



(10) 授权公告号 CN 111247170 B

(45) 授权公告日 2024.07.16

(21) 申请号 201880068146.6

S·科尔尼格 A·克鲁

(22) 申请日 2018.10.19

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111247170 A

有限公司 11038

专利代理师 张小勇

(43) 申请公布日 2020.06.05

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

17197541.0 2017.10.20 EP

18194394.5 2018.09.14 EP

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/34 (2006.01)

C07K 16/42 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.20

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2018/051136 2018.10.19

WO 2010057626 A1, 2010.05.27

WO 9749809 A1, 1997.12.31

WO 9324630 A1, 1993.12.09

WO 2013121296 A1, 2013.08.22

WO 9407921 A1, 1994.04.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/075523 EN 2019.04.25

(73) 专利权人 杰特有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

专利权人 加拿大血液服务中心

审查员 孙琳

权利要求书2页 说明书37页

序列表4页 附图12页

(72) 发明人 A·拉萨鲁斯 F·卡瑟曼

(54) 发明名称

一种方法

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗或预防炎性病症的针对红细胞的抗体,并且涉及治疗或预防炎性病症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的针对红细胞的抗体。

1. 针对红细胞 (RBC) 的抗体在制造用于通过减少炎症来预防或治疗炎性病情的组合物中的用途,

其中所述炎性病情是自身免疫病情,所述自身免疫病情不是ITP,

其中所述抗体包含:

SEQ ID NO:5所示的轻链可变区中的轻链可变区CDR1、CDR2和CDR3,和

SEQ ID NO:6所示的重链可变区中的重链可变区CDR1、CDR2和CDR3,

其中所述病情选自类风湿性关节炎和与输血有关的急性肺损伤 (TRALI),且

其中所述抗体是IgG类型。

2. 根据权利要求1的用途,其中所述抗体结合RBC分子,所述RBC分子在RBC上的密度高于在一种或多种其他血细胞和/或与血管系统相关的细胞上的密度。

3. 根据权利要求1的用途,其中所述抗体是单克隆的并且是人的或人源化的。

4. 根据权利要求1的用途,其中所述IgG是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

5. 根据权利要求1的用途,其中所述抗体包含Fc区。

6. 根据权利要求5的用途,其中所述抗体结合Fc受体。

7. 根据权利要求6的用途,其中所述Fc受体是Fc  $\gamma$  受体。

8. 根据权利要求7的用途,其中所述Fc  $\gamma$  受体是Fc  $\gamma$  RI、Fc  $\gamma$  RIIA、Fc  $\gamma$  RIIB、Fc  $\gamma$  RIIIA或Fc  $\gamma$  RIIIB。

9. 根据权利要求1的用途,其中所述自身免疫病情是自身抗体介导的自身免疫病情。

10. 根据权利要求1的用途,其中所述RBC抗体结合以每细胞 $10^2 \sim 10^5$ 个拷贝的密度存在的RBC分子。

11. 根据权利要求1的用途,其中通过静脉内、肌内、腹膜内、脑脊髓内、脑内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、肺内、鼻内、皮内局部施用或通过吸入来施用所述抗体。

12. 根据权利要求11的用途,其中通过静脉内或皮下施用来施用所述抗体。

13. 根据权利要求1的用途,其中所述抗体与一种或多种其他治疗剂组合施用。

14. 根据权利要求13的用途,其中所述抗体与至少一种其他抗炎剂或用于治疗炎性病情或减少其症状的药剂组合施用。

15. 根据权利要求13的用途,其中所述一种或多种其他治疗剂选自抗炎剂、免疫抑制剂和/或镇痛剂。

16. 根据权利要求1~15中任一项的用途,其中:

(a) 所述抗体的施用不导致抗原的耐受或对抗原的耐受,和/或

(b) 所述抗体不包含任何非免疫球蛋白序列,和/或

(c) 所述抗体不是与任何其他蛋白质或肽的融合蛋白。

17. 根据权利要求16的用途,其中所述抗原是与参与或引起自身免疫病情的抗体一起施用的蛋白质或肽。

18. 根据权利要求16的用途,其中所述抗体由免疫球蛋白序列组成,并且不存在其他序列。

19. 根据权利要求18的用途,其中不存在其他序列与N或C末端融合。

20. 根据权利要求1~15中任一项的用途,其中所述抗体以组合物的形式施用至受试者。

21. 根据权利要求20的用途,其中所述组合物不包含任何细胞和/或没有细胞与所述组合物共同施用。

## 一种方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗或预防炎症性病症的红细胞抗体,并且涉及治疗或预防炎症性病症的方法,该方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的针对红细胞的抗体。

[0002] 发明背景

[0003] 炎症性病症包括大量以炎症为特征的疾病和病情。实例包括变态反应、哮喘、自身免疫病、乳糜泻、肾小球肾炎、肝炎和炎症肠病等。

[0004] 当前用于炎症性病症的治疗与疾病本身一样范围广泛,但是一种方法是使用静脉内免疫球蛋白(IVIg)来治疗这些疾病。IVIg制剂是通常从健康个体的血浆中获得的合并的多特异性IgG的治疗性制剂,IVIg制剂自20世纪80年代初以来就已经可用,并已用于治疗原发性或继发性免疫缺陷。由于其多重抗炎和免疫调节特性,IVIg已成功用于各种自身免疫和炎症性病情。公认的自身免疫适应症包括特发性血小板减少性紫癜(ITP)、川崎病、格林-巴利综合征和其他自身免疫性神经病、重症肌无力、皮炎和几种罕见疾病(Hartung HP等人, Clin Exp Immunol.2009;158(Suppl 1):23-33)。

[0005] 其他治疗还涉及抗体。例如,单克隆抗体(mAb)也用于治疗炎症性疾病。这些mAb中有许多靶向在炎症中起作用的分子,例如抗肿瘤坏死因子(抗TNF)、抗白介素-1(抗IL-1)受体、抗IL-6受体、抗 $\alpha$ 4整联蛋白亚基和抗CD20药剂,其已被批准用于治疗几种炎症性和免疫性疾病,包括类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、脊柱关节炎、青少年关节炎、银屑病、银屑病关节炎等。

[0006] 与红细胞(RBC)结合的抗体在治疗上仅用于两个目的,即作为免疫性血小板减少症(ITP)患者的一线治疗,以及用于Rh阴性母亲的Rh同种免疫。

[0007] 用于ITP的治疗的应用最初基于抗RBC抗体例如“抗D”(从人血浆中纯化的抗D免疫球蛋白的混合物)竞争性抑制单核吞噬系统(MPS,以前称为网状内皮系统(RES))中吞噬细胞的经调理的血小板清除的能力来进行实践,因为ITP是一种自身免疫性疾病,其中可检测到针对几种血小板表面抗原的抗体,并且ITP的定义特征之一是低血小板计数。这至少部分是由于血小板被IgG自身抗体包被所致,其进而使它们易受脾脏巨噬细胞以及肝脏中的Kupffer细胞的调理作用和吞噬作用。已经提出ITP治疗是有效的,因为通过引入这些抗体,RBC变成被抗体包被并且随后被单核吞噬系统(MPS,以前称为RES)清除。这与通过相同途径发生的经调理的血小板的清除竞争,并导致自身抗体调理的血小板的减少的清除。

[0008] 此理论得到ITP患者在脾切除术后对抗D的反应极少或没有反应的现象的支持。抗D调理的RBC还可以防止经调理的血小板的体外吞噬作用。

[0009] 已显示针对许多不同的小鼠RBC分子(例如CD24和TER-119抗原)的单克隆抗体在小鼠模型中成功改善了血小板减少症(Song S.等人, Blood.2003;101(9):3708-3713)。在小鼠中,CD24似乎由RBC表达,但据信它不在人RBC上表达。在进一步的研究中,不表达RhD但表达RhC的ITP患者已成功用抗RhC治疗(Oksenhendler E等人, Blood.1988;71:1499-1502)。

[0010] 然而,本发明人已经出乎意料地观察到,通过针对TER-119抗原的抗体对ITP的改

善迅速发生,并且发生在可测量的贫血发作(由RBC清除诱导)之前。基于这种观察,先前提出的简单的MPS阻断机制似乎不足以解释抗体的作用,并进一步表明涉及广泛的抗炎活性。本发明人在小鼠模型中的证实已经证实了这一点,即针对TER-119抗原的抗体能够改善不涉及经典MPS功能的炎性疾病,特别是炎性关节炎和与输血有关的急性肺损伤(TRALI)。测试的抗TER-119抗原抗体既预防关节炎的诱导,又能够改善小鼠的已有疾病。另外,它能够在TRALI鼠模型中防止体温过低并减少肺水肿。在此基础上,抗RBC抗体在炎性病症中具有显著的治疗潜力。

## 发明内容

[0011] 因此,本发明提供了针对红细胞的抗体,其用于治疗或预防炎性病情的方法。

[0012] 还提供了一种在受试者中治疗或预防炎性病情的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的针对红细胞的抗体。

[0013] 还提供了针对红细胞的抗体在制备用于治疗或预防炎性病情的药物中的用途。

[0014] 在一些实施方案中,针对RBC的抗体特异性结合RBC分子,优选RBC跨膜分子。

[0015] 在一些实施方案中,针对RBC的抗体是多克隆或单克隆的。该抗体可以是单特异性的或多特异性的(例如单特异性的)。在一些实施方案中,抗体是分离的、多克隆的、单克隆的、多特异性的、单特异性的、小鼠的、人的、完全人的、人源化的、灵长类化的或嵌合的。在一个特定的实施方案中,针对RBC抗原的抗体是单克隆的人或人源化抗体或微型抗体(minibody)(缺少Fab部分中的恒定区的抗体片段)。在一些实施方案中,针对RBC的抗体选自Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、单链Fv(scFv)和二硫键连接的Fv(sdFv)、双抗体、三抗体、四抗体;优选地,这样的片段与包含Fc的部分连接或融合。

[0016] 在一些实施方案中,针对RBC的抗体是IgG或IgM类型,并且特别地可以是任何类型的大鼠、小鼠、人或人源化IgG或IgM,优选人或人源化IgG或IgM。人或人源化IgG可以是例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4类型。也可以使用大鼠或小鼠IgG(例如大鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG2c,或小鼠IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3或IgG4)。针对RBC抗原的抗体优选包含Fc区,并优选结合Fc受体,例如Fc $\gamma$ 受体(Fc $\gamma$ R),例如Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RIIA(CD32)、Fc $\gamma$ RIIB(CD32)、Fc $\gamma$ RIIIA(CD16a)、Fc $\gamma$ RIIIB(CD16b)。

[0017] 在一些实施方案中,炎性病情是自身免疫病情,例如。自身抗体介导的自身免疫病情。自身免疫病情可以是其中存在升高的IL-10的病情(例如,与健康受试者相比)。自身免疫病情可以是神经病情,其在一些实施方案中不是ITP。自身免疫病情可以(i)选自慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、重症肌无力(MG)、多发性硬化症(MS)和视神经脊髓炎(NMO),或(ii)选自类风湿性关节炎和TRALI。

[0018] 在一些实施方案中,RBC抗体结合肽表位。在一些实施方案中,RBC抗体结合选自RhD蛋白、GPA、TER-119抗原的人直向同源物(Ly76)和Band 3的RBC分子。在一些实施方案中,RBC抗体结合以每RBC 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup>个拷贝的密度存在的RBC分子。抗体可以通过任何途径施用,例如肠胃外或非肠胃外。优选的胃肠外途径包括静脉内、肌内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、局部施用或通过吸入。通常,通过静脉内或皮下施用来施用针对RBC的抗体。

[0019] 在一些实施方案中,施用针对RBC的抗体,使得在给定的时间范围内,例如在一天

或一周、两周或一个月内,施用受试者体重的约0.001mg/kg至约100mg/kg的量的抗体。在某些实施方案中,这样的基于体重的剂量选自每天或每周、每两周或每一个月约0.01mg/kg体重,每天或每周、每两周或每一个月约0.3mg/kg体重、约1mg/kg体重,每天或每周、每两周或每一个月约3mg/kg体重,和每天或每周、每两周或每一个月约10mg/kg体重。

[0020] 在一些实施方案中,以固定剂量施用针对RBC的抗体。在一个具体的实施方案中,施用针对RBC的抗体,使得在给定的时间范围内,例如在一天、一周、两周或一个月之内,施用约50 $\mu$ g至约2000mg的固定剂量的量的抗体。

[0021] 因此,根据在给定的时间范围内施用至受试者的抗体的量来定义剂量方案。在该时间范围内的施用频率将决定每次施用的抗体的量。例如,如果剂量是10mg/kg/周,则可以以单次10mg/kg剂量或以使用适当减少的量的抗体(例如一周内2个5mg/kg剂量)的多剂量施用。在一些实施方案中,针对RBC的抗体以单剂量(例如每天、每周、每两周一次或每月一次)施用,或者如果每次施用的抗体量较低,则更频繁地以多剂量施用。一般而言,通过皮下途径的施用可以比静脉内施用(例如,每两周一次或每月一次)更频繁地(例如,每天一次)进行。

[0022] 在一些实施方案中,本发明的方法包括进一步向受试者施用治疗有效量的一种或多种其他治疗剂,优选至少一种其他抗炎剂,或用于治疗炎性病情或减少其症状的药剂,例如抗炎剂、免疫抑制剂或镇痛剂。

[0023] 在一些实施方案中,抗体优选结合RBC。例如,RBC抗体结合的RBC分子在RBC上的密度可以高于在一种或多种其他血细胞和/或与血管系统相关的细胞上的密度。

[0024] 在一些实施方案中,抗体在人或合适的动物模型中在体内引起MPS阻断,或在体内(例如在动物模型中或在人中)引起溶血,或在体外测定中抑制经调理的血小板的吞噬作用。

[0025] 附图列表

[0026] 图1. 抗体克隆策略。使用所示的酶消化载体和片段,并通过T4DNA连接酶克隆在一起。使用位于InTag衔接子中的氯霉素抗性标记(CmR)选择重组克隆。pCMV:CMV启动子,pA:BGH polyA,S:ER信号序列。

[0027] 图2显示,鼠ITP的改善可发生在可检测到的贫血之前。C57BL/6小鼠用45ug大鼠IgG(B)或45ug TER-119抗体(C、D)进行预处理并在x轴上描述的持续时间内计数血小板以及血红细胞。在x轴上的指定时间点,用2ug抗血小板抗体(MWReg30)诱导ITP。注射MWReg30的1小时后计数血小板。左y轴代表血小板计数(空心正方形),右y轴代表RBC计数(实心三角形)。数据表示为来自5个独立实验的平均值 $\pm$ SEM,共有90只小鼠。对于血小板减少症,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.001$ ,\*\*\* $P < 0.0001$ 。

[0028] 图3显示,单克隆RBC特异性抗体TER-119抑制性关节炎和输血相关的急性肺损伤。在第0天,评估C57BL/6小鼠的基础关节炎测量值(A、B)。一组小鼠接受45ug TER-119抗体(空心圆圈),另一组小鼠(空心正方形)则什么也不接受。两个小时后,所有小鼠都接受K/BxN血清的注射。根据Mott PJ等人,PLoS One. 2013;8(6):e65805,每天进行踝关节测量(A)和临床评分(B),持续10天。数据表示为5个独立实验的平均值 $\pm$ S.E.M.n=16(仅K/BxN血清);n=13(TER-119)。\* $P < 0.005$ ;\*\* $P < 0.0001$ 。

[0029] 在独立的实验中,小鼠在未经预处理的情况下接受K/BxN血清的注射。在第5天,不

处理(空心正方形)或使用50ug 30F1抗体(空心三角形)或45ug TER-119抗体(空心圆圈)处理(箭头)关节炎小鼠。根据Mott PJ等人,PLoS One.2013;8(6):e65805,在第0、1、2和5-9天测量踝关节测量值(C)和临床评分(D)。数据表示为来自4个独立实验的平均值±S.E.M.n=5(仅K/BxN血清);n=6(TER-119);n=7(30-F1)。\*P<0.01;\*\*P<0.0001。

[0030] 对于TRALI实验,向SCID小鼠注射40ug TER-119抗体(空心圆圈,空心三角形)或保持未经处理(空心正方形),持续24小时。然后向小鼠注射50ug的34-1-2s(空心三角形,空心正方形)或不进行注射(空心圆圈)。每30分钟测量直肠温度,持续2小时(E)。随后在2小时处死小鼠以评估肺水肿(F)。数据表示为来自4个独立实验的平均值±S.E.M.n=4(TER-119);n=5(34-1-2S);n=14(TER-119+34-1-2S)。\*P=0.006;\*\*P=0.001。

[0031] 图4. TER-119对胶原Ab诱导的关节炎(CAbIA)的治疗作用。

[0032] (A) 在第5天用2mg/kg TER-119或同种型对照mAb(大鼠IgG2b)的单次静脉内注射处理患有建立的CAbIA的小鼠。根据Campbell IK等人,J Immunol.2014;192:5031-5038评估临床评分。数据为平均值±SEM(n=9)。

[0033] (B) 在实验的第12天小鼠的总组织学评分。点代表个体小鼠;条显示平均值±SEM。与同种型对照相比,\*\*\*P<0.001,Mann-Whitney检验(双尾)。

[0034] (C)和(D)显示了在胶原Ab诱导的关节炎(CAbIA)中不同剂量的TER119对临床评分的影响。

[0035] (E) 为了评估关节中的浸润细胞的数量,收集来自每只小鼠的膝盖骨,消化并通过目视计数来计算浸润白细胞。

[0036] (F) 1mg/kg剂量的TER119导致RBC表面的结合抗体显著低于1.5和2mg/kg剂量,其与临床评分相关。

[0037] (G) 所有剂量的TER119抗体减少关节炎小鼠关节中的C1q、C3、C5a水平。通过ELISA从关节液中评估补体成分C1q(A)、C3(B)和C5a(C)。通过单因素ANOVA检验和与对照组的Holm-Sidak多重比较对数据进行分析。\*P<0.05;\*\*P<0.01;\*\*\*P<0.001;\*\*\*\*P<0.0001。

[0038] (H) 在第6天用TER-119、同种型对照mAb、去糖基化的TER119或M1/69处理患有建立的CAbIA的小鼠。评估临床评分和爪宽度。使用两因素ANOVA和Dunnnett多重比较检验(所有组针对同种型对照)计算统计学比较。

[0039] (I) 显示通过流式细胞术评估的抗体(0-512ng—抗)与来自C57BL/6小鼠的红细胞的结合。

[0040] 图5. TER-119调理的红细胞的剂量依赖性吞噬指数。从C57B/6小鼠中获取红细胞,并不进行调理(对照)或用各种浓度的TER-119进行调理,然后与RAW264.7巨噬细胞孵育30分钟。吞噬指数的计算方法是:计数摄入的RBC的总数,然后将其除以视野内巨噬细胞总数,然后乘以100(每组n=5)。\*\*P<0.01,\*\*\*P<0.001。

[0041] 图6. 与TER-119调理的红细胞孵育的血小板的吞噬指数。将RAW 264.7细胞过夜培养,然后将标记有CMFDA并用Mwreg30调理的血小板在37°C下添加到有或没有TER-119调理的红细胞的RAW细胞中,持续30分钟。计算血小板吞噬指数。\*\*\*P<0.05。

[0042] (每组n=5)。

[0043] 图7. 抗红细胞抗体包被的RBC抑制血小板吞噬作用的能力。红细胞未经调理或用抗体TER-119、去糖基化的TER-119、34-3C(5或40ug)和M1/69调理1小时,然后与RAW 264.7

细胞和MWReg30调理的CFMDA标记的血小板孵育30分钟。通过共聚焦显微镜观察细胞,并通过Imaris软件8.0.2版计数内化的血小板。(P<0.05)。

[0044] (每组n=4-6)。

[0045] 图8.表达为鼠IgG转换变体的6种TER-119能够治疗胶原诱导的关节炎(CIA)的慢性模型,而不依赖于抗体被动转移。使针对II型胶原蛋白免疫的DBA-1小鼠发展关节炎,然后用PBS(正方形,n=7只小鼠)、表达为鼠IgG1亚型(三角形,n=6只小鼠)或表达为鼠IgG2a亚型(倒三角形,n=6只小鼠)的2mg/kg TER-119处理(如箭头所示定时),并在实验过程中评估关节炎临床评分。

[0046] 图9:34-3C(抗Band 3抗体)对胶原Ab诱导的关节炎(CAbIA)的治疗作用。

[0047] (A)在第5天用2mg/kg抗Band 3mAb(克隆34-3C,小鼠IgG2a)或PBS的单次静脉内注射处理患有建立的CAbIA的小鼠。根据Campbell IK等人,J Immunol.2014;192:5031-5038评估临床评分。数据为平均值±SEM(n=4/5)。

[0048] (B)实验的第6天和第12天之间的小鼠临床平均评分。点代表个体小鼠;条显示平均值±SEM。通过Mann-Whitney检验(双尾)分析数据。\*P<0.05。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明涉及针对RBC的抗体在炎性病情的治疗中的用途,并且基于发明人的出乎意料的观察,即针对RBC TER-119抗原的抗体对炎性病情免疫性血小板减少症(ITP)有作用,这发生在此抗体的溶血作用之前。以前曾认为该抗体和其他耗竭RBC的抗体对ITP的作用是由单核吞噬系统(MPS)调理RBC清除而产生的,这竞争性抑制通过同一途径的血小板耗竭。但是,如通过血小板计数评估的,对RBC的作用和ITP的改善之间在时间上的这种差异支持了抗RBC抗体具有广泛的抗炎活性的结论,因此此类抗体的效用从ITP治疗扩展至涉及炎症的其他疾病。

[0051] 这种广泛的抗炎活性的存在得到抗RBC抗体改善三种不涉及经典MPS功能的独立炎性疾病的支持。首先,抗RBC抗体能够在类风湿性关节炎的众所周知和良好表征的K/BxN小鼠模型中防止类风湿性关节炎的诱导,其中在从K/BxN小鼠转移血清后发生关节炎的诱导。这是通过在用K/BxN血清诱导疾病之前用抗RBC抗体预防性治疗小鼠来显示的。与未使用抗RBC抗体预防性治疗的小鼠相比,在用抗RBC抗体预防性治疗的小鼠中临床关节炎评分和踝关节宽度(这是评估该小鼠模型中RA的两个标准参数(Mott PJ,Lazarus AH(2013)PLoS ONE 8(6):e65805))明显减少。除此之外,再次基于临床关节炎评分和踝关节宽度的参数,抗RBC抗体还能够改善已建立的关节炎疾病。在用K/BxN血清诱导疾病后5天,用抗RBC抗体进行治疗在3天后将临床评分和踝关节宽度恢复到正常水平。

[0052] 抗RBC抗体还能够缓解小鼠的众所周知和良好表征的胶原蛋白抗体诱导的关节炎(CAbIA)模型(类风湿性关节炎的最常研究的自身免疫模型)中的炎性关节炎(Campbell IK等人,J Immunol.2014;192:5031-5038,Campbell I K等人,J Immunol.2016;197:4392-4402)。CAbIA模型中的疾病发展依赖于Fc $\gamma$ R参与和补体系统的激活(Kagari TD等人,J Immunol.2013;170(8):4318-4324,Nandakumar KS等人,Arthritis Res Ther.2006;8(6):223)。在注射抗胶原蛋白mAb混合物并注射LPS后,发生关节炎的诱导。这在诱导疾病后用抗RBC抗体治疗小鼠来证实。治疗组之间有明显的差异;经治疗的小鼠在注射后24h内完全免受关节炎侵害,并且与未进行抗RBC抗体治疗的小鼠相比,在用抗RBC抗体治疗的小鼠中观



察到组织学评分的减少。

[0053] 在炎症疾病的另一种小鼠模型中,抗RBC抗体能够防止体温过低的诱导(这是在将MHC I类抗体(34-1-2S)注入SCID小鼠后观察到的)并改善肺水肿。这是人输血相关的急性肺损伤(TRALI)(这是输血的最严重的并发症之一)的小鼠模型。在该炎症疾病(其症状与ITP和关节炎不同)中抗RBC抗体预防全身性休克的能力(如通过防止体温过低确定的)以及缓解肺水肿的能力为抗RBC抗体的广泛的抗炎作用提供了额外的支持。

[0054] 尽管IVIG已被用于治疗ITP超过30年,并且多克隆抗D能够逆转表达D抗原的ITP患者的血小板减少症(例如,以用于此治疗的**Rhophylac®**的形式出售),但抗RBC抗体的广泛的抗炎作用以前未被认可。已经开展工作以鉴定能够用于治疗ITP的针对RBC的单克隆抗体,并且某些抗RBC单克隆抗体(如上文提及的抗-TER-119)和其他抗CD24抗体已显示出在小鼠模型中有效(Song S等人,Blood.2003;101(9):3708-3713),但是,一项在患有ITP的人中测试单克隆抗D抗体的小型研究并未成功(Godeau,B.等人,(1996)Transfusion;36(4):328-330)。

