



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105992591 A

(43)申请公布日 2016. 10. 05

(21)申请号 201480062068.0

(22)申请日 2014.09.24

(30)优先权数据

61/881,857 2013.09.24 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.05.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/057234 2014.09.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/048145 EN 2015.04.02

(71)申请人 纽约州立大学研究基金会

地址 美国纽约

(72)发明人 塞茜·巴鲁-莱尔

马修·P.·科斯洛斯基

克里希卡·阿伦·谢蒂

詹妮弗·李·施耐德

阿纳斯·法萨拉

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事

务所(普通合伙) 11201

代理人 宋融冰

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

C07F 9/09(2006.01)

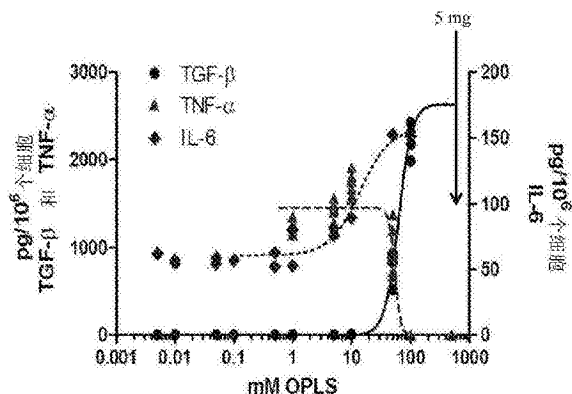
权利要求书1页 说明书28页 附图28页

### (54)发明名称

用于降低抗原特异性免疫原性的组合物和方法

### (57)摘要

提供了用于诱导针对包括治疗性抗原类的抗原类的免疫耐受性的方法。该方法包括向个体给药以单一制剂形式或作为分开的制剂的OPLS或其它脂质组合物和抗原,其中将分开的制剂同时或相继给药。



1. 一种用于诱导针对抗原的免疫耐受性的方法, 包括:
  - a) 提供包括O-磷酸基-L-丝氨酸(OPLS)的第一组合物和包括所述抗原的第二组合物, 其中所述第一组合物基本上不含所述抗原并且所述第二组合物基本上不含OPLS;
  - b) 分别将所述第一组合物和所述第二组合物通过皮肤途径给药至个体; 其中, 将所述第一组合物和所述第二组合物在彼此紧密接近的位点给药, 其中OPLS和所述抗原的给药导致在所述个体中诱导针对所述抗原的免疫耐受性。
2. 如权利要求1所述的方法, 其中将所述第一组合物和所述第二组合物同时给药。
3. 如权利要求1所述的方法, 其中将所述第一组合物和所述第二组合物相继给药。
4. 如权利要求3所述的方法, 其中将所述第一组合物在所述第二组合物之前给药, 或者将所述第一组合物在所述第二组合物之后给药。
5. 如权利要求1所述的方法, 其中将所述第一组合物和所述第二组合物以皮下或皮内的方式给药。
6. 如权利要求1所述的方法, 其中将OPLS以超过20mM的浓度给药。
7. 如权利要求6所述的方法, 其中将OPLS以20mM至300mM的浓度给药。
8. 如权利要求1所述的方法, 其中所述第一组合物和所述第二组合物的渗透强度为300毫摩尔/公斤至1100毫摩尔/公斤。
9. 如权利要求1所述的方法, 其中将所述第一组合物和所述第二组合物每周至少给药一次持续达12周。
10. 一种用于诱导针对抗原的免疫耐受性的方法, 包括: 通过皮肤途径向个体给药包括OPLS和亚治疗量的抗原的组合物, 其中这种给药导致所述个体出现针对所述抗原的免疫耐受性。
11. 如权利要求10所述的方法, 其中所述OPLS与所述抗原是松散结合的, 其中 $K_d$ 为10 $\mu$ M至500 $\mu$ M; 或者所述OPLS与所述抗原是未结合的, 其中 $K_d$ 大于500 $\mu$ M。
12. 如权利要求10所述的方法, 其中所述组合物的渗透强度为300毫摩尔/公斤至1100毫摩尔/公斤。
13. 如权利要求10所述的方法, 其中所述亚治疗剂量是治疗剂量的至少1/10。
14. 一种用于诱导针对抗原的免疫耐受性的方法, 包括:
  - a) 获得来自个体的树突细胞;
  - b) 使所述树突细胞与OPLS和所述抗原接触; 以及
  - c) 将所述树突细胞返回至所述个体,其中所述树突细胞返回所述个体之后, 所述个体出现针对所述抗原的特异性免疫耐受性。
15. 一种用于诱导免疫耐受性的试剂盒, 包括:
  - a) 包含OPLS、基本上不含抗原的组合物;
  - b) 用于将所述OPLS和抗原经由皮肤途径给药的说明书; 和
  - c) 任选地, 用于将所述OPLS和/或所述抗原经由皮肤途径给药的给药装置。
16. 如权利要求15所述的试剂盒, 进一步包括包含抗原、基本上不含OPLS的组合物。

## 用于降低抗原特异性免疫原性的组合物和方法

[0001] 关于联邦资助研究的声明

[0002] 本发明是在根据由美国国立卫生研究院批准的合同HL-70227的政府支持下完成的。政府对本发明具有一定的权利。

[0003] 相关申请的交叉引用

[0004] 本申请要求2013年9月24日提交的第61/881,857号美国临时专利申请的优先权，其公开内容通过引用并入本文。

### 技术领域

[0005] 本申请一般涉及抗原蛋白免疫原性技术领域。更具体地说，本发明涉及用于(i)降低免疫原性，(ii)提高药代动力学和(iii)诱导对包括治疗性蛋白、肽和抗体的生物治疗药物耐受的组合物和方法。

### 背景技术

[0006] 生物治疗药物，其包括重组蛋白、肽和抗体，代表了发展中的一类药物制剂。这类已经用于治疗广泛的疾病。尽管使用这些制剂的治疗可能是高度有效的，但是这样的治疗常常遇到有关稳定性和免疫原性的问题。治疗性蛋白质形成聚集体不是罕见的，其中未折叠的治疗性蛋白质彼此联合并形成复合物，这可导致不期望的免疫反应。同样，如果没有更多的话，关注的是这样的治疗方法的固有的免疫原性，其常常导致影响其安全性和有效性的基于抗体的免疫反应。例如，基于抗体的免疫反应(例如抗药物抗体)不仅可以改变药代动力学(例如增加清除率/减少循环时间)而且还终止该蛋白的药理活性。当基于抗体的免疫反应包括中和抗体的形成时，后者发生。随着时间的推移，由于中和抗体的效价增加，该疗法变得不太有效，并且可能导致额外的并发症，有时甚至是死亡，特别是在没有替代疗法存在的情况下。

[0007] 生物治疗药物的“免疫原性”受由各种因素影响，包括给药途径、联合用药、药物剂量和治疗计划、遗传、年龄、性别、免疫和营养状况、发病特征、药物的大小和结构、“人类”药物是怎么样的、免疫复合物的清除率和药物的溶解度。因为有这么多引起免疫原性的因素，对特定的生物治疗药物在不同的研究之间可以存在广泛的“免疫原性”。

[0008] 针对生物治疗药物的抗药物抗体的发展存在许多实例。许多实例涉及单克隆抗体，其可以包括嵌合的、人源化的、甚至全人源抗体。具体的例子是用于治疗自身免疫性疾病的生物抗肿瘤坏死因子(抗TNF)疗法，例如阿达木单抗(Humira®)和英夫利昔(Remicade®)。抗药物抗体的形成公认为解释类风湿性关节炎(“RA”)治疗中抗TNF生物治疗药物的失败的机制。针对抗TNF疗法发展出的抗药物抗体降低了这些疗法的临床有效性并使更高剂量或停止不可避免。中和抗体引起12%至44%RA患者发展出对抗TNF剂的耐药性或不良反应。因为抗药物抗体形成，至少1/3RA患者不响应治疗或失去初始反应性。目前市售抗TNF生物治疗药物(Remicade®(英利昔单抗)、Humira®(阿达木单抗)、Simponi®(戈利木单抗)、Enbrel®(依那西普)和Cimzia®(聚乙二醇化赛妥珠单抗))的每一种都具有各自

的“免疫原性”范围。

[0009] 其它实例包括基于蛋白质的替代疗法,包括但不限于针对诸如血友病的凝血功能障碍的替代疗法(例如因子VIII),和针对如庞佩氏症的溶酶体贮积病的酶替代疗法。在具体的例子中,患有庞佩氏症的患者具有酶酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(“GAA”)的缺陷。对于该疾病的目前治疗是使用阿糖苷酶 $\alpha$ 的酶替代疗法,其以Myozyme®和Lumizyme®销售。像上面提到的抗TNF生物治疗药物,这些药物是免疫原性的,常常导致最终使治疗不太有效、甚至无效的不期望的免疫反应。

[0010] 已使用和/或研究了几种方法以生物治疗药物的免疫原性最小化,包括但不限于开发低免疫原性制剂、修改治疗方案、使用类固醇(即全身性免疫抑制),以及各种给药方法。每种方法自身都有一套缺点和局限性。

[0011] 除了免疫原性,面对生物治疗药物的皮下给药途径的另一个关注是其不完全的生物利用度,这可能部分地由于在注射部位或注射部位附近生物治疗药物的降解。

[0012] 因此,使免疫原性最小化,提高药代动力学并诱导抗原特异性免疫耐受性的安全、有效的方法是可取的。

## 发明内容

[0013] 本发明描述了用于降低抗原免疫原性(例如生物治疗药物),改善其药代动力学性质并诱导对这样的抗原的特异性免疫耐受性的组合物和方法。

[0014] 本公开基于令人惊讶的观察到即使不存在抗原与OPLS联合或抗原并入脂质颗粒(和/或免疫原性表位的屏蔽)(即形成复合物),某些脂质颗粒或OPLS和抗原的同时或相继给药导致针对该抗原的免疫低反应性和其药代动力学性质的改善。特别令人惊讶是,即使当经由皮下途径进行给药时,仍看到免疫原性降低,而广泛认为皮下途径由于高数量的树突细胞的存在(即高免疫暴露)为高度免疫原性。

[0015] 免疫耐受性可以被看作是针对抗原从免疫低反应性到非响应性的连续。对于治疗目的,通常优选的是特异于讨论中抗原的免疫耐受性,以避免由全身性免疫抑制引起的并发症。本发明的上下文中,对抗原的“免疫耐受性”通过如下任一种或组合来证明:(a)增加如下的一种或多种:(i)免疫调节性T细胞、(ii)TGF- $\beta$ 、和/或(iii)IL-10;和/或(b)降低如下的一种或多种:(i)抗原特异性抗体效价、(ii)B细胞,包括抗原特异性记忆B细胞、(iii)IL-6、(iv)IL-17、(v)CD40、(vi)CD80、和/或(vii)CD86;和/或(c)用抗原再次攻击之后的低反应性。可以在培养条件中对这些标识物的一个或多个进行评估。“特异性”是指,对不相关的抗原(即没有与本公开的脂质组合物复合的抗原,或没有与本公开的脂质组合物同时或相继共同给药的抗原)的免疫反应不受影响。

[0016] 在一个方面,本公开提供了一种用于诱导对制剂(如治疗性制剂)的免疫耐受性的方法。将该制剂与OPLS给药联合给药。在一个实施方案中,将该药剂和OPLS作为单独的组合物给药。该给药可以在同一时间(同时)进行,或者可以一个接一个地(相继)进行。在一个实施方案中,OPLS和制剂可以在给药前进行组合,但OPLS和制剂的联合是低的或不存在(即,不可检测的)。

[0017] 在一个实施方案中,通过改善皮下给药后淋巴摄取来增加生物治疗药物的生物利用度。尽管在过去已经开发了充当体积膨胀剂的制剂(例如白蛋白),这些制剂不具有降低

共同给药的生物制品的免疫原性的能力。在本公开中观察到给药高渗缓冲液中的生物制品可能增加生物利用度以及诱导免疫耐受性。

[0018] 在一个实施方案中,将治疗性制剂与亚治疗剂量的OPLS联合给药。在这个剂量,治疗性制剂对于预定的适应症不发挥临床相关作用。然而,如在本发明中所描述,出人意料的是,它能够诱导针对该制剂的特异性免疫耐受性。治疗药物和OPLS可以在同一组合物中给药给药,或者可以分开给药(同时或相继)。

[0019] 在一个实施方案中,将制剂(如治疗性制剂)与OPLS联合给药(作为单一制剂或单独的制剂-无论是同时或相继给药),其中所述制剂是治疗剂量的。在一个实施方案中,如果作为单一制剂给药,OPLS和制剂是松散结合的( $K_d$ 大于 $10\mu\text{M}$ 以上包括 $500\mu\text{M}$ )或未结合的( $K_d$ 大于 $500\mu\text{M}$ )。在一个实施方案中,如果作为单一制剂给药,在给药之前即时将OPLS和抗原结合所以不存在可检测的OPLS和抗原的络合。

[0020] 在一个实施方案中,制剂和OPLS的给药经由透皮途径完成。透皮途径可以是一个皮下注射、经皮或皮内递送、局部施用或经由皮肤的任何其它递送方法。

[0021] 在一个方面,本公开提供了一种通过体外暴露于治疗性抗原和OPLS来诱导免疫耐受性的方法。该方法包括从个体获得树突细胞,将树突细胞与OPLS和抗原在体外相接触,并将树突细胞返回宿主。

[0022] 在一个方面,本公开提供了用于诱导免疫耐受性的试剂盒。所述试剂盒包括一种或多种以下物质:含脂质制剂的OPLS或其它丝氨酸、治疗性制剂、高渗缓冲液、给药装置和制剂,给药各种组合物的说明书。

## 附图说明

[0023] 图1.OPLS对骨髓来源的树突细胞(BMDC)的细胞因子谱的影响。 $\text{TGF-}\beta$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 和IL-6的浓度显示为OPLS浓度的函数。

[0024] 图2.生物治疗药物与OPLS的结合。解离常数( $K_d$ )的范围为对于FVIII  $8.4\mu\text{M}$ 至对于OVA  $2573\mu\text{M}$ (基本上无结合)。

[0025] 图3.FVIII和OPLS( $0.4\text{mg}/5\text{IU}$ 和 $5\text{mg}/5\text{IU}$ )皮下共同给药相对于FVIII单独( $5\text{IU}$ )给药之后小鼠抗体效价。在给药前在室温即时将OPLS和FVIII结合并且不存在可检测的抗原和OPLS的复合物。

[0026] 图4.在小鼠中静脉内给药之后随时间变化的平均FVIII生物活性(血浆)。

[0027] 图5.在小鼠皮下给药FVIII和OPLS-FVIII之后(A)血药浓度和(B)淋巴浓度。

[0028] 图6.皮下给药蛋白质相对于皮下共同给药蛋白质和脂质之后小鼠抗体效价水平。(a)给药卵清蛋白相对于共同给药卵清蛋白和 $5\text{mg}$  OPLS,(b)给药FVIII相对于共同给药各种浓度的FVIII和OPLS,(c)给药酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)蛋白相对于共同给药GAA蛋白和O-磷酸基-D-丝氨酸("OPDS")或OPLS共同给药,(d)给药Humira®(阿达木单抗)相对于共同给药Humira®(阿达木单抗)和 $5\text{mg}$  OPLS。

[0029] 图7.皮下共同给药人IgG和OPLS( $0.4\text{mg}/1\mu\text{g}$ )相对于单独皮下给药IgG之后小鼠抗体效价。如图7,预期在等于或大于 $5\text{mg}$  OPLS剂量下较大的影响。在本实施例中人IgG是人血浆IgG分离物。

[0030] 图8.皮下共同给药利妥昔单抗(RXT)和OPLS( $0.4\text{mg}/1\mu\text{g}$ 和 $5\text{mg}/1\mu\text{g}$ )相对于单独皮

下给药利妥昔单抗之后小鼠抗体效价。

[0031] 图9.皮下给药酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)肽(SEQ:YIFLGPEPKSVVQ)相对于皮下共同给药GAA肽与PS-脂质体(如下所述1:10000)或5mg OPLS之后鼠抗体效价。需要注意的是,GAA肽是全长GAA的最突出的T细胞表位(Molecular Genetics and Metabolism,2012.106(2): p.189-195)。

[0032] 图10.皮下给药GAA蛋白相对于皮下共同给药GAA蛋白和脂质之后小鼠抗体效价水平。所使用的脂质是PS-脂质体(PS/PC)和PG30。

[0033] 图11.使用O-磷酸基-L-丝氨酸(以下简称为“OPLS”)的FVIII特异性耐受性/低反应性。(a)基线示出在皮下共同给药(i)、(ii)、(iii)之后,与单独给药FVIII相比,小鼠抗FVIII抗体效价的比较:(i)FVIII和OPLS、(ii)FVIII和O-磷酸基-D-丝氨酸(以下简称为“OPDS”)、(iii)FVIII和地塞米松(“Dex”)。(b)再次攻击显示出用单独FVIII皮下再次攻击之后各个组中小鼠抗FVIII抗体效价的比较。共同给药(s.c.)FVIII与OPLS导致再次攻击时抗原(FVIII)特异性低反应性,反之共同给药(s.c.)FVIII与OPDS或地塞米松,一般免疫抑制剂都没有。

[0034] 图12.使用PS-脂质体的FVIII特异性耐受性/低反应性。(a)用各种脂质组合物(磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰甘油(PG))反向接种之后,与单独FVIII和FVIII加地塞米松(Dex)相比,小鼠抗FVIII中和抗体效价;(b)用Ova再次攻击之后各个组中小鼠抗卵白蛋白(Ova)效价表明在反向接种步骤之后小鼠正常应答Ova。

[0035] 图13.GAA再次攻击之后,GAA与GAA加OPLS处理的动物的抗GAA效价。

[0036] 图14.GAA再次攻击之后,GAA与GAA加OPLS处理的动物的抗GAA效价,使用PS-脂质体的GAA耐受性数据。

[0037] 图15.使用PS-脂质体的Humira®(阿达木单抗)耐受性数据。小鼠模型经过(a)单独阿达木单抗和(b)阿达木单抗与磷脂酰丝氨酸(PS)脂质体处理。在分别暴露于(a)单独阿达木单抗和(b)阿达木单抗与磷脂酰丝氨酸(PS)脂质体后,用单独阿达木单抗再次攻击该模型,并且测定任意单位的免疫效价。最初经过使用阿达木单抗和PS脂质体的方案的模型与最初仅经受单独形式的阿达木单抗的模型相比产生了统计学上显著降低的免疫效价。

[0038] 图16.因子VIII与PS脂质体一起给药诱导了CD4+FoxP3+免疫调节T细胞上调。实验组给药(a)单独因子VIII或(b)因子VIII与PS脂质体。给药(b)因子VIII与PS脂质体的组与给药单独形式的因子VIII的组相比具有统计学上显著相对更高的CD4+FoxP3+免疫调节T细胞上调。

[0039] 图17.PS介导的低反应性中记忆B细胞的作用。接受来自PS-FVIII处理的供体小鼠的记忆B细胞的小鼠表现出显著降低的抗FVIII抗体效价。

[0040] 图18.来自接受了4周的耐受性诱导方法的小鼠的中和效价数据,其中抗原和脂质颗粒彼此远端给药,然后单独FVIII再次攻击四周。

[0041] 图19.经过耐受性诱导方法的小鼠的总抗FVIII效价数据,其中抗原和脂质颗粒彼此远端给药。

[0042] 图20.从对CD-1小鼠进行的短期、重复剂量(28日剂量)TDAR研究中获得抗KLH IgG效价水平。任何OPLS处理组和溶剂处理组之间的平均效价水平没有发现显著性差异。数据表明,即使在最高剂量进行评估,OPLS不改变动物的一般免疫能力的状态。

[0043] 图21. 28天注射OPLS剂量范围对CD-1小鼠的血浆化学标志物的影响。样本采集自给药终止后1天的动物。数据表明,指定的OPLS给药甚至在OPLS最高评价剂量对肾和肝功能没有影响。

[0044] 图22. 28日每日给CD-1小鼠皮下注射OPLS之后血浆肌酸激酶(CK:在肌细胞中高表达的酶,血浆CK升高是肌肉组织受损的指示)活性水平。任何OPLS处理组的尸检时在注射部位组织的宏观评价过程中没有观察到可见的注射部位病理。任何OPLS处理组和溶剂处理组的平均血浆CK活性水平之间没有发现显著性差异。数据表明,即使在最高剂量进行评估,OPLS不会引起注射部位的肌肉退化。

[0045] 图23. 21日每日给药25mg/kg OPLS对恒河猴外周血中的淋巴细胞亚群的影响。在基线(第0天)、治疗过程中的中间时间点(第8天)和终止给药后1天(第22天)的动物获取样本,使用流式细胞仪进行免疫分型。除了B细胞的%暂时升高外,在基线和治疗后的水平之间没有观察到显著变化(\*P值<0.05)。数据表明以给定剂量给药OPLS没有改变动物的一般免疫能力的状态。

[0046] 图24. 21日每日给药25mg/kg OPLS对恒河猴的血浆化学标志物的影响。在基线(第0天)、治疗过程中的中间时间点(第8天)和终止给药后1天(第22天)的动物获取样本。数据表明,指定的OPLS给药对肾和肝功能没有影响。

[0047] 图25. 提供蛋白质与OPLS摩尔比的表。

[0048] 图26. 给药OPLS和GAA的单独的组合物之后第6周的隐静脉采样。

[0049] 图27. 再次攻击之后-最终采样-11周。

[0050] 图28. 第6周至第11周的比较。

[0051] 图29. 对SW小鼠静脉给药(空心圆)和皮下给药(空心菱形)之后,利妥昔单抗的血浆(空心符号)和淋巴结(实心符号)的浓度-时间分布。皮下或静脉注射1 $\mu$ g/g利妥昔单抗,并监测血药浓度120小时。实线代表将静脉数据拟合成2隔室模型,虚线代表将皮下数据拟合成模型。实心的菱形代表皮下给药之后腹股沟淋巴结利妥昔单抗的浓度。数值表示为平均值 $\pm$ SD。

[0052] 图30. 皮下给药等渗缓冲液(缓冲液A实心菱形)和高渗缓冲液(缓冲液B实心倒三角)中的利妥昔单抗的血浆(空心符号)和淋巴结(实心符号)浓度-时间分布。皮下给药等渗缓冲液(缓冲液A实心菱形)和高渗缓冲液(缓冲液B实心倒三角)中的利妥昔单抗的淋巴结浓度。数值表示为平均值 $\pm$ SD。实线表示将数据拟合成图2所示的模型。该数据显示,与等渗缓冲液相比,皮下给药高渗缓冲液中的利妥昔单抗之后增加了血浆和淋巴结暴露。

[0053] 图31. 皮下给药不同高渗缓冲液中的利妥昔单抗的血浆(空心符号)和淋巴结(实心符号)浓度-时间分布。5.A缓冲液C和E代表与仅含有NaCl的高渗缓冲液(缓冲液B空心圆)相比低剂量OPLS(20mM空心框)和高剂量OPLS 270mM(空心倒三角形),与仅含有NaCl的高渗缓冲液(缓冲液B实心圆)相比具有对于缓冲液C和E相应的利妥昔单抗淋巴结浓度(分别为实心框和实心倒三角形)。数值表示为平均值 $\pm$ SD值。实线代表将数据拟合成模型。数据显示出与OPLS一起给药的利妥昔单抗以剂量依赖方式增加血浆浓度。这也相应地增加淋巴结暴露尤其对于缓冲液E。模型预测出对于缓冲液E几乎完全的生物利用度。5.B缓冲液D和F代表了与仅含有NaCl的高渗缓冲液(缓冲液B空心圆)相比低剂量甘露醇(20mM空心框)和高剂量甘露醇270mM(空心倒三角形),与仅含有NaCl的高渗缓冲液(缓冲液B实心圆)相比具有对

于缓冲液D和F相应的利妥昔单抗淋巴结浓度(分别为实心框和实心倒三角形)。数值表示为平均值 $\pm$ SD值。实线代表将数据拟合成模型。数据显示对于利妥昔单抗与甘露醇给药增加了血药浓度。这也对应地增加了淋巴结暴露。模型预测出对于缓冲液D和F几乎完全的生物利用度。

[0054] 图32.4周每周皮下注射FVIII而侵略性再次攻击的HA小鼠中的抗-FVIII效价。用单独的FVIII、FVIII/OPLS或FVIII-地塞米松(Dex)皮下预处理小鼠4周,之后是2周的洗脱期,在此之后用单独的FVIII再次攻击动物。FVIII和FVIII-地塞米松预处理组的动物显示出再次攻击之后的强抗FVIII抗体反应。FVIII/OPLS预处理组的反应不太强。

[0055] 图33.在存在和不存在OPLS下暴露于FVIII的BMDC的表征。图A和B显示50mMOPLS对BMDC的表型成熟的影响。在存在和不存在OPLS下暴露于FVIII的BMDC中CD40表达的流式细胞仪分析显示了OPLS处理组中CD40表达显著降低。代表性的数据集显示在图(A)的上图,CD40+细胞百分比和MFI出现在图2B的上图( $n=3$ , \* $p<0.05$ 学生t-检验)。在存在和不存在50mM OPLS下暴露于FVIII的BMDC中MHCII表达示于图33A和33B的下图。该数据显示了响应于OPLS MHCII表达水平没有变化。图C和D显示OPLS对由BMDC产生的细胞因子的剂量依赖性效应。随着OPLS剂量增加暴露于FVIII的BMDC显示出促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-12p70的剂量依赖性减少(图C,  $n=4$ )。这是伴随着调控细胞因子TGF- $\beta$ 的剂量依赖性增加(图D,  $n=4$ )。图E、F和G荧光标记的BMDC和用单独的FVIII或者FVIII与50mM OPLS体外处理的BMDC的迁移潜能。FVIII(图E)或FVIII/OPLS(图F)组用DiI1C18(5)染料成功标记的BMDC。DiI1C18(5)标记的宿主HA小鼠腹股沟淋巴结中回收的BMDC的荧光曲线下的面积(图G)。

[0056] 图34.在宿主HA小鼠中OPLS削减体外暴露于FVIII的BMDC的免疫潜能。在3周每周皮下给药体外暴露于单独的FVIII或FVIII/OPLS(50mM)的BMDC之后宿主HA小鼠中的总抗FVIII抗体。数据显示了OPLS处理组中抗FVIII效价统计学上显著减少。来自空白HA小鼠的血浆用来计算ELISA的截断值。

