献

[0391] Avalos A.M.&Ploegh H.(2014)Early BCR Evens and Antigen Capture, Processing and Loading on MHC Class II on B cells.Front.Immunol.March 10:5:92

[0392] Dal Porto JM,Gauld SB,Merrell KT,Mills D,Pugh-Bernard AE,Cambier J.B cell antigen receptor signaling 101.Mol.Immunol.41(6-7),599-613(2004).

[0393] Dobbs AK,Yang T,Farmer D,Kager L,Parolini O,Conley ME.(2007)Cutting edge:a hypomorphic mutation in Igbeta(CD79b)in a patient with immunodeficiency and a leaky defect in B cell development.J Immunol.15;179(4):2055-9

[0394] Hardy I,Anceriz N,Rousseau F,Seefeldt M,Irla M et a1.(2014)Anti-CD79Antibody Induces B Cell Anergy That Protects against Autoimmunity.J Immunol.192:1641-1650

[0395] Jahnmatz M,Kesa G,Netterlid E,Buisman AM,Thorstensson R,et al.(2013)Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses.J Immunol Methods391:50-59

[0396] Johansson BP,Shannon O,BjörckL(2008)IdeS:a bacterial proteolytic enzyme with therapeutic potential.PLoS One 3:e1692

[0397] Johnson GL and Lapadat R.(2002).Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK,JNK,and p38protein kinases.Science,298,1911-1912

[0398] Kurosaki T.Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins.Nat.Rev.Immunol.2(5),354-363(2002)

[0399] Lanzavecchia A.Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes.Annu Rev Immunol(1990)8:773-93

[0400] Manz R,Hauser A,Hiepe F,Radbruch A.(2005)Maintenance Of Serum Antibody Levels.Annu.Rev.Immunol.2005.23:367-86

[0401] Nandakumar KS,Johansson BP,BjörckL,Holmdahl R(2007)Blocking of experimental arthritis by cleavage of IgG antibodies in vivo.Arthritis Rheum 56:3253-3260

[0402] Rajewsky K.Clonal selection and learning in the antibody system.Nature 1996:381(6585):751-8

[0403] Reth M.Antigen receptor tail clue.Nature 338(6214),383-384(1989)

[0404] Reth M,Wienands J.Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor.Annu.Rev.Immunol.15,453-479(1997)

[0405] Scharenberg AM,Humphries LA,Rawlings DJ.Calcium signalling and cell-fate choice in B cells.Nat.Rev.Immunol.7(10),778-789(2007)

[0406] Stuart G.Tangye and Kim L.Good Human IgM+CD27+B Cells:Memory B Cells or“Memory”B Cells?The Journal of Immunology,2007,179:13-19

[0407] Su YF,Chuang WJ,Wang SM,Chen WY,Chiang-Ni C,Lin YS,Wu JJ,Liu CC.(2011)The deficient cleavage of M protein-bound IgG by IdeS:insight into the escape of Streptococcus pyogenes from antibody-mediated immunity.Mol Immunol.49(1-2):134-42

[0408] Tangye&Tralington.(2009)Memory B cells:Effectors of long-lived immune responses.Eur.J.Immunol.39:2065-2075

[0409] Tradtrantip L,Asavapanumas N,Verkman AS(2013)Therapeutic cleavage of anti-aquaporin-4autoantibody in neuromyelitis optica by an IgG-selective proteinase.Mol Pharmacol 83:1268-1275

[0410] Vincents B,von Pawel-Rammingen U,BjörckL and Abrahamson M,(2004).Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase.IdeS,reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding.Biochemistry 43:15540-9

[0411] von Pawel-Rammingen U,Johansson B P andBjörckL,(2002).IdeS,a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G.EMBO J 21:1607-15

[0412] Wenig K,Chatwell L,von Pawel-Rammingen U,BjörckL,Huber R and Sondermann P,(2004).Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS,a cysteine proteinase with strict specificity for IgG.ProcNatlAcadSci USA101:17371-6

[0413] Yang R,Otten MA,Hellmark T,Collin M,BjörckL,et al.(2010)Successful treatment of experimental glomerulonephritis with IdeS and EndoS,IgG-degrading streptococcal enzymes.Nephrol Dial Transplant 25:2479-2486

[0414] 实施例4

[0415] 以下研亢是为了确定是否可以靶向被IdeS处理的B细胞的BCR。

[0416] 材料和方法

[0417] 简言之,从80 000/孔到1250/孔的细胞两步稀释液(Nu-DUL-1细胞,具有IgG型BCR的B细胞淋巴瘤;DSMZ的ACC579)(R10培养基,RPMI1640、PEST和10％FCS)被接种于96孔平底聚苯乙烯平板上,并用作活细胞的校准。20000个细胞/孔被接种于平板中,并在37℃于CO_2孵育箱中与或不与30μg/ml IdeS一起孵育1小时。抗Fab、抗Fc或对照被加入测试孔中以达到10μg/ml的终浓度,平板在37℃于CO_2孵育箱中孵育。第一个平板在3小时后移除,第二个在24小时后移除,第三个在48小时后移除。在从孵育箱中移除平板后,加入CCK-8试剂(来自CCK-8细胞计数试剂盒,Dojindo Laboratories,Japan)并继续孵育1小时,再于ELISA-平板读取器(分光光度计)中在450nm处读数。CCK-8试验可进行灵敏的比色测定,以确定细胞增殖和细胞毒性试验中的细胞存活率。所使用的抗Fab试剂是$F(ab')_2$特异性羊$F(ab')_2$片段(Jackson#109-006-097,1.3mg/ml)。所使用的抗Fc试剂是Fc特异性羊$F(ab')_2$片段(Jackson#109-006-098,1.3mg/ml)。对照是小鼠γ球蛋白(Jackson#015-000-002,11.4mg/ml)。选择该对照的原因是它与所测试的抗Fab和抗Fc来自于同一制造商,并且小鼠IgG不被IdeS酶切。

[0418] 结果和结论

[0419]

	抗 Fab			抗 FC			对照 IgG			
	3 h	**24 h**	**48 h**	**3 h**	**24 h**	**48 h**	**3 h**	**24 h**	**48 h**	
PBS	25665	18514	7969	21569	8568	3112	21569	23598	24386	平均或细胞数
IdeS	25026	29347	25211	23005	9104	979	21569	21583	22469	
PBS	1013	288	212	1015	332	446	884	504	1114	StDEV
IdeS	1718	664	355	1940	1780	427	1665	489	374	

[0420] 结果显示，使用抗$F(ab')_2$或Fc部分的抗体交联表达IgG型BCR的靶细胞(此例为B细胞淋巴瘤细胞系)上的BCR，诱导了细胞死亡。但是，在IdeS之前在人体中直接利用BCR作为靶标是不可能的，因为在血液循环中存在正常的IgG水平(～10mg/mL)。但是，用IdeS预处理可降低血液循环中的抗体水平，而使靶细胞上的Fc片段仍可用于治疗措施。在IdeS酶切后，靶向Fc片段对在IdeS处理细胞上和在模拟处理的细胞上至少同样有效。治疗措施可借助靶向表位(由IdeS酶切而在BCR中产生)的抗体或靶向Fc上的共同表位(未示出)来实现。治疗性抗体优选是不被IdeS酶切的抗体，并且具有高度的Fc效应功能，即CDC、ADCC和ADCP。抗体也可连接至细胞毒试剂，即放射性同位素或毒素。

[0421] 另一种可能性是基于膜结合BCR上的完整IgG的恢复速度相比于血液循环中的IgG的恢复速度快得多来提供的。这使得可以利用$F(ab')_2$部分，而不仅是Fc部分。记忆性B细胞上IgG-BCR的恢复使得可以利用抗原(连接至毒素或放射性同位素)以特异性地靶向具有特定的非期望特异性(即抗HLA或抗胰岛素)的记忆性B细胞。

SEQUENCE LISTING

<110> 汉莎生物制药股份有限公司

<120> 一种方法

<130> 17624CN2

<150> GB1413240.1

<151> 2014-07-25

<160> 3

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 310

<212> PRT

<213> 化脓性链球菌

<400> 1

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15
Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30
Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45
Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60
Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80
Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95
Lys Ile Asn Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110
Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125
Glu Lys Ala Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro
130 135 140
Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160
Asn His Gly Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly
165 170 175
Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190
Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp

195 200 205

Leu Ile Lys Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His
210 215 220

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 2

<211> 959

<212> PRT

<213> 化脓性链球菌

<400> 2

Glu Glu Lys Thr Val Gln Val Gln Lys Gly Leu Pro Ser Ile Asp Ser
1 5 10 15

Leu His Tyr Leu Ser Glu Asn Ser Lys Lys Glu Phe Lys Glu Glu Leu
20 25 30

Ser Lys Ala Gly Gln Glu Ser Gln Lys Val Lys Glu Ile Leu Ala Lys
35 40 45

Ala Gln Gln Ala Asp Lys Gln Ala Gln Glu Leu Ala Lys Met Lys Ile
50 55 60

Pro Glu Lys Ile Pro Met Lys Pro Leu His Gly Pro Leu Tyr Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Phe Arg Thr Trp His Asp Lys Thr Ser Asp Pro Thr Glu Lys Asp
85 90 95

Lys Val Asn Ser Met Gly Glu Leu Pro Lys Glu Val Asp Leu Ala Phe
100 105 110

Ile Phe His Asp Trp Thr Lys Asp Tyr Ser Leu Phe Trp Lys Glu Leu
115 120 125

Ala Thr Lys His Val Pro Lys Leu Asn Lys Gln Gly Thr Arg Val Ile
130 135 140

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

145 150 155 160
Ala Glu Asp Thr Ser Lys Tyr Pro Asn Thr Pro Glu Gly Asn Lys Ala
165 170 175
Leu Ala Lys Ala Ile Val Asp Glu Tyr Val Tyr Lys Tyr Asn Leu Asp
180 185 190
Gly Leu Asp Val Asp Val Glu His Asp Ser Ile Pro Lys Val Asp Lys
195 200 205
Lys Glu Asp Thr Ala Gly Val Glu Arg Ser Ile Gln Val Phe Glu Glu
210 215 220
Ile Gly Lys Leu Ile Gly Pro Lys Gly Val Asp Lys Ser Arg Leu Phe
225 230 235 240
Ile Met Asp Ser Thr Tyr Met Ala Asp Lys Asn Pro Leu Ile Glu Arg
245 250 255
Gly Ala Pro Tyr Ile Asn Leu Leu Leu Val Gln Val Tyr Gly Ser Gln
260 265 270
Gly Glu Lys Gly Gly Trp Glu Pro Val Ser Asn Arg Pro Glu Lys Thr
275 280 285
Met Glu Glu Arg Trp Gln Gly Tyr Ser Lys Tyr Ile Arg Pro Glu Gln
290 295 300
Tyr Met Ile Gly Phe Ser Phe Tyr Glu Glu Asn Ala Gln Glu Gly Asn
305 310 315 320
Leu Trp Tyr Asp Ile Asn Ser Arg Lys Asp Glu Asp Lys Ala Asn Gly
325 330 335
Ile Asn Thr Asp Ile Thr Gly Thr Arg Ala Glu Arg Tyr Ala Arg Trp
340 345 350
Gln Pro Lys Thr Gly Gly Val Lys Gly Gly Ile Phe Ser Tyr Ala Ile
355 360 365
Asp Arg Asp Gly Val Ala His Gln Pro Lys Lys Tyr Ala Lys Gln Lys
370 375 380
Glu Phe Lys Asp Ala Thr Asp Asn Ile Phe His Ser Asp Tyr Ser Val
385 390 395 400
Ser Lys Ala Leu Lys Thr Val Met Leu Lys Asp Lys Ser Tyr Asp Leu
405 410 415
Ile Asp Glu Lys Asp Phe Pro Asp Lys Ala Leu Arg Glu Ala Val Met
420 425 430
Ala Gln Val Gly Thr Arg Lys Gly Asp Leu Glu Arg Phe Asn Gly Thr
435 440 445
Leu Arg Leu Asp Asn Pro Ala Ile Gln Ser Leu Glu Gly Leu Asn Lys
450 455 460

Phe Lys Lys Leu Ala Gln Leu Asp Leu Ile Gly Leu Ser Arg Ile Thr
465 470 475 480
Lys Leu Asp Arg Ser Val Leu Pro Ala Asn Met Lys Pro Gly Lys Asp
485 490 495
Thr Leu Glu Thr Val Leu Glu Thr Tyr Lys Lys Asp Asn Lys Glu Glu
500 505 510
Pro Ala Thr Ile Pro Pro Val Ser Leu Lys Val Ser Gly Leu Thr Gly
515 520 525
Leu Lys Glu Leu Asp Leu Ser Gly Phe Asp Arg Glu Thr Leu Ala Gly
530 535 540
Leu Asp Ala Ala Thr Leu Thr Ser Leu Glu Lys Val Asp Ile Ser Gly
545 550 555 560
Asn Lys Leu Asp Leu Ala Pro Gly Thr Glu Asn Arg Gln Ile Phe Asp
565 570 575
Thr Met Leu Ser Thr Ile Ser Asn His Val Gly Ser Asn Glu Gln Thr
580 585 590
Val Lys Phe Asp Lys Gln Lys Pro Thr Gly His Tyr Pro Asp Thr Tyr
595 600 605
Gly Lys Thr Ser Leu Arg Leu Pro Val Ala Asn Glu Lys Val Asp Leu
610 615 620
Gln Ser Gln Leu Leu Phe Gly Thr Val Thr Asn Gln Gly Thr Leu Ile
625 630 635 640
Asn Ser Glu Ala Asp Tyr Lys Ala Tyr Gln Asn His Lys Ile Ala Gly
645 650 655
Arg Ser Phe Val Asp Ser Asn Tyr His Tyr Asn Asn Phe Lys Val Ser
660 665 670
Tyr Glu Asn Tyr Thr Val Lys Val Thr Asp Ser Thr Leu Gly Thr Thr
675 680 685
Thr Asp Lys Thr Leu Ala Thr Asp Lys Glu Glu Thr Tyr Lys Val Asp
690 695 700
Phe Phe Ser Pro Ala Asp Lys Thr Lys Ala Val His Thr Ala Lys Val
705 710 715 720
Ile Val Gly Asp Glu Lys Thr Met Met Val Asn Leu Ala Glu Gly Ala
725 730 735
Thr Val Ile Gly Gly Ser Ala Asp Pro Val Asn Ala Arg Lys Val Phe
740 745 750
Asp Gly Gln Leu Gly Ser Glu Thr Asp Asn Ile Ser Leu Gly Trp Asp
755 760 765
Ser Lys Gln Ser Ile Ile Phe Lys Leu Lys Glu Asp Gly Leu Ile Lys

770 775 780
His Trp Arg Phe Phe Asn Asp Ser Ala Arg Asn Pro Glu Thr Thr Asn
785 790 795 800
Lys Pro Ile Gln Glu Ala Ser Leu Gln Ile Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
805 810 815
Asn Leu Asp Asn Leu Leu Glu Asn Pro Asn Lys Phe Asp Asp Glu Lys
820 825 830
Tyr Trp Ile Thr Val Asp Thr Tyr Ser Ala Gln Gly Glu Arg Ala Thr
835 840 845
Ala Phe Ser Asn Thr Leu Asn Asn Ile Thr Ser Lys Tyr Trp Arg Val
850 855 860
Val Phe Asp Thr Lys Gly Asp Arg Tyr Ser Ser Pro Val Val Pro Glu
865 870 875 880
Leu Gln Ile Leu Gly Tyr Pro Leu Pro Asn Ala Asp Thr Ile Met Lys
885 890 895
Thr Val Thr Thr Ala Lys Glu Leu Ser Gln Gln Lys Asp Lys Phe Ser
900 905 910
Gln Lys Met Leu Asp Glu Leu Lys Ile Lys Glu Met Ala Leu Glu Thr
915 920 925
Ser Leu Asn Ser Lys Ile Phe Asp Val Thr Ala Ile Asn Ala Asn Ala
930 935 940
Gly Val Leu Lys Asp Cys Ile Glu Lys Arg Gln Leu Leu Lys Lys
945 950 955

<210> 3
<211> 312
<212> PRT
<213> 化脓性链球菌
<400> 3
Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15
Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Lys
20 25 30
Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45
Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60
Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80
Asn Asn Glu Lys Ile Glu Ala Tyr Leu Lys Lys His Pro Asp Lys Gln

85 90 95
Lys Ile Met Phe Gly Asp Gln Glu Leu Leu Asp Val Arg Lys Val Ile
100 105 110
Asn Thr Lys Gly Asp Gln Thr Asn Ser Glu Leu Phe Asn Tyr Phe Arg
115 120 125
Asp Lys Ala Phe Pro Gly Leu Ser Ala Arg Arg Ile Gly Val Met Pro
130 135 140
Asp Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Tyr
145 150 155 160
Lys Thr Gln Thr Thr Asp Val Asn Arg Thr Tyr Gln Glu Lys Asp Arg
165 170 175
Arg Gly Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys
180 185 190
Leu Leu Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Thr Leu Lys Glu Ile
195 200 205
Ser Asp Leu Ile Lys Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu
210 215 220
Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp
225 230 235 240
Gly Ala Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Glu Ala Ile Tyr Val Thr
245 250 255
Asp Ser Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly
260 265 270
Val Asn Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu
275 280 285
Asp Asn Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly
290 295 300
Gln Asp Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

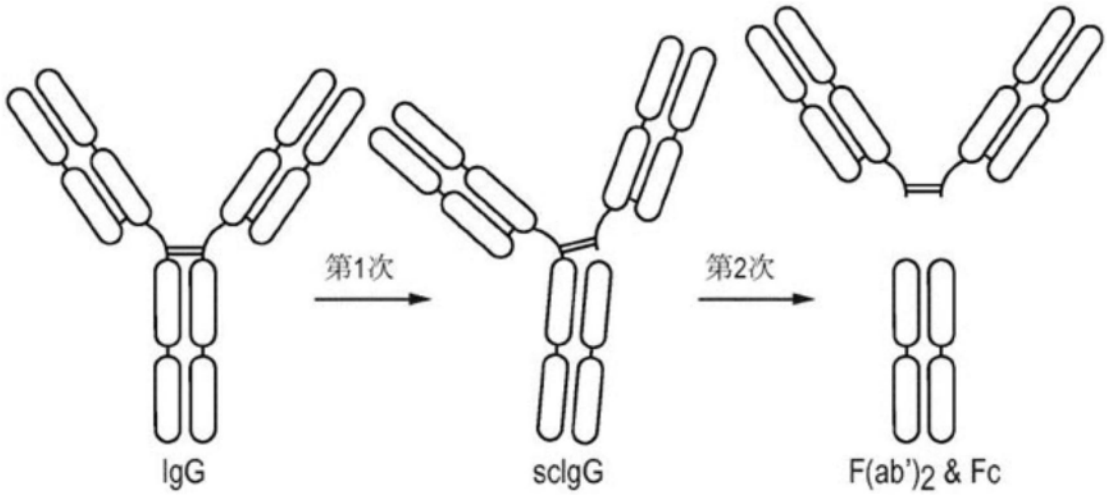

第1次
第2次
IgG
scIgG
F(ab')2 & Fc

图1

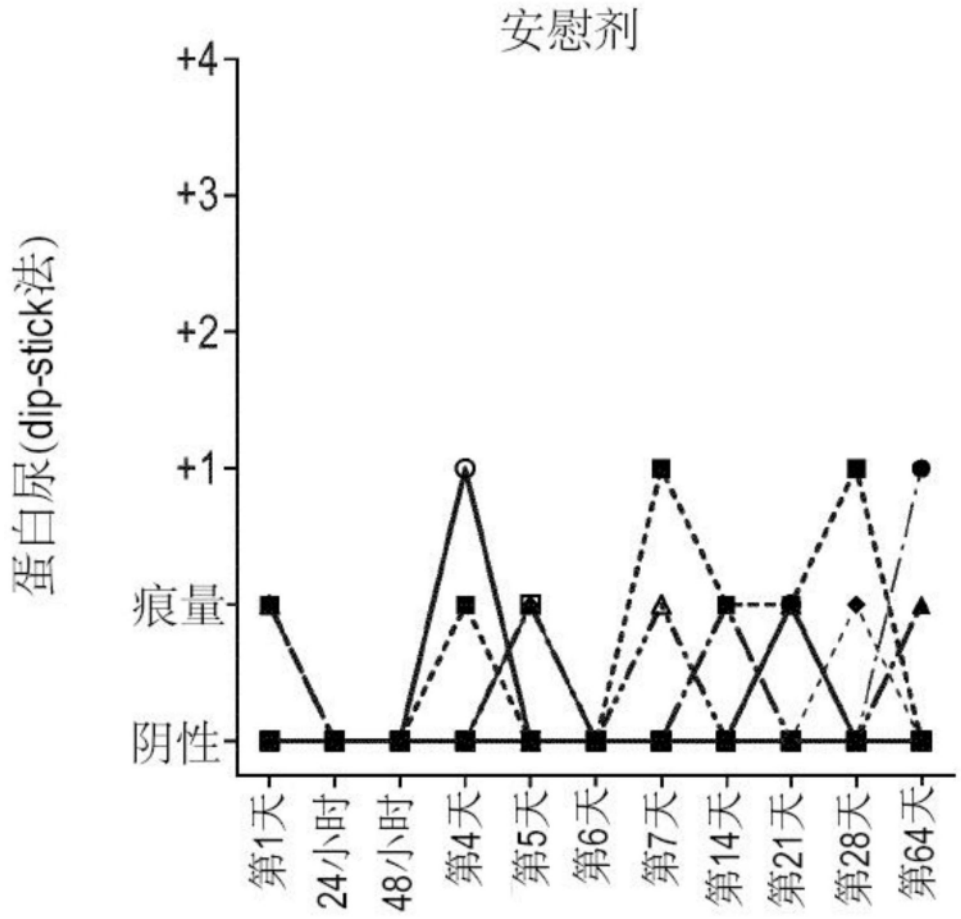

安慰剂
蛋白尿(dip-stick法)
+4
+3
+2
+1
痕量
阴性
第1天
24小时
48小时
第4天
第5天
第6天
第7天
第14天
第21天
第28天
第64天