[0055] 因此,先前关于用于治疗ITP的抗体的许多工作都集中于这类抗体调理RBC以防止血小板破坏的能力(特别是通过提供对MPS途径的竞争)。然而,本发明人的这项新工作在更一般的炎症治疗中为针对RBC的抗体开辟了新的治疗领域。本发明人已经认识到,这些见解提供了使用与RBC结合并旨在减少炎症、提高治愈率、延长炎症病症的存活和/或无进展存活的抗体进行治疗干预的新机会。

[0056] 因此,本发明提供了针对RBC的抗体,其用于预防或治疗炎症病情的方法,以及提供了预防和治疗受试者的炎症病情的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的针对RBC的抗体。已显示,使用在体外用抗D抗体致敏然后引入患者体内的红细胞可以获得类似的效果(Ambriz-Fernandez,R.等人,(2002)"Fc receptor blockade in patients with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura with anti-D IgG"Arch Med Res 33(6):536-540);因此,本发明还提供了用针对RBC的抗体致敏的RBC的施用,其用于预防或治疗炎症病情的方法,以及提供了预防和治疗受试者的炎症病情的方法。

[0057] 炎症病情

[0058] 本发明涉及炎症病情的治疗和/或预防。“炎症病情”是指以破坏性炎症(其可以是复发性或慢性的,并且与正常组织修复无关)为特征的任何病情。炎症可以是慢性炎症。在慢性炎症病情下,中性粒细胞和其他白细胞被细胞因子和趋化因子组成型募集,导致组织损伤。

[0059] 炎症病情的实例是自身免疫病情,即其中免疫系统攻击身体自身组织的疾病。此类疾病尤其包括“自身炎症性疾病”,其中身体的免疫系统引起炎症。此类病情可以是抗体介导的和/或T细胞介导的,和/或身体先天免疫系统介导的。在一个实施方案中,本发明的抗体用于治疗自身抗体介导的自身免疫病情。

[0060] 炎症病情也可以是补体介导的(例如,再灌注损伤或脊髓损伤中补体介导的炎症)。

[0061] 炎症病情可以是其中存在升高的IL-10的自身免疫病情,例如选自关节炎、特别是类风湿性关节炎、川崎病、I型糖尿病、多发性硬化症、系统性红斑狼疮(SLE)的病情。

[0062] 可选择地, 炎性病情可以是其中不存在升高的IL-10的自身免疫病情, 例如其中IL-10水平正常, 或其中IL-10减少。ITP患者和自身免疫性甲状腺炎患者具有低于对照的IL-10水平。

[0063] 疾病可以是例如与温度变化相关的炎症、自身免疫性血细胞减少症(例如自身免疫性溶血性贫血(AIHA)、自身免疫性中性粒细胞减少症(AIN)、自身免疫性血小板减少症(ITP))、原发性抗磷脂综合征、关节炎(例如类风湿性关节炎、青少年关节炎)、肠病(例如溃疡性结肠炎、克罗恩病、乳糜泻)、川崎病、SLE、免疫性血小板减少性紫癜、缺血/再灌注损伤、I型糖尿病、炎性皮肤病(例如痤疮、银屑病、扁平苔藓、天疱疮、类天疱疮)、自身免疫性甲状腺病情(例如格雷夫斯病、桥本甲状腺炎)、舍格伦综合征、肺部炎症(例如哮喘、慢性阻塞性肺病(COPD)、肺结节病、淋巴细胞性肺炎)、移植排斥、脊髓损伤、脑损伤(例如中风、创伤性脑损伤)、神经退行性病情(例如阿尔茨海默病、帕金森病、路易体病)、其他神经系统病情(进行性多灶性白质脑病、ALS、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、炎性神经病、格林-巴利综合征(GBS)、运动神经元疾病(MND)、多发性硬化症、重症肌无力、视神经脊髓炎(NMO)、其他自身免疫性通道病)、牙龈炎、基因治疗引起的炎症、血管生成疾病、炎性肾脏疾病(例如IgA肾病、膜增生性肾小球肾炎、快速进行性肾小球肾炎)、Stevens-Johnson综合征、自身免疫性癫痫、肌肉炎症(例如皮肌炎和多肌炎)、硬皮病和动脉粥样硬化。

[0064] 特别令人感兴趣的是肺损伤(例如急性肺损伤、与输血有关的急性肺损伤(TRALI))、自身免疫性血细胞减少症、特发性血小板减少性紫癜/免疫性血细胞减少症(ITP)、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、哮喘、川崎病、格林-巴利综合征、Stevens-Johnson综合征、克罗恩病、结肠炎、糖尿病(例如1型或2型糖尿病)、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、炎性神经病、视神经脊髓炎(NMO)、其他自身免疫性通道病、自身免疫性癫痫、重症肌无力、皮肌炎、多肌炎、硬皮病、血管炎、葡萄膜炎、天疱疮、类天疱疮、脊髓损伤或阿尔茨海默病。

[0065] 在一些实施方案中, 炎性病情是神经病情, 例如神经性自身免疫性病情。此类病情的实例包括慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP)、重症肌无力(MG)、多发性硬化症(MS)、视神经脊髓炎(NMO)或自身免疫性癫痫。

[0066] 在一些实施方案中, 炎性病情选自关节炎(例如类风湿性关节炎)和TRALI。

[0067] 在一些实施方案中, 炎性病情不是ITP, 或者不是ITP或自身免疫性甲状腺炎。在其他实施方案中, 炎性病情不是其中IL-10减少的疾病, 或者不是其中IL-10水平正常的疾病。

[0068] 可以使用本领域已知的标准免疫测定(例如ELISA)试剂盒来测量IL-10水平。可以在任何合适的样品(例如血液、血清、血浆、尿液、脑脊液)中测量水平, 因此在本文提到IL-10水平时, 其是在相关的样品中的水平。可以与正常例如健康受试者进行比较。

[0069] 治疗的生物读出(readout)/效果

[0070] 不受任何特定理论的束缚, 本发明人认为, 根据本发明的抗RBC抗体的使用可用于: (i) 减少炎性病情中的炎症, (ii) 减少和/或延迟该病情的临床表现(可能是炎性病情中炎症的作用), (iii) 延长患有炎性病情的受试者的存活, (iv) 提高患有此类病情的患者的生活质量, (v) 增强患者的治疗的便利性, 和/或(vi) 增强用于治疗炎性病情的其他药物的功效。

[0071] 提供了一种治疗炎性病情的方法, 所述方法包括向受试者施用有效量的针对RBC

的抗体。在一些实施方案中,本发明的方法可以描述为减少炎性病情中的炎症的方法,减少和/或延迟该病情的临床表现(例如炎性病情中的炎症的作用)的方法,延长患有炎性病情的受试者的存活的方法,提高患有这种病情的患者的生活质量,增强患者的治疗的便利性的方法和/或增强用于治疗炎性病情的一种或多种其他药物的有效性的方法,其中在每种情况下,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的针对RBC的抗体。

[0072] 本发明的方法也可以描述为治疗或预防炎性病情的一种或多种症状,任选地治疗炎性病情的一种或多种症状的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量的针对RBC的抗体。

[0073] 同样地,提供了用于这些方法的针对RBC的抗体,以及针对RBC的抗体在制造用于执行此类方法的药物中的用途。

[0074] (i) 减少炎性病情中的炎症

[0075] 可以将本发明的方法描述为减少炎性病情中的炎症的方法。在一些实施方案中,通过本领域已知的标准临床测试评估炎症及其在炎性病情的作用。

[0076] 例如,炎性病情的疾病标志物是已知的。用于评估疾病状态的一种或多种标志物可以是特异于相关疾病的一种标志物或一组标志物(此处称为“疾病标志物”),或可以是炎症的标志物(此处称为“炎性标志物”)。用于评估的合适样品的实例包括组织、血液和尿液。

[0077] 可以评估受试者中一种或多种炎性标志物的水平,以提供有关炎性疾病的状态以及任何治疗对该疾病的作用的信息。炎性标志物的减少通常是炎症减少的指示。可以在各个时间点(例如,在开始治疗之前以及在施用本发明的抗体之后的合适时间点)从受试者获取生物样品,并且可以评估一种或多种炎性标志物的水平以确定治疗对受试者的炎症的作用。用于此目的的已知的炎性标志物的实例包括CRP、IL-6和TNF- $\alpha$ 。在一个实施方案中,与施用本发明的抗体之前的标志物的水平相比,施用本发明的抗体之后受试者中一种或多种炎性标志物减少。在本发明的另一个实施方案中,该方法进一步包括确定受试者中一种或多种炎性标志物的水平的步骤,这可以在治疗之前和/或之后进行。

[0078] 任何减少优选在统计学上是显著的。一种或多种上述标志物的减少可以与治疗前的水平相比减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

[0079] (ii) 减少和/或延迟炎性病情的临床表现(例如炎性病情中炎症的作用)

[0080] 可以将本发明的方法描述为减少炎性病情的临床表现(例如,炎性病情中炎症的作用)的方法。在一些实施方案中,可以在受试者中评估一种或多种疾病标志物的水平以提供关于疾病状态以及关于任何治疗对疾病的作用的信息。在许多情况下,疾病的临床表现是炎症和相关的组织损伤的结果,但是其他机制也是已知的。

[0081] 某些疾病标志物是已知的,并被临床医生用于诊断和监测炎性病情。通常,疾病标志物水平的减少可能指示疾病严重性的减少(尽管在某些情况下,一种或多种疾病标志物的增加可能指示疾病严重性的减少)。可以在各个时间点(例如,在开始治疗之前以及在施用本发明的抗体之后的合适时间点)从受试者获取生物样品,并且可以评估一种或多种疾病标志物的水平以确定治疗对受试者的炎症的作用。下表1列出了用于此目的的已知的疾病标志物的实例。在一个实施方案中,与施用本发明的抗体之前的标志物的水平相比,施用本发明的抗体后受试者中一种或多种疾病标志物减少(或增加)。在某些实施方案中,减少(例如炎性细胞因子或趋化因子)或增加(例如抗炎细胞因子或抗炎趋化因子)与病情严重程度

的减少有关。在本发明的另一个实施方案中,该方法进一步包括确定受试者中一种或多种疾病标志物水平的步骤,这可以在治疗之前和/或之后进行。

[0082] 表1:

疾病	血液疾病标志物
类风湿性关节炎 (RA)	类风湿因子 (RF) (在约 80% 的类风湿性关节炎患者的血液中发现的针对免疫球蛋白的 Fc 部分的自身抗体)。 抗环瓜氨酸化肽抗体 (抗 CCP) 蛋白质生物标志物 14-3-3eta
MG	抗乙酰胆碱受体抗体 (抗 AChR Ab) 抗肌肉特异性酪氨酸激酶抗体 (抗 MuSK Ab)
系统性红斑狼疮 (SLE)	抗核抗体 抗双链 DNA (dsDNA) 抗体 抗 U1 RNP (U1 剪接体 RNA) 抗组蛋白抗体

[0084] 这些标志物的任何减少或增加优选在统计学上是显著的。一种或多种上述标志物的减少或增加可以例如与治疗前的水平相比减少或增加至少 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%。

[0085] 炎症的作用也可以通过本领域已知的标准临床测试来评估。临床测试可以涉及基于待治疗的疾病或病症的临床表现进行的评分。与施用本发明的抗体之前的疾病的临床评分相比,一个实施方案中的治疗导致疾病的临床评分的改善。这类似于在适当的动物模型中观察到的改善,例如在用本发明的抗体治疗后在实施例3和4中在K/BxN小鼠中观察到的临床评分的改善和踝关节尺寸的减小,以及实施例6中的防止34-1-2S诱导的体温过低,以及实施例5中在CAbIA小鼠中观察到的临床和组织学评分的改善。

[0086] 改善可以表现为炎性病情的临床表现或严重程度的减少,或者炎性病情的临床表现的延迟,从而治疗影响病情进展的时间进程。

[0087] (iii) 延长患有炎性病情的受试者的存活

[0088] 可以将本发明的方法描述为延长患有炎性病情的受试者的存活的方法。许多炎性病情尤其是自身免疫病情无法治愈,并且导致受试者与没有这种病情的受试者相比具有减少的预期寿命。因此,该治疗可以延长患有炎性病情的受试者的存活,例如延长至少1、2、5、10个月或几年。

[0089] (iv) 增强用于治疗炎性病情的其他药物的功效。

[0090] 可以将本发明的方法描述为增强用于治疗炎性病情的一种或多种其他药物的功效的方法。治疗炎性病情的已知方法包括三种一般方法,免疫抑制、抗炎或姑息治疗。抗炎药的实例包括抗炎镇痛剂 (NSAID, 例如阿司匹林、布洛芬)。还使用皮质类固醇 (如泼尼松和泼尼松龙)、氨基水杨酸酯、免疫抑制剂药物如硫唑嘌呤、巯基嘌呤和甲氨蝶呤。目前正在使用生物疗法,靶标包括细胞因子、B细胞和共刺激分子。细胞因子靶标包括肿瘤坏死因子 (TNF) - $\alpha$  (例如英夫利昔单抗、阿达木单抗和戈利木单抗)、白介素 (IL) -1、抗IL-6分子。B细胞耗竭包括使用抗CD20抗体 (例如利妥昔单抗) 和通过B淋巴细胞刺激物 (BLyS) (贝利单抗) 调节B细胞受体 (BCR)。

[0091] 因此,本发明的抗体可以与一种或多种其他抗炎药组合使用,以增强另一种抗炎药的功效。类似地,其他抗炎药可以增强本发明抗体的功效。

## [0092] 红细胞抗体

[0093] 红细胞(RBC)抗体与RBC结合。RBC抗体结合的分子在本文中称为RBC分子。因此,这是RBC表面分子,即在RBC的外表面上发现或与RBC的外表面缔合的分子,使得针对RBC的抗体结合完整的RBC。在红细胞膜级分中已鉴定出的蛋白质列表如下所示;可以从该列表中选择适合用于本发明的RBC分子(表2)。表2(来自Kakhniashvili, DG等人, Mol Cell Proteomics. 2004; 3(5): 501-509)RBC膜级分中鉴定的蛋白质

编号	蛋白描述	分子量 (Da)	Gi 编号	序列覆盖率 (%)	鉴定的肽的数量
1	血影蛋白 α 链, 红细胞	279,916.5	1174412	48.0	77*
2	血影蛋白 β 链, 红细胞	246,468.1	17476989	48.0	76*
3	锚蛋白 1, 剪接型 2	206,067.9	105337	45.0	55
4	锚蛋白 1, 同种型 4, 红细胞	203,416.6	10947036	45.0	50
5	锚蛋白 1, 同种型 2, 红细胞	189,011.2	10947042	46.0	48
6	类似于锚蛋白 1	206,264.8	13645508	51.0	46
7	蛋白 band 4.2, 红细胞	79,946.5	107446	33.0	21
8	蛋白 band 4.1 (椭圆形红细胞增多症 1, RH 相关)	66,398.5	4758274	45.0	17
9	蛋白 band 3, 红细胞	101,792.3	4507021	28.0	17
10	蛋白 band 4.1, 红细胞	97,016.9	14916944	32.0	16
11	肌动蛋白 β 链	41,812.8	481515	47.0	12*
12	网蛋白 1, 红细胞	47,355.3	5031699	47.0	12
13	膜蛋白 p55, 红细胞, (棕榈酰化)	52,296.5	4505237	35.0	11
14	网蛋白 2	47,142.3	18587629	29.0	11
15	蛋白 band 4.9 (成束蛋白), 红细胞	45,514.4	13623437	40.0	10
16	蛋白 band 7.2b, 红细胞膜整合蛋白	32,598.5	1103842	47.0	10
17	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	36,054.2	31645	51.0	10
18	原肌球蛋白 3, 细胞骨架	29,032.7	136096	55.0	10
19	溶质载体家族 2 (促进的葡萄糖转运蛋白), 成员 1	54,117.8	5730051	13.0	6
20	类似于网蛋白 2	42,565.9	13277550	15.0	6
21	原肌球蛋白同种型	28,420.1	1082876	36.0	6
22	葡萄糖转运糖蛋白	37,879.6	3387905	17.0	5
23	原肌球蛋白 α 链 (平滑肌)	26,576.7	136100	37.0	5
24	肌动蛋白 α2, 主动脉平滑肌	42,108.1	1070613	20.0	5
25	内收蛋白 α 亚基, 红细胞	80,955.1	12644231	10.0	5*
26	Rab 亲和蛋白-3 A-整合蛋白	80,858.2	1082757	8.0	5*
27	C-1-四氢叶酸合酶, 胞质	101,559.2	115206	6.0	4
28	翻译起始因子 2C, 2	66,252.2	18570004	10.0	4
29	醛缩酶 A	39,288.8	229674	17.0	4
30	原肌球蛋白调节蛋白	40,569.2	4507553	16.0	3*
31	RAP2B, RAS 癌基因家族成员	20,504.4	11433346	43.0	3
32	1 型精氨酸酶红细胞样变体	35,664.1	18535612	12.0	3
33	1 型精氨酸酶	34,734.9	10947139	12.0	3
34	肌酸激酶, 肌肉	43,101.1	14763181	21.0	3
35	B-CAM 蛋白	63,566.7	2134798	8.0	3
36	ATP 结合盒半转运蛋白	99,712.3	11245444	5.0	2
37	RAP1A, RAS 癌基因家族成员或 RAP1B	20,987.1 20,824.7	4506413 7661678	14.1 14.1	2 2
38	钙转运 ATP 酶 4	137,920.2	14286105	2.5	2
39	Rh 血液 D 型抗原多肽	45,136.5	10800054	4.0	2
40	通道样整合膜蛋白	16,239.5	1314306	15.0	2
41	血型糖蛋白 A 前体	16,429.6	1070639	21.0	2
42	溶质载体家族 29 (核苷转运蛋白), 成员 1	50,219.4	4826716	3.5	2
43	血型糖蛋白 A	14,784.8	106140	23.0	2
44	谷胱甘肽转移酶	27,053.4	809436	19.0	2
45	血型糖蛋白 C, 同种型 1	13,810.6	4504229	20.0	1
46	水通道蛋白 1	28,526.0	4502177	7.0	1
47	成红细胞膜相关蛋白	52,604.8	17489129	3.0	1
48	类似于血型糖蛋白 A	16,371.6	13529077	20.0	1
49	细胞表面糖蛋白 CD44	39,433.8	7512338	4.0	1
50	囊泡相关膜蛋白 2 (小突触泡蛋白 2)	12,648.7	7657675	15.0	1
51	类似于粘附斑块基质蛋白前体	106,879.1	17481669	1.9	1
52	聚(A)特异性核糖核酸酶	73,451.0	4505611	3.0	1
53	类似于 RAS 相关蛋白 RAL-A	23,566.8	14740792	7.0	1
54	早老素相关蛋白	39,862.4	6409316	6.0	1
55	十二指肠细胞色素 b	31,611.2	13376257	3.5	1
56	bA421H8.2 (新蛋白)	16,743.7	17402228	9.0	1
57	类似于 RAS 相关蛋白 RAB-15	23,517.9	18596861	5.0	1

[0094]



编号	蛋白描述	分子量 (Da)	Gi 编号	序列覆盖率 (%)	鉴定的肽的数量
58	CD59 抗原 p18-20	17,067.4	17473237	5.0	1
59	Rhesus D 类 VI 型 III 蛋白	45,247.7	2765839	1.9	1
60	RAB 35, RAS 癌基因家族	23,025.2	5803135	6.0	1
61	RalA 结合蛋白	76,063.4	5803145	2.1	1
62	假定的蛋白 XP 100510	8,049.3	18577723	16.0	1
63	ATP 结合盒, 亚家族 C, 成员 6	164,904.4	6715561	0.9	1
64	磷酸核糖焦磷酸合成酶	34,834.2	4506127	7.0	1
65	未知蛋白	46,884.2	18089137	3.6	1
66	类似于 Lutheran 血型	59,287.7	18589892	3.1	1
67	磷脂酰肌醇 4-磷酸 5 激酶, III 型	46,078.6	1730569	4.4	1
68	假定的蛋白 XP 100665	35,877.6	18604339	7.0	1
69	假定的蛋白 XP 100619	18,567.6	18604359	15.0	1
70	增殖阻断蛋白 1	83,629.5	23830903	1.5	1
71	类似于原肌球蛋白	10,804.3	18590249	13.0	1
72	假定的蛋白 XP 061743 或 XP 089854	48,719.0	17472555	2.5	1
[0095]	73 假定的蛋白 XP 106269	31,487.9	18577194	4.0	1
	74 假定的蛋白 XP 100925	12,703.8	18558481	22.0	1
	75 透明带结合蛋白	22,863.4	18601384	8.0	1
	76 2',3'-环核苷酸 3'-磷酸二酯酶	40,169.8	5902116	3.4	1
	77 Lyn B 蛋白	4,242.9	7435185	60.0	1
	78 KIAA0340	56,033.3	2117805	4.3	1
	79 假定的蛋白 XP 091724	117,819.0	2224621	2.1	1
	80 假定的蛋白 XP 091430	144,900.8	18588504	1.1	1
	81 类似于原肌球蛋白 4	27,641.2	18586430	6.0	1*
	82 HGTDP	18,426.8	14729747	6.0	1*
	83 假定的蛋白 XP 095819	17,342.4	9295192	10.0	1*
	84 远上游元件结合蛋白	291,206.1	18572484	0.6	1*
	85 假定的蛋白 XP 103707	67,534.4	1082624	2.5	1*
	86 假定的蛋白 XP 092517	13,374.6	18551195	12.0	1*
	87 增强子蛋白	41,409.4	18552304	2.6	1*
	88 假定的蛋白	41,289.8	1345400	4.6	1*
	89 KIAA1741 蛋白	15,770.3	18551736	12.0	1*
	90 Ig 重链 V-V 区	123,305.7	12698027	1.7	1*
	91 DC38	10,995.4	87863	16.0	1*
		31,691.4	12005984	4.7	1*

[0096] \*, 这些蛋白质主要存在于来自RBC膜的低离子强度血影蛋白提取物中

[0097] RBC分子可以直接或间接附接至RBC膜。该分子与RBC膜的直接附接可能由于该分子是跨膜蛋白或跨膜糖蛋白或直接附接在膜中的脂质而发生。该分子与RBC的间接附接可能由于该分子与本身直接附接至膜的分子(例如,膜蛋白或糖蛋白或与膜中的一种或多种脂质附接的蛋白或碳水化合物)结合或缔合而发生。

[0098] 因此,RBC抗体结合RBC分子,即RBC表面分子,其可以是蛋白质(例如糖蛋白)或碳水化合物,但是通常是蛋白质(例如糖蛋白)。在一些情况下,RBC分子未被糖基化。

[0099] RBC表面分子也可被描述为RBC抗原,但是RBC抗体不需要区分RBC分子的不同同种型,例如引起不同血型的RBC分子的不同同种型。换言之,在一些实施方案中,RBC抗体可以结合RBC分子的多于一种同种型(例如2种或更多种、3种或更多种、4种或更多种同种型),例如其中RBC分子具有与不同血型相关的多种同种型。在这种情况下,抗体无法区分由于RBC分子中的多态性而产生的不同血型。可选择地,RBC抗体可以仅结合RBC分子的一种同种型,使得其可以区分由于RBC分子中的多态性而产生的不同血型。

[0100] 某些RBC分子在不同的个体中可能采取不同的形式,并且这些差异可能与不同的血型有关。例如,蛋白质或糖蛋白分子可以具有多种可能的同种型,其中不同的同种型与不同的血型相关。基于不同蛋白质抗原的血型的一个实例是Rhesus系统。Rhesus D蛋白存在或不存在,使得给定的个体是RhD阳性或阴性,但相关的Rhesus CE蛋白可以以几种形式存在,这是由于在仅五个氨基酸位置上的氨基酸多态性引起的。Rhesus CE蛋白的不同形式与不同的Rhesus血型相关,并可以被称为不同的抗原。因此,在RBC分子例如Rhesus CE蛋白的