[0057] 图35.对OPLS/FVIII处理的体内剂量依赖性应答。与单独的FVIII和低剂量OPLS(0.4mg)相比,用高剂量OPLS(5mg)处理的HA小鼠显示处抗FVIII效价统计学上显著减少。

## 具体实施方式

[0058] 当与一种或多种抗原组合或以顺序方式给药本公开提供了包含OPLS或脂质颗粒的组合物时使得抗原免疫原性降低并改善其药代动力学性质和/或诱导针对抗原的免疫耐受性。

[0059] 如本文所用的术语生物治疗药物意思是基于生物学上的治疗剂,包括重组蛋白类、肽类、治疗性/预防性抗体类(例如单克隆抗体类)及其片段。在本说明书中,生物治疗药物作为抗原,有时称为抗原。

[0060] 将制剂(如治疗性制剂)与如O-磷酸基-L-丝氨酸(“OPLS”)的免疫耐受诱导剂或脂质颗粒一起递送;脂质颗粒可以是:(a)由磷脂酰丝氨酸(“PS”)和一种或多种磷脂组成的单层或多层脂质体(“PS-脂质体”);或(b)由丝氨酸组成的非脂质体结构,包括微胶粒、缩合型结构和螺旋结构。OPLS是市售可得的。包括PS的磷脂可以从各种天然来源和合成来源获得。例如,PS可以从猪脑PS或基于植物的大豆(黄豆)PS来获得。卵PC和PS以及合成的PC也是市售可得的。术语脂质组合物包括OPLS以及脂质颗粒。



[0061] 本公开提供了用于改善药代动力学(PK)性质的组合物和方法。在一个实施方案中,药代动力学性质的“改善”意思是对抗原的半衰期或生物利用度的改善。例如,当皮下给药OPLS或脂质组合物与抗原(如因子VIII)时,相对于皮下给药单独蛋白质,淋巴摄取和血浆PK分布有改善。当用利妥昔单抗作为抗原时,还看到淋巴摄取和血浆浓度的改善,这提供了这是广泛适用的方法的进一步的证据。

[0062] 在一个实施方案中,免疫耐受诱导剂包括OPLS,基本上由OPLS组成或由OPLS组成。在一个实施方案中,脂质组合物中的唯一免疫耐受诱导剂是OPLS。该OPLS浓度可以是1mM至100mM,包含所有整数和位于其间的范围。在一个实施方案中,OPLS含量为100nM至300nM,包含所有整数和位于其间的范围。在一个实施方案中,mM浓度为5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100。在另一个实施方案中,OPLS浓度为在21mM至100mM之间,包括位于其间的所有整数。在另一个实施方案中,OPLS浓度为25mM和75mM,包括位于其间的所有整数。在另一个实施方案中,OPLS浓度在35mM和65mM之间,包括位于其间的所有整数。在又一个实施方案中,OPLS浓度在45mM和55mM之间,包括位于其间的所有整数。在一个实施例中,OPLS浓度为50mM。在一个实施方案中,OPLS为125、150、175、200、225、250或275mM。可替代地,需要能够实施本文所公开的方法的OPLS的含量可以剂量的形式描述。剂量可以是1mg以上的任何量。在一个实施方案中,OPLS的剂量可以为1mg至1000mg,包括位于其间的所有整数。在一个特定实施例中,剂量为5mg。

[0063] 一般地,可以使用任何合适的缓冲液。例如,可以使用任何磷酸盐缓冲液(包括磷酸盐缓冲盐水)或TRIS缓冲液。在一个实施方案中,采用第8349794号美国专利所描述的重组介质。缓冲液的pH可以为5至8。在一个实施方案中,缓冲液的pH可以为5.5至8或5.5至7.6或6.0至7.6。在另一个实施方案中,缓冲液的pH可以为6至8,或7.2至7.6或7.4。

[0064] 在一个实施方案中,通过使用含有OPLS的高渗溶液来实现了同时或相继给药抗原的用于改善淋巴摄取和/或血浆浓度的方法。在一个实施方案中,组合物包含OPLS和NaCl。在一个实施方案中,组合物包含OPLS和甘露糖醇以及任选的NaCl。渗压强度的增加可以通过任意含量的一种或多种OPLS、甘露醇和NaCl的任意组合来实现。

[0065] 在另一实施方案中,通过使用包括OPLS和甘露糖醇中的至少一种的高渗溶液(如本文中定义具有大于300mmol/kg渗压强度)来实现同时或相继给药抗原的用于改善淋巴摄取和/或血浆浓度的方法。在一个实施方案中,所述溶液的渗压强度的范围为在300mmol/kg至1100mmol/kg之间,包括所有整数和位于其间的范围。在一个实施方案中,所述溶液的渗压强度的范围为在300mmol/kg至800mmol/kg之间,包括位于其间的所有整数。在一个实施方案中,渗压强度为301至1100mmol/kg或500至600mmol/kg。在一个实施方案中,渗压强度为290至300mmol/kg(包括所有整数和位于其间的范围)。在包括OPLS的高渗溶液的具体实施方案中,其中所述溶液的渗压强度的范围为在300mmol/kg至1100mmol/kg之间,相对于较低浓度的OPLS(例如:<100mM),较高浓度的OPLS(例如,>100mM)导致较高的淋巴摄取和/或血浆浓度。同样地,在包括甘露糖醇的高渗溶液的具体实施方案中,其中所述溶液的渗压强度的范围为在300mmol/kg至1100mmol/kg之间,相对于较低浓度的甘露醇(例如:<100mM),较高浓度的甘露醇(例如,>100mM)导致较高的淋巴摄取和/或血浆浓度。

[0066] 注意,尽管在本文公开的某些实施例中使用了包含O-磷酸基-D-丝氨酸(“OPDS”)、基本上由或由O-磷酸基-D-丝氨酸组成的脂质组合物,观察到与使用OPLS提供的作用类似

的作用。尽管不期望受任何特定理论的束缚,据认为观察到的OPDS的作用,至少部分地是由于以下事实:OPDS非常不稳定,一部分OPDS体内转化为OPLS。

[0067] 在另一个实施方案中,脂质颗粒是由磷脂酰丝氨酸(“PS”)和磷脂酰胆碱(“PC”)的脂质体以及任选的胆固醇组成(有时称为“PS/PC”)。在一个实施方案中,脂质组合物中的磷脂类包括以在10:90至30:70之间的比值和位于其间的所有比值存在的PS和PC,或基本上由或由以在10:90至30:70之间的比值和位于其间的所有比值存在的PS和PC组成。在一个实施方案中,脂质颗粒中的唯一的磷脂类是如上所述的PS和PC。在一些实施方案中,胆固醇也可存在,但对实施本文所公开的方法不是必需的。然而,在抗原是与脂质颗粒络合的(相对于共同给药)和抗原的释放是期望的情况下,优选的是包括1-33%胆固醇(PS和PC一起的百分比)。

[0068] 在其它实施方案中,脂质组合物中的磷脂类包括PS、磷脂酰肌醇(“PI”)和PC以及任选的胆固醇,或基本上由或由PS、PI和PC以及任选的胆固醇组成(有时称为“PS/PI”)。PS和PI的组合优选不超过60mol%,PC为至少40mol%。PS/PI脂质体的PI成分为1mol%至30mol%和位于其间的所有整数mol%值。对于PS脂质体(PS/PC脂质体和PS/PI脂质体),PS应至少为1mol%。在一个实施方案中,PS是至少10mol%。

[0069] PS、PC和PI的酰基链可以具有0-22个碳原子。例如,对于PS当碳原子为0时,所述分子是0-磷酸基-L-丝氨酸(OPLS)。在一个实施方案中,酰基链具有1至22、2至22或6至22个碳原子(和所有整数碳原子数和位于其间的范围)。酰基链可以是饱和的或不饱和的并且可以是相同长度或不同长度的。酰基链的一些实例是:月桂酸、肉豆蔻酸、棕榈酸、硬脂酸、花生酸、山嵛酸、油酸、棕榈油酸、亚油酸和花生四烯酸。PC可以具有一个或两个酰基链。例如,PC可以包括溶血磷脂酰胆碱(LPC)。例如,在一个实施方案中,PS脂质体的组成是PS:LPC:PC为30:10:70mol%。LPC可以是0mol%至20mol%。在一个实施方案中,LPC为1mol%至20mol%和所有整数mol%值和位于其间的范围。

[0070] 使用适当的缓冲液中的适当摩尔比的PS、PC和任选的胆固醇或适当摩尔比的PS、PC和PI以及任选的胆固醇,通过薄脂质膜水合可以制备本发明的脂质颗粒。将脂质溶于氯仿并干燥溶剂。在高压下通过所需尺寸的过滤器(定径装置)将所得的多层脂质体(MLV)挤出以获得本发明的脂质结构。在一个实施方案中,50、60、70、80、90、95或100%(包括在50至100之间的所有百分数)的脂质颗粒的尺寸为40nm到4微米,包括纳米和微米范围内的位于其间的所有尺寸。在另一个实施方案中,颗粒的尺寸为60至140nm。在另一个实施方案中,颗粒小于140nm(由显微照片和动态光散射测量值计算的)从而使得颗粒在网状内皮系统(RES)中不会被过滤掉以便能参加免疫系统反应。因此,在一个实施方案中,至少50%粒子小于140nm。例如,颗粒小于120nm,例如40至100nm。在各种实施方案中,50、60、70、80、90、95或100%颗粒小于140nm,例如40至100nm或60至100nm。

[0071] 包括OPLS、基本上由或由OPLS组成的脂质组合物的制备可以与缓冲液的制备一样简单。可称出所需量的OPLS,添加到任何缓冲液中。然后使用本领域中已知的方法可以将这种OPLS缓冲溶液的pH调整至所期望的值(例如7.4)。

[0072] 该抗原可以是肽(通常50或小于50个氨基酸)、多肽(通常100或小于100个氨基酸)或蛋白质类(大于100个氨基酸)。制剂可以是治疗性抗原,或者可以是已经对个体进行预致敏的抗原,但是针对该抗原的免疫耐受性是期望的(如过敏反应或移植状况)。蛋白质类或

肽类可以是中性的或带电荷的(带负电或带正电)。这样的蛋白质类包括参与血液凝固级联的蛋白质类,包括因子VIII(FVIII)、因子VII(FVII)、因子IX(FIX)、因子V(FV)和血管性血友病因子(vWF)、冯Heldebrant因子(von Heldebrant factor)、组织纤溶酶原激活物、胰岛素、生长激素、促红细胞生成素 $\alpha$ 、VEG-F、血小板生成素、溶菌酶、酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)、治疗性抗体(包括单克隆抗体类,如阿达木单抗)、髓鞘蛋白类,髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)、谷氨酸脱羧酶65(GAD)、胰岛素受体等等。在一个实施方案中,抗原为单克隆抗体或其片段(如Fc部分)。在一个实施方案中,抗原可以是通常引发相对温和的、如通常由花粉、动物皮屑、室内尘土等引起的过敏反应的抗原,或通常将引起个体严重的过敏反应的抗原,如来自昆虫叮咬的毒液组分、螺母过敏原、某些抗生素和在讨论的特定个体中可引起严重的过敏反应的其它组合物或者可以是移植相关抗原。

[0073] 在一些实施方案,期望使抗原和脂质组合物联合(即复合物)。为了产生抗原与脂质结构的联合(即,形成复合物),将适当的缓冲液中的抗原添加到脂质结构中。然后通过离心方法如密度梯度离心将单独抗原从脂质结构分离。在各种实施例中,抗原与脂质颗粒的联合效率为至少30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90和95%。如果需要的话,可以将具有相关抗原的脂质颗粒冻干以备进一步使用。在一个实施方案中,与抗原联合之前可以将本发明的脂质结构冻干并储存。当需要时,可以对脂质结构进行重构并继而用于与抗原结合以在使用前实现抗原与脂质结构的联合。

[0074] 在将抗原与PS-脂质体联合的实施方案中,联合可以是这样的:抗原与脂质的摩尔比在1:10(抗原:脂质)至1:30000(抗原:脂质)之间以及位于其间的所有比值。在一个实施方案中,为约1:10000(抗原:脂质)。当抗原的治疗剂量增加时,比值减小。在其它实施方案中,该比值为约1:2000或1:4000(抗原:脂质)。抗原:本发明的脂质的最大比值为1:30000。由于对不同蛋白质剂量不同,所需的剂量的量将改变比值。

[0075] 在一些实施方案中,脂质组合物未与抗原络合。在一个实施方案中,在给药前可以将本发明的脂质颗粒冻干并储存。当需要时,可以将脂质颗粒进行重构并继而向个体给药。

[0076] 在使用OPLS的实施方案中,抗原与OPLS之间的摩尔比可以为1:1至 $1:1 \times 10^7$ 以及位于其间的所有比值以及位于其间的所有范围。在一个实施方案中,为1:1至 $1:1 \times 10^6$ 以及位于其间的所有比值。在一个实施方案中,抗原与OPLS的比为1:1至1:1000之间以及位于其间的所有比值。

[0077] 当我们描述复合物或抗原和脂质组合物联合(即络合)时,是指抗原和脂质组合物的 $K_d$ 小于 $10\mu\text{M}$ 。在一个实施方案中, $K_d$ 为 $8.4\mu\text{M}$ 。当我们描述抗原和脂质组合物未络合时,我们的意思是抗原和脂质组合物的 $K_d$ 大于或等于 $10\mu\text{M}$ 。结合至单独的范围如下:当解离常数( $K_d$ )小于 $10\mu\text{M}$ 时,认为蛋白质被结合或络合;当 $K_d$ 为 $10\mu\text{M}$ 至 $500\mu\text{M}$ 时,认为蛋白质是以非特异性想回作用而松散结合的;当 $K_d$ 大于或等于 $500\mu\text{M}$ 时,蛋白质是未被结合(“单独”)的。在一个实施方案中, $K_d$ 大于 $10\mu\text{M}$ 。在一个实施方案中, $K_d$ 可以为 $10\mu\text{M}$ 至 $5000\mu\text{M}$ ,包括位于其间的所有整数。在各种不同的实施方案中, $K_d$ 为至少10、20、30、40、50、60、70、80、90和 $100\mu\text{M}$ 。在其它实施方案中, $K_d$ 为10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、1000、1500、2000、2500、或 $3000\mu\text{M}$ 。

[0078] 在一些实施方案中,至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%抗原以未与脂质组合物(如OPLS)结合或与脂质组合物(如OPLS)松散结合的方式存在。

例如,在实施方案中,可以经皮肤途径给药组合物,其中该组合物包含与OPLS松散结合或未结合的治疗性制剂。

[0079] 在一个实施方案中,在给药之前可即时将OPLS或其它脂质组合物与抗原结合(如在给药时间的少于1分钟或1至5分钟内)。在一个实施方案中,室温(例如,20至26℃和位于其间的所有整数温度,或小于20℃)下在给药之前即时进行结合从而使得不存在OPLS和抗原的络合或者存在微不足道的OPLS和抗原的络合。在具体的实施方案中,结合的OPLS和抗原未暴露于高于22、23、24、25或26℃的温度下从而使得没有机会形成复合物。

[0080] 在本公开所描述的组合物可以用于任何个体(例如,人或非人哺乳动物)。例如,可以将它们给药先前已经给药和/或暴露于该抗原并且先前没有出现针对该抗原的免疫不耐受性的个体。在又一个实施例中,可以将它们给药先前已经给药和/或暴露于抗原并已出现针对该抗原的免疫不耐受性的个体。该个体可能显示出或可能未显示出最近的免疫不耐受性适应症。对于向空白个体(即先前没有被给药和/或暴露于抗原的那些个体)给药,它们也是有用的。如本文所使用的免疫不耐受性是指个体应该具有可测量的(通过标准方法如ELISA或活性测定法)抗体产生。相反,不存在免疫不耐受性是指个体不具有可测量的抗体。“给药”或“给予”是指通过任何手段或递送途径如静脉内、肌肉内、腹膜内、粘膜、皮下、透皮、皮内、口腔等将抗原和脂质颗粒递送给个体或引入个体的机体中。在一个实施方案中,经由皮肤途径如皮下给药抗原和脂质颗粒。

[0081] 在一个方面,本公开提供了用于减少抗原的免疫原性和/或改善抗原的药代动力学性质的方法,包括以下步骤:a)向个体给药包括抗原的组合物;以及b)与给药a)中的组合物相继或同时向个体给药包含本文所公开的一种或多种脂质组合物的组合物。在一个实施方案中,如本文所定义,一种或多种脂质组合物选自由OPLS和PS脂质体所组成的组。在一个实施方案中,如本文所定义,PS脂质体选自由PS/PC和PS/PI所组成的组。在一个实施方案中,所述抗原和脂质组合物的 $K_d$ 大于或等于10 $\mu$ M。在一个实施方案中,脂组合物和抗原之一或两个都经由皮肤途径递送。

[0082] 在其它实施方案中,用于降低抗原的免疫原性和/或改善抗原的药代动力学性质的方法可以进一步由如下一个或两个步骤组成:(i)从个体获得的生物样本并测量如下的一种或多种:T调节细胞、TGF- $\beta$ 、IL-10、抗原特异性抗体效价、B细胞(包括抗原特异性记忆B细胞)、IL-6、IL-17、CD40、CD80和/或CD86;和/或(ii)在给药抗原和OPLS或另外的脂质组合物后,从个体获得生物样本并测量如下的一种或多种:T调节细胞、TGF- $\beta$ 、IL-10、抗原特异性抗体效价、B细胞(包括抗原特异性记忆B细胞)、IL-6、IL-17、CD40、CD80和/或CD86。在实施(i)和(ii)两者的实施方案中,可以比较上述细胞和/或生物标志物的水平来测定方法的有效性。

[0083] 在其它实施方案中,为了实现更大程度地发展免疫耐受性,上述用于降低抗原(如FVIII、GAA和阿达木单抗)的免疫原性和/或改善抗原的药代动力学性质的方法可以无限期地每周重复1次至每周重复三次以上或者持续1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12周或更多周的时间。在适当的一段时间(如最后一次预致敏后的至少4天)之后,可以给予个体第二组合物(一次或多次给药),第二组合物包含单独形式、与脂质颗粒络合或与脂质颗粒组合的抗原,与先前给药的组合物(即“预致敏组合物”)相比具有不同的组成,或络合(共价或非共价)到PEG、表面活性剂或微球等。脂质结构可以包括微胶粒、螺旋结构、脂质分子组装体等。在一

个实施方案中,在最后一次给药组合物进行预致敏的4至30天(包括所有整数天数和位于其间的范围)之后,给予个体第二组合物(其可以是治疗性组合物)。在一个实施方案中,在最后一次给药组合物进行预致敏的第5、6、7、8、9、10、11、12、13、14天和15天给予个体第二组合物。在第7351688号、第7875288号、第7875289号、第7625584号美国专利和第20090053297号、PCT/US2010/041196专利申请中公开了较少的免疫原性制剂,其相关公开的内容通过引用并入本文。

[0084] 所述第二组合物(其可以是治疗性组合物)中的脂质颗粒的磷脂组合物可以与第一组合物(其是预致敏组合物)的脂质颗粒的磷脂组合物相同或不同。该磷脂组合物的变化可包括磷脂的类型或不同的磷脂的比。在一个实施方案中,治疗性组合物包括LPC和鞘氨醇。

[0085] 在一个实施方案中,经由皮下途径给药预致敏组合物的频率为每周一次持续四周。在一个实施方案中,至少四周每周一次给药用来诱导耐受性。如本文所述,抗原和脂质组合物的给药可以同时或相继地发生。如果需要,可以采用多次给药与PS脂质体或OPLS组合或络合的抗原。

[0086] 与给药“增强剂”疫苗的现行方法相似,可以重复这种方法由此所述个体在进一步暴露于所述抗原后随着时间变为免疫响应性的。

[0087] 在另一个方面,本公开提供了(a)无需诱导个体中的抗原特异性B记忆细胞的增加或(b)降低了个体中的抗原特异性B记忆细胞的数量而用于抗原给药的方法,包括向个体给药抗原和一种或多种脂质组合物的步骤。在一个实施方案中,经由皮肤途径给药抗原和/或脂质组合物。例如,OPLS和抗原组合物之一或两者都可以经皮下、皮内或透皮、和/或通过局部途径给药。在一个实施方案中,一种或多种脂质组合物选自OPLS和PS脂质体所组成的组。在一个实施方案中,如本文所述,PS脂质体选自PS/PC和PS/PI所组成的组。在一些实施方案中,抗原和一种或多种脂质组合物存在于同一制剂中。在其它实施方案中,抗原与一种或多种脂质组合物存在于不同的制剂中。在抗原和一种或多种脂质组合物存在于同一制剂的实施方案中,抗原和一种或多种脂质组合物的 $K_d$ 大于或等于10 $\mu$ M的。脂质组合物和抗原的给药可以同时或分别发生。

[0088] 在抗原和脂质组合物同时给药的实施方案中,脂质组合物和抗原可以存在于相同制剂中或存在于不同的制剂中。

[0089] 在抗原和脂质组合物存在于相同制剂中的实施方案中,它们可以是络合的或未络合的。在一个实施方案中,抗原和脂质组合物(例如OPLS)是松散结合的或者未结合的)。

[0090] 在将抗原和脂质组合物相继给药的实施方案中,可首先给药抗原或脂质组合物,条件是无论第二次给药哪个组分在空间和时间方面都靠近第一次给药,以便使它们一起存在。给药顺序无关紧要。在一个实施方案中,在彼此相距小于2英寸的解剖位置给药抗原和脂质组合物。可以在距离给药第一个组分的部位0.5、1、1.5或2英寸的部位给药第二个组分。在一个实施方案中,在彼此相距24小时内给药抗原和脂质组合物。在给药第一个组分的时间起0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、120、240、300、480、600、720、1080或1440分钟内可以进行第二个组分的给药。在一个优选的实施方案中,它们通过相同或相似的皮肤途径给药。例如,都皮下给药,或者抗原皮下给药,脂质组合物经皮给药。

[0091] 在一个实施方案中,皮下给药(如通过皮下注射)抗原(例如,蛋白、肽或多肽),并

将OPLS通过局部途径递送到相同或附近的部位。对于局部或透皮递送,可以在无菌条件下将OPLS与药学上可接受的载体混合,并具有合适的防腐剂、缓冲剂或抛射剂。局部制剂还可以包含另外的赋形剂,如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄耆胶、纤维素衍生物、聚乙二醇类、硅酮类、膨润土类、硅酸、滑石和氧化锌或它们的混合物。局部制剂可以为液体类、乳剂、喷雾剂或起泡剂。该制剂还可以包含另外的赋形剂,例如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末或这些物质的混合物。喷雾剂或起泡剂可以另外含有常规的抛射剂,如氯氟烃类和挥发性未取代烃类,如丁烷和丙烷。在一个实施方案中,可以使用皮肤贴剂。这些具有额外的优势:为该部位提供可控的递送。这种剂量形式可以通过将OPLS溶解或分散在合适的介质中并将该制剂施加到贴剂的一部分而制成。吸收增强剂可用于增强OPLS流入和穿过皮肤。这种流入的速率可以通过提供速率控制膜或将活性成分分散在聚合物基质或凝胶中来控制。在一个实施方案中,将OPLS组合物施加于皮肤贴剂、绷带剂、粘性绷带剂、测量仪器或可以直接应用到所期望的区域的其它类似的材料。临用前可以通过密封、可移除的覆盖物来保护OPLS组合物存在于其上的皮肤贴剂的一部分(例如粘性绷带)。通过相同或不同的可移除覆盖物还可以保护粘性表面。在使用时,可以移除一个或多个覆盖物,以及施于将OPLS递送到的区域或经由所期望的皮肤的条带或贴片。

[0092] 在本公开的一个方面,提供了对减少抗原的免疫原性或改进抗原的药代动力学性质或降低抗原特异性B记忆细胞数量有用的试剂盒。在一个实施方案中,试剂盒包含OPLS和给药OPLS连同抗原的说明书以及任选的用于给药OPLS和/或抗原的给药装置。该试剂盒也可任选包括一种或多种抗原。用于给药OPLS和抗原的说明书可以指示这些应通过皮肤途径给药。该说明书还可以指示给药部位以及给药的时间或空间间隔。在一个实施方案中,说明书还可以指示可以在给药快开始之前(如给药的1分钟内或1至5分钟内)将OPLS和抗原结合以及可以将OPLS和抗原结合的温度范围(例如,20至26℃)。

[0093] 在一个实施方案中,试剂盒包含抗原(例如蛋白、肽或多肽)组分和脂质组合物组分。该试剂盒还可以包括一组用于制备和使用该组分的说明书。在一个实施方案中,脂质组合物选自OPLS和PS脂质体所组成的组。在一个实施方案中,如本文所述的,PS脂质体选自PS/PC(与任选地PE,其中PC浓度为1-10mol%,PEmol%替换PC量)和PS/PI所组成的组。在一个实施方案中,试剂盒包含冻干形式的抗原(例如因子VIII)、用于制备用于给药(如皮下给药)的抗原和/或脂质组合物(如OPLS)的重组介质的组、脂质组合物递送制品以及用于存储、制备和/或使用各种组分的一组说明书。在一些实施方案中,重组介质由选自磷脂酰丝氨酸、磷脂酰胆碱以及它们的组合所组成的组的脂质组成。在其他实施方案中,重组介质为OPLS溶液。重组介质是缓冲溶液,但是如本公开所定义的重组介质可以包含或不包含脂质。如果重组介质不含脂质,那么试剂盒中的其它小瓶会提供必要的脂质。如果是这样的话,它可以是任何包括OPLS的含磷脂酰丝氨酸的溶液。脂质组合物递送制品可以是具有由脂质组合物(如OPLS和PS脂质体)组成的液体制剂或冻干制剂的容器、预装有脂质组合物的注射器、含有由用于局部施用的脂质组合物组成的制剂的喷雾容器或发泡容器或包括由脂质制剂组成的制剂的局部贴剂。在实施局部施用的实施方案中,由于OPLS穿透皮肤能力,它是优选的脂质组合物。该组说明书可为印刷材料或电子信息存储介质,例如拇指驱动器、电子卡等。该组说明书可提供关于组分的给药部位、组分的给药顺序和组分的给药频率和与预期用途相关的任何其它信息的说明。该试剂盒的各种组分可以在试剂盒中单独的小瓶

