



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.12.13

(21) Номер заявки
201790192

(22) Дата подачи заявки
2015.07.10

(51) Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)

**(54) СПОСОБ СНИЖЕНИЯ Fc-РЕЦЕПТОРНОГО СВЯЗЫВАНИЯ МОЛЕКУЛ
СЫВОРОТОЧНОГО IgG У СУБЪЕКТА**

(31) **1413240.1**

(32) **2014.07.25**

(33) **GB**

(43) **2017.09.29**

(86) **PCT/EP2015/065895**

(87) **WO 2016/012285 2016.01.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХАНСА БИОФАРМА АБ (SE)

(72) Изобретатель:
**Челльман Кристиан, Ярнум София,
Винстедт Лена (SE)**

(74) Представитель:
**Осипов К.В., Хмара М.В., Пантелеев
А.С., Ильмер Е.Г., Липатова И.И.,
Новоселова С.В., Дощечкина В.В.
(RU)**

(56) WO-A1-2013110946
KAVITHA BARUAH ET AL.: "Selective
Deactivation of Serum IgG: A General
Strategy for the Enhancement of Monoclonal
Antibody Receptor Interactions", JOURNAL OF
MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS,
UNITED KINGDOM, vol. 420, no. 1, 3 April
2012 (2012-04-03), pages 1-7, XP028514772,
ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/J.JMB.2012.04.002
[retrieved on 2012-04-05] abstract

WO-A2-2008071418

KUTTY SELVA NANDAKUMAR ET AL.:
"Blocking of experimental arthritis by cleavage of IgG

antibodies in vivo", ARTHRITIS & RHEUMATISM,
vol. 56, no. 10, 1 January 2007 (2007-01-01), pages
3253-3260, XP055107646, ISSN: 0004-3591, DOI:
10.1002/art.22930 page 3258 - page 3259; figures 1-6
abstract

ALBERT HEIKE ET AL.: "In vivo enzymatic
modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune
disease in an IgG subclass-dependent manner",
PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY
OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF
SCIENCES, US, vol. 105, no. 39, 30 September 2008
(2008-09-30), pages 15005-15009, XP002569095,
ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0808248105
[retrieved on 2008-09-24] abstract

Jenny Johansson Söderberg: "The streptococcal
IgG degrading enzyme IdeS: studies on host-
pathogen interactions", 1 January 2012 (2012-01-01),
XP055248265, Retrieved from the Internet:
URL: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:513947/FULLTEXT01.pdf> [retrieved on 2016-02-08]
figure 4

WO-A1-2013037824

WO-A2-2009033670

Anonymous: "Structural Biochemistry/
Proteins/Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay
(ELISA) - Wikibooks, open books for an
open world", 29 October 2012 (2012-10-29),
XP055248514, Retrieved from the Internet:
URL: [https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Proteins/Enzyme-Linked_Immunoabsorbent_Assay_\(ELISA\)](https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Proteins/Enzyme-Linked_Immunoabsorbent_Assay_(ELISA)) [retrieved on 2016-02-09] the whole
document

(57) Изобретение относится к способу увеличения преимуществ терапии для субъекта, при этом указанная терапия представляет собой трансплантацию органа. Данный способ включает введение субъекту белка, обладающего активностью IgG-цистеинпротеазы, который представляет собой IdeS, и последующее проведение указанной терапии у субъекта.

Область изобретения

Изобретение относится к способу увеличения преимуществ терапии для субъекта, при этом указанная терапия представляет собой трансплантацию органа. Данный способ включает введение субъекту белка, обладающего активностью IgG-цистеинпротеазы, который представляет собой IdeS, и последующее проведение указанной терапии у субъекта.

Уровень техники

Антитела являются компонентами иммунной системы, которые привлекают другие элементы иммунной системы к конкретным мишеням в организме. Антитела являются специфическими для антигенов-мишеней за счет специфичности Fab-доменов. Антитела привлекают другие элементы иммунной системы путем взаимодействия кристаллизуемого фрагмента (fragment crystallisable, Fc) антитела с Fc-рецепторами (FcR), экспрессированными на поверхности иммунных клеток. Преобладающими антителами в сыворотке крови у млекопитающих, как правило, являются иммуноглобулины класса G (IgG): IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Эти антитела связываются с человеческими FcR: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и FcγRIIIb и с Fc-рецептором комплемента C1q. Эффективность привлечения клеточной иммунной системы молекулами IgG зависит от аффинности Fc к FcR. Взаимодействие между Fc-доменом антитела и FcR имеет большое значение как для действия антител, которые вводятся в качестве терапевтических агентов, так и для действия антител, которые играют патогенную роль в развитии различных аутоиммунных состояний, включая отторжение трансплантата, опосредованное антителами.

Сущность изобретения

Авторы данного изобретения неожиданно показали, что можно использовать агент для полного, быстрого, временного и безопасного устранения Fc-рецепторного связывания всеми или, по существу, всеми молекулами IgG в сыворотке пациента. Это устранение создает окно определенной длительности, в котором, если вводится терапевтическое антитело, оно будет иметь повышенную эффективность, так как ему не нужно будет конкурировать с эндогенными IgG за связывание Fc-рецепторов.

Окно определенной длительности также может быть использовано для проведения лечения, например, трансплантации органа, которое иначе было бы неэффективным из-за действия IgG-антител против донора, присутствующих в сыворотке крови пациента. Таким образом, в одном воплощении данный способ может быть использован для десенсибилизации пациента перед трансплантацией органа.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу увеличения преимуществ терапии для субъекта, который включает: (а) введение субъекту белка, обладающего активностью IgG-цистеинпротеазы, который представляет собой IdeS; и (b) последующее проведение указанной терапии у субъекта, где

указанная терапия представляет собой трансплантацию органа; количество вводимого указанного белка является достаточным для того, чтобы устранить Fc-рецепторное связывание, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке крови субъекта; а также

этапы (а) и (b) разделены временным интервалом, который является достаточным для устранения Fc-рецепторного связывания, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке крови субъекта, и составляет от 1 до не более 6 ч;

где, кроме того, количество вводимого IdeS находится в диапазоне от 0,01 до 1 мг/кг массы тела, и где субъектом является человек.

В одном воплощении настоящего изобретения указанный белок вводят путем внутривенной инфузии.

В другом воплощении настоящего изобретения временной интервал между этапами (а) и (b) составляет от 1 до 2 ч, от 1 до 3 ч, от 1 до 4 ч, от 1 до 5 ч, от 1 до 6 ч, от 2 до 3 ч, от 2 до 4 ч, от 2 до 5 ч, от 2 до 6 ч, от 3 до 4 ч, от 3 до 5 ч, от 3 до 6 ч, от 4 до 5 ч, от 4 до 6 ч или от 5 до 6 ч.

В другом воплощении настоящего изобретения трансплантация органа представляет собой трансплантацию почки, печени, сердца, поджелудочной железы, легкого или тонкого кишечника.

В другом воплощении настоящего изобретения способ также включает этап, проводимый во время или непосредственно перед трансплантацией, который включает индукцию супрессии Т-клеток и/или В-клеток у пациента.

В другом воплощении настоящего изобретения указанная индукция супрессии включает введение эффективного количества по меньшей мере одного из муромонаба, базиликсимаба, даклизумаба, антитела против тимоцитарного глобулина (ATG), лимфоцитарного иммуноглобулина, препарата глобулина против тимоцитов (ATGAM) или ритуксимаба.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 - схематическое представление расщепления IgG посредством IdeS. Интактный человеческий IgG, независимо от изотипа, расщепляется посредством IdeS в два этапа. Первый этап образует однократно расщепленный IgG (single-cleaved IgG, scIgG) с одной интактной тяжелой цепью. Второй этап образует полностью расщепленные продукты, состоящие из одного F(ab')₂-фрагмента и одного гомодимерного Fc-фрагмента, соединенных за счет нековалентных взаимодействий.

Фиг. 2 - протеинурию контролировали в качестве меры безопасности в ходе всего исследования на

людях из примера 1. Multistix (Siemens) стандартным образом использовали в больнице, и у нескольких субъектов была обнаружена временная протеинурия, которая коррелировала с расщеплением IgG. А) субъекты, которые получали плацебо (n равно 9), В) субъекты, которые получали одну дозу 0,24 мг/кг массы тела IdeS (n равно 4).

Фиг. 3 - фармакокинетика IdeS в сыворотке. Концентрации IdeS в сыворотке определяли способом LC-MS/MS на основе четырех пептидов, полученных из IdeS. А) сравнение сывороточной концентрации IdeS за одну минуту до окончания инфузии по сравнению с уровнями доз IdeS (0,01, 0,04, 0,12 и 0,24 мг/кг массы тела) (логарифмическая шкала: круги - отдельные концентрации). Анализируемое вещество: пептид LFEYFK (n равно 20); В) сравнение профилей зависимости сывороточной концентрации средних значений четырех пептидов (AFPYLSTK, AIYVTDSDSNASIGMK, GGIFDAVFTR и LFEYFK) от времени в течение периода до 24 ч после инфузии 0,12 или 0,24 мг/кг массы тела IdeS (n равно 8).

Фиг. 4 - качественный фармакодинамический анализ с помощью SDS-PAGE показал быструю деградацию IgG. Анализ SDS-PAGE сыворотки от субъектов, которым вводили А) 0,12 мг/кг массы тела IdeS и В) 0,24 мг/кг массы тела IdeS, показал паттерны белковых полос в моменты времени до введения дозы, через 14 мин, 20 мин, 1, 2, 6 и 24 ч после введения дозы; С) восстановление IgG в сыворотке крови от одного субъекта в группе с введением 0,24 мг/кг массы тела в моменты времени до введения дозы, через 2 ч, 24 ч, 7, 14, 21, 28 и 35 дней после введения дозы. Стрелки справа на каждой фигуре показывают различные полосы в IgG-маркере, содержащем смесь человеческого IgG, scIgG, F(ab')₂ и Fc. Линии слева на каждой фигуре показывают молекулярную массу стандарта в кДа. Гели показывают репрезентативного субъекта в группах, получавших IdeS в дозах 0,12 и 0,24 мг/кг массы тела.

Фиг. 5 - количественный фармакодинамический анализ путем ELISA показал быструю деградацию IgG. Уровни сывороточного IgG у отдельных субъектов, которым вводили IdeS в дозе 0,24 мг/кг массы тела, определяли с помощью валидированного способа ELISA (ИФА) (обнаружение интактных IgG и scIgG). Для того чтобы иметь возможность следить как за ранней быстрой деградацией, так и за восстановлением IgG, ось x разделяли на две части. Первая часть показывает время в часах (0-24 ч), а вторая показывает время в днях (7-64 дня).

Фиг. 6 - титрование IdeS in vitro на человеческой сыворотке. Образцы человеческой сыворотки от здоровых субъектов использовали в качестве субстратов для IdeS и титровали путем ELISA (n равно 20; столбцы ошибок, среднее $\pm$ SEM). Группа с самой высокой дозой IdeS 0,24 мг/кг массы тела соответствует примерно 6 мг/л IdeS in vitro, 0,12 мг/кг массы тела соответствует 3 мг/л, 0,04 мг/кг массы тела соответствует 1 мг/л, а 0,01 мг/кг массы тела соответствует 0,2 мг/л IdeS in vitro. Результаты представлены в виде процента оставшегося IgG на оси y по сравнению с исходным значением для каждого объекта. Доза IdeS в мг/л находится на оси x.

Фиг. 7 - антигенспецифическая фармакодинамика. Образцы человеческой сыворотки из группы, получавшей 0,24 мг/кг массы тела (n равно 4), направляли на анализ на наличие IgG против смеси антигенов (дифтерия, коклюш, столбняк, полиомиелит и инфекция Haemophilus influenza типа b). Результаты представлены в виде процента оставшегося IgG на оси y по сравнению с исходным значением для каждого субъекта. Для того чтобы иметь возможность следить как за ранней быстрой деградацией, так и за восстановлением IgG, ось x разделяли на две части. Первая часть показывает время в часах (0-24 ч), а вторая показывает время в днях (7-64 дня).

Фиг. 8 - сыворотка от субъектов, которым вводили IdeS, показала нарушенную способность к фагоцитозу. Способность к опсонизации IgG в человеческой сыворотке измеряли как процент эффекторных клеток по меньшей мере с одной поглощенной флуоресцентной гранулой. А) до и через 24 ч после введения IdeS в дозе 0,24 мг/кг массы тела по сравнению с субъектами, получавшими плацебо. Уровень фагоцитоза перед введением дозы для каждого индивидуума был принят за 100%, а фоном было спонтанное поглощение гранул в отсутствие сыворотки, n равно 4 в группе с IdeS, и n равно 2 в группе с плацебо; В) кинетика фагоцитарного потенциала в сыворотке показана для одного репрезентативного субъекта в группе, получавшей 0,24 мг/кг массы тела, в различные временные точки (до введения дозы, через 2, 6, 24, 48 ч, 4, 7 и 14 дней). Спонтанное поглощение гранул в отсутствие IgG показано в виде незаштрихованного прямоугольника. Р-значение рассчитывали с помощью критерия Манна-Уитни, *** = Р менее 0,01.

Фиг. 9 - антитела против IdeS исследовали до и в ходе всего исследования. Образцы человеческой сыворотки анализировали с использованием IdeS-специфического анализа CAP-FEIA (ImmunoCAP) (Thermo Fisher Scientific) на инструменте Phadia® 250. Отсечка (LLOQ) для IgG составляла 2 мг/л. А) образцы от 130 людей-доноров (референс) сравнивали с образцами от 78 здоровых мужчин, подвергшихся скринингу в этом исследовании (скрининг). Выделенные линии показывают медиану для референсной группы (6,1 мг/л) и скрининговой группы (10,6 мг/л); В) кинетика уровней IgG против IdeS показана как среднее значение для групп, получавших 0,12 и 0,24 мг/кг (n равно 8; столбцы ошибки, среднее значение $\pm$ SEM). Никакого увеличения IgG против IdeS не наблюдалось ни у одного из субъектов до 14-го дня; С) уровни IgG против IdeS показаны для отдельных групп на 14-й день, и D) на 182-й день. Линии показывают медианный уровень для каждой группы. Р-значения рассчитывали с использованием критерия Крус-

скала-Уоллиса, одностороннего ANOVA и множественного сравнения с критерием Данна: $*=P<0,05$ и $**=P<0,02$.

Фиг. 10 - эффективность IdeS в сыворотке от двадцати проанализированных доноров (здоровые добровольцы и пациенты с 5 стадией CKD). Оставшийся IgG после обработки человеческих сывороток различными концентрациями IdeS определяли с помощью ELISA (ИФА). На фигуре показаны сигмоидальные кривые "доза-ответ" для отдельных человеческих сывороток, где оставшийся IgG нанесен на график в мг/мл в виде функции от дозы IdeS (г/л). Рассчитанные MABEL (от англ. Minimal Anticipated Biological Effect Level - доза, оказывающая минимальное ожидаемое биологическое действие) (0,0031 г/л) и MED (от англ. Minimum Effective Dose - минимальная действующая доза) (0,025 г/л) указаны на графиках (темно-синяя линия). Выбранные сыворотки от пациентов P02, P04, P07, P08 и P09 выделены различными цветами.

Фиг. 11 - эффективность IdeS на IgG против HLA в сыворотке от сенсibilизированного пациента № P02. График показывает MFI (от англ. Mean fluorescent intensity - средняя интенсивность флуоресценции) (необработанное значение) против отдельных антигенов для (верхний график) MHC класса I (A, B и C) и (нижний график) MHC класса II (DP, DQ и DR) после обработки имитационным контролем (синий) и IdeS (красный). MFI: средняя интенсивность флуоресценции.

Фиг. 12, 13, 14, 15 - эквивалент фиг. 11 для сенсibilизированных пациентов P04, P07, P08 и P09 соответственно.

Фиг. 16 - спленоциты Balb/c (гейт P1) окрашивали сывороткой (10 мкл необработанных DTT) от субъектов 503 и 504, собранные перед введением дозы (черный), через 24 ч после введения дозы (красный), через 48 ч после введения дозы (зеленый) и через 96 ч после введения дозы (синий) IdeS или плацебо. Связывание обнаруживали с помощью вторичного реагента против человеческого Fc γ . Для IdeS график перед введением дозы находится справа от всех трех графиков после введения дозы. Таким образом, происходит уменьшение способности сыворотки связываться с мышиными спленоцитами через 24 ч, и этот эффект сохраняется через 96 ч.

Фиг. 17 - ксеногенная перекрестная реакция между сывороткой от здорового субъекта (504), получившего IdeS в дозе 0,24 мг/кг массы тела, и клетками селезенки от мыши Balb/c. Образцы сыворотки собирали перед введением дозы и в указанные моменты времени после введения дозы. Сыворотки обрабатывали DTT, чтобы инактивировать IgM. Наложение фотографий лунок планшета Terasaki, показывающих живые клетки (зеленые/яркие) и мертвые клетки (красные/тусклые). Клетки селезенки, обработанные только PBS (от англ. phosphate-buffer saline - фосфатно-солевой буфер) (без сыворотки), использовали в качестве контроля спонтанной клеточной гибели.

Фиг. 18 показывает сравнение двух способов измерения уровней IgG (турбидиметрия и PD-ELISA) в сыворотке крови от субъекта (№ 101), получившего IdeS. Сыворотку собирали в различные моменты времени после введения дозы IdeS и измеряли, используя стандартный больничный турбидиметрический тест p-IgG, а также используя анализ PD-ELISA, разработанный авторами данного изобретения для различения интактного IgG и F(ab') $_2$ -фрагментов, образующихся при IdeS-расщеплении IgG. ULN - верхний предел нормальности, LLN - нижний предел нормальности для IgG у здоровых людей.