情况下,在存在该蛋白的不同同种型时,RBC抗体可以与该蛋白的所有同种型结合或可以仅与某些同种型结合。

[0101] 同样地,存在不同的基于碳水化合物的血型抗原。“ABO”抗原是附接至在RBC膜上的众多不同蛋白质和脂质的碳水化合物链。ABO基因座具有三种主要的等位基因形式:A、B和O。A和B等位基因各自编码分别催化A和B抗原的合成的最后一步的糖基转移酶。A/B多态性源于ABO基因中的几个SNP,其导致在四个氨基酸上不同的A和B转移酶。O等位基因编码失活的糖基转移酶,其使ABO抗原前体(H抗原)未经修饰,而A和B抗原在碳水化合物结构上不同。ABO抗原可存在于多个RBC分子上。碳水化合物的不同形式与不同的血液类型相关,并且可以被称为不同的抗原。因此,在含有ABO抗原的RBC分子的情况下,在不同的碳水化合物结构与不同的血液类型相关时,RBC抗体可仅结合某些碳水化合物结构或可结合所有形式的RBC分子(例如通过结合RBC分子的蛋白质部分)。

[0102] 在一些实施方案中,RBC分子不是其存在或不存在或其不同同种型的存在引起血型的分子(例如,RBC抗体不结合A或B抗原)。在其他实施方案中,RBC分子是其存在或不存在或其不同同种型的存在引起血型的分子。在这种情况下,RBC抗体结合的表位通常不受引起血型的同种型的影响,即不管血型如何,抗体均结合。

[0103] 抗体结合的分子的部分是表位。当分子是糖蛋白时,表位可以在糖蛋白的碳水化合物部分或蛋白质部分上,但是优选在蛋白质部分上,即是肽表位。抗体结合的表位可以是碳水化合物或肽表位,但是优选地是肽表位,并且优选地不是碳水化合物表位。肽表位可以是线性或构象表位。

[0104] RBC分子可以是参与运输的蛋白质或糖蛋白。参与运输的RBC分子可以例如为是Band 3阴离子转运蛋白(其具有定义Diego血型的不同亚型)、水通道蛋白1水分转运蛋白(其定义Colton血型)、水通道蛋白3、Glut1、Kidd抗原蛋白、Rhesus相关糖蛋白(RhAG、CD241)、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶、 $\text{Na}^+\text{K}^+2\text{Cl}^-$ 协同转运蛋白、 $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$ 协同转运蛋白、Na-H交换剂、K-Cl协同转运蛋白、Gardos通道。作为糖蛋白的RBC转运蛋白包括但不限于:Band 3阴离子转运蛋白、水通道蛋白1、水通道蛋白3、Glut1、Kidd抗原蛋白、RhAG (CD241)、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶、Na-H交换剂。

[0105] RBC分子可以是参与细胞粘附的分子,例如ICAM-4或BCAM (CD239)。ICAM-4和BCAM都是糖蛋白。

[0106] RBC分子可以是被认为在RBC中具有结构作用的分子。具有结构作用的RBC分子可能与骨架蛋白建立联系,并可能在调节脂质双层和膜骨架之间的凝聚中发挥重要作用,这可能使红细胞能够通过防止膜塌陷(起泡)来维持其有利的膜表面积。如果这样的分子在红细胞的表面上,则其根据本发明可能是有用的。具有结构作用的细胞表面分子包括Band 3(这将各种糖酵解酶、推定的 $\text{CO}_2$ 转运蛋白和碳酸酐酶组装成被称为“代谢区室”的大分子复合物,其可能在调节红细胞代谢和离子以及气体转运功能中起着关键作用)、RhAG (CD241)、其是基于rht蛋白4.11R的大分子复合物成员的蛋白(例如,血型糖蛋白C (CD236)和D(其定义Gerbich血型)、XK、RhD (CD240D)/RhCE (CD240E)、Duffy蛋白 (CD234)和其他血型糖蛋白,例如血型糖蛋白A (CD235a)和B (CD235b)。

[0107] 作为糖蛋白的RBC结构蛋白包括但不限于:Band 3、RhAG、血型糖蛋白A至D、XK、RhD/RhCE、Duffy蛋白。

[0108] 其他RBC分子包括CR1、CD99、CD147、ERMAP、CD238、CD20、CD151、DAF (CD55)、AChE、Dombrock (CD297、ART4)、CD108 (JMH)、Emm和小鼠TER-119抗原的人直向同源物 (Ly76, 血型糖蛋白A相关蛋白)。

[0109] RBC分子可以是蛋白质,其可以是糖蛋白,或者其可以是碳水化合物,但是优选地是蛋白质 (例如糖蛋白)。抗体结合的表位可以是碳水化合物或肽表位,但是优选地是肽表位,并且优选地不是碳水化合物表位。

[0110] 可以基于其结构定义RBC分子,即其为I型单通道蛋白、II型单通道蛋白、III型单通道蛋白、多通道蛋白、GPI连接的蛋白或其组合。

[0111] I型单通道RBC分子的实例包括血型糖蛋白A (CD235a)、血型糖蛋白B (CD235b)、血型糖蛋白C (CD236)、血型糖蛋白D、CR1、BCAM (CD239)、ICAM-4 (CD242)、CD99、CD147和ERMAP。

[0112] II型单通道蛋白的实例包括CD238、XK、Band3、水通道蛋白1、Kidd、水通道蛋白3、CD151。

[0113] RBC GPI连接的蛋白的实例是DAF (CD55)、AChE、Dombrock (CD297、ART4)、CD108 (JMH)、Emm。

[0114] 可以附接至RBC蛋白和/或脂质的碳水化合物抗原的实例包括P1、Pk、P、ABO、Hh、Lewis或I抗原。

[0115] RhD抗原

[0116] 优选的RBC分子是RhD分子 (例如人RhD分子)。这是一种在欧洲约85%的高加索人中被发现并且参与“Rhesus血型系统”的蛋白质。在其他人群中,Rhesus因子的频率可能更高。

[0117] Rhesus D分子是高度免疫原性的,从而在Rhesus不相容的怀孕期间和在Rhesus不相容的血液的输血后引发抗Rhesus D抗体。建模研究表明,Rhesus D分子具有12个跨膜结构域,其中只有非常短的连接区域延伸到细胞膜外或突出到细胞质中。那些表达Rhesus D分子的个体被称为Rhesus阳性。缺乏D分子的个体被称为Rhesus阴性。Rhesus系统中涉及的另一基因是RHCE基因,该基因编码含有C、E、c和e抗原和变体的RhCE蛋白。

[0118] 已知D分子上有多个表位,这解释了“部分D表型”,即在其红细胞上携带D抗原但在其血清中具有同种抗D的人。在至少9个不同的表位 (epD1至epD9) 的情况下,一些D变异人群可能缺少某些表位,使得产生针对缺失的D表位的抗体。产生针对部分D抗原的抗体的Rhesus阳性个体被分为6个主要的不同类别 (D<sup>+</sup>至DVI<sup>-</sup> I),每个类别均在D抗原中具有不同的异常。已经证明,这些D类别在针对人单克隆抗D抗体的实验组进行测试时产生不同的反应模式 (Tippett,P等人,Vox Sanguinis.70 (3):123;1996)。不同的反应模式鉴定了9个表位,因此定义了不同的部分D类别。D抗原上存在的表位的数量从一个部分D类别到另一个部分D类别是不同的,其中DVI类别表达最少的epD3、4和9。

[0119] 在一个实施方案中,RBC分子是Rhesus D分子。在另一个实施方案中,RBC分子是具有9个表位epD1至epD9中的至少3个的Rhesus D分子,例如epD1至epD9表位中的至少4、5、6、7、8或全部9个。在一个实施方案中,RBC分子是具有UniProt条目Q02161的序列的Rhesus D分子。

[0120] 另一种Rh抗原是具有C、E、c和e抗原 (和变体)的RhCE (UniProt条目P18577)。

[0121] 小鼠TER-119抗原 (Ly-76) 的人直向同源物



[0122] 在一个优选的实施方案中,RBC分子是TER-119抗原(Ly76)的人直系同源物。已经使用了针对TER-119抗原的抗体,并且发现其在如下所述的实施例中在三种炎症病情的治疗中有效。针对TER-119的大鼠单克隆抗体已用于ITP的小鼠模型中(Song S.等人, Blood.2003;101(9):3708-3713),并已显示可缓解ITP。TER-119抗原是52kD的血型糖蛋白A相关蛋白,也称为Ly76。它是与细胞表面血型糖蛋白A相关的分子。

[0123] 血型糖蛋白A(GPA,CD135a)和B(GPB,CD235b)以及血型糖蛋白C和D

[0124] 在一个实施方案中,RBC分子是血型糖蛋白A(GPA)。血型糖蛋白A和B是人红细胞膜的主要唾液糖蛋白,它们携带MN和Ss血型的抗原决定簇。已鉴定出约40种变异表型,UniProt条目为P02730(GPA)和P06028(GPB)。

[0125] Band 3(CD233)

[0126] 在一个实施方案中,RBC分子是Band 3阴离子转运蛋白。Band3阴离子转运蛋白,也称为阴离子交换剂1(AE1)或Band 3或溶质载体家族4成员1(SLC4A1),是由人中的SLC4A1基因编码的蛋白质;UniProt条目为P02730。它是一种多通道膜蛋白。CD233是一种系统发育保守的转运蛋白,其负责介导跨质膜的氯化物与碳酸氢根的电中性阴离子交换。它是红细胞膜的主要整体膜糖蛋白,并且通过其胞质结构域与细胞骨架蛋白、糖酵解酶和血红蛋白的相互作用而对于红细胞膜的正常柔韧性和稳定性以及正常红细胞形状是必需的。

[0127] 群体中RBC分子的频率

[0128] 并非所有RBC分子均发现于所有个体中。事实上,众所周知,在不同个体的RBC上发现的分子之间的差异负责个体的血型。举例来说,在ABO血型系统中,A型中的个体在其RBC上具有A抗原,并且在其血液中具有针对B抗原的抗体。B型中的个体在其RBC上具有B抗原,并且在其血液中具有针对A抗原的抗体。AB型中的个体在其RBC上具有A和B抗原,并且在其血液中没有针对A或B抗原的抗体。O型中的个体具有O抗原(H抗原),因此在其RBC上不存在A或B抗原,但是在其血液中具有针对A和B抗原两者的抗体。由此可见,在本发明的方法中使用抗A抗体(即与A碳水化合物抗原结合的抗体)将仅对A型或AB型的患者有效,并且在本发明的方法中使用抗B抗体(即与B碳水化合物抗原结合的抗体)将仅对B型或AB型患者有效。因此,存在与使用在所有受试者或给定受试者群体例如给定人群中以高水平发现的针对RBC分子的抗体相关的优点。

[0129] 因此,可以在至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%的人上或在至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%或99.5%的感兴趣的人群上发现该分子或表位。

[0130] 举例来说,在大约80%的人中发现了RhD分子,但是其可以根据人群而变化。

[0131] 分子密度

[0132] 优选以每细胞 $10^2$ - $10^6$ 个拷贝,例如每细胞 $10^2$ - $10^5$ 、 $10^2$ - $10^4$ 、 $10^2$ - $10^3$ 、 $10^3$ - $10^4$ 、 $10^3$ - $10^5$ 、 $10^4$ - $10^5$ 个拷贝的密度发现RBC分子或表位。可以是有利的是选择在RBC上具有合适密度的分子,以使得可以避免过度的溶血作用以及其对受试者的不利作用(例如,引起贫血)。例如,A和B血型抗原在RBC上具有非常高的密度(每个细胞 $10^6$ 个拷贝左右),而RhD分子为约 $10^3$ - $10^4$ 个拷贝,和TER-119抗原为约 $10^5$ 个拷贝,因此,分子或表位的密度因此优选为每RBC  $10^2$ - $10^5$ 、 $10^2$ - $10^4$ 、 $10^2$ - $10^3$ 、 $10^3$ - $10^4$ 、 $10^3$ - $10^5$ 、 $10^4$ - $10^5$ 个拷贝。

[0133] 在某些情况下,分子优选是RhD分子或GPA或TER-119抗原(GPA相关蛋白,Ly-76)的

人直系同源物或Band 3。

[0134] 在某些其他情况下,抗原优选不是RhD分子、TER-119抗原的人直系同源物或TER-119抗原(Ly-76)或CD24,或者优选不是RhD分子或TER-119抗原(Ly-76)或TER-119抗原的人同源物。或者,抗原优选不是RhD分子、TER-119抗原(Ly-76)、TER-119抗原的人同源物、CD24或RhCE分子,或者优选不是RhD分子或TER-119抗原(Ly-76)或TER-119抗原的人同源物或RhCE分子。

[0135] 在一些实施方案中,表位还不是碳水化合物表位。在一些实施方案中,其不是ABO表位,也不是P1、Pk、P、ABO、Hh、Lewis或I表位。

[0136] 体内RBC分子的分布

[0137] RBC分子优选在RBC上选择性表达,这可能是有利的,因为这意味着抗体将优选与RBC结合,从而可以避免脱靶效应。例如,分子在RBC上被发现的密度(表示为每个细胞的分子拷贝)比在一种或多种其他细胞上更高,例如密度是一种或多种其他细胞上的至少2、3、4、5、10、20或50倍。这些其他细胞可以是血细胞(例如白细胞(淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)或血小板)。这些其他细胞也可以是与血管系统相关的细胞(例如内皮细胞或成纤维细胞)。优选的是,该分子不在白细胞、血小板和/或与血管系统相关的细胞上表达,例如不在白细胞、血小板和与血管系统相关的细胞中的一种或多种上表达。在某些实施方案中,该分子以在任何其他细胞类型上的至少2、3、4、5、10、20或50倍的密度,例如在上述细胞类型中的一种或多种上的至少2、3、4、5、10、20或50倍的密度表达。

[0138] 结果,抗体优选结合RBC。因此,与一种或多种其他细胞(例如血细胞(例如白细胞(淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)或血小板))和/或与血管系统相关的细胞(例如内皮细胞或成纤维细胞)相比,抗体优选结合RBC。优选的是,抗体不结合白细胞、血小板和/或与血管系统相关的细胞。在某些实施方案中,该抗体不结合任何其他细胞类型,例如不结合白细胞、血小板和与血管系统相关的细胞中的一种或多种。抗体结合的检测可以使用本领域已知的标准方法进行(例如,检测与细胞结合的抗体的免疫测定,例如通过将抗体与细胞一起孵育并使用适当标记的二抗(例如使用流式细胞术)检测结合的抗体)。

[0139] 替代地或另外地,该分子可以在RBC和其他细胞类型上表达,但是在此类情况下,这些其他细胞类型在抗体无法进入的身体或身体区域中以较低的频率被发现。这可能是有利的,因为这意味着抗体将优选地与RBC结合,因为在统计学上它更可能遇到此类细胞,从而可以避免脱靶效应。例如,该分子可以发现在以比RBC更低的频率存在于体内或血管系统中的细胞上(例如,RBC中这些细胞的数量是在体内或血管系统中这些细胞的数量至少2、3、4、5、10、20或50倍)。另外地或替代地,这些其他细胞类型发现在例如脑中。

[0140] 可以通过本领域已知的标准体外方法(例如基于蛋白质或编码核酸水平,例如免疫测定和基于PCR的方法)分子在不同细胞类型上的表达,并且抗体结合不同细胞类型的能力可以类似地使用免疫测定体外测定。还可通过本领域已知标准方法测定不同细胞类型的计数。

[0141] 抗体

[0142] 所使用的抗体是针对RBC分子的抗体。在一些实施方案中,它对RBC分子是特异性的。这意味着抗体和RBC分子之间的结合是特异性结合。如本文所用,术语“特异性结合”是指本发明的抗体与RBC分子之间的结合反应,其中解离常数(KD)为 $10^{-7}$ M或更小,特别是 $10^{-$

$10^{-8}$ M或更小、 $10^{-9}$ M或更小或 $10^{-10}$ M或更小。如本文所用,术语“KD”是指离解常数,其由解离速率(Kd)与缔合速率(Ka)的比率获得并表示为摩尔浓度(M)。可使用本领域充分建立的方法确定KD值。确定抗体的缔合和解离动力学的一种方法是通过使用表面等离子体共振,例如通过使用生物传感器系统(例如Biacore™系统)。

[0143] 通常,较小的KD值是优选的。这对应于对分子更高的亲和力。

[0144] 本发明的抗体通常以高亲和力结合RBC分子。如本文所用,术语“高亲和力”是指以 $10^{-7}$ M或更小、 $10^{-8}$ M或更小、 $10^{-9}$ M或更小或 $10^{-10}$ M或更小的KD结合RBC分子的抗体。但是,“高亲和力”结合对于不同抗体可有所不同。例如,对于IgG抗体的“高亲和力”结合是指 $10^{-8}$ M或更小、 $10^{-9}$ M或更小或 $10^{-10}$ M或更小的KD,而与对于IgM抗体的高亲和力结合是指抗体具有 $10^{-7}$ M或更小或 $10^{-8}$ M或更小的KD。在一些实施方案中,抗体是高亲和力IgG抗体。

[0145] 在一些实施方案中,用于本发明方法中的抗体将以 $10^{-7}$ M至 $10^{-11}$ M的范围内的KD值结合其RBC分子,例如,如通过表面等离子体共振(SPR)技术(例如Biacore)确定的。

[0146] 亲和力也可以使用其他技术(例如平衡结合测定)来计算。抗RBC抗体的亲和力和浓度定义了实现的与RBC的结合的程度。结合也可以由抗体的亲合力来驱动,特别是当使用多价IgM抗体时。“亲合力”是指非共价结合相互作用的多个亲和力的累积强度。

[0147] IgG1形式(MDJ8s)的抗RhD抗体的LD1/2-6-3克隆显示纳摩尔范围内的针对RBC的亲和力(KD = 3nM;经计算的每个细胞14,069个结合位点)(Miescher S等人,Br. J Haematol. 2000;111(1):157-166)。TER-119(大鼠IgG2b)显示出约30nM的亲和力(根据FACS饱和和实验计算)。

[0148] 抗体的功能定义

[0149] 在一些实施方案中,本发明的抗体在体外和体内与RBC结合(例如与人RBC结合)。这可以在体外评估,例如通过使用基于免疫的技术检测抗体与RBC的结合。这可以使用本领域已知的标准程序来进行(例如,通过与RBC一起孵育抗体并使用经过适当标记的二抗检测结合的抗体(例如使用流式细胞术)来检测与RBC结合的抗体,例如,如实施例7中所示出的)。也可以检测体内抗体结合,例如通过向受试者施用抗体,并使用适当标记的二抗检测(例如,使用流式细胞术)受试者样品中与RBC结合的抗体。

[0150] 本发明的抗体可以另外或替代地在人或合适的动物(例如小鼠)模型中体内引起MPS(也称为RES)阻断。可以使用本领域已知的测定(例如,如Song S.等人,Blood. 2003;101(9):3708-3713中所述)评估小鼠模型中的MPS阻断。简而言之,将取自合适的小鼠模型(例如SCID)的RBC与本发明的抗体在体外孵育以引起调理作用,并将经调理的RBC用合适的标志物标记并注射到合适的小鼠中。在注射后以一定时间间隔采集的样品针对RBC和标记的RBC数量进行评估。在引入后循环中标记的RBC的数量随时间的减少表明MPS阻断。减少可以是例如与评估的第一个时间点的数量相比,减少到循环中标记RBC的30-80%、40-75%或50-65%。可以通过基于吞噬作用测定的替代测定法测量MPS功能来评估人中的MPS阻断。临床上接受的测定法在本领域中称为单核细胞单层测定法(MMA)(Tong TN&Branch DR J Vis Exp. 2017;119:55039, Tong TN等人,Transfusion. 2016;56(11):2680-2690)。

[0151] 抗体可以另外或替代地在体内例如在动物模型或人受试者中引起溶血。这是例如通过在施用抗体后RBC数量的减少来测量的。这可以通过标准技术来确定,例如在施用抗体后获得血液样品中的RBC计数,或者通过测量血液样品中的一种或多种溶血标志物(例如

游离的血红蛋白)。引入抗体后RBC数量随时间的减少表明体内溶血。

[0152] 当在这种方法中评估RBC数量的减少时,RBC数量可能减少到小于施用抗体前所见的RBC数量的99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、80%、70%、60%、50%。

[0153] 抗体可另外引起体内(例如在动物模型或人受试者中)血小板计数或血小板浓度的减少。这是例如通过确定在施用抗体后从受试者获取的样品中的血小板数量或浓度测量的。这可以通过标准技术来确定。

[0154] 抗体可以另外或替代地改善小鼠ITP模型中的鼠ITP,例如如实施例2中所述。通过例如比较经治疗的小鼠的血小板数量与治疗前的水平确定在这种小鼠模型中由施用抗体引起的鼠ITP的改善。与治疗前的水平相比,在经治疗的小鼠中在1.5小时后血小板计数增加至少1.25、1.5、1.75、2、2.5、3可指示这种小鼠模型中鼠ITP的改善。

[0155] 抗体可以另外地或替代性地改善类风湿性关节炎的小鼠模型中的炎性关节炎,例如,如实施例3中所述。在一些实施方案中,与未预处理的注射K/BxN血清的小鼠相比,在注射K/BxN血清之前2小时用本发明的抗体预处理可以减少注射K/BxN血清的小鼠中的关节炎评分和/或减少踝关节宽度,如根据Mott等人(Mott PJ等人,PLoS One.2013;8(6):e65805)中描述的标准程序评估的。可以例如在治疗后7天观察到效果。在一些实施方案中,与在未治疗的情况下的踝关节宽度和/或临床评分相比,踝关节宽度和/或临床评分减少至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%。在某些情况下,临床评分可减少至0。

[0156] 类似地,抗体可以另外地或替代地逆转类风湿性关节炎的小鼠模型中已建立的炎性关节炎,例如,如实施例4中所述。在注射K/BxN血清后5天施用抗体可在治疗后例如在治疗后3天减少临床评分和/或踝关节宽度。在一些实施方案中,与治疗前的踝关节宽度和/或临床评分相比,踝关节宽度和/或临床评分减少至少5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%。在某些情况下,临床评分可减少至0。

[0157] 抗体可以另外地或替代地改善CAbIA模型中的炎性关节炎,例如如实施例5中所述。在一些实施方案中,在施用抗胶原蛋白mAb混合物(第0天)和LPS(第3天)后的第5天,用本发明的抗体进行治疗可以预防关节炎,例如通过与注射胶原蛋白mAb混合物(第0天)和LPS(第3天)但未用本发明的抗体治疗的小鼠相比减少的临床和组织学关节炎评分测量,如根据实施例5中所述的方法所评估的。在例如治疗后1天观察到效果。在一些实施方案中,与在未治疗的情况下的组织学和/或临床评分相比,组织学和/或临床评分减少至0,或减少至少50%、60%、70%、80%。

[0158] 抗体可以另外地或替代地预防或减少TRALI的小鼠模型中34-1-2S诱导的体温过低。用本发明的抗体注射SCID小鼠可减少在1小时后注射抗MHC I抗体34-1-2s诱导的体温过低(Fung YL等人,Blood.2010;116(16):3073-3079),如通过直肠温度测量所评估的(例如在实施例6中)。在处理2小时后,用本发明的抗体和抗MHC I抗体34-1-2s处理的小鼠中的直肠温度测量值可以比单独用抗MHC I抗体34-1-2s处理的小鼠中的直肠温度测量值高至少2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C或10°C。

[0159] 抗体可以另外地或替代地减少或预防TRALI的小鼠模型中34-1-2S诱导的肺水肿。用本发明的抗体注射SCID小鼠可以减少在1小时后注射抗MHC I抗体34-1-2S诱导的肺水肿,如通过在处理2小时后处死小鼠后进行湿/干(W/D)肺重量比的尸体解剖测定评估的。在

用抗体预处理后接受34-1-2S的小鼠可显示比注射34-1-2S的小鼠明显更低的肺W/D比率。

[0160] 抗体可以另外或替代地在体外测定中抑制经调理的血小板的吞噬作用。可以例如通过比较在RBC存在下的血小板吞噬作用的量与在已用本发明的抗体调理的RBC存在下的血小板吞噬作用的量(例如使用实施例7的方法)来评估抗体在体外测定中抑制经调理的血小板的吞噬作用的能力。与在没有用本发明的抗体调理的RBC存在下的血小板吞噬作用的量相比,在已用本发明的抗体调理的RBC存在下的血小板吞噬作用的量的减少可以表示为血小板吞噬指数的减少,例如减少至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%。

[0161] 考虑到人和小鼠RBC分子在其一级序列上可能不同并因此可能与被测试的抗体具有不同的结合特性的事实,在可能的情况下,上述测定使用人RBC进行(对于体外测定)。在使用任何小鼠模型的情况下,可以对小鼠模型进行修饰(例如遗传操作),以便表达合适的人RBC分子。