或容器中或作为一个单元(如在一个泡罩包装中的单独的隔室中)提供。

[0094] 在一个实施方案中,本公开提供了用于诱导针对抗原的免疫耐受性的方法,包括:  
a)提供包含OPLS、基本上不含抗原的第一组合物和包含抗原、基本上不含OPLS的第二组合物,和b)通过皮肤途径向个体分别给药第一组合物和第二组合物;其中,将两种组合物在彼此2英寸内的部位给药。抗原和OPLS可在等渗溶液(270至300mmol/kg)或高渗溶液(大于300mmol/kg)中给药。在各种实施方案中,制剂可以是治疗性的,其可以以治疗剂量或亚治疗剂量存在。可以每周一次或多次给药组合物之一或两者持续1至12周以上。如本公开中使用的术语“基本上不含”指的是存在于该组合物中的具体材料的量不足以具有任何可检测的临床相关的生物效应。例如,如果存在小于0.5mol%抗原,OPLS组合物基本上不含抗原。同样地,如果存在小于0.5mol%OPLS(或脂质组分),抗原组合物基本上不含OPLS(或其它脂质组分)。在一些实施方案中,抗原或OPLS的组合物中分别存在小于0.4、0.3、0.2、0.1、0.05mol%OPLS或抗原。

[0095] 在一个实施方案中,本公开提供了用于诱导针对抗原的免疫耐受性的方法,包括向个体给药包括OPLS和亚治疗量的抗原的组合物。OPLS和亚治疗剂量的抗原可以是存在于单独的组合物或同一组合物中。当存在于同一组合物中时,OPLS和抗原是这样的:它们是松散结合的或未结合的。可以经由相同或不同的皮肤途径递送该组合物。亚治疗剂量的治疗性抗原被定义为少于最低可接受的治疗剂量至少50%(即,它可以是1/2)的剂量。各种治疗剂的治疗剂量是临床医生和本领域技术人员所熟知的。在各种实施方案中,亚治疗剂量可以是治疗剂量的1/2到1/100的任何分数。在一个实施方案中,它可以是治疗剂量的1/100至1/500。作为一个例子,据认为FVIII的治疗剂量是40IU/kg至400IU/kg,亚治疗剂量为20IU/kg以下。在一个实施方案中,亚治疗剂量为约10IU/kg。作为另一个例子,GAA的临床或治疗剂量是20mg/kg,而亚治疗剂量为10mg/kg。在一个实施方案中,亚治疗剂量为1 $\mu$ g至1mg/kg。

[0096] 在一个实施方案中,本公开提供用于诱导针对抗原的免疫耐受性的方法,包括向个体给药包括OPLS和治疗量的抗原的组合物。OPLS和治疗剂量的抗原可以存在于单独的组合物或同一组合物中。当存在于同一组合物中时,OPLS和抗原是这样的:它们是松散结合的( $K_d$ 值为10 $\mu$ M至500 $\mu$ M)或未结合的( $K_d$ 值大于500 $\mu$ M)。可以通过相同或不同的皮肤途径递送该组合物。在一个实施方案中,制剂是抗体,其可以是多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、抗体片段或它们的组合。

[0097] 在一个实施方案中,本公开提供了用于在个体中诱导针对抗原的免疫耐受性的方法,包括a)从个体获得树突细胞;b)使树突细胞与OPLS和抗原体外接触;以及c)将树突细胞返回个体。树突细胞可同时或相继暴露于OPLS和抗原。可以使用治疗剂量或亚治疗剂量的抗原。在一个实施方案中,树突细胞可暴露于不只一种抗原。

[0098] 在一个方面,本公开提供了用于诱导免疫耐受性的试剂盒。该试剂盒可包括如以下的一种或多种:包括OPLS的组合物(基本不含或完全不含抗原);包括一种或多种抗原的组合物(基本上不含或完全不含OPLS或其它脂质组分);经由皮肤途径给药的说明书,或用于体外暴露细胞的说明书;任选的一个或多个用于给药组合物的给药装置。给药装置可以是注射器、注射笔、皮肤贴片等。

[0099] 给出以下实施例用以说明本发明。它们不是为了以任何方式进行限制。

[0100] 实施例1

[0101] 该实施例提供了给药OPLS抗原组合物的表征。

[0102] 材料:全长重组人FVIII(Baxter Biosciences, Carlsbad, CA)由纽约西部血友病基金会馈赠。卵和人IgG来自Sigam(St. Louis, MO)阿达木单抗和利妥昔单抗是市售可得的。对于本公开,阿达木单抗是由药店市售的。O-磷酸基-L-丝氨酸(OPLS)购自Sigma(Sr. Louis, MO)。所有的溶剂和缓冲盐购自Fisher Scientific(Fairlawn, NJ)或Sigma(St. Louis, MO)。抗FVIII单克隆抗体ESH8购自美国Diagnostica Inc.(Greenwich, CT)。山羊抗小鼠IgG购自Southern Biotechnology Associates, Inc.(Birmingham, AL)。牛血清白蛋白(BSA)购自Sigma(St. Louis, MO),而磷酸酶底物系统(二乙醇胺缓冲液和磷酸对硝基苯酯)购自KPL Inc.(Gaithersburg, MD)。Chromogenix Coamatic FVIII分析试剂盒购自DiaPharma Group(West Chester, OH)以用于检测血浆中的FVIII。抗卵IgG抗体效价分析试剂盒购自Alphadiagnostic International。

[0103] 在体内皮下给药之后OPLS对FVIII的免疫原性的影响:将21只6至8周龄之间的HA小鼠分成3组,组1在腹部接受1 $\mu$ g的FVIII皮下给药。组2在腹部接受1 $\mu$ g FVIII加0.4mg OPLS皮下给药,组3在腹部接受1 $\mu$ g FVIII加5mg OPLS给药。将FVIII与OPLS在37 $^{\circ}$ C孵育30分钟保证络合,但对于本实施例,室温下(22 $^{\circ}$ C)在所需的浓度下将OPLS和FVIII结合并立即给药(1分钟之内)。给予这种处理1、8、10和12天,最后一次注射后三天处死动物。血液在4摄氏度7500rpm离心5分钟。然后转移血浆并储存在摄氏-80度直至分析。结果示于图3中。

[0104] 通过经典标准ELISA法测定总效价。将抗FVIII抗体(ESH8)用作对照。对对数转换的数据的算术平均值进行统计,图表报告为几何平均值。为了一致性,将板特定因子的值赋予非应答。

[0105] 在O-磷酸基-L-丝氨酸存在和不存在下HA小鼠中的FVIII的PK:将60只6至8周龄之间的HA小鼠分成2组,每组30只动物。第一组在腹部接受5IU/g FVIII,每只注射后按摩60秒。第二组在腹部接受FVIII加OPLS(5IU/g FVIII加0.4mg OPLS),随后进行如上按摩。在以下预先设定的时间点4、6、9、12、15、18、24、33和44小时处死来自每组的3只动物。收集全血以及腹股沟淋巴结。在4摄氏度7500rpm离心血液5分钟。所有样本储存在-80摄氏度直至分析。根据制造商的说明书使用Coamatic Factor VIII试剂盒(DiaPharma West Chester, OH, USA)分析法对样本进行分析。

[0106] 静脉共同给药OPLS和生物治疗药物(例如FVIII)对药代动力学的影响很小:仅看到血浆暴露略有增加(图4)。然而,皮下共同给药生物治疗药物与OPLS或PS脂质体提高了从皮下空间的淋巴摄取(这是大的蛋白质的关键摄取途径),并且与皮下给药单独的生物治疗药物的相比其提高了生物利用度。当皮下给药时,OPLS能够有效地阻止生物治疗药物从体内被快速清除。在淋巴中改善的淋巴摄取和延长的停留时间转化为延长的血浆暴露(图5)。

[0107] 在蛋白抗原(FVIII)存在和不存在下OPLS对骨髓来源的树突细胞(BMDC)的细胞因子谱的影响:骨髓分离自2只6至8周龄之间的HA小鼠。简单地说,将骨髓培养于补充有胎牛血清白蛋白、2-巯基乙醇、Pen/Strip和GM-CSF的RPMI培养基中。培养第3、6和8天更换培养基并在第9天或10使用DC。这种延长的培养方法在第9或10天产生70-80%的未成熟DC。收获DC后,将它们暴露于以下处理组之一:空白(阴性对照)、单独的FVIII(阳性对照)、FVIII与逐渐增加剂量的OPLS 10mM、50mM和100mM OPLS、单独OPLS(100nM)和脂多糖(Lipopolysaccharides)(炎症反应阳性对照)。细胞一式三份铺板,制作2组。一组用于细胞因



子分析,在收集培养基之前被允许保持培养72小时以用于细胞因子分析。使用标准ELISA (DuoSet ELISA kit,R&D System Inc.Minneapolis,MN,USA)测定TGF- $\beta$ ,TNF- $\alpha$ 和IL-6的浓度。另一组在移除培养基之前被允许保持培养24小时,DC与分离自暴露于如下使用FVIII的攻击性免疫方案的HA小鼠的脾脏的CD4<sup>+</sup>T细胞共培养:第一周:星期一皮下给予1 $\mu$ g FVIII。第二周:周一、周三和周五那些日子的每天皮下给予1 $\mu$ g FVIII。在最后一次免疫后72小时处死动物并收集粉碎脾脏,使用负分离试剂盒(Miltenyi Biotec,Auburn,CA,USA)按照制造商的步骤分离CD4<sup>+</sup>T细胞。与CD一起共培养72小时后,除去上清液,并使用标准ELISA进行细胞因子分析来测定由T细胞产生的TGF- $\beta$ 和IL-17。(DuoSet ELISA kit,R&D System Inc.Minneapolis,MN,USA)。结果示于图1。

[0108] 使用荧光光谱对OPLS与数种治疗性蛋白质的结合进行了评价(图2)。随着OPLS浓度增加荧光发射降低。相比于GAA和Ova,FVIII的荧光强度变化是最高的。基于光谱滴定法评估的结合常数表明,FVIII以最高的亲和力与OPLS结合,而以最低亲和力与GAA和Ova结合。FVIII的高亲和力与推定的脂质结合结构域的存在相一致。

#### [0109] 实施例2

[0110] 本实施例描述了在体内皮下给药后OPLS对卵清蛋白(Ova)的免疫原性的影响:

[0111] 方法:14只6至8周龄之间的SW小鼠分成2组:组1在腹部接受1 $\mu$ g Ova皮下给药。组2在腹部接受1 $\mu$ g Ova/5mg OPLS皮下给药。在第1、8、10和12天给予这种处理一次。在最后一次注射后三天处死动物。血液在4摄氏度7500rpm离心5分钟。然后移除血浆并储存在-80摄氏度直到分析。按照制造商的说明(Alphadiagnostic International),使用抗Ova IgG效价分析试剂盒获得效价值。对对数转换的数据的算术平均值进行统计,图表报告为几何平均值。为了一致性,将板特定因子的值赋予非应答。

[0112] 如图6(a)所示,经皮下途径共同给药OPLS(Sigma公司)(5mg剂量)和Ova(Sigma)(1 $\mu$ g)的小鼠中的抗Ova抗体效价比单独给药(也通过皮下途径)Ova(1 $\mu$ g)的小鼠中的抗Ova抗体效价低。在这种情况下,OPLS和Ova之间不存在结合表明,当OPLS与Ova共同给药时,见到的免疫原性的降低是由于上述免疫机制(不同于耐受性诱导)。

#### [0113] 实施例3

[0114] 本实施例描述了OPLS对酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶蛋白(GAA)的免疫原性的影响

[0115] 材料和方法:GAA来源:在由Creative Biomart(Shirley,NY)供我们的使用的人肾胚胎细胞中产生全长重组rhGAA;OPLS来源:Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)。四周每周一次用100 $\mu$ L无菌TRIS中的1 $\mu$ g GAA(GAA组)或用100 $\mu$ L无菌TRIS中的5mg OPLS和1 $\mu$ g GAA(OPLS-GAA组)以皮下注射对n=8只动物/组进行免疫。一组8只小鼠接受相同剂量的5mg O-磷酸基-D-丝氨酸(OPDS)溶液中CBrhGAA作为阴性对照。2周休息后,从隐静脉收集血液样本。样本储存在-80 $^{\circ}$ C直至分析。然后对这些样本分析抗GAA抗体效价。抗GAA抗体效价测量如下:用50 $\mu$ L 5 $\mu$ g/mL pH=9.6碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中的无菌rhGAA对ELISA板(maxisorp,NUNC)进行包被。该板在40 $^{\circ}$ C孵育过夜。用含有0.05%吐温20的PBS(PBS-T 250 $\mu$ L/孔)使用自动板洗涤器洗涤该板六次。该板用含有1%BSA(300 $\mu$ L/孔)作为封闭缓冲液的PBS在37 $^{\circ}$ C封闭2小时。用PBS-T洗涤该板六次。然后将系列稀释的样本(100 $\mu$ L/孔)添加到板中一式两份。样本在37 $^{\circ}$ C培养1小时。用PBS-T洗涤该板六次。将封闭缓冲液中的检测抗体(1:10000稀释,100 $\mu$ L/孔)加入到孔中,并在室温培养1小时。用PBS-T洗涤该板六次。将3,3',5,

5'-四甲基联苯胺底物(加入100 $\mu$ L/孔)添加到孔中,并在室温孵育30分钟。用2N硫酸停止反应并立即使用酶标仪在450nm读数。使用如Frey等人描述的统计端点方法定量效价值。在每个板上设置对照血浆样本。统计分析:统计差异( $p < 0.05$ )单因素ANOVA,然后利用GraphPad Prism进行Dunnett事后多重比较检验(Frey等人, J. Immunol. Methods, 1998. 221(1-2): p. 35-41)。

[0116] 如图6(c)所示,由皮下途径共同给药(a)OPLS(5mg剂量)和GAA或(b)OPDS(5mg剂量)和GAA的小鼠中的抗GAA抗体效价比给药单独的GAA(也通过皮下途径)的小鼠中的抗GAA抗体效价低。共同给药OPLS和GAA的小鼠中的抗GAA效价水平是最低的。在共同给药OPDS和GAA的小鼠中见到的抗GAA抗体效价的轻微减少可能归因于OPLS体内转化为OPDS。在这种情况下,不存在OPLS和GAA之间的结合表明,当共同给药OPLS与GAA时见到的免疫原性的降低是由于上述免疫机制(不同于耐受性诱导)。在共同给药PS-脂质体与GAA之后观察到类似的结果(图10)。

[0117] 实施例4

[0118] 本实施例描述了OPLS对阿达木单抗的免疫原性的影响。

[0119] 方法:四周每周一次用100 $\mu$ L无菌TRIS中的10 $\mu$ g阿达木单抗(阿达木单抗组)或用100 $\mu$ L无菌TRIS中的5mg OPLS和10 $\mu$ g阿达木单抗(OPLS-阿达木单抗组)以皮下注射对 $n = 8$ 只动物/组进行免疫。2周休息时间后,从隐静脉收集血液样本用于效价分析。通过经典夹心ELISA获得效价值。简言之,在4 $^{\circ}$ C用2.5 $\mu$ g/mL Humira以50 $\mu$ L/孔对Nunc-Maxisorb 96孔平板进行包被过夜。然后洗涤板并用1%牛血清白蛋白(封闭缓冲液)对板进行封闭。将各种稀释的样本以50 $\mu$ L/孔加入到该板中并在室温孵育2小时。将来自动物的血浆样本暴露于作为对照的假处理(仅有缓冲液)。然后洗涤板,并在室温下与封闭缓冲液中1:50000稀释的50 $\mu$ L山羊抗小鼠抗体-HRP缀合物孵育1小时。用100 $\mu$ L TMB溶液显影颜色20分钟。使用100 $\mu$ L 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>停止反应。使用酶标仪测定405nm处的光密度。为了一致性,将板特定因子的值赋予非应答。

[0120] 如在图6(d)所示,在四周每周一次注射随后2周洗脱期之后,皮下途径共同给药OPLS(5mg剂量)和HUMIRA<sup>®</sup>(10mg/g)的小鼠中的抗Humira抗体效价比单独给药(也经由皮下途径)HUMIRA<sup>®</sup>(10mg/g)的小鼠中的抗Humira抗体效价低。通过经典夹心ELISA法获得效价值,在用血浆样本与稀释物孵育之前,用Humira对板进行包被,用大鼠抗-小鼠-HRP缀合抗体检测抗-Humira抗体。在这种情况下,OPLS和HUMIRA<sup>®</sup>之间的弱结合表明,当共同给药OPLS与HUMIRA<sup>®</sup>时见到的免疫原性的降低是由于上述免疫机制(不同于耐受性诱导)。非常值得怀疑的是,这里见到的弱结合是“屏蔽”免疫表位。

[0121] 实施例5

[0122] 本实施例描述了OPLS对人IgG的免疫原性的影响。

[0123] 材料和方法:8只动物用于该初步研究,用单独的人IgG(Sigma)(1 $\mu$ g)或(1 $\mu$ g)或用人IgG加OPLS(1 $\mu$ g人IgG加0.4mg OPLS)对4只动物进行注射。以2周期间的4次注射完成该研究,如下:第1天、第8天、第10天、第12天,随后3天洗脱期。进行ELISA测定总效价。简言之,在4 $^{\circ}$ C用2.5 $\mu$ g/mL人IgG以50 $\mu$ L/孔对Nunc-Maxisorb 96孔板进行包被过夜。然后对板进行洗涤并用1%牛血清白蛋白(封闭缓冲液)对板进行封闭。将各种稀释的样本以50 $\mu$ L/孔加入到该板中并在室温下孵育2小时。将来自动物的血浆样本暴露于作为对照的假处理(仅有缓冲

液)。然后对板进行洗涤,并在室温下用50 $\mu$ L封闭缓冲液中1:50000稀释的山羊抗小鼠抗体-HRP缀合物孵育1小时。用100 $\mu$ L TMB溶液显影颜色20分钟。100 $\mu$ L 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>用于停止反应。使用酶标仪测定405nm处的光密度。为了一致性,将板特定因子的值赋予非应答。

[0124] 在这个初步研究中,用单独的人IgG抗体(Sigma)(1 $\mu$ g)或与OPLS(5mg)一起对动物进行注射。以2周期间的4次注射完成该研究,如下:第1天、第8天、第10天、第12天,随后3天洗脱期。如上所述通过经典ELISA法获得效价。如图7所示,经皮下途径共同给药OPLS(0.4mg剂量)和IgG的小鼠中的抗IgG抗体效价比单独给药IgG(也经由皮下途径)的小鼠中的抗IgG抗体效价低。可以预期的是,当与IgG共同给药时,如测试的其它生物治疗药物所看到的,较高剂量(5mg以上)的OPLS对效价水平具有更加明显的影响。

[0125] 实施例6

[0126] 本实施例描述了OPLS对利妥昔单抗免疫原性(RXT)的影响。

[0127] 材料和方法:30只6至8周龄之间的SW小鼠分成3组:组1在腹部接受1 $\mu$ g RXT皮下给药。组2在腹部接受1 $\mu$ g RXT/0.4mg OPLS皮下给药。组3在腹部接受1 $\mu$ g RXT/5mg OPLS皮下给药。在第1、8、10和12天给予这种处理一次。在最后一次注射后三天处死动物。血液在4摄氏度7500rpm离心5分钟。然后转移血浆并储存在-80摄氏度直到分析。通过经典标准ELISA测定总效价。简言之,在4 $^{\circ}$ C用2.5 $\mu$ g/mL RXT以50 $\mu$ L/孔对Nunc-Maxisorb 96孔板进行包被过夜。然后对板进行洗涤并用1%牛血清白蛋白(封闭缓冲液)对板进行封闭。将各种稀释的样本以50 $\mu$ L/孔加入到该板中并在室温下孵育2小时。将来自动物的血浆样本暴露于作为对照的假处理(仅有缓冲液)。然后对板进行洗涤,并在室温下用50 $\mu$ L封闭缓冲液中1:50000稀释的FC-特异性抗体-HRP缀合物孵育1小时。用100 $\mu$ L TMB溶液显影颜色20分钟。100 $\mu$ L 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>用于停止反应。使用酶标仪测定405nm处的光密度。为了一致性,将板特定因子的值赋予非应答。对对数转换的数据的算术平均值进行统计,图表报告为几何平均值。为了一致性,将板特定因子的值赋予非应答。

[0128] 如图8所示,经皮下途径共同给药以剂量依赖的方式5mg OPLS和0.4mg RXT的小鼠中的抗RXT抗体效价比给药单独的RXT(也经由皮下途径)的小鼠中的抗RXT抗体效价低。

[0129] 实施例7

[0130] 本实施例描述了OPLS和PS-脂质体对酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)肽免疫原性的影响

[0131] 材料和方法:GAA肽来源:该GAA肽是由美国Peptide Company(Sunnyvale,CA)制备。他们为我们制备长13个氨基酸、含有GAA全长序列的339-352位氨基酸的肽,YIFLGPEPKSVVQ。OPLS来源:Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)肽浓度剂量:10 $\mu$ g/注射。单独GAA肽(n=4),PS-GAA肽(n=4)以及OPLS-GAA肽(N=5)。每只小鼠在靠近其处理的100 $\mu$ L/注射的尾根部接受四周每周一次皮下(S.C.)注射。在最后一次注射后两周,从每只小鼠取眼球后血液样本。将样本储存在-80 $^{\circ}$ C直至分析。然后分析这些样本的抗GAA肽抗体效价。抗GAA肽抗体效价测定如下:用100 $\mu$ L pH=9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中的10 $\mu$ g/mL无菌rhGAA对ELISA板(maxisorp,NUNC)进行包被。该板在40 $^{\circ}$ C孵育过夜。使用自动板洗涤器用含有0.05%吐温20的PBS(PBS-T,250 $\mu$ L/孔)洗涤该板六次。在37 $^{\circ}$ C用作为封闭缓冲液的含有1% BSA的PBS(300 $\mu$ L/孔)对该板进行封闭2小时。用PBS-T洗涤该板6次。该板用PBS-T洗涤6次。然后将系列稀释液的样本(100 $\mu$ L/孔)一式两份添加到板中。样本在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。该板用PBS-T洗涤6次。将封闭缓冲液中的检测抗体(1:10000稀释,100 $\mu$ L/孔)加入到孔中,并在室

温孵育1小时。该板用PBS-T洗涤6次。将3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物(加入100 $\mu$ L/孔)添加到孔中,并在室温孵育30分钟。用2N硫酸停止反应并使用酶标仪在450nm立即读数。使用如Frey等人描述的统计端点方法定量效价值。在每个板上设置对照血浆样本。统计分析:统计差异( $p < 0.05$ )单因素ANOVA,然后利用GraphPad Prism进行Dunnett事后多重比较检验。

[0132] 如图9所示,经皮下途径共同给药(a)OPLS(5mg剂量)和GAA肽经或(b)PS-脂质体(PS/PC,1:10,000蛋白:脂质比,基于蛋白质的分子量)和GAA肽的小鼠中的抗GAA肽抗体效价比给药单独的GAA肽(也经皮下途径)的小鼠中的抗GAA肽抗体效价低。共同给药OPLS和GAA的小鼠中的抗GAA肽效价水平是最低的。

[0133] GAA肽没有结合至OPLS。由于GAA肽不具有内部荧光,相比于其它蛋白质-OPLS结合研究,我们需要使用不同方法。采用紫外/可见光谱来代替使用荧光来检测结合。

[0134] 实施例8

[0135] 本实施例描述了使用OPLS和PS-脂质体诱导针对GAA蛋白的耐受性。

[0136] 材料:在由Creative Biomart(Shirley,NY)供我们使用的人肾胚胎细胞中产生全长重组rhGAA。二肉豆蔻磷脂酰胆碱(DMPC)、磷脂酰甘油(PG)和脑磷脂酰丝氨酸(PS)购买自Avanti Polar Lipids(Alabaster,AL.)。O-磷酸基-L-丝氨酸(OPLS)、山羊抗小鼠IgG辣根过氧化物酶、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物购自Sigma-Aldrich(St.Louis,MO)。动物:庞贝氏症小鼠繁殖对购自杰克逊实验室(Bar Harbor,Maine)。构建用于基因敲除的克隆纯合子,并且8至12周龄的动物用于体内研究。

[0137] 利用OPLS的GAA耐受性。方法:四周每周一次皮下注射100 $\mu$ L无菌TRIS中的1 $\mu$ g GAA(GAA组)或100 $\mu$ L无菌TRIS中的5mg OPLS和1 $\mu$ g GAA(OPLS-GAA组)对n=8只动物/组进行免疫。一组8只小鼠接受5mg O-磷酸基-D-丝氨酸(OPDS)溶液中的相同剂量的GAA作为阴性对照。2周休息后,从隐静脉收集血液样本。然后,用无菌TRIS中的1 $\mu$ g单独GAA对小鼠进行4周的再次攻击。在另外2周休息期后处死小鼠,收集血浆,然后存储在-80 $^{\circ}$ C直至通过ELISA分析抗GAA抗体效价。

[0138] 利用PS-脂质体的GAA耐受性。方法:四周每周一次皮下注射100 $\mu$ L无菌TRIS中的1 $\mu$ g GAA(GAA组)或100 $\mu$ L PS脂质体制剂(30%PC,70%DMPC)中的1 $\mu$ g GAA对n=8只动物/组进行免疫。一组8只小鼠接受PG30脂质体制剂(30%PG,70%DMPC)中的相同剂量的GAA作为阴性、配对负载(charge-matched)对照。2周休息后,从隐静脉收集的血液样本。然后,用无菌TRIS中的1 $\mu$ g单独GAA对小鼠进行4周的再次攻击。在另外2周休息期后处死小鼠,收集血浆,然后存储在-80 $^{\circ}$ C直至通过ELISA分析抗GAA抗体效价。

[0139] 抗-GAA抗体效价。用50 $\mu$ L pH=9.6的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中的5 $\mu$ g/mL无菌GAA对ELISA板(maxisorp,NUNC)进行包被。在4 $^{\circ}$ C对该板进行过夜孵育。使用自动板洗涤器用含有0.05%吐温20的PBS(PBS-T,250 $\mu$ L/孔)洗涤该板六次。在37 $^{\circ}$ C用作为封闭缓冲液的含有1%BSA的PBS(300 $\mu$ L/孔)对该板进行2小时的封闭。用PBS-T洗涤该板6次。然后将系列稀释的样本(100 $\mu$ L/孔)一式两份添加到板中。样本在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。该板用PBS-T洗涤6次。将封闭缓冲液中的检测抗体(1:10000稀释,100 $\mu$ L/孔)加入到孔中,并在室温孵育1小时。该板用PBS-T洗涤6次。将TMB底物(100 $\mu$ L/孔)添加到孔中,并在室温孵育30分钟。用2N硫酸停止反应并使用酶标仪在450nm立即读数。使用如Frey等人描述的统计端点方法定量效价值。(Journal of Immunological Methods,1998.221(1-2):p.35-41)。在每个板上设置对照血