图2A

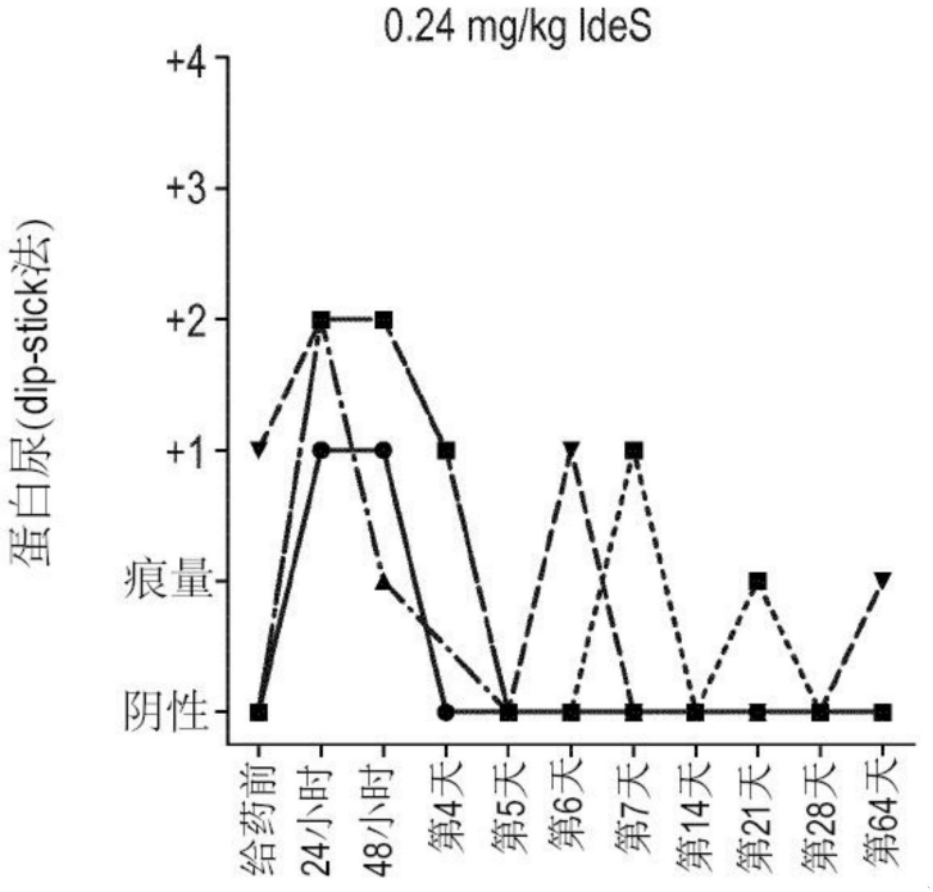

0.24 mg/kg IdeS
蛋白尿(dip-stick法)
+4
+3
+2
+1
痕量
阴性
给药前
24小时
48小时
第4天
第5天
第6天
第7天
第14天
第21天
第28天
第64天

图2B

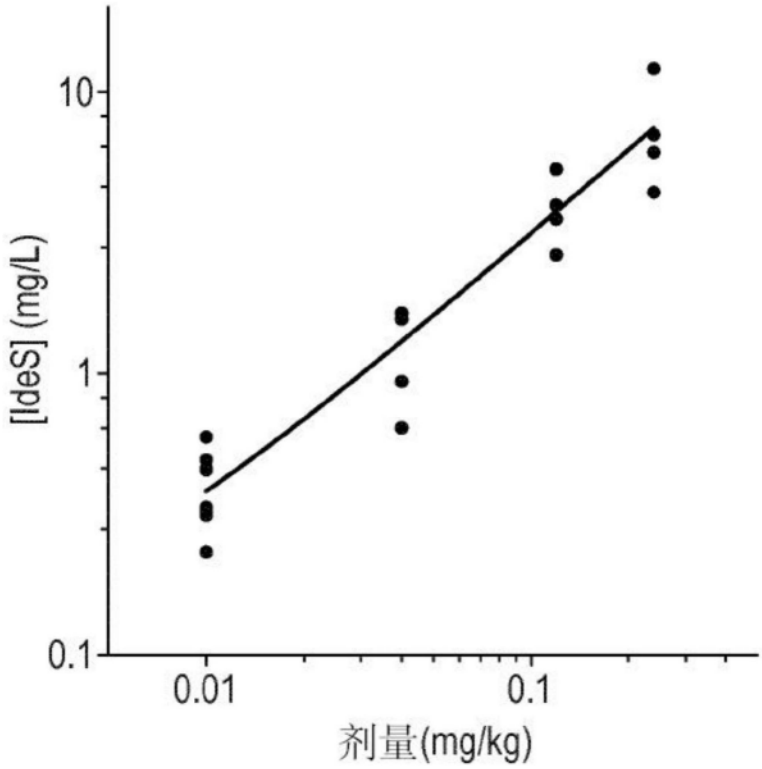


图3A

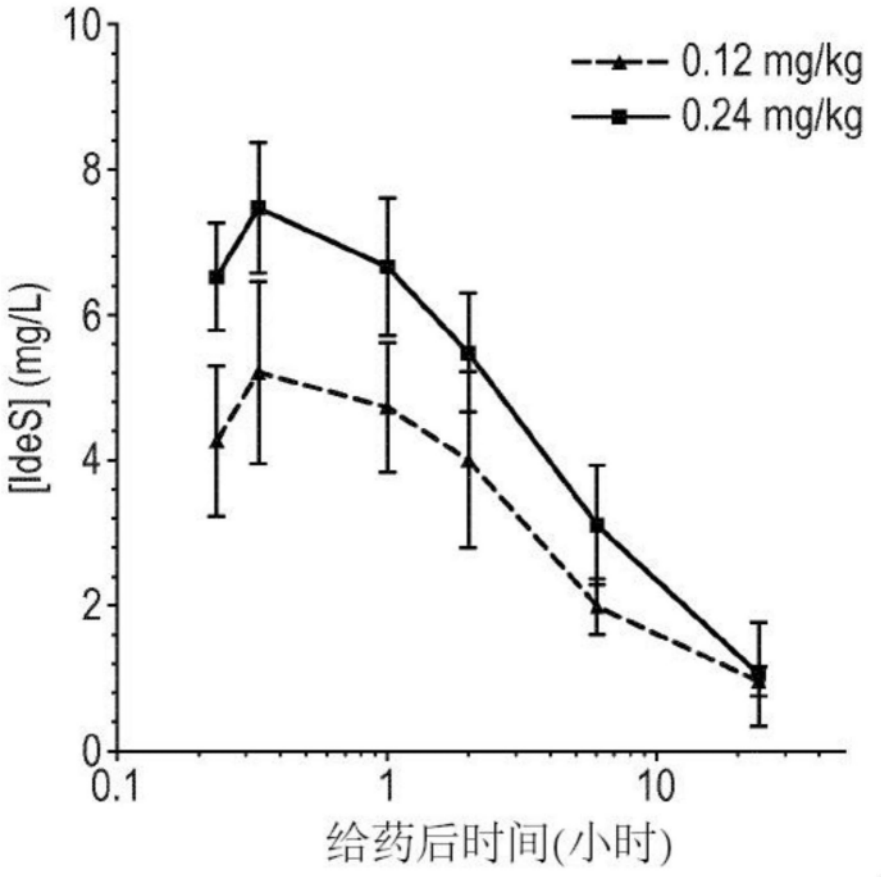


图3B

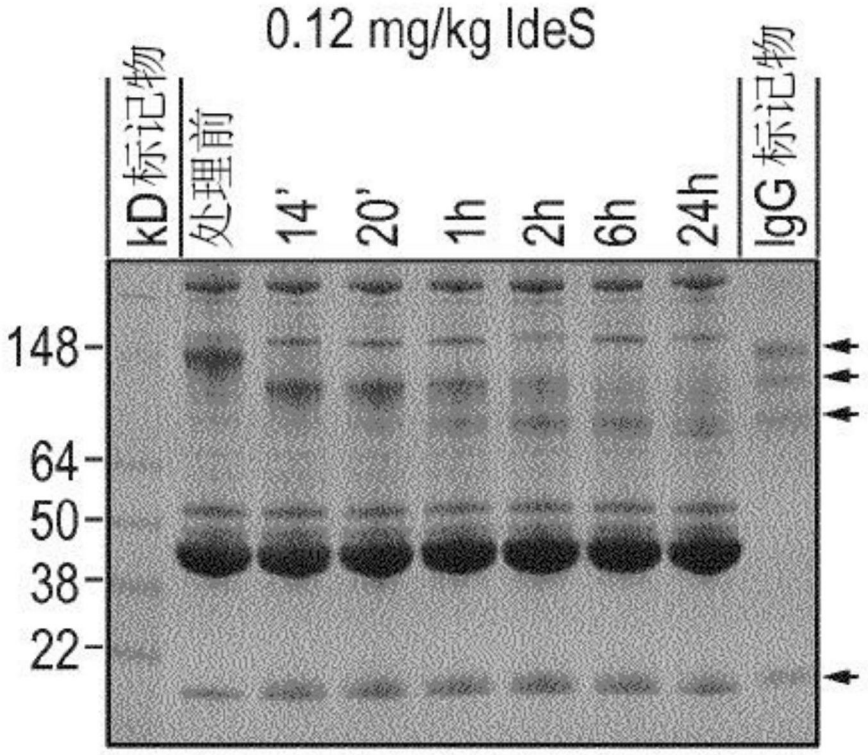

0.12 mg/kg IdeS
kD标记物
处理前
14'
20'
1h
2h
6h
24h
IgG 标记物
148
64
50
38
22

图4A

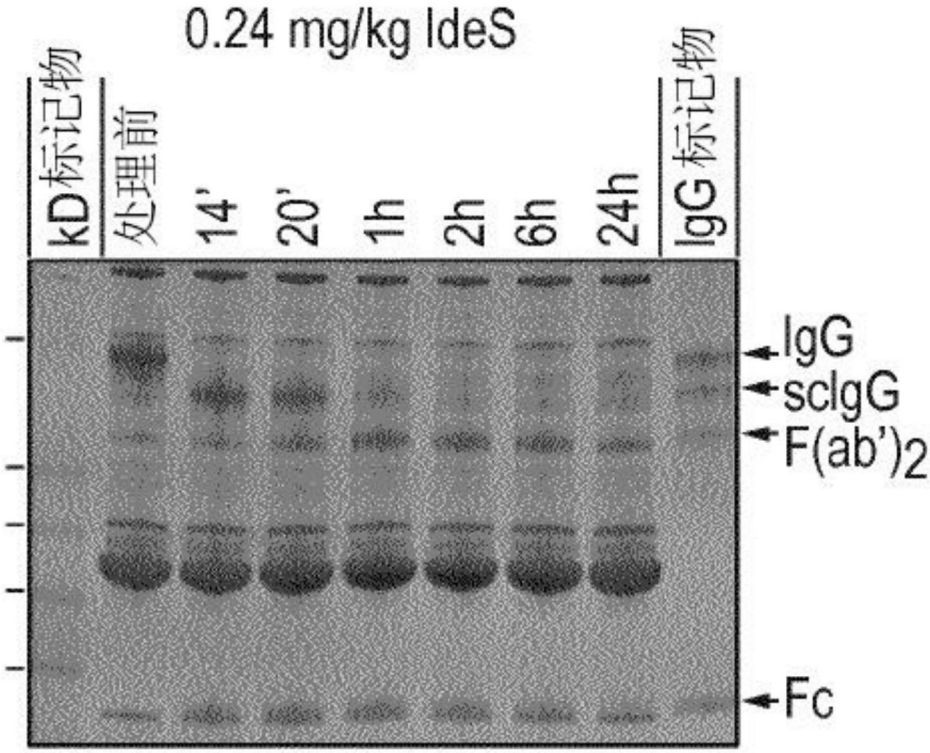

0.24 mg/kg IdeS
kD标记物
处理前
14'
20'
1h
2h
6h
24h
IgG 标记物
IgG
sclgG
F(ab')2
Fc

图4B

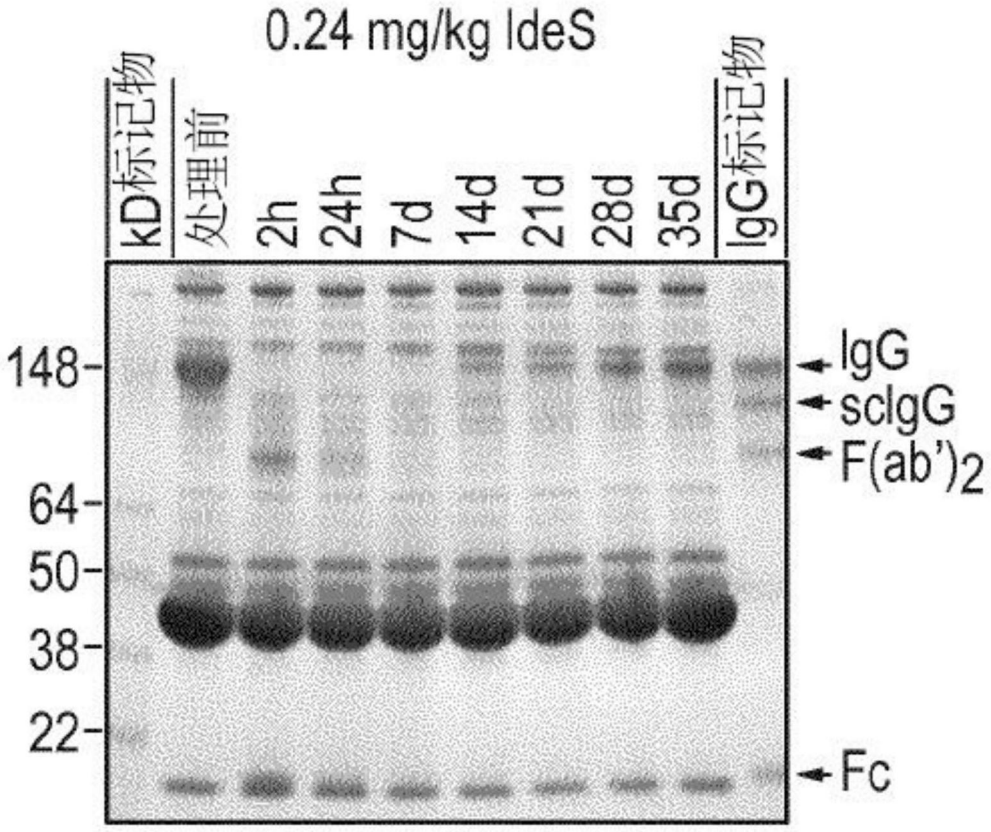

0.24 mg/kg IdeS
kD标记物
处理前
2h
24h
7d
14d
21d
28d
35d
IgG标记物
148
64
50
38
22
IgG
sclgG
F(ab')2
Fc