[0162] 在一些实施方案中,抗体的施用不导致抗原(例如参与或引起自身免疫病情的抗原)的耐受性 or 对该抗原的耐受性(例如免疫耐受),例如抗原(其可以是与抗体一起施用的蛋白质或肽)的耐受性 or 对该抗原的耐受性。在一些实施方案中,抗体不与另一种蛋白质(例如蛋白质或肽抗原)一起施用。

[0163] 结构抗体定义

[0164] 如本文所用,术语“抗体”通常是指抗体及其抗原结合片段。天然存在的“抗体”是糖蛋白,其包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链包含重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(在本文中缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域CL。VH和VL区可以进一步细分为高变区,称为互补决定区(CDR),其间散布着更为保守的区域,称为框架区(FR)。每个VH和VL包含三个CDR和四个FR。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0165] 优选地,抗体是由以上指定的区域/结构域组成的分子。抗体可仅包含通过二硫键相互连接的两条抗体重链和两条抗体轻链,例如其中每条抗体重链由抗体重链可变区和三个恒定区结构域(CH1、CH2、CH3)组成,并且每条抗体轻链由抗体轻链可变区和轻链恒定区组成。

[0166] 优选地,抗体不包含任何非免疫球蛋白序列,例如,其由免疫球蛋白序列组成,并不存在其他序列(例如与N或C末端融合)。该免疫球蛋白序列可以是抗体或免疫球蛋白特别是IgG中存在的序列与其相对应的序列。本领域技术人员能够容易地基于例如免疫球蛋白折叠的保守性质鉴定这样的序列。

[0167] 优选地,抗体不是与任何其他蛋白质或肽的融合蛋白,例如抗体不与任何非抗体蛋白质或肽(例如抗原)连接或融合。“连接或融合”包括直接或间接的联接,但可以是作为化学键的键,例如抗体与另外的蛋白质或肽之间的肽键,例如可以是分子融合。间接联接可以例如是通过附接至抗体的颗粒(例如,微粒、纳米颗粒、脂质体、聚合物囊泡或胶束)。其他的蛋白质或肽可以例如是致耐受性抗原(例如为了产生对抗原的耐受性而施用的抗原)。

[0168] 抗体包括但不限于分离的、多克隆、单克隆、多特异性、单特异性、小鼠、人、完全人、人源化、灵长类化或嵌合抗体。在一个实施方案中,抗体是分离的。通常,本发明的抗体是嵌合的、完全人的、人的或人源化的抗体。在另一个实施方案中,抗体是人或人源化单克隆抗体。术语抗体包括抗原结合片段,如下文更详细地阐述。可选地,RBC抗体可以是多克隆制剂,例如多克隆抗RhD制剂。

[0169] 如本文所用,“分离的抗体”是指基本上不含其他细胞材料和/或化学物质的抗体和/或基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体(例如与其他抗原结合的抗体)的抗体。如本文其他地方所讨论的组合物可以具体地包含分离的抗体和如下文更详细地定义的药学上可接受的载体或稀释剂,例如可以由分离的抗体(例如分离的抗体制剂)和如下文更详细地定义的药学上可接受的载体或稀释剂组成。术语“分离的”可另外适用于多克隆制剂,例如其中多克隆抗体制剂基本上不含其他细胞材料和/或化学物质和/或基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体(例如与其他抗原结合的抗体)的抗体。

[0170] 如本文所用,“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是单分子组成的抗体分子的制剂。单克隆抗体组合物显示出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0171] “人抗体”旨在包括具有可变区的抗体,其中框架、CDR区和恒定区(如果存在的话)源自人源序列,例如人种系序列或人种系序列的突变形式。因此,人抗体可包含不由人序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0172] 术语“人单克隆抗体”是指表现出单一结合特异性的抗体,其具有可变区,其中框架区和CDR区均来自人序列。这样的人单克隆抗体可以由杂交瘤产生,所述杂交瘤包含与永生化细胞融合的B细胞,所述B细胞从具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物例如转基因小鼠中获得。完全人序列衍生的抗体不具有鼠或其他非人序列,并且主要通过两种来源产生:噬菌体展示技术和转基因小鼠。

[0173] “人源化抗体”含有鼠或其他非人序列衍生的CDR区,其已与任何必要的框架反向突变一起植入到人序列衍生的可变区中。

[0174] 也可以使用抗原结合片段、变体和衍生物,包括但不限于Fab、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(sdFv)或微型抗体(缺少Fab部分中的恒定区的抗体片段)。ScFv分子是本领域已知的,并且在例如美国专利号5,892,019中描述。在一些实施方案中,抗体选自IgG、IgM。在其他实施方案中,可以使用片段例如F(ab')<sub>2</sub>、F(ab)<sub>2</sub>、Fab'、Fab、ScFv、双抗体、三抗体、四抗体和微型抗体。如果使用片段,则优选将其融合或连接至合适的包含Fc的部分。抗体优选不是scFv,或者优选不包含scFv。

[0175] 在一些实施方案中,抗体是IgG或IgM类型。特别地,抗体可以是任何类型的IgG。特别地,它可以是任何类型的大鼠、小鼠、人或人源化的IgG或IgM,优选人或人源化的IgG或IgM。人或人源化IgG可以是例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4类型。也可以使用大鼠或小鼠IgG(例如大鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG2c,或小鼠IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3或IgG4)。

[0176] 抗体优选包含Fc结构域或其部分。作为非限制性实例,合适的Fc结构域可衍生自免疫球蛋白亚类,例如IgG。在一些实施方案中,合适的Fc结构域或其部分衍生自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4(例如人),或衍生自大鼠或小鼠IgG(例如大鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG2c,或小鼠IgG2a、IgG2b、IgG2c、IgG3或IgG4)。特别合适的Fc结构域包括衍生自人或人

源化抗体的那些。

[0177] 抗体优选结合Fc受体。这可以是Fc $\gamma$ 受体(例如Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RIIA(CD32)、Fc $\gamma$ RIIB(CD32)、Fc $\gamma$ RIIIA(CD16a)、Fc $\gamma$ RIIIB(CD16b))。在某些情况下,与Fc受体结合的能力可能取决于Fc结构域的糖基化,因此Fc结构域或其部分优选被糖基化(或优选未被去糖基化)。

[0178] 抗体优选具有低的补体激活活性。“低补体激活活性”是指当表面结合或免疫复合时,与表面结合或免疫复合的人IgG3相比抗体激活较少的补体。抗体优选比人IgG3激活少于90%的补体,优选比人IgG3激活少于80%、75%、70%、60%、50%、40%的补体,更优选比人IgG3激活少于30%、25%或20%的补体,甚至更优选比人IgG3激活少于15%或甚至少于10%的补体。

[0179] 可以在Fc区中修饰抗体以减少补体激活活性。与未修饰的抗体相比,优选补体激活活性减少至少10%、20%、30%或40%。与未修饰的抗体相比,更优选补体激活活性减少至少50%、60%或70%,甚至更优选补体激活活性减少至少80或甚至90%。

[0180] 补体激活是通过监测表面结合或免疫复合的抗体与补体来源孵育过程中可溶性末端复合物(sC5b-C9)的产生来确定的;末端复合物可以通过标准ELISA测量。

[0181] 产生和表征针对某些RBC分子的抗体的方法在本领域中是已知的,并且先前已经进行了描述。例如,W09749809描述了抗Rhesus D抗体,TER-119抗体(Kina T等人,Br J Haematol.2000;109:280-287)已被广泛用于小鼠模型并且抗CD24(其为小鼠RBC分子)也已在小鼠模型中进行了测试(Song S.等人,Blood.2003;101(9):3708-3713)。

[0182] 在一些实施方案中,RBC抗体是抗D的多克隆制剂。此类抗D多克隆制剂可商购获得(例如**Rhophylac®**);或者,可以使用几种单克隆抗D抗体的混合物。

[0183] 在一些实施方案中,用于本发明方法的抗体是重组产生的。

[0184] 在一些实施方案中,RBC抗体包含如在实施例提及的在TER-119抗体中发现的一个或多个互补决定区(CDR)(例如这些CDR中的一个、两个、三个、四个、五个或六个或至少一个、两个、三个、四个、五个或六个)。RBC抗体可以具有如在实施例提及的在TER-119抗体中发现的轻链和/或重链的序列。

[0185] 在一些实施方案中,RBC抗体包含如在实施例提及的在抗人RhD抗体中发现的一个或多个互补决定区(CDR)(例如,例如这些CDR中的一个、两个、三个、四个、五个或六个或至少一个、两个、三个、四个、五个或六个)。RBC抗体可以具有如在实施例提及的在抗人RhD抗体中发现的轻链和/或重链的序列。

[0186] 在一些实施方案中,RBC抗体包含如在实施例提及的在抗人GPA抗体中发现的一个或多个互补决定区(CDR)(例如这些CDR中的一个、两个、三个、四个、五个或六个或至少一个、两个、三个、四个、五个或六个)。RBC抗体可以具有如在实施例提及的在抗人GPA抗体中发现的轻链和/或重链的序列。

[0187] 治疗方法

[0188] 本发明提供了在治疗或预防炎性病情的方法中使用的针对RBC的抗体以及在受试者中治疗或预防炎性病情的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的针对RBC的抗体。

[0189] 本发明还提供了在受试者中治疗或预防炎性病情的方法,该方法包括向有需要的

受试者施用治疗有效量的用针对RBC的抗体致敏的受试者自身或(替代地或另外地)捐赠的人红细胞。

[0190] 如本文所用,术语“受试者”或“个体”或“患者”是指需要治疗的对象。如本文所用,术语“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,例如小鼠、大鼠、非人灵长类、羊、狗、猫、马和牛。然而,通常,术语“受试者”是指人。

[0191] 术语“有效量”或“有效用于…的量”或“治疗有效量”包括指足以产生所需结果(特别是预防疾病进展和/或改善与受试者所治疗的疾病相关的症状)的治疗剂的剂量。

[0192] 如本文所用,术语“治疗”(“treat”、“treating”或“treatment”)是指治疗性措施,其中目的是减少或减缓(减轻)现有的不期望的生理变化或病症,例如炎症。有益或期望的临床结果包括但不限于症状的缓和、疾病程度(包括炎症程度)的减轻、稳定(即不恶化)的疾病状态、疾病进展的延缓或减缓、疾病状态的改善或缓和以及缓解(无论是部分还是全部)。“治疗”还可意味着与未接受治疗所预期的存活相比存活的延长。需要治疗的受试者通常是指已经患有向其提供治疗的疾病、病情或病症的受试者,但是可以包括处于患有向其提供治疗的疾病、病情或病症的风险中的受试者。在一些实施方案中,被治疗的受试者具有自身免疫疾病的一种或多种症状。

[0193] 在与慢性炎症相关的疾病状态的上下文中,术语“治疗”包括以下中的任何或全部:抑制促炎性免疫细胞的复制或刺激、抑制或减少失调的免疫系统的慢性炎症状态或减少患有自身免疫性病情或疾病的受试者经历的发烧(flare)的频率和/或强度。

[0194] 如本文所用,“预防”用于意指尚未建立疾病状态,因此本发明的方法可以防止疾病状态的建立,或者可以减少或减缓(缓和)不希望的生理变化或病症,如炎症。在预防的背景下,治疗可以在疾病状态已建立之前开始。

[0195] 抗体优选以本文其他地方定义的组合物的形式施用至受试者。在某些优选的实施方案中,组合物不包含任何细胞和/或没有细胞与该组合物共同施用。在其他优选的实施方案中,抗体是组合物中唯一的蛋白质活性成分,和/或没有蛋白质活性成分与组合物共同施用。活性成分可以例如是组合物中旨在对受试者产生作用和/或对受试者产生作用的成分。因此,“活性成分”可以排除例如载体和/或赋形剂。

[0196] 在某些优选的实施方案中,抗体存在于组合物中,并且待施用的所述组合物中的抗体不与任何抗原结合(例如,不通过抗体CDR与任何抗原结合)。换言之,在施用抗体至受试者后,例如仅在施用抗体之后抗体在受试者中与抗原结合,例如其中在施用抗体后例如在受试者的血液中形成抗体-RBC复合物,和/或其中受试者中存在的任何抗体/RBC复合物在向受试者施用抗体后形成。

[0197] 在某些优选的实施方案中,抗体存在于组合物中,并且待施用的所述组合物中的所述抗体的CDR可用于结合抗原。

[0198] 组合

[0199] 在一些实施方案中,本发明的抗体与一种或多种其他治疗剂组合施用。例如,组合法可以包括与至少一种其他抗炎剂或用于治疗炎性病情或减轻其症状的药剂组合的本发明的抗体。例如,在一个具体的实施方案中,治疗或预防炎性病情的方法包括向有需要的受试者施用有效量的与一种或多种选自抗炎剂、免疫抑制剂和/或镇痛剂的治疗剂组合的



针对RBC的抗体。实例包括NSAID(例如阿司匹林、布洛芬)、皮质类固醇(例如泼尼松和泼尼松龙)、氨基水杨酸酯、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、甲氨蝶呤和生物疗法(例如其他抗体)。

[0200] 可以将多种药剂配制用于同时或顺序使用。

[0201] 给药方案

[0202] 通常调节给药方案以提供最佳的期望反应(例如治疗反应)。例如,可以施用抗体的单次推注。在其他实施方案中,可以随时间施用数个分开的剂量,或者可以根据治疗情况的需要按比例减少或增加剂量。抗体可以通过任何途径施用,例如肠胃外或肠内,或使用DNA疫苗技术在体内产生。优选的肠胃外途径包括静脉内、肌内、腹膜内、脑脊髓内、脑内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、肺内(例如雾化)、鼻内、皮内局部施用或通过吸入。可以使用两个或更多个所述途径的组合。在一个具体的实施方案中,通过静脉内或皮下施用来施用针对RBC的抗体。

[0203] 在一些实施方案中,抗体可以静脉内(IV)施用,例如作为静脉输注或静脉推注。术语“静脉内输注”是指在大于约5分钟的时间段内,例如在约30至90分钟之间的时间段内,将药物例如抗体引入动物或人患者的静脉中,尽管根据本发明,静脉内输注可选择地施用10小时或更短的时间,例如5小时或更短或2小时或更短的时间。在一个特定实施方案中,输注的持续时间为至少60分钟。术语“静脉推注”或“静脉内推送”是指将药物例如抗体施用到动物或人的静脉中使得身体在大约15分钟或更短的时间段内,例如在5分钟或更短的时间段内接受药物。举例来说,本发明的抗体以1mg/kg至100mg/kg的剂量在1周至4周的间隔内静脉内施用。

[0204] 在其他实施方案中,本发明的抗体可以皮下施用。术语“皮下施用”是指通过从药物容器中相对缓慢、持续性递送而将抗体引入至受试者的皮肤下,例如,在皮肤与下面的组织之间的口袋内。可以通过向上和远离下面的组织捏或拖拽皮肤来产生所述口袋。在一些实施方案中,使用皮下注射针将包含抗体的组合物引入至患者的皮肤表面下。

[0205] 在一些实施方案中,以取决于受试者体重的剂量施用抗体,例如施用抗体以使得在给定的时间范围,例如在一天或一周、两周或一个月内施用受试者体重的约0.001mg/kg至约100mg/kg的抗体的量。在某些实施方案中,这样的基于体重的剂量选自每天或每周、每两周或每一个月约0.01mg/kg体重,每天或每周、每两周或每一个月约0.3mg/kg体重、约1mg/kg体重,每天或每周、每两周或每一个月约3mg/kg体重,和每天或每周、每两周或每一个月约10mg/kg体重。

[0206] 在一些实施方案中,以固定剂量施用抗体。在一个具体的实施方案中,施用抗体以使得在给定的时间范围,例如在一天或一周、两周或一个月内施用约50 $\mu$ g至约2000mg的固定剂量的抗体的量。

[0207] 因此,根据在给定的时间范围内施用至受试者的抗体量来定义剂量方案。在该时间范围内的施用频率将决定每次施用的抗体量。例如,如果剂量是10mg/kg/周,则可以以单次10mg/kg剂量或以适当减少量的抗体(例如一周内2个5mg/kg剂量)的多剂量进行施用。在一些实施方案中,抗体以单剂量(例如每天、每周、每两周一次或每月一次)施用,或者如果每次施用的抗体量较低,则更频繁地以多剂量施用。一般而言,通过皮下途径的施用可以比静脉内施用(例如,每两周一次或每月一次)更频繁地(例如,每天一次)进行。在一些实施方案中,针对RBC的抗体以单剂量;每周的一次或多次剂量,每周一次的两次或更多次剂量;每

两周一次;每三周一次;每四周一次;每月一次;每三个月一次;或每六个月一次施用。

[0208] 在一些实施方案中,以一天至六个月的间隔施用针对RBC的抗体。在一个具体的实施方案中,以1周;2周;3周;4周;1个月;2个月;3个月;4个月;5个月;或6个月的间隔施用针对RBC的抗体。

[0209] 在一些实施方案中,抗体以单剂量施用或以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每月一次、每三个月一次、每六个月一次或以不同的间隔的两次或更多次的剂量施用。

[0210] 在一些实施方案中,将红细胞(患者自身的红细胞或捐赠的人红细胞)与抗体体外组合,然后将这些“致敏”的红细胞(即被抗体包被的红细胞)施用至患者。

[0211] 药物组合物

[0212] 本发明还提供了组合物,例如药物组合物,其包含本发明的抗体,例如分离的抗体。这样的组合物可以包含本发明的一种或一种(例如两种或更多种不同的)抗体的组合。例如,本发明的药物组合物可以包含两种抗体,其结合不同的RBC分子、抗原或不同的抗原或不同的表位或具有在其他方面互补的活性。本文讨论的组合物可用于本发明的方法。本文所提及的抗体优选以本文所提及的组合物进行施用。

[0213] 在一些实施方案中,本公开提供了包含一种或多种本发明的抗体和药学上可接受的载体的药物组合物。术语“药学上可接受的载体”包括生理相容的任何和所有溶剂、缓冲剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注)。例如,在一些实施方案中,用于静脉内施用的组合物通常是在无菌等渗水性缓冲液中的溶液。

[0214] 在某些优选的实施方案中,组合物(例如用于本发明的方法)包含分离的抗体。组合物可用于本发明的方法中,其中活性成分是分离的抗体(例如,其中唯一的蛋白质活性成分(例如,蛋白质或肽)是分离的抗体,或其中唯一的活性成分是分离的抗体)。在某些实施方案中,组合物可以由分离的抗体和药学上可接受的载体组成。

[0215] 在某些实施方案中,抗体存在于不包含任何细胞(例如任何血细胞例如红细胞)并且特别是不包含与抗体结合的任何红细胞的组合物中。因此,抗体可以存在于基本上不含细胞(例如任何血细胞例如红细胞)特别是不包含与抗体结合的红细胞的组合物中。

[0216] 在某些优选的实施方案中,抗体没有被包封,例如没有被包封在细胞中,例如没有被包封在血细胞诸如RBC中。

[0217] 这样的药物载体和赋形剂以及合适的药物制剂的制备是本领域众所周知的(参见例如,Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins,Frokjaer等人,Taylor&Francis;Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,Kibbe等人,Pharmaceutical Press,2000)。在某些实施方案中,药物组合物可包含至少一种添加剂,例如填充剂、缓冲剂或稳定剂。标准药物配制技术是本领域技术人员众所周知的(参见,例如2005Physicians' Desk **Reference**<sup>®</sup>,Thomson Healthcare:Monvale,NJ,2004;Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,Gennaro等人编辑,Lippincott Williams&Wilkins:Philadelphia,PA,2000)。合适的药物添加剂包括例如糖,例如甘露醇、山梨糖醇、乳糖、蔗糖、海藻糖或其他;氨基酸、例如组氨酸、精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸、

脯氨酸或其他,用于达到等渗条件的添加剂,例如氯化钠或其他盐,稳定剂,例如聚山梨酸酯80、聚山梨酸酯20、聚乙二醇、丙二醇、氯化钙或其他,生理pH缓冲剂,例如Tris(羟甲基氨基甲烷)等。在某些实施方案中,药物组合物可以包含pH缓冲剂和湿润剂或乳化剂。在其他实施方案中,组合物可包含防腐剂或稳定剂。

[0218] 取决于施用途,可以将本发明的抗体包被在一种材料中,以保护化合物免受酸和可能使化合物失活的其他自然条件的作用。

[0219] 在一些实施方案中,本发明的药物组合物包含可注射制剂形式的抗体。在其他实施方案中,本发明的药物组合物包含抗体或其抗原结合片段,其可以配制用于肠胃外施用,例如配制用于静脉内、皮下或肌肉内施用。

[0220] 在一些实施方案中,药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂。在某些实施方案中,本公开内容提供了例如在容器诸如小瓶中的本发明的抗体的无菌粉末,其用于制备无菌可注射溶液。

[0221] 一般描述

[0222] 术语“包含”涵盖例如“包括”以及“由...组成”,例如组合物“包含”X可仅由X组成,或可包含其他物质,例如X+Y。

[0223] 关于数值x的术语“约”是指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0224] 将理解的是,仅通过示例的方式描述了本发明,并且可以在不脱离本发明的范围和精神的情况下进行修改。

[0225] 发明声明

[0226] 1. 在用于治疗或预防炎性病情的方法中使用的针对红细胞(RBC)的抗体。

[0227] 2. 一种治疗或预防受试者的炎性病情的方法,包括向有需要的受试者施用治疗有效量的针对红细胞(RBC)的抗体。

[0228] 3. 针对红细胞(RBC)的抗体在制备用于治疗或预防炎性病情的药物中的用途。

[0229] 4. 用于条款1的抗体或条款2的方法或条款3的用途,其中所述抗体与RBC分子特异性结合。

[0230] 5. 用于条款1或4的抗体,或条款2或4的方法,或条款4的用途,其中所述抗体是分离的、多克隆的、单克隆的、多特异性的、单特异性的、小鼠的、人的、完全人的、人源化的、灵长类化的或嵌合的。

[0231] 6. 用于条款1或4或5中任一项的抗体,或条款2或4或5中任一项的方法,或条款3-5中任一项的用途,其中所述抗体是单克隆的并且是人的或人源化,并且任选是分离的。

[0232] 7. 用于条款6的抗体,或条款6的方法,或条款6的用途,其中所述抗体是IgG类型。

[0233] 8. 用于条款6或7的抗体,或条款6或7的方法,或条款6或7的用途,其中所述抗体是IgG1类型。

[0234] 9. 用于条款6或7的抗体,或条款6或7的方法,或条款6或7的用途,其中该抗体为IgG2类型。

[0235] 10. 用于条款6或7的抗体,或条款6或7的方法,或条款6或7的用途,其中所述抗体是IgG3类型。

[0236] 11. 用于条款6或7的抗体,或条款6或7的方法,或条款6或7的用途,其中所述抗体是IgG4类型。

[0237] 12. 用于条款1或4至11中任一项的抗体,或条款2或4至11中任一项的方法,或条款3至11中任一项的用途,其中所述抗体包含Fc区和优选结合Fc受体,例如Fc  $\gamma$  受体 (Fc  $\gamma$  R), 例如Fc  $\gamma$  RI (CD64)、Fc  $\gamma$  RIIA (CD32)、Fc  $\gamma$  RIIB (CD32)、Fc  $\gamma$  RIIIA (CD16a)、Fc  $\gamma$  RIIIB (CD16b)。

[0238] 13. 用于条款1或4至11中任一项的抗体,或条款2或4至11中任一项的方法,或条款3至11中任一项的用途,其中所述抗体具有低的补体激活活性。

[0239] 14. 条款13的抗体、方法或用途,其中已对Fc区进行修饰以减少补体激活。

[0240] 15. 用于条款1或4至14中任一项的抗体,或条款2或4至14中任一项的方法,或条款4至14中任一项的用途,其中所述炎性病情是自身免疫病情。

[0241] 16. 用于条款1或4至15中任一项的抗体,或条款2或4至15中任一项的方法,或条款3至15中任一项的用途,其中所述自身免疫病情是自身抗体介导的自身免疫病情。

[0242] 17. 用于条款1或4至16中任一项的抗体,或条款2或4至16中任一项的方法,或条款4至16中任一项的用途,其中所述自身免疫病情是其中存在升高的IL-10的病情。

[0243] 18. 用于条款1或4至17中任一项的抗体,或条款2或4至17中任一项的方法,或条款4至17中任一项的用途,其中所述自身免疫病情是神经病情。

[0244] 19. 用于条款1或4至18中任一项的抗体,或条款2或4至18中任一项的方法,或条款4至18中任一项的用途,其中所述自身免疫病情不是ITP。

[0245] 20. 用于条款1或4至19中任一项的抗体或条款2或4至19中任一项的方法或条款3至19中任一项的用途,其中所述病情:

[0246] (i) 选自慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 (CIDP)、重症肌无力 (MG)、多发性硬化症 (MS) 和视神经脊髓炎 (NMO), 或

[0247] (ii) 选自类风湿性关节炎和TRALI。

[0248] 21. 用于条款1或4至20中任一项的抗体,或条款2或4至20中任一项的方法,或条款3至20中任一项的用途,其中所述病情是慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病 (CIDP)。

[0249] 22. 用于条款1或4至20中任一项的抗体,或条款2或4至20中任一项的方法,或条款3至20中任一项的用途,其中所述病情是重症肌无力 (MG)。

[0250] 23. 用于条款1或4至20中任一项的抗体,或条款2或4至20中任一项的方法,或条款3至20中任一项的用途,其中所述病情是多发性硬化 (MS)。

[0251] 24. 用于条款1或4至20中任一项的抗体,或条款2或4至20中任一项的方法,或条款3至20中任一项的用途,其中所述病情是视神经脊髓炎 (NMO)。

[0252] 25. 用于条款1或4至20中任一项的抗体,或条款2或4至20中任一项的方法,或条款3至20中任一项的用途,其中所述病情是类风湿性关节炎。

[0253] 26. 用于条款1或4至20中任一项的抗体,或条款2或4至20中任一项的方法,或条款3至20中任一项的用途,其中所述病情是TRALI。

[0254] 27. 用于条款1或4至26中任一项的抗体,或条款2或4至26中任一项的方法,或条款3至26中任一项的用途,其中RBC抗体与肽结合表位。

[0255] 28. 用于条款1或4至27中任一项的抗体,或条款2或4至27中任一项的方法,或条款3至27中任一项的用途,其中RBC抗体与选自RhD蛋白、GPA、TER-119抗原 (Ly76) 的人直向同源物和Band 3的RBC分子结合。

[0256] 29. 用于条款1或4至28中任一项的抗体,或条款2或4至28中任一项的方法,或条款3至28中任一项的用途,其中RBC抗体结合以每细胞 $10^2$ - $10^5$ 个拷贝的密度存在的RBC分子。

[0257] 30. 用于条款1或4至29中任一项的抗体,或条款2或4至29中任一项的方法,或条款3至29中任一项的用途,其中通过静脉内、肌内、腹膜内、脑脊髓内、脑内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、肺内、鼻内、皮内局部施用或通过吸入,优选通过静脉内或皮下施用来施用所述抗体。

[0258] 31. 用于条款1或4至29中任一项的抗体或条款2或4至29中任一项的方法的抗体,或条款3至29中任一项的用途,其中施用所述抗体以使得每周施用受试者体重的约0.001mg/kg至约100mg/kg的量的抗体。

[0259] 32. 用于条款1或4至29中任一项的抗体,或条款2或4至29中任一项的方法的抗体,或条款3至29中任一项的用途,其中施用所述抗体以使得每两周施用受试者体重的约0.001mg/kg至约100mg/kg的量的抗体。

[0260] 33. 用于条款1或4至29中任一项的抗体,或条款2或4至29中任一项的方法的抗体,或条款3至29中任一项的用途,其中施用所述抗体以使得每月施用受试者体重的约0.001mg/kg至约100mg/kg的量的抗体。

[0261] 34. 用于条款1或4至29中任一项的抗体,或条款2或4至29中任一项的方法的抗体,或条款3至29中任一项的用途,其中施用所述抗体以使得每周施用药约50 $\mu$ g至约2000mg的固定剂量。

[0262] 35. 用于条款1或4至29中任一项的抗体,或条款2或4至29中任一项的方法的抗体,或条款3至29中任一项的用途,其中施用所述抗体以使得每两周施用药约50 $\mu$ g至约2000mg的固定剂量。

[0263] 36. 用于条款1或4至29中任一项的抗体,或条款2或4至29中任一项的方法的抗体,或条款3至29中任一项的用途,其中施用所述抗体以使得每月施用药约50 $\mu$ g至约2000mg的固定剂量。

[0264] 37. 用于条款1或4至36中任一项的抗体,或条款2或4至36中任一项的方法,或条款3至36中任一项的用途,其中与一种或多种其他治疗剂,优选至少一种其他抗炎剂,或用于治疗炎性病情或减轻其症状的药剂组合施用所述抗体。

[0265] 38. 用于条款37的抗体,或条款37的方法,或条款37的用途,其中所述一种或多种其他治疗剂包括抗炎剂。

[0266] 39. 条款37或38的抗体、方法或用途,其中所述一种或多种其他治疗剂包括免疫抑制剂。

[0267] 40. 条款35至39中任一项的抗体、方法或用途,其中所述一种或多种其他治疗剂包括镇痛剂。

[0268] 41. 用于条款1或4至40中任一项的抗体,或条款2或4至40中任一项的方法,或条款3至40中任一项的用途,其中所述抗体优选与RBC结合。

[0269] 42. 用于条款1或4至41中任一项的抗体,或条款2或4至41中任一项的方法,或条款3至41中任一项的用途,其中所述RBC抗体结合的RBC分子在RBC上的密度高于在一种或多种其他血细胞和/或与血管系统相关的细胞上的密度。

[0270] 43. 用于条款1或4至42中任一项的抗体,或条款2或4至42中任一项的方法,或条款

3至42中任一项的用途,其中所述RBC抗体结合的RBC分子在RBC上的密度高于在血小板、白细胞和/或与血管系统相关的细胞上的密度。

[0271] 44.用于条款1或4至43中任一项的抗体,或条款2或4至43中任一项的方法,或条款3至43中任一项的用途,其中所述RBC抗体结合的RBC分子未发现在血小板上。

[0272] 45.用于条款1或4至44中任一项的抗体,或条款2或4至44中任一项的方法,或条款3至44中任一项的用途,其中所述抗体在人或合适的动物模型中体内引起MPS阻断。

[0273] 46.用于条款1或4至45中任一项的抗体,或条款2或4至45中任一项的方法,或条款3至45中任一项的用途,其中所述抗体在体内例如在动物模型或人中引起溶血。

[0274] 47.用于条款1或4至46中任一项的抗体,或条款2或4至46中任一项的方法,或条款3至46中任一项的用途,其中所述抗体在体外测定中抑制经调理的血小板的吞噬作用。

[0275] 48.用于条款1或4至47中任一项的抗体,或条款2或4至47中任一项的方法,或条款3至47中任一项的用途,其中所述抗体的施用不导致抗原的耐受或对抗原的耐受。

[0276] 49.条款48的抗体、方法或用途,其中所述抗原是与参与或引起自身免疫病情的抗体一起施用的蛋白质或肽。

[0277] 50.用于条款1或4至49中任一项的抗体,或条款2或4至49中任一项的方法,或条款3至49中任一项的用途,其中所述抗体不包含任何非免疫球蛋白序列,优选地,其中所述抗体由免疫球蛋白序列组成,并且不存在其他序列(例如与N或C末端融合)。

[0278] 51.用于条款1或4至50中任一项的抗体,或条款2或4至50中任一项的方法,或条款3至50中任一项的用途,其中所述抗体不是与任何其他蛋白质或肽的融合蛋白。

[0279] 52.用于条款1或4至51中任一项的抗体,或条款2或4至51中任一项的方法,或条款3至51中任一项的用途,其中将抗体以组合物的形式施用至受试者,任选地,其中所述组合物不包含任何细胞和/或没有细胞与所述组合物共同施用。

[0280] 53.一种治疗或预防受试者的炎性病情的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的用针对红细胞(RBC)的抗体致敏的人红细胞。

## 实施例

[0281] 方法

[0282] 试剂

[0283] C57BL/6小鼠和SCID小鼠来自Charles River Laboratories (Kingston, NY, USA)。MWRReg30来自BD Biosciences (Mississauga, Ont., Canada)。30-F1来自Biolegend (San Diego, CA, USA)。30-1-2S和TER-119来自Bio X Cell (West Lebanon, NH, USA)。

[0284] ITP/贫血

[0285] 如所述的诱导ITP并计数血小板(Crow AR等人, Blood. 2011; 117(3): 971-974)。如所述的诱导贫血并计数RBC(Chen X等人, Transfusion. 2014; 54(3): 655-664)。在特定时间点向小鼠注射45ug对照大鼠IgG或45ug TER-119, 计数其RBC, 然后每组接受2ug MWRReg30。注射MWRReg30后1小时, 将小鼠放血以进行血小板计数。

[0286] K/BxN关节炎模型

[0287] 如所述的诱导和评分K/BxN关节炎(Mott PJ等人, PLoS One. 2013; 8(6): e65805)。对小鼠不进行任何预处理或在注射K/BxN血清之前用45ug TER-119进行预处理。每天监测

小鼠的关节炎进展。在独立实验中,使小鼠患有关节炎,并在第5天用45ug TER-119或50ug 30-F1进行处理。

[0288] TRALI

[0289] 如所述的诱导TRALI (Kapur R等人,Blood.2015;126(25):2747-2751)。简而言之,在注射50ug 34-1-2S之前24小时向SCID小鼠注射40ug TER-119。每30分钟记录直肠温度,持续2小时,然后处死小鼠以测定肺的湿/干重比。

[0290] 实施例1.靶向红细胞的抗体的产生(TER-119、IC3、LD1/2-6-3)

[0291] 通过将各种抗体同种型的重链恒定区(CH)引入pCMV/myc/ER载体(Invitrogen, ThermoFisher Scientific MA,USA),生成了一系列称为pCGC载体的表达载体。针对CHO表达密码子优化了编码抗TER-119(W02013121296A1)、抗血型糖蛋白A抗体IC3(W09324630A1)和抗D抗体LD1/2-6-3(W09749809A1)的可变区(VL和VH)的DNA片段并由ThermoFisher Scientific(MA,USA)合成。然后使用InTag阳性选择方法(Chen等人,2014Nucleic Acids Res 42(4):e26)用合适的InTag衔接子将VL和VH片段共克隆到相关的pCGC载体中,如图1所示。最终的表达载体是双重表达载体,其中轻链的表达由第一个CMV启动子驱动,而重链的表达由第二个CMV启动子驱动。

[0292] 表3

[0293]

Ab3	LC	HC	载体	InTag衔接子
LD1263_hKG1	hCK	hIgG1	pCGC1_hG1	hCK_pGBHpA_CmR_pCMV_SP
LD1263_hKG2	hCK	hIgG2	pCGC2_hG2	hCK_pGBHpA_CmR_pCMV_SP
LD1263_hKG3	hCK	hIgG3	pCGC3_hG3	hCK_pGBHpA_CmR_pCMV_SP
LD1263_hKG4	hCK	hIgG4p	pCGC4_hG4	hCK_pGBHpA_CmR_pCMV_SP
LD1263_hKG1xv90*	hCK	hIgG1xv90	pCGC8_hG1xv90	hCK_pGBHpA_CmR_pCMV_SP
LD1263_mKG1	mCK	mIgG1	pCGC6_mG1	mCK_pGBHpA_CmR_pCMV_SP
LD1263_mKG2a	mCK	mIgG2a	pCGC7_mG2a	mCK_pGBHpA_CmR_pCMV_SP

[0294] \*人IgG1恒定区包含S239D/I332E突变(Lazar等人,Proc Natl Acad Sci U S A.2006;103(11):4005-4010)。

[0295] 氨基酸序列

[0296] LD1/2-6-3VL(抗人RhD)

[0297] VMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSIIRYLNWYQHKPGKAPKLLIHTASSLQSGVPSRFSVSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYTTPYTFGQGTKLQIKR(SEQ ID NO:1)

[0298] LD1/2-6-3VH(抗人RhD)

[0299] QVKLLESGGGVVQPGGSLRVACVASGFTFRNFGMHWVRQAPGKGLEWVAFIWFASNKGYGDSVKGRFTVSRDNSKNTLYLQMNLRAEDTAVYYCAREKAVRGISRYNYMDVWVGKTTVTVSS(SEQ ID NO:2)

[0300] IC3 VL(抗人GPA)

[0301] DIVMSQSPSSLAVSVGEKVSMSCKSSQLFNSRTRKNYLTWYQQKPGQSPKPLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYYCKQSYNLRFTFGGGTKLEIKR(SEQ ID NO:3)

[0302] IC3 VH(抗人GPA)

[0303] EVRLLESGGGPVQPGGSLKLSAASGFDFSRYSYWMNWRRAPGKGLEWIGEINQQSSTINYSPLKDKF

IIISRDNAKSTLYLQMNKVRSEDTALYYCARLSLTAAGFAYWGQGLTVTVSA (SEQ IDNO:4)

[0304] 抗-TER-119VL(抗小鼠GPA相关蛋白,抗Ly76)

[0305] DIQMTQSPSVLSASVGDRTLNCKASQNKYLNWYQQKLGAEAPKVLIIYNTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYFCFQHYTWPTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO:5)

[0306] 抗-TER-119VH(抗小鼠GPA相关蛋白,抗Ly76)

[0307] EVKLQESGGGLVQPGGSLKLSCVASGFTFRDHWMNWVRQAPGKTMEWIGDIRPDGSDTNYAPSVRNRFTIISRDNARSILYLQMSNMRSYDTATYYCVRDSPTRAGLMDAWGQGTSTVTVSS (SEQID NO:6)

[0308] ExpiCHO™细胞中的瞬时mAb表达

[0309] 根据制造商的说明,使用ExpiCHO™表达系统(Gibco,Life Technologies, Carlsbad CA,USA)的Max Titer方案进行瞬时转染。将质粒DNA(120μg)在8mL OptiPro™SFM中稀释并轻轻混合。将ExpiFectamine™CHO试剂(640μL)在7.4mL OptiPro™SFM中稀释,轻轻混合并立即与稀释的DNA混合,轻轻混合并在室温下孵育2分钟,以形成DNA-ExpiFectamine™CHO复合物。然后将DNA-ExpiFectamine™CHO复合物添加到1L锥形烧瓶中,该烧瓶中含有200mL在ExpiCHO Expression™培养基中的ExpiCHO-S™细胞( $1.2 \times 10^9$ 个细胞)。将细胞在37°C培养箱中以8%CO<sub>2</sub>以140rpm摇动培养约20小时。制备了由1200μL ExpiCHO™增强剂和32mL ExpiCHO™进料组成的预混液,并将其添加到每个烧瓶中。将细胞在32°C培养箱中以5%CO<sub>2</sub>以140rpm摇动培养另外4天。加入额外的32mL ExpiCHO™进料,并将细胞培养另外9天。从在4°C下以4000rpm离心20分钟的上清液收集蛋白质,并在进行HPLC定量和纯化之前,使用0.45μM过滤器将其过滤到干净的容器中。

[0310] Expi293F™细胞中的瞬时mAb表达

[0311] 根据制造商的说明,使用Expi293F™表达系统(Life Technologies,CA,USA)进行瞬时转染。将质粒DNA(1mg)在50mL Opti-MEM™I培养基中稀释并轻轻混合。将Expifectamine™293转染试剂(2.7mL)在50mL Opti-MEM™I培养基中稀释,轻轻混合并在室温下孵育5分钟。然后将稀释的Expifectamine™293转染试剂添加到稀释的DNA中,轻轻混合并在室温下孵育20-30分钟,以形成DNA-Expifectamine™293转染试剂复合物。然后将DNA-Expifectamine™293转染试剂复合物添加到含有817mL Expi293F™细胞( $2.5 \times 10^9$ 个细胞)的3L锥形烧瓶中。将细胞在37°C培养箱中以8%CO<sub>2</sub>以120rpm摇动培养约19小时。制备由5mL Expifectamine™293转染增强剂1(Life Technologies,CA,USA)、50mL Expifectamine™293转染增强剂2(Thermo Fisher Scientific,CA,USA)和25mL羽扇豆蛋白胨(Solabia S.A.S,France)组成的预混液并添加到每个锥形烧瓶中。将细胞在37°C培养箱中以8%CO<sub>2</sub>以120rpm摇动培养另外5天。从以4000rpm离心20分钟的上清液收集蛋白质,并在进行HPLC定量和纯化之前,使用0.45μM过滤器将其过滤到干净的试管中。

[0312] 实施例2.使用治疗性抗体TER-119的时程实验

[0313] 在ITP模型中使用TER-119进行了时程实验。用大鼠45ug IgG(图2B)或45ug TER-119(图2C、D)预处理C57BL/6小鼠,并在图2的x轴上描绘的持续时间内计数血小板和血红细胞。在x轴上的指定时间,通过2ug抗血小板抗体(MWReg30)诱导ITP。在注射MWReg30 1小时后计数血小板。

[0314] 短期或长期(图2B)暴露于大鼠IgG后,注射了对照大鼠IgG的小鼠没有显示贫血或抗血小板抗体诱导的ITP的改善。相反,用TER-119预处理的小鼠在施用后3小时开始表现出



可测量的贫血(图2C)。出人意料的是,在可测量的贫血发作之前,看到了ITP的改善(图2C, 0.5小时和1.5小时)。相反,当达到最大贫血时,未观察到ITP的明显改善(图2D,96小时)。这些数据表明贫血不是通过TER-119改善ITP的先决条件。这使我们推测TER-119在ITP中的治疗活性可能不完全是MPS功能的竞争性抑制所引起的。

[0315] 实施例3.TER-119可以改善K/BxN模型中的炎性关节炎。

[0316] 类风湿性关节炎是一种常见的自身免疫性疾病,其涉及滑膜关节的炎症(Colmegna I,Ohata BR,Menard HA.Clin Pharmacol Ther.2012;91(4):607-620)。K/BxN关节炎模型捕获了人类类风湿性关节炎的许多免疫机制(Kouskoff V等人,Cell.1996;87(5):811-822),并且不是已知称为需要脾隔离(splenic-sequestration)的炎症疾病,因为脾脏切除的小鼠与正常小鼠一样易患该疾病(Misharin AV等人,Cell Rep.2014;9(2):591-604)。因此,我们使用此模型来测试TER-119的潜在广泛抗炎活性。

[0317] 在第0天,评估C57BL/6小鼠的基础关节炎测量值(图3A和B)。一组小鼠接受45ug TER-119(空心圆圈),另一组小鼠(空心正方形)不接受任何试剂。2小时后,所有小鼠接受K/BxN血清的注射。根据Mott PJ等人,PLoS One.2013;8(6):e65805,每天进行踝关节测量(A)和临床评分(B),持续10天。

[0318] 注射K/BxN血清的小鼠基于其临床关节炎评分在注射后第2天(图2B,空心正方形)和基于其踝关节宽度在第3天(图3A,空心正方形)发展炎性关节炎。病情严重程度随时间增加,在第7天(临床评分)和第8天(踝关节宽度)达到最大值。相比之下,用TER-119预防性治疗的小鼠表现出明显减少的关节炎评分(图3A,空心圆圈)和(图3B,空心圆圈)。这些数据表明,针对RBC的单克隆抗体可以改善炎性关节炎,表明TER-119可能发挥除治疗ITP之外的广泛抗炎活性。

[0319] 实施例4.TER-119可逆转K/BxN模型中已建立的关节炎。

[0320] 我们还测试了TER-119改善已建立的关节炎疾病的能力。在独立的实验中,小鼠在未经预处理的情况下接受K/BxN血清的注射。在第5天,不用任何试剂处理(图3C,空心正方形)、用50 $\mu$ g 30F1(非治疗性抗CD24抗体,如例如在Song S.等人,Blood.2003;101(9):3708-3713中使用的,空心三角形)或45ug TER-119(空心圆圈)处理关节炎小鼠(图3C/D,箭头)。在第0、1、2和5-9天测量踝关节测量值(C)和临床评分(D)。

[0321] 在这组实验中,小鼠基于其踝关节宽度(图3C)和临床评分(图3D)在第5天发生最大的关节炎。在第5天用TER-119治疗的小鼠在治疗后1天表现出明显的关节炎炎症减少,其中踝关节宽度和临床评分在治疗后3天恢复正常。尽管在治疗后1天,踝关节宽度的减少并不明显(第6天, $P=0.06$ ),但肿胀有明显的减少。接受RBC抗体30-F1(不与Fc受体结合且不改善鼠ITP的大鼠IgG2c抗体(Song S等人,Blood.2003;101(9):3708-3713))的小鼠显示没有改善炎症,类似于未经治疗的小鼠。这些数据证明TER-119能够逆转已建立的关节炎,并且必须选择能够结合激活性Fc受体的IgG亚型。这也通过去糖基化TER-119(一种已知会大大减少Fc受体结合活性的过程)得到证实,并显示去糖基化的TER-119没有显著改善K/BxN关节炎或ITP(数据未显示)。

[0322] 实施例5.TER-119能够改善胶原蛋白抗体诱导的关节炎CAbIA模型中的炎性关节炎

[0323] 实验概述

[0324] 在小鼠的胶原蛋白Ab诱导的关节炎 (CAbIA) 模型 (Campbell IK等人, J Immunol. 2014, 192:5031-5038. Campbell IK等人, J Immunol. 2016, 197:4392-4402) 中检查了红细胞靶向抗体的治疗功效。

[0325] 试剂

[0326] • 抗II型胶原蛋白mAb混合物 (CAb), Chondrex Cat#53100, 10mg/ml (批号150211)。

[0327] • LPS (大肠杆菌0111:B4), Chondrex Cat#53100, 0.5mg/ml (批号140243)。

[0328] • 大鼠IgG2b (同种型对照), 2.75mg/ml, 4.5.17, WEHI Antibody Facility。

[0329] • TER-119, 2.00mg/ml, 4.5.17, WEHI Antibody Facility。

[0330] 小鼠

[0331] 从Bio21 Animal Facility, Melbourne, Australia获得了30只雄性C57BL/6小鼠 (7-8周龄)。在实验开始之前, 让小鼠在Bio21的CSL小鼠房间内适应一周。

[0332] 程序

[0333] 在第0天, 用0.2ml抗胶原蛋白mAb混合物 (10mg/ml) 腹膜内注射所有小鼠。在第3天, 用0.1ml LPS (0.5mg/ml) 腹膜内注射所有小鼠。在第5天, 将关节炎小鼠随机分配到治疗组中 (表4), 并用指定的试剂给予单次静脉内注射。实验在第12天终止。

[0334] 关节炎关节的组织学

[0335] 在第12天, 处死小鼠, 将后爪在10%中性缓冲的福尔马林中固定, 脱钙并包埋在石蜡中。矢状组织切片用H&E染色, 并对治疗组进行盲法评分。将踝关节在三个方面进行全局评分 (渗出液-关节腔内炎性细胞的存在; 滑膜炎-滑膜增厚和炎性细胞浸润的程度; 组织破坏-软骨和骨侵蚀和浸润), 每个方面从最高为5的数值进行评分 (0-正常, 1-最低, 2-轻度, 3-中度, 4-显著, 5-严重), 并将这些针对最高为15的总分进行计算。

[0336] 表4

组#	药物	剂量	途径	n=
[0337] 1	同种型对照	2 mg/kg	i.v.	9
2	TER-119	2 mg/kg	i.v.	9

[0338] 治疗组的概述

[0339] 结果

[0340] TER-119治疗的小鼠在注射后24小时内完全免受关节炎的侵害, 并且这种情况一直持续到第12天实验结束 (图4a)。

[0341] 在第12天 (同种型对照, n=9; TER-119, n=6), 小鼠右后踝关节的盲法组织学评分显示了两个治疗组之间的明显差异 (图4b)。TER-119治疗的关节外观正常, 没有炎症和关节组织破坏的体征, 而这在同种型对照mAb治疗的关节炎小鼠中可见。注意, 由于体重减轻过多, 在研究结束前对TER-119治疗组的3只小鼠实施了安乐死。

[0342] 不同剂量TER-119的作用

[0343] 评估了不同剂量的TER-119 (1, 1.5和2mg/kg) 对临床评分 (图4C和D) 和关节中细胞蓄积 (图4E) 的作用。为了评估关节中的浸润细胞的数量, 收集每只小鼠的膝盖骨, 进行消化并通过视觉计数来计数浸润的白细胞。

[0344] 1.5和2mg/kg Ter119可有效减少临床评分。所有剂量均显著减少关节浸润细胞数

量。相较于与临床评分相关的1.5和2mg/kg剂量,1mg/kg剂量的Ter119导致RBC表面上明显更低的结合抗体(图4F)。

[0345] CAblA导致关节中C3和C5a升高(Spirig R等人,J Immunol.2018,200:2542-2553),并且通过TER-119减少了关节中这些补体成分以及C1q(图4G),而在血浆中在这些补体成分中未观察到差异(未显示)。