浆样本。统计分析：统计差异( $p < 0.05$ )单因素ANOVA,然后利用GraphPad Prism的Dunnett进行事后多重比较检验。

[0140] 结果：如图13所示,发现在GAA再次攻击之后用OPLS-GAA处理的动物的抗GAA抗体效价比用单独GAA处理的动物的抗GAA抗体效价显著低。如图14所示,发现在GAA再次攻击之后用GAA-PS脂质体处理的动物的抗GAA抗体效价比用单独GAA处理的动物的抗GAA抗体效价明显更低。

[0141] 实施例9

[0142] 本实施例描述了PS介导的低反应性中的调节性T细胞

[0143] 方法：在血友病A小鼠模型中进行免疫研究。动物( $n = 3$ /处理组)每周接受单独FVIII或FVIII-PS( $2\mu\text{g}$  FVIII)皮下注射持续12周。在最后一次注射后两周,从免疫的动物的脾中分离CD4<sup>+</sup>T细胞,用缀合到CD4抗体的FITC和缀合到抗FoxP3抗体的PE进行染色。使用流式细胞仪分析双阳性细胞。为了说明FITC和PE的光谱重叠,获取使用单一标记的FITC对照和单一标记的PE对照补偿,利用FlowJo软件进行补偿。利用Minitab软件采用单-尾配对t检验进行统计分析。

[0144] 结果：作为调节性T细胞的生物标志物分析Foxp3表达。与单独的FVIII处理组相比,FVIII-PS处理组的CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>双阳性细胞明显更高(图16)。

[0145] 实施例11

[0146] 本实施例描述了PS-介导的低反应性中记忆B细胞的作用。

[0147] 方法：在GFP-FoxP3敲入血友病A小鼠模型中进行免疫研究。动物( $n = 7$ 或 $8$ /处理组)每周接受单独FVIII或FVIII-PS或FVIII-PG30( $2\mu\text{g}$  FVIII)皮下注射持续12周。留下一组动物( $n = 5$ )不进行处理,作为空白对照。在最后一次注射后两周,处死所有的动物并从它们的脾中分离记忆B细胞。将约 $0.1 \times 10^6$ 个来自所有小鼠的记忆B细胞通过阴茎静脉继承性转移到相应的各个空白的GFPFoxP3血友病小鼠中。经过48小时等待期间,以四周每周一次皮下注射 $1\mu\text{g}$ 单独FVIII/注射对所有受体动物进行攻击性免疫。在最后一次注射后两周,处死所有动物并收集它们的血浆样本用于抗体效价水平分析。

[0148] 结果：分析血浆样本的总抗FVIII抗体效价水平的存在。接受来自FVIII处理的小鼠或者来自空白(未处理)小鼠的记忆B细胞的小鼠产生强烈的FVIII免疫反应。相比较而言,接受来自PS-FVIII处理的供体小鼠的记忆B细胞的小鼠表现出显著降低的抗FVIII抗体效价。然而,从用与其它阴性负载PG脂质(FVIII-PG)相关联的FVIII处理的小鼠转移的记忆B细胞未能显著降低抗体效价(图17)。

[0149] 实施例11

[0150] 本实施例描述了对于诱导免疫耐受性的接近的要求。

[0151] 持续四周在小鼠的一侧胁腹注射空载PS脂质体并在小鼠另一侧胁腹注射单独FVIII,然后在处死前用单独FVIII对小鼠进行再次攻击四周。如果空间接近不是关键的,那么用空间分离的PS和FVIII处理应该导致效价降低。然而,数据表明,中和效价( $425 \pm 100\text{SEM}$ ,  $n = 5$ )和总抗FVIII效价( $8197 \pm 1235\text{SEM}$ ,  $n = 5$ )与单独FVIII对照没有明显不同;单独FVIII对照的中和效价为 $469 \pm 63.3\text{SEM}$  ( $n = 5$ ),总抗FVIII效价为 $5153 \pm 893\text{SEM}$  ( $n = 5$ ) (分别见图18和19)。在两个处理组之间没有看到显著差异。这表明,对于通过PS制剂诱导对FVIII的持久低反应性,空间接近是必需的。

[0152] 针对外源FVIII给药的免疫反应的发展是主要的临床关注。15%-30%接受替代治疗的患者体内出现中和抗体,这降低了这种治疗对于A型血友病患者的功效。扭转这种免疫原性的目前的策略需要大剂量的FVIII与免疫抑制剂一起给药较长一段时间,经常长达一年。这种策略是昂贵的且对治疗期间他们的免疫系统受损的病人来说进行它有相当大的风险。因此,开发新的降低FVIII免疫原性的方法是极其重要的。

[0153] 以前的研究已经表明在血友病小鼠中FVIII与PS的络合降低针对FVIII的免疫反应。通过PS-FVIII制剂诱导针对FVIII的低反应性可以被认为是“反向疫苗”策略。不是试图建立针对抗原的免疫反应,治疗的目的是使患者对抗原不敏感。如果实现它的机制类似于凋亡细胞诱导针对它们的细胞内蛋白的耐受性的方法,那么该低反应性应当是抗原特异性的。非特异性反应也是临床上不期望的,因为它会导致免疫抑制。

[0154] 为了发展低反应性,FVIII和PS之间需要空间接近,因为细胞凋亡是发生在细胞水平上的局部事件。为了进行测试,小鼠在一侧胁腹接受空载PS脂质体,并在另一侧胁腹接受单独FVIII,并用单独FVIII对小鼠进行再次攻击。当与单独FVIII对照相比时,这些小鼠在对FVIII免疫反应方面没有表现出差别。该数据表明,为了发展低反应性,需要紧密的解剖接近。该观察为PS-FVIII利用细胞凋亡拟态而诱导对FVIII的耐受性的理论提供了支持。

[0155] 总之,由该数据明显看出PS-FVIII脂质体制剂的免疫学作用对作为抗原的FVIII以及与含PS的脂质体解剖学上接近的FVIII均具有特异性。这些结论是与如下假设相一致:经由细胞凋亡拟态的耐受性诱导是由于反向疫苗PS-FVIII疗法观察到的免疫反应降低的机制。未来的研究应当解决含有PS的脂质体制剂扭转既定效价以及诱导针对除了FVIII之外的抗原的低反应性的可能性。

[0156] 实施例12

[0157] 本实施例描述了树突细胞中的细胞凋亡诱导

[0158] 磷脂酰丝氨酸是天然存在的脂类,是通过细胞凋亡释放的囊泡和其它细胞类型的一部分,包括外来体、核外颗粒体、微泡、膜颗粒和凋亡小体。在一个实施方案中,可将分离后的蛋白装载入这些颗粒中,并可用于降低免疫原性和/或诱导耐受性。从因子VIII缺乏的小鼠的骨髓祖细胞中分离树突细胞。简言之,从股骨和胫骨收集骨髓细胞。细胞培养8天,每两天更换培养基。在第8天,从悬浮液RPMI培养基收集细胞,离心并接种在新板上。然后未成熟树突细胞用于诱导细胞凋亡。

[0159] 在几个方面测试树突细胞中的细胞凋亡诱导。所测试的方法的一部分是通过添加5mM的丁酸钠总浓度、45℃热休克1小时和血清贫化24小时利用8W UV透照仪UV照射1小时/5min时间点。48小时诱导后,以300g 10min将细胞沉淀下来,随后以2000-10000g 20分钟除去细胞碎片,其中对于外来体需要100000g。利用荧光显微镜,使用购自Sigma的膜联蛋白V/碘化丙啶试剂盒测试细胞凋亡诱导效率。可用蛋白(FVIII、GAA、Humira等)装载这些凋亡小体和囊泡以降低免疫原性和诱导耐受性。

[0160] 实施例13

[0161] 本实施例描述了OPLS的安全性的表征

[0162] 鉴于本文所公开的方法似乎以等于或超过5mg的OPLS剂量工作最好,了解高剂量的OPLS的安全性和毒性是重要的。如图11-14反复所示,在啮齿类和灵长类动物模型中高剂量(高达950mg)OPLS是耐受性良好的。

## [0163] 实施例14

[0164] 本实施例描述了OPLS-GAA相继给药研究。为了确定当OPLS和GAA两个在相同的注射部位分别间隔注射剂给药时是否OPLS对针对GAA的免疫反应可以发挥其免疫调节作用,进行了如下实验。小鼠( $n=6$ 只动物/组)以如下所示的四周每周1次注射皮下进行免疫。一组动物接受5mg OPLS和1 $\mu$ g rhGAA(100 $\mu$ L体积)的一次单一联合注射。重组人GAA由Creative Biomart产生。第二组接受5mg OPLS(100 $\mu$ L体积)的一次注射之后,在5分钟等待后它们在同一部位接受无菌TRIS(100 $\mu$ L体积)中1 $\mu$ g rhGAA的第二次注射。最后对照组接受无菌TRIS(100 $\mu$ L体积)的一次注射之后,在5分钟等待后它们在同一部位接受无菌TRIS(100 $\mu$ L体积)中1 $\mu$ g rhGAA的第二次注射。经过两周休息期,采集隐静脉血样。然后,四周每周一次以100 $\mu$ L无菌TRIS中的1 $\mu$ g rhGAA(一次单一注射)对所有老鼠进行再次攻击。通过ELISA完成总效价分析。结果如图26-28所示。6周后平均单独GAA为 $3135 \pm 910$ ,当共同给药时GAA为 $787 \pm 155$ ,当分别给药(相继地)时GAA为 $926 \pm 202$ (图26)。再次攻击后,在第11周末完成末端采样。结果如图27所示。11周后平均单独GAA为 $8775 \pm 2363$ ,当共同给药时GAA为 $895 \pm 335$ ,当分别给药(相继)时GAA为 $1884 \pm 761$ 。这表明:在再次攻击后后,与接受单独GAA的动物的效价相比,接受GAA与5mg OPLS共同给药或5mg OPLS注射后5分钟在相同位点给药GAA的小鼠的效价明显更低。无论哪种给药方法都能够诱导针对GAA的低反应性。6至11周的联合结果如图28所示。

## [0165] 实施例15

[0166] 在本实施例中,我们测试高渗缓冲液的影响。我们采用三种不同的赋形剂形成了高渗缓冲液体系:NaCl、甘露醇和O-磷酸基-L-丝氨酸(OPLS)。选择NaCl作为通用的盐调节渗透压强度。甘露醇是蛋白制剂中使用的常规GRAS(通常视为安全的)赋形剂。OPLS是免疫调节脂质磷脂酰丝氨酸(PS)的头部。所有三种赋形剂在水性介质中是高度可溶的。我们测试了这些赋形剂皮下给药Swiss Webster小鼠后对利妥昔单抗药代动力学的影响。

[0167] 材料和方法:Swiss Webster小鼠(19-22g)(SW)来自Charles River实验室(Wilmington,MA)。所有动物实验均按照布法罗大学,纽约州立大学,机构动物使用和管理委员会既定的准则进行。

[0168] 使用商业制备的利妥昔单抗(RXT)。大鼠抗利妥昔单抗抗体购自AbD Serotec(Raleigh,NC)。山羊抗小鼠FC特异性HRP缀合的抗体、3,3',5,5'四甲基联苯胺(TMB)底物系统、牛血清白蛋白(BSA)、O-磷酸基-L-丝氨酸(OPLS)和甘露醇购自Sigma(St.Louis,MO)。所有其它溶剂和缓冲盐由Fisher Scientific(Fairlawn,NJ)或Sigma(St.Louis,MO)购得。

[0169] 注射缓冲液的制备与表征:制备一种等渗TRIS缓冲液和六种不同的高渗TRIS缓冲液以研究高渗性和缓冲液组合物对利妥昔单抗淋巴摄取和血浆暴露的影响(表1)。

## [0170] 表1

[0171]

| 缓冲液 | 组合物        |            |            |           |     |                 |
|-----|------------|------------|------------|-----------|-----|-----------------|
|     | Tris<br>mM | NaCl<br>mM | OPLS<br>mM | 甘露醇<br>mM | pH  | 渗透强度<br>mmol/kg |
| A   | 25         | 150        | -          | -         | 7.5 | 300             |
| B   | 25         | 300        | -          | -         | 7.5 | 600             |
| C   | 25         | 300        | 20         | -         | 7.5 | 600             |

[0172]

|   |    |     |     |     |     |     |
|---|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| D | 25 | 300 | -   | 20  | 7.5 | 600 |
| E | 25 | 150 | 270 | -   | 7.5 | 600 |
| F | 25 | 150 | -   | 270 | 7.5 | 600 |

[0173] 使用25mM TRIS和150mM NaCl制备等渗TRIS缓冲(缓冲液A)。高渗(600mmol/kg) TRIS缓冲液用含有300mM NaCl的25mM TRIS制备(缓冲液B)。缓冲液“C”和“E”包含NaCl以及20mM OPLS或甘露醇。为了进一步描述缓冲液组合物对淋巴摄取的影响,我们制备了两个具有270mM OPLS(缓冲液D)或甘露醇(缓冲液F)的600mmol/kg缓冲液。因为这些缓冲液的渗透强度与缓冲液的“C”和“E”相同,淋巴摄取的任何变化将可归因于OPLS浓度和甘露醇浓度的增加。将pH调节至7.5。使用5500蒸汽压力渗透计根据制造商的说明(Wescor Inc. Logen UT, USA)测定渗透强度。

[0174] 利妥昔单抗药代动力学研究:126只雄性SW小鼠随机分为7组。每组由18只动物组成,PK曲线的每个时间点三只。给予每只动物配制在上述制剂(表1)之一中的1 $\mu$ g/g RXT。所有皮下注射均在与腹股沟淋巴结等距的腹部。由于预计做5天完成吸收,选择如下预设时间点1、5、15、24、48和120小时处死动物和采集样本。收集全血和两个腹股沟淋巴结。RXT分布由静脉注射PK分布来确定并与皮下注射研究产生的吸收数据缠绕。对于静脉注射PK研究,动物经阴茎静脉给予基础缓冲液(缓冲液A)中的1 $\mu$ g/g RXT。在以下时间点收集全血:0.5、2、15、24、48和120小时。4摄氏度7500rpm离心血液5分钟。所有样本储存在-80摄氏度直至分析。分析前立即将腹股沟淋巴结匀浆于冰上300 $\mu$ L PBS中,然后进行分析。

[0175] 血浆和淋巴结样本中的RXT分析:用标准ELISA对来自PK研究的血浆和淋巴结样本进行分析。简要地,在4 $^{\circ}$ C用100 $\mu$ L/孔的1 $\mu$ g/ml抗RXT抗体(AbD Serotec Raleigh, NC)包被Nunc-Maxisorb 96孔平板过夜。然后洗涤板并用1%牛血清白蛋白(封闭缓冲液)封闭。根据需要将样本以最终稀释度1:100或1:1000稀释到封闭缓冲液中并加入到板中。将封闭缓冲液中的RXT系列稀释液也加入到该板中用于标准曲线。采用100 $\mu$ L 5 $\mu$ g/mL山羊抗人-HRP缀合抗体作为检测抗体。用100 $\mu$ L TMB溶液显影颜色20分钟。利用50 $\mu$ L 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>用来停止反应。使用酶标仪在450nm处测定光密度。

[0176] 结果:静脉注射给药和皮下给药后SW小鼠中利妥昔单抗的药代动力学:在静脉注射和皮下给药等渗缓冲液A中的1 $\mu$ g/g剂量之后利妥昔单抗的血浆浓度-时间分布如图29所示。基于该数据,缓冲液A中的利妥昔单抗皮下生物利用度为0.29(29%)。由淋巴结摄取的



剂量的分数估计为0.05(总摄取剂量的5%)。

[0177] 高渗缓冲液组合物对利妥昔单抗的淋巴摄取的影响:为了阐明高渗缓冲液对淋巴摄取的影响,我们比较了对小鼠皮下给药等渗缓冲液(缓冲液A)或高渗缓冲液(缓冲液B)中的 $1\mu\text{g/g}$ 利妥昔单抗之后,离体的腹股沟淋巴结中利妥昔单抗的浓度。如图30所示,我们观察到,与缓冲液A相比,在高渗缓冲液B中给药的利妥昔单抗的淋巴结浓度增加。缓冲液A组中,在头2个时间点动物的淋巴结中回收利妥昔单抗,在剩余时间点动物的淋巴结中利妥昔单抗的含量低于我们的ELISA的检测极限。然而,缓冲液B组中所有动物在整个研究过程中具有它们的淋巴结中的利妥昔单抗。

[0178] 为了进一步描述高渗缓冲液组合物对淋巴摄取的作用,我们将在表1中剩余的5个缓冲液中给药的利妥昔单抗的淋巴结浓度与由缓冲液B获得的结果进行比较。如图31A所示,与缓冲液B相比,20mM OPLS高渗缓冲液(缓冲液C)中给药的利妥昔单抗的淋巴结浓度没有大幅升高,然而与缓冲液B和C相比,270mM OPLS(缓冲液E)导致淋巴结浓度增加。由于所有三个缓冲液中的渗透压强度是相同( $600\text{mOsmol}$ ),这使得由淋巴结摄取的剂量的分数增加,并且使得淋巴结浓度增加,这可能归因于对比缓冲液B和C以及缓冲液E中的OPLS浓度增加。

[0179] 有趣的是,当使用甘露醇时(缓冲液D和F),我们观察到与不含甘露醇的缓冲液B相比,在含甘露醇的缓冲液中给药的利妥昔单抗的淋巴结浓度增加(图31B)。与OPLS不一样,这个增加不依赖甘露醇的剂量。模型评估出由淋巴结摄取的剂量的分数不亚于两个缓冲液D和F中的;这也不亚于高剂量OPLS(缓冲液E)获得的估计值。该数据进一步支持了如下想法:缓冲液组合物在淋巴结摄取中起作用,因为在所有三个缓冲液中渗透压强度保持不变。

[0180] 高渗缓冲液组合物对利妥昔单抗血浆浓度和生物利用度的影响:为了研究改善的淋巴摄取是否会转化为改善的利妥昔单抗的生物利用度,对血浆样本进行分析以测定利妥昔单抗的浓度,然后如上所述建模。如图29所示,我们观察到,与等渗缓冲液A相比,在高渗缓冲液B中给药的利妥昔单抗的血浆浓度增加。接着,我们比较了缓冲组合物对生物利用度和血浆暴露的影响,这通过对剩下的5个缓冲液中的利妥昔单抗的血浆浓度时间分布与缓冲液B中的利妥昔单抗的血浆浓度时间分布进行比较而实现。图5A显示由含有OPLS的缓冲液(C和E)所获得的结果。数据显示,与缓冲液B(特别是在后面的时间点)相比,两个缓冲液的利妥昔单抗的血浆浓度增加。同样,与缓冲液B相比,含甘露醇的缓冲液D和F导致了较高的利妥昔单抗的血浆浓度。

[0181] 与等渗缓冲液相比,全部高渗缓冲液产生较高的利妥昔单抗的生物利用度。而且,该缓冲组合物影响生物利用度(bioava)。

[0182] 我们的数据表明,当在高渗缓冲液中给药利妥昔单抗( $600\text{mmol/Kg}$ )时,淋巴摄取得到改善。此外,该缓冲液的组合物在淋巴摄取中起作用,甘露醇和OPLS比仅含有NaCl的渗透压强度配对缓冲液表现更好。改善后的淋巴摄取与改善的血浆暴露和改善的利妥昔单抗的生物利用度密切相关。

[0183] 尽管不期望受任何特定理论的束缚,可以认为,皮下空间中的高渗缓冲液改变了间质环境的环境。这样的环境是间质液形成背后的驱动力。在正常情况下,血液滤过毛细血管床的小动脉末端,该过程由与毛细血管的小静脉末端相比在小动脉末端增加的液体静压驱动。毛细血管的下游,毛细血管内的胶体渗透压增加,这有利于将滤液再吸收回携带有它的废物和来自组织的副产物的血液。由高渗缓冲液导致的小间隙中的高渗透压改变了间质

环境的渗透条件,这增加了间隙体积,并从而增加淋巴引流。可以预期高渗缓冲液对皮下空间中的体积膨胀的影响将持续直到渗压强度恢复。这可以解释甘露醇和高剂量OPLS相对于单独的NaCl的优势。

[0184] 实施例16

[0185] 本实施例通过诱导树突细胞中的耐受性特性证明了OPLS降低了免疫原性。

[0186] 材料和方法:使用全长重组人FVIII(Baxter Biosciences,Carlsbad,CA)。O-磷酸基-L-丝氨酸(OPLS)购自Sigma(St.Louis,MO)。所有溶剂和缓冲盐均购自Fisher Scientific(Fairlawn,NJ)或Sigma(St.Louis,MO)。抗FVIII单克隆抗体ESH8购自美国 Diagnostica Inc.(Greenwich,CT)。热灭活优质牛血清白蛋白(BSA)购自Lonza Walkersville Inc.(Walkersville,MD)。RPMI-1640培养基购自Gibco Life Technologies (Carlsbad,CA)。EndosafeEndochrome-K®试剂盒购自Charles River Laboratories, (Charleston,SC)。NUNC Maxisorp 96孔板购自Thermoscientific(Waltham,MA)。细胞因子酶联免疫(ELISA)试剂盒购自R&D System Inc.(DuoSet)(Minneapolis,MN,USA)或 Invitrogen(Camarillo,CA)。DilC18(5)购自Sigma(St.Louis,MO)。BD FC-封闭、抗CD40-PE和抗MHCII-FITC抗体和各自的同种型分别购自BD Biosciences(San Jose,CA)或 eBiosciences(San Jose,CA)。

[0187] HA小鼠中的耐受性诱导研究:使用外显子16基因敲除转基因血友病小鼠(HA)的繁殖对。所有动物实验均按照布法罗大学,纽约州立大学,机构动物使用和管理委员会既定的准则进行。

[0188] 免疫和再次攻击方案:为了描述OPLS介导抗体效价降低是否是由于免疫耐受性或免疫抑制,我们进行了再次攻击实验。如图1所示,连续四周每周一次通过皮下注射1 $\mu$ g单独FVIII的无内毒素制剂或与5mg OPLS或200ng地塞米松一起用FVIII、FVIII加OPLS或FVIII加上地塞米松对四十只HA小鼠进行预处理。在含有25mM TRIS和150mM NaCl的pH 7.5TRIS缓冲液中制备注射剂。对于含有OPLS的制剂,将OPLS添加到缓冲液中并将pH值调节至7.5。注射前立即添加合适量的FVIII,以防止注射前FVIII和OPLS之间络合。低剂量的地塞米松(200ng/注射)多次给药是优选的以避免淋巴细胞活性的严重免疫抑制。这之后是2周的洗脱期。然后四周每周一次以1 $\mu$ g单独FVIII皮下给药对动物进行侵略性地再次攻击。在第十一周,处死动物,将血液收集于10%柠檬酸葡萄糖(ACD)中,离心,分离血浆。样本储存于-80℃直至分析。通过ELISA测定总抗FVIII效价水平。

[0189] 在存在和不存在OPLS下暴露于FVIII的BMDC的表征:在该组实验中,我们检测了在存在和不存在OPLS下OPLS对表型成熟、细胞因子谱和暴露于FVIII的来源骨髓的树突细胞(BMDC)的迁移潜力的影响。

[0190] 来源骨髓的树突细胞(BMDC)的产生:从6至8周龄空白HA分离骨髓。简言之,在补充有胎牛血清白蛋白(低内毒素)、2-巯基乙醇、青霉素/链霉素和200IU/mL GM-CSF的RPMI培养基中培养骨髓。在培养的第3、6和8天更换培养基,在第9天使用DC。然后收获BMDC,根据需要使用。为了验证骨髓细胞分化成DC,使用具有适当的同位素对照的抗CD11c-FITC抗体通过流式细胞仪确认CD11c表面表达。

[0191] OPLS对BMDC表型成熟的影响:接下来我们研究了OPLS对BMDC表型成熟的影响。在存在和不存在OPLS下,将BMDC暴露于1 $\mu$ g/mL FVIII24小时。然后收获细胞,用冰冷的无菌

PBS洗涤两次,以约 $1 \times 10^6$ 细胞/mL悬浮。在用抗CD40-PE或抗MHCII FITC抗体标记之前用BD Fc-封闭抗体对细胞进行封闭。使用FACSCalibur流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, CA)分析细胞。本研究一式三份进行。

[0192] 在体外OPLS对BMDC的细胞因子谱的影响:研究了OPLS对树突细胞的细胞因子分泌的影响。在第九天,在渐增剂量的OPLS存在下,用作为抗原的FVIII处理如上生成的BMDC。以剂量函数监测产生促炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL12p70以及调控细胞因子TGF- $\beta$ 的变化。将BMDC暴露于具有渐增剂量的OPLS(0、0.5、1、10、25、50mM)的 $1\mu\text{g/mL}$  FVIII。通过将适量OPLS直接添加到RPMI培养基制备1M OPLS储液并用无菌3N和1N NaOH调节pH。使用不含内毒素的储液(EndosafeEndochrome-K®kit Charles River Laboratories, Charleston, SC)。细胞一式四份( $n=4$ )铺板,培养48小时。在培育期结束时收集培养基用于细胞因子分析。使用标准ELISA(R&D System Inc. Minneapolis, MN, USA或Invitrogen Amarillo, CA)测定TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ 和IL-12p70的浓度。

[0193] OPLS对BMDC迁移潜力的影响:研究了OPLS对体外用FVIII或FVIII/OPLS处理的BMDC的体内迁移潜力的影响。在第九天,将 $3 \times 10^6$ 细胞与 $5\mu\text{g}$  FVIII或 $5\mu\text{g}/50\text{mM}$  FVIII/OPLS孵育过夜。第二天,收获非贴壁细胞,并用冰冷的无菌PBS洗涤两次,用DilC(18)5染料(Sigma, St. Louis, MO)进行标记。将细胞在 $37^\circ\text{C}$ 与 $2\mu\text{g/mL}$  DilC(18)5(Sigma, St. Louis, MO)孵育5分钟。5分钟后,用冰冷的无菌PBS洗涤细胞两次。使用配备有AxioCamMRC彩色摄像机和LEP电动平移台控制器的Zeiss Axiovert 200M倒置显微镜,通过细胞样本成像来确认染料掺入。由Cy5通道激发,发射滤波器为695/655nm。(Carl Zeiss Microscopy, LLC. Thornwood, NY)。将九只HA小鼠随机分为3组:空白、FVIII和FVIII/OPLS。将从上述回收的全部非贴壁细胞在每个处理组的三只小鼠之间等分并在下腹部皮下(sc)注射。注射后3小时处死动物,取出腹股沟淋巴结并在10%多聚甲醛中固定24小时。然后利用具有ImgeLab 4.0.1软件包(Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA)的Bio-Rad ChemiDoc MP成像系统对淋巴结整个成像。