Фиг. 19 показывает, что IdeS расщепляет IgG-тип, но не IgM-тип BCR (от англ. B cell receptor - В-клеточный рецептор) на В-клетках. А - анализ путем проточной цитометрии анти-Fab-сигнала на клетках, экспрессирующих IgG-тип (Nu-DUL-1) и IgM-тип (Daudi) BCR, после обработки указанными количествами IdeS. Ось у показывает среднюю интенсивность флуоресценции в FL4. В - анализ путем проточной цитометрии анти-Fab и анти-Fc на поверхности клеток Nu-DUL-1 после обработки различными количествами IdeS.

Фиг. 20 показывает, что IdeS расщепляет IgG-тип BCR с такой же эффективностью, как и растворимый IgG. А - гепаринизированную периферическую кровь обрабатывали PBS или различными количествами IdeS. После инкубационного периода плазму выделяли и разделяли на геле SDS-PAGE. Интактный IgG, scIgG и F(ab') $_2$ -фрагменты показаны справа. В - PBMC, выделенные из той же крови, обработанной PBS или IdeS, дважды окрашивали на CD19 $^+$ и на анти-Fc или анти-Fab.

Фиг. 21 показывает, что IdeS расщепляет поверхностный IgG на В-клетках памяти. А - отрицательная селекция В-клеток с использованием RosetteSep привела к получению более 90% CD19 $^+$ -клеток. В - F(ab') $_2$ -часть поверхностного IgG с CD19 $^+$ /CD27 $^+$ -клеток эффективно расщепляется под влиянием IdeS. Количество клеточно-мембранных заякоренных Fc-эпитопов не меняется после обработки IdeS.

Фиг. 22 показывает восстановление клеток после обработки IdeS. А - анализ путем проточной цитометрии анти-Fab на поверхности клеток Nu-DUL-1 после обработки различными количествами IdeS. IdeS удаляли и клетки культивировали и анализировали через 1 ч и через 24 ч. В - клетки Nu-DUL-1 обрабатывали различными количествами IdeS или антипролиферативными контрольными веществами (цитохалазином D и пурамицином) и культивировали в течение 24 ч с последующим временем импульса BrdU 6 ч. С - клетки Nu-DUL-1 обрабатывали PBS или 30 мкг/мл IdeS в течение 24 ч с последующим анализом жизнеспособности на основе внутриклеточной гидрогеназной активности (ССК-8) в виде считывания.

Фиг. 23 показывает восстановление экспрессии IgG-типа BCR на ex vivo IdeS-обработанных PBMC.

А - анализ путем проточной цитометрии анти-Fab-сигнала на CD19⁺-клетках сразу после обработки PBS или IdeS (30 мкг/мл) и через 16 ч культивирования без IdeS. Дважды положительные клетки обнаружены в R2. В - анализ путем проточной цитометрии анти-Fc-сигнала на CD19⁺-клетках сразу после обработки PBS или IdeS (30 мкг/мл) и через 16 ч культивирования. Дважды положительные клетки обнаружены в R2 и выражены в процентах клеток в гейте P3.

Фиг. 24 показывает восстановление IgG-типа BCR на обогащенных В-клетках (RosetteSep, более 90% CD19⁺-клеток). А - анализ путем проточной цитометрии анти-Fab-сигнала на обогащенных В-клетках сразу после обработки PBS или IdeS (30 мкг/мл) и в указанные моменты времени после обработки. В - анализ путем проточной цитометрии анти-Fc-сигнала на обогащенных В-клетках сразу после обработки PBS или IdeS (30 мкг/мл) и в различные моменты времени после обработки.

Фиг. 25 показывает, что IdeS не влияет на жизнеспособность В-клеток. Обогащенные с помощью RosetteSep В-клетки, содержащие более 90% CD19⁺-клеток, содержали в культуре в течение нескольких дней после обработки PBS или IdeS (30 мкг/мл), и измеряли их жизнеспособность с помощью колориметрического анализа ССК-8.

Фиг. 26 показывает, что обработка IdeS ингибирует передачу сигналов (сигналинг) BCR. Клетки Nu-DUL-1 обрабатывали PBS или IdeS (30 мкг/мл) до сшивания с помощью F(ab')₂-специфического анти-тела. А - фосфорилирование ERK1/2 исследовали в различные моменты времени после стимуляции с помощью фосфоспецифического антитела путем проточной цитометрии. В - фосфорилирование PLC-γ2 исследовали в различные моменты времени после стимуляции с помощью фосфоспецифического анти-тела путем проточной цитометрии.

Фиг. 27 показывает, что IdeS специфически блокирует В-клеточное созревание IgG-продуцирующих клеток. PBMC обрабатывали IdeS и стимулировали рекомбинантным IL2 и R848 для активации В-клеток памяти и для их дифференцировки в Ig-продуцирующие клетки. Фильтровальные планшеты ELISPOT оценивали на количество IgG-продуцирующих клеток. А - в фильтровальный планшет засевали 50000 или 100000 клеток и обрабатывали их (или не обрабатывали) IdeS и rIL2/R848 в день 0. В одном случае IdeS добавляли на 3-й день стимуляции посредством R848 и IL2. В - число клеток, продуцирующих IgA, IgM и IgG, после стимуляции посредством rIL2/R848 в присутствии или в отсутствие IdeS в концентрации 30 мкг/мл в течение 96 ч. С - число IgG-продуцирующих клеток после стимуляции посредством rIL2/R848 в присутствии или в отсутствие IdeS в концентрации 0,3-30 мкг/мл в течение 72 ч. D - число IgG-продуцирующих клеток после предварительной обработки клеток в течение одного часа посредством IdeS в концентрации 0,3-30 мкг/мл с последующим удалением IdeS и стимуляцией клеток посредством rIL2/R848 в течение 72 ч.

Фиг. 28 показывает анализ путем проточной цитометрии CD19⁺/IgG⁺-клеток в различные моменты времени у здорового человека после однократного внутривенного введения IdeS в дозе 0,24 мг/кг массы тела. Выделенные PBMC гейтировали с использованием прямого светорассеяния (P1), и В-клетки (CD19⁺) контролировали как M1 в P1. Верхняя панель показывает дважды положительные клетки на CD19 (FL2) и Fc-часть IgG (FL4) перед введением дозы и в течение периода до 96 ч после введения дозы. Нижняя панель показывает дважды положительные клетки на CD19 (FL2) и Fab-часть IgG (FL4) перед введением дозы и в течение периода до 96 ч после введения дозы.

Фиг. 29 показывает, что IdeS расщепляет IgG-тип BCR in vivo у людей. Здоровым людям вводили IdeS в дозе 0,24 мг/кг массы тела и собирали PBMC в разные моменты времени после введения дозы. Процент дважды положительных клеток на CD19 и F(ab')₂ анализировали путем проточной цитометрии. Часы после введения дозы показаны на оси x, а значение "MFI × частота клеток" показано на оси y.

Фиг. 30 показывает жизнеспособность В-клеток после сшивания антитела с IdeS-обработанными клетками (наверху) и PBS-обработанными клетками (внизу) в течение периода анализа длительностью 48 ч.

Описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 показывает аминокислотную последовательность зрелого иммуноглобулин G-разрушающего фермента от *S. pyogenes* (IdeS). Этот белок иногда называют MAC1. Полная последовательность MAC1, включая сигнал секреции, доступна в GenBank под номером WP_010922160.1.

SEQ ID NO: 2 показывает аминокислотную последовательность зрелой эндогликозидазы S (EndoS). Полная последовательность, включая сигнал секреции, доступна в GenBank под номером AAK00850.1.

SEQ ID NO: 3 показывает аминокислотную последовательность зрелого MAC2, варианта IdeS. Полная последовательность MAC 2, включая сигнал секреции, доступна в GenBank под номером AFC67907.1.

Подробное описание изобретения

Следует понимать, что различные применения описанного способа могут быть адаптированы к конкретным потребностям в данной области. Кроме того, следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, нужна только для описания конкретных воплощений изобретения и не предназначена для ограничения изобретения.

Кроме того, используемые в данном описании и прилагаемой формуле изобретения понятия в единственном числе включают множественное число, если содержание явно не указывает на иное. Таким об-

разом, например, ссылка на "легкое" включает "легкие", ссылка на "антиген" включает два или более двух таких антигенов, ссылка на "субъект" включает двух или более двух таких субъектов и т.п.

Термины "пациент" и "субъект" используются как взаимозаменяемые и, как правило, относятся к человеку.

Используемый в данном документе термин "агент, который уменьшает Fc-рецепторное связывание с молекулами сывороточного IgG" применяется для обозначения агента, который достигает этого эффекта с помощью любого подходящего механизма. Как известно, различные агенты снижают Fc-рецепторное взаимодействие молекул IgG. Эти агенты часто являются белками бактериального происхождения и могут действовать различными путями.

Например, такой белок может представлять собой IgG-цистеинпротеазу, которая расщепляет IgG таким образом, что антигенсвязывающие домены и Fc-взаимодействующие домены отделяются друг от друга. В таких случаях Fc-рецепторное взаимодействие сывороточных молекул IgG уменьшается, так как количество интактных молекул IgG в сыворотке снижается.

Используемый в данном документе термин "молекула сывороточного IgG" относится к любой молекуле γ -иммуноглобулина (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), которая присутствует в тканях человека перед выполнением способа согласно данному изобретению. Такие молекулы IgG могут продуцироваться эндогенно из В-клеток индивидуума или могут быть экзогенными γ -иммуноглобулинами, которые вводили пациенту до выполнения способа согласно данному изобретению.

Используемый в данном документе термин "Fc-рецептор" относится к Fc-рецепторам γ -иммуноглобулина (Fc γ R), которые присутствуют на клетках. У людей Fc γ R относится к одному, некоторым или всем представителям семейства рецепторов, включающего Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIA (CD16a) и Fc γ RIIB (CD16b). Используемый в данном документе термин "Fc γ R" включает встречающиеся в природе полиморфизмы Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIA (CD32A), Fc γ RIIB (CD32B), Fc γ RIIA (CD16a) и Fc γ RIIB (CD16b).

Все публикации, патенты и заявки на патенты, цитируемые в данном документе выше или ниже, включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Способы увеличения преимуществ терапии

Данное изобретение относится к способу увеличения преимуществ терапии для субъекта, который включает: (a) введение субъекту белка, обладающего активностью IgG-цистеинпротеазы, который представляет собой IdeS; и (b) последующее проведение указанной терапии у субъекта, где

указанная терапия представляет собой трансплантацию органа; количество вводимого указанного белка является достаточным для того, чтобы устранить Fc-рецепторное связывание, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке крови субъекта; а также

этапы (a) и (b) разделены временным интервалом, который является достаточным для устранения Fc-рецепторного связывания, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке крови субъекта, и составляет от 1 до не более 6 ч;

где, кроме того, количество вводимого IdeS находится в диапазоне от 0,01 до 1 мг/кг массы тела, и где субъектом является человек.

Сроки и порядок этапов (a) и (b).

Этап (a) проводят перед этапом (b), а этапы (a) и (b) разделены временным интервалом, достаточным для устранения Fc-рецепторного связывания всеми или, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке субъекта. Под термином "по существу, все" обычно понимается, что Fc-рецепторное связывание сывороточными IgG снижается до уровня менее 5% от того уровня, который имел место перед этапом (a). Например, если агент, вводимый на (a), представляет собой протеазу (например, IdeS), то интервал будет представлять собой время, необходимое для того, чтобы агент расщепил по меньшей мере 95% сывороточного IgG у субъекта, измеренного с помощью любого подходящего анализа. Указанный интервал, как правило, может составлять не менее 30 мин и не более 21 дня.

Нижний предел временного интервала между этапами (a) и (b) определяется временем, которое требуется для того, чтобы агент, вводимый на этапе (a), устранил Fc-рецепторное связывание, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке субъекта. Это можно определить путем анализа образца сыворотки, взятого у индивидуума, с применением любого подходящего анализа. Некоторые иллюстративные подходящие анализы описаны в примерах.

Такой анализ может непосредственно проверить наличие молекул IgG в образце сыворотки, которые способны связываться с одним или более чем одним Fc-рецептором, например, в ELISA. В качестве альтернативы такой анализ может быть косвенным, при этом он может проверить наличие одного или более чем одного продукта реакции, который, как ожидается, образуется в результате воздействия на IgG агента, вводимого на этапе (a). Например, когда агент представляет собой фермент, который расщепляет белок IgG, образец сыворотки можно проанализировать на наличие интактных молекул IgG или фрагментов, которые образуются в результате расщепления. Это можно осуществить любым подходящим способом, например путем разделения молекул и фрагментов на основании их молекулярной массы, например, путем масс-спектрометрии или SDS-PAGE, или путем специфического обнаружения молекул

или фрагментов, например путем ELISA. В качестве альтернативы IgG можно обнаружить путем смешивания сыворотки от субъекта с клетками, экспрессирующими FcγR, и мониторинга связывания IgG путем проточной цитометрии с использованием противочеловеческого IgG, конъюгированного с флуорохромом.

Традиционные способы оценки количества IgG в образце, таком как образец сыворотки, в клинических условиях основаны на нефелометрии и турбидиметрии из-за их скорости, простоты использования и точности. Как при нефелометрии, так и при турбидиметрии источник света проецируется через жидкий образец, находящийся в прозрачном контейнере. Турбидиметрия измеряет уменьшение интенсивности света, а нефелометрия измеряет рассеяние света при его прохождении через образец, которое пропорционально концентрации иммуноглобулина в растворе. Оба принципа основаны на добавлении антител против IgG, которые вступают в реакцию с антигеном в образце с формированием комплекса антиген/антитело (агглютинация). Добавление ПЭГ позволяет реакции быстро прогрессировать до конечной точки, повышает чувствительность, а также снижает риск получения ложно отрицательных результатов с образцами, содержащими избыток антигена. В случае IgG-анализа F(ab')₂-часть IgG сшиваются антителом против IgG и вызывают реакцию агглютинации. Тем не менее, такие способы могут быть неподходящими, если некоторые или все присутствующие IgG могут не быть интактными. Например, если IgG-цистеинпротеаза (например, IdeS) была введена субъекту, от которого взят образец, например, в способе согласно данному изобретению, или если такая протеаза была введена в образец, то будут присутствовать фрагменты расщепления, такие как F(ab')₂- и Fc-фрагменты. Это не влияет на реакцию агглютинации в традиционных способах нефелометрии и турбидиметрии до тех пор, пока F(ab')₂-фрагменты все еще присутствуют в образце. Из-за более короткого периода полужизни F(ab')₂-фрагментов по сравнению с интактным IgG агглютинация будет уменьшаться с течением времени, хотя не пропорционально количеству интактного IgG, присутствующего в образце. Таким образом, образцы, затронутые присутствием IgG-цистеинпротеазы (например, IdeS), нельзя оценить с помощью традиционных способов. Авторы данного изобретения разработали новый способ количественной оценки концентрации IgG, который совместим с образцами, затронутыми присутствием IgG-цистеинпротеазы (такой как IdeS), и может быть использован в любых клинических условиях, в том числе (но не ограничиваясь этим) может быть использован в сочетании с другими способами согласно данному изобретению.

Указанный способ позволяет различать интактный IgG и IdeS-образованные F(ab')₂-фрагменты. Это было достигнуто путем использования антител, которые обнаруживают различные фрагменты, т.е. антител против Fab и антител против Fc. Антитела, используемые в данном анализе, не должны быть субстратом для IgG-цистеинпротеазы, действующей на образец (как правило, IdeS). Это позволяет избежать воздействия любой активной протеазы, которая может присутствовать в образце, на реагенты для анализа. Это может быть достигнуто путем анализа IgG от различных видов или с использованием фрагментов антител (т.е. Fab-фрагментов или F(ab')₂-фрагментов) вместо целых антител. Как правило, анти-F(ab')₂-агент инкубируют с образцом в качестве реагента захвата. Реагент захвата, как правило, иммобилизируют, например, в лунках планшета для анализа. Затем связанный IgG обнаруживают путем инкубации с анти-Fc-агентом в качестве реагента для обнаружения. Таким образом, будет обнаруживаться только IgG, которые обладают и Fab-, и Fc-частями, в отличие от способов нефелометрии и турбидиметрии. Реагент для обнаружения, как правило, может быть конъюгирован непосредственно или косвенно с группировкой для облегчения обнаружения, такой как флуоресцентная метка или фермент, который вступает в реакцию с хромогенным субстратом. Реагенты для захвата и обнаружения могут представлять собой любую другую молекулу, которая специфически распознает Fab- или Fc-часть IgG, и могут быть использованы в обратном порядке, т.е. с захватом с помощью анти-Fc и обнаружением с помощью анти-Fab. Анализ может быть проведен в любом подходящем формате, например в стандартном формате ELISA или в формате Meso Scale Discovery.

В некоторых случаях, например, когда цистеинпротеаза IgG представляет собой IdeS, образец может включать промежуточные фрагменты, такие как scIgG, в которых только одна тяжелая цепь является расщепленной, а F(ab')₂ остается прикрепленной к другой, интактной тяжелой цепи. В таких случаях фрагмент scIgG может быть неправильно идентифицирован в данном анализе как интактный IgG. Таким образом, способ может включать дополнительный этап оценки размеров фрагментов, присутствующих в образце. Так как между тяжелыми цепями ниже шарнирной области нет дисульфидных мостиков, Fc-часть тяжелой цепи во фрагменте scIgG будет отделяться от интактной тяжелой цепи в денатурирующих условиях в виде белка массой примерно 20-25 кДа. Различные размеры фрагментов можно обнаружить и количественно оценить с использованием любого подходящего способа, такого как SDS-PAGE. Конкретное воплощение способа, включая возможный дополнительный этап, описано в примере 1 (см. оценка эффективности). Этот способ является особенно полезным для оценки эффективности IdeS в клинических условиях.