[0346] 不同抗体的作用

[0347] 使注射胶原蛋白抗体混合物(第0天)和LPS(第3天)的C57BL/6小鼠发生关节炎,然后注射(第6天;治疗)2mg/kg的TER-119、去糖基化的TER-119(不含Fc聚糖的变体,因此其在Fc受体和补体结合上受到损害)、M1/69或IgG2b同种型对照抗体,并每天评估临床评分和爪宽度(图4H)。仅两只小鼠用M1/69测试。

[0348] TER-119对红细胞上的血型糖蛋白A复合物是特异的,而M1/69与小鼠CD24(也称为热稳定抗原(HSA))、Ly-52或Nectadrin反应,并且是通过磷脂酰肌醇键锚定在质膜中的约35-45kDa的糖蛋白膜,并且是在红细胞以及淋巴细胞、粒细胞、胸腺细胞、上皮细胞、神经元和树突状细胞上表达的抗原。

[0349] TER-119和M1/69均可在ITP的鼠模型中增加血小板计数(Song S.等人,Blood.2003;101(9):3708-3713)。为了验证这些抗体与鼠红细胞的结合,将抗体(0-512ng的一抗)与来自C57BL/6小鼠的红细胞反应,然后与抗大鼠Ig二抗-藻红蛋白缀合物反应,并通过流式细胞术进行评估(见图4I)。与同种型对照相比,在研究的所有剂量下,TER-119、去糖基化的TER-119和M1/69相当结合红细胞。

[0350] 所有关节炎模型的临床评分分配如下:0,正常;0.5,限于足趾的肿胀;1,爪轻度肿胀;2,爪明显肿胀;3,严重的爪肿胀和/或关节僵硬。

[0351] 结论

[0352] 在临床和组织学上评估时,静脉内TER-119对阻断已建立的CAblA具有治疗效果。

[0353] 实施例6.TER-119治疗能够显著预防34-1-2S诱导的体温过低。

[0354] 与输血相关的急性肺损伤(TRALI)是输血最严重的并发症之一(Chapman CE等人,Transfusion.2009;49(3):440-452)。将MHC I类抗体(34-1-2S)(Looney MR等人,J Clin Invest.2006;116(6):1615-1623)注入SCID小鼠会诱导类似于人TRALI(一种炎性疾病,其症状与在ITP和关节炎中观察到的那些不同(Fung YL等人,Blood.2010;116(16):3073-3079))的症状。如我们最近发现炎症是鼠TRALI的风险(Kapur R等人,Blood.2015;126(25):2747-2751),我们接下来探究了TER-119抑制该疾病的诱导的能力。

[0355] 给SCID小鼠注射40ug TER-119(图3E/F,空心圆圈,空心三角形)或未经治疗(空心正方形),持续24小时。然后给小鼠注射50ug 34-1-2S(空心三角形,空心正方形)或不注射试剂(空心圆圈)。每30分钟测量直肠温度持续2小时(图3E),随后在2小时处死小鼠以评估肺水肿(图3F)。监测小鼠直肠温度以评估由34-1-2S诱导的全身性休克(Fung YL等人,Blood.2010;116(16):3073-3079)。与仅注射TER-119的小鼠相比,接受34-1-2S的小鼠在注射后30分钟显示直肠温度的降低(图3E),该温度降低直到90分钟,保持稳定直到120分钟。相比之下,在注射34-1-2S之前接受TER-119预处理的小鼠在30分钟时显示体温的较不明显的下降,其在60、90和120分钟时变得显著(相对于单独的34-1-2S)。这些数据表明,TER-119治疗能够显著预防34-1-2S引起的体温过低。

[0356] 肺水肿的尸检测定是通过湿/干(W/D)肺的重量比测量的。在TER-119预处理后接受34-1-2S的小鼠显示出与仅用TER-119治疗的小鼠相似的肺W/D比,但明显低于仅注射34-1-2S的小鼠(基于其增加的W/D重量比经历TRALI)。因此,TER-119能够预防34-1-2S诱导的全身性休克并改善肺水肿。由于尚不知道致敏的RBC会转移到肺(或关节),因此这表明抗RBC抗体的抗炎作用不太可能是局部的。

[0357] 实施例7. TER-119能够在体外(小鼠系统)抑制吞噬作用

[0358] TER-119结合RBC,并且以浓度依赖性方式吞噬TER-119调理的RBC。

[0359] 材料和方法

[0360] RAW264.7细胞的制备

[0361] 通过刮入到补充有10%热灭活的FBS的新鲜RPMI-1640中来收获RAW细胞,并使用Beckman Coulter Vi-Cell XR细胞活力分析仪(系列号AT08066)对细胞进行计数,并调节至 $5 \times 10^5$ 个细胞/mL。将细胞在具有盖玻片的12孔板中培养,每孔使用1mL细胞制备物。将细胞在37°C下孵育过夜。

[0362] 血小板和红细胞计数

[0363] 使用心脏穿刺从每只小鼠中采集五到八百微升全血。立即将血液与200 $\mu$ L的1:1(抗凝缓冲液:BSGC缓冲液)混合,并使用BSGC缓冲液稀释至1.5mL的最终体积。每个稀释的血液样品在室温下以300g离心3分钟,并收集富含血小板的血浆(PRP)。剩余的样品再次在BSGC中重悬至1.5mL,并再次离心。再次收集PRP并将其添加到先前的PRP样品中,然后将该PRP混合物以1200g离心10分钟。将血小板沉淀重悬于1mL BSGC中,并将5 $\mu$ L PRP在BSGC缓冲液中以1:200稀释,然后在MACSQuant分析仪10(MACS Miltenyi Biotec)流式细胞仪上对血小板计数,以确定制剂中的血小板浓度。

[0364] 然后将RBC重悬于1mL PBS中,并将每个样品在PBS中以1:3000稀释,然后通过流式细胞仪(Guava EasyCyte流式细胞仪系统)进行分析,以确定血液中的红细胞浓度。

[0365] 用CMFDA Cell Tracker Green标记血小板

[0366] 使用MACSQuant分析仪10(MACS Miltenyi Biotec)流式细胞仪通过采取5 $\mu$ L PRP并在995 $\mu$ L BSGC缓冲液中稀释对血小板进行计数。将血小板调节至 $5 \times 10^8$ 个血小板/mL。以10 $\mu$ g/mL的浓度制备CMFDA。然后将等体积的血小板和CMFDA(例如1mL血小板和1mL CMFDA)混合在一起,以使CMFDA最终浓度为5 $\mu$ g/mL。将混合物在37°C下在黑暗中的温和混合下孵育30分钟。

[0367] 用抗CD41(Mwreg30)抗体调理血小板和用抗RBC抗体调理RBC

[0368] 与CMFDA孵育后,将血小板以1200g离心10分钟,然后将沉淀重悬于1mL HBSS中。将Mwreg30抗体以10 $\mu$ g/mL的浓度添加到血小板样品中。将混合物在室温下在温和混合下孵育30分钟。

[0369] 使用Guava Easy Cyte Mini(系列号2800060170)对RBC进行计数,并调节至 $5 \times 10^8$ 个RBC/mL。将选定浓度的抗RBC抗体添加到一毫升RBC中。将混合物在室温下在温和混合下孵育1小时。

[0370] 与RAW264.7细胞一起孵育

[0371] 与抗体孵育1小时后,将RBC用PBS洗涤并离心300g,持续8分钟。再次计数红细胞,并使用补充有10%热灭活的FBS的RPMI-1640调节至 $0.4 \times 10^8$ 个RBC/mL。用HBSS洗涤血小

板,并在1200g离心10分钟。再次计数血小板,并在补充有10%热灭活的FBS的RPMI-1640中调节至 $3-5 \times 10^8$ 个血小板/mL。为了添加RBC和血小板,从RAW 264.7细胞中除去上清液,并添加100uL的血小板制剂( $3-5 \times 10^7$ 个血小板;比率为1个巨噬细胞:100个血小板),并每孔添加250uL的RBC制剂( $10 \times 10^6$ 个RBC;比率为约1个巨噬细胞:20个血小板)。将细胞在37°C下孵育30分钟。

[0372] 吞噬后制备

[0373] 通过将细胞置于冰上来停止吞噬作用。每孔用500 $\mu$ L HBSS (1 $\mu$ g/mL卡巴环素)洗涤RAW 264.7细胞一次。通过每孔添加0.9mL dH<sub>2</sub>O持续1.5分钟来裂解剩余的RBC,然后添加0.1mL PBS 10X以停止裂解过程。细胞用500 $\mu$ L HBSS再洗涤2次。最后,将500 $\mu$ L PBS/0.5mM EDTA/0.05%胰蛋白酶的溶液在37°C下加入孔中持续5分钟,以除去任何剩余的结合的血小板。除去胰蛋白酶/EDTA溶液,并将细胞置于含有HEPES缓冲液的500 $\mu$ L RPMI 1640中。

[0374] 共聚焦成像和吞噬指数的计算

[0375] 使用LSM 700Zeiss共聚焦显微镜拍摄照片。每孔拍摄五张照片(顶部、底部、中心、左侧和右侧)。使用IMARIS 8.0对内化的血小板计数。这些实验中的内化血小板的标准是:最小体积为4.2 $\mu$ M,绿色荧光和在x、y和z平面上巨噬细胞对血小板的内化。使用Fiji (Fiji is Just Images)细胞计数程序对巨噬细胞进行计数。吞噬指数(PI)使用以下公式计算:

[0376]  $PI = (\text{吞噬的血小板的总数} / \text{计数的巨噬细胞的总数}) \times 100$

[0377] 经调理的红细胞的免疫荧光检测

[0378] 使用心脏穿刺从每只小鼠中采集5至800 $\mu$ L全血,并立即在200 $\mu$ L的1:1(抗凝缓冲液:BSGC缓冲液)中稀释血液,然后进一步使用BSGC缓冲液稀释至1.5mL的总体积。每个稀释的血液样品在室温下以300g离心3分钟,然后去除富含血小板的血浆(PRP)。然后将RBC重悬于1mL PBS中,并将每个样品在PBS中以1:3000稀释。使用Guava EasyCyte Mini(系列号2800060170)对RBC进行计数,并调节至 $5 \times 10^8$ 个RBC/mL。每种抗体使用一毫升的RBC。将抗体以指定的浓度添加到RBC悬浮液中。将混合物在37°C在温和混合下孵育1小时。孵育后,将RBC洗涤并重新调节至 $10^8$ 个RBC/mL,然后将100 $\mu$ L的样品添加到5mL流式细胞仪管中,并在100 $\mu$ L的适当的物种特异性R-PE-缀合的二抗制备物(1:200)中在室温下孵育30分钟。进行最后的洗涤以除去未结合的抗体。然后通过流式细胞仪(Guava EasyCyte流式细胞仪系统)分析样品,以确定抗体调理的红细胞的平均荧光强度(MFI)。

[0379] 结果

[0380] 将小鼠RBC与各种浓度的TER-119抗体在室温下孵育45分钟,洗涤,然后在37°C和5%CO<sub>2</sub>下加入至RAW巨噬细胞中30分钟。孵育后,将剩余的RBC用H<sub>2</sub>O裂解2分钟,并用4%PFA固定RAW细胞,然后在相差显微镜上观察。计数巨噬细胞和内化的红细胞,并计算吞噬指数。TER-119能够在低至1.25 $\mu$ g/mL的浓度下调理红细胞以进行吞噬(图5)。最大的RBC吞噬作用(即平台期)达到 $\geq 5\mu$ g/mL(图5)。

[0381] 此外,已通过使用共聚焦显微镜方法证明,TER-119调理的RBC在体外防止血小板吞噬作用(数据未显示)。用TER-119调理的RBC显著抑制RAW 264.7细胞对CMFDA标记的血小板的摄取,而对照RBC不影响摄取(数据未显示)。吞噬指数的计算证实了TER-119调理的RBC能够将血小板吞噬作用减少约75%(图6)。

[0382] 不同的抗体在抑制吞噬作用方面具有不同的能力。来自正常小鼠的红细胞未经调理或用TER-119抗体、去糖基化的TER-119、34-3C (5或40ug) 或M1/69调理1小时, 然后与RAW 264.7细胞和MWR<sub>reg</sub>30调理的CFMDA标记的血小板一起孵育30分钟。所测试的抗体的反应性示于下表5和图7中。通过共聚焦显微镜观察细胞, 并通过Imaris软件8.0.2版计数内化的血小板。仅TER-119、34-3C和M1/69能够在体外显著抑制血小板吞噬作用 ( $P < 0.05$ )。(每组  $n = 4-6$ )。

[0383] 抗红细胞抗体包被的RBC具有抑制血小板吞噬作用的能力。

[0384] 表5. 抗红细胞抗体特性概述

抗体	同种型	反应性	RBC结合 <sup>1</sup>	RBC清除 <sup>2</sup>	改善ITP	导致RBC吞噬作用	抑制血小板吞噬作用
[0385] TER-119	大鼠 IgG2 <sub>b</sub>	mGPA	++++	++++	是	是	是
去糖基化的TER-119	大鼠 IgG2 <sub>b</sub>	mGPA	+++	-	否	否	否
34-3C	小鼠 IgG2 <sub>a</sub>	Band3	++++	+++	是	是	是
M1/69	大鼠 IgG2 <sub>b</sub>	CD24	++++	++++	是	是	是

[0386] 1. RBC结合表示抗体与RBC结合的程度, 其通过流式细胞术测量 (++++ = MFI > 500; ++ = MFI > 250; + = MFI > 125; - = MFI < 62.5)

[0387] 2. RBC清除表示抗体清除循环中RBC的能力 (++++ = > 50% 清除率; +++ = > 25%; ++ = > 12.5%; + = > 6.25%; - = < 6.25%)

[0388] 实施例8. 测试红细胞靶向抗体改善MG的能力

[0389] 在第0、28和56天, 用从太平洋电鳐 (*torpedo californica*) 中提取并纯化的20-40微克乙酰胆碱受体 (T-AChR) 在完全弗氏佐剂 (CFA) 中对小鼠 (C57B1/6, 8-10周龄) 进行免疫。还包括CFA对照组。在四个部位进行皮下免疫。第一次注射在两个后足垫中和在肩胛骨上进行, 随后的注射在肩胛骨和大腿中进行 (Wu B等人, *Curr Protoc Immunol*. 2001; Chapter 15: unit 8)。

[0390] 通过测量握力 (作为肌肉无力的客观测量) 或倒吊的时间, 筛选小鼠的全身性肌肉无力的发生。肌肉无力也可以在运动后进行测量。为此, 将小鼠放在平坦的平台上并观察其肌肉无力。然后通过尾巴底部悬挂在笼子顶部的网格上的小鼠尝试抓住网格时反复轻柔拖拽它们 (20-30分钟) 进行锻炼。将它们放在平坦的平台上2分钟, 并再次观察到肌肉无力的迹象。临床上的肌肉无力可分为以下等级: 0级, 小鼠姿势正常; 1级, 休息时正常, 但运动后肌肉无力, 典型地表现为运动后驼背姿势、活动受限和难以抬起头; 2级, 在观察期内在无运动下的1级症状; 3级, 脱水且垂死, 具有2级的无力。

[0391] 当显著数量的小鼠表现出1-3级无力时, 确定特异于T-AChR的抗体 (IgG2<sub>b</sub>)。

[0392] 显示1-3级无力和显著阳性的T-AChR特异性IgG2<sub>b</sub>抗体的小鼠随机分为以下几组:

[0393] 1. 用同种型对照治疗

[0394] 2. 用抗TER-119抗体治疗

[0395] 3. 用抗血型糖蛋白A抗体治疗

[0396] 用单剂量例如2mg/kg的任一抗体静脉内注射小鼠。剂量也可以是0.1mg/kg至2mg/kg。抗体也可以腹膜内或皮下施用。

[0397] 在施用抗体后,每周两次确定临床评分和肌肉无力持续总共一个月。在实验结束时,将每只小鼠的血清、肌肉(即三头肌)和尸体冷冻。在血清中确定T-AChR特异性IgG2b抗体的滴度,并通过免疫组织学分析组织的补体沉积(C3和C5b-C9)。

[0398] 实施例9. 在NMO中测试红细胞靶向抗体

[0399] 使用氯胺酮(100mg/kg)和甲苯噻嗪(10mg/kg)麻醉体重匹配的雌性Sprague Dawley大鼠(250-300g,9-12周龄),然后将其放置在立体定位架上。在中线头皮切口后,在前囟的前侧0.5mm和外侧3.5mm处形成一个直径为1mm的颅钻孔。将直径40 $\mu$ m的玻璃针插入5mm深,以通过压力注射在10分钟内以3-6 $\mu$ L的总体积脑内注入30或40 $\mu$ g重组抗AQP4-IgG。在同一天,用0.1-2mg/kg单剂量的1)抗TER-119抗体或2)同种型对照腹膜内处理大鼠。在第5天,将大鼠深度麻醉,然后通过左心室用200ml肝素化的PBS,然后100ml的PBS中的4%多聚甲醛(PFA)进行穿心灌注。将大脑固定在4%PFA中,在4 $^{\circ}$ C在30%蔗糖中放置过夜,并包埋在OCT中。将固定的大脑冷冻,切片(10微米厚),并在封闭溶液(PBS,1%牛血清白蛋白,0.2% Triton X-100)中孵育1小时,然后与针对以下的一抗进行过夜孵育(4 $^{\circ}$ C):AQP4(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、GFAP(1:100, Millipore)、髓磷脂碱性蛋白(MBP)(1:200, Santa Cruz Biotechnology)、离子钙结合衔接子分子1(Iba1;1:1000;Wako, Richmond, VA)、C5b-9(1:50, Hycult Biotech, Uden, The Netherlands)或CD45(1:10, BD Biosciences, San Jose, CA),然后加入适当的荧光二抗(1:200, Invitrogen, Carlsbad, CA)。将切片与VECTASHIELD(Vector Laboratories, Burlingame, CA)一起安装,以便在Leica荧光显微镜上观察。NMO病理学通过AQP4和髓磷脂丢失和补体沉积来评估。

[0400] 实施例10. 在体外人系统中测试红细胞靶向抗体抑制Fc $\gamma$ R功能的能力

[0401] Fc $\gamma$ R功能包括Fc $\gamma$ R介导的对例如免疫球蛋白包被的颗粒的摄取。预期抗RBC抗体和红细胞的免疫复合物比单独的抗体能更有效地阻断Fc $\gamma$ -受体,这预期导致抗炎/免疫抑制的一般状态。这种作用可能取决于RBC表面上抗原的密度和被测抗体的同种型。为了研究不同的抗RBC抗体的作用,将表达Fc $\gamma$ R的细胞(如THP1细胞或人单核细胞/巨噬细胞)与RBC-抗RBC抗体复合物孵育,然后测量表达Fc $\gamma$ R的细胞吞噬IgG-包被的颗粒或细菌的能力。如果RBC抗体复合物阻断细胞表面上的Fc $\gamma$ R,则Fc $\gamma$ R介导的摄取减少。(实验改编自Tridandapani等人,J Biol Chem.2002;277(7):5082-9;Nagelkerke SQ等人,Blood.2014;124(25):3709-18;Coopamah MD等人,Blood.2003;102(8):2862-7)。

[0402] 抗RBC抗体和红细胞的免疫复合物本身诱导吞噬作用(类似于小鼠系统),但也通过这种机制抑制其他颗粒和细菌的吞噬作用。

[0403] 实施例11. 在人系统中测试红细胞靶向抗体体外抑制Fc $\gamma$ R表面表达的能力

[0404] 与上述抗RBC抗体和红细胞的免疫复合物结合Fc $\gamma$ R并由此阻断Fc $\gamma$ R功能如Fc $\gamma$ R介导的吞噬作用的免疫机制相一致,预期Fc $\gamma$ R表达本身也会受到影响。为了研究RBC-抗RBC抗体复合物对细胞表面上Fc $\gamma$ R表达的作用,将THP1细胞或人单核细胞/巨噬细胞与该复合物一起孵育,并通过FACS随时间评估Fc $\gamma$ R表达。预期活化性Fc $\gamma$ R包括CD64、CD32a和CD16会下调,而抑制性受体CD32b甚至可能上调(实验改编自Song S.等人,Blood.2003;101(9):3708-3713)。

[0405] 实施例12. 转换为鼠IgG变体的TER-119抗体改善胶原蛋白诱导的关节炎(CIA)

[0406] 为了验证独立于诱导疾病的抗体或血清的输注在B细胞和T细胞依赖性慢性病情

模型中的疾病改善活性,评估了CIA中的治疗反应。另外,为了评估TER-119的鼠形式,将大鼠IgG2b恒定区替换为鼠IgG1和IgG2a。如所述的(Campbell IK等人,J Leuk Biol2000;68:144-50),将2mg/kg的每种抗体注射到用II型胶原蛋白预先免疫的DBA/1小鼠的不同组中,持续28天。简而言之,通过静脉内途径,间隔21天用完全弗氏佐剂中的鸡胶原蛋白注射DBA-1小鼠,并在7天后用2mg/kg同种异型转换(小鼠IgG1,小鼠IgG2a)的TER-119处理,并评估临床评分。

[0407] 两种鼠IgG亚型均可在注射1天内降低关节炎小鼠的临床评分,并且改善作用持续了一整周,然后恢复为关节炎(图8)。因此,疾病改善不仅限于抗体诱导的关节炎模型。CIA模型如(Campbell IK等人,J Leuk Biol 2000;68:144-50)所述的进行。

[0408] 实施例13:34-3C能够改善胶原蛋白抗体诱导的关节炎CAbIA模型中的炎性关节炎

[0409] 我们还测试了靶向红细胞上Band 3抗原的34-3C mAb改善小鼠的CAbIA模型中已建立的关节炎疾病的能力。在第0天,用0.2ml抗胶原蛋白mAb混合物(10mg/ml)腹膜内注射所有小鼠。在第3天,用0.1ml LPS(0.5mg/ml)腹膜内注射所有小鼠。在第5天,将关节炎小鼠随机分配到治疗组中,并给予2mg/kg 34-3C(图9,实心正方形)或作为阴性对照的PBS(实心圆圈)的单次静脉内注射。实验在第12天终止。作为对照的用PBS处理的小鼠随时间增加疾病的严重程度,在第8天达到最大值(临床评分)。相比之下,接受RBC抗体34-3C的小鼠(小鼠IgG2a,Leddy JP,J.Clin.Invest.1993;91:1672-1680)显示出临床评分的显著减少。这些数据表明34-3C mAb能够逆转已建立的关节炎。



[0001] 序列表  
 [0002] <110> 杰特有限公司  
 [0003] 加拿大血液服务中心  
 [0004] <120> 一种方法  
 [0005] <130> 2017\_P002\_A280  
 [0006] <150> EP17197541.0  
 [0007] <151> 2017-10-20  
 [0008] <150> EP18194394.5  
 [0009] <151> 2018-09-14  
 [0010] <160> 6  
 [0011] <170> PatentIn version 3.5  
 [0012] <210> 1  
 [0013] <211> 106  
 [0014] <212> PRT  
 [0015] <213> 智人  
 [0016] <400> 1  
 [0017] Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg  
 [0018] 1 5 10 15  
 [0019] Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Arg Tyr Leu Asn  
 [0020] 20 25 30  
 [0021] Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile His Thr  
 [0022] 35 40 45  
 [0023] Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Val  
 [0024] 50 55 60  
 [0025] Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
 [0026] 65 70 75 80  
 [0027] Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Tyr Thr Phe  
 [0028] 85 90 95  
 [0029] Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Lys Arg  
 [0030] 100 105  
 [0031] <210> 2  
 [0032] <211> 125  
 [0033] <212> PRT  
 [0034] <213> 智人  
 [0035] <400> 2  
 [0036] Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly  
 [0037] 1 5 10 15  
 [0038] Ser Leu Arg Val Ala Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Phe

[0039]	20	25	30
[0040]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0041]	35	40	45
[0042]	Ala Phe Ile Trp Phe Asp Ala Ser Asn Lys Gly Tyr Gly Asp Ser Val		
[0043]	50	55	60
[0044]	Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0045]	65	70	75
[0046]	Leu Gln Met Asn Gly Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0047]	85	90	95
[0048]	Ala Arg Glu Lys Ala Val Arg Gly Ile Ser Arg Tyr Asn Tyr Tyr Met		
[0049]	100	105	110
[0050]	Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0051]	115	120	125
[0052]	<210> 3		
[0053]	<211> 113		
[0054]	<212> PRT		
[0055]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[0056]	<400> 3		
[0057]	Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly		
[0058]	1	5	10
[0059]	Glu Lys Val Ser Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser		
[0060]	20	25	30
[0061]	Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln		
[0062]	35	40	45
[0063]	Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val		
[0064]	50	55	60
[0065]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr		
[0066]	65	70	75
[0067]	Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Tyr Cys Lys Gln		
[0068]	85	90	95
[0069]	Ser Tyr Asn Leu Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0070]	100	105	110
[0071]	Arg		
[0072]	<210> 4		
[0073]	<211> 119		
[0074]	<212> PRT		
[0075]	<213> 小家鼠		
[0076]	<400> 4		
[0077]	Glu Val Arg Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Pro Val Gln Pro Gly Gly		