图4C

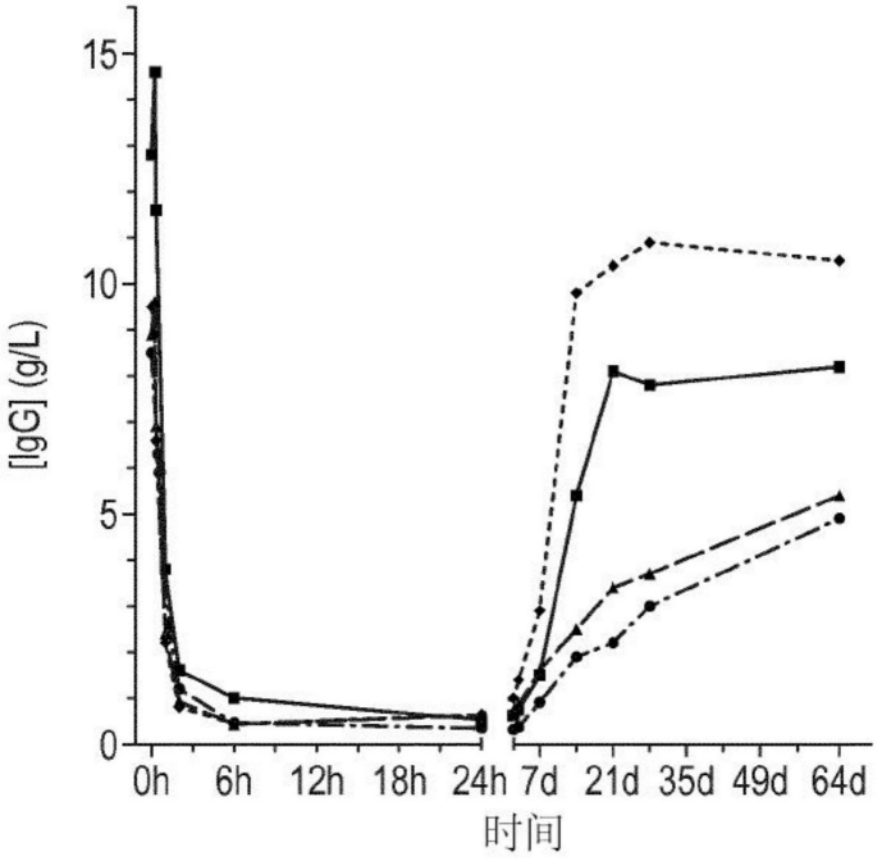


图5

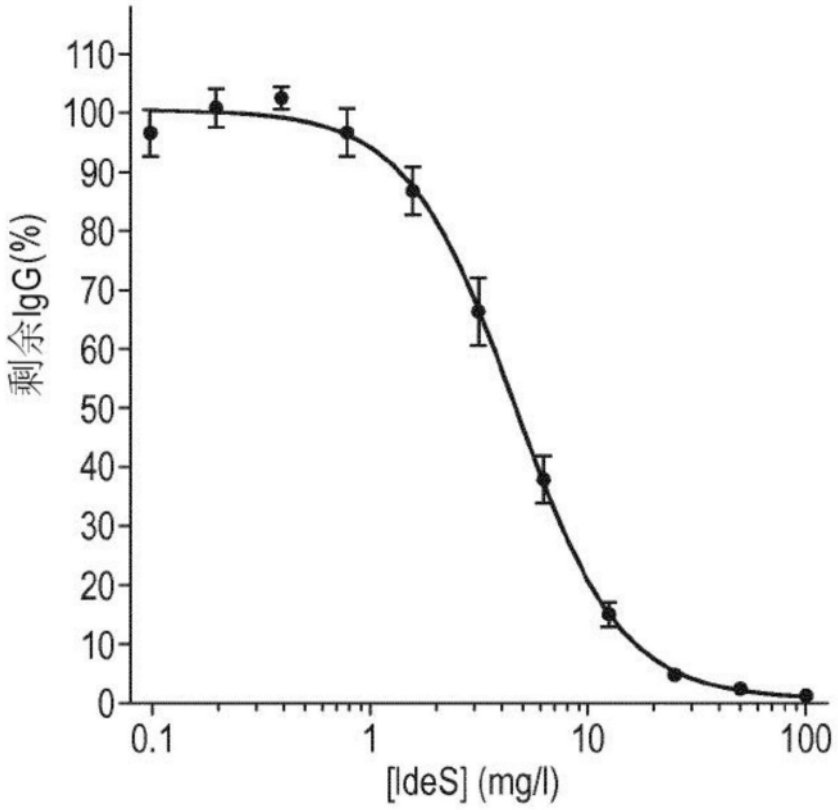


图6

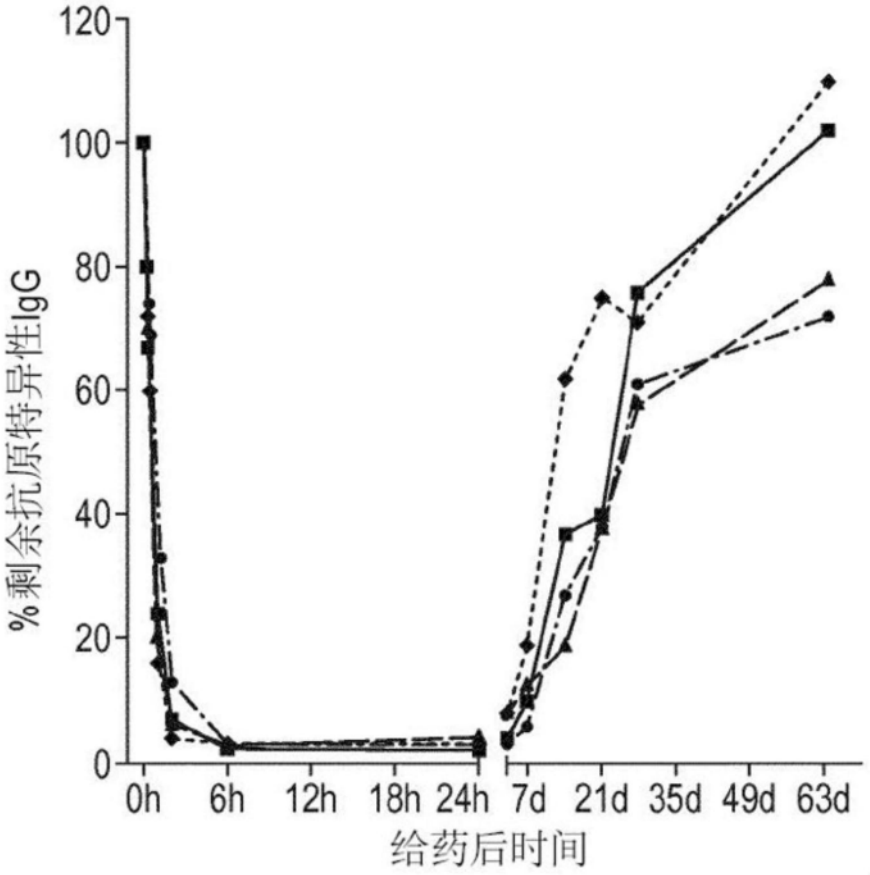

120
100
80
60
40
20
0
%剩余抗原特异性IgG
0h
6h
12h
18h
24h
7d
21d
35d
49d
63d
给药后时间

图7

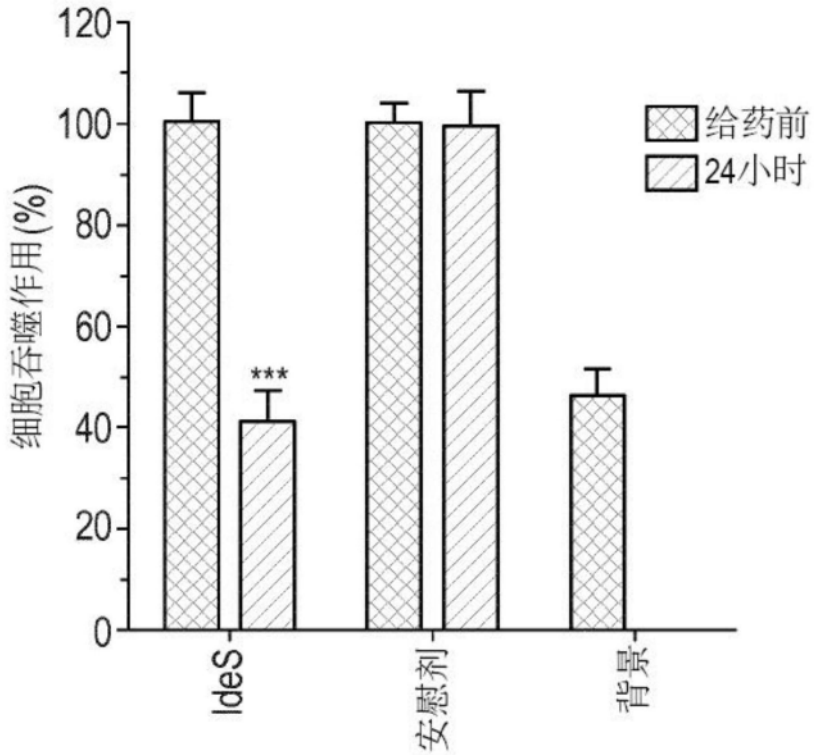


图8A

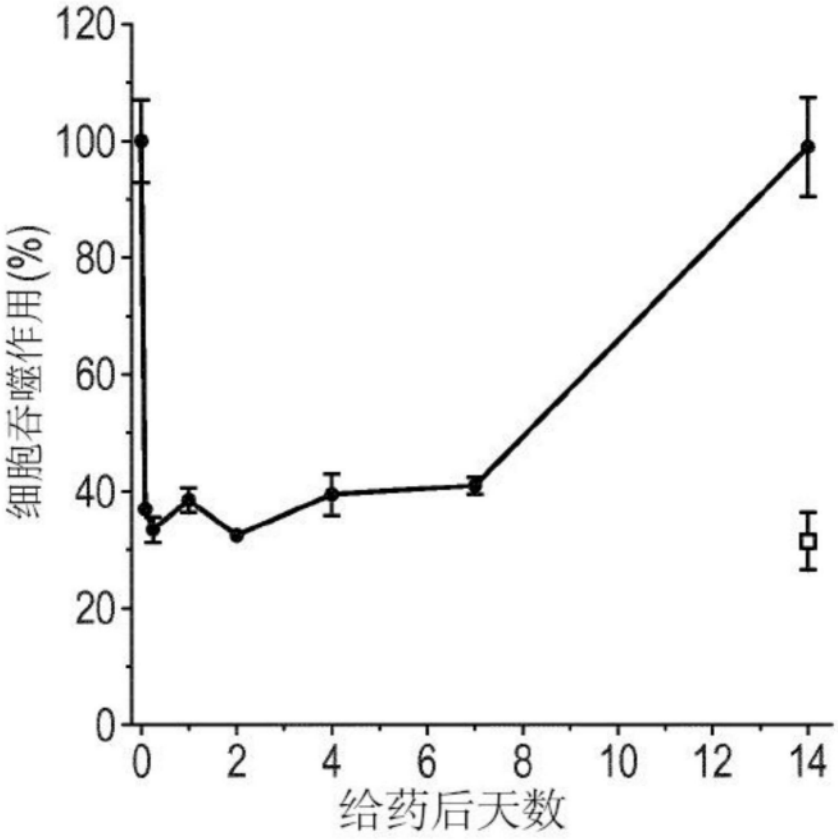


图8B

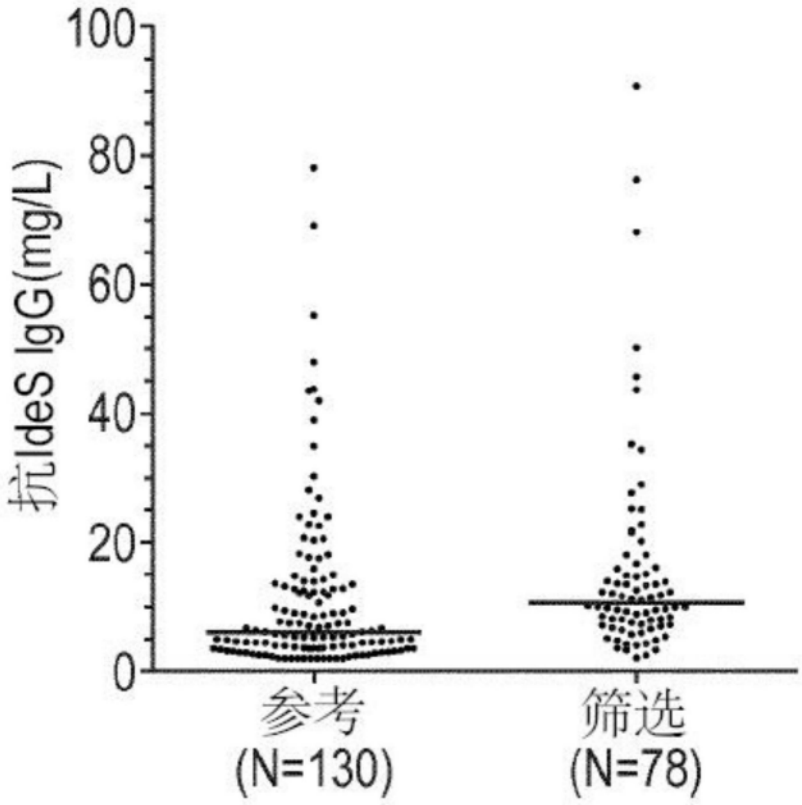


图9A

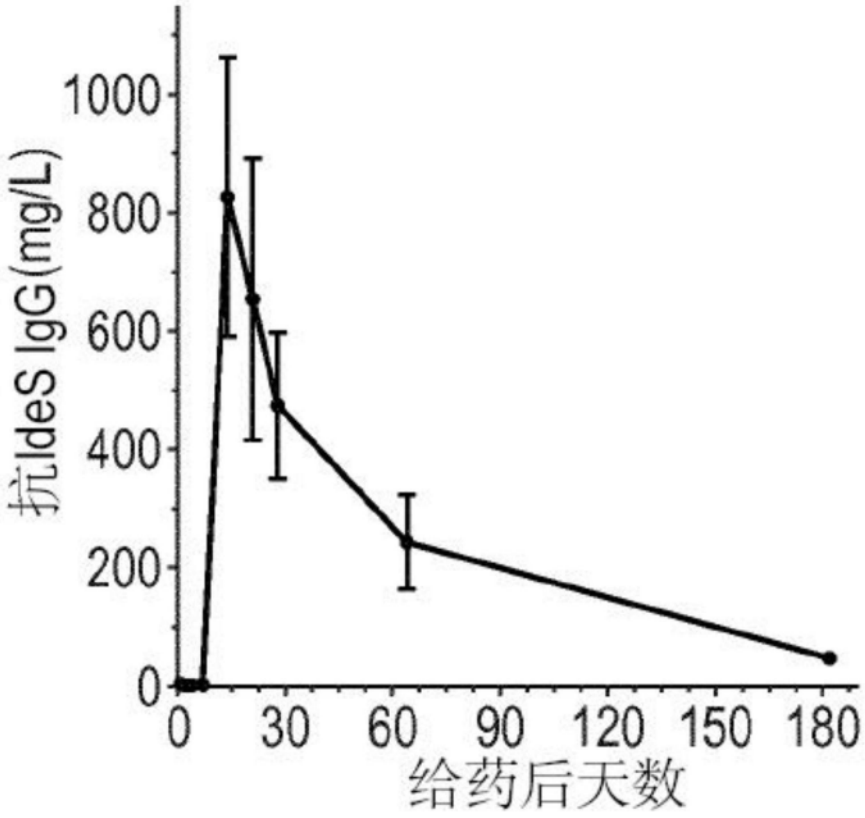


图9B

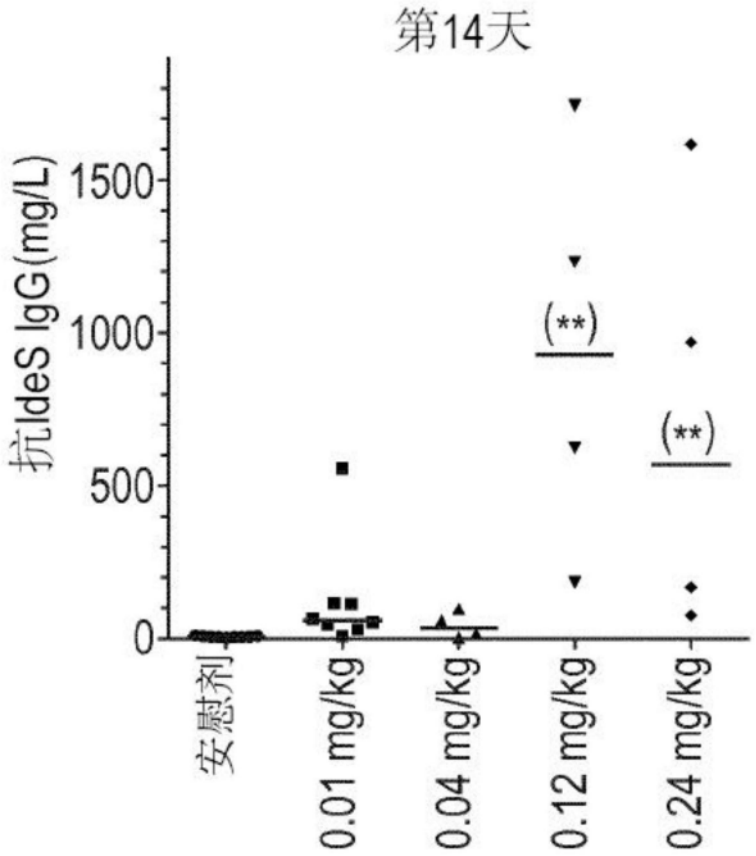

第14天
抗IdeS IgG(mg/L)
1500
1000
500
0
(**)
(**)
安慰剂
0.01 mg/kg
0.04 mg/kg
0.12 mg/kg
0.24 mg/kg

图9C

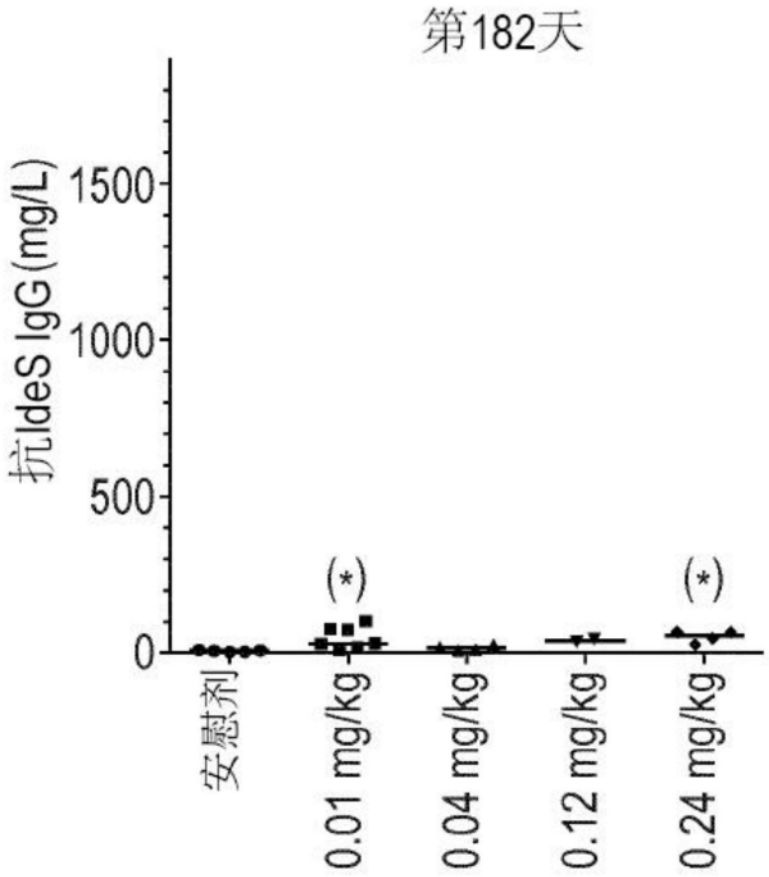

第182天
抗IdeS IgG(mg/L)
1500
1000
500
0
(*)
(*)
安慰剂
0.01 mg/kg
0.04 mg/kg
0.12 mg/kg
0.24 mg/kg

图9D

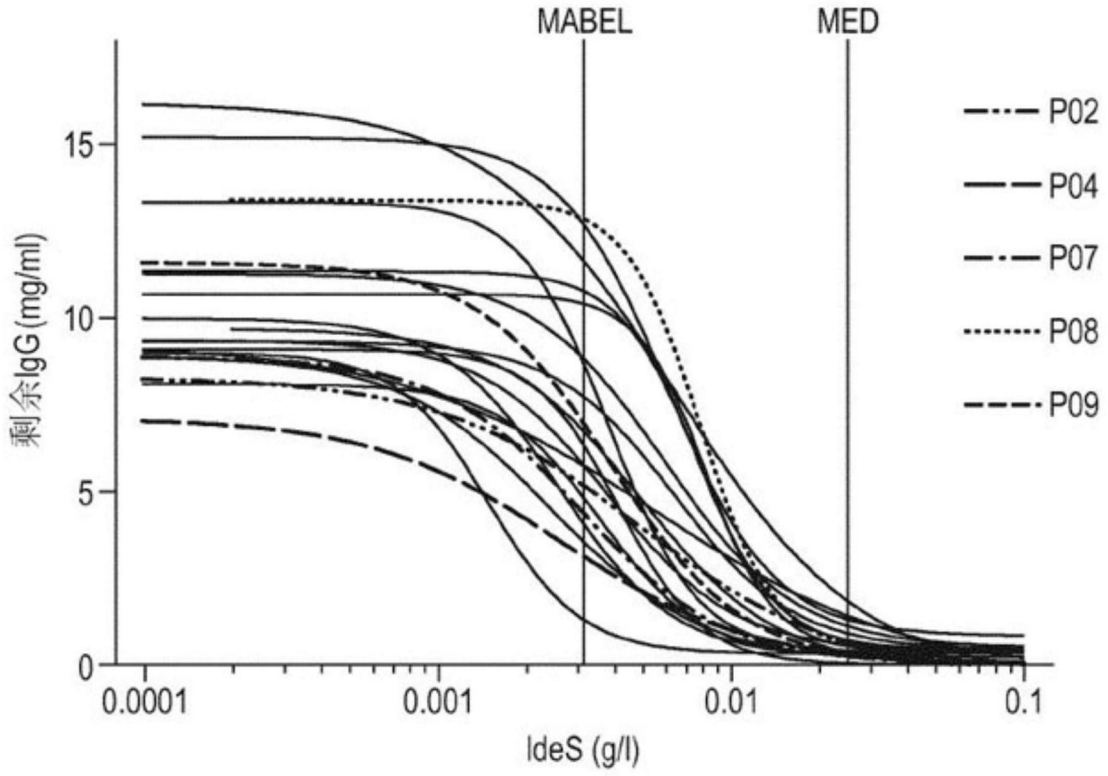

MABEL
MED
P02
P04
P07
P08
P09
剩余IgG (mg/ml)
15
10
5
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
IdeS (g/l)

图10

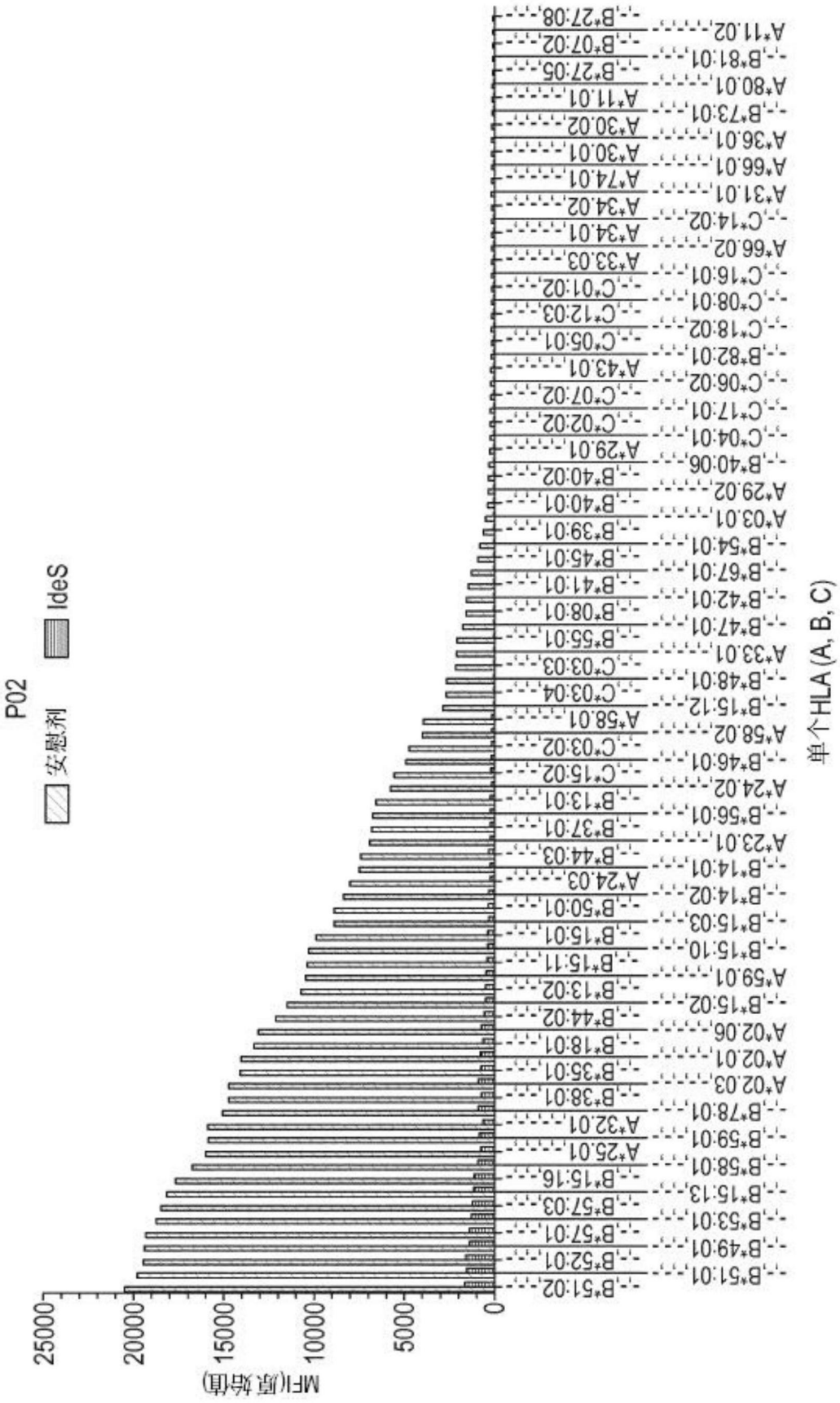

P02
安慰剂
IdeS
MFI(原始值)
25000
20000
15000
10000
5000
0
单个HLA (A, B, C)
-,-,B*51:02,-,-
-,-,B*51:01,-,-
-,-,B*52:01,-,-
-,-,B*57:01,-,-
-,-,B*57:03,-,-
-,-,B*15:16,-,-
-,-,B*58:01,-,-
-,-,B*59:01,-,-
-,-,B*78:01,-,-
-,-,B*38:01,-,-
-,-,B*35:01,-,-
-,-,B*18:01,-,-
-,-,B*44:02,-,-
-,-,B*13:02,-,-
-,-,B*15:11,-,-
-,-,B*15:01,-,-
-,-,B*50:01,-,-
-,-,B*44:03,-,-
-,-,B*37:01,-,-
-,-,B*13:01,-,-
-,-,C*15:02,-,-
-,-,C*03:02,-,-
-,-,B*46:01,-,-
-,-,B*58:01,-,-
-,-,C*03:04,-,-
-,-,B*15:12,-,-
-,-,B*48:01,-,-
-,-,C*03:03,-,-
-,-,B*55:01,-,-
-,-,B*08:01,-,-
-,-,B*41:01,-,-
-,-,B*45:01,-,-
-,-,B*39:01,-,-
-,-,B*40:01,-,-
-,-,B*40:02,-,-
-,-,A*29:01,-,-
-,-,C*04:01,-,-
-,-,C*02:02,-,-
-,-,C*17:01,-,-
-,-,C*07:02,-,-
-,-,A*43:01,-,-
-,-,C*05:01,-,-
-,-,C*12:03,-,-
-,-,C*08:01,-,-
-,-,C*01:02,-,-
-,-,C*16:01,-,-
-,-,A*33:03,-,-
-,-,A*34:01,-,-
-,-,A*34:02,-,-
-,-,A*74:01,-,-
-,-,A*30:01,-,-
-,-,A*30:02,-,-
-,-,A*11:01,-,-
-,-,B*27:05,-,-
-,-,B*07:02,-,-
-,-,B*27:08,-,-

图11

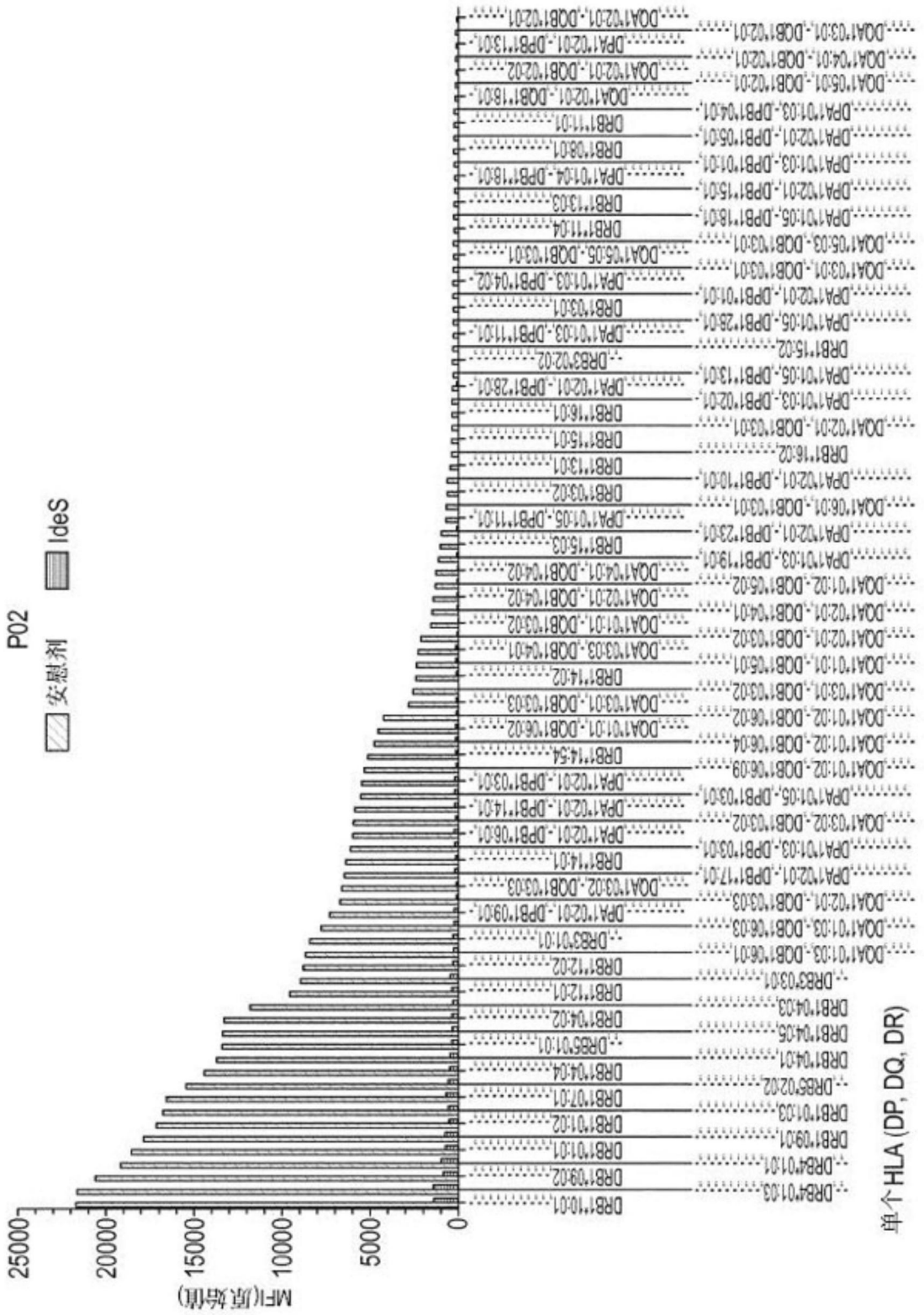

P02
安慰剂
IdeS
MFI(原始值)
25000
20000
15000
10000
5000
0
单个HLA (DP, DQ, DR)