Нижний предел временного интервала между этапами (a) и (b) может быть выбран среди следующих значений: по меньшей мере 1 ч, по меньшей мере 2 ч, по меньшей мере 3 ч, по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 5 ч или по меньшей мере 6 ч. Нижний предел может быть короче, чем любой из перечисленных выше, если будет установлено, что Fc-рецепторное связывание, по существу, всеми молекулами

IgG, присутствующими в сыворотке субъекта, было устранено за более короткий период времени.

Верхний предел временного интервала между этапами (a) и (b) может быть выбран независимо от нижнего предела и может быть определен временем, которое требуется для эндогенной продукции IgG, чтобы начать заменять или полностью заменить молекулы IgG, присутствовавшие в сыворотке субъекта до осуществления указанного способа. Это можно определить путем анализа образца сыворотки, взятого у индивидуума, с применением любого подходящего анализа, такого как описан выше для определения нижнего предела. Вновь синтезированный IgG, как правило, начинает появляться в сыворотке в течение 3-4 дней, а полная замена завершается примерно в течение 3 недель (21 дня).

Верхний предел временного интервала между этапами (a) и (b) может быть выбран независимо от нижнего предела и может быть выбран среди следующих значений: не более 6 ч, не более 5 ч, не более 4 ч, не более 3 ч, не более 2 ч или не более 1 ч.

Предпочтительно временной интервал между этапами (a) и (b) составляет от 1 до 2 ч, от 1 до 3 ч, от 1 до 4 ч, от 1 до 5 ч, от 1 до 6 ч, от 2 до 3 ч, от 2 до 4 ч, от 2 до 5 ч, от 2 до 6 ч, от 3 до 4 ч, от 3 до 5 ч, от 3 до 6 ч, от 4 до 5 ч, от 4 до 6 ч или от 5 до 6 ч.

Этап (a).

На этапе (a) субъекту вводят эффективное количество агента, который уменьшает Fc-рецепторное связывание сывороточных молекул IgG у субъекта. Под термином "эффективное количество" подразумевается, что количество агента является достаточным для устранения Fc-рецепторного связывания, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке субъекта.

Агент.

Агент, как правило, представляет собой белок, как правило, бактериального происхождения. Данный агент может быть белком, который обладает активностью IgG-цистеинпротеазы, предпочтительно расщепляющим молекулу иммуноглобулина в шарнирной области. Примером такого белка является IdeS (Immunoglobulin G-degrading enzyme of *S. pyogenes*, иммуноглобулин G-разрушающий фермент от *S. pyogenes*). IdeS представляет собой стрептококковую протеазу с уникальной степенью специфичности; он расщепляет антитела иммуноглобулины G (IgG), но не расщепляет никакие другие субстраты (включая IgA, IgD, IgE и IgM). IdeS расщепляет человеческий IgG в F(ab')₂- и Fc-фрагментах в определенном сайте с COOH-конца от шарнирной области (см. фиг. 1). Зрелая последовательность IdeS приведена как SEQ ID NO: 1. Данный агент может представлять собой белок, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, либо может быть его гомологом из альтернативной бактерии.

В качестве альтернативы данный агент может представлять собой вариант белка IdeS, который содержит или состоит из любой аминокислотной последовательности, которая обладает по меньшей мере 80, 85, 90 или 95% идентичностью с SEQ ID NO: 1 и обладает активностью IgG-цистеинпротеазы. Предпочтительным вариантом является белок MAC2, полная последовательность которого доступна в GenBank под номером AFC67907.1. Последовательность MAC2 без сигнальной последовательности приведена как SEQ ID NO: 3. Данный агент может представлять собой белок, содержащий или состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, либо может быть его гомологом из альтернативной бактерии.

Вариант белка IdeS может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, в которой было сделано до 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 или более аминокислотных замен, вставок или делеций относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, при условии, что указанный вариант обладает активностью IgG-цистеинпротеазы. Указанные аминокислотные замены предпочтительно являются консервативными. Консервативные замены заменяют аминокислоты другими аминокислотами с похожей химической структурой, похожими химическими свойствами или похожим объемом боковой цепи. Вводимые аминокислоты могут иметь полярность, гидрофильность, гидрофобность, основность, кислотность, нейтральность или заряд, аналогичные таковым у аминокислот, которые они заменяют. В качестве альтернативы консервативная замена может ввести другую аминокислоту, которая является ароматической или алифатической, на место ранее существовавшей ароматической или алифатической аминокислоты. Консервативные аминокислотные замены хорошо известны в данной области и могут быть выбраны в соответствии со свойствами 20 основных аминокислот, приведенных в табл. 1 ниже. Варианты, в которых аминокислоты имеют одинаковую полярность, можно определить по ссылке на шкалу гидрофобности для боковых цепей аминокислот в табл. 2.

Таблица 1

Химические свойства аминокислот

Ala	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Met	гидрофобная, нейтральная
Cys	полярная, гидрофобная, нейтральная	Asn	полярная, гидрофильная, нейтральная
Asp	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Pro	гидрофобная, нейтральная
Glu	полярная, гидрофильная, заряженная (-)	Gln	полярная, гидрофильная, нейтральная
Phe	ароматическая, гидрофобная, нейтральная	Arg	полярная, гидрофильная, заряженная (+)
Gly	алифатическая, нейтральная	Ser	полярная, гидрофильная, нейтральная
His	ароматическая, полярная, гидрофильная, заряженная (+)	Thr	полярная, гидрофильная, нейтральная
Ile	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Val	алифатическая, гидрофобная, нейтральная
Lys	полярная, гидрофильная, заряженная(+)	Trp	ароматическая, гидрофобная, нейтральная
Leu	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Tyr	ароматическая, полярная, гидрофобная

Таблица 2

Шкала гидрофобности

Боковая цепь	Гидрофобность
Ile	4,5
Val	4,2
Leu	3,8
Phe	2,8
Cys	2,5
Met	1,9
Ala	1,8
Gly	-0,4
Thr	-0,7
Ser	-0,8
Trp	-0,9
Tyr	-1,3
Pro	-1,6
His	-3,2
Glu	-3,5
Gln	-3,5
Asp	-3,5
Asn	-3,5
Lys	-3,9
Arg	-4,5

В качестве альтернативы данный агент может быть белком, который содержит или состоит из фрагмента SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3 и обладает активностью IgG-цистеинпротеазы, предпочтительно, где указанный фрагмент содержит от 100 до 300, от 150 до 300 или от 200 до 300 аминокислот в длину. Фрагмент может быть создан путем делеции одного или более чем одного аминокислотного остатка в аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 3. До 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30,

40 или 50 или более остатков могут быть удалены. Удаленные остатки могут быть смежными друг с другом.

Введение и дозы.

На этапе (а) указанный агент предпочтительно вводится путем внутривенного вливания, но может быть введен любым подходящим способом, включая, например, внутрикожный, подкожный, чрескожный, внутримышечный, внутриартериальный, внутрибрюшинный, внутрисуставной, внутрикостный или другие подходящие пути введения. Количество указанного агента, которое вводят, может находиться в пределах от 0,01 до 1 мг/кг массы тела, от 0,04 до 1 мг/кг массы тела, от 0,12 до 1 мг/кг массы тела, предпочтительно от 0,24 до 1 мг/кг массы тела и наиболее предпочтительно в пределах 1 мг/кг массы тела. Указанный агент может присутствовать, по существу, в выделенной форме. Он может быть смешан с носителями или разбавителями (как описано ниже), которые не будут мешать предполагаемому применению, и по-прежнему сможет рассматриваться как, по существу, выделенный. Он также может находиться, по существу, в очищенной форме, и в этом случае он, как правило, содержит по меньшей мере 90%, например по меньшей мере 95, 98 или 99% белка в препарате.

Составы и композиции.

Указанный агент предпочтительно вводят вместе с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем и, возможно, одним или более чем одним другим терапевтическим ингредиентом. Носитель (носители) должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и безвредности по отношению к его реципиенту. Как правило, носители для инъекций и конечный состав являются стерильными и апирогенными.

Состав подходящей композиции может быть получен с использованием стандартных фармацевтических химических компонентов и методик, которые легко доступны квалифицированному специалисту. Например, агент может быть объединен с одним или более чем одним фармацевтически приемлемым эксципиентом или носителем. В эксципиенте или носителе могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие агенты, pH-буферные вещества и т.п. Эти эксципиенты, носители и вспомогательные вещества, как правило, представляют собой фармацевтические агенты, которые не индуцируют иммунный ответ у индивидуума, получающего композицию, и которые могут быть введены без чрезмерной токсичности. Фармацевтически приемлемые эксципиенты включают, но не ограничиваясь ими, жидкости, такие как воду, физиологический раствор, полиэтиленгликоль, гиалуроновую кислоту, глицерин, тиоглицерин и этанол. В данное изобретение также могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и т.п.; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и т.п. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых эксципиентов, носителей и вспомогательных веществ доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Такие композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, подходящей для болюсного введения или для непрерывного введения. Инъекционные композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в единичной дозированной форме, например в ампулах или в многодозовых контейнерах, содержащих консервант. Композиции включают, но не ограничиваясь ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые с замедленным высвобождением или биоразлагаемые составы. Такие композиции дополнительно могут содержать один или более чем один дополнительный ингредиент, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном из воплощений композиции для парентерального введения активный ингредиент находится в сухом виде (например, в виде порошка или гранул) для восстановления с помощью подходящего носителя (например, стерильной апирогенной воды) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде стерильной инъекционной водной или масляной суспензии или раствора. Эта суспензия или раствор могут быть приготовлены в соответствии с известными в данной области методиками и могут включать в дополнение к активному ингредиенту дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты, описанные в данном документе. Такие стерильные инъекционные составы могут быть приготовлены с использованием нетоксичного разбавителя или растворителя, приемлемого для парентерального введения, например, такого как вода или 1,3-бутандиол. Другие приемлемые разбавители и растворители включают, но не ограничиваясь этим, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды.

Другие приемлемые для парентерального введения композиции, которые могут быть использованы, включают такие композиции, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме, в липосомальном препарате или в качестве компонента биоразлагаемых полимерных систем. Композиции для замедленного высвобождения или имплантации могут включать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы, такие как эмульсии, ионообменные смолы, труднорастворимый полимер или умеренно растворимая соль.

Этап (b).

На этапе (b) субъекту проводят терапию. Терапию, как правило, осуществляют или вводят точно

таким же образом, как это было бы сделано, если бы вначале не проводился этап (а).

Терапия.

В другом воплощении терапия представляет собой трансплантацию органа. Орган может быть выбран среди почки, печени, сердца, поджелудочной железы, легкого или тонкого кишечника.

Субъект, подвергаемый лечению, предпочтительно может быть сенсibilизирован или сильно сенсibilизирован. Под термином "сенсibilизированный" подразумевается, что у субъекта выработались антитела к человеческим антигенам гистосовместимости (major histocompatibility, МНС) (также упоминаемым как антигены лейкоцитов человека (human leukocyte antigens, HLA)). Антитела против HLA происходят из аллогенно сенсibilизированных В-клеток и, как правило, присутствуют у пациентов, которые ранее были сенсibilизированы при переливании крови, предыдущей трансплантации или беременности (Jordan et al., 2003).

Является ли потенциальный реципиент трансплантата сенсibilизированным, можно определить любым подходящим способом. Например, можно использовать тест Panel Reactive Antibody (PRA), чтобы определить, является ли реципиент сенсibilизированным. Значение PRA более 30%, как правило, следует понимать как тот факт, что пациент имеет "высокий иммунологический риск" или является "сенсibilизированным". В качестве альтернативы может быть проведен перекрестный тест, в котором образец крови потенциального донора трансплантата смешивают с образцом от предполагаемого реципиента. Положительная перекрестная реакция означает, что реципиент имеет антитела, которые вступают в реакцию с образцом донора, что указывает на то, что реципиент сенсibilизирован, и трансплантацию проводить нельзя. Перекрестные тесты, как правило, проводят в качестве окончательной проверки непосредственно перед трансплантацией.

Наличие высоких титров антител против антигенов МНС потенциального донора (т.е. донор-специфических антител (donor specific antibodies, DSA)) является прямым противопоказанием к трансплантации из-за риска острого отторжения, опосредованного антителами. Вкратце, сенсibilизация к донорским антигенам МНС затрудняет выявление подходящего донора. Положительный перекрестный тест является однозначным препятствием для трансплантации. Поскольку примерно одна треть пациентов, ожидающих трансплантации почки, являются сенсibilизированными, при этом 15% из них являются высокосенсibilизированными, это приводит к накоплению пациентов, ожидающих трансплантации. В США среднее время в листе ожидания трансплантации почки в 2001-2002 гг. составляло 1329 дней для пациентов с оценкой по Panel Reactive Antibody (PRA) 0-9%, 1920 дней для пациентов с оценкой PRA 10-79%, и 3649 дней для пациентов с оценкой PRA 80% или более (база данных OPTN, 2011).

Одной из принятых стратегий для преодоления барьера DSA является применение плазмафереза или иммуноадсорбции, часто в сочетании, например, с внутривенным введением γ -глобулина (IVIg) или ритуксимаба, чтобы снизить уровни DSA до уровня, при котором трансплантацию можно проводить (Jordan et al., 2004; Montgomery et al., 2000; Vo et al., 2008a; Vo et al., 2008b). Тем не менее, плазмаферез, иммуноадсорбция и введение IVIg имеют недостаток, заключающийся в неэффективности и необходимости строгого планирования, поскольку они включают повторное лечение в течение длительного периода времени. Когда орган от умершего донора будет доступен, он должен быть пересажен в течение нескольких часов, так как длительная гипотермическая ишемия является одним из наиболее важных факторов риска отсроченной функции трансплантата и потери трансплантата при трансплантации почек (Ojo et al., 1997).

Напротив, способ согласно данному изобретению делает возможным быстрое, временное и безопасное удаление DSA у потенциального реципиента трансплантата.

Введение агента непосредственно перед трансплантацией способно эффективно десенсibilизировать высокосенсibilизированного пациента, тем самым позволяя провести трансплантацию и избежать острого отторжения, опосредуемого антителами. Одна доза агента перед трансплантацией позволит провести трансплантацию тысячам пациентов с донор-специфическими антителами IgG.

Указанный способ альтернативно может быть описан как способ лечения органной недостаточности у субъекта, причем указанный способ включает (а) введение субъекту агента, который снижает Fc-рецепторное связывание сывороточных молекул IgG у субъекта; и (b) последующую трансплантацию органа у субъекта; где

количество вводимого указанного агента является достаточным для того, чтобы устранить Fc-рецепторное связывание, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке субъекта; и

этапы (а) и (b) разделены временным интервалом продолжительностью не менее 2 ч и не более 21 дня.

Это может быть описано как способ профилактики отторжения пересаженного органа у субъекта, в частности острого отторжения трансплантата, опосредованного антителами, причем указанный способ включает (в период не менее чем за 2 ч и не более чем за 21 день до трансплантации органа) введение субъекту агента, который уменьшает Fc-рецепторное связывание сывороточных молекул IgG у субъекта, где количество вводимого указанного агента является достаточным для того, чтобы устранить Fc-рецепторное связывание, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке субъекта.

Следует принять во внимание, что введение агента и последующая трансплантация разделены временным интервалом, который эквивалентен временному интервалу между этапами (а) и (b) в альтернативных формулировках способа, представленных выше. Таким образом, различные верхние и нижние пределы временного интервала между этапами (а) и (b), описанные выше, в равной степени применимы к этому временному интервалу. В этом воплощении особенно предпочтительно, что интервал времени является достаточно коротким, что позволяет осуществлять указанный способ в течение одного посещения больницы. Таким образом, предпочтительные интервалы составляют от 1 до 6 ч или от 1 до 12 ч.

В этом воплощении способ согласно данному изобретению может дополнительно включать этап, проводимый во время или непосредственно перед трансплантацией, который включает индукцию супрессии Т-клеток и/или В-клеток у пациента. Указанная индукция супрессии обычно может включать введение эффективного количества агента, который убивает или ингибирует Т-клетки, и/или введение эффективного количества агента, который убивает или ингибирует В-клетки. Агенты, которые убивают или ингибируют Т-клетки, включают муромонаб, базиликсимаб, даклизумаб, антитело против тимоцитарного глобулина (ATG) и лимфоцитарный иммуноглобулин, препарат глобулина против тимоцитов (ATGAM). Ритуксимаб, как известно, убивает или ингибирует В-клетки.

Следующие примеры иллюстрируют данное изобретение.

Пример 1. Доклинические исследования.