[0194] 暴露于FVIII和OPLS/FVIII的BMDC的免疫原性潜力:为了确定OPLS对BMDC体内发起强烈的免疫反应的能力的影响,我们测试了在存在和不存在50mM OPLS下体外暴露于FVIII之后BMDC的免疫原性潜力。在第九天,用 $5\mu\text{g}$  FVIII或 $5\mu\text{g}/50\text{mM}$  FVIII-OPLS处理BMDC 24小时。然后,除去培养基,细胞用冰冷的无菌PBS洗涤两次。然后将约 $5 \times 10^5$ 细胞/小鼠皮下注射到两组(FVIII组和FVIII-OPLS组)的HA小鼠中。一周注射一次持续3周,随后是2周洗脱期。洗脱期结束时,处死动物,收集血浆。通过ELISA用由空白动物血浆计算出的板特定截断值来测定总抗FVIII效价水平。

[0195] OPLS对体内FVIII的免疫原性的影响:21只6至8周龄之间的HA小鼠分成3组。组1以皮下给药的方式在腹部接受 $1\mu\text{g}$  FVIII。组2和3以皮下给药的方式在腹部接受 $1\mu\text{g}$  FVIII与0.4mg OPLS/注射(组2)或5mg OPLS/注射(组3)。在第1、8、10和12天给予该处理。在最后一次注射后三天处死动物。收集血液,在4摄氏度7500rpm离心5分钟。然后转移血浆并储存于 $-80^\circ\text{C}$ 直至分析。

[0196] 统计:在适当的情况下采用非参数单因素ANOVA与Tukey事后分析用于效价值的分析。学生t检验用于比较流式细胞术数据的平均荧光(MIF)强度。在适当的情况下采用非参数单因素ANOVA与Kruskal-Wallis事后分析用于效价值分析

[0197] 结果:OPLS诱导了HA小鼠中对FVIII再次攻击的低反应性:为了研究OPLS是否是负责诱导耐受性的关键的结构组分,进行再次攻击研究。在预处理阶段过程中,如所预期的OPLS和地塞米松降低了抗FVIII抗体反应。用FVIII再次攻击时,与用FVIII-OPLS预处理的动物( $14712 \pm 1853$ 逆稀释因子,平均值 $\pm$ SEM,图32)相比,用FVIII和FVIII-地塞米松预处理的动物表现出强烈的抗FVIII抗体反应(分别为 $25438 \pm 5275$ 和 $33694 \pm 7598$ 逆稀释因子,平均值 $\pm$ SEM)。即使用OPLS处理结束后仅OPLS预处理组表现出较低的效价,而在地塞米松处理组中没有观察到这样的效果。

[0198] 体外OPLS介导的BMDC成熟化的变化:抗原加工和呈递的机制包括下列顺序步骤:由树突细胞摄取抗原是进行有效的免疫反应的第一步。之后是表型成熟化、细胞因子产生和迁移到输入淋巴管用于T细胞呈递。为了确定OPLS是否通过DC干扰抗原加工与呈递,我们监测了其对BMDC表型成熟化、细胞因子分泌和迁移潜力的影响。

[0199] 体外OPLS降低BMDC中的共刺激标记CD40的表达:暴露于FVIII的BMDC导致CD40表达增加。在存在50mM OPLS下,表达CD40的BMDC的数量从用FVIII处理的细胞中平均47.8%掉落至用FVIII-OPLS处理的细胞中的26.5%( $n=3$ ,  $p<0.05$ 图2A中的上图),这是也体现在平均荧光强度(MFI)上,平均荧光强度从用FVIII处理的细胞中 $14.4 \times 10^3$ (任意荧光单位)掉落至在存在OPLS下 $9.45 \times 10^3$ (任意荧光单位)( $n=3$ 时,  $p<0.05$ ,图2B上图)。

[0200] 如图33A和33B(下图)所见,MHCII表达水平没有受到将BMDC暴露于OPLS的影响。在不存在和存在50mM OPLS下表达MHCII的BMDC的百分比分别为89.8%和89.5%( $n=3$ )。这也体现在平均荧光强度(MFI)上。对于用FVIII处理的细胞和用FVIII-OPLS处理的细胞( $n=3$ ),来自三个实验的平均MFI为 $468 \times 10^3$ 和 $449 \times 10^3$ (任意荧光单位)。该发现表明,OPLS不干涉经由BMDC中MHCII复合体的FVIII的加工和呈递。

[0201] OPLS诱导了促炎性细胞因子的剂量依赖性降低和由BMDC产生的调节性细胞因子的增加:在存在OPLS下暴露于FVIII的DC在降低促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-12p70上表现出剂量依赖性( $n=4$ )。观察到在50mM时IL-12p70细胞因子的产生全部消失以及TNF- $\alpha$ 大幅度降低(图2C)。这伴随着调节性细胞因子TGF- $\beta$ 的剂量依赖性增加( $n=4$ )(图33D)。该数据表明,用FVIII和10mM以上OPLS预致敏的BMDC产生类似于致耐受性DC的细胞因子谱(图33C和图33D)。

[0202] OPLS对BMDC的迁移潜力的影响:抗原摄取和加工的下一步涉及DC从组织转移到输入淋巴管。预期致耐受性DC到淋巴的转移增强。通过结合荧光膜标签Di1C18(5),我们追踪体外暴露于FVIII或FVIII/OPLS的BMDC在宿主HA小鼠中的迁移。该染料仅在细胞膜的疏水环境中发出荧光,任何检测到的荧光将归因于DILC(18)5/BMDC复合体,而不是单独的染料。图2D和2E显示出暴露于FVIII(E上图)或FVIII/OPLS(F上图)的BMDC的亮视野图象,下图显示由Cy5通道(发射滤波器设置在695/655)获得的相同图像。在BMDC的膜中观察到的荧光用DILC(18)5成功标记的指示。在将Di1C18(5)标记的BMDC细胞皮下注射到HA小鼠中时,我们观察到,与FVIII处理相比(对于OPLS/FVIII为 $45254 \pm 4240$ ,对于FVIII处理组为 $26709 \pm 5018$ ),在用OPLS/FVIII处理的BMDC注射的小鼠的腹股沟淋巴结中回收的荧光的量增加(通过荧光曲线下面积测定的)(图33F)。由于OPLS预致敏的树突细胞的迁移潜力,这种增加是到达淋巴的BMDC的数量的直接体现。

[0203] OPLS削减了体外暴露于FVIII的BMDC在HA小鼠中免疫原性潜力:在本研究中,我们

通过监测再引入体外处理的BMDC后宿主HA小鼠中的抗体的产生研究了OPLS对BMDC发起免疫反应的能力的影响。我们的研究表明,用FVIII体外处理的BMDC注射的小鼠的抗FVIII效价比用FVIII/OPLS处理的BMDC注射的小鼠的抗FVIII效价在统计学上高(分别为 $1894 \pm 667$ 相对于 $81 \pm 15.6$ 任意效价单位)(平均值 $\pm$ SEM,  $p=0.03$ ,图34)。重要的是要注意,各组中的小鼠不直接暴露于FVIII,而是将BMDC体外暴露于FVIII或FVIII-OPLS。发展的任何反应是体外成熟的BMDC将FVIII抗原呈递给宿主的免疫系统的结果。这些数据表明,OPLS以在有助于有效的适应性应答的方式损害DC递呈抗原的能力。

[0204] OPLS对FVIII体内免疫原性的影响,图35显示在存在和不存在渐增剂量的OPLS下HA小鼠中针对FVIII的体内免疫反应的结果。FVIII处理组中的总抗FVIII效价值在统计学上比高剂量OPLS处理的动物中的抗FVIII效价高(分别为 $285 \pm 3.3$ 任意单位相对于 $5.34 \pm 5.8$ 任意单位)(几何平均数 $\pm$ 关于几何平均数标准偏差)( $p<0.05$ )。低剂量OPLS处理组的效价值低于单独的FVIII,然而,这种降低没有统计学意义。(分别为 $137 \pm 1.4$ 相对于 $285 \pm 3.3$ 任意效价单位)

[0205] 该数据清楚地显示出针对OPLS的体内剂量依赖性应答。在本研究中,OPLS未络合FVIII。这允许相继给药,即首先给药OPLS以预致敏免疫系统,然后第二次给药生物制剂。

[0206] 由致耐受性DC诱导耐受性。据认为在体内响应于凋亡事件产生致耐受性树突细胞。它们与组织固有的未成熟DC在表型上不同。它们的特征是增加调节性细胞因子的产生,并降低促炎细胞因子的分泌。它们显示出某种程度的成熟化以及粘附分子的损失。后者对于从组织迁移出来进入输入淋巴管是必需的。在输入淋巴管中,这些DC在可以在不存在共刺激标记下向T细胞呈递抗原,这导致T细胞无免疫应答。我们的数据(图33)支持响应于OPLS形成致耐受性DC。这基于我们如下的观察:改变细胞因子谱和下调共刺激标记CD40同时保持MHCII表达水平,所有这些与致耐受性DC特征一致。

[0207] 免疫原性和致耐受性DC可以迁移到输入淋巴管。在图2G中,我们观察到,与单独的FVIII相比,在用暴露于FVIII/OPLS的BMDC注射的小鼠的腹股沟淋巴结中回收的荧光标记的BMDC的数量增加。在到达淋巴管时,预期DC通过MHCI或MHCII将抗原呈递至T细胞。该呈递的背景决定了这种相互作用的结果。致耐受性DC可以在不存在共刺激标记如CD40下将抗原呈递给T细胞,这导致耐受性。耐受性应转化为体内降低的免疫原性潜力。在图3中呈现的数据支持了该观点。一旦转移回宿主HA小鼠中,体外露出于单独的FVIII的BMDC没有失去它们的免疫原性潜力。对于FVIII/OPLS处理的BMDC却并非如此。这表明,暴露于OPLS削减BMDC的免疫原性潜力。

[0208] 在本公开中呈现的数据表明,在用OPLS/FVIII处理的HA小鼠中观察到的抗FVIII效价降低是OPLS免疫调节的结果,而不是免疫抑制。此外,我们的数据显示,不同于地塞米松预处理的动物,OPLS预处理的动物对用单独FVIII再次攻击是低反应性的。这不仅表明OPLS是免疫调节子,还预示着对FVIII的低反应性是抗原特异性的。这种抗原特异性需要在伴随着由DC相应于OPLS而增加的TGF- $\beta$ 产生、降低的TNF- $\alpha$ 和IL-12p70产生的较低的CD40表达的情况下由DC加工和呈递FVIII。这进一步由我们的流式细胞术数据支持,该数据显示响应于OPLS MHCII表达无变化。这模拟了致耐受性DC的特征。这是伴随着响应于OPLS DC的迁移潜力的增加和DC的免疫原性潜力的削减。我们的数据合起来表明OPLS具有改变DC成熟化所需的关键结构特征,这导致产生具有致耐受性特征的DCs。

[0209] OPLS的致耐受性特性可在反向疫苗策略中使用,其中低剂量的治疗性蛋白与OPLS一起给药将使患者的免疫系统对随后该蛋白的给药不敏感,有效地降低了治疗性蛋白的免疫原性。我们观察到,这种方法可用于诱导耐受性并在降低小鼠庞贝氏症模型中针对酸性 $\alpha$ -葡萄糖苷酶(GAA)的免疫原性,表明该方法具有普遍性。这种使用OPLS的反向疫苗策略,通过提供与一般免疫抑制截然不同的抗原特异性耐受性,提供了优于伴行免疫抑制疗法(例如地塞米松)的优势。