图11(续)

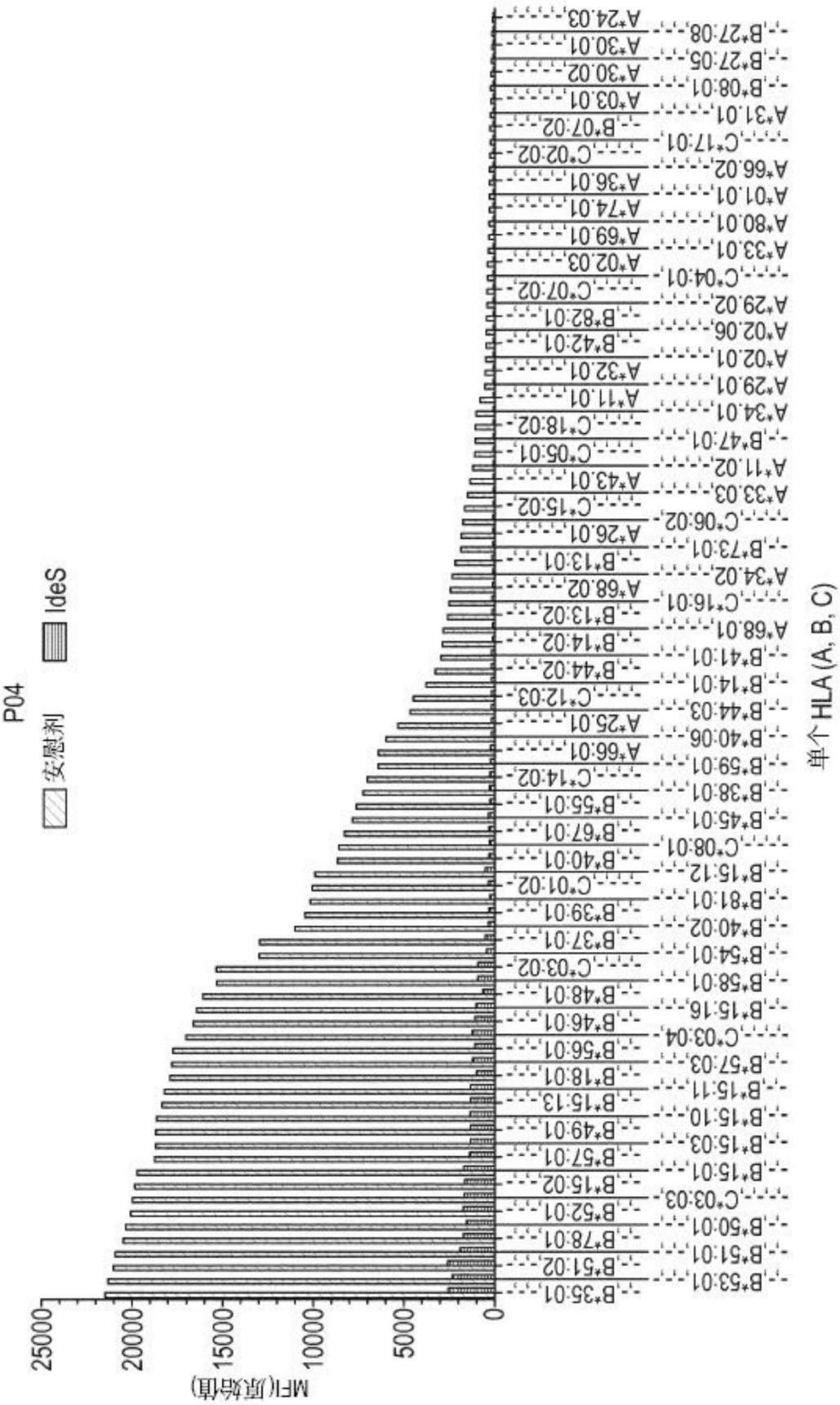


图12

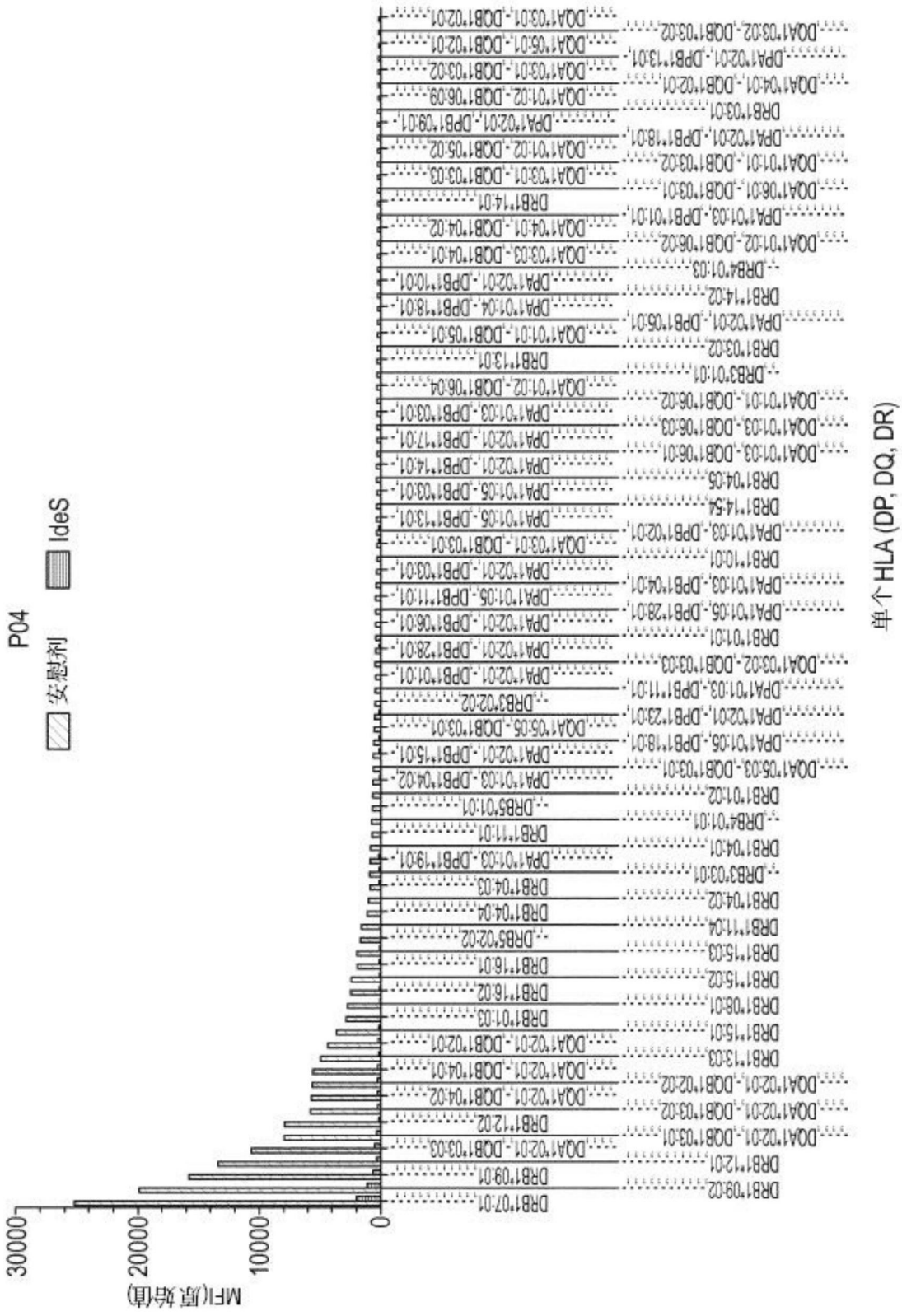


图12(续)

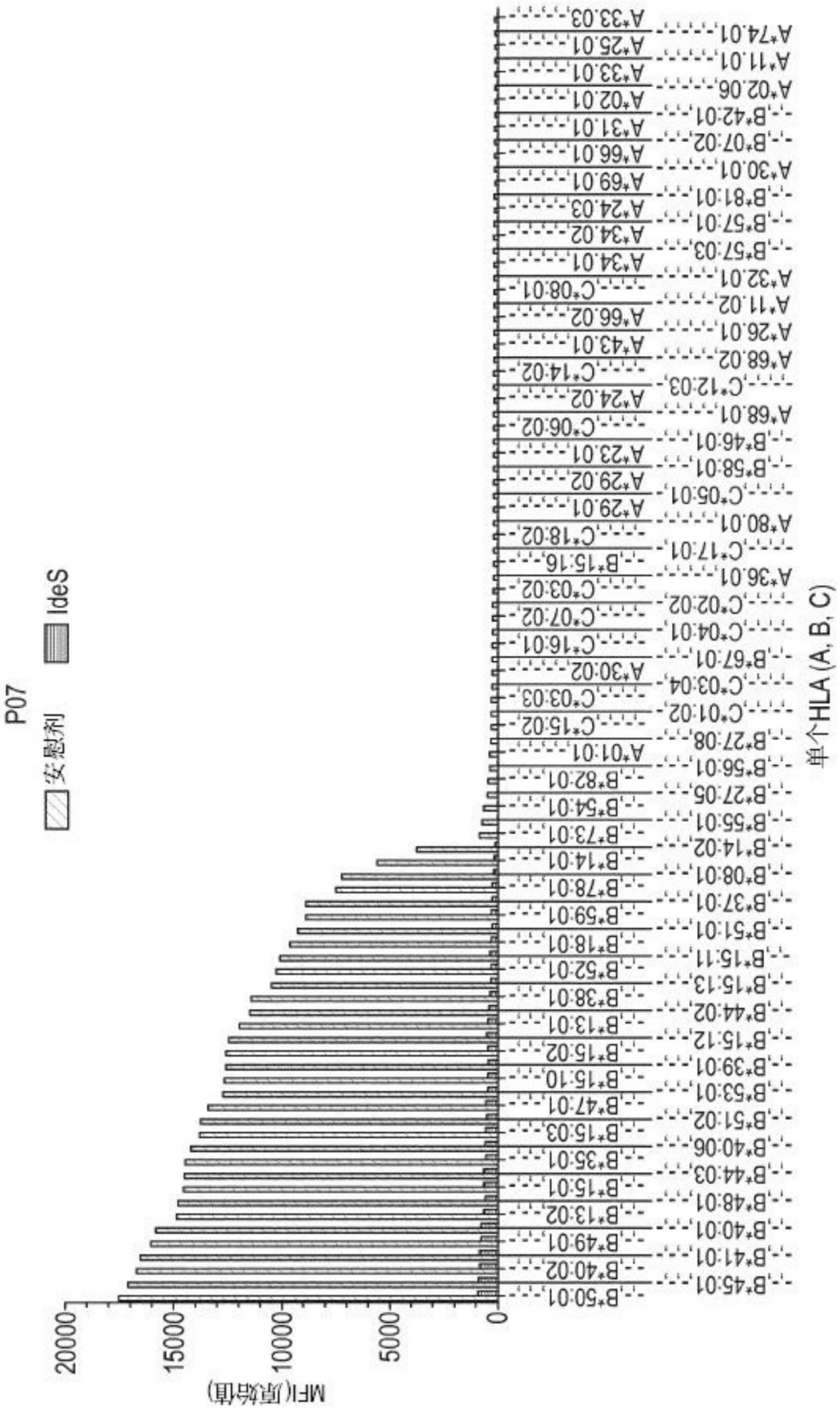


图13

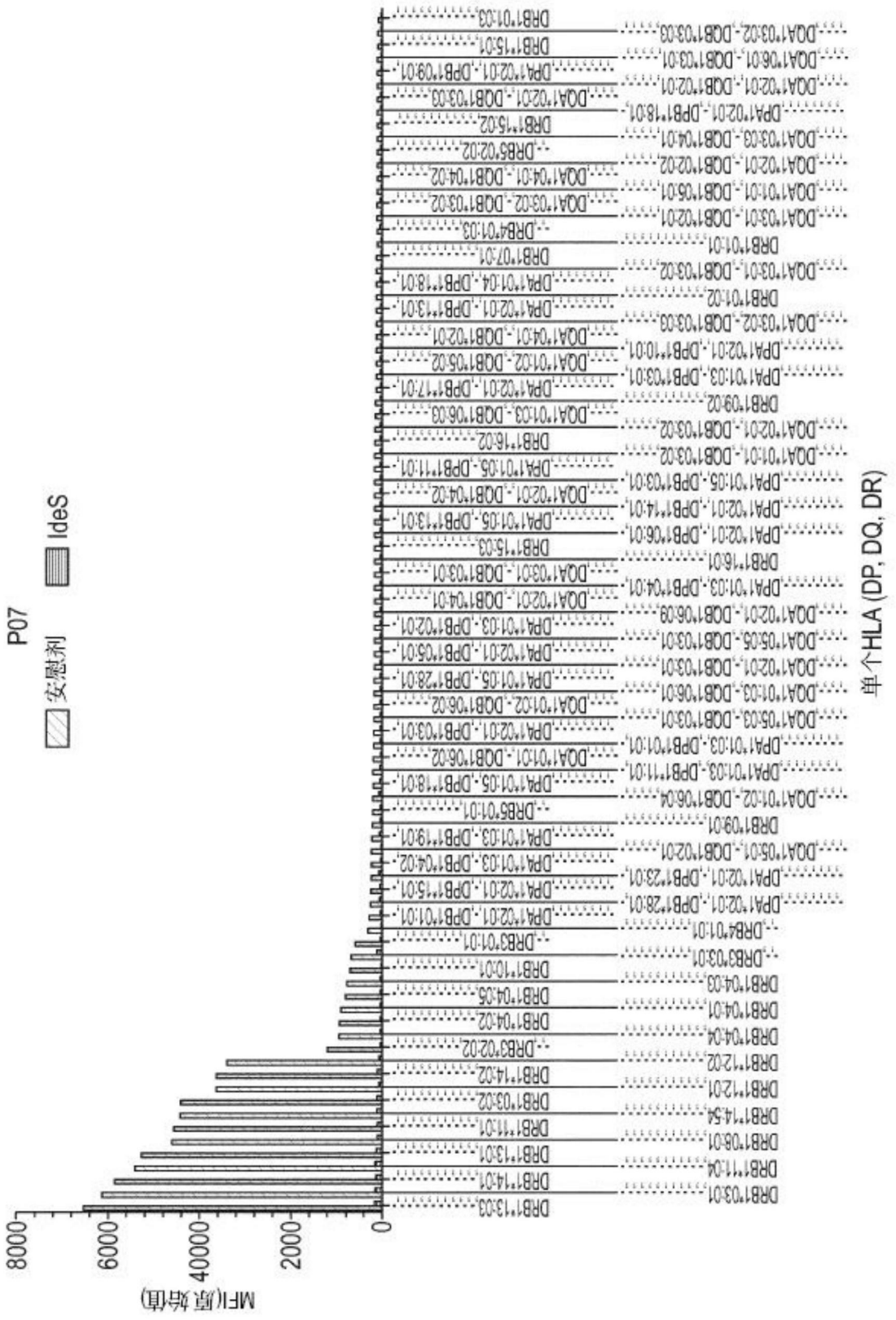


图13(续)

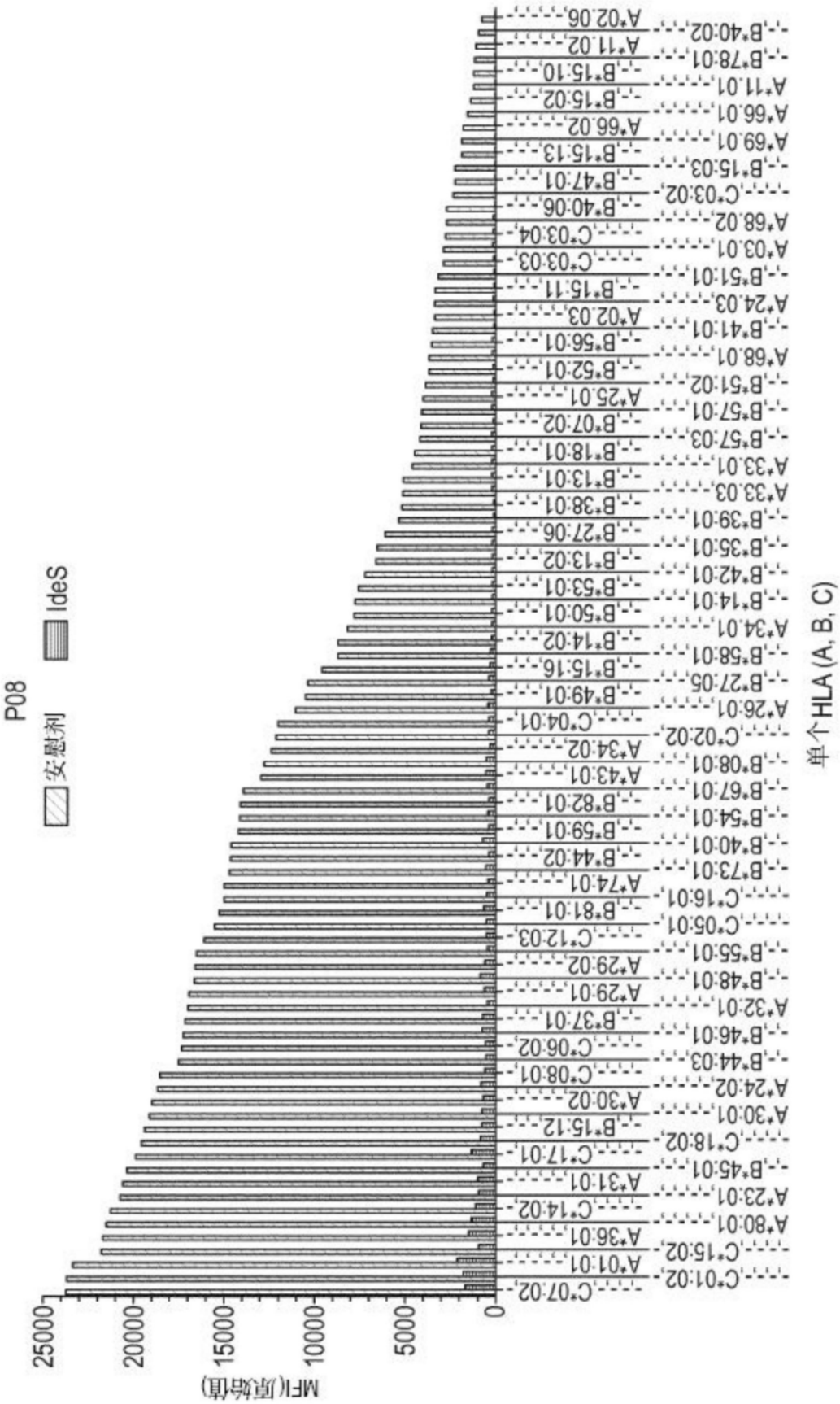


图14

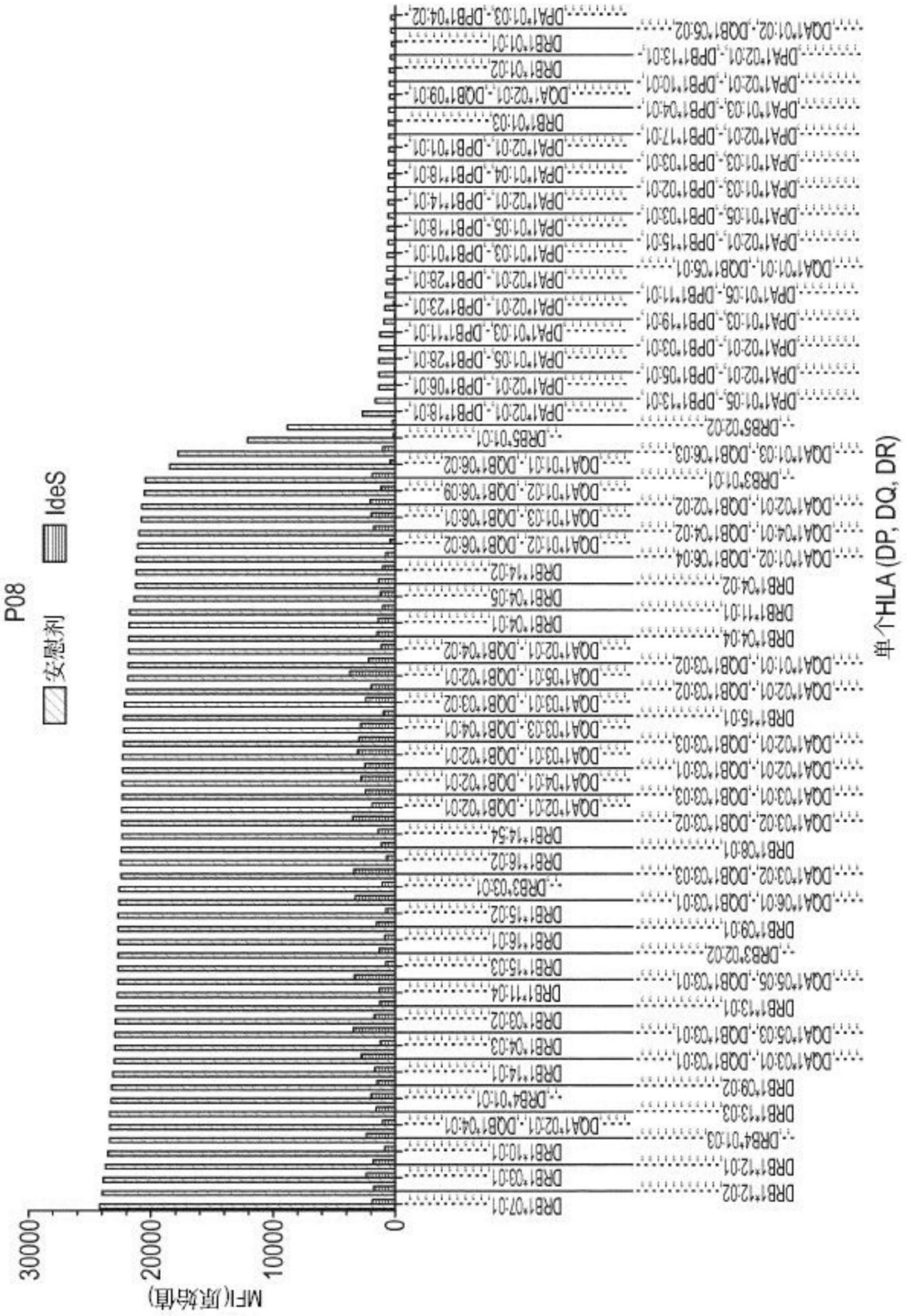


图14(续)