GLP-совместимые доклинические исследования, разработанные для исследования токсикологии и фармакологии GMP-полученного IdeS на новозеландских белых кроликах, показали, что IdeS расщеплял полный плазменный пул IgG в течение 5 мин после введения IdeS, при этом уровень менее 1% IgG сохранялся через один день после введения. Уровень IgG достигал самого низкого значения через 24-48 ч после введения IdeS, а затем постепенно повышался в течение последующих дней. Нормальные уровни IgG восстанавливались примерно через 3 недели после введения однократной дозы IdeS. Конечные продукты, т.е. F(ab')₂- и Fc-фрагменты, имели значительно более короткие периоды полужизни по сравнению с интактным IgG, и только низкие уровни были обнаружены на следующий день после введения однократной дозы IdeS. IdeS имел быстрое распространение, показывал пропорциональную дозе фармакокинетику и многофазную элиминацию с периодом полужизни в плазме у кроликов примерно 1 ч. На основании токсикологических исследований с повторными введениями IdeS в дозе 2 мг/кг массы тела (BW) был установлен уровень отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NO: AEL). Данные не показаны.

Влияние IdeS *in vitro* и *in vivo* в экспериментах, описанных выше, было драматичным и послужило основой для дальнейшего исследования на здоровых добровольцах.

Исследования на людях.

Материалы и методы.

Дизайн исследования.

Это было двойное слепое, рандомизированное, одноцентровое испытание на здоровых субъектах мужского пола (№ EudraCT: 2012-000969-21), проводимое на первой фазе в Университетской больнице в Лунде, Швеция. Перед набором субъектов протокол был одобрен местным комитетом по этике, и все привлеченные субъекты подписывали информированное согласие перед проведением каких-либо процедур, связанных с испытанием. Основная цель заключалась в оценке безопасности и переносимости IdeS после внутривенного введения разовых возрастающих доз. Вторичные цели заключались в оценке эффективности (т.е. снижении IgG в сыворотке), фармакокинетики и иммуногенности IdeS у здоровых людей.

Разведенный инфузионный раствор GMP-произведенного IdeS (Hansa Medical AB, Швеция) получали в забуференном фосфатом изотоническом солевом растворе в аптеке больницы в инфузионном шприце с инфузионным набором, включающим фильтр с размером пор 0,2 мкм (B. Braun, Германия). Выбранная начальная доза 0,010 мг/кг массы тела была в 10 раз ниже предварительно клинически определенного минимального уровня предполагаемого биологического эффекта (MABEL) и в 200 раз ниже уровня отсутствия наблюдаемых побочных эффектов (NO: AEL), определенного в ходе токсикологического испытания на животных. Дизайн исследования позволял постепенно увеличивать дозу с интенсивным мониторингом безопасности.

Для того чтобы соответствовать критериям включения, субъекты должны были быть здоровыми в соответствии со скрининговым медицинским обследованием, находиться в возрасте 18-45 лет, иметь подходящие вены для пункции, индекс массы тела (BMI) от 19 до 30 кг/м² и массу тела 50-100 кг. Из исследования исключались субъекты, которые имели (или имели в анамнезе) любой клинически значимый иммунодефицит, включая, но не ограничиваясь им, дефицит иммуноглобулина А, которые имели во время скрининга повышенные уровни IgG к IdeS (более 15 мг/л), положительный результат на поверхностный антиген сывороточного гепатита В, антитела против гепатита С, вирус иммунодефицита человека (HIV), текущий туберкулез, текущий сифилис, активную инфекцию вирусом простого герпеса или вирусом опоясывающего герпеса.

Каждый субъект имел трехдневный срок включения в клинические испытания и был рандомизирован в группу IdeS или плацебо (забуференный фосфатом солевой раствор) и получал препарат утром по-

сле приема. Двум субъектам в каждой группе вводили дозу препарата в первый день (один субъект в группе IdeS и один субъект в группе плацебо), а последующие субъекты в группе получали дозу препарата через одну неделю. После каждой когорты Комитет по наблюдению за данными оценивал данные по безопасности и принимал решение о следующем уровне дозы. Время от последнего введения на одном уровне дозы до начала введения на следующем уровне дозы составляло по меньшей мере 14 дней. Инфузии проводили в течение 30 мин первым двум субъектам в каждой группе и в течение 15 мин последующим субъектам в этих группах. В период включения выполняли интенсивный мониторинг безопасности и серийные заборы крови для анализа безопасности, фармакокинетики, эффективности и антител против лекарственного препарата. Субъектов выписывали на 4-й день, проводили по меньшей мере восемь последующих промежуточных посещений с медицинским обследованием и взятием образцов крови до конца испытания на 64-й день.

Все субъекты, участвующие в испытании, получали антибиотики (Spektramoх, если не было гиперчувствительности к β -лактамам) в качестве профилактики бактериальных инфекций. Профилактическое лечение начинали в день введения дозы и продолжали до тех пор, пока уровни IgG в плазме не составляли более 4,5 г/л. В течение первых 28 дней после введения дозы не разрешали ни одно другое сопутствующее лечение или терапию, кроме парацетамола, если это не было предписано исследователем и не считалось необходимым для обеспечения безопасности и благополучия субъекта.

Оценка безопасности.

Побочные явления (adverse events, AE) собирали с момента включения и на протяжении всего периода исследования, включая период последующего наблюдения. Всю информацию об AE записывали, в том числе описание, время начала/завершения, степень критериев общей токсичности (согласно СТСАЕ), тяжесть, причинно-следственную связь (маловероятно, возможно или вероятно), принятые меры, прекращение терапии и исход. Жизненно важные признаки, температуру тела, частоту сердечных сокращений и артериальное давление в положении лежа на спине регулярно регистрировали в течение периода включения и при всех последующих посещениях. Кроме того, субъектов наблюдали с помощью телеметрической регистрации ЭКГ с 5 отведениями во время инфузии и в последующие 24 ч. Образцы для анализа безопасности анализировали на предмет клинической химии, гематологии, коагуляции, биомаркеров безопасности (IL-6, IL-8 и TNF- α) и IgG в плазме с использованием стандартных способов на Labmedicin Skåne, Швеция. Анализ мочи (U-глюкоза, U-гемоглобин и U-белок) проводили с использованием Multistix (Siemens, Германия).

Образцы сыворотки для оценки эффективности, фармакокинетики и антител против IdeS.

Образцы крови, предназначенные для исследования эффективности, собирали в модифицированные САТ сывороточные пробирки BD vacutainers (BD DiagNO:stics, Нью-Джерси, США), содержащие 2 мМ иодуксусную кислоту, чтобы предотвратить дальнейшее протеолитическое расщепление под влиянием IdeS. Забор крови проводили в следующие временные точки: перед введением дозы, за 1 мин до окончания инфузии (через 14 или 29 мин), через 5 мин после окончания инфузии (через 20 или 35 мин) и через 45 мин после окончания инфузии (через 1 ч или 1 ч и 15 мин). Кроме того, собирали образцы через 2, 6, 24, 48 и 72 ч после начала инфузии, а также через 7, 14, 21, 28 и 64 дня после инфузии. Образцы крови, предназначенные для фармакокинетических исследований, собирали в обычные сывороточные пробирки BD vacutainers в следующие временные точки: перед введением дозы, за 1 мин до окончания инфузии, через 5 мин после окончания инфузии, через 45 мин после окончания инфузии и через 2, 6, 24, 48, 72 и 144 ч после введения дозы. Образцы крови, предназначенные для анализа антител против IdeS, собирали в обычные сывороточные пробирки BD vacutainers в день 1 (перед введением дозы), 2 (24 ч), 3 (48 ч), 4 (72 ч), 7 (1 неделя), 14 (2 недели), 21 (3 недели), 28 (4 недели) и 64 (2 месяца). Вне протокола исследования субъектам предлагалось дополнительно сдать образцы сыворотки в день 182 (6 месяцев) и 365 (1 год). Все образцы хранили при температуре ниже -60°C до проведения анализа.

Оценка эффективности.

Расщепление и процессинг IgG под влиянием IdeS исследовали с помощью различных способов; иммуносорбентные ферментные анализы (ИФА, ELISA) использовали для определения IgG и фрагментов IgG в сыворотке крови и для исследования динамики Fab- и Fc-содержащих фрагментов. Количественные анализы не смогли полностью дифференцировать продукты расщепления IdeS, т.е. F(ab')₂, Fc и однократно расщепленный IgG (scIgG) (в котором расщеплена одна из тяжелых цепей). Анализ ELISA, измеряющий интактный IgG и scIgG, был разработан и проведен компанией Covance Ltd, Великобритания. Анализ Fab-ELISA измерял все Fab-содержащие фрагменты IgG, т.е. интактный IgG, scIgG и F(ab')₂; а анализ Fc-ELISA измерял все Fc-содержащие фрагменты, т.е. интактный IgG, scIgG и свободный Fc.

Анализ, проводимый компанией Covance Ltd, Великобритания, был официально валидирован. Вкратце, образцы сыворотки анализировали с помощью ELISA, в котором IgG давали связываться с антителом захвата, козлиным противочеловеческим IgG F(ab')₂ (№ 109-006-097, Jackson ImmunoResearch Labs Inc., Пенсильвания, США). Количественный калибратор человеческого сывороточного белка (IgG) (X0908, Dako, Дания) использовали для изготовления стандартов и образцов качества. Связанный IgG обнаруживали путем последующего добавления конъюгированного с пероксидазой F(ab')₂-фрагмента

козлиного противочеловеческого IgG, специфического к Fc γ -фрагменту (№ 109-036-098, Jackson ImmunoNO:Research Labs), и хромогенного субстрата (TMB). Нижний предел количественной оценки составлял 5 нг/мл (в 100% сыворотке). Анализы сыворотки проводили на Covance Laboratories Limited (Харрогейт, Великобритания).

В анализе Fc-ELISA использовали F(ab')₂-фрагмент козлиного противочеловеческого IgG (специфического к Fc γ -фрагменту) (№ 109-006-098 Jackson ImmunoNO:Research Labs Inc., Пенсильвания, США) в качестве антитела захвата и F(ab')₂-фрагмент козлиного противочеловеческого IgG (специфического к Fc γ -фрагменту), конъюгированный с биотином (№ 109-066-098 Jackson ImmunoNO:Research) в качестве детектора. В Fab-ELISA аффинно очищенное мышинное противочеловеческое антитело IgG, специфическое к F(ab')₂-фрагменту (№ 209-005-097 Jackson ImmunoNO:Research Labs Inc., Пенсильвания, США), использовали в качестве антитела захвата и биотинилированную матрицу CaptureSelect IgG-CH1 (№ 710.3120.100 BAC B.V., Наарден, Нидерланды) в качестве детектора. Конъюгат стрептавидин-пероксидазы хрена (SA-HRP), (№ 21126 Pierce, Thermo Fisher Scientific, Рокфорд, Иллинойс) использовали для вторичного обнаружения. Калибратор и QC-образцы (ULOQ, LLOQ, H-QC, M-QC и L-QC) получали из человеческого γ -глобулина для внутривенного введения (IVIg, Octagam®). Все разведения проводили в PBS + 0,1% BSA, и плоскодонные 96-луночные планшеты для микротитрования Nunc MaxiSorp® (Nunc A/S, Роскилле, Дания) промывали PBS, содержащим 0,05% Tween 20. Образцы сывороток и QC-образцы анализировали в трех повторах. Однокомпонентный субстрат TMB One component HRP Microwell Substrate (TMBW-1000-01, BioRx Laboratories Inc., Мэриленд, США) использовали в качестве хромогенного субстрата и ферментативную реакцию останавливали добавлением 0,5M H₂SO₄. Оптическую плотность измеряли в планшетном ридере для ELISA (Multiscan EX, Thermo Electron Corp.) (программное обеспечение: Ascent Software версии 2.6) при λ =450 нм.

Сравнение Fab-ELISA и стандартного турбидиметрического анализа сывороточного IgG показано на фиг. 18. Как показано, турбидиметрический анализ обнаруживает лишь небольшое изменение уровня интактного IgG в течение долгого времени после окончания введения IdeS, так как он не может различить F(ab')₂ и интактный IgG. Напротив, Fab-ELISA показывает почти полное удаление и восстановление уровней IgG в тот же период времени.

Для того чтобы дополнительно оценить количественные данные, полученные путем ELISA, образцы сывороток также анализировали с помощью качественных SDS-PAGE-анализов. SDS-PAGE-анализы проводили в соответствии с инструкциями производителя (Bio-Rad Laboratories, Калифорния, США). Вкратце, 0,25 мкл сыворотки разделяли в заранее залитых 4-20% гелях Mini-PROTEAN®TGX™ (BioRad) при 200 В в течение 40 мин в невосстанавливающих условиях. Стандарт молекулярных весов SeeBlue MW (Life TechNO:logies) и смесь человеческих IgG, sIgG, F(ab')₂ и Fc собственного изготовления использовали в качестве маркеров. Гели окрашивали реагентом GelCode Blue (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями изготовителя и гели сканировали.

Оценка фармакокинетики.

Четыре пептида, образованных под влиянием IdeS, т.е. AFPYLSTK, AIYVTDSDSNASIGMK, GGIFDAVFTR и LFEYFK, анализировали в образцах сыворотки с помощью подходящего LC-MS/MS-анализа (Karlsson et al., 2012). Образцы для MS-анализа готовили так, как было описано ранее (Karlsson et al., 2012). Мониторинг выбранных реакций (SRM) выполняли на тройном квадрупольном масс-спектрометре TSQ Vantage (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США), снабженном колонкой PicoChip, заполненной Reprosil-PUR C18 (New Objective, Массачусетс, США), и системе Easy-nLC II (Thermo Fisher Scientific). Полученные данные обрабатывали и анализировали с помощью программного обеспечения для SRM-анализа Skyline (MacLean et al., 2010) с ручной валидацией и проверкой результатов. Объем введения составлял 1 мкл, что соответствовало 12,5 нл сыворотки (т.е. 1 мкг общего белка). Ненормированные общие площади пиков пептидов из IdeS-пиковой сыворотки использовали для построения линейной кривой регрессии (количественная оценка немеченого белка). Концентрации отдельных пептидов в неизвестных человеческих образцах интерполировали из линейной регрессии. Коммерческую эквивалентную смесь триптических пептидов от 6 белков крупного рогатого скота (6 Bovine Tryptic Digest Equal Molar Mix, Michrom Bioresources) использовали в качестве QC-образца и запускали каждые 4-6 анализируемых образцов (Teleman et al., 2012).

Данные о сывороточной концентрации с течением времени анализировали с помощью некомпартментного анализа (NCA) в программном обеспечении Phoenix™ WinNO:nlin® версии 6.3, сборка 6.2.0.495 (Pharsight®, Сент-Луис, Миссури, США). Поскольку между номинальным и реальным временем взятия образца и дозами никаких серьезных отклонений (более 20%) обнаружено не было, для расчетов NCA использовали номинальные время взятия образцов и дозы. Анализ LC-MS/MS не был валидирован, и никакие формальные нижние пределы обнаружения (LLOQ) определены не были. Отсечку для расчетов PK устанавливали на 24 ч после введения дозы для всех четырех пептидов и индивидуумов.

Оценка IgG против IdeS.

Анализ CAP-FEIA (ImmunoNO:CAP) для количественной оценки специфических IgG против IdeS был разработан в Thermo Fisher Scientific (Phadia®) в Упсале, Швеция. Первоначальный анализ показал, что

возможен 3-логарифмический диапазон измерений, и с помощью анализа было показано, что предел обнаружения (LOD) для IgG в IdeS-специфическом CAP-FEIA-анализе в семь раз ниже предложенной нижней отсечки анализа (т.е. 2,0 мг/л). Анализ клинических образцов проводили на инструменте Phadia® 250 с использованием анализа с одним повтором согласно инструкции Phadia® 250. Анализ предназначен только для исследовательских целей.

Антигенспецифическая эффективность.

Анализ ELISA исследовательского класса был разработан в Hansa Medical AB с целью определения антигенспецифической эффективности в конце исследования. IgG-ответ субъектов на вакцину, включенную в календарь прививок для детей Швеции, использовали в качестве заменителя отсутствия аутоантител у здоровых субъектов, включенных в 1 фазу испытания. Вкратце, вакцину DTaP-IPV//PRP-T (Pentavac®/Pentaxim®-SaNO:fi Pasteur) разводили в 100 раз в PBS, а затем наносили на планшеты MaxiSorp (Nunc) при 4°C. Нормальный человеческий IgG (IVIg, Octagam®) использовали в качестве калибратора, а козлий античеловеческий Fc-специфический F(ab')₂ конъюгированный с биотином-SP (Jackson № 109-066-098), использовали в качестве детектора. Кроме того, использовали SA-HRP (Pierce № 21126), а сигналы получали с помощью однокомпонентного субстрата TMB One component HRP Microwell Substrate (BioFX Laboratories, № TMBW-1000-01), реакцию останавливали с помощью 0,5M H₂SO₄, и сигнал регистрировали при 450 нм.

Функциональный анализ in vitro.

Фагоцитарный анализ был разработан с модификациями из Ackerman et al., 2011. Флуоресцентные нейтравидиновые гранулы (№ F8776, Molecular Probes) покрывали в течение ночи биотинилированным CH1 против IgG (CaptureSelect, № 710.3120.100 BAC B.V., Наарден, Нидерланды) в дозе 0,1 мг/мл. Реагент CaptureSelect специфичен для домена CH1 тяжелой цепи IgG человека, т.е. для интактного IgG, scIgG и F(ab')₂-фрагментов, но IgM не будут захватываться этим белком. Покрытые гранулы промывали и смешивали с разведенной 1:100 сывороткой от субъектов в исследовании и инкубировали при 37°C в течение 2 ч, позволяя IgG в сыворотке связаться с покрытыми гранулами. Контроль получали путем смешивания покрытых гранул с буфером для разведения (PBS с 0,1% BSA). Все образцы готовили в двух повторях. После инкубации IgG-нагруженные гранулы промывали и смешивали с 75000 клеток THP-1/образец и инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 1,5-3 ч. После инкубации образцы фиксировали в ледяном 2% забуференном фосфатом формалине и флуоресцентное поглощение в клетках THP-1 контролировали с помощью проточного цитометра Accuri C6.