[0078]	1	5	10	15
[0079]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr			
[0080]	20	25	30	
[0081]	Trp Met Asn Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
[0082]	35	40	45	
[0083]	Gly Glu Ile Asn Gln Gln Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ser Pro Pro Leu			
[0084]	50	55	60	
[0085]	Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr			
[0086]	65	70	75	80
[0087]	Leu Gln Met Asn Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys			
[0088]	85	90	95	
[0089]	Ala Arg Leu Ser Leu Thr Ala Ala Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0090]	100	105	110	
[0091]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
[0092]	115			
[0093]	<210> 5			
[0094]	<211> 107			
[0095]	<212> PRT			
[0096]	<213> 褐家鼠			
[0097]	<400> 5			
[0098]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Val Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0099]	1	5	10	15
[0100]	Asp Arg Val Thr Leu Asn Cys Lys Ala Ser Gln Asn Ile Asn Lys Tyr			
[0101]	20	25	30	
[0102]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys Val Leu Ile			
[0103]	35	40	45	
[0104]	Tyr Asn Thr Asn Asn Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0105]	50	55	60	
[0106]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0107]	65	70	75	80
[0108]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Phe Gln His Tyr Thr Trp Pro Thr			
[0109]	85	90	95	
[0110]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
[0111]	100	105		
[0112]	<210> 6			
[0113]	<211> 120			
[0114]	<212> PRT			
[0115]	<213> 褐家鼠			
[0116]	<400> 6			

[0117] Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0118] 1 5 10 15  
 [0119] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asp His  
 [0120] 20 25 30  
 [0121] Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Thr Met Glu Trp Ile  
 [0122] 35 40 45  
 [0123] Gly Asp Ile Arg Pro Asp Gly Ser Asp Thr Asn Tyr Ala Pro Ser Val  
 [0124] 50 55 60  
 [0125] Arg Asn Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Ser Ile Leu Tyr  
 [0126] 65 70 75 80  
 [0127] Leu Gln Met Ser Asn Met Arg Ser Asp Tyr Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 [0128] 85 90 95  
 [0129] Val Arg Asp Ser Pro Thr Arg Ala Gly Leu Met Asp Ala Trp Gly Gln  
 [0130] 100 105 110  
 [0131] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 [0132] 115 120

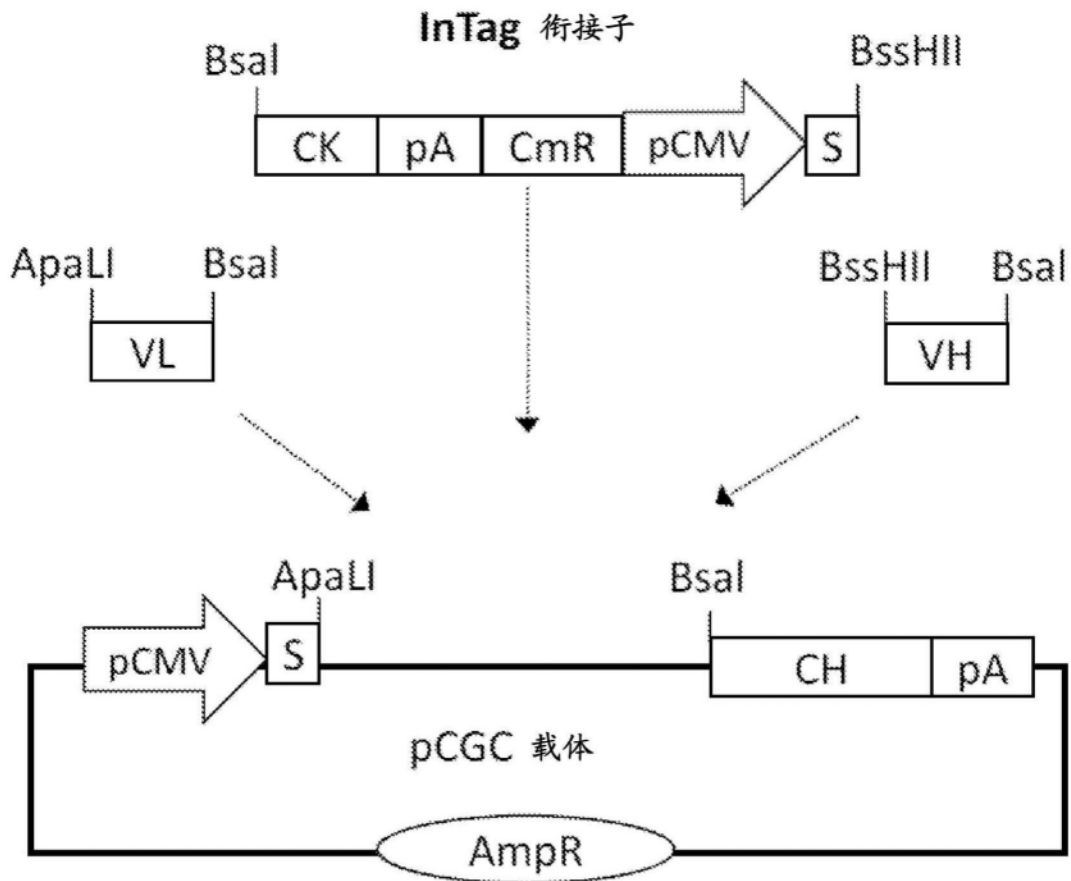


图1

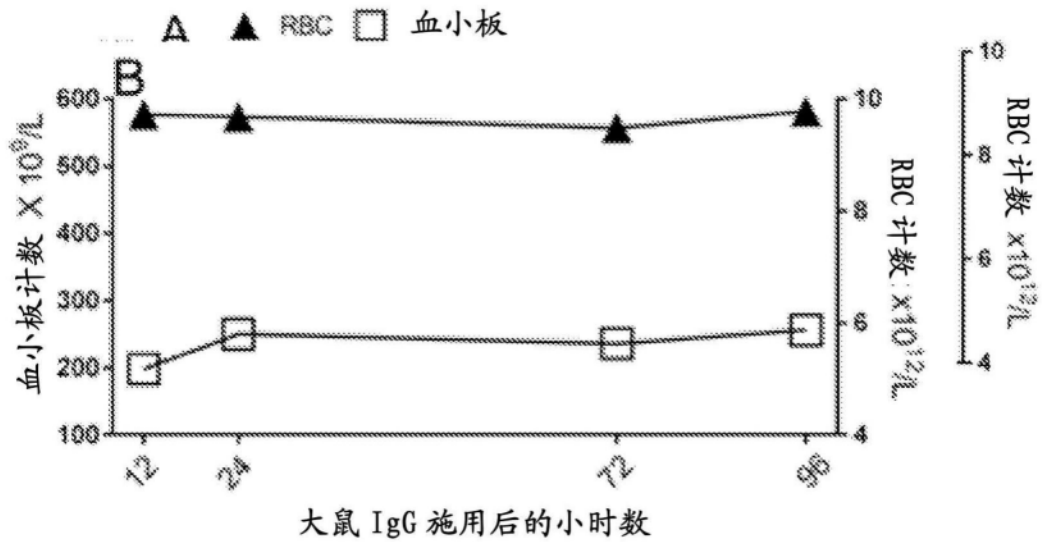


图2

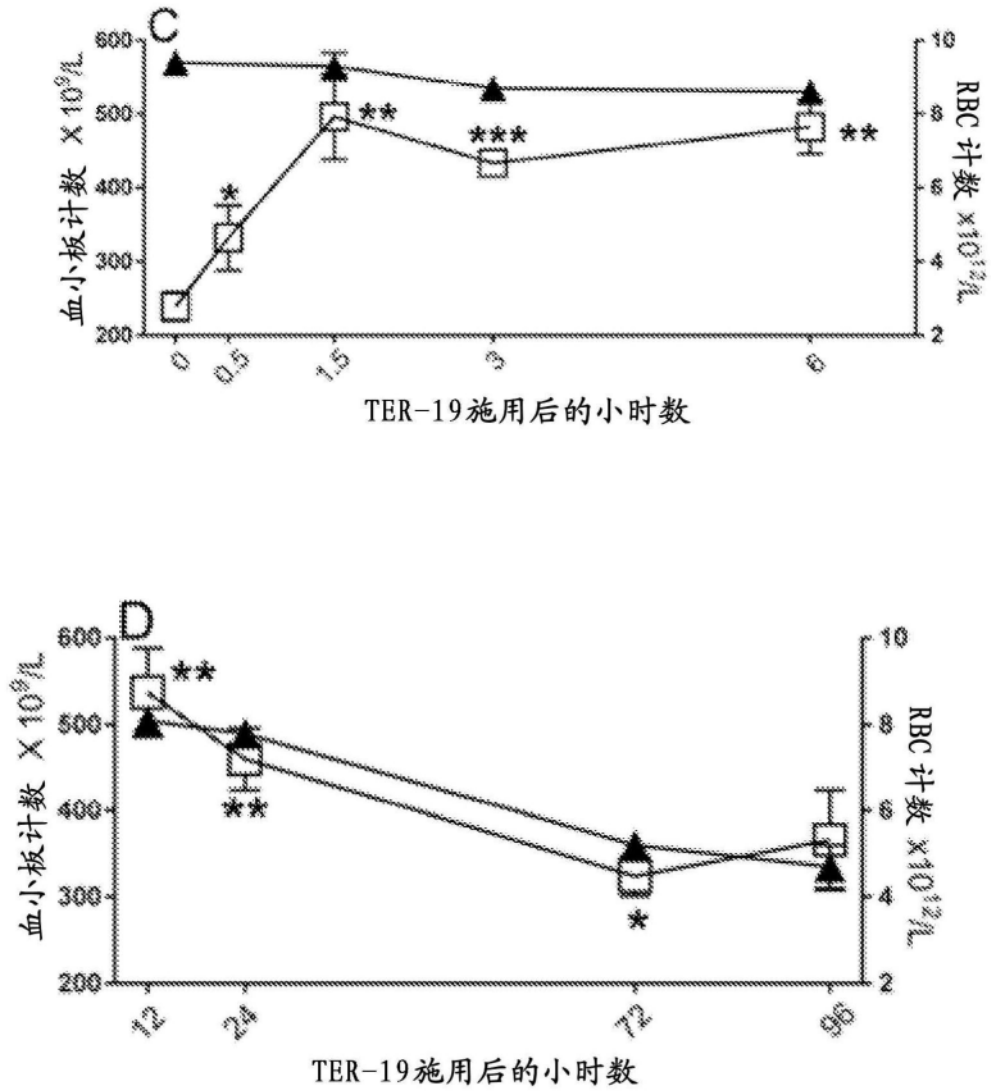


图2续

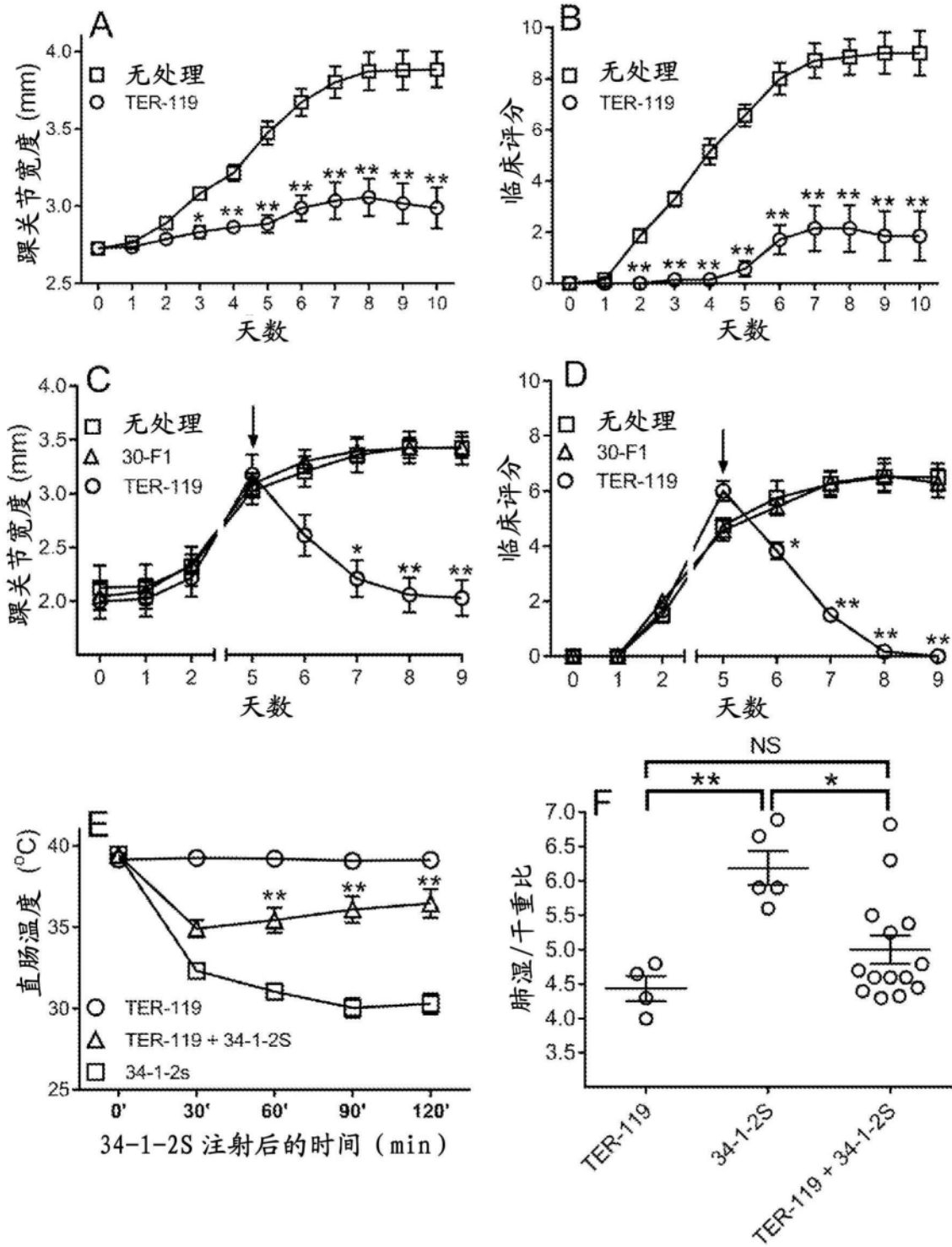
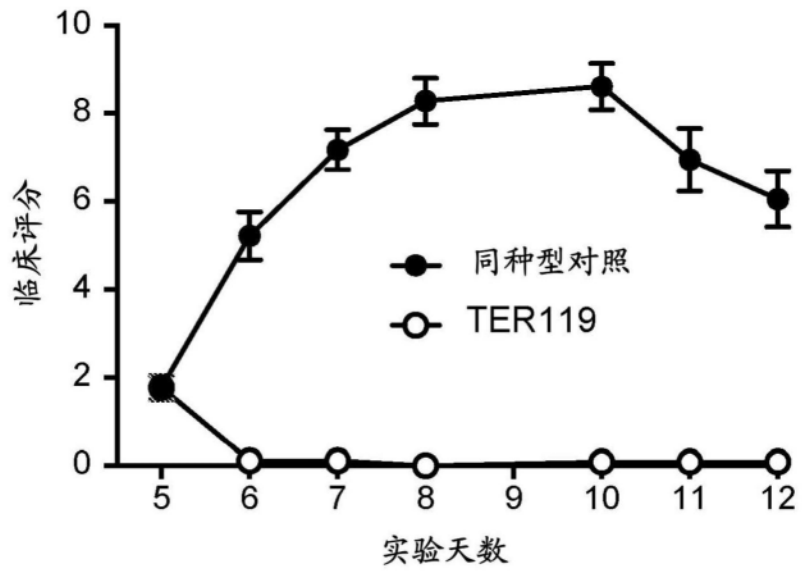


图3

A



B

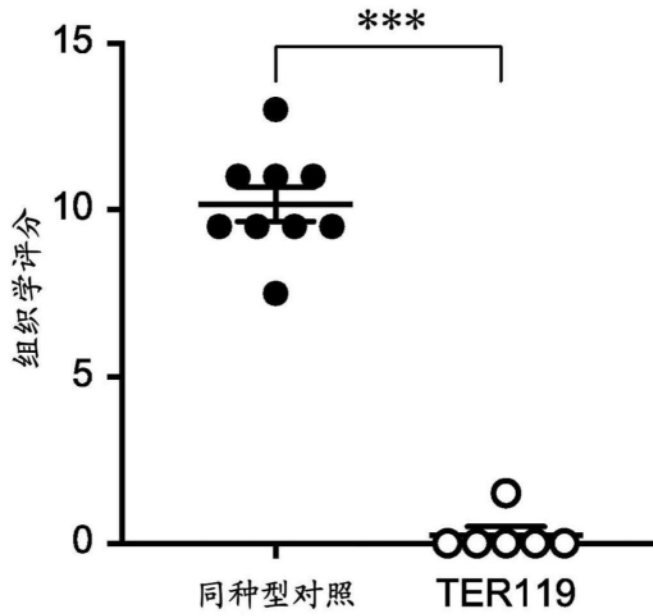


图4



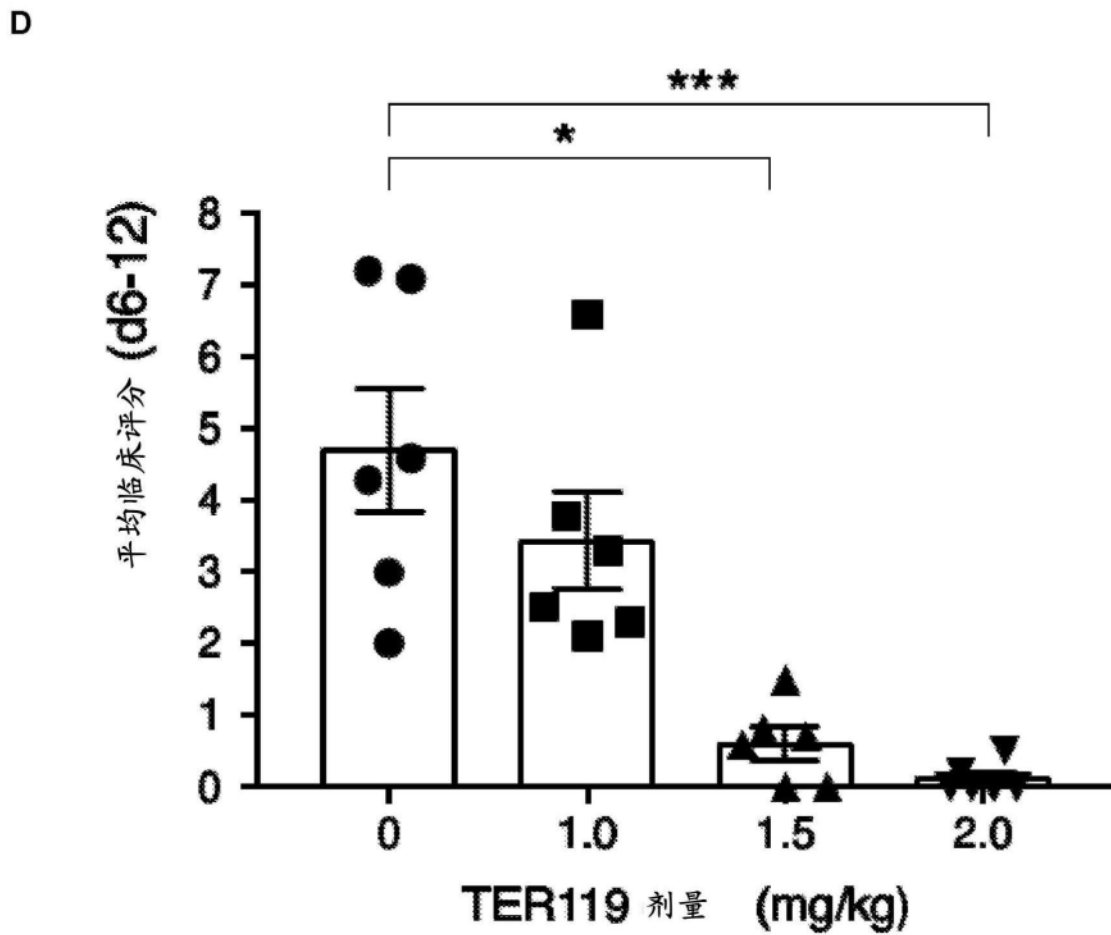
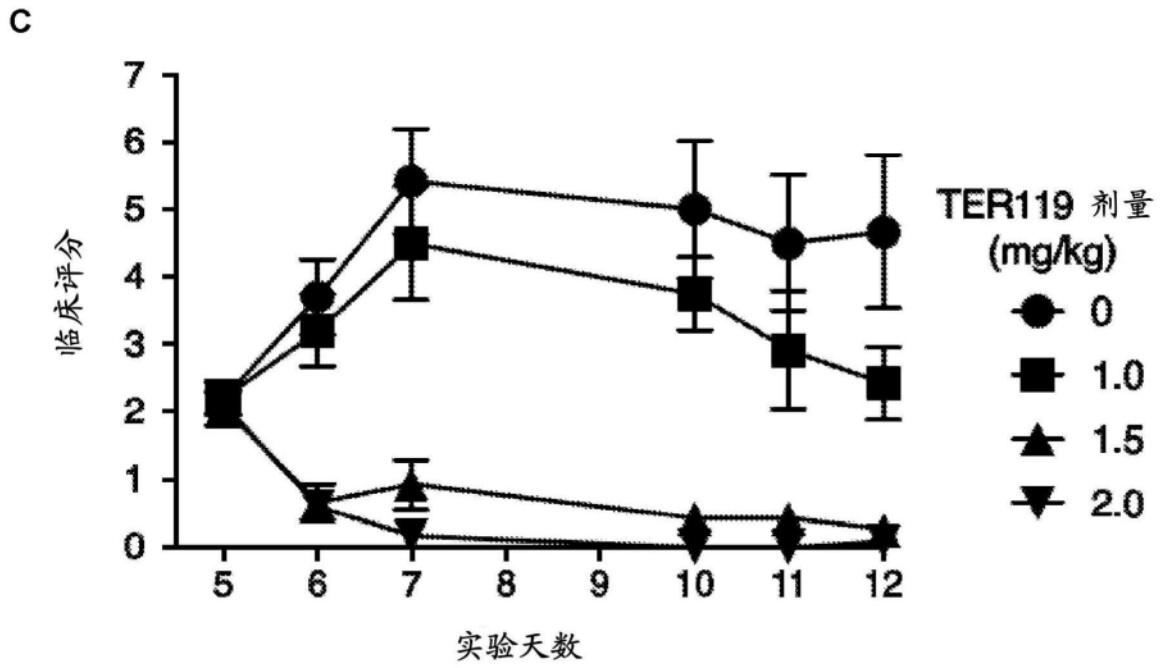
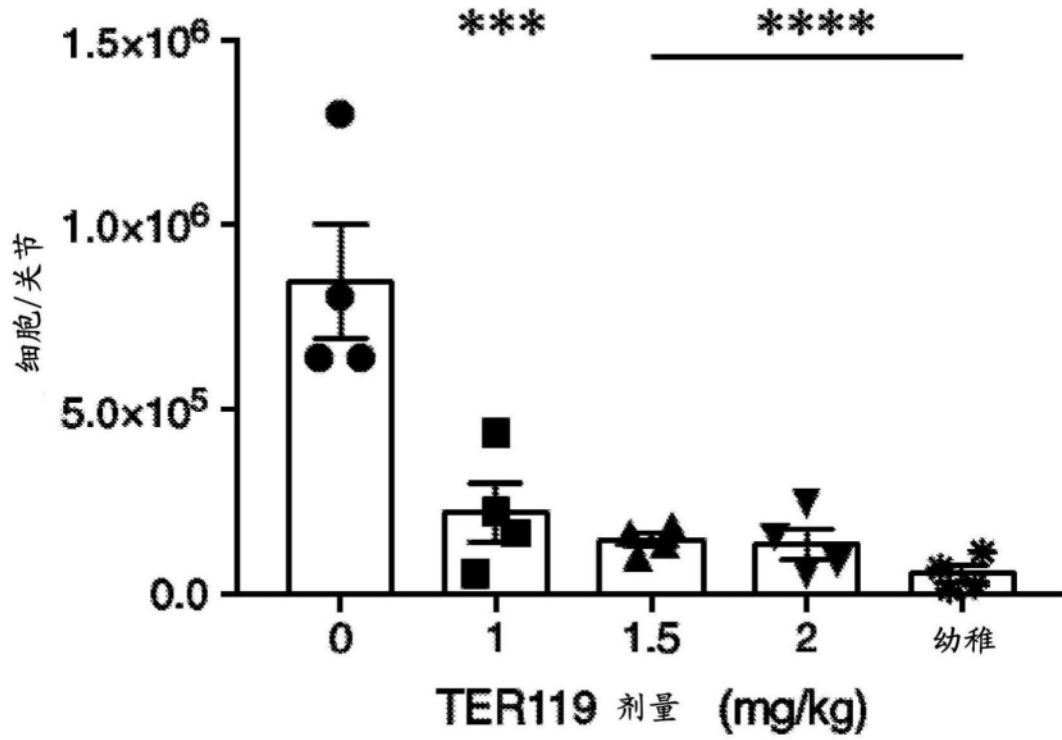