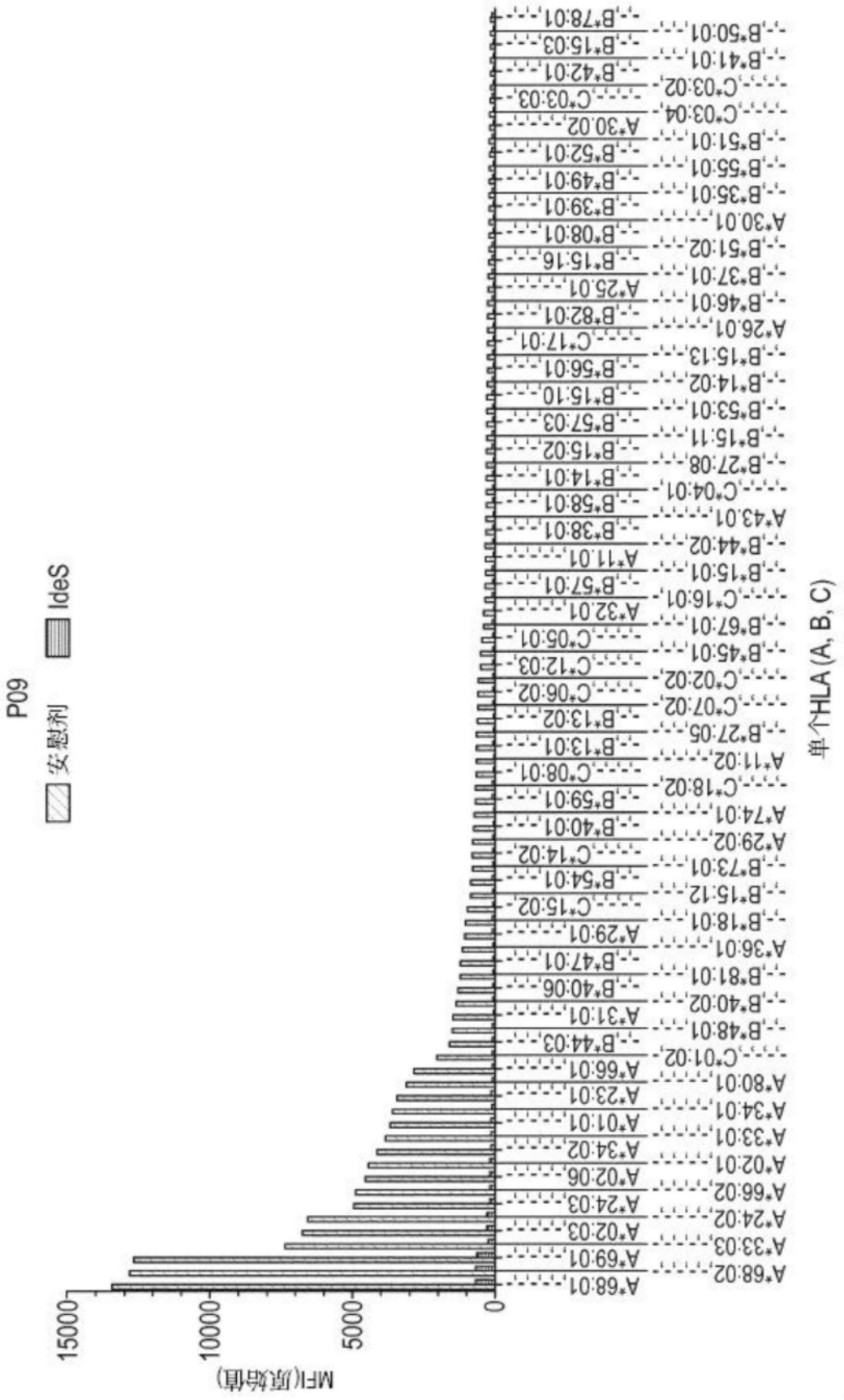

P09
安慰剂
IdeS
MFI(原始值)
15000
10000
5000
0
单个HLA(A, B, C)
A*68:01
A*68:02
A*69:01
A*33:03
A*02:03
A*24:02
A*24:03
A*66:02
A*02:06
A*02:01
A*34:02
A*33:01
A*01:01
A*34:01
A*23:01
A*80:01
A*66:01
B*44:03
C*01:02
B*48:01
A*31:01
B*40:02
B*40:06
B*81:01
A*36:01
A*29:01
B*47:01
B*18:01
C*15:02
B*15:12
B*54:01
B*73:01
C*14:02
A*29:02
B*40:01
A*74:01
B*59:01
C*18:02
C*08:01
B*13:01
A*11:02
B*27:05
B*13:02
C*07:02
C*06:02
C*02:02
C*12:03
C*05:01
B*45:01
B*67:01
A*32:01
C*16:01
B*57:01
B*15:01
A*11:01
B*44:02
B*38:01
A*43:01
B*58:01
B*14:01
C*04:01
B*27:08
B*15:02
B*57:03
B*15:11
B*53:01
B*15:10
B*14:02
B*56:01
B*15:13
C*17:01
A*26:01
B*82:01
B*46:01
A*25:01
B*37:01
B*15:16
B*51:02
B*08:01
A*30:01
B*39:01
B*35:01
B*49:01
B*55:01
B*52:01
B*51:01
A*30:02
C*03:04
C*03:03
C*03:02
B*42:01
B*15:03
B*41:01
B*50:01
B*78:01

图15

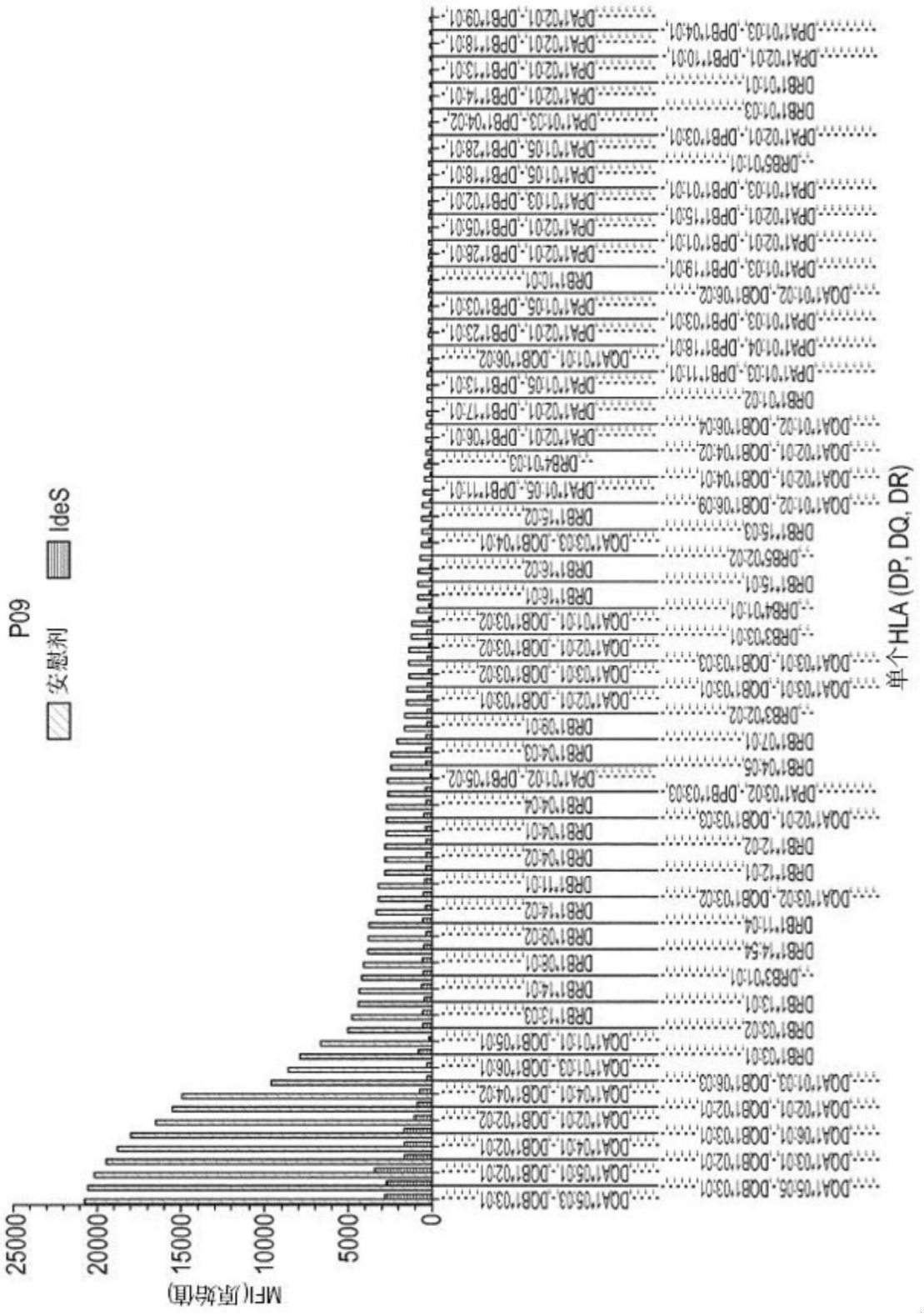

P09
安慰剂
IdeS
MFI(原始值)
25000
20000
15000
10000
5000
0
单个HLA (DP, DQ, DR)

图15(续)

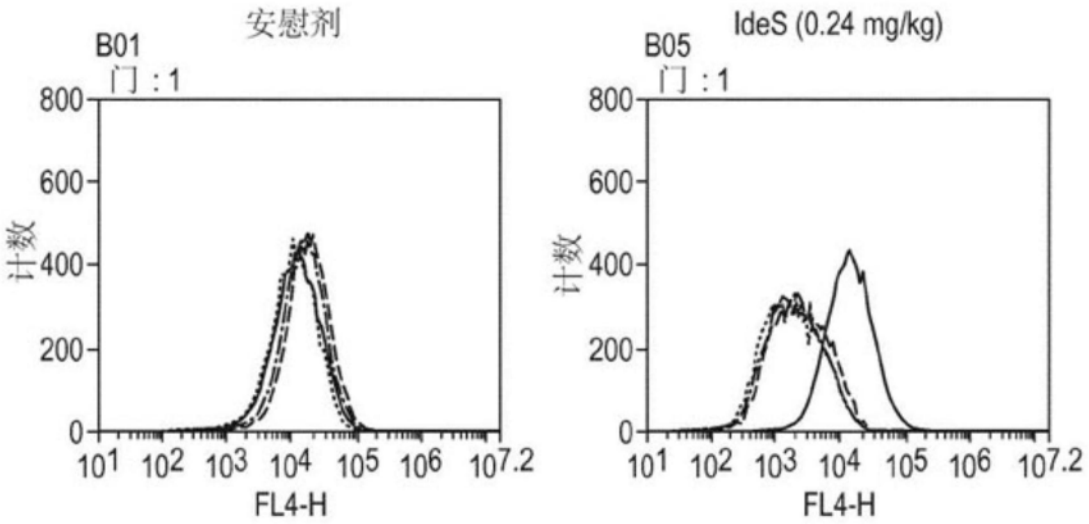

安慰剂
B01
门 : 1
800
600
400
200
0
计数
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 $10^{7.2}$
FL4-H
IdeS (0.24 mg/kg)
B05
门 : 1
800
600
400
200
0
计数
10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 $10^{7.2}$
FL4-H

图16

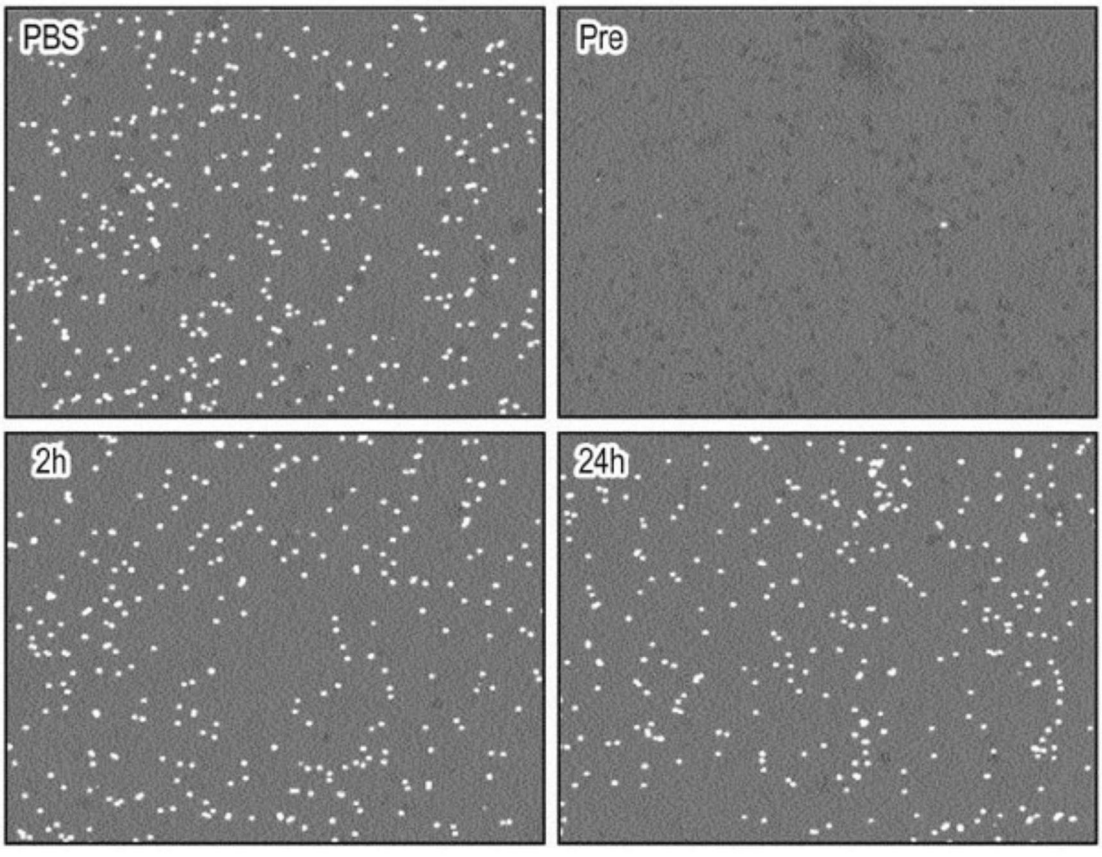

PBS
Pre
2h
24h

图17

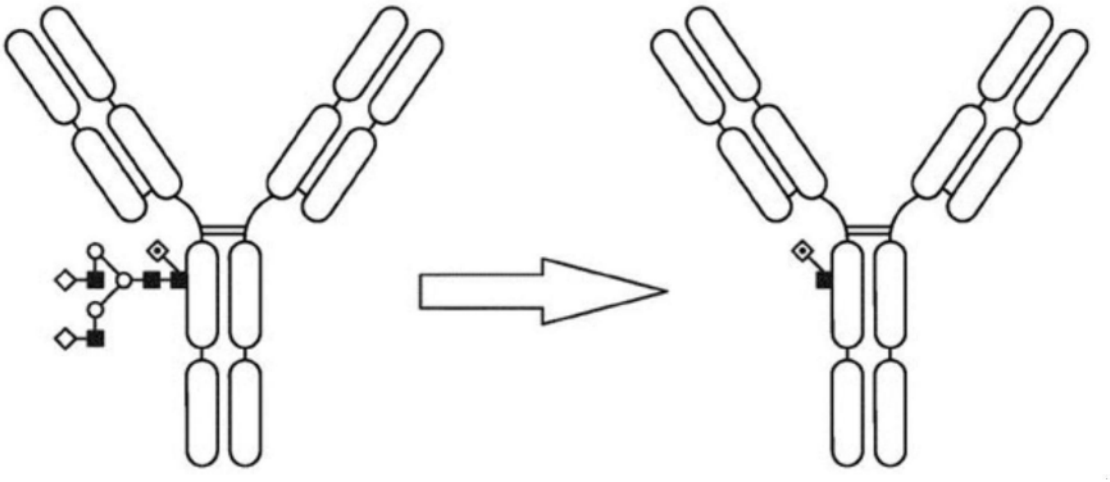


图18

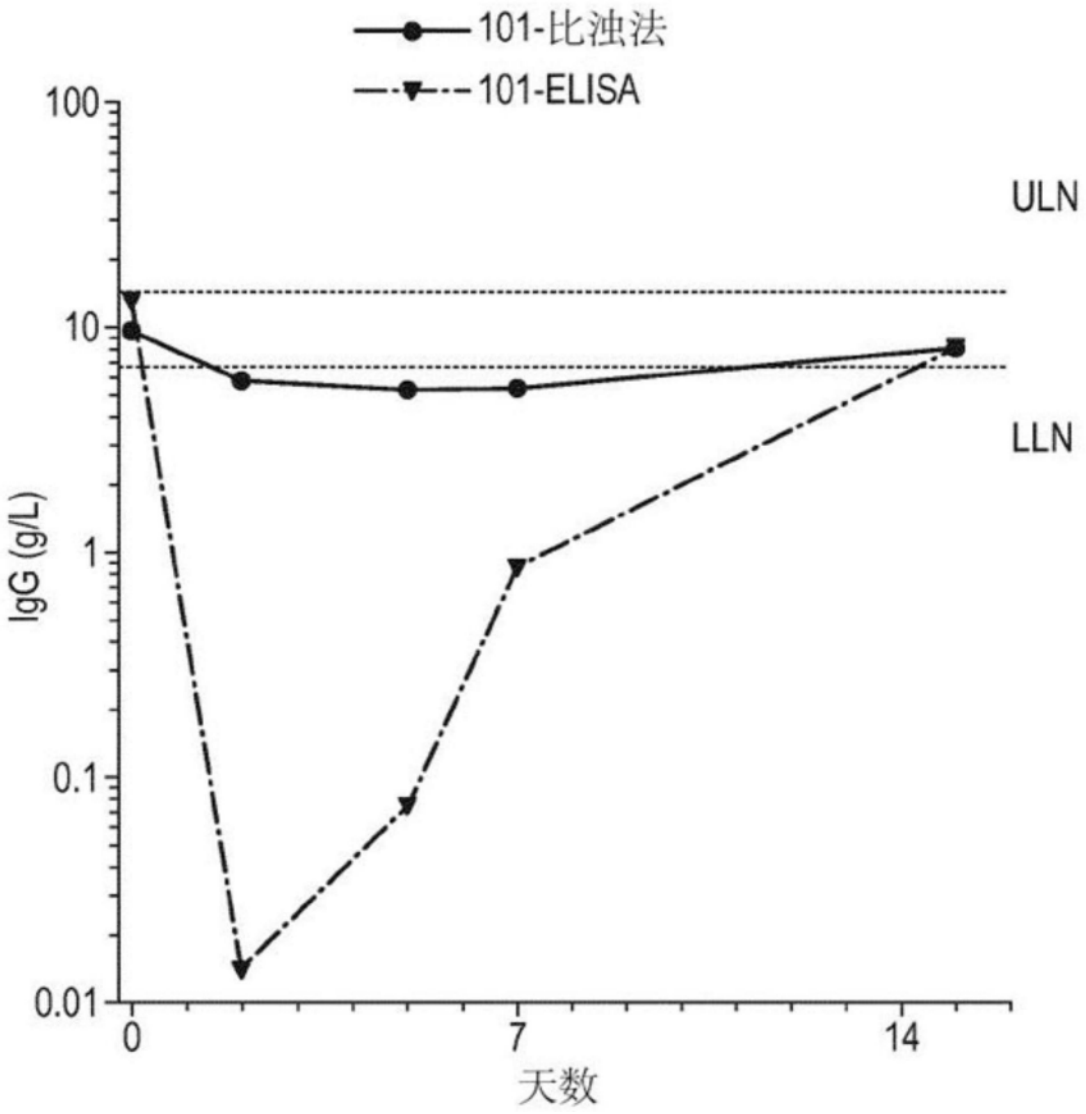


图19

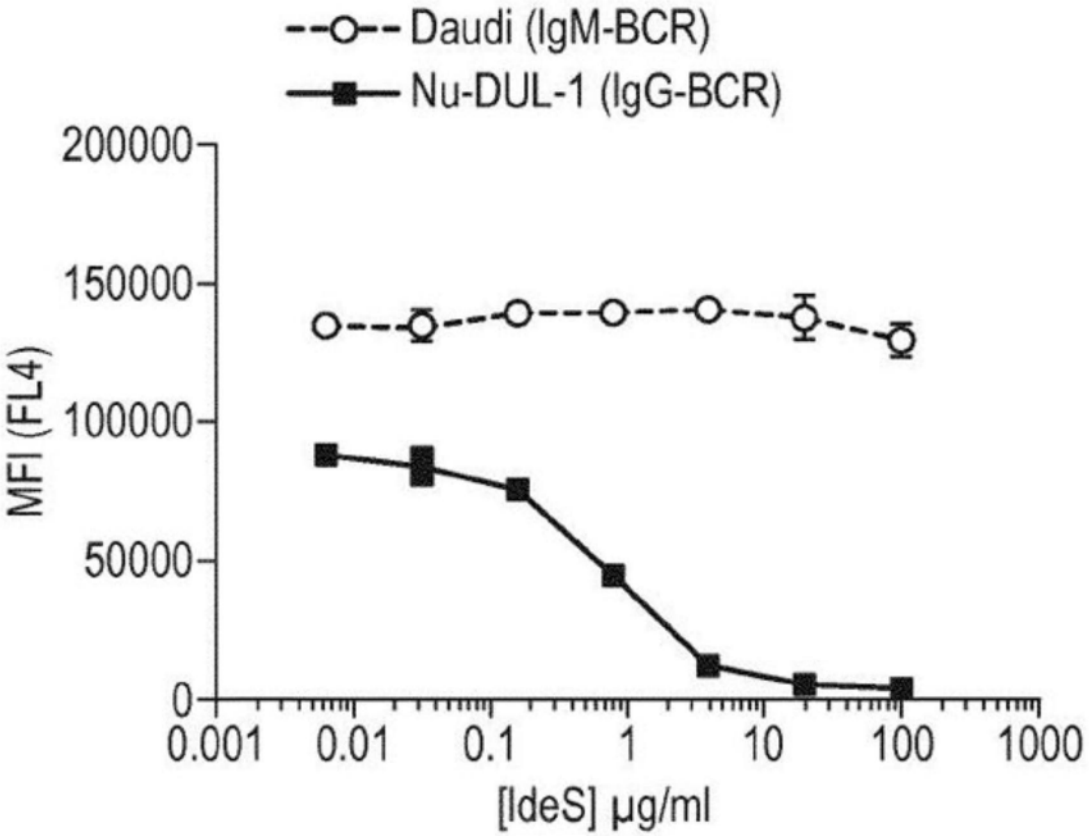

Daudi (IgM-BCR)
Nu-DUL-1 (IgG-BCR)
200000
150000
100000
50000
0
MFI (FL4)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[IdeS] µg/ml