Статистический анализ.

Средние значения, медианные значения, стандартные отклонения и основной статистический анализ выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Калифорния, США).

Результаты.

Описание исследования.

Фаза I, первая на людях, рандомизированное двойное слепое исследование с разовыми возрастающими дозами IdeS, была проведена после утверждения шведскими нормативными и этическими органами. Цели заключались в оценке безопасности, эффективности, фармакокинетики и иммуногенности IdeS у здоровых людей после внутривенного введения.

В общей сложности 29 здоровых субъектов были включены и разделены на четыре группы с определенной дозировкой. Субъекты в каждой группе с определенной дозировкой были рандомизированы и получали либо IdeS, либо плацебо. Инфузии проводили внутривенно в течение 30 мин первым двум субъектам в каждой группе и в течение 15 мин последующим субъектам. Начальная доза составляла 0,01 мг/кг массы тела (N_{IdeS}: 8 и N_{плацебо}: 4), и после оценки Комитетом по мониторингу данных дозу ступенчато увеличивали до 0,04 мг/кг массы тела (N_{IdeS}: 4 и N_{плацебо}: 4), 0,12 мг/кг массы тела (N_{IdeS}: 4 и N_{плацебо}: 1) и, наконец, 0,24 мг/кг массы тела (N_{IdeS}: 4 и N_{плацебо}: 2). Субъектов наблюдали до 64 дня после введения дозы с более интенсивным наблюдением в течение первой недели. Все субъекты были мужчины европеоидной расы со средним возрастом 23 года (диапазон: 20-41 лет), весом 76 кг (диапазон: 59-100 кг) с BMI 23 кг/м² (диапазон: 20-30 кг/м²), и между группами не было никакой статистически значимой разницы в демографических данных.

Оценка безопасности.

В общей сложности у 24 из 29 субъектов наблюдалось 77 побочных явлений (АЕ), при этом 39 АЕ (у 14 субъектов) были классифицированы как связанные (т.е. с возможной или вероятной связью) (табл. 1.1). Среди этих 39 АЕ 35 имели степень 1 по шкале критериев общей токсичности. Четыре АЕ имели степень 2, и все они имели место у одного субъекта (506), который испытал вероятную инфузионную реакцию. Симптомы разрешились в течение 15 мин после введения антигистаминового препарата (2 мг тавегила внутривенно) и кортикостероидов (8 мг бетапреда внутривенно), и инфузию IdeS не прерывали. Ни один из АЕ не был зарегистрирован как серьезный, не имел ограничивающих дозу критериев токсичности и не привел к отмене исследуемого лекарственного препарата.

Среди 77 АЕ наиболее часто встречающимися были назофарингит, головная боль и усталость. На-

зофарингит сообщался у десяти из двадцати субъектов, получавших IdeS, и у шести из девяти субъектов, получавших плацебо. Семь субъектов сообщили о головной боли в девяти случаях (все в группе IdeS), и шесть субъектов (пять в группе IdeS и один в группе плацебо) сообщили о семи случаях усталости.

В анализах гематологии, клинической химии или коагуляции никаких клинически значимых изменений выявлено не было. Тем не менее, наблюдалась преходящая протеинурия через 24-48 ч у субъектов, получавших IdeS, что было вызвано значительным расщеплением IgG (фиг. 2). Этот пик, вероятно, отражает клиренс продуктов расщепления IgG из кровотока. Поскольку IdeS разрушает антитела IgG, первоначально было опасение, что субъекты в исследовании будут иметь повышенный риск инфицирования, и перед включением в исследование субъекты были обследованы на наличие наследственных иммуноглобулиновых нарушений, например дефицита IgA. Кроме того, была выражена обеспокоенность, что субъекты в исследовании могут быть субклиническими носителями бактериальных агентов (например, пневмококков) с повышенным риском инфицирования из-за уменьшения плазменного IgG. Поэтому субъекты получали антибиотикопрофилактику до того момента, пока сывороточные уровни IgG не возвращались к значению более 4,5 г/л. Все субъекты в исследовании дали согласие на лечение антибиотиками, и никаких признаков распространения инфекции не наблюдалось.

Таблица 1.1

Сводка побочных явлений по каждому субъекту

Доза	Субъект	Связь						
		0-24 ч	2-7 дни	8-21 дни	22-64 дни			
001	103	Назофарингит (1)		Усталость (1) Невнимательность (1) Звон в ушах (1)		Возможно	Нет	Разрешение
	106	Назофарингит (1)	Эпитаксис (1) Дискомфорт в груди (1) Ночные кошмары (1)			Возможно	Нет	Разрешение
	206			Головная боль (1) Усталость (1) Тошнота (1) Головокружение (1)		Возможно	Нет	Разрешение
004	303	Тошнота (1) Прилив (1)				Возможно	Нет	Разрешение
	304		Боль в ротоглотке (1)			Возможно	Нет	Разрешение

			Назофарингит (1)					
	305		Волдырь (1) Головная боль (1)			Возможно	Нет	Разрешение
012	404		Диарея (1) Вздутие живота (1)			Возможно	Нет	Разрешение
024	501	Головная боль (1) Желудочно-кишечный дискомфорт (1)	Назофарингит (1)			Возможно	Нет	Разрешение
	504			Астения (1)		Возможно	Нет	Разрешение
	506	Прилив (2) Синусовая тахикардия (1) Дискомфорт в груди (2) Отек глотки (2) Назальная обструкция (1)	Раздражение горла (1)	Боль в ротоглотке (1) Миалгия (2)		Вероятно Возможно	Тавегил или Бета пред нет	Разрешение
Плацибо	101	Периферическое охлаждение (1) Реакция, связанная с инфузией (1)	Усталость (1)			Возможно	Нет	Разрешение
	104	Дизгевзия	Назальная обструкция (1)			Возможно	Нет	Разрешение
	201		Простой герпес (1)			Возможно	Нет	Разрешение
	302		Озноб (1)			Возможно	Нет	Разрешение

Фармакокинетика IdeS.

Концентрации IdeS в сыворотке измеряли способом LC-MS/MS на основе четырех пептидов, образованных под влиянием IdeS, и данные о концентрации в сыворотке с течением времени анализировали с помощью некомпартментного анализа. Фармакокинетические параметры рассчитывали до 24 ч после введения дозы, а остальные концентрации были примерно на уровне или ниже рассчитанного количественного диапазона данного способа.

Из 29 субъектов девять получали плацебо, а 20 получали IdeS в группах с дозами 0,01, 0,04, 0,12 и 0,24 мг/кг массы тела. Ни один из анализируемых пептидов не был обнаружен в образцах, взятых перед введением дозы, или в образцах от девяти субъектов, получавших плацебо. Тем не менее, IdeS был обнаружен в образцах от 20 субъектов, получавших IdeS, тем самым подтверждая введение дозы. Концентрация IdeS увеличивалась с дозой, и увеличение концентрации в сыворотке за одну минуту до окончания инфузии было пропорционально дозе (фиг. 3А).

У субъектов, которым вводили 0,12 и 0,24 мг/кг массы тела, в общей сложности было собрано 10 образцов крови/субъект в течение 1 недели после введения дозы. Концентрация IdeS в сыворотке может быть описана как многофазная кривая элиминации, где основная фракция введенного вещества элиминировалась в течение первых 24 ч после введения дозы. В течение первых 6 ч после введения среднее $t_{1/2}$ составляло 4,1 ($\pm 2,6$) ч при дозе 0,12 мг/кг массы тела и 4,9 ($\pm 2,8$) ч при дозе 0,24 мг/кг массы тела. $C_{\max}$ составляла 5,0 ($\pm 2,5$) мг/л при дозе 0,12 мг/кг массы тела и 8,3 ($\pm 3,7$) мг/л при дозе 0,24 мг/кг массы тела (фиг. 3В).

Эффективность и фармакодинамика IdeS.

Эффективность и фармакодинамику расщепления IgG под влиянием IdeS оценивали с помощью SDS-PAGE-анализа и ELISA образцов сыворотки от субъектов. IdeS расщепляет IgG в два этапа (Ryan et al., 2008; Vindebrot et al., 2013). Первая реакция происходит очень быстро и эффективно расщепляет одну из двух тяжелых цепей, образуя однократно расщепленный IgG (scIgG), по-прежнему имеющий одну интактную из двух тяжелых цепей. scIgG является менее чувствительным, но все еще функциональным субстратом для IdeS, и это второе расщепление образует F(ab')₂- и Fc-фрагменты.

Анализ SDS-PAGE показал, что IdeS имел полный или близкий к полному эффект в течение 6 ч у всех 8 субъектов, которым вводили дозу 0,12 или 0,24 мг/кг массы тела, т.е. пул IgG был переведен в F(ab')₂- и Fc-фрагменты (фиг. 4А и В). Эффект был чрезвычайно быстрым, и пул IgG был переведен в scIgG уже во время введения дозы (через 14 мин после начала введения, т.е. за 1 мин до окончания введения полной дозы), и максимальный эффект достигался у всех субъектов через 2-6 ч после введения

дозы. Вновь синтезированный интактный IgG обнаруживался в сыворотке через две недели после введения дозы, а через три недели уровень интактного IgG еще больше увеличился и составлял основную фракцию IgG в сыворотке крови (фиг. 4С).

Динамику Fab- и Fc-содержащих фрагментов в сыворотке крови анализировали с помощью одного Fab- и одного Fc-специфического способа ELISA. ELISA не полностью различал разные образцы IgG, т.е. F(ab')₂, Fc, scIgG и интактный IgG. Fab-ELISA измерял все Fab-содержащие фрагменты IgG, т.е. интактный IgG, scIgG и F(ab')₂, а Fc-ELISA измерял все Fc-содержащие фрагменты, т.е. интактный IgG, scIgG и свободный Fc.

F(ab')₂, а также Fc-фрагменты достигали нижних уровней через 1-7 дней после введения дозы, после чего у всех субъектов уровни повышались в результате синтеза интактного IgG (данные не показаны). Элиминация Fc-фрагментов была несколько более быстрой, чем элиминация F(ab')₂-фрагментов, и уровни плато были достигнуты уже через один день после введения дозы. Быстрое расщепление человеческого IgG до F(ab')₂ и Fc, обнаруживаемых с помощью анализа SDS-PAGE, подтвердили с помощью ELISA (фиг. 5), который показал, что через 2-6 ч после введения дозы низкий уровень плато был достигнут на уровне менее 5% оставшегося сигнала. Был сделан вывод о том, что этот сигнал в основном происходит от scIgG. Разрушение IgG у людей хорошо коррелирует с ранее протитрованными концентрациями IdeS, необходимыми для расщепления IgG в образцах сыворотки от 20 здоровых людей (фиг. 6).

IdeS и антигенспецифические IgG-антитела.

Большинство населения Швеции имеет IgG-антитела против антигенных компонентов вакцины DTaP-IPV//PRP~T (Pentavac®) (дифтерия, столбняк, коклюш, полиомиелит и Haemophilus типа b). Вакцина является частью шведского графика детских прививок, и большинство людей получили повторные инъекции этой или подобной вакцины. Это было использовано в диагностическом исследовании, в котором были измерены ранее существовавшие IgG против этих антигенов. Результаты показали, что IdeS влияет на антигенспецифический IgG таким же образом, как и на общий IgG у каждого индивидуума. Кроме того, повторное появление этих антигенспецифических IgG-антител было таким же, как общего IgG (фиг. 7).

Введение IdeS и фагоцитарная активность.

Для оценки функциональной активности оставшегося IgG после введения дозы IdeS сыворотку от субъектов тестировали в анализе фагоцитоза. IgG из образцов сыворотки, собранных перед введением и в различные моменты времени после введения дозы IdeS, захватывали на флуоресцентные гранулы, промывали и смешивали с эффекторными клетками, и фагоцитоз измеряли как процент эффекторных клеток по меньшей мере с одной фагоцитированной гранулой. В качестве фона в анализе использовали гранулы, не обработанные сывороткой, для мониторинга спонтанного поглощения пустых гранул эффекторными клетками. Анализ фагоцитоза показал, что все субъекты, которым вводили IdeS в дозе 0,24 мг/кг массы тела, достигали фоновых уровней фагоцитоза через 24 ч после введения дозы (фиг. 8А). Кроме того, он показал, что оставшиеся IgG или IgG-фрагменты в сыворотке от пациентов, получивших IdeS в дозе 0,24 мг/кг массы тела, имели значительно сниженную фагоцитарную активность уже через 2 ч после, и что фагоцитарная активность оставалась сниженной в течение 7 дней (фиг. 8В).

IdeS и иммуногенность.

Более ранняя работа показала, что значительная часть населения имеет уже сформированные IgG-антитела против IdeS (Akeson et al., 2004). Можно предположить, что люди с уже сформированными антителами против IdeS имеют повышенный риск гиперчувствительности/инфузиоподобных реакций против IdeS. Таким образом, был разработан специфический тест *in vitro* для количественного измерения IdeS-специфических антител. Тест представляет собой иммуноферментный анализ CAP Fluoro enzyme immunoNO:assay (CAP-FEIA/ImmunoNO:CAP), и он был использован для скрининга субъектов в исследовании перед включением в него. Субъекты с повышенными титрами IgG-антител (более 15 мг/л) были исключены из этого исследования. Референсную группу из 130 людей обследовали с помощью этого теста до начала исследования. Результаты показаны на фиг. 9А (первый столбец). Десять из 130 имели IdeS-специфический IgG ниже линии отсечки (менее 2 мг/л). Средний уровень IgG против IdeS составил 6,1 мг/л (диапазон менее 2-78 мг/л; n равно 130) с 80% процентилем при 15 мг/л. Все 78 здоровых субъектов мужского пола, подвергнутых скринингу в данном исследовании, имели обнаруживаемый IgG против IdeS до введения препарата. Результаты показаны на фиг. 9А во втором столбце. Медианный уровень IgG против IdeS составил 10,6 мг/л (диапазон 2,1-90,8 мг/л). 28% испытуемых имели титр IgG против IdeS выше 15 мг/л и были исключены из исследования.

Большинство испытуемых ответили увеличением IgG против IdeS. Ответ не поддавался обнаружению через неделю после введения дозы, но достигал почти пиковых уровней через две недели после введения дозы, а затем медленно снижался (фиг. 9В). Медианный уровень IgG против IdeS перед введением дозы (у всех субъектов) составлял 5,3 мг/л (диапазон: 2,0-10,6 мг/л), а на 14-й день медианный уровень у всех субъектов, которым вводили IdeS, составлял 104 мг/л (диапазон: 3,1-1744 мг/л). Через два месяца после введения дозы уровни IgG против IdeS у большинства субъектов начинали снижаться, и медианный уровень IgG против IdeS у всех субъектов, которым вводили IdeS, составлял 87,8 мг/л (диапазон: 10,5-764 мг/л). Хотя индивидуальные различия в значении IgG против IdeS-ответа были большими, среди

субъектов, получавших IdeS в дозе 0,12 или 0,24 мг/кг массы тела, ответ был явно более сильный по сравнению с субъектами, получавшими 0,01 или 0,04 мг/кг (фиг. 9C). В день 182 уровни IgG против IdeS у 19 из 20 субъектов, которым вводили IdeS, находились в нормальном диапазоне ранее проанализированных субъектов (диапазон менее 2-90,8 мг/л, n равно 208) (фиг. 9D). Только один субъект в день 182 все еще имел уровни IgG против IdeS немного выше нормального диапазона (101 мг/л). Этот субъект был из группы, получившей дозу 0,01 мг/кг, и в день 365 уровни IgG против IdeS для данного субъекта находились в нормальном диапазоне (40,5 мг/л). Можно сделать вывод о том, что IgG против IdeS-ответ очень похож по кинетике и величине реакции на описанный для других белковых препаратов бактериального происхождения, таких как стрептокиназа и стафилокиназа.

Обсуждение.

Это первое в своем классе клиническое испытание показывает, что IdeS превращает плазменный IgG в однократно расщепленный IgG (scIgG) уже через несколько минут после введения. Было продемонстрировано, что scIgG имеет ослабленные эффекторные функции со сниженной способностью к связыванию Fc γ -рецепторов и сниженной Fc-опосредованной цитотоксичностью (Brezski et al., 2009). Несмотря на отсутствие патогенных аутоантител у здоровых субъектов, включенных в исследование, нормальный IgG можно было контролировать как биомаркер, и IdeS показал впечатляющую эффективность в расщеплении IgG в тестируемом диапазоне доз. Полное или близкое к полному влияние на общий IgG, т.е. превращение его в F(ab')₂- и Fc-фрагменты, наблюдалось у всех субъектов, которым вводили IdeS в дозе 0,12 и 0,24 мг/кг массы тела, и исследуемый лекарственный препарат показал благоприятный профиль безопасности. Уже через 6 ч после введения в крови можно было обнаружить только низкие концентрации IgG (менее 5%), и уровень IgG упорно оставался низким в течение более недели до тех пор, пока вновь синтезированный IgG не попадал в плазму. Эти результаты можно сравнить с результатами, обычно получаемыми, например, с помощью плазмафереза, когда замена одного объема плазмы приводила к уменьшению IgG до примерно 35% от исходного уровня, а через 24 ч после плазмафереза уровни IgG поднимались до 60%, главным образом, из-за лимфодренажа в сосудистое пространство (Ismail et al., 2001).