[0210] 尽管通过具体实施方案已经描述了本发明,常规的修改对本领域技术人员来说是显而易见的。这样的修改都旨在本发明的范围之内。

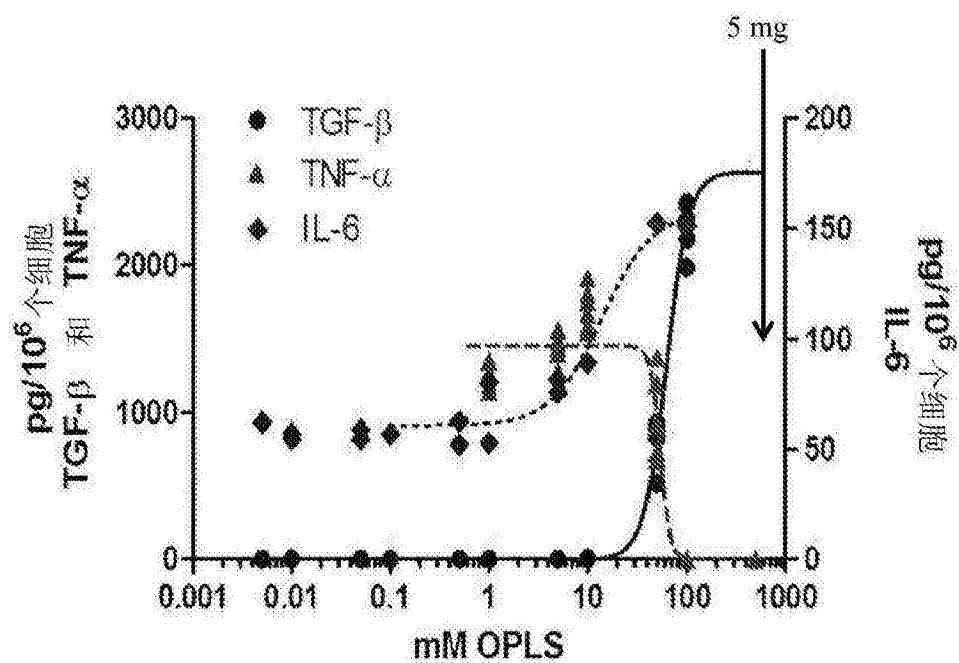


图1

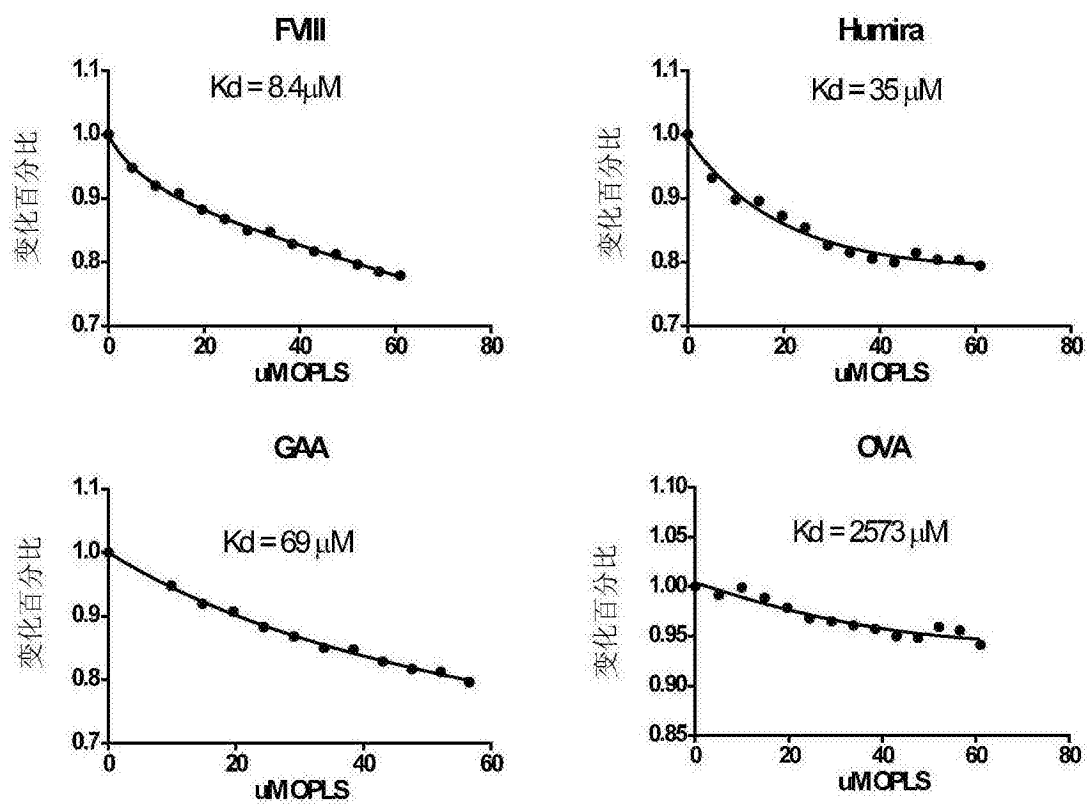


图2



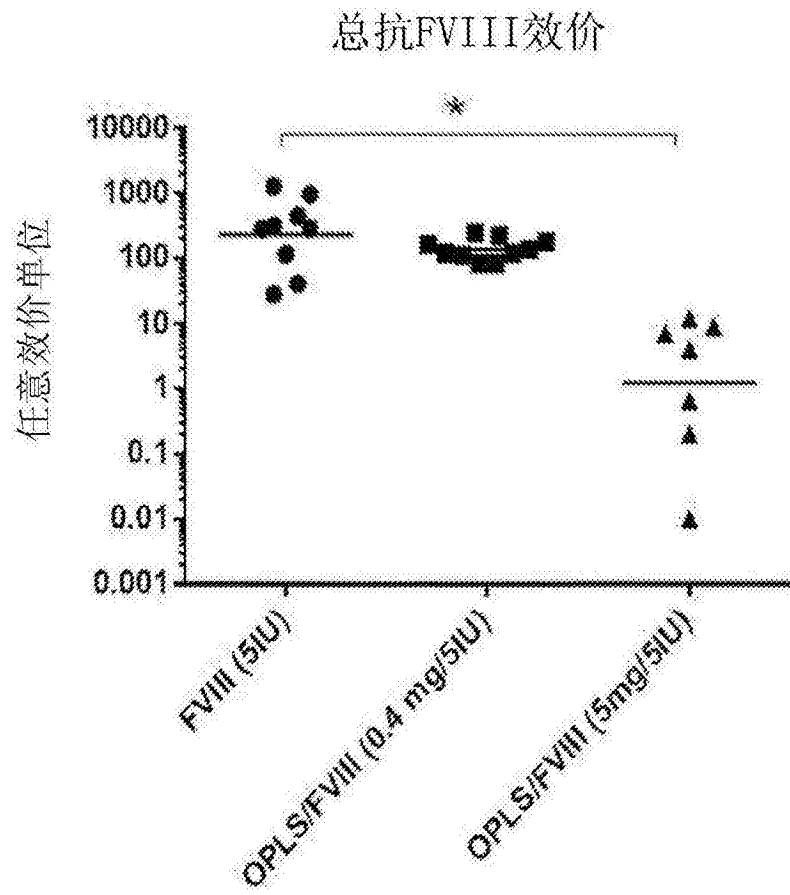


图3

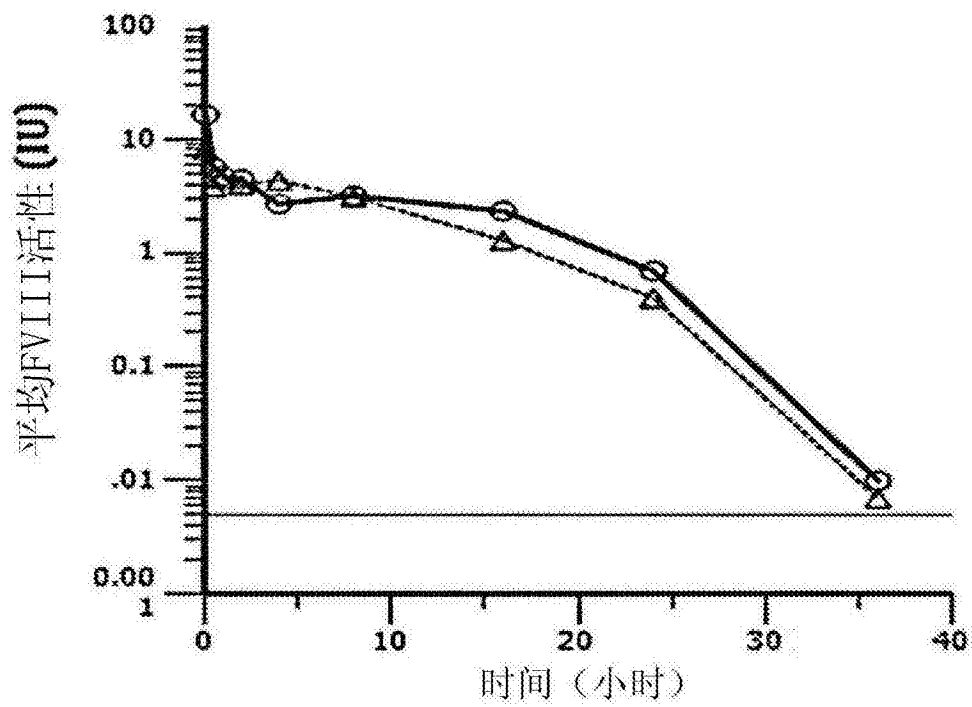


图4

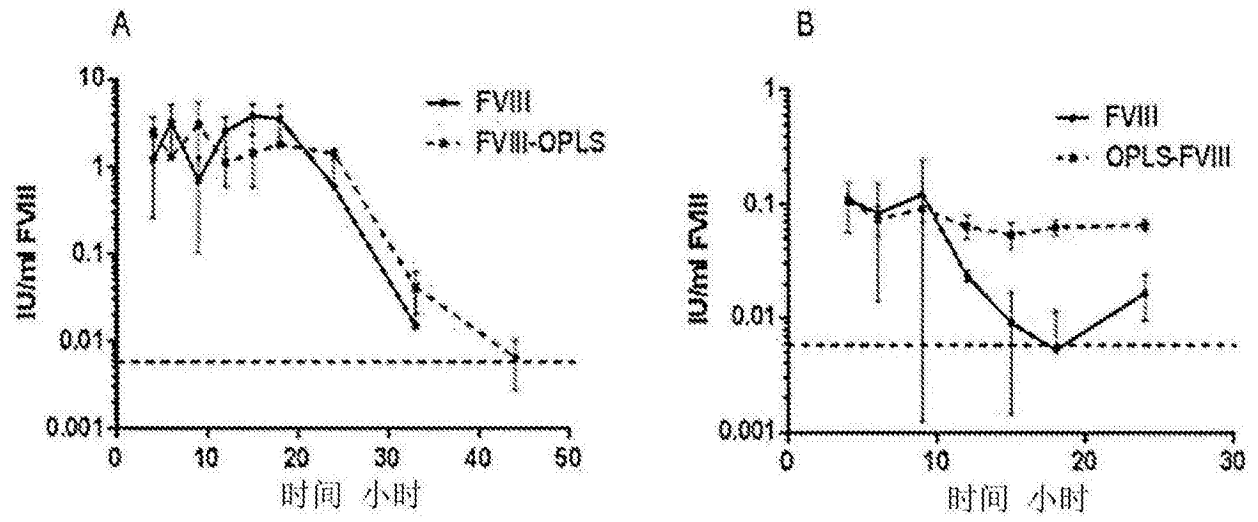


图5

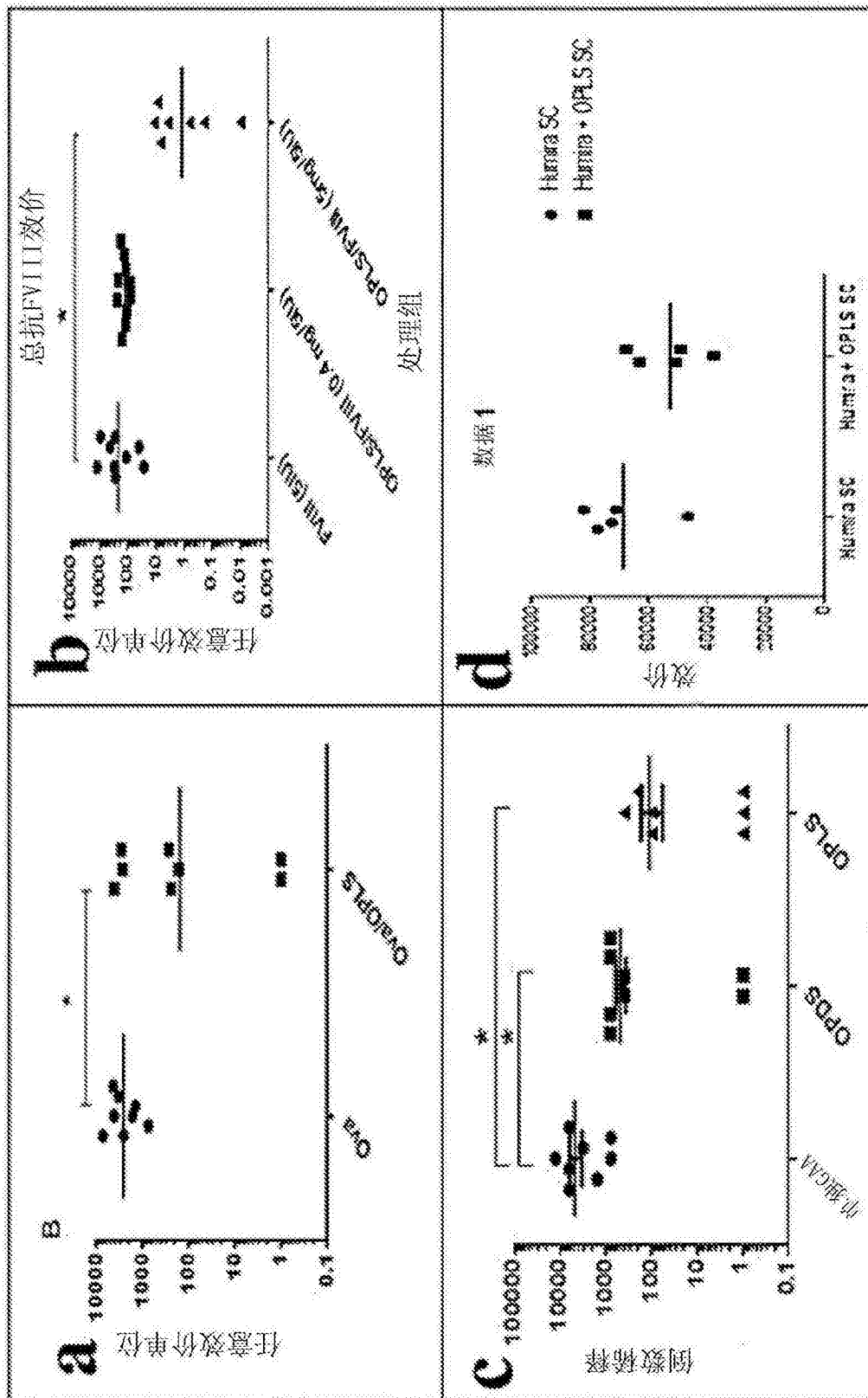


图6

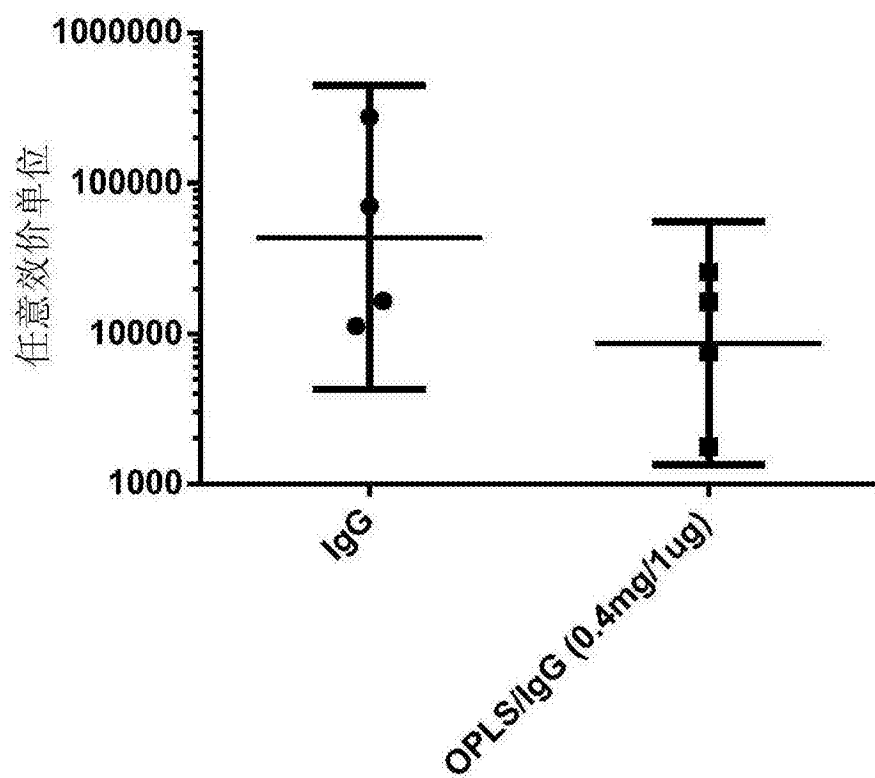


图7

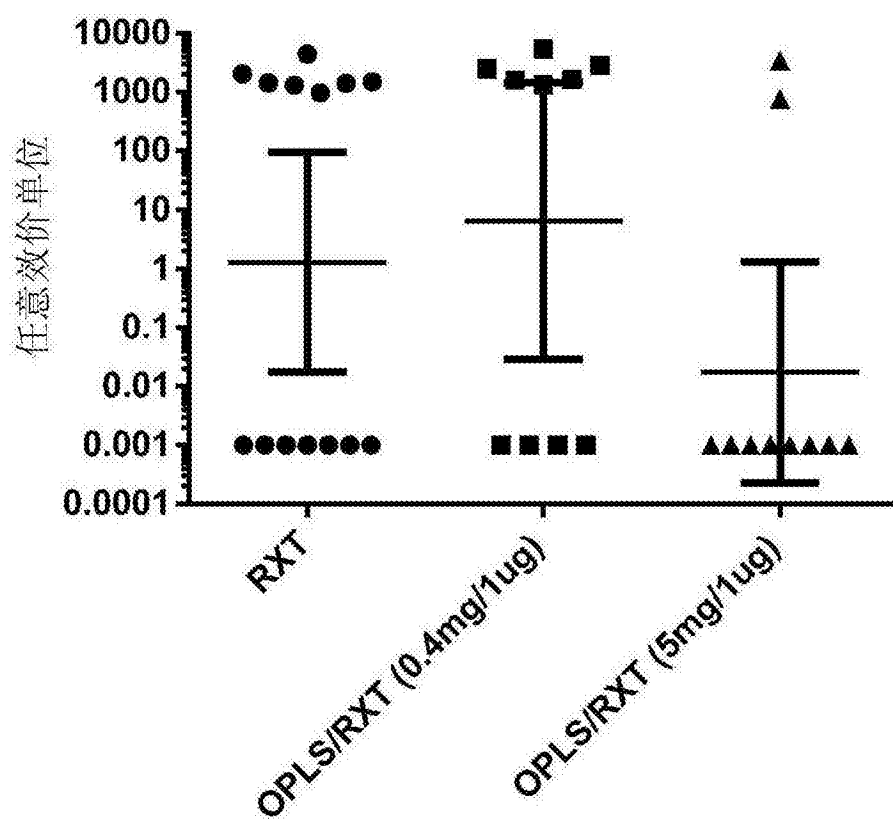


图8

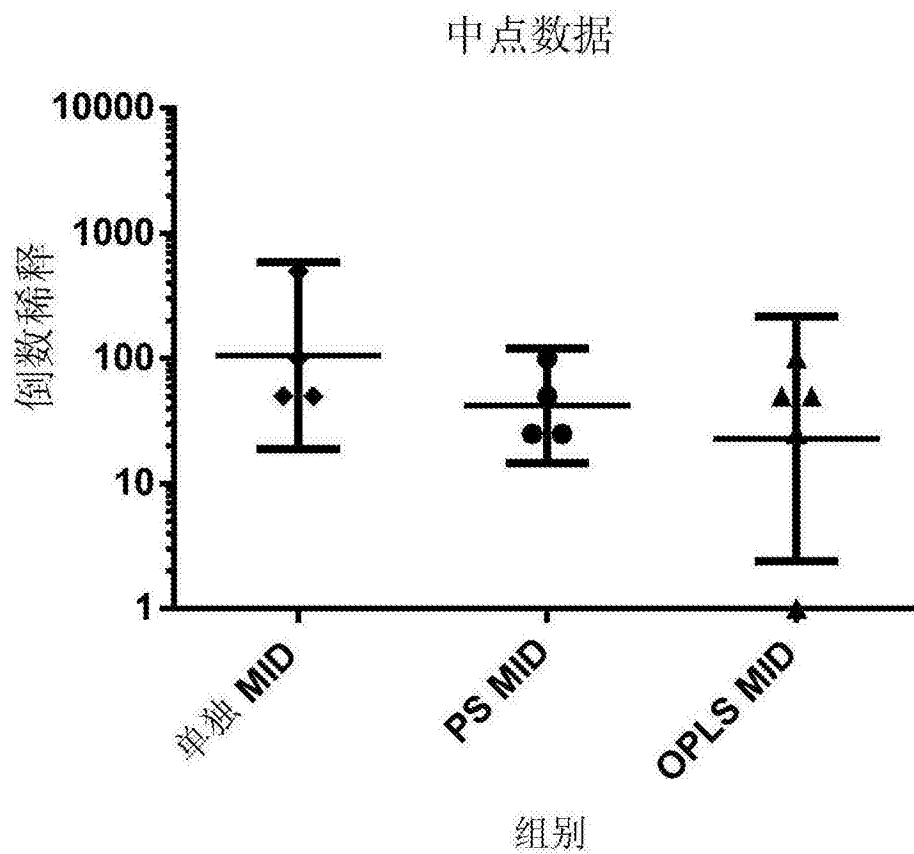


图9

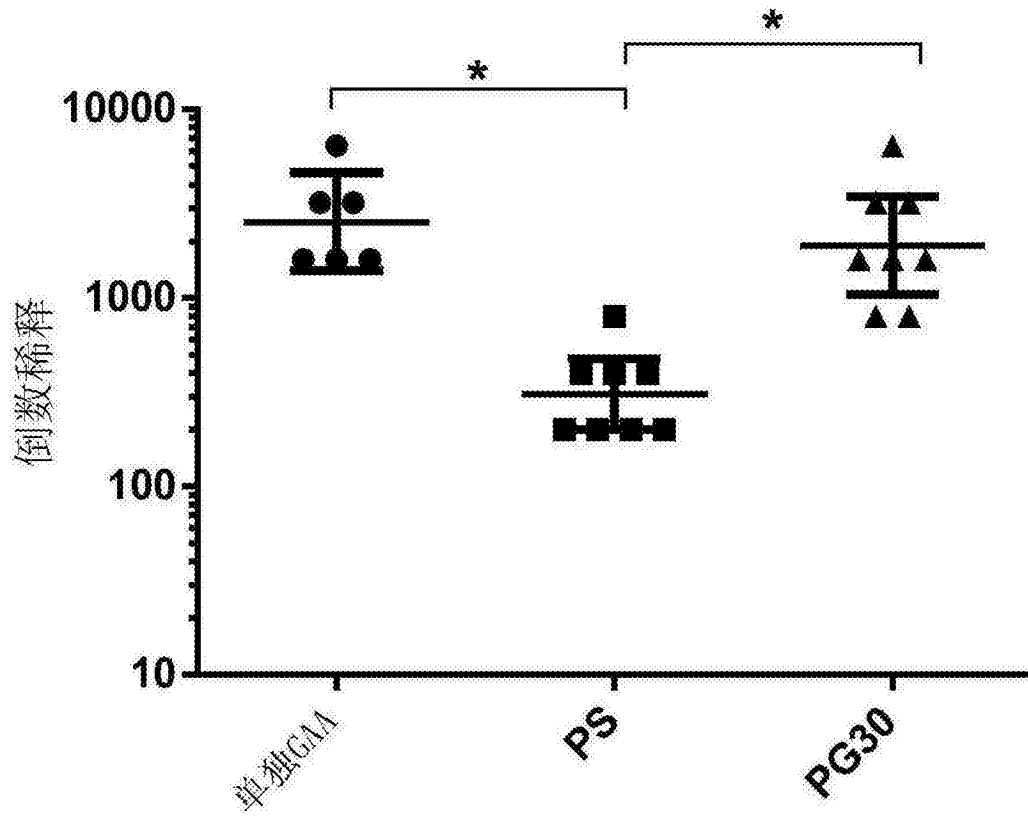


图10

再次攻击\_\_OPLS耐受性

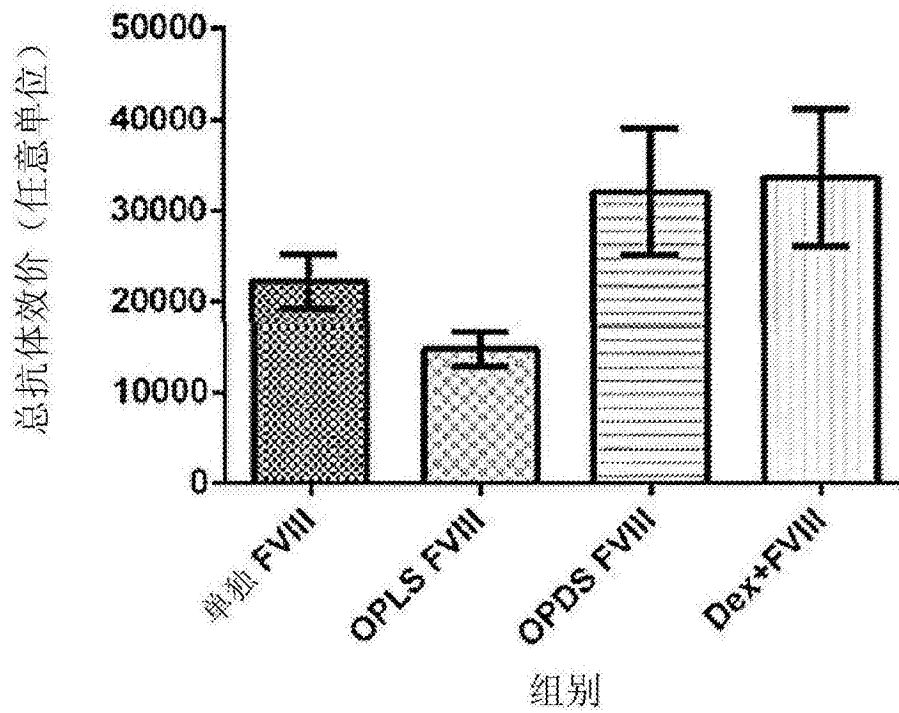


图11

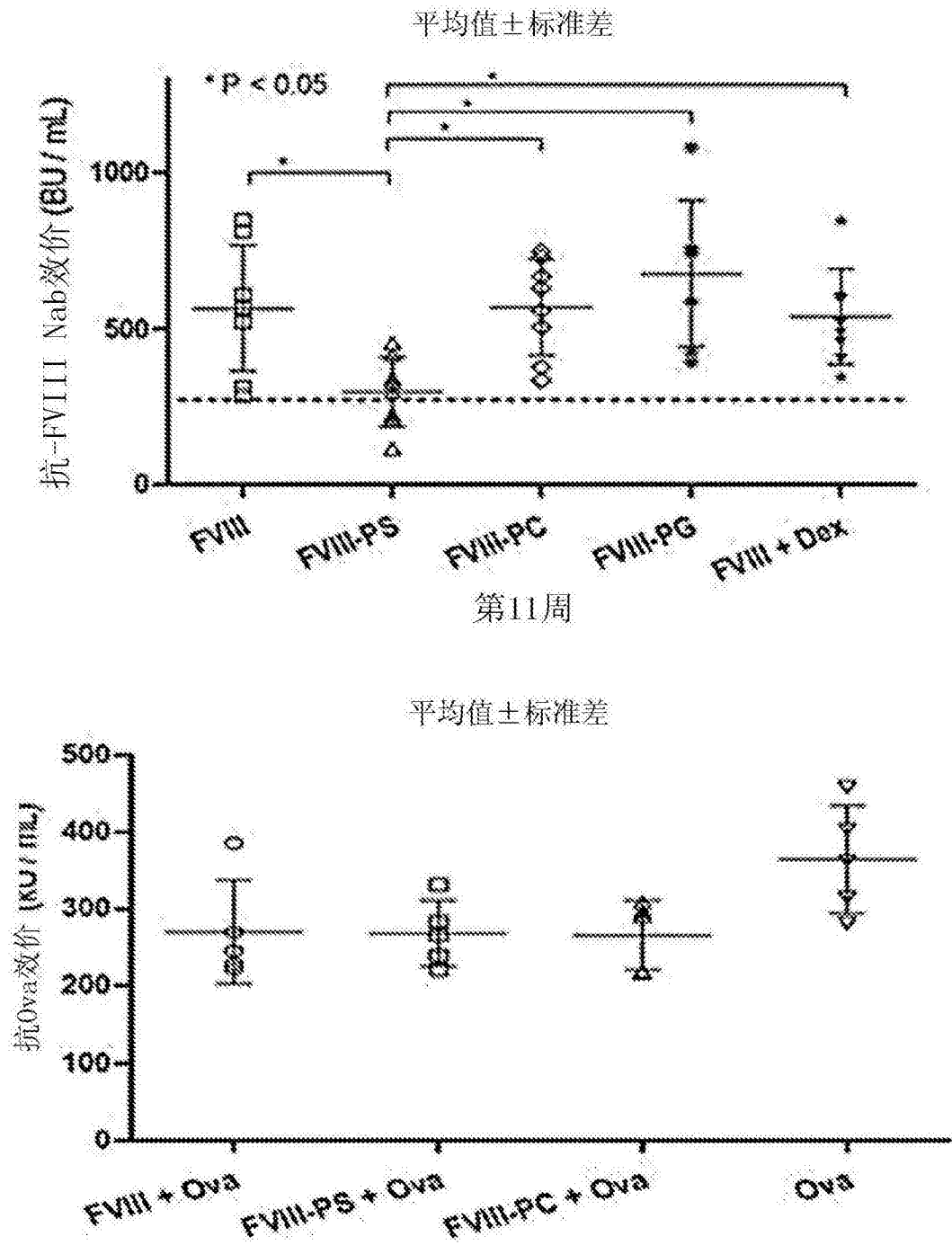


图12

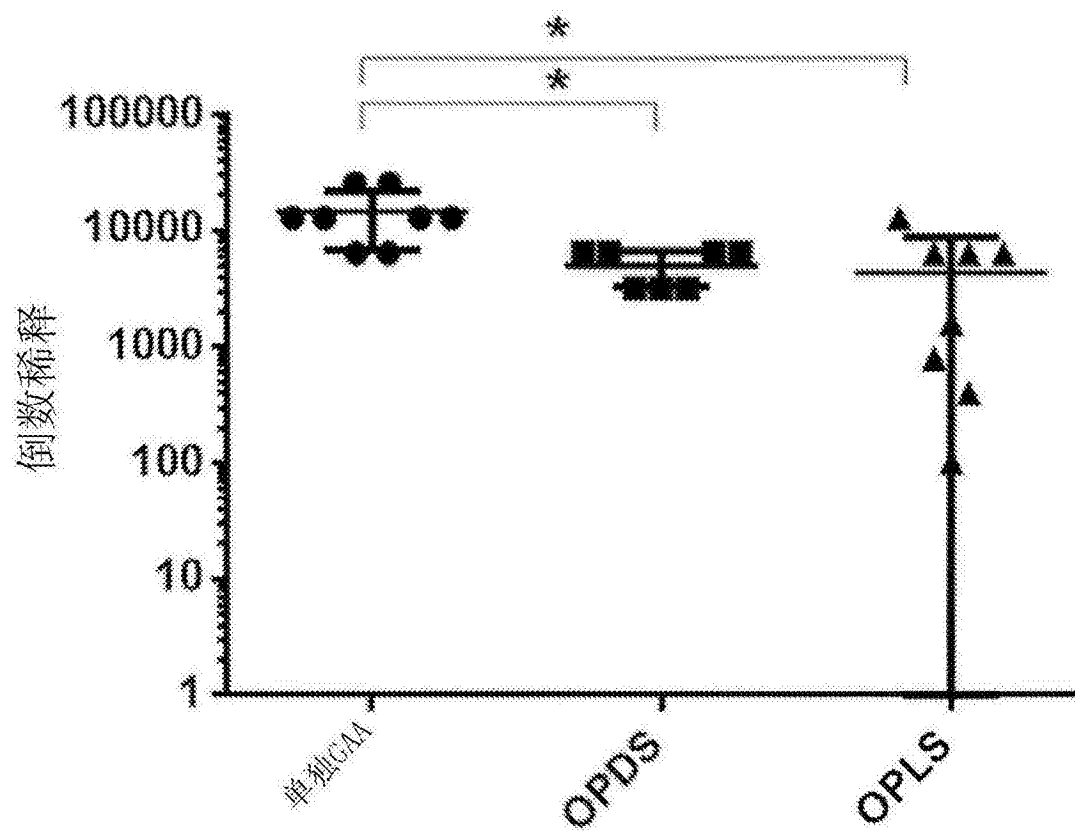


图13

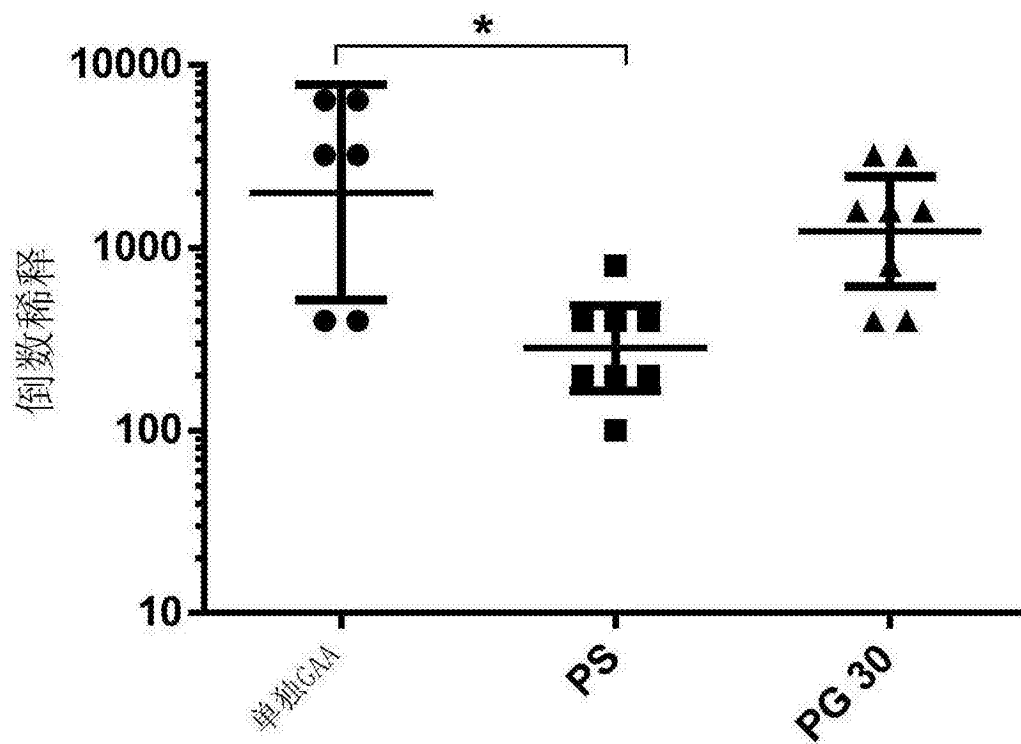


图14



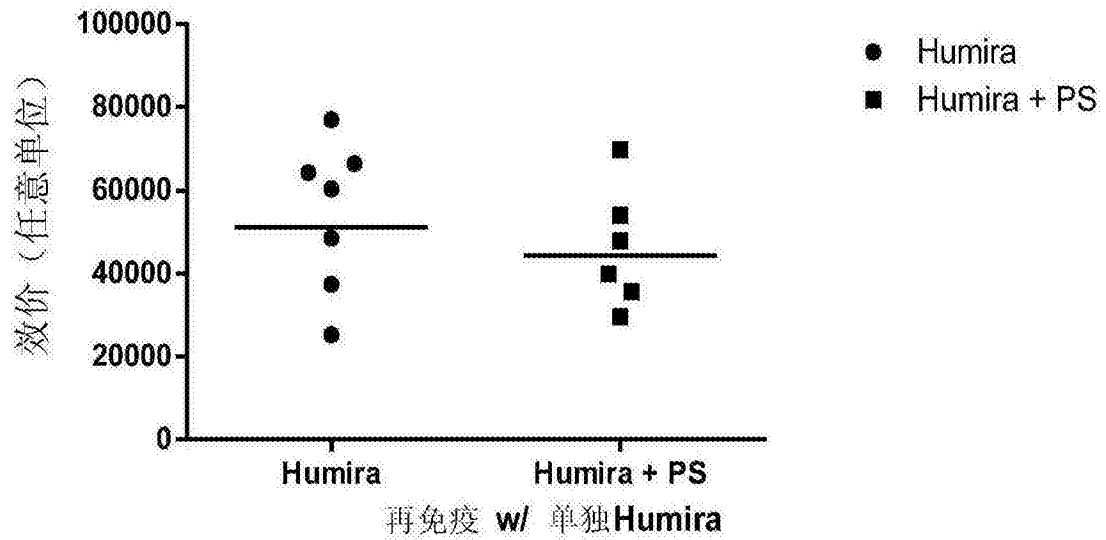


图15

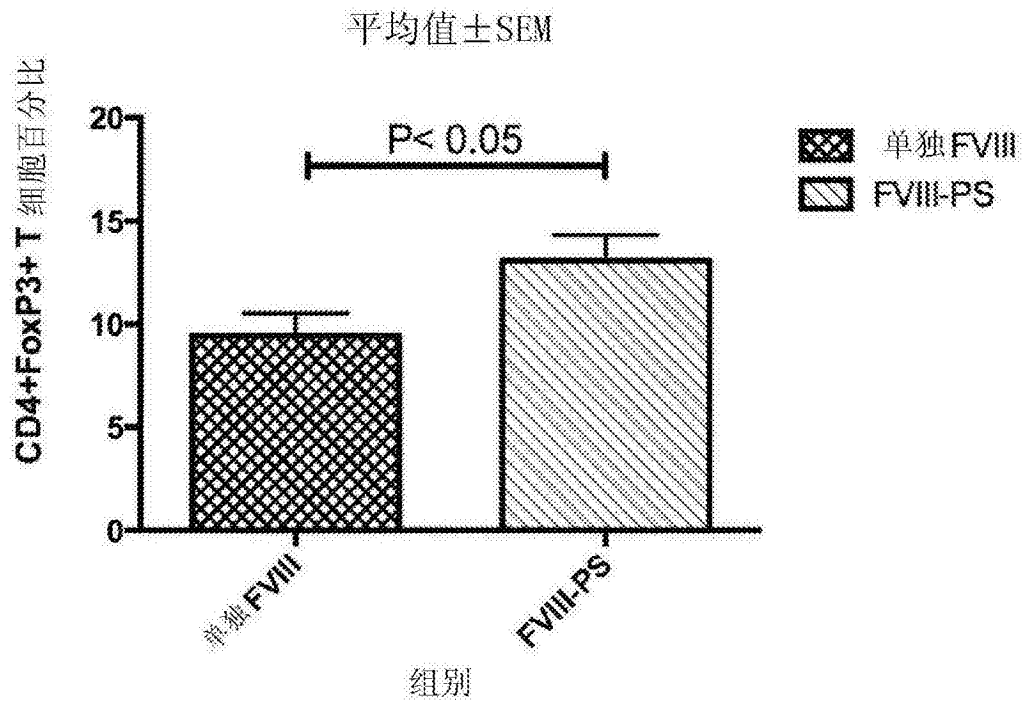


图16

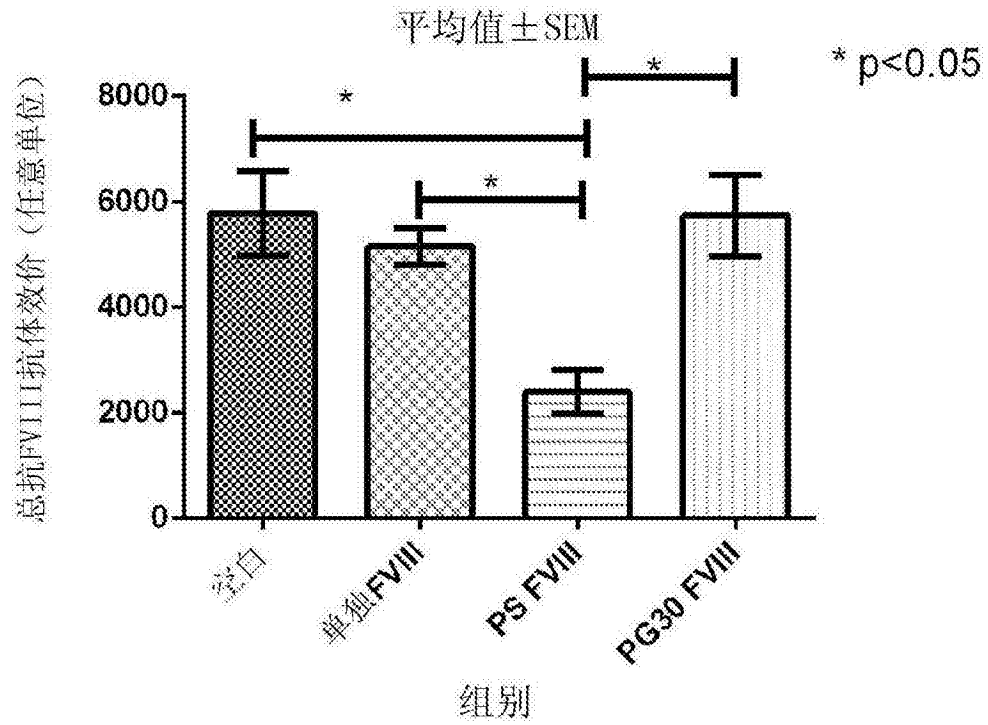


图17

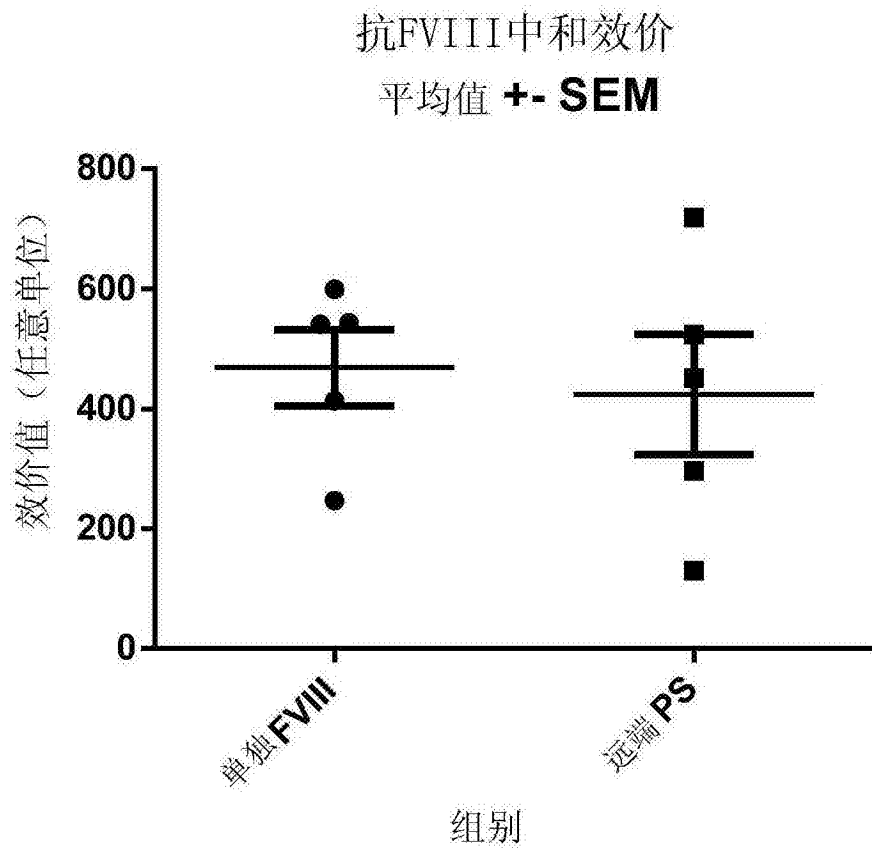


图18

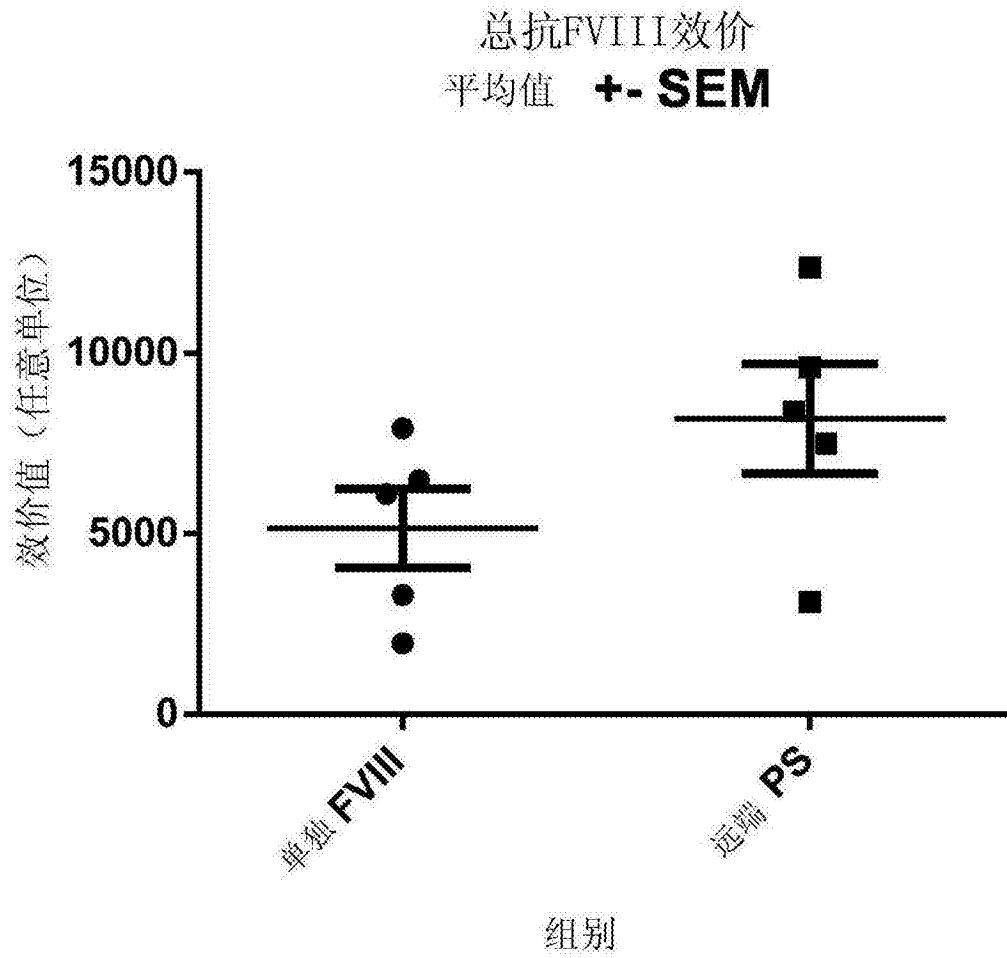


图19

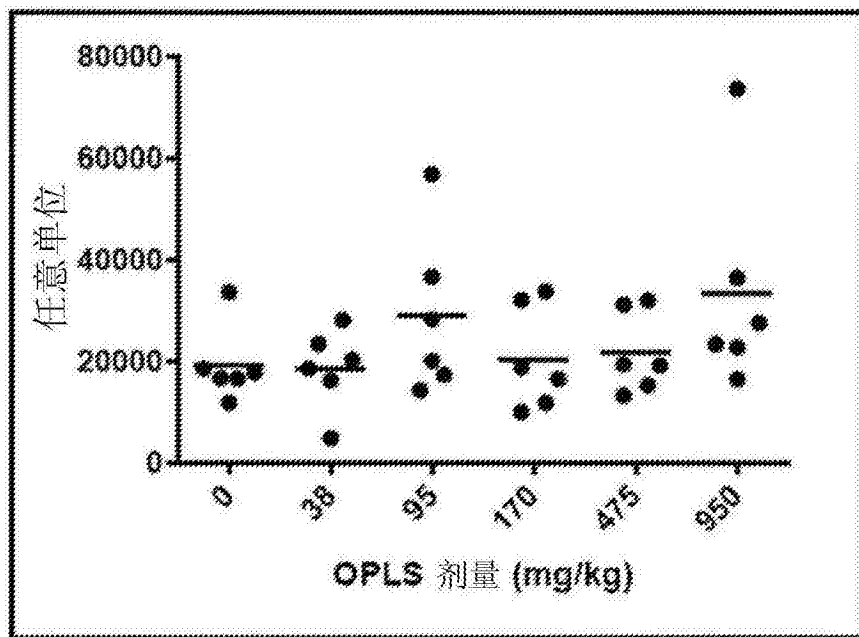


图20

|             |             | 平均值 (SD)      |               |                |                |                |  |
|-------------|-------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|--|
| 溶剂          |             | 38 mg/kg OPLS | 95 mg/kg OPLS | 190 mg/kg OPLS | 475 mg/kg OPLS | 950 mg/kg OPLS |  |
| ALB(g/dL)   | 2.57(0.06)  | 2.93(0.15)    | 2.90(0.20)    | 2.87(0.23)     | 2.93(0.12)     | 2.67(0.06)     |  |
| ALP(U/L)    | 35.67(6.51) | 64.00(14.53)  | 67.00(26.89)  | 48.67(18.15)   | 28.03(23.54)   | 49.67(11.93)   |  |
| ALT(U/L)    | 31.00(6.08) | 35.67(17.67)  | 26.67(6.03)   | 37.67(10.07)   | 46.00(25.71)   | 32.33(9.81)    |  |
| AMY(U/L)    | 1014(149.5) | 1043(29.51)   | 996.00(29.46) | 989.67(62.40)  | 1048.00(58.81) | 969.33(42.16)  |  |
| TBIL(mg/dL) | 0.30(0)     | 0.33(0.06)    | 0.30(0.00)    | 0.33(0.06)     | 0.33(0.06)     | 0.30(0.00)     |  |
| BUN(mg/dL)  | 16.67(1.15) | 18.00(2.00)   | 16.67(2.08)   | 15.00(3.46)    | 15.67(3.21)    | 12.67(2.89)    |  |
| CA(mg/dL)   | 5.53(0.29)  | 5.57(0.21)    | 5.77(0.21)    | 5.73(0.25)     | 5.93(0.70)     | 5.03(0.12)     |  |
| PHOS(mg/dL) | 5.70(0.60)  | 5.77(0.67)    | 5.83(0.90)    | 5.50(0.95)     | 5.67(1.03)     | 5.70(0.85)     |  |