图20A

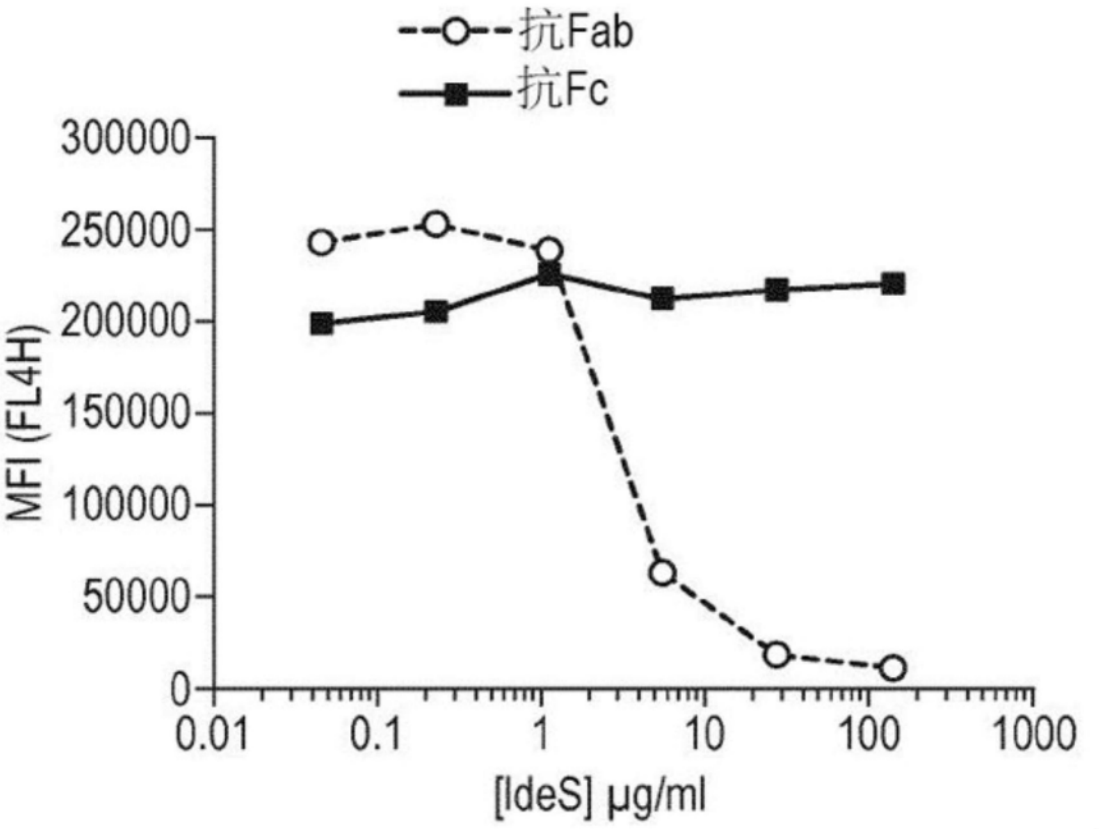

抗Fab
抗Fc
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
MFI (FL4H)
0.01
0.1
1
10
100
1000
[IdeS] μg/ml

图20B

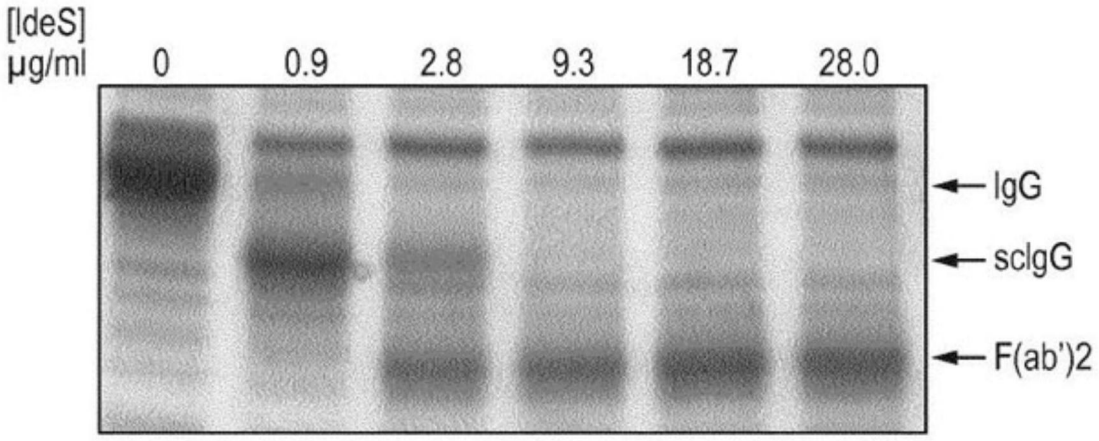

[IdeS]
μg/ml
0
0.9
2.8
9.3
18.7
28.0
IgG
scIgG
F(ab')2

图21A

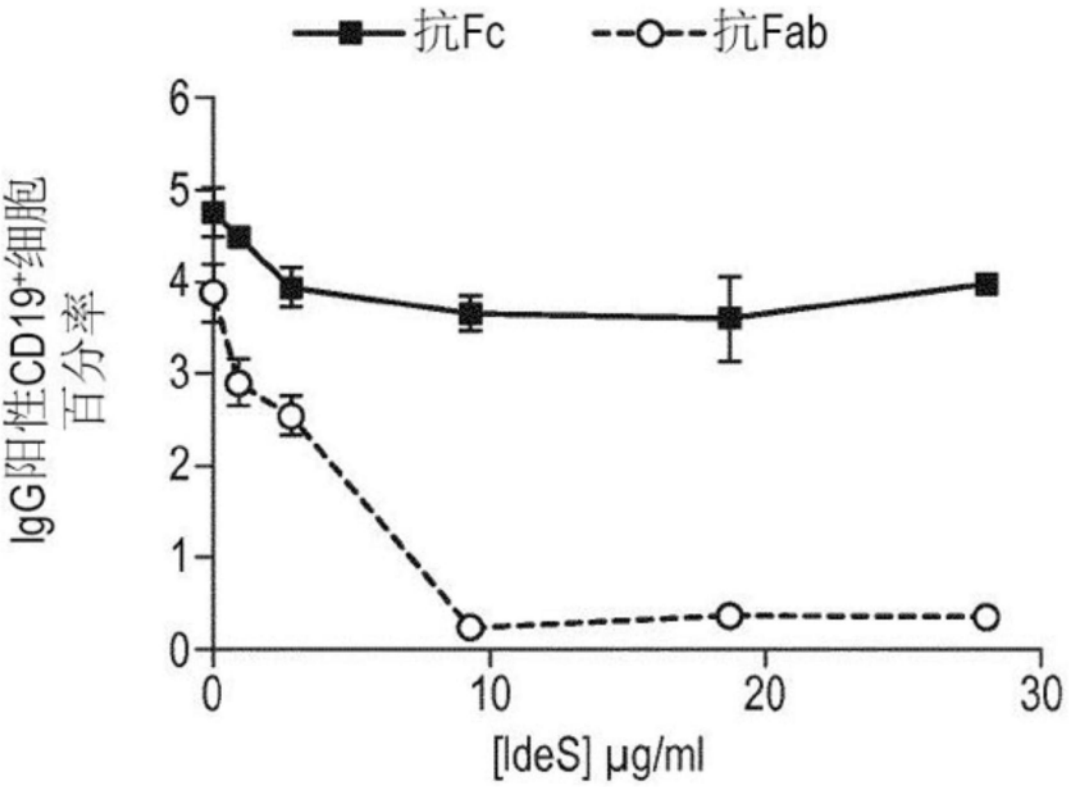


图21B

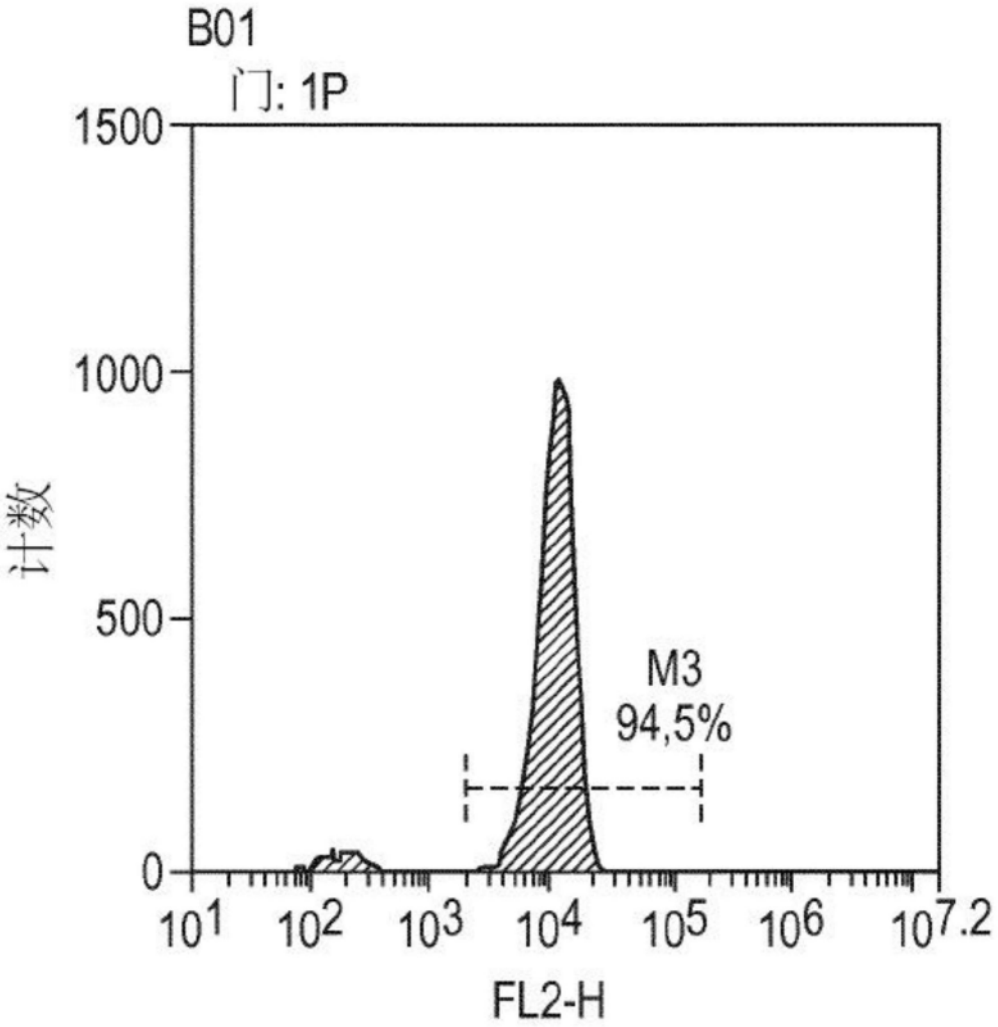

B01
门: 1P
1500
1000
500
0
计数
M3
94,5%
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5
10^6
10^7.2
FL2-H

图22A

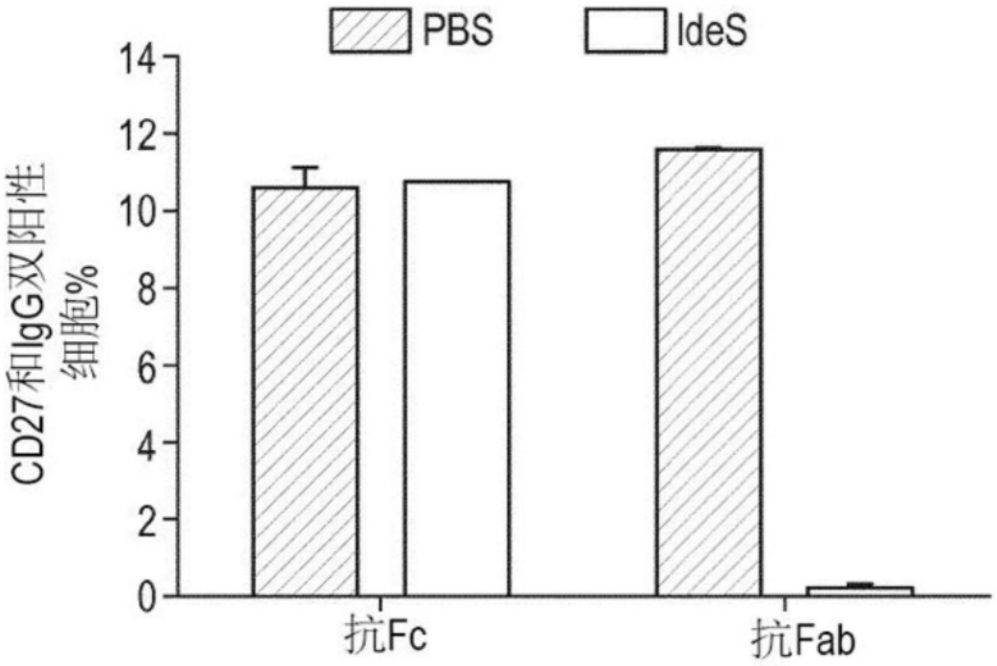

PBS
IdeS
CD27和IgG双阳性细胞%
14
12
10
8
6
4
2
0
抗Fc
抗Fab

图22B

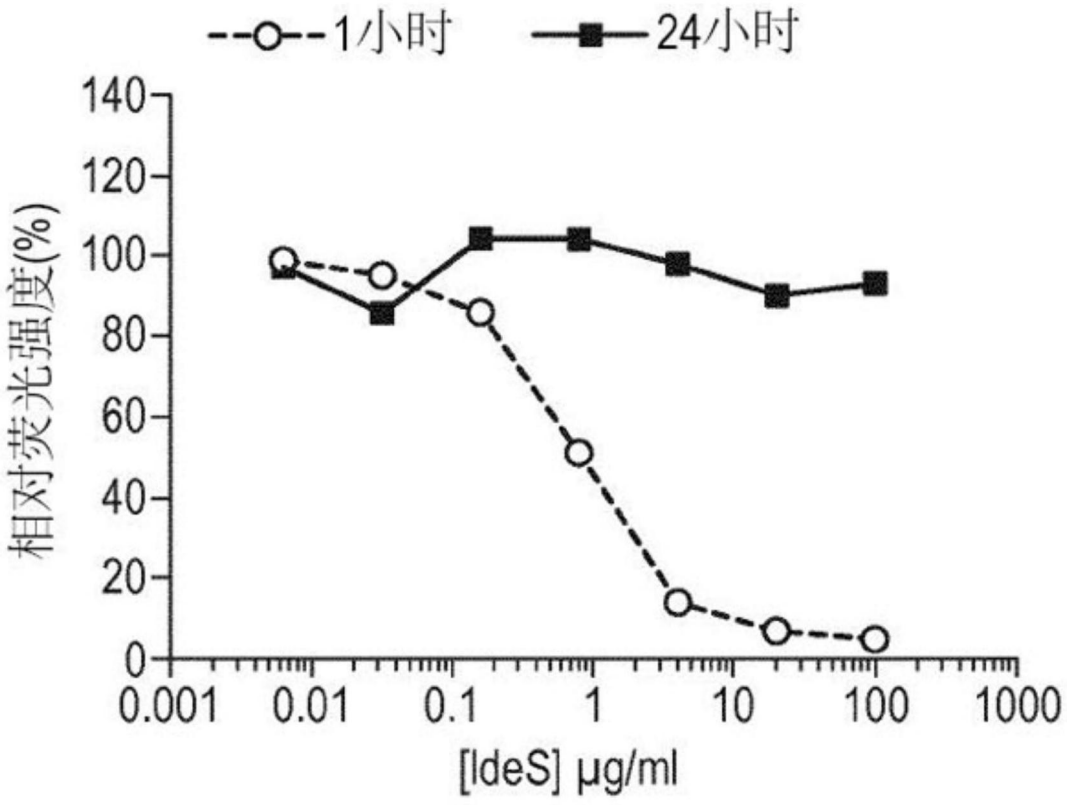

1小时
24小时
相对荧光强度(%)
140
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[IdeS] μg/ml

图23A

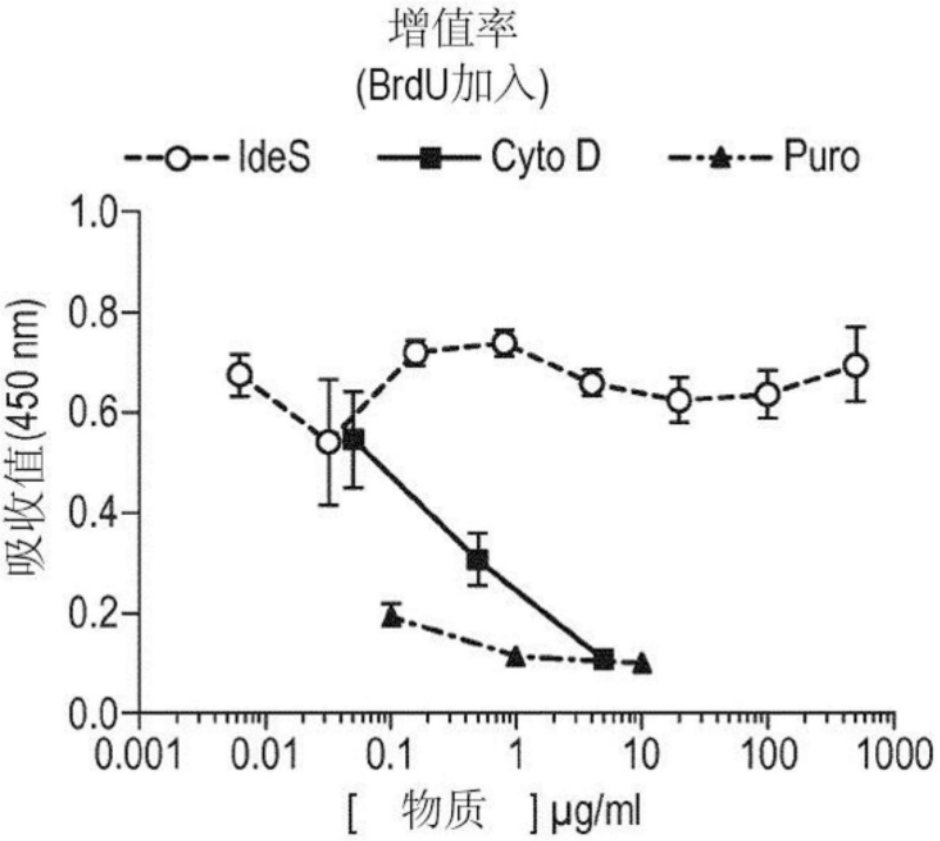

增值率
(BrdU加入)
IdeS
Cyto D
Puro
吸收值(450 nm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
[物质] μg/ml

图23B

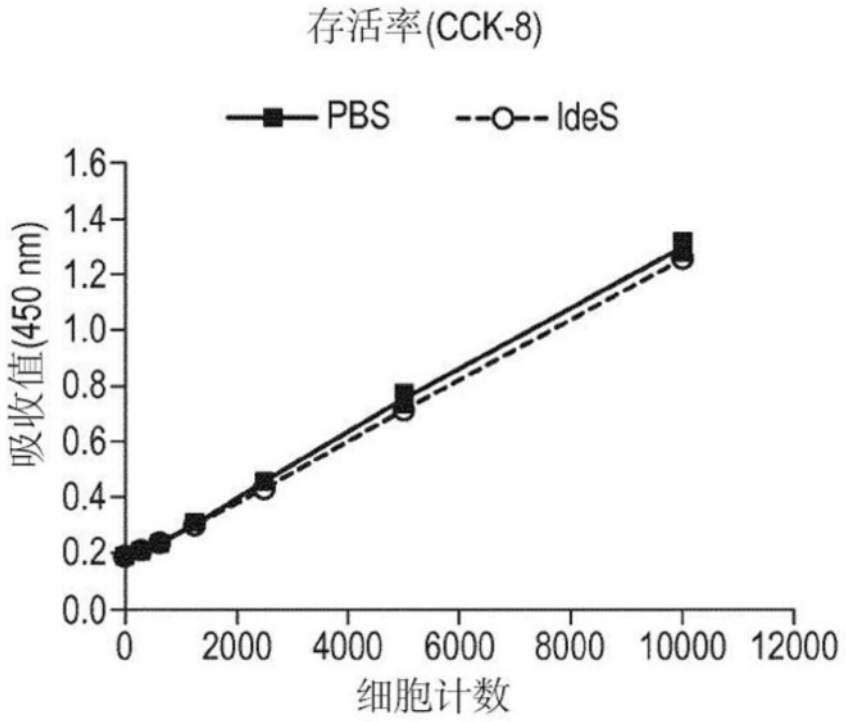

存活率(CCK-8)
PBS
IdeS
吸收值(450 nm)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
细胞计数

图23C

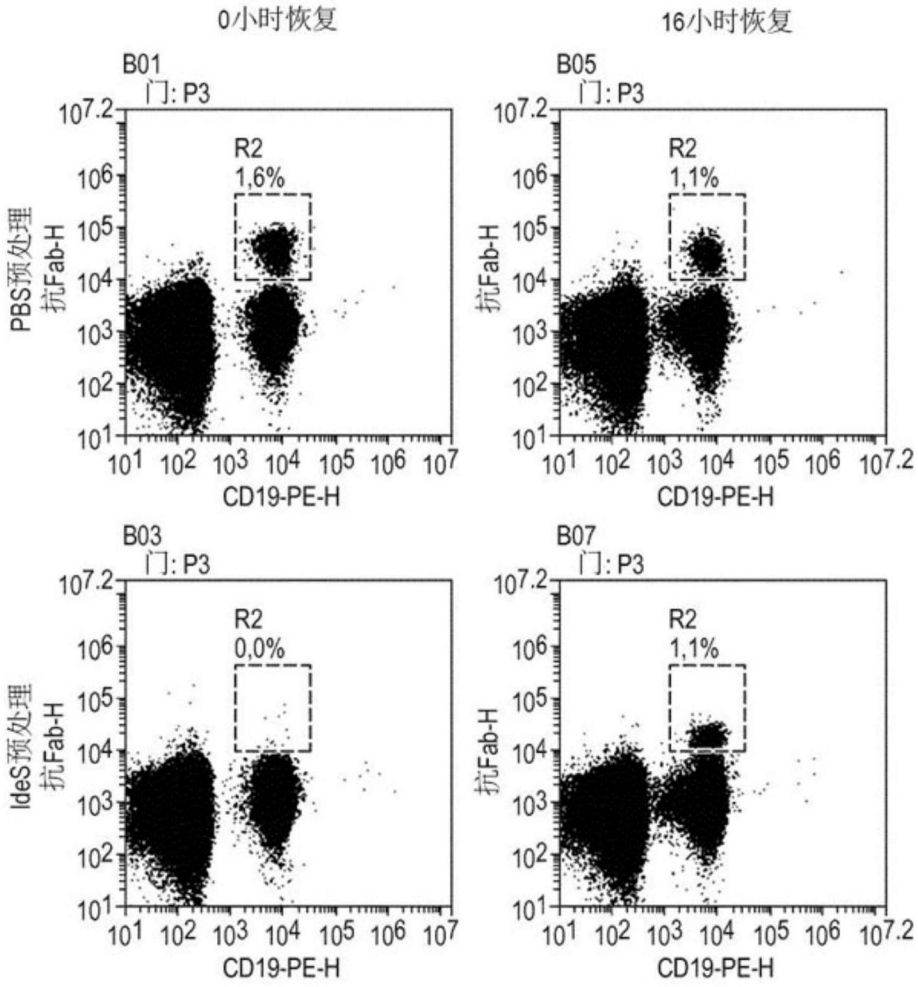

0小时恢复
16小时恢复
B01
门: P3
R2
1,6%
B05
门: P3
R2
1,1%
B03
门: P3
R2
0,0%
B07
门: P3
R2
1,1%
PBS预处理
IdeS预处理
抗Fab-H
CD19-PE-H