Как следствие того, что IdeS является бактериальным белком, и большинство людей имели ранее контакт с *S. pyogenes*, все субъекты имели ранее сформированные антитела IgG против IdeS и отвечали, как и ожидалось, уровнем IgG, который достигал максимума через 2-3 недели после инфузии IdeS. Амплитуда реакции против лекарственного препарата существенно различалась между отдельными лицами, хотя был отмечен характер "доза - реакция". Через 6-12 месяцев после введения дозы у всех субъектов уровни антител против IdeS возвращались в пределы нормального диапазона (т.е. менее 2-91 мг/л), и, принимая во внимание потенциально нейтрализующие антитела и аспект безопасности, предполагается, что лечение IdeS можно повторять через 6-12 месяцев. IdeS-специфический тест CAP FEIA, разработанный параллельно с этим клиническим испытанием, может быть ценным инструментом для руководства врачей при рассмотрении вопроса о повторном введении препарата.

В дополнение к общему плазменному IgG в данном исследовании анализировали влияние IdeS на специфический биомаркер, используемый в качестве вакцины против дифтерии, столбняка, коклюша, полиомиелита и гемофильной палочки типа b в рамках шведского графика детских прививок. Результаты показали, что в антигенной специфичности касательно влияния IdeS на общий IgG не было каких-либо серьезных различий, и все субъекты полностью восстановили их антигенспецифические IgG к тому моменту, когда вернулся весь пул IgG.

В исследовании также оценивали функциональную значимость расщепления IgG под влиянием IdeS в анализе фагоцитоза, при котором взаимодействие с Fc γ -рецептором, как ожидается, играет важную роль. Этот анализ показал, что уже через несколько часов после введения IdeS фагоцитарный эффект оставшихся IgG/IgG-фрагментов был значительно снижен у всех тестируемых субъектов, и этот эффект сохранялся семь дней спустя. Результаты показывают, что IdeS обладает способностью инактивировать Fc-опосредованную эффекторную функцию *in vivo* в организме человека.

Взятые вместе представленные здесь данные показывают, что разовая доза IdeS безопасно, быстро и эффективно инактивирует IgG в организме человека, и что этот эффект сохраняется в течение нескольких недель. IdeS сам по себе и/или в сочетании с другими истощающими B-клетки лекарственными препаратами (например, ритуксимабом или бортезומибом) является очень привлекательным терапевтическим подходом при многих состояниях, когда аутоантитела IgG способствуют развитию патологии. Иммуногенная природа IdeS, скорее всего, не позволит проводить хроническое лечение, но, скорее всего, повторное лечение будет возможным один или два раза в год. Тем не менее, применение продуманного терапевтического подхода с использованием высокой эффективности IdeS в сочетании с другими лекарственными препаратами или технологиями, такими как иммуноадсорбция или плазмаферез, должно обеспечить возможность поддержания низкого уровня патогенных антител в плазме крови в течение длительного периода времени.

Удаление IgG с помощью IdeS было временным, подтверждая, что его лучшее применение может быть при состояниях с однофазным курсом, таких как отторжение трансплантата, опосредованное анти-

тeлaми. B нacтoящee вpeмя пpoвoдитcя иcпытaниe IdeS фaзы II.

Ссылки.

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

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

Brezski, R.J., O. Vafa, D. Petrone, S.H. Tam, G. Powers, M.H. Ryan, J.L. Luongo, A. Oberholtzer, D.M. Knight, and R.E. Jordan. 2009. Tumor-associated and microbial proteases compromise host IgG effector functions by a single cleavage proximal to the hinge. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17864-17869.

Carapetis, J.R., A.C. Steer, E.K. Mulholland, and M. Weber. 2005. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* 5:685-694.

Collen, D., F. De Cock, E. Demarsin, S. Jenne, I. Lasters, Y. Laroche, P. Warmerdam, and L. Jespers. 1997. Recombinant staphylokinase variants with altered immunoreactivity. III: Species variability of antibody binding patterns. *Circulation* 95:455-462.

Declerck, P.J., S. Vanderschueren, J. Billiet, H. Moreau, and D. Collen. 1994. Prevalence and induction of circulating antibodies against recombinant staphylokinase. *Thromb Haemost* 71:129-133.

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

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

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

Jordan, S.C., D. Tyan, D. Stablein, M. McIntosh, S. Rose, A. Vo, M. Toyoda, C. Davis, R. Shapiro, D. Adey, D. Milliner, R. Graff, R. Steiner, G. Ciancio, S. Sahney, and J. Light. 2004. Evaluation of intravenous immunoglobulin as an agent to lower allosensitization and improve transplantation in highly sensitized adult patients with end-stage renal disease: report of the NIH IG02 trial. *J Am Soc Nephrol* 15:3256-3262.

Karlsson, C., L. Malmstrom, R. Aebersold, and J. Malmstrom. 2012. Proteome-wide selected reaction monitoring assays for the human pathogen *Streptococcus pyogenes*. *Nat Commun* 3:1301.

MacLean, B., D.M. Tomazela, N. Shulman, M. Chambers, G.L. Finney, B. Frewen, R. Kern, D.L. Tabb, D.C. Liebler, and M.J. MacCoss. 2010. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. *Bioinformatics* 26:966-968.

Mainet, D., M. del Rosario, A. Toruncha, P. Prats, C. Valenzuela, and P. Lopez Saura. 1998. Similar, more than 6-months persisted, antibody and neutralizing activity responses in patients with acute myocardial infarction treated with recombinant or natural streptokinase. *Fibrinolysis Proteol* 12:301-309.

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

Nandakumar, K.S., B.P. Johansson, L. Björck, and R. Holmdahl. 2007. Blocking of experimental arthritis by cleavage of IgG antibodies in vivo. *Arthritis Rheum* 56:3253-3260.

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

Ryan, M.H., D. Petrone, J.F. Nemeth, E. Barnathan, L. Björck, and R.E. Jordan. 2008. Proteolysis of purified IgGs by human and bacterial enzymes in vitro and the detection of specific proteolytic fragments of endogenous IgG in rheumatoid synovial fluid. *Mol Immunol* 45:1837-1846.

Teleman, J., S. Waldemarson, J. Malmstrom, and F. Levander. 2013. Automated quality control system for LC-SRM setups. *J Proteomics* 95:77-83.

Tradtrantip, L., N. Asavapanumas, and A.S. Verkman. 2013. Therapeutic cleavage of anti-aquaporin-4 autoantibody in neuromyelitis optica by an IgG-selective proteinase. *Mol Pharmacol* 83:1268-1275.

Wenig, K., L. Chatwell, U. von Pawel-Rammingen, L. Björck, R. Huber, and P. Sonderrmann. 2004. Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:17371-17376.

Vincents, B., U. von Pawel-Rammingen, L. Björck, and M. Abrahamson. 2004. Enzymatic characterization of the streptococcal endopeptidase, IdeS, reveals that it is a cysteine protease with strict specificity for IgG cleavage due to exosite binding. *Biochemistry* 43:15540-15549.

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

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

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

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

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

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

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

Пример 2.

Введение.

Трансплантация в присутствии донор-специфических антител (DSA) имеет риски, приводящие к опосредованному антителами гиперострому отторжению с быстрой потерей аллотрансплантата. Исследование в примере 1 показывает, что IdeS безопасен и хорошо переносится в дозе до 0,24 мг/кг массы тела. При этой дозе IdeS полностью расщеплял пул плазменных IgG в течение 14 мин после начала инфузии. Уровень интактного IgG снижался до менее 5% от первоначального уровня. Данные ясно показали, что одна доза IdeS превосходит как плазмаферез, так и иммуноадсорбцию в отношении эффективности и скорости восстановления плазменных IgG.

Поэтому введение IdeS сенсibilизированным пациентам непосредственно перед трансплантацией почки должно быстро и эффективно расщеплять IgG до F(ab')₂- и Fc-фрагментов, тем самым снижая сывороточные уровни цитотоксических DSA до уровня, при котором возможна трансплантация от живого и умершего донора (LD и DD). Донор-специфические F(ab')₂-фрагменты, все еще находящиеся в кровотоке в момент трансплантации, могут также предотвратить связывание, например, низкоаффинных IgM или остаточных IgG с трансплантатом, таким образом, дополнительно защищая орган от отторжения. Цель данного исследования состояла в том, чтобы проанализировать, может ли введение клинически релевантной дозы IdeS перевести положительный перекрестный тест в отрицательный с помощью сыворотки от сенсibilизированных пациентов, а также проанализировать корреляцию между снижением уровней общего IgG и IgG, специфического для HLA класса I и II.

Материал и методы.

Образцы сыворотки.

У исследуемых пациентов диагностировали СКД стадии 5 и вносили их в список ожидания на трансплантацию почки. Пациенты были сенсibilизированы и положительны на анти-HLA. Пациенты были набраны профессором Н. Ekberg в Блоке трансплантологии Отделения нефрологии и трансплантологии Университетской больницы Сcone в Мальмё, Швеция, и профессором Г. Tufveson в Отделении трансплантационной хирургии Университетской больницы Упсалы, Швеция. Пациенты получали письменную информацию и подписывали информированное согласие перед началом каких-либо связанных с испытанием процедур. Сыворотку выделяли из 10 мл венозной крови в соответствии с больничной процедурой. Для обеспечения конфиденциальности главный исследователь делал личность пациентов недоступной исследующим ученым путем присвоения идентификационного номера (PXX) образцам сыворотки. Образцы отправляли в Отдел клинический иммунологии Университетской больницы Упсалы для сохранения, и часть каждой сыворотки затем отправляли в Hansa Medical AB в Лунде для IdeS-связанных анализов.

Расщепление IdeS в сыворотке от пациентов.

Сыворотки (100 мкл) от пяти пациентов (P02, P04, P07, P08 и P09) обрабатывали IdeS (партия BX1001865; 9,9 г/л). Стоковый раствор IdeS с концентрацией 6 г/л готовили в PBS/0,1% BSA. 100 мкл сыворотки добавляли к 12 мкл 0,1M HCl для подведения pH сыворотки до физиологического уровня (pH 7,4), а затем добавляли 2,4 мкл стокового раствора IdeS (6 г/л), чтобы достичь конечной концентрации

125 мкг/мл IdeS в 115 мкл. Все препараты готовили на льду. Расщепление проводили при 37°C (Thermomixer; Eppendorf) в течение 2 ч и останавливали, помещая образцы в морозильную камеру (-20°C) до дальнейших анализов. Контрольные образцы от каждого пациента представляли собой одинаковые имитационные контроли, обработанные буфером для разведения (PBS/0,1% BSA) вместо IdeS.

Количественная оценка человеческого IgG.

Образцы сыворотки отправляли в Отделение клинической химии Университетской больницы Сcone в Лунде, Швеция, для определения общей концентрации IgG. Образцы человеческих сывороток крови, обработанные IdeS, анализировали на интактный IgG с использованием анализа ELISA, разработанного Hansa Medical AB. 96-Луночные ELISA-планшеты MaxiSorp в течение ночи при +4-8°C покрывали F(ab')₂-фрагментом козлиного противочеловеческого антитела, специфического в отношении F(ab')₂ (Jackson № 109-006-097), в карбонатном буфере (pH 9,6) в концентрации 100 нг/лунка. Планшеты промывали PBS+Tween 20 (0,05%) и блокировали PBS+2% BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. Калибраторы и образцы разводили в PBS+0,1% BSA (буфер для разведения). После промывания разведенные калибраторы (M-1, сыворотка от здорового добровольца; конц. 11,2 г/л) и образцы сыворотки добавляли в планшет и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшеты снова промывали, добавляли 50 мкл биотин-SP-AffiniPure F(ab')₂-фрагмента козлиного противочеловеческого IgG, специфического в отношении Fcγ-фрагмента (Jackson № 109-066-098), разведенного 1:20000 в буфере для разведения, и инкубировали в течение 30 мин. После очередного промывания добавляли 50 мкл SA-HRP (Pierce № 21126), разведенного 1:40000 в буфере для разведения, и после 30-минутной инкубации планшет промывали и запускали реакцию с TMB (BioFX Laboratories № TMBW-1000-01), затем ее останавливали с помощью 0,5M H₂SO₄ и регистрировали сигнал при A равно 450 нм. Калибраторы формировали кривую с 4-параметрической логистической регрессией ($y = b + (a - b) / (1 + x^d)$) в анализируемом диапазоне, и разведения образцов, дающие OD-значения как можно ближе к значению IC₅₀ стандартной кривой, предпочтительно использовали для количественной оценки.

Эффективность IdeS и оценка иммуногенности.

ELISA-анализ на эффективность IdeS проводили так, как описано в примере 1, как анализ CAP FEIA (ImmuNO:CAP) для ответов IdeS-специфических антител. Результаты использовались только для сравнения с результатами, представленными в примере 1, и не показаны.

Комплементзависимая цитотоксичность (CDC) и анализ одной антигенной гранулы (Single Antigen Bead, SAB) (Luminex).

Сыворотки, обработанные IdeS и плацебо, анализировали на IgG-антитела против HLA с использованием анализов SAB против антигенов панели MHC класса I и II (LABScreen Single Antigen, One Lambda). Сыворотки также тестировали и оценивали на реактивность в скрининговом тесте на комплементзависимую цитотоксичность (CDC) на Т- и В-клетках от 23 доноров. Т-клетки и В-клетки обогащали с использованием магнитных гранул с CD8 и MHC класса II (Dyna) соответственно. Анализы SAB и CDC проводил с использованием валидированных способов в клинических условиях доктор Mats Bengtsson в Отделе клинической иммунологии Отделения онкологии, радиологии и клинической иммунологии Лаборатории Rudbeck Университетской больницы Упсалы, Швеция. Реакции CDC оценивали в соответствии с процедурой международного семинара (Fuller et al., 1982).

Перекрестные тесты комплементзависимой лимфоцитотоксичности (CDC-CXM).

Спленоциты получали от мышей Balb/c путем разделения в градиенте плотности фикола. Клетки промывали в PBS (2 раза) и ресуспендировали до плотности 2×10^6 клеток/мл в DMEM:F12 (Difco) с 0,1% инактивированной нагреванием BSA. Образцы сывороток обрабатывали DTT, чтобы инактивировать IgM, путем смешивания 45 мкл сыворотки с 5 мкл 50 mM DTT и инкубации в течение 30-45 мин при 37°C. CXM-тест проводили путем добавления 1 мкл суспензии клеток (т.е. 2000 клеток) и 1 мкл образца (т.е. сыворотки или контролей) в 60-луночный планшет Terasaki (Nunc). После 30-минутной инкубации при комнатной температуре добавляли Baby Rabbit Complement (5 мкл) (Cedarlane) и смесь далее инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. В каждую лунку добавляли FluoroQuench AO/EB Stain Quench (5 мкл) (One Lambda inc.) и смесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Цитотоксичность оценивали (оценка 1-8) и записывали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Обработка данных.

Графики строили с использованием GraphPad Prism версии 5.0d для Mac OS X, GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США, www.graphpad.com.

Результаты и обсуждение.

Обработка IdeS сывороток пациентов.

Сыворотку собирали от двенадцати сенсibilизированных пациентов с СКД на стадии 5, ожидающих трансплантации почки. Дозу IdeS титровали в каждой сыворотке, чтобы определить эффективность введения IdeS, и был сделан вывод о том, что IdeS эффективно расщепляет IgG в сыворотках всех пациентов в исследуемом диапазоне концентраций, хотя имели место индивидуальные различия в минимальной концентрации IdeS, необходимой для достижения максимального эффекта (фиг. 10). Уровни общего IgG в сыворотках крови пациентов проанализировали и нашли их в пределах нормального диапазона (медиана

на: 9,3 г/л, диапазон 6,5-16,2 г/л). Кроме того, с помощью анализа IdeS-ImmunoCAP определили уровни антител против IdeS, и все 12 сывороток содержали низкие уровни (медиана: 4,5 мг/л, диапазон менее 2-14,8 мг/л) IgG против IdeS (Hmed Doc. № 2012-041). Между отдельными уровнями антител к IdeS или уровнями общего IgG и эффективностью IdeS никакой четкой корреляции выявлено не было. Пять репрезентативных сывороток, т.е. P02, P04, P07, P08 и P09, были отобраны для дальнейшего анализа антител против HLA.

Сыворотки обрабатывали IdeS или плацебо (PBS) в течение 2 ч при температуре 37°C и анализировали на оставшиеся IgG с помощью описанного ELISA. В качестве сравнения мы провели истощающую иммуноадсорбцию на сефарозе с протеином А и проанализировали оставшийся IgG параллельно с образцами, обработанными IdeS. Результаты показали, что обработка IdeS снижает уровень IgG от 7,5-15,9 г/л до 0,17-0,4 г/л (табл. 2.1). Иммуноадсорбция в целом была менее эффективной с 0,18-1,5 г/л оставшегося IgG.

Таблица 2.1

Сыворотки от пяти пациентов (P02, P04, P07, P08 и P09), обработанные IdeS, PBS или подвергнутые иммуноадсорбции (IA), IgG в г/л.