| K(mg/dL)    | 3.67(0.15)  | 3.33(0.25)    | 3.70(0.20)    | 3.90(0.30)     | 3.87(0.25)     | 3.80(0.00)     |  |
| TP(mg/dL)   | 4.60(0.14)  | 4.60(0.20)    | 4.70(0.10)    | 4.80(0.20)     | 4.80(0.17)     | 4.67(0.15)     |  |

图21

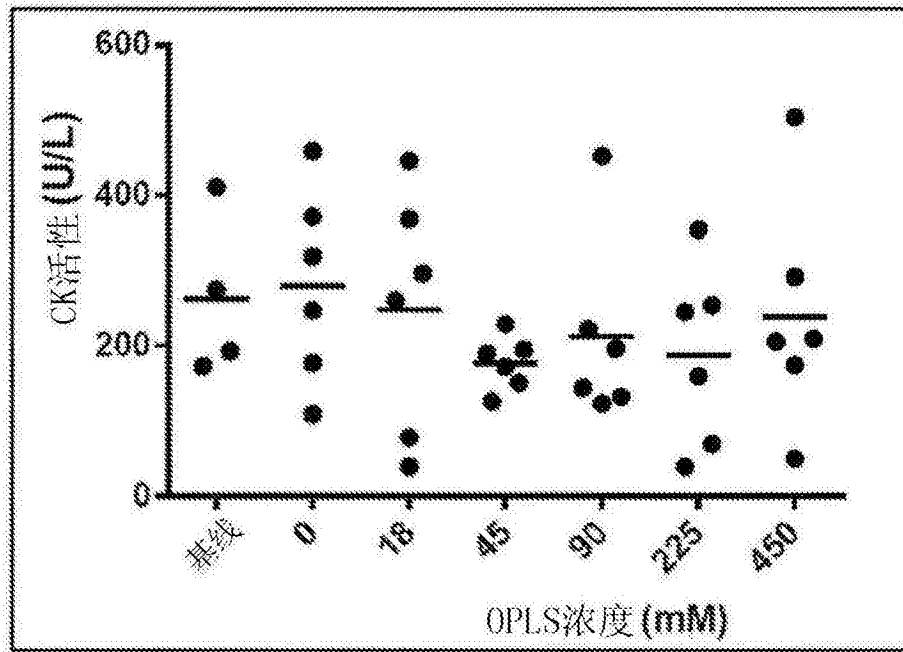


图22

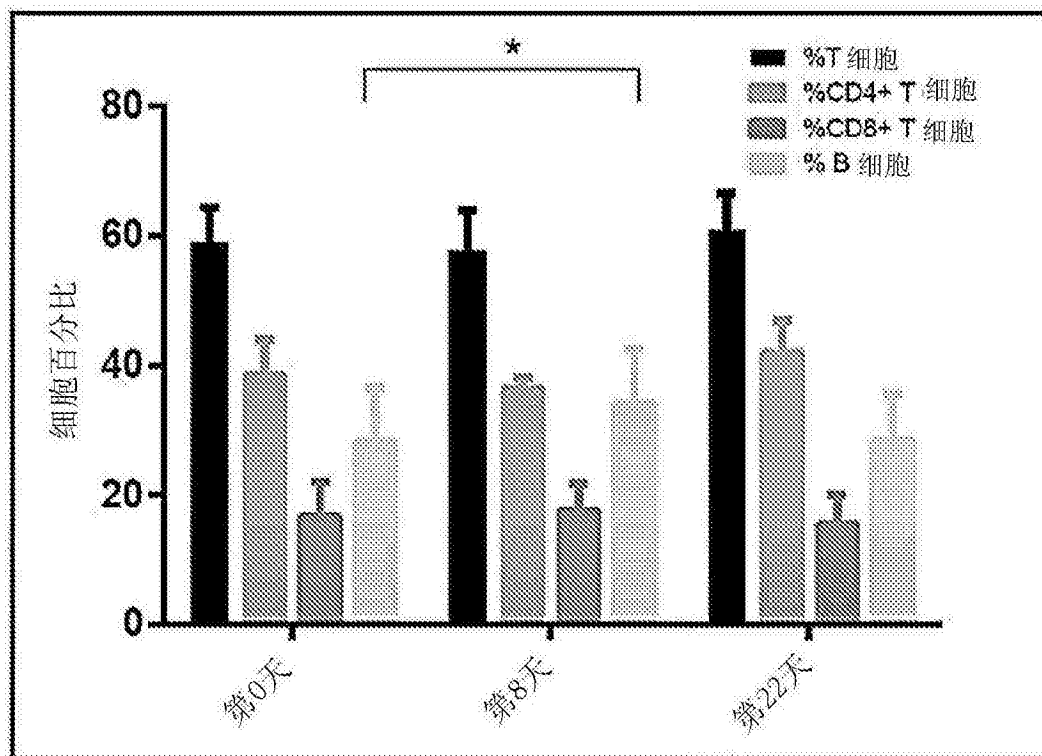


图23

| 平均值 (SD)         |                |               |              |
|------------------|----------------|---------------|--------------|
|                  | 第0天            | 第8天           | 第22天         |
| 钠 (mEq/L)        | 148(2.65)      | 149(1.41)     | 149(2.83)    |
| 钾 (mEq/L)        | 4.17(0.72)     | 4(0.14)       | 4.05(0.07)   |
| 氯化物 (mEq/L)      | 110(1)         | 112.50(0.71)  | 110(2.83)    |
| 总蛋白 (g/dL)       | 6.17(0.35)     | 6.95(0.07)    | 6.70(0.14)   |
| 白蛋白 (g/dL)       | 4.20(0.26)     | 4.4(0)        | 4.30(0.14)   |
| 球蛋白 (g/dL)       | 1.97(0.15)     | 2.55(0.07)    | 2.4(0)       |
| A/G比             | 2.17(0.15)     | 1.75(0.07)    | 1.8(0)       |
| 钙 (mg/dL)        | 9.37(0.5)      | 9.6(0.28)     | 10.5(0.14)   |
| 总胆红素 (mg/dL)     | 0.13(0.06)     | 0.14(0.04)    | 0.09(0.02)   |
| BUN (mg/dL)      | 15.33(2.52)    | 15(0)         | 15.5(2.12)   |
| 葡萄糖 (mg/dL)      | 77.3(16.77)    | 66.50(3.54)   | 79.5(17.68)  |
| 肌酸酐 (mg/dL)      | 0.63(0.11)     | 0.64(0.03)    | 0.69(0.11)   |
| 磷 (mg/dL)        | 6.13(0.45)     | 6.25(0.07)    | 4.90(0.14)   |
| ALP (mg/dL)      | 517(112.93)    | 525.50(10.61) | 376(18.38)   |
| ALT (SGPT) (U/L) | 34(13.23)      | 53.50(19.09)  | 45(2.83)     |
| AST (SGOT) (U/L) | 72.67(68.25)   | 51(29.7)      | 44(5.66)     |
| LDH (U/L)        | 852.33(729.29) | 443.50(79.90) | 463.5(31.82) |
| 胆固醇 (mg/dL)      | 160.67(58.77)  | 185(35.36)    | 176(35.36)   |
| BUN/肌酸酐比         | 25.27(8.95)    | 23.45(1.06)   | 22.7(0.42)   |

图24

表

蛋白质/OPLS比

| 蛋白质                        | 大约摩尔比      |
|----------------------------|------------|
| FVIII/OPLS 1ug/5mg         | 1:8.00E+06 |
| FVIII/OPLS 1ug/0.4mg       | 1:6.00E+05 |
| Humira/OPLS 10ug/5mg       | 1:5.00E+05 |
| Human IgG/OPLS 1ug/0.4OPLS | 1:3.25E+05 |
| 利妥昔单抗/OPLS 1ug/5mg         | 1:4.00E+06 |
| 利妥昔单抗/OPLS 1ug/0.4mg OPLS  | 1:3.25E+05 |
| GAA 肽                      | 1:4.00E+03 |
| GAA                        | 1:3.00E+06 |
| OVA                        | 1:1.5E+06  |