图24A

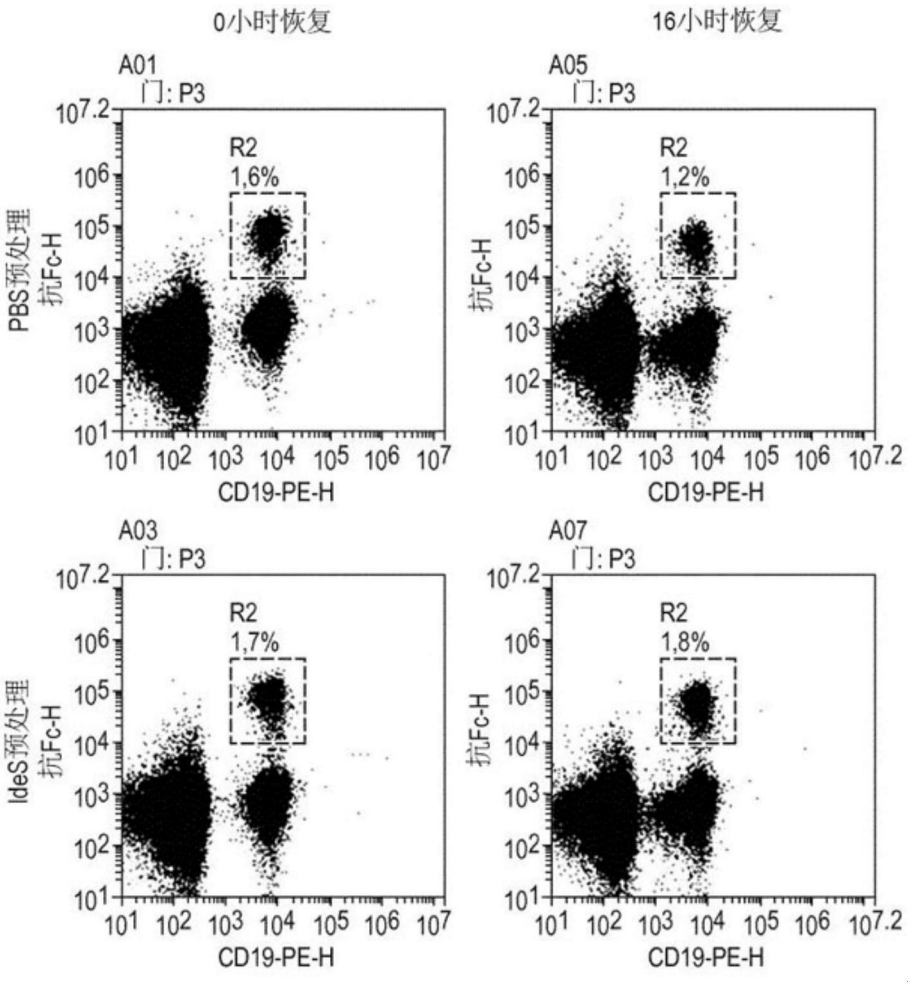

0小时恢复
16小时恢复
A01
门: P3
R2
1,6%
A05
门: P3
R2
1,2%
A03
门: P3
R2
1,7%
A07
门: P3
R2
1,8%
PBS预处理
IdeS预处理
抗Fc-H
CD19-PE-H

图24B

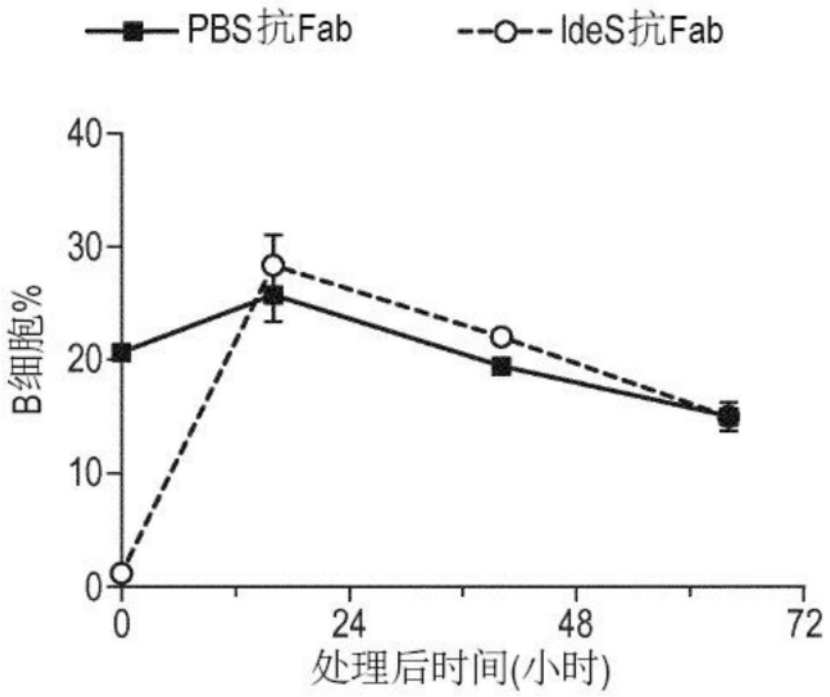

PBS抗Fab
IdeS抗Fab
B细胞%
40
30
20
10
0
0
24
48
72
处理后时间(小时)

图25A

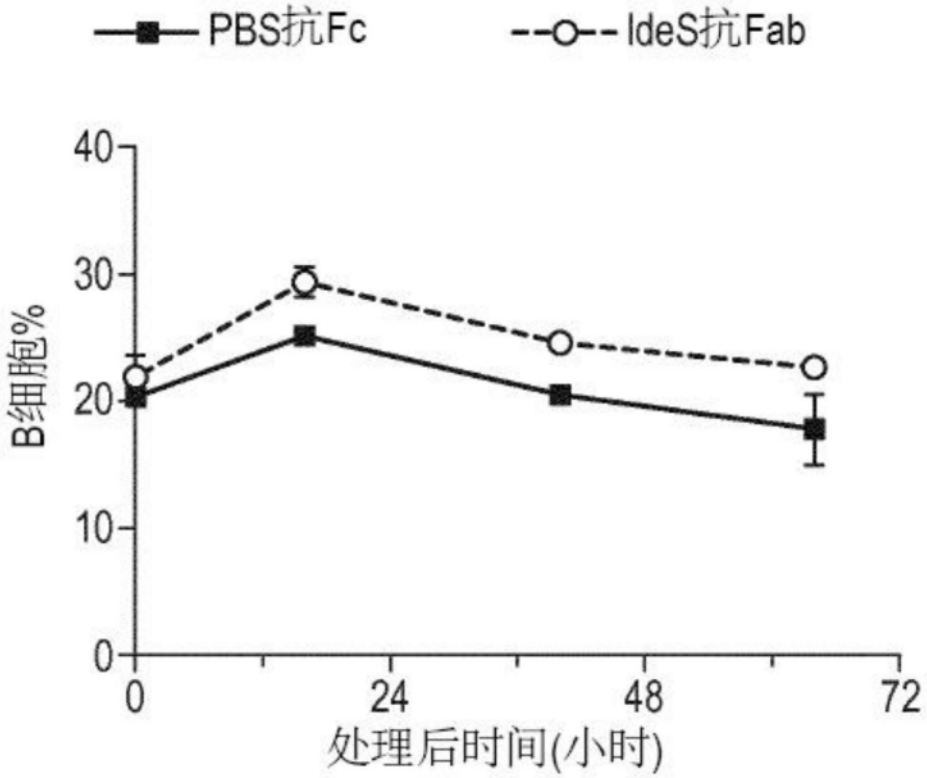

PBS抗Fc
IdeS抗Fab
B细胞%
40
30
20
10
0
0
24
48
72
处理后时间(小时)

图25B

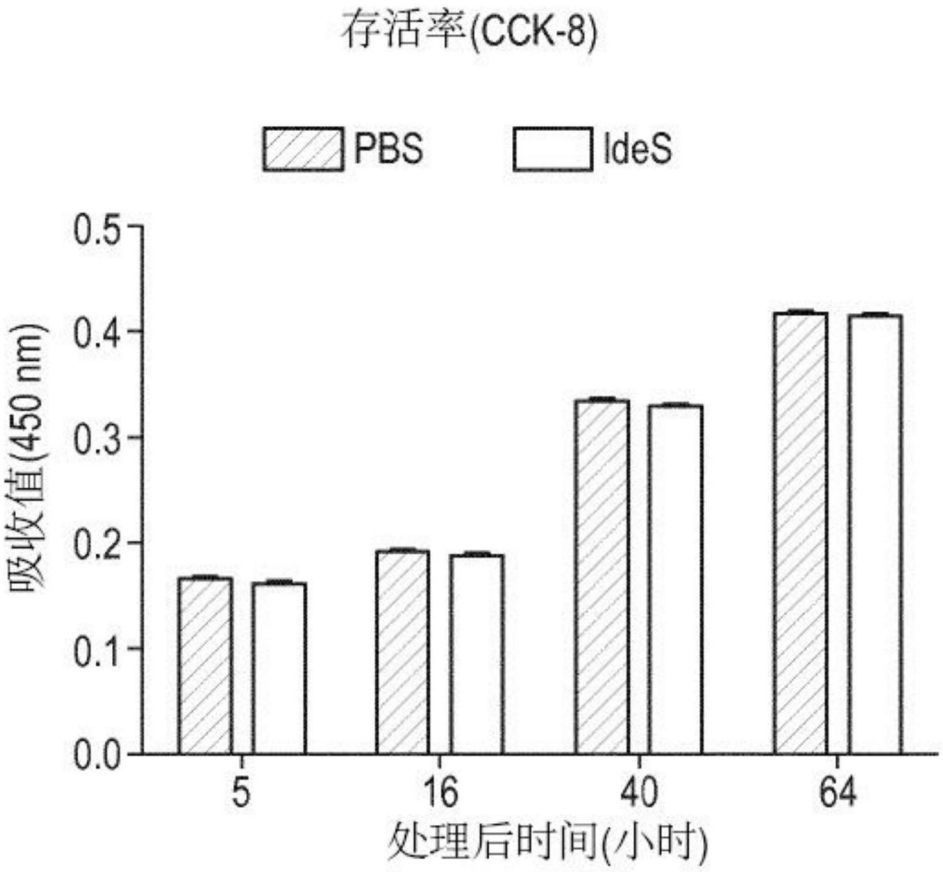


图26

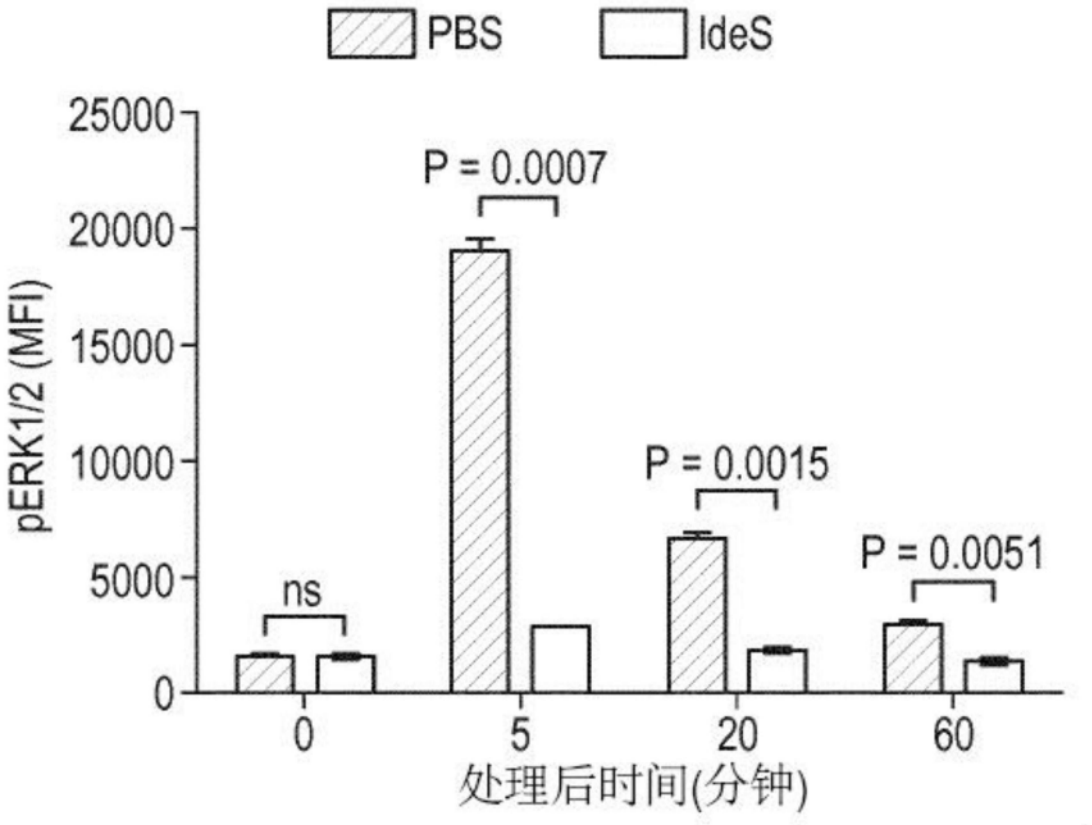

PBS
IdeS
25000
20000
15000
10000
5000
0
pERK1/2 (MFI)
P = 0.0007
P = 0.0015
P = 0.0051
ns
0
5
20
60
处理后时间(分钟)

图27A

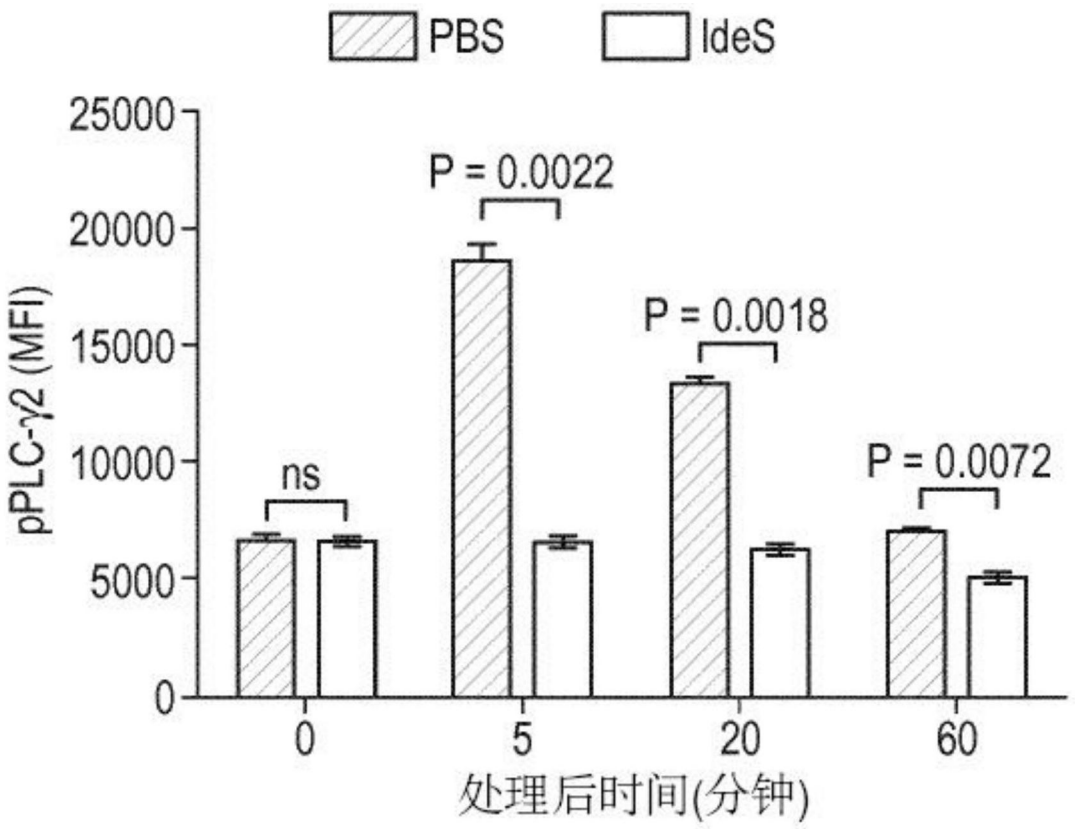

PBS
IdeS
25000
20000
15000
10000
5000
0
pPLC-γ2 (MFI)
P = 0.0022
P = 0.0018
P = 0.0072
ns
0
5
20
60
处理后时间(分钟)

图27B

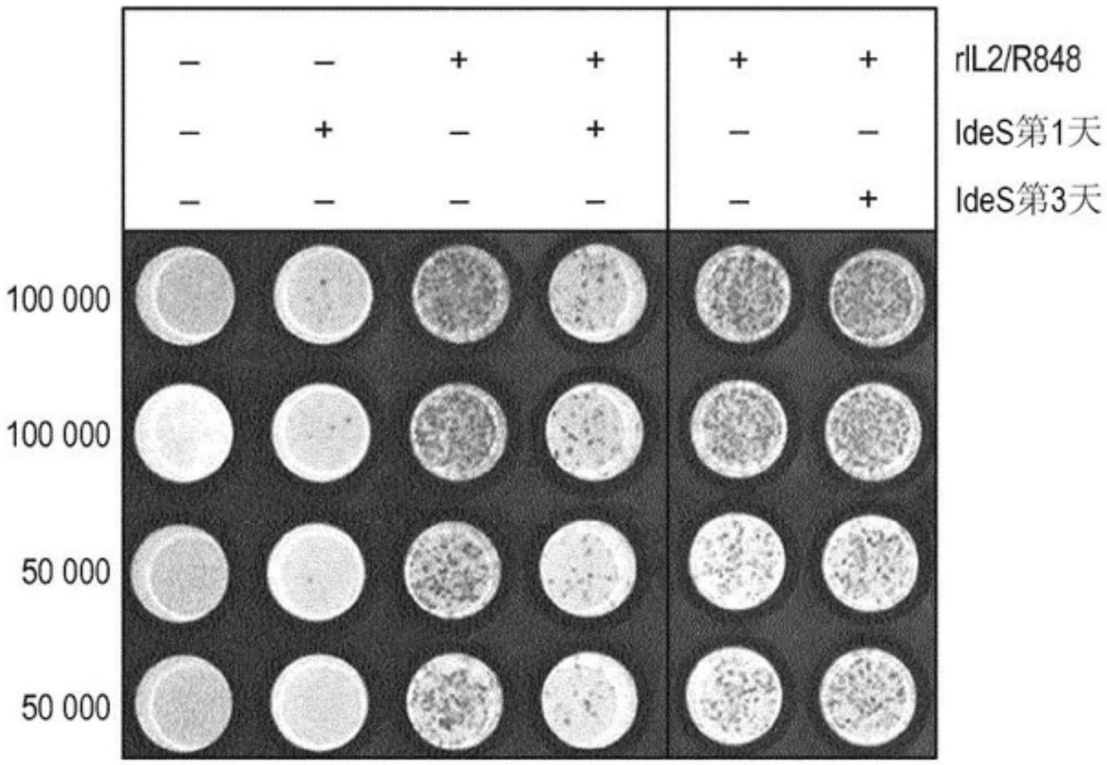

rIL2/R848
IdeS第1天
IdeS第3天
100 000
100 000
50 000
50 000

图28A

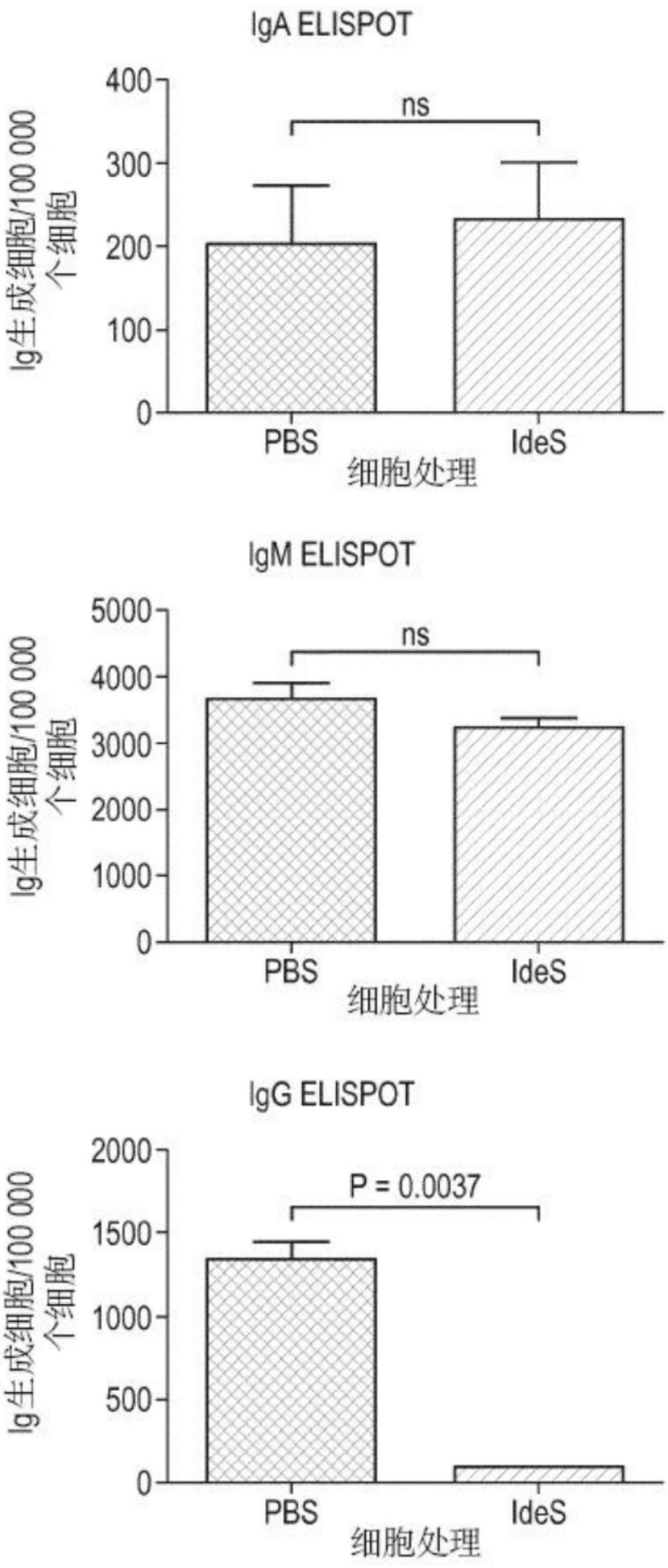

IgA ELISPOT
Ig生成细胞/100 000个细胞
400
300
200
100
0
ns
PBS
IdeS
细胞处理
IgM ELISPOT
Ig生成细胞/100 000个细胞
5000
4000
3000
2000
1000
0
ns
PBS
IdeS
细胞处理
IgG ELISPOT
Ig生成细胞/100 000个细胞
2000
1500
1000
500
0
P = 0.0037
PBS
IdeS
细胞处理