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

Эти результаты следует сравнить с результатами, полученными с использованием, например, плазмафереза, когда замена одного объема плазмы приводила к уменьшению IgG до примерно 35% от исходного уровня, а через 24 ч после плазмафереза уровни IgG поднимались до 60%, главным образом, из-за лимфодренажа в сосудистое пространство (Ismail et al., 2001). Даже повторные, вплоть до пяти раз, циклы плазмафереза приводили к колеблющимся уровням IgG в пределах от 10% в конце процедуры до 20-25% перед следующей процедурой. Доклинические исследования, описанные в примере 1, показали, что однократное внутривенное введение IdeS у кроликов приводит к быстрому (в течение 1 ч) уменьшению интактного IgG до 2-3% от исходного уровня, и что уровень IgG остается низким в течение нескольких дней после лечения. Аналогичные результаты были получены в I фазе клинических испытаний, описанной в примере 1, после введения IdeS здоровым людям. Пул плазменных IgG был полностью переведен в scIgG уже во время введения IdeS в дозе 0,24 мг/кг массы тела (через 14 мин после начала инфузии), а через 2 ч после введения препарата пул IgG был далее переведен в F(ab')₂ и Fc. Данные показали, что уровни, соответствующие менее 5% от исходного уровня, большинство из которых состояли из scIgG, могут быть достигнуты уже между 2-6 ч после введения дозы, и что потребуется несколько дней для того, чтобы уровень начал постепенно повышаться.

CDC-анализы.

Обработанные IdeS и плацебо сыворотки от пациентов P02, P04, P07, P08 и P09 подвергали скрининговому CDC-тесту против панели Т-клеток (т.е. клеток, обогащенных CD8⁺) и В-клеток (т.е. клеток, обогащенных МНС класса II⁺) от отобранных и хорошо охарактеризованных доноров. Результаты, представленные в табл. 2.2 и 2.3 (также см. краткое изложение результатов для отдельных пациентов, ниже), ясно показали, что обработка IdeS обладала способностью полностью отменять комплементзависимую цитотоксичность, опосредованную сывороткой, содержащей донор-специфический IgG. В анализе Т-клеток, которые в основном направляли антитела против МНС класса I, обработка IdeS могла полностью десенсибилизировать пациентов P02, P04, P07 и P09 и значительно повысить степень сенсibilизации для пациента P08 (табл. 2.2). В анализе В-клеток, которые направляли антитела против МНС класса I и класса II, обработка IdeS повышала степень сенсibilизации у всех пациентов (табл. 2.3). Можно сделать вывод о том, что обработка IdeS явно снижала реактивность CDC в отношении потенциальных доноров, тем самым увеличивая шансы найти подходящего донора для всех обследованных пациентов. Также было ясно из данных, представленных здесь, что обработка IdeS была способна перевести положительный предтрансплантационный перекрестный тест в отрицательный, тем самым делая сенсibilизированного пациента подходящим для трансплантации.

Анти-HLA-анализ.

Для того чтобы убедиться в том, что снижение общего IgG после обработки IdeS отражается в сокращении уровней антител против HLA в сыворотках от сенсibilизированных пациентов, образцы, обработанные IdeS или плацебо, подвергали SAB-анализам. Матрица включала 188 аллельных вариантов МНС, включая 97 антигенов МНС класса I (HLA-A, -B и -C) и 91 антиген МНС класса II (HLA-DP, -DQ и -DR). Результаты подтвердили, что обработка IdeS могла снижать уровни IgG против HLA в сыворотке от сенсibilизированных пациентов, и можно сделать вывод о том, что реакционная способность сыворотки от всех обследованных пациентов в отношении отдельных молекул МНС класса I и класса II была значительно снижена после обработки IdeS (фиг. 11-15 и приложение I и II). Порог MFI (необработанное значение) более 1000 (иногда более 2000) довольно часто используется в качестве отсечки для значительной реакционной способности против специфического антигена HLA при рассмотрении вопроса о

трансплантации сенсibilизированному пациенту. Обработка IdeS у всех обследованных пациентов могла явно уменьшить количество HLA-антигенов, находящихся выше этих пороговых значений, как MHC класса I, так и MHC класса II (табл. 2.4 и 2.5; приложение I-II).

Введение IdeS способно переводить положительный CXM в отрицательный.

Природные антитела против структур [Gal α -1,3-Gal] (анти-Gal-антитела) являются первичными эффекторами человеческого гиперострого отторжения (HAR) нечеловеческой ткани. В отличие от большинства млекопитающих люди не имеют функционального гена α -1,3-галактозилтрансферазы (GalT) и продуцируют много антител против Gal, предположительно в ответ на GalT+ энтеробактерии (Ding et al., 2008, и Pierson, 2009). Цель состояла в том, чтобы исследовать, может ли анти-Gal-реакционная способность примата и не примата быть использована в качестве псевдомаркера для анализа влияния IdeS с использованием клинических образцов сыворотки из фазы I испытания из примера 1.

Уровень IgG измеряли в последовательных образцах сыворотки крови, взятых до и после введения здоровым испытуемым людям IdeS в дозе 0,24 мг/кг, используя валидированный PD-ELISA (табл. 2.6). Данные показали, что через 2 ч после введения дозы препарата имело место примерно 10-кратное снижение IgG, а через 24 ч после введения дозы IdeS имело место 20-кратное снижение. PD-ELISA не позволяет различить интактный полностью функциональный IgG и scIgG с ослабленной Fc-эффекторной функцией. SDS-PAGE-анализы показали, что scIgG составлял доминирующую фракцию оставшегося IgG в этих сыворотках, подтверждая, что уровень полностью функционального IgG является низким уже через несколько минут после введения IdeS (см. пример 1).

Таблица 2.2

Скрининговый анализ сывороток от сенсibilизированных пациентов (P02, P04, P07, P08 и P09), получавших IdeS или плацебо (PBS), в отношении Т-клеток из панели доноров (n равно 23).

Реакционную способность оценивали путем присвоения значения 1-8, где 1 соответствует 0% цитотоксичности, а 8 соответствует более 80% цитотоксичности

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

Таблица 2.3

Скрининговый анализ сывороток от сенсibilизированных пациентов (P02, P04, P07, P08 и P09), получавших IdeS или плацебо (PBS), в отношении В-клеток из панели доноров (n равно 23). Реакционную способность оценивали путем присвоения значения 1-8, где 1 соответствует 0% цитотоксичности, а 8 соответствует более 80% цитотоксичности

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

Таблица 2.4

SAB-анализы в отношении 31 антигена HLA-A, 50 антигенов HLA-B и 16 антигенов HLA-C. В таблице приведено число антигенов, имеющих MFI (необработанное значение) выше 1000 или выше 2000 у каждого пациента до и после введения IdeS. Пациенты P02, P04, P07, P08 и P09

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

Таблица 2.5

SAB-анализы в отношении 26 антигенов HLA-DP, 29 антигенов HLA-DQ и 36 антигенов HLA-DR. В таблице приведено число антигенов, имеющих MFI (необработанное значение) выше 1000 или выше 2000 у каждого пациента до и после введения IdeS. Пациенты P02, P04, P07, P08 и P09

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

Таблица 2.6

Уровни IgG, измеренные в образцах сыворотки от здоровых субъектов, получивших плацебо (503) или IdeS (504-506), с помощью валидированного PD-ELISA, который измеряет интактный IgG (плюс scIgG)

	[IgG] (г/л)		
	Перед введением	Через 2 ч	Через 24 ч
503	10,6	14,1	12,6
504	12,8	1,6	0,53
505	8,9	0,91	0,62
506	9,5	0,81	0,62

Для того чтобы исследовать, содержали ли образцы сыворотки человека IgG, который связывается с мышинными антигенами (например, анти-gal), клетки селезенки мыши окрашивали для FACS-анализов неразведенными последовательными образцами сыворотки, собранными до и в различные моменты после введения IdeS в дозе 0,24 мг/кг здоровым людям. Связывание IgG с клетками обнаруживали с помощью hFcγ-специфического реагента. Данные показали четкий сдвиг через 24 ч после введения IdeS, который сохранялся до 96 ч после введения (репрезентативный график на фиг. 16) в соответствии с продемонстрированным сокращением общего IgG. Продукты расщепления, т.е. F(ab')₂- и Fcγ-фрагменты, имеют быстрое выведение из циркуляции и достигают низкого уровня плато через 1-2 дня после введения IdeS (см. пример 1). Следовательно, конкуренция между потенциально оставшимся интактным IgG и F(ab')₂-фрагментами за связывание целевых антигенов, по-видимому, будет незначительной в этом анализе. Был сделан вывод о том, что образцы, собранные перед введением препарата в фазе I испытания, содержали IgG, который связывал мышинные клетки, и что введение IdeS уменьшало эту реакционную способность.

Было показано, что человеческая сыворотка обладает реакционной способностью в отношении Gal-антигенов, что является результатом фиксации комплемента IgG и IgM (Pierson, 2009). Это было подтверждено демонстрацией того, что сыворотка человека сильно реагировала в комплемент-зависимом перекрестном тесте (CDC-CXM) (тест Terasaki) против клеток селезенки мыши (Balb/c) (данные не показаны). Поскольку IdeS очень специфичен в отношении IgG, все образцы обрабатывали DTT для того, чтобы инактивировать IgM, присутствующий в анализируемых сыворотках. Последовательные образцы сыворотки, собранные перед введением препарата, через 2 ч после введения препарата и через 24 ч после введения препарата у трех здоровых субъектов (504, 505 и 506), которым вводили дозу 0,24 мг/кг массы тела, анализировали в CDC-CXM против клеток селезенки мыши Balb/c. Все образцы, собранные перед введением препарата, реагировали сильно (оценка 8), тогда как образцы, собранные через 2 ч и через 24 ч после введения IdeS, были полностью отрицательными (оценка 1) (табл. 2.7 и фиг. 17).

Таблица 2.7

Ксеногенный перекрестный тест с сыворотками здоровых субъектов (504-506), которым вводили IdeS в дозе 0,24 мг/кг, и клетками селезенки мыши Balb/c. Реакционную способность оценивали путем присвоения значения 1-8, где 1 соответствует отсутствию цитотоксичности, а 8 соответствует максимальной цитотоксичности

	Перед введением	Через 2 ч	Через 24 ч
504	8	1	1
505	8	1	1
506	8	1	1

Взяты вместе эти данные позволили сделать вывод о том, что введение IdeS может снизить сывороточный уровень специфических IgG со способностью связывать мышинные мишени клеточной поверхности, и что этот эффект сохраняется в течение нескольких дней после введения IdeS. Тот факт, что уровень IgG не восстановился уже в течение первых дней после введения IdeS, четко указывает на то, что IdeS расщеплял не только плазменный IgG, но также IgG, находящийся за пределами сосудистой системы, т.е. в межклеточной жидкости. Кроме того, сыворотка, собранная через 2 и через 24 ч после введения IdeS от пациентов, получавших IdeS в дозе 0,24 мг/кг, не могла опосредовать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) в отношении мышинных клеток-мишеней, ясно показывая, что IdeS может перевести положительный результат CMX в отрицательный.

Краткое изложение результатов для отдельных пациентов.

Пациент P02.

Сыворотка от пациента P02 показала CDC-реактивность в отношении Т-клеток от 4 доноров, и введение IdeS могло полностью нейтрализовать эту реактивность (оценка: 1) (табл. 2.2). Кроме того, сыворотка перед введением реагировала против 16 из 23 доноров В-клеток, а после введения (сниженная) реакционная способность оставалась только против двух доноров (табл. 2.3), тогда как остальные реакции были отрицательными (оценка: 1). SAB-анализы показали, что перед введением IdeS сыворотка от пациента обладала реакционной способностью (т.е. MFI более 1000) против антигенов HLA-A, -B и -C, а также против антигенов HLA-DP, -DQ и -DR (табл. 2.4 и 2.5; фиг. 11). Введение IdeS снижало реакционную способность против всех антигенов, и очень немногие (т.е. два HLA-DR-антигена) имели реактивность выше MFI: 1000 (не превышали MFI: 2000) (табл. 2.4 и 2.5; фиг. 11). Общий вывод состоит в том, что IdeS мог почти полностью или полностью десенсибилизировать сыворотку от пациента P02.

Пациент P04.

Сыворотка от пациента P04 реагировала против пяти доноров в Т-клеточном CDC-анализе, и введение IdeS могло полностью нейтрализовать эту реакционную способность (т.е. оценка: 1) (табл. 2.2). SAB-анализы для МНС класса I показали сильную реакционную способность в основном против антигенов HLA-B, но также и против некоторых антигенов HLA-A и HLA-C (табл. 2.4, фиг. 12). После введения IdeS сниженная, но значительная реакционная способность оставалась против некоторых антигенов HLA-B. Обратите внимание, что донор PC:17 имеет генотип HLA-B*35:01, и сыворотка P04 сильно реагировала в анализе CDC против этого донора (табл. 2.3). Кроме того, в SAB-анализе сыворотка сильно реагировала с антигеном HLA-B*35:01 (MFI: 21463) (приложение I). Тем не менее, введение IdeS полностью нейтрализовало реакционную способность в отношении донора PC:17 (от 8 баллов до 1), даже если реакционная способность по отношению к антигену HLA-B*35:01 в анализе SAB все еще была одной из самых высоких (MFI: 2517).

В В-клеточном CDC-тесте сыворотка сильно реагировала (т.е. оценка: 8) с 8 из анализируемых 23 доноров, и введение IdeS снижало реакционную способность против всех этих доноров (табл. 3). Сыворотка от пациента P04 была положительной в SAB-анализе против обоих антигенов HLA-DQ и HLA-DR (табл. 2.5, фиг. 12). Тем не менее, введение IdeS было очень эффективным, и после введения только два из анализируемых антигенов HLA-DR имели значительную реакционную способность. Общий вывод заключается в том, что введение IdeS является весьма эффективным для снижения реакционной способности против HLA в сыворотке от пациента P04.

Пациент P07.

Сыворотка от пациента P07 имела широкую реакционную способность в CDC-тесте и демонстрировала сильную реакционную способность (т.е. CDC-оценка: 8) в отношении 15 из 23 доноров, протестированных в Т-клеточном CDC-тесте. Введение IdeS полностью нейтрализовало (т.е. оценка: 1) реакционную способность в отношении всех этих 15 доноров (табл. 2.2). SAB-анализы МНС класса I показали высокую реакционную способность в отношении 34 протестированных антигенов HLA-B, не имеющих реакционной способности в отношении антигенов HLA-A или -C (табл. 2.5, фиг. 13 и приложение I). После введения IdeS не было значимого сигнала от антигенов МНС класса I, т.е. измеренные MFI были ниже 1000.

В В-клеточном CDC-тесте сыворотка сильно реагировала (т.е. CDC-оценка: 8) в отношении 16 из протестированных 23 доноров и, за одним исключением (донор PC:19), это были те же доноры, которые

были сильно положительными в Т-клеточном CDC-анализе (табл. 2.2 и 2.3). Это указывает на то, что большую часть реакционной способности можно было бы отнести к реакционной способности МНС класса I, так как В-клетки являются положительными и по классу I, и по классу II. Интересно отметить, что хотя IdeS уменьшает оценку против большинства протестированных доноров, IdeS не был столь же эффективен, как в соответствующем Т-клеточном CDC. Были два донора (PC:20 и PC:21), у которых IdeS полностью нейтрализовал оценку в Т-клеточном CDC, но не имел никакого эффекта в В-клеточном CDC. Возможным объяснением этого могут быть, например, очень высокие титры против антигенов класса II, или тот факт, что этот пациент имеет значительные титры антител IgM к антигенам класса II. Тем не менее, SAB-анализ ясно показывает, что пациент не имеет антител к HLA-DP или -DQ (табл. 2.5, фиг. 13 и приложение II). Пациент имеет реакционную способность от низкой до средней (т.е. MFI 1200-6500) в отношении 13 протестированных антигенов HLA-DR, и эта реакционная способность полностью нейтрализуется введением IdeS (MFI менее 160). Следовательно, трудно объяснить оставшуюся реакционную способность в В-клеточном тесте высокими титрами к антигенам II класса. Два донора (PC:20 и PC:21), у которых введение IdeS имело полный эффект в Т-клеточном CDC, но не имело никакого эффекта в В-клеточном CDC, несут следующие аллели HLA-DR: PC:20 - DRB1*11:01, DRB3*02:02 и PC:21 - DRB1*01:01, DRB1*16:01:01, DRB5*02:02. Все эти антигены присутствуют на матрице SAB. Сыворотка от пациента P07 реагирует с промежуточной реакционной способностью против DRB1*11:01 (MFI: 4552) и слабо против DRB3*02:02 (MFI: 1203), но после введения IdeS сигнал становится ниже 100 для обоих антигенов. Сыворотка не имеет реакционной способности в отношении DRB1*01:01, DRB1*16:01:01 или DRB5*02:02 ни до, ни после введения IdeS. Вывод состоит в том, что IgG против антигенов МНС класса II не может объяснить отсутствия эффекта в В-клеточном CDC с использованием этих доноров, и заманчиво предположить, что могут быть вовлечены IgM. Общий вывод состоит в том, что IdeS является весьма эффективным в снижении уровней антител против HLA в сыворотке крови от пациента P07.

Пациент P08.

Сыворотка от пациента P08 обладает высокой реакционной способностью в отношении всех протестированных доноров в Т- и В-клеточном CDC-тесте (табл. 2.2 и 2.3). В Т-клеточном тесте есть 14 доноров, у которых IdeS может полностью нейтрализовать реакционную способность, и 6 доноров, у которых IdeS не имеет никакого измеримого эффекта. В В-клеточном тесте есть 5 доноров, у которых IdeS может полностью нейтрализовать реакционную способность, и поскольку IdeS также демонстрирует полную активность в Т-клеточном тесте с использованием тех же доноров, заманчиво предположить, что эта реакционная способность просто является реакционной способностью в отношении МНС класса I. Есть целый ряд доноров, у которых IdeS не оказывает никакого влияния ни в Т-клеточном, ни в В-клеточном тесте, или у которых IdeS имеет только частичный эффект в этих тестах. Тем не менее, есть также 3 донора (PC:14, PC:16 и PC:20), у которых IdeS имеет полный эффект в Т-клеточном тесте и никакого заметного эффекта в В-клеточном тесте.