图25

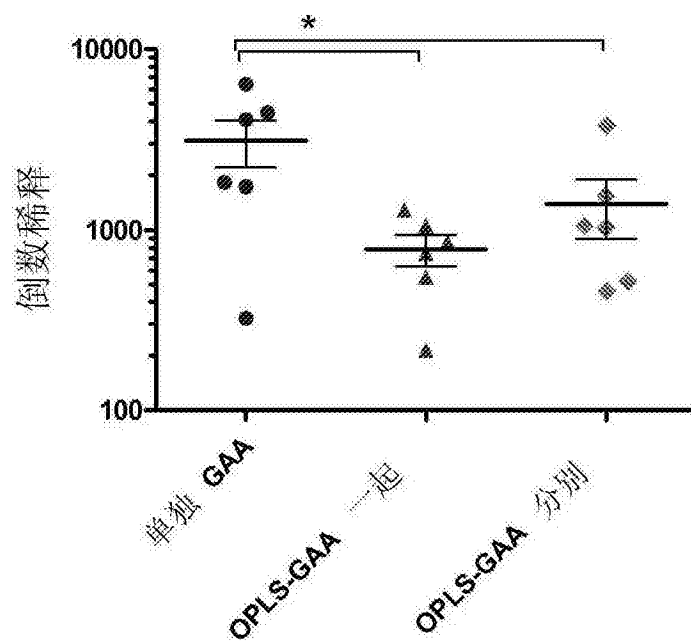


图26

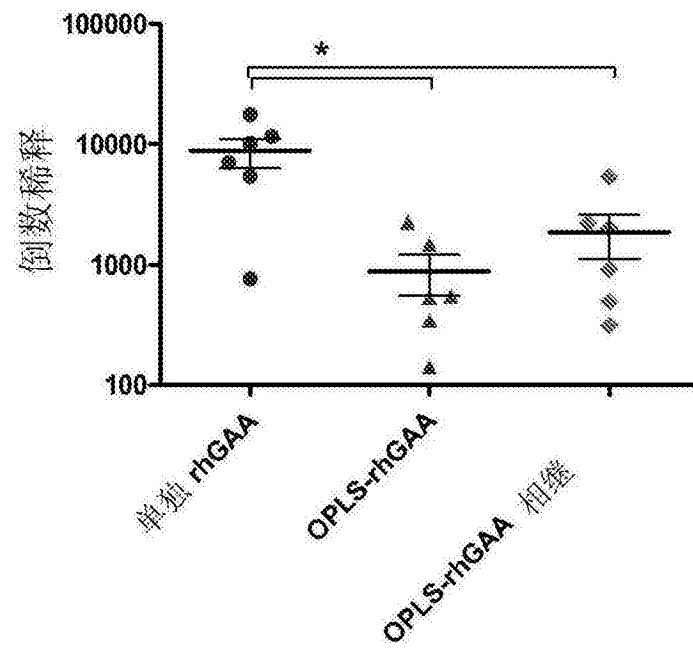


图27



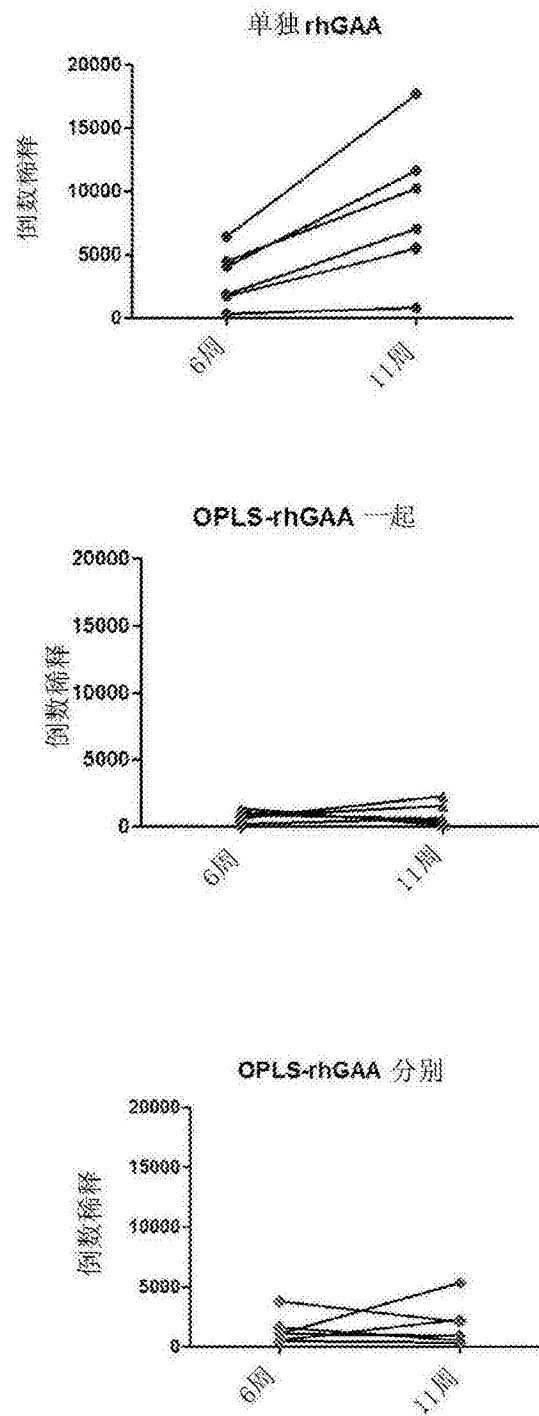


图28

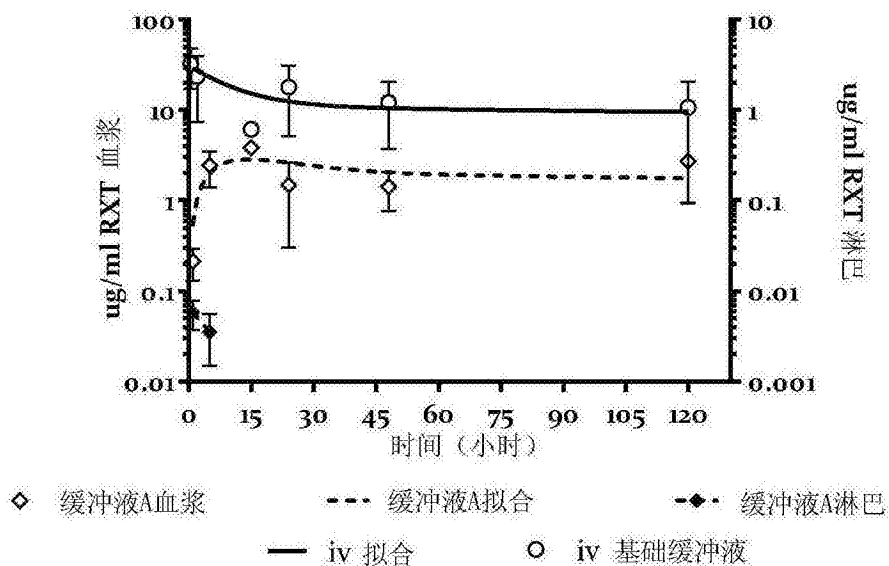


图29

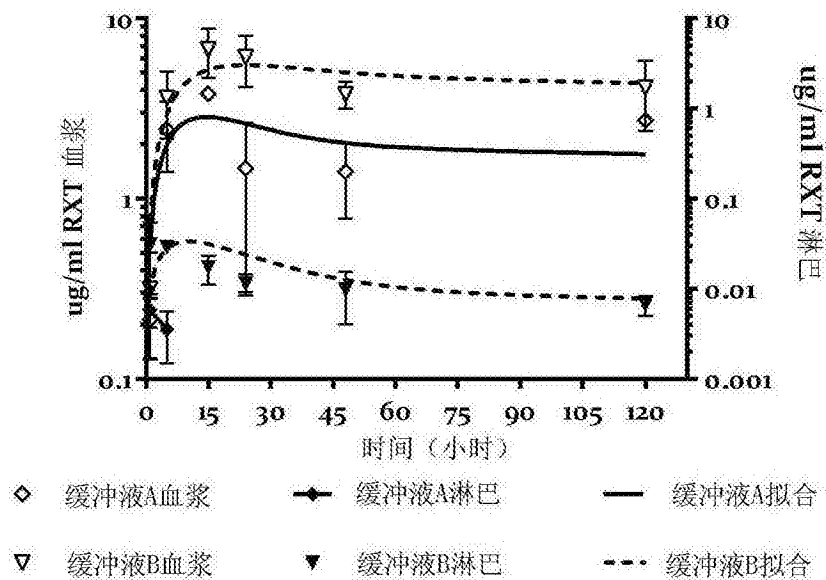


图30

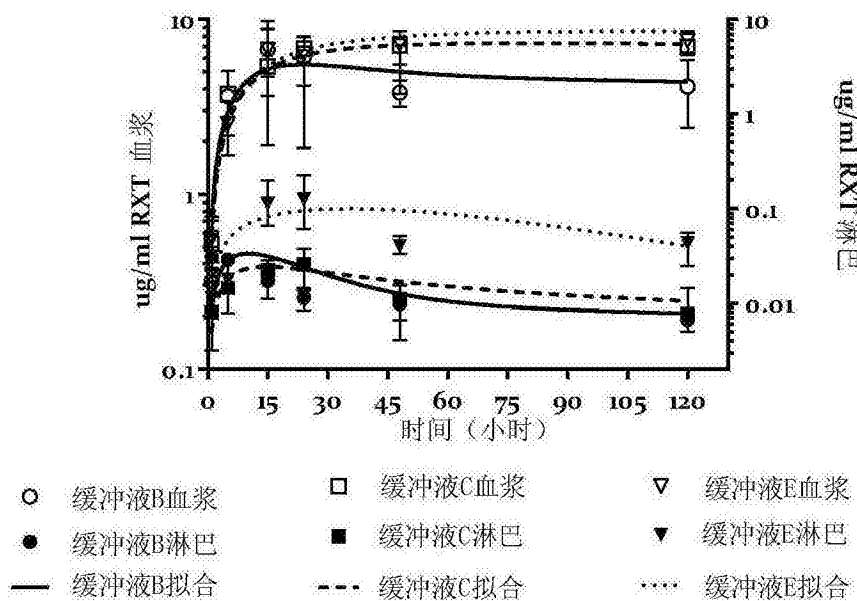


图31A

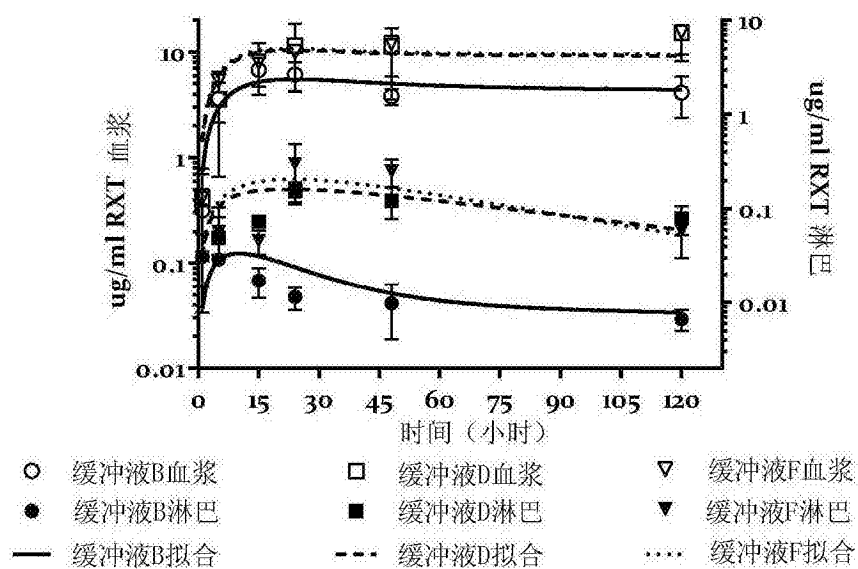


图31B

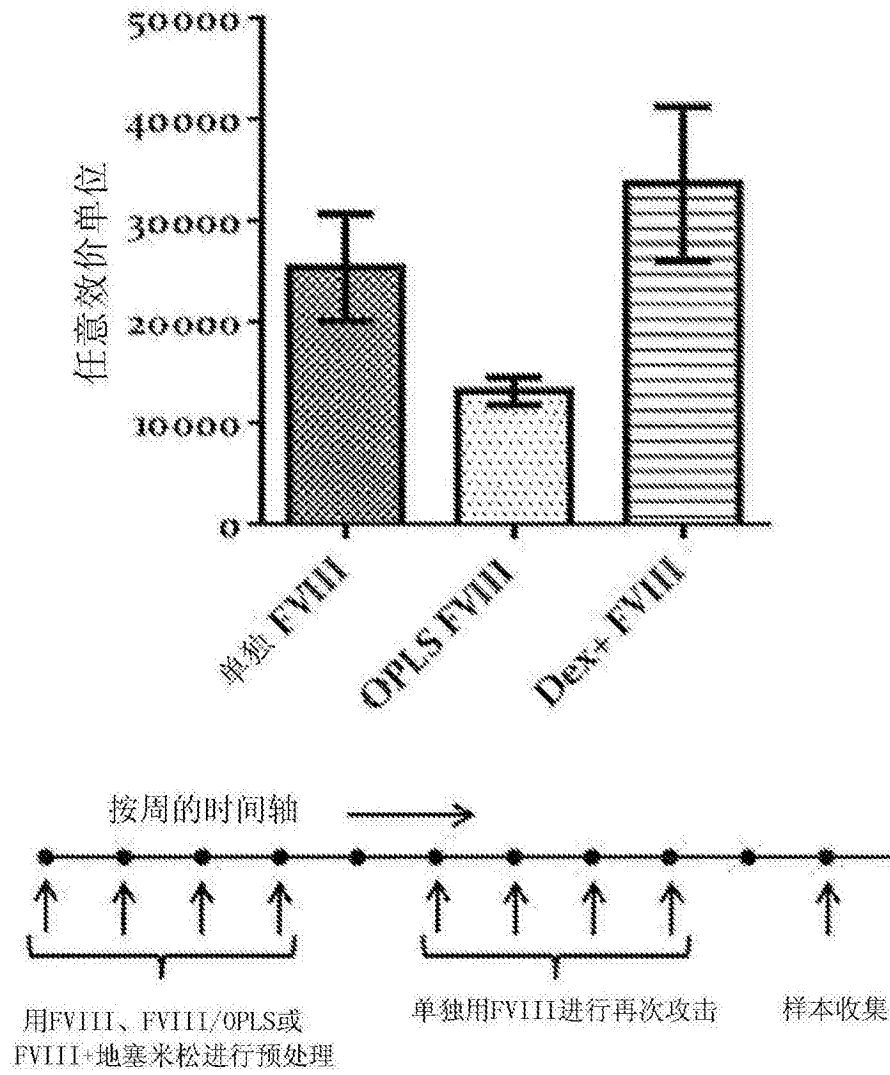


图32

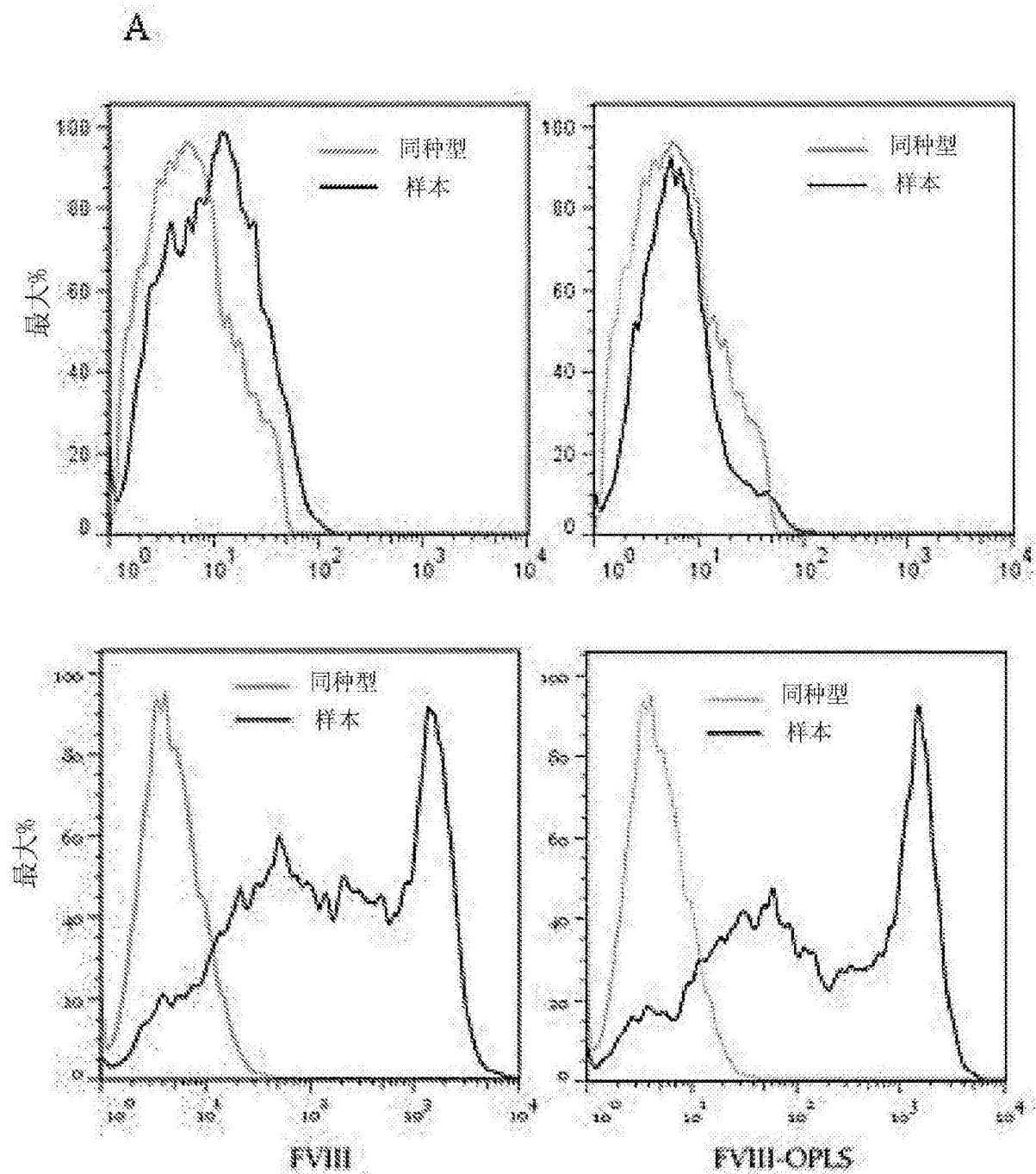


图33A

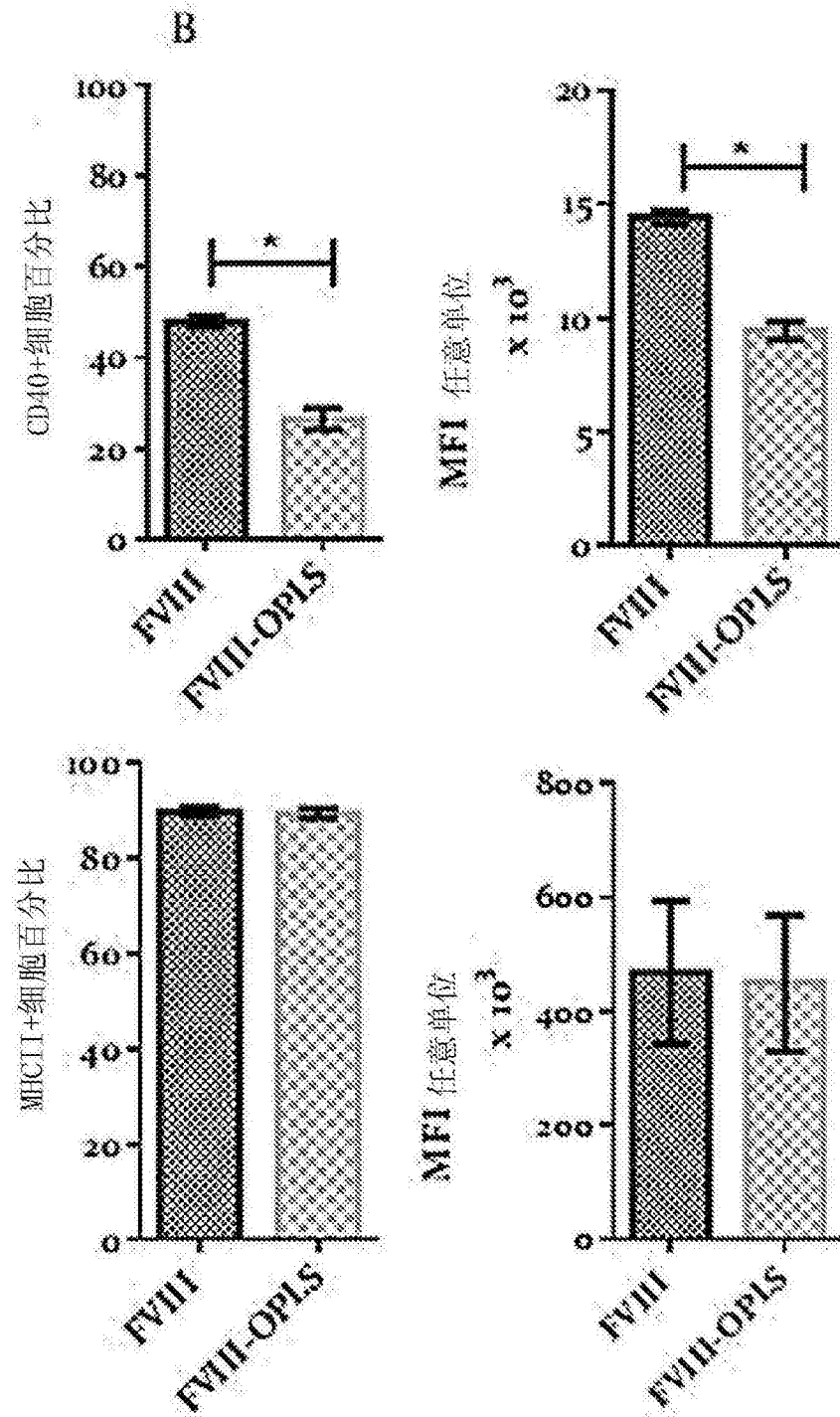


图33B

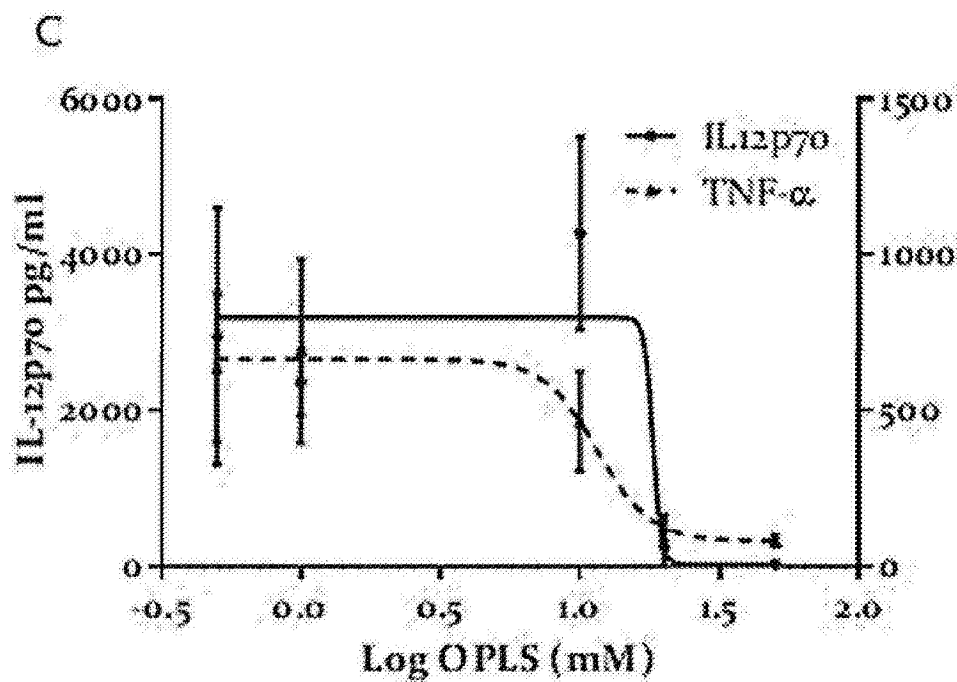


图33C

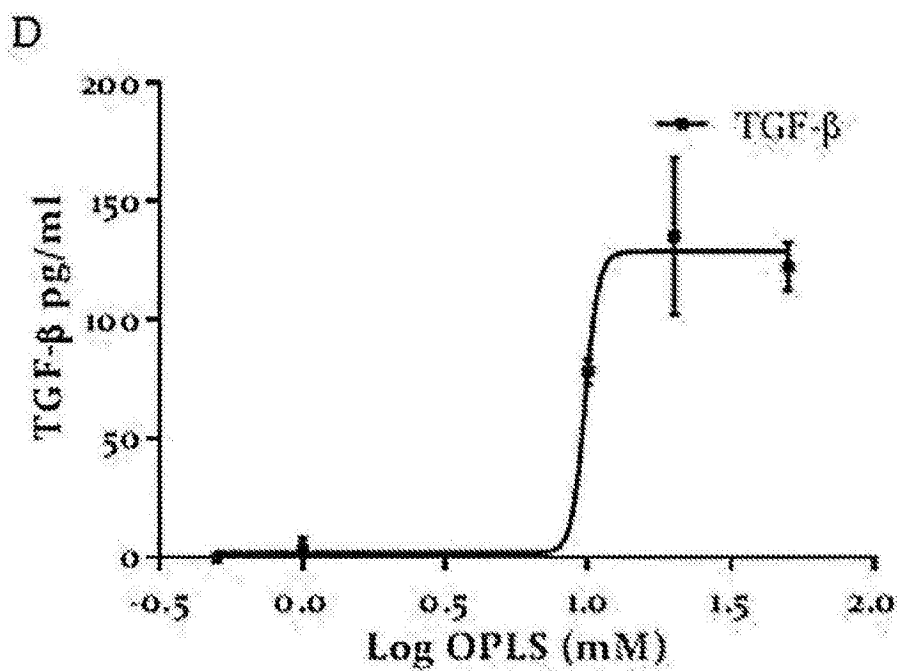


图33D

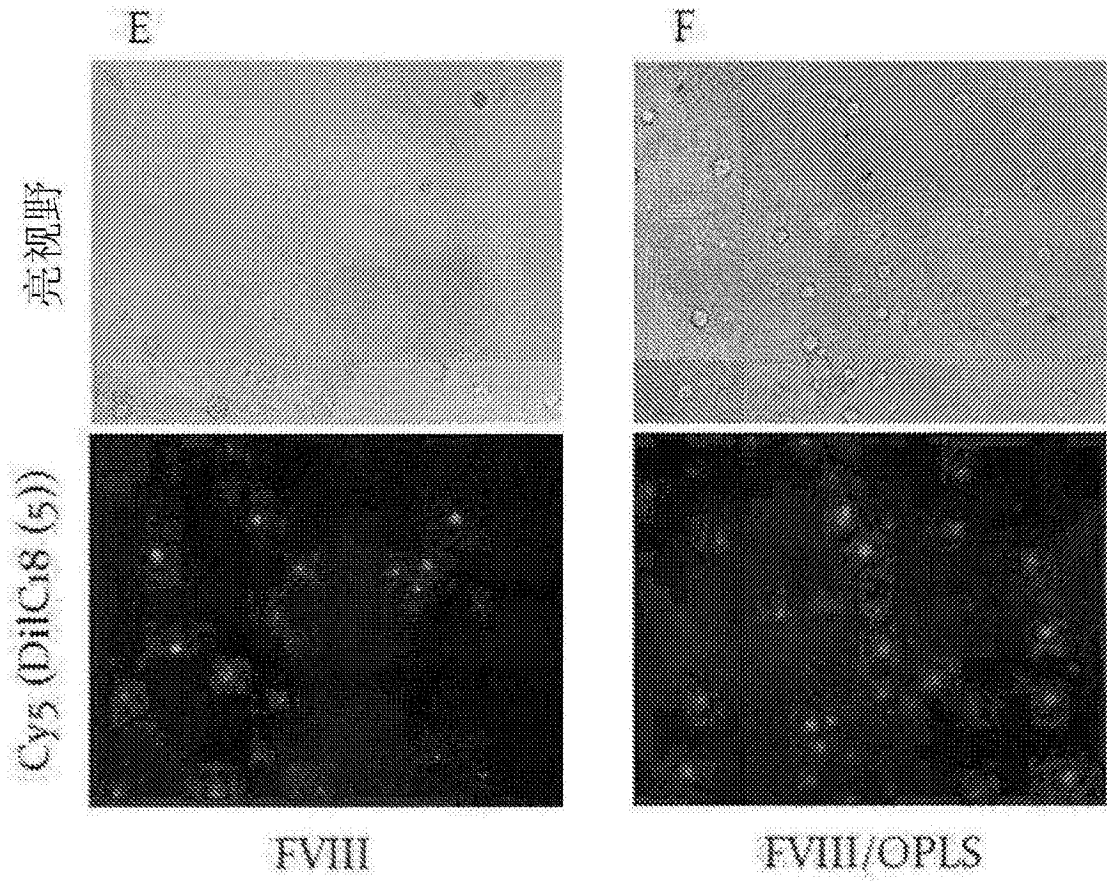


图33E

图33F



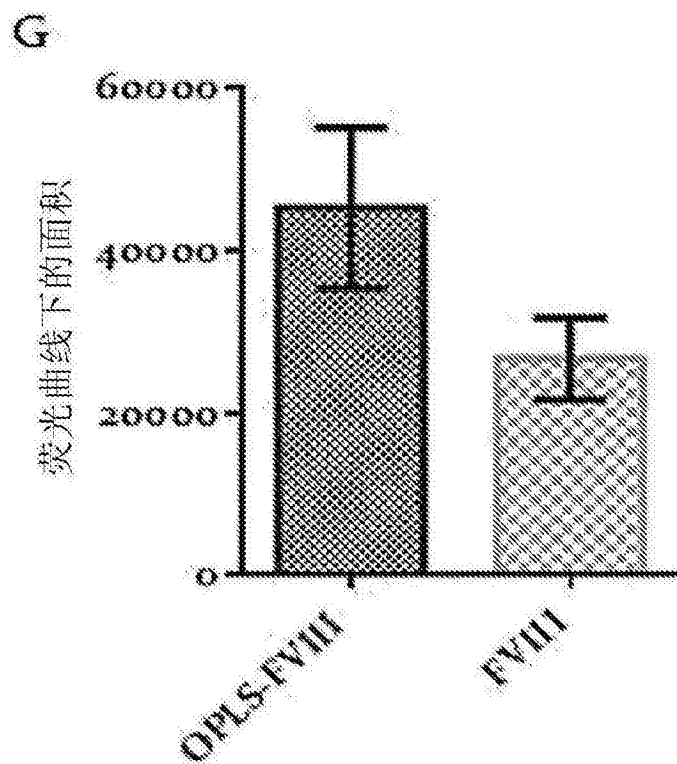


图33G

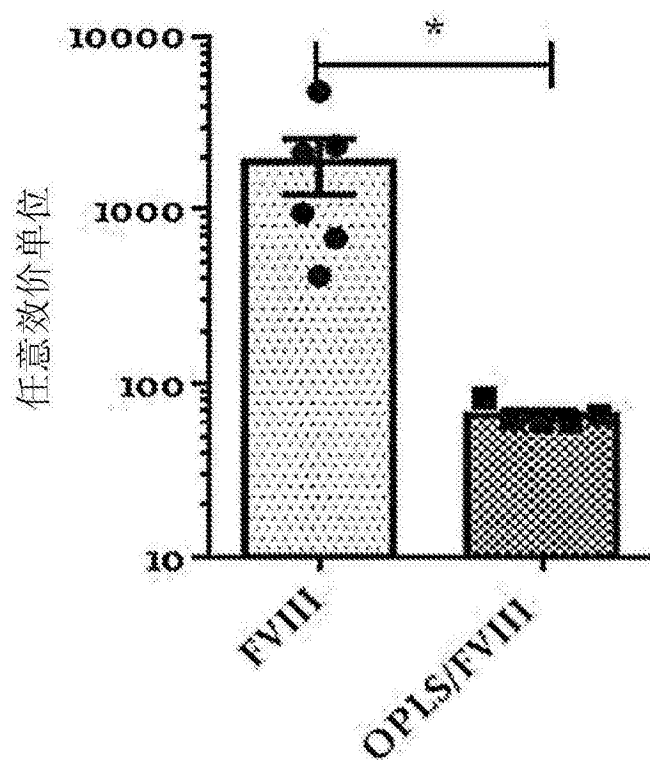


图34

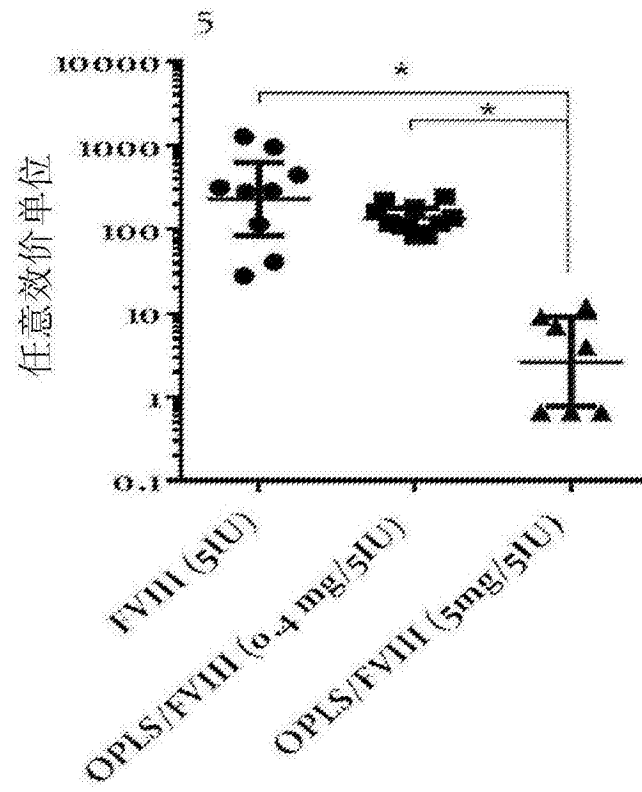


图35