图28B

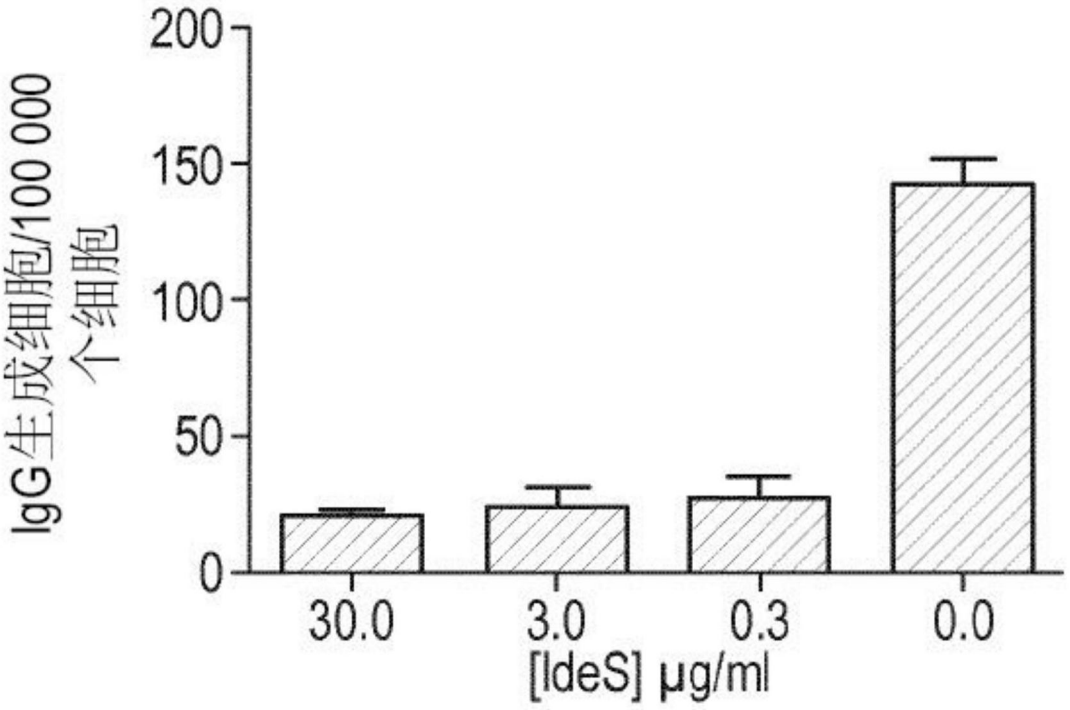

IgG生成细胞/100 000个细胞
200
150
100
50
0
30.0
3.0
0.3
0.0
[IdeS] µg/ml

图28C

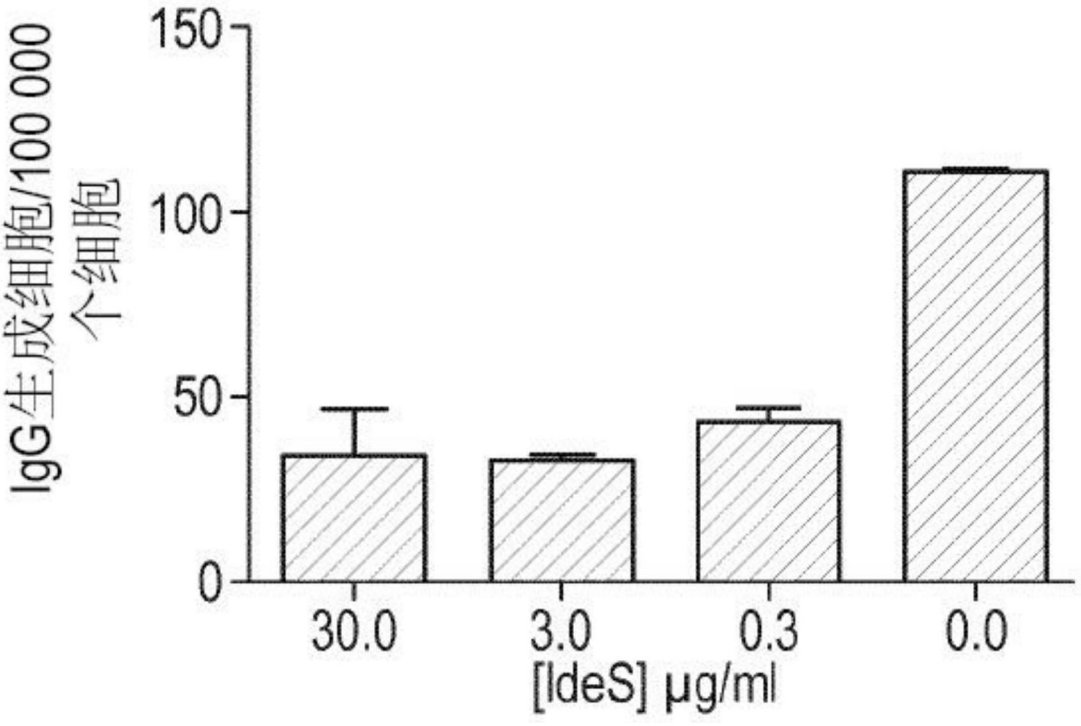

IgG生成细胞/100 000个细胞
150
100
50
0
30.0
3.0
0.3
0.0
[IdeS] µg/ml

图28D

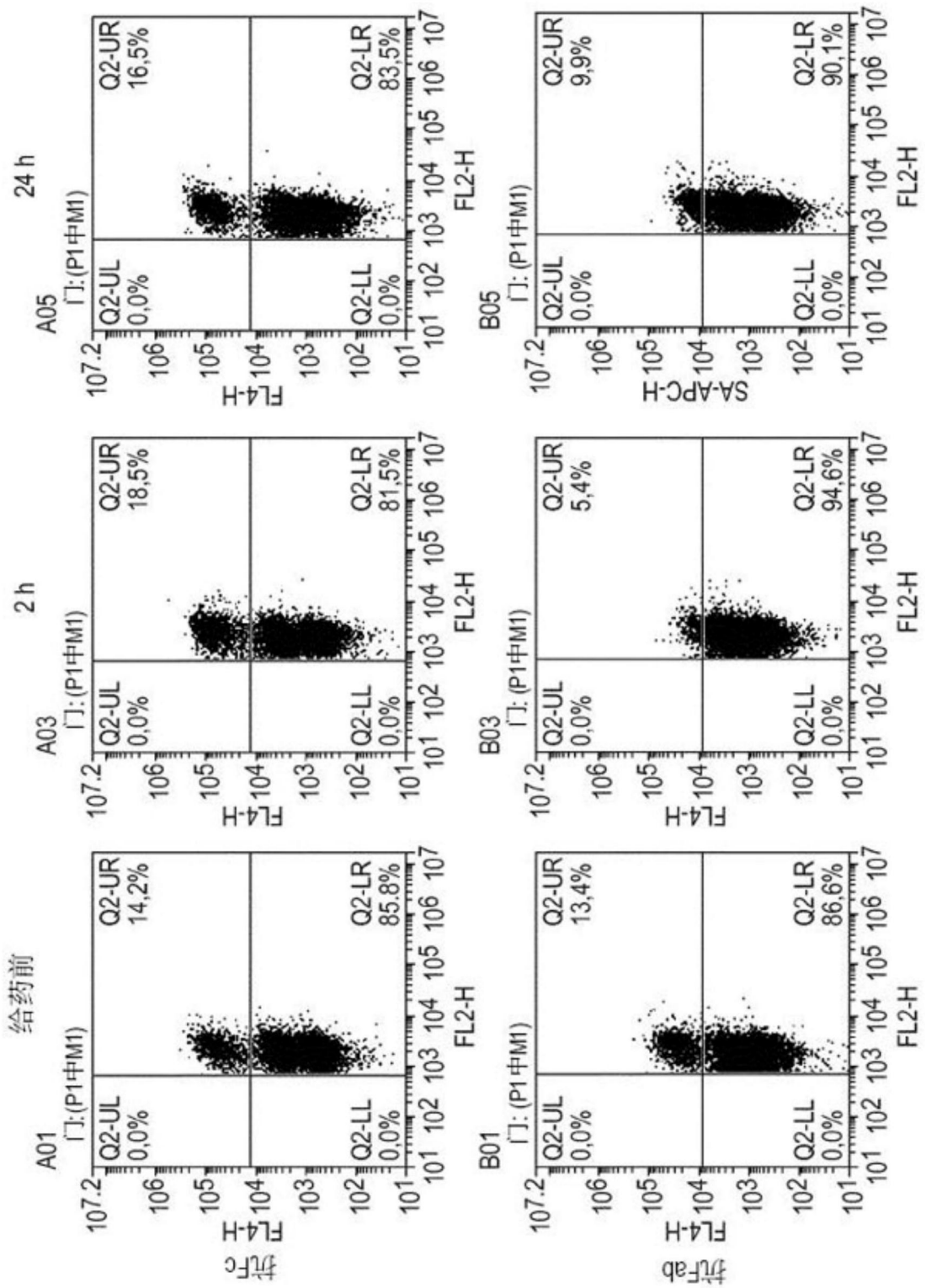

给药前
2 h
24 h
抗Fc
抗Fab
A01
A03
A05
B01
B03
B05
门:(P1中M1)
Q2-UL 0,0%
Q2-UR 14,2%
Q2-LL 0,0%
Q2-LR 85,8%
Q2-UR 18,5%
Q2-LR 81,5%
Q2-UR 16,5%
Q2-LR 83,5%
Q2-UR 13,4%
Q2-LR 86,6%
Q2-UR 5,4%
Q2-LR 94,6%
Q2-UR 9,9%
Q2-LR 90,1%
FL4-H
SA-APC-H
FL2-H

图29

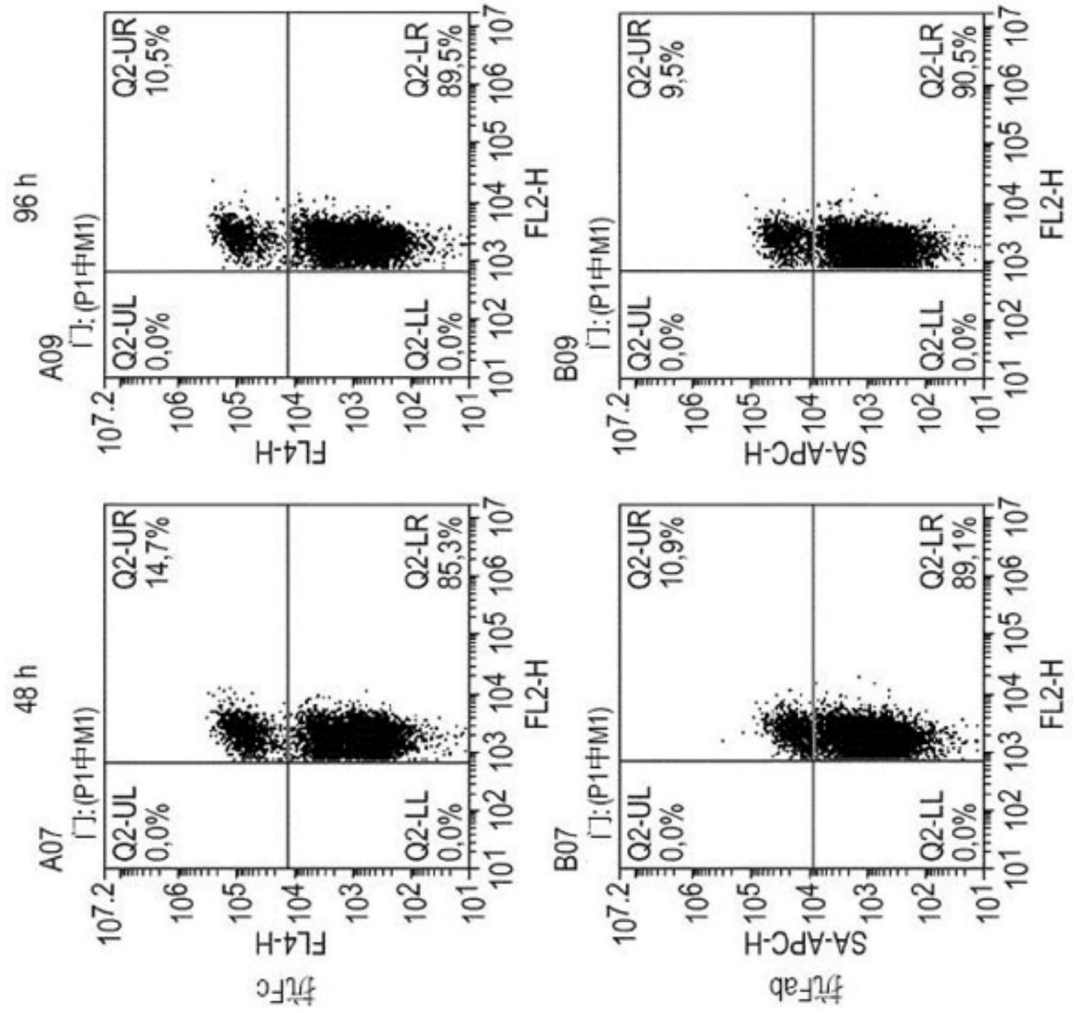

96 h
48 h
A09
A07
B09
B07
门:(P1中M1)
Q2-UL 0,0%
Q2-UR 10,5%
Q2-LL 0,0%
Q2-LR 89,5%
Q2-UR 14,7%
Q2-LR 85,3%
Q2-UR 9,5%
Q2-LR 90,5%
Q2-UR 10,9%
Q2-LR 89,1%
FL4-H
SA-APC-H
FL2-H
抗Fc
抗Fab

图29(续)

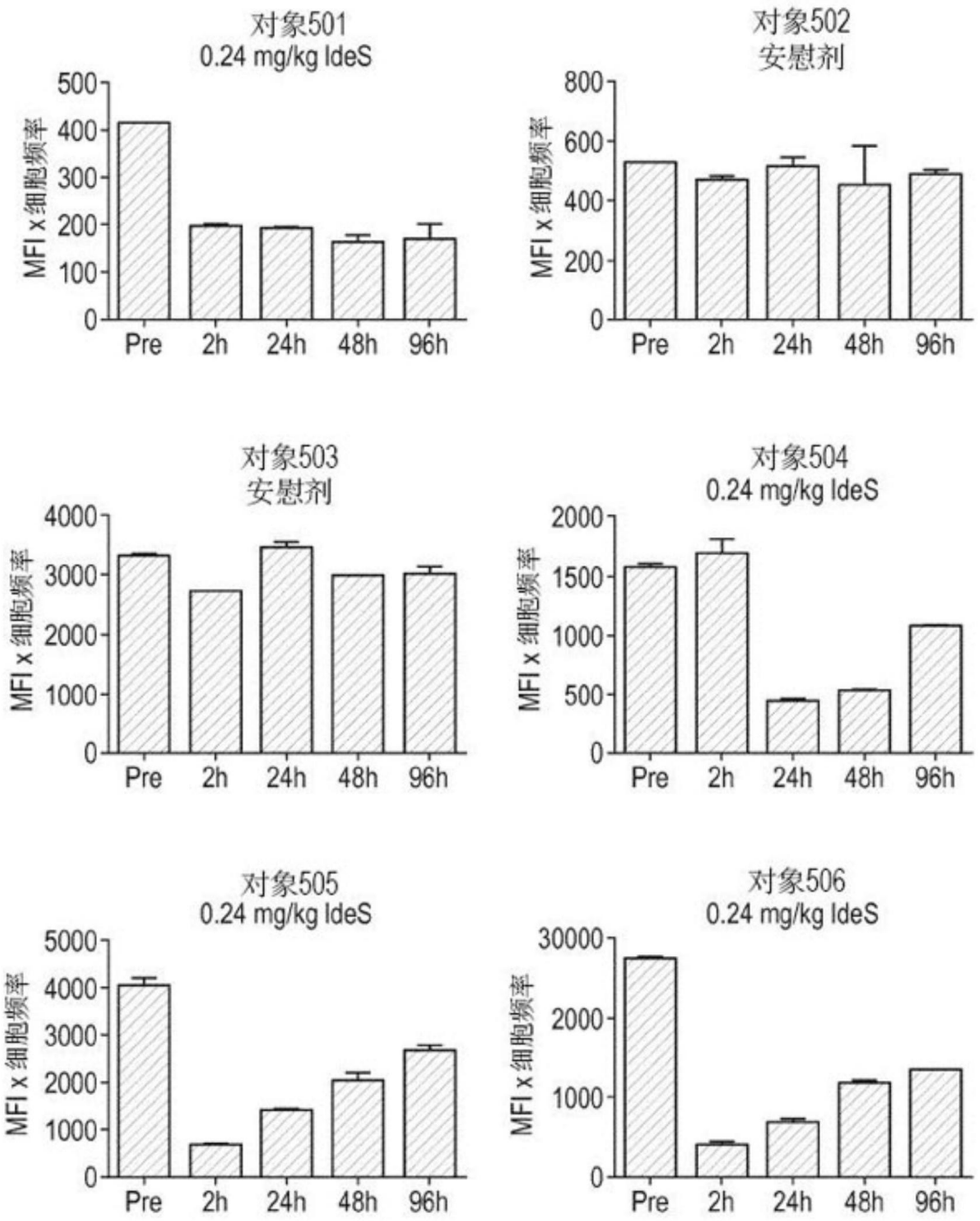
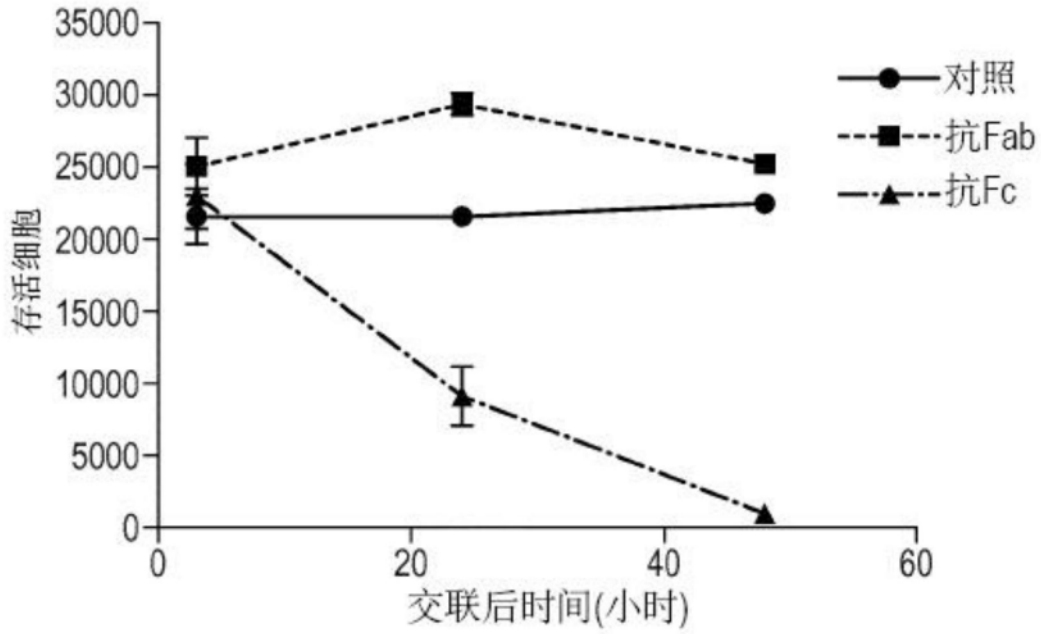

对象501
0.24 mg/kg IdeS
MFI x 细胞频率
500
400
300
200
100
0
Pre
2h
24h
48h
96h
对象502
安慰剂
800
600
400
200
对象503
安慰剂
4000
3000
2000
1000
对象504
0.24 mg/kg IdeS
2000
1500
1000
500
对象505
0.24 mg/kg IdeS
5000
4000
3000
2000
1000
对象506
0.24 mg/kg IdeS
30000
2000
1000

图30


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
存活细胞
0
20
40
60
交联后时间(小时)
对照
抗Fab
抗Fc

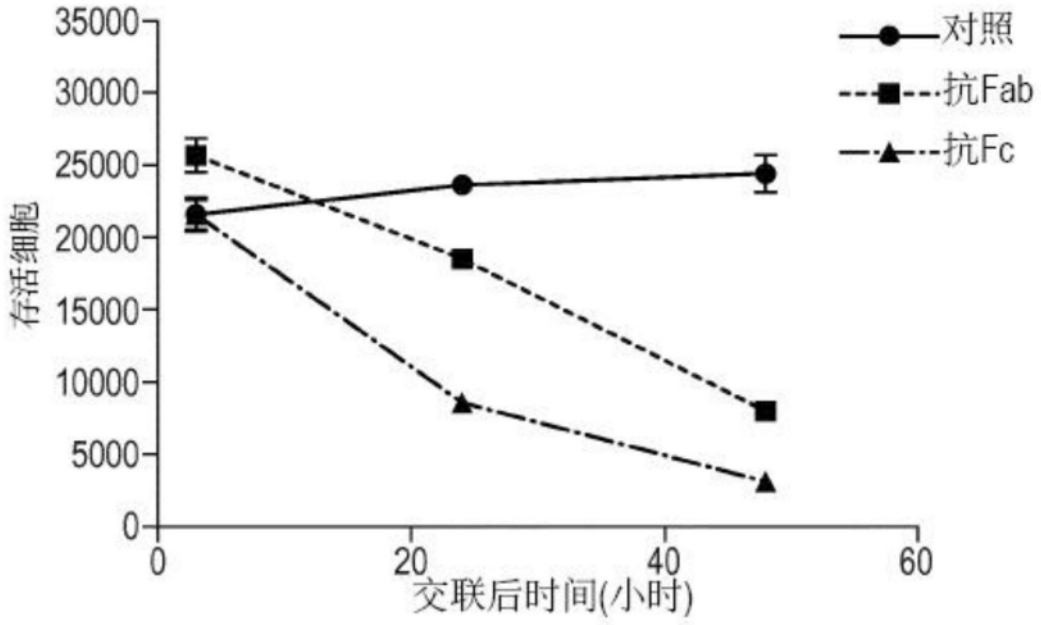

35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
存活细胞
0
20
40
60
交联后时间(小时)
对照
抗Fab
抗Fc

图31