图4续

E



F

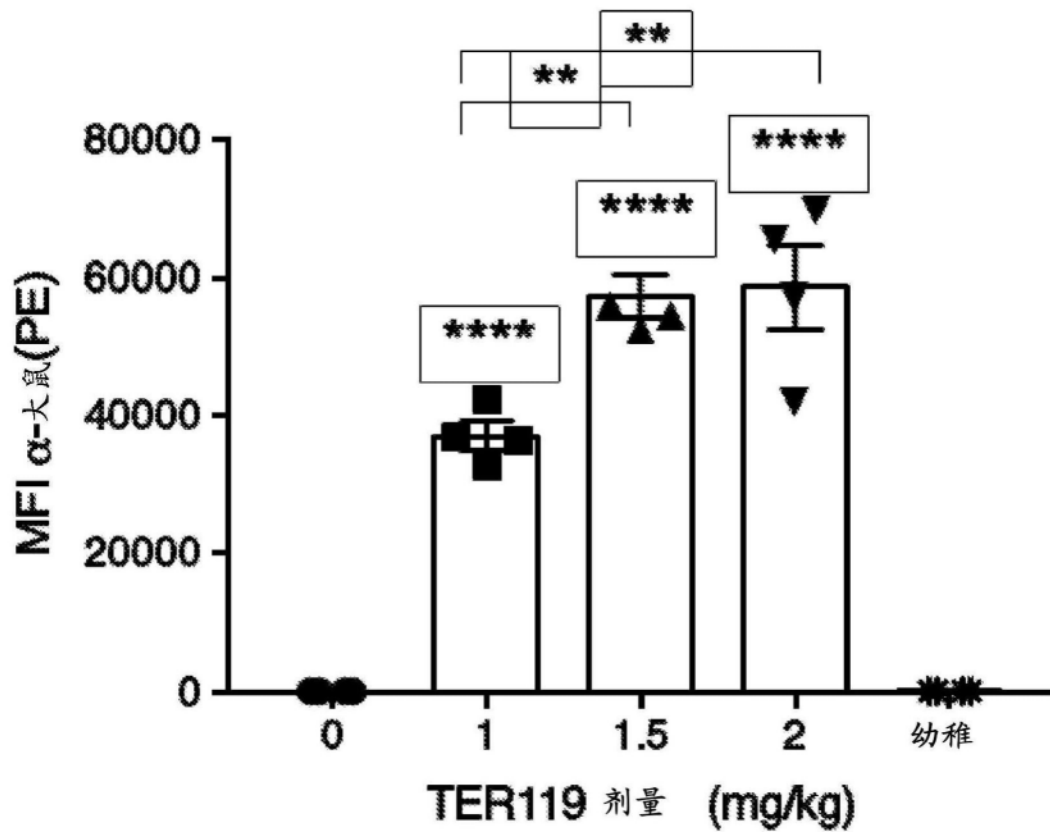


图4续

G

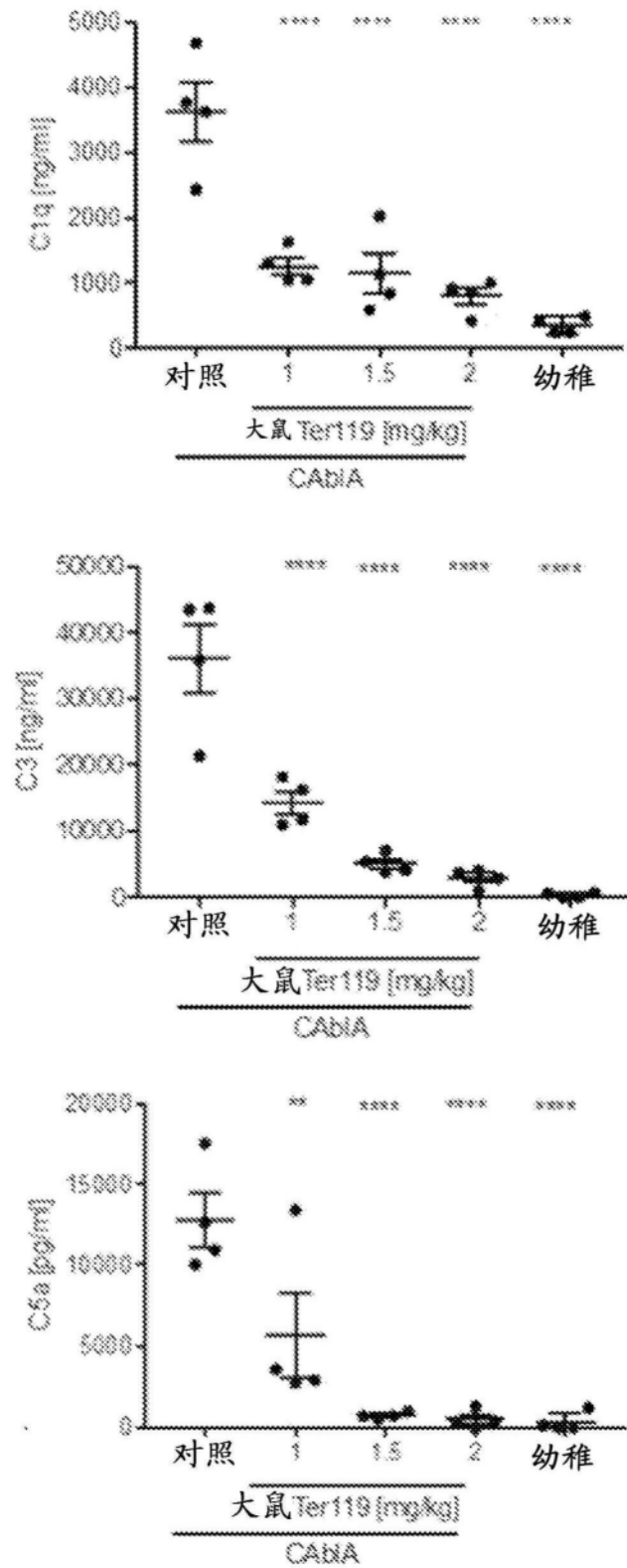


图4续

H

每组的小鼠

- 1. Ter119 (n=5)
- 2. 去糖基化Ter119 (n=5)
- 3. M1/69 (n=2)
- 4. 同种型对照 (n=4)

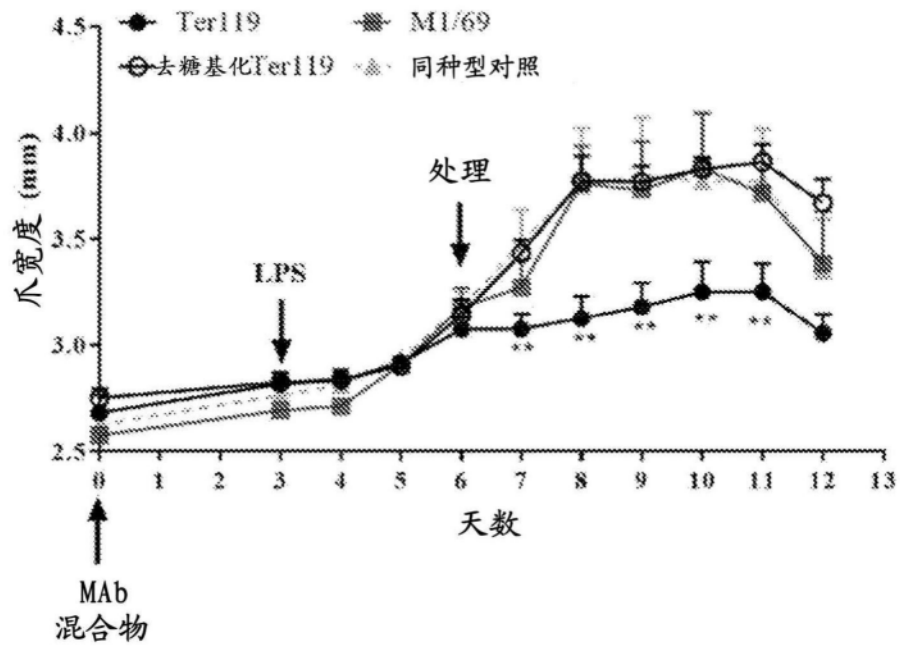
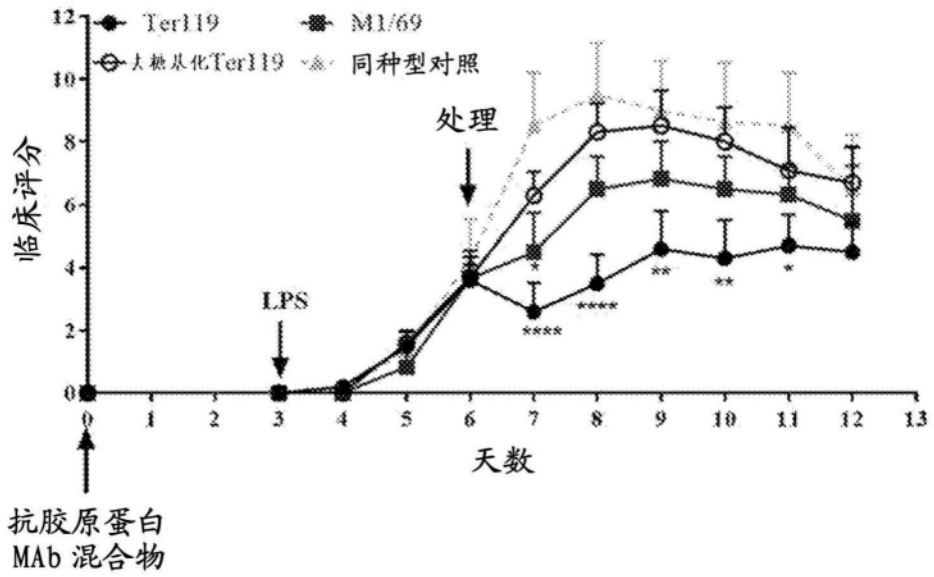


图4续

I

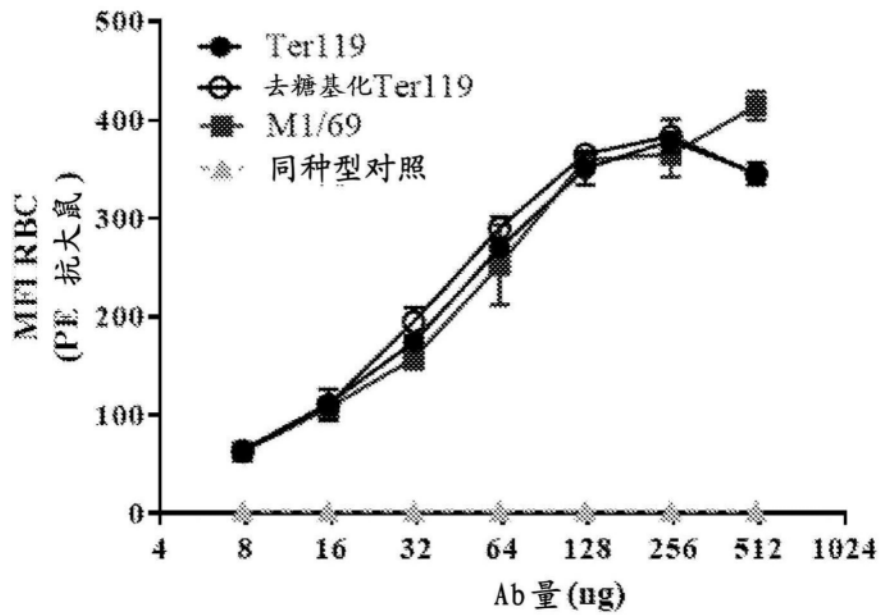
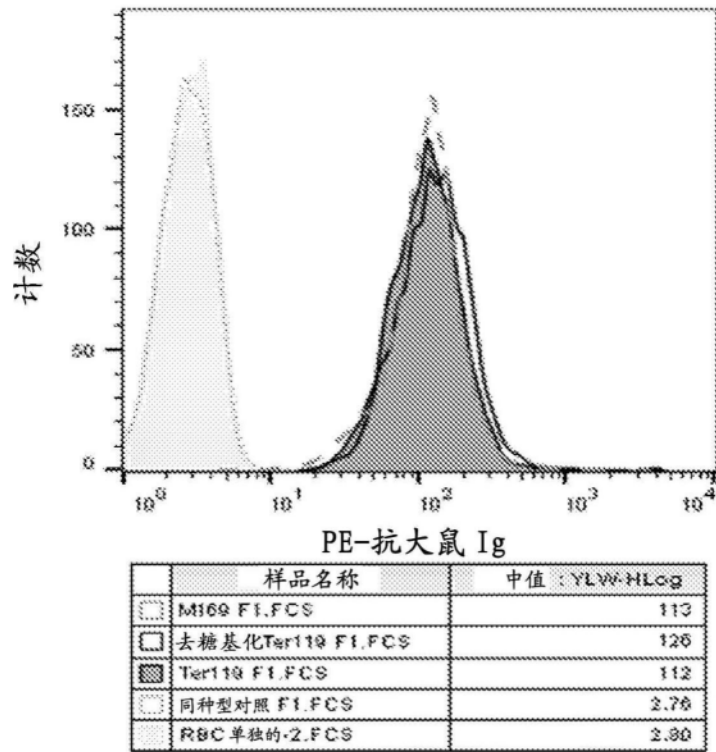


图4续

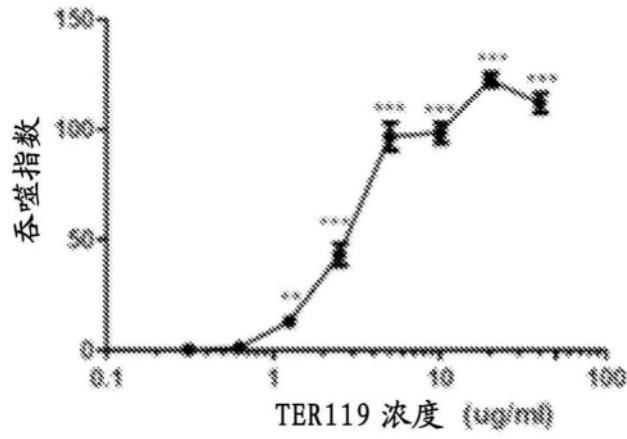


图5

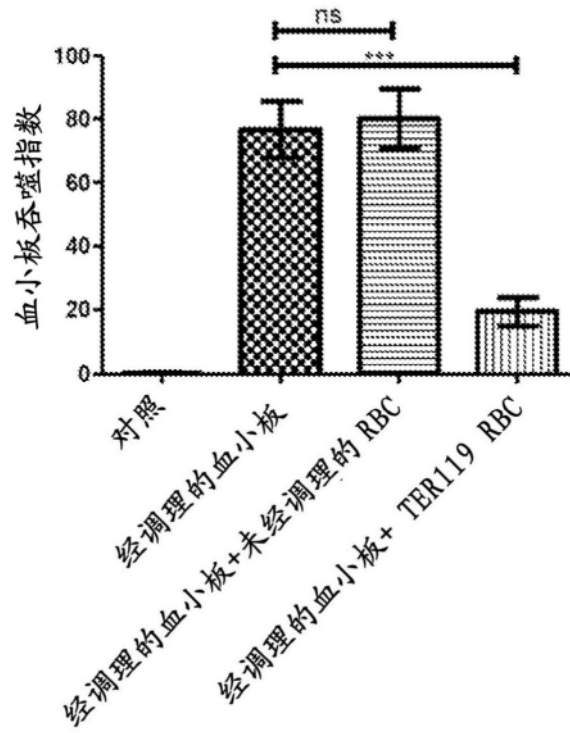


图6

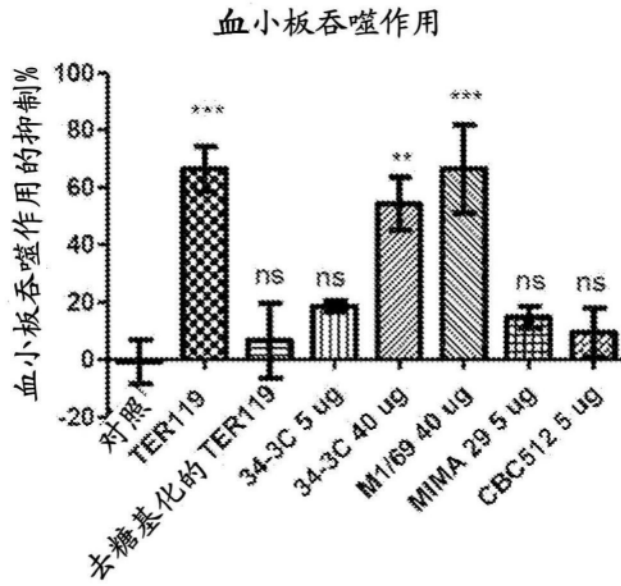


图7

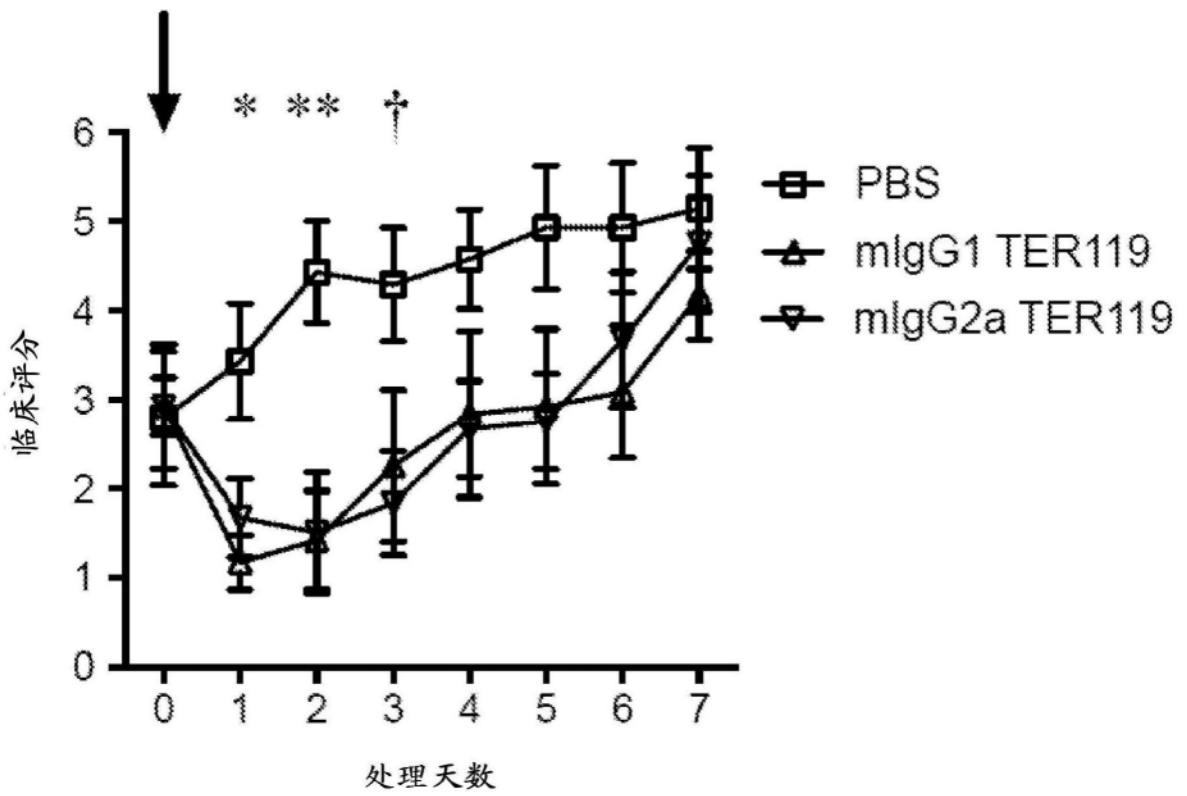
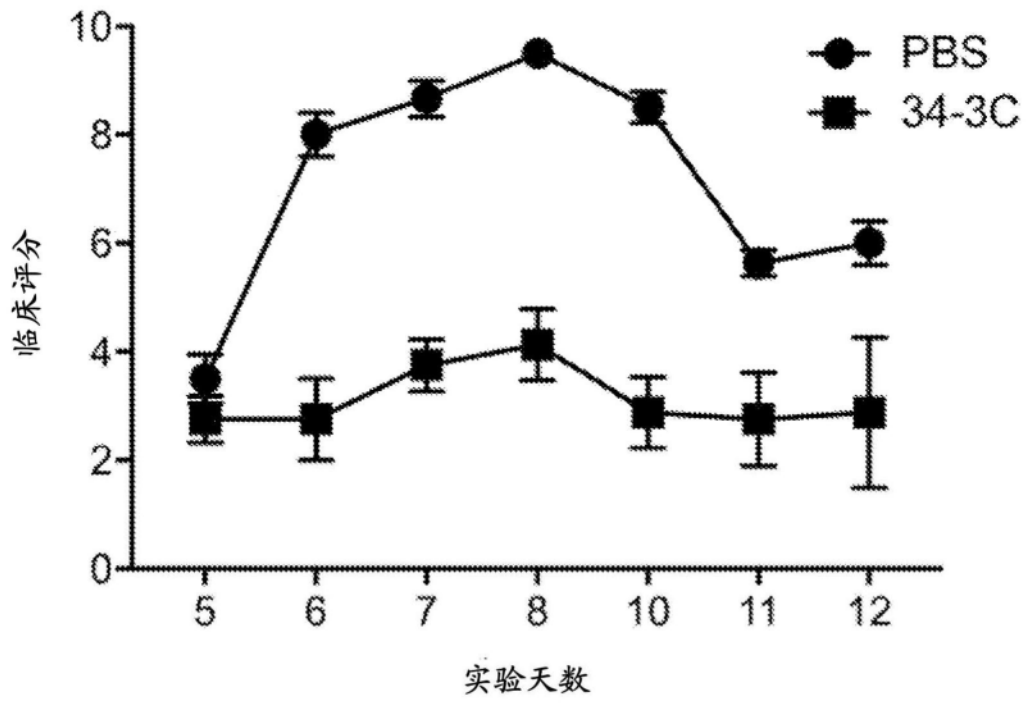


图8

A



B

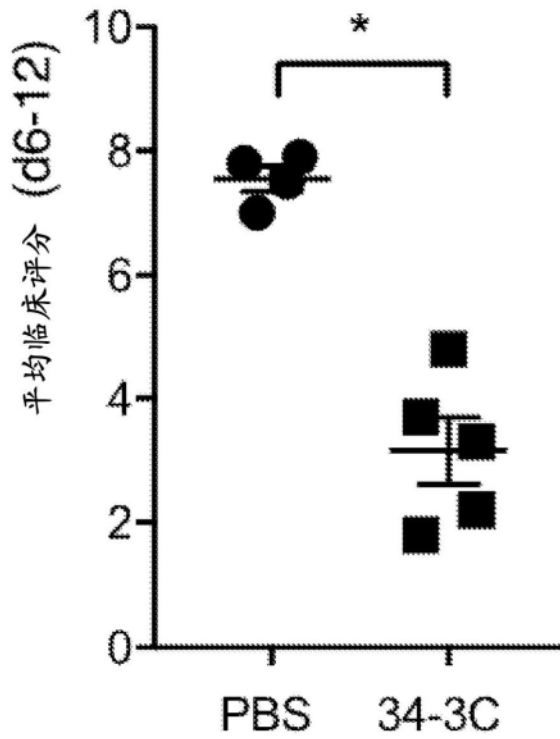


图9