SAB-анализы ясно показывают, что пациент P08 имеет антитела к HLA-A, -B и -C, а также HLA-DP, -DQ и -DR. До введения IdeS сыворотка имеет широчайшую реакционную способность среди протестированных сывороток (табл. 2.4 и 2.5; фиг. 14). Кроме того, SAB-анализы показывают, что этот пациент имеет самые высокие титры антител против HLA (фиг. 15 и приложения I и II) среди протестированных пациентов. IdeS может явно снижать уровни антител против МНС класса I и класса II, хотя реакционная способность остается значительной (т.е. MFI более 1000) к довольно высокой доле антигенов HLA-DQ и -DR после введения. Следует отметить, что IdeS был наименее эффективен в сыворотке P08 при измерении оставшегося общего IgG (0,4 г/л), и это, естественно, отражается на уровне оставшихся антител против HLA.

Пациент P09.

Сыворотка от пациента P09 имела сильную CDC-реактивность (т.е. CDC-оценка: 8) в отношении Т-клеток от 7 доноров, и введение IdeS могло полностью нейтрализовать эту реакционную способность (табл. 2.2). Кроме того, сыворотка реагировала против 22 из 23 доноров В-клеток, и после введения (сниженная) реакционная способность оставалась против 6 доноров (табл. 2.3). SAB-анализы показали, что до введения IdeS сыворотка пациента имела реакционную способность (т.е. MFI более 1000), главным образом, в отношении HLA-A-антигенов, а также HLA-DQ- и -DR-антигенов (табл. 2.4 и 2.5; фиг. 15). IdeS снижал реакционную способность в отношении всех антигенов, и лишь несколько HLA-DQ-антигенов имели реакционную способность выше MFI: 1000 после введения. Общий вывод состоит в том, что IdeS может почти полностью десенсибилизировать сыворотку от пациента P09.

Выводы.

Обработка сывороток от сенсibilизированных пациентов, страдающих от СКД стадии 5, клинически значимыми дозами IdeS могла быстро и существенно снизить уровень общего IgG. Кроме того, эта активность непосредственно отражалась в уменьшении уровней специфических и/или обладающих широкой реакционной способностью IgG против HLA в сыворотке от этих пациентов. SAB-анализы ясно показали, что введение IdeS снижало уровень IgG-антител ко всем МНС-антигенам, которые дали положительный результат в сыворотке от всех проанализированных пациентов. В большинстве случаев реакционная способность к отдельным МНС-антигенам после введения IdeS была ниже критической MFI, т.е.

ниже 1000. В CDC-CXM против Т- и В-клеток от гипотетических доноров IdeS мог снизить реакционную способность во всех протестированных образцах сыворотки от пациентов и был способен перевести положительный перекрестный тест в отрицательный. Кроме того, сыворотка, собранная у здоровых субъектов до введения 0,24 мг/кг IdeS, сильно реагировала в CDC-CXM с мышинными клетками-мишенями, в то время как сыворотки, собранные через 2 и через 24 ч после введения IdeS, были отрицательными, что также доказывает, что введение IdeS способно перевести положительный CXM в отрицательный. Взятые вместе представленные здесь данные ясно показывают, что введение IdeS непосредственно перед трансплантацией имеет потенциал для десенсибилизации высокосенсибилизированного пациента, тем самым позволяя провести трансплантацию и избежать острого отторжения, опосредованного антителами.

Пример 2. Приложение I. Необработанные данные по MFI - антигены MHC класса I.

Таблица А

MFI (необработанные данные) против отдельных антигенов HLA-A, измеренные с помощью SAB-анализа

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

Таблица В

MFI (необработанные данные) против отдельных антигенов HLA-B, измеренные
с помощью SAB-анализа

аллель	P02		P04		P07		P08		P09	
	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS	+PBS	+IdeS
-, -, B*13:01, -, -, -	6568	239	2156	96	11940	415	5049	134	612	52
-, -, B*13:02, -, -, -	10690	467	2597	102	14834	625	6532	140	602	43
-, -, B*18:01, -, -, -	13289	640	17859	955	9574	282	4412	116	1011	64
-, -, B*27:05, -, -, -	82	12	156	23	471	17	10312	295	609	36
-, -, B*27:08, -, -, -	74	13	152	21	283	18	6053	120	288	29
-, -, B*35:01, -, -, -	14040	735	21463	2517	14472	566	6441	146	175	62
-, -, B*37:01, -, -, -	6773	187	12918	476	8835	228	17098	655	206	60
-, -, B*38:01, -, -, -	14695	712	7209	189	11384	337	5136	90	307	55
-, -, B*39:01, -, -, -	625	21	10465	304	12569	424	5273	77	177	33
-, -, B*41:01, -, -, -	1423	40	2978	89	16496	839	3424	78	128	33
-, -, B*42:01, -, -, -	1565	51	422	29	123	16	7160	174	128	33
-, -, B*44:03, -, -, -	7408	286	4611	151	14513	614	17506	446	1576	62
-, -, B*44:02, -, -, -	12112	541	3225	108	11467	396	14585	306	318	52
-, -, B*45:01, -, -, -	905	25	7774	291	17110	907	20330	605	462	48
-, -, B*46:01, -, -, -	4880	123	16562	1035	169	30	17200	673	222	79
-, -, B*47:01, -, -, -	1700	41	1045	56	13404	535	2187	62	1193	58
-, -, B*48:01, -, -, -	2621	53	16060	597	14815	569	16613	811	1493	78
-, -, B*49:01, -, -, -	19412	1338	18626	1265	16059	743	10511	178	169	53
-, -, B*50:01, -, -, -	8854	343	20304	1509	17500	932	7763	155	121	48
-, -, B*51:01, -, -, -	19766	1510	20906	1895	9227	240	3099	72	159	73
-, -, B*51:02, -, -, -	20506	1611	20995	2547	13718	515	3801	86	183	87
-, -, B*52:01, -, -, -	19436	1585	20028	1726	10231	275	3682	71	160	61
-, -, B*53:01, -, -, -	18707	1261	21303	2272	12708	410	7582	160	267	86
-, -, B*54:01, -, -, -	770	28	12971	405	632	28	14088	316	835	71
-, -, B*55:01, -, -, -	2044	64	7628	186	691	22	16497	397	162	39
-, -, B*56:01, -, -, -	6751	224	17712	1039	385	22	3469	110	247	43
-, -, B*57:03, -, -, -	18455	1192	17761	1170	150	24	4147	107	274	59
-, -, B*57:01, -, -, -	19337	1338	18733	1350	136	21	4007	110	342	58
-, -, B*58:01, -, -, -	16725	911	15316	856	170	23	8670	196	294	55
-, -, B*59:01, -, -, -	15856	819	6399	177	8852	274	14144	330	653	80
-, -, B*40:01, -, -, -	372	19	8620	267	15827	738	14576	630	735	42
-, -, B*40:02, -, -, -	318	17	10941	289	16694	856	890	34	1354	55
-, -, B*40:06, -, -, -	304	26	5967	119	14189	594	2623	69	1283	60
-, -, B*15:01, -, -, -	9919	349	19678	1672	14553	640	529	33	337	63
-, -, B*15:16, -, -, -	17630	1094	16364	993	190	27	9578	210	199	63
-, -, B*14:01, -, -, -	7479	218	3726	105	5556	136	7704	162	292	62
-, -, B*14:02, -, -, -	8348	280	2889	81	3724	102	8668	175	256	68
-, -, B*67:01, -, -, -	1276	50	8260	329	219	30	13904	365	393	65
-, -, B*07:02, -, -, -	79	12	221	23	129	14	4083	89	93	29
-, -, B*15:10, -, -, -	10301	389	18614	1329	12626	454	1122	46	262	77
-, -, B*15:03, -, -, -	8867	311	18677	1297	13782	579	2173	38	126	48
-, -, B*73:01, -, -, -	95	16	1842	65	825	32	14648	466	789	51
-, -, B*15:11, -, -, -	10379	411	18185	1319	10037	356	3259	78	286	79
-, -, B*15:02, -, -, -	11482	478	19823	1615	12558	423	1327	39	287	59
-, -, B*15:12, -, -, -	2830	54	9906	508	12454	501	19323	713	843	52
-, -, B*15:13, -, -, -	18141	1108	18294	1317	10436	287	1812	55	241	69
-, -, B*78:01, -, -, -	15049	865	20478	1730	7461	217	1111	38	116	61
-, -, B*08:01, -, -, -	1581	36	168	23	7192	163	12749	426	181	35
-, -, B*81:01, -, -, -	81	13	10132	236	134	17	15231	590	1194	5447
-, -, B*82:01, -, -, -	166	21	407	28	439	24	14058	267	227	2830
сумма	410769	22178	559523	36782	421945	16539	416138	11738	22865	12%
реактивность %	100%	5%	100%	7%	100%	4%	100%	3%	100%	

Таблица С

MFI (необработанные данные) против отдельных антигенов HLA-C, измеренные
с помощью SAB-анализа

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

Пример 2. Приложение II. Необработанные данные по MFI - антигены MHC класса II.

Таблица D

MFI (необработанные данные) против отдельных антигенов HLA-DP, измеренные
с помощью SAB-анализа

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

Таблица Е

MFI (необработанные данные) против отдельных антигенов HLA-DQ, измеренные с помощью SAB-анализа

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

Таблица F

MFI (необработанные данные) против отдельных антигенов HLA-DR, измеренные с помощью SAB-анализа

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

Ссылки.

Ding JW, Zhou T, Zeng H, Ma L, Verbeek JS, Yin D, m.fl. Hyperacute rejection by anti-Gal IgG1, IgG2a, and IgG2b is dependent on complement and Fc-gamma receptors. J Immunol. 01 januari 2008;180(1):261–8.

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

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

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

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

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

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

Pierson RN 3rd. Antibody-mediated xenograft injury: mechanisms and protective strategies. Transpl Immunol. juni 2009;21(2):65–9.

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

Vo AA, Petrozzino J, Yeung K, Sinha A, Kahwaji J, Peng A, m.fl. Efficacy, outcomes, and cost-effectiveness of desensitization using IVIG and rituximab. Transplantation. 27 Mars 2013;95(6):852–8.

von Pawel-Rammingen U, Johansson BP, Björck L. IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. EMBO J 2002 Apr;21(7):1607-1615.

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

Пример 3.

Введение.

Как показано в примерах 1 и 2, IdeS быстро расщепляет все плазменные IgG после внутривенного введения людям. Следующие данные *in vitro* и *ex vivo* показывают, что IdeS не только расщепляет растворимый IgG, как было показано ранее, но и отрезает F(ab')₂-часть В-клеточного рецепторного комплекса с поверхностных IgG-положительных В-клеток. Усечение BCR под влиянием IdeS имеет сильные ингибирующие эффекты на индукцию IgG, секретируемого CD27-положительными В-клетками памяти, активированными R848 и IL-2, в то время как секреция IgM клетками с IgM-положительными поверхностными BCR не уменьшается при введении IdeS. Это говорит о том, что введение IdeS пациентам с донор-специфическими антителами не только удаляет указанные антитела, но также делает донор-специфические В-клетки памяти (по меньшей мере, на начальном этапе) неспособными реагировать на антигены донора. Таким образом, любая начальная активация В-клеток памяти и образование плазматических клеток, которые могли бы производить больше донор-специфических антител, также нарушается.

Материал и методы.

Скрининг клеточных линий на поверхностный иммуноглобулин.

Различные клеточные линии В-клеточных лимфом человека, т.е. U-2940 (ACC634), Nu-DUL-1 (ACC579), Raji (CCL-86) и Daudi (CCL-213), подвергали скринингу на наличие мембраносвязанного IgG или IgM. Вкратце, клетки культивировали при 37°C в 5% CO₂ в RPMI1640, дополненной 10% FCS и

PEST. Клетки обрабатывали в течение 30 мин при 37°C PBS или различными концентрациями IdeS, а затем подвергали кислотному промыванию (0,1M глицин, pH 2,7, 0,5M NaCl) в течение 5 мин на льду. Кислотное промывание удаляет антитела, присутствующие на FcγR или связанные с антигеном, оставляя интактными трансмембранные молекулы (Gilden et al., 1978, Jennings et al., 2011). Клетки окрашивали биотинилированными антителами, специфическими в отношении F(ab')₂-части (№ 109-066-097, Jackson, перекрестная реактивность с легкой цепью, присутствующей во всех подклассах иммуноглобулинов) и Fc-части IgG (№ 109-066-098, Jackson, специфические в отношении тяжелой цепи IgG) или IgM (GM-80A, ICL). Стрептавидин-APC (№ 016-130-084, Jackson) использовали для мониторинга клеток в FL4 с использованием проточного цитометра Accuri C6.

Анализы пролиферации и жизнеспособности клеток.

Пролиферацию измеряли путем встраивания BrdU. Клетки обрабатывали PBS или различными концентрациями IdeS, и 5×10⁴ клеток/лунка высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч. BrdU добавляли к клеткам и инкубировали в течение 6 ч перед измерением пролиферации в соответствии с рекомендациями производителей (Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric, Roche № 11 647 229 001). Цитохалазин D (C2618, Sigma) и пуромицин (Invitrogen) использовали в различных концентрациях в качестве антипролиферативных контролей.

Для измерения жизнеспособности клеток использовали чувствительный колориметрический анализ (ССК-8). Клетки обрабатывали PBS или 30 мкг/мл IdeS, и 2×10⁴ клеток/лунка высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч. Добавляли ССК-8 (набор для подсчета клеток ССК-8, ССК-8 cell counting kit 8, Dojindo Laboratories, Япония) и измеряли абсорбцию при 450 нм в различные моменты времени. В экспериментах с клетками Nu-DUL-1 их обрабатывали PBS или 30 мкг/мл IdeS, и различное число клеток высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч перед добавлением ССК-8. В экспериментах с обогащенными В-клетками периферическую кровь собирали в гепаринизированные пробирки, дополненные IdeS с концентрацией 30 мкг/мл или PBS, и инкубировали при 37°C, 5% CO₂, в течение 30 мин. 250 мкл смеси RosetteSep® Human B cell Enrichment (№ 07905, StemCell Technologies) добавляли к 5 мл крови, хорошо перемешивали и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Образцы разводили равным объемом PBS, дополненным 2% FCS, а затем разделяли в градиенте плотности (Ficoll-PaquePLUS). Собранные В-клетки подсчитывали и их плотность доводили до 20×10⁴ клеток/мл в RPMI 1640, дополненной 10% FCS и PEST. 2×10⁴ клеток/лунка высевали в трех повторах в 96-луночные планшеты и культивировали в течение 24 ч перед добавлением ССК-8.

Эффективность нацеливания IdeS в плазме, оцениваемая путем SDS-PAGE.

Плазму, собранную при разделении в градиенте плотности гепаринизированной крови, обработанной PBS или различными количествами IdeS, использовали для проверки эффективности IdeS на растворимом IgG. Анализы SDS-PAGE проводили в соответствии с инструкциями производителя (Bio-Rad Laboratories, Калифорния, США). Вкратце, 1 мкл плазмы разделяли в 4-20% заранее приготовленных гелях Mini-PROTEAN®TGX™ (Bio-Rad) при 200 В в течение 40 мин в невозстанавливающих условиях. Гели окрашивали реагентом GelCode Blue (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) в соответствии с инструкциями изготовителя и сканировали.

Восстановление отщепленного BCR.

Клетки Nu-DUL-1 обрабатывали PBS или различными количествами IdeS в течение 1 ч при 37°C, а затем тщательно промывали, чтобы удалить весь оставшийся IdeS. Клетки высевали в 96-луночные планшеты в RPMI 1640, дополненной 10% FCS и PEST. Один планшет сразу же использовали для анализа интактного IgG путем проточной цитометрии, а другой культивировали (37°C, 5% CO₂) в течение 24 ч перед анализом. Клетки окрашивали биотинилированным антителом, специфичным в отношении F(ab')₂-части (№ 109-066-097, Jackson), а затем стрептавидином-APC (№ 016-130-084, Jackson), и клетки оценивали в FL4 с использованием проточного цитометра Accuri C6.

Периферическую кровь собирали у здоровых добровольцев в гепаринизированные пробирки (BD Vacutainer, № 367876) и обрабатывали 30 мкг/мл IdeS или PBS в течение 1 ч при 37°C до выделения PBMC путем разделения в градиенте плотности (Ficoll-PaquePLUS). Промежуточную фазу PBMC собирали, промывали в PBS и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI 1640, дополненной 10% FCS и PEST). PBMC подсчитывали, доводили до плотности 2×10⁶ клеток/мл, затем образец отбирали, фиксировали в PFA, промывали в PBS с добавлением 0,1% BSA и хранили при 4°C до анализа путем проточной цитометрии. Остальные клетки культивировали и образцы отбирали и фиксировали в PFA в указанные моменты времени. Для обнаружения F(ab')₂-части IgG использовали биотинилированное IgG против CH1 (№ 710.3202.100, BAC), для обнаружения Fc-части IgG использовали козлий античеловеческий Fc-специфический F(ab')₂-фрагмент (№ 109-066-098, Jackson). Клетки также дважды окрашивали PE-конъюгированным анти-CD19 (№ IP-305-T100, ExBio) и стрептавидин-APC (№ 016-130-084, Jackson). Популяцию лимфоцитов гейтировали с использованием прямого светорассеяния и дважды положительные клетки оценивали в FL2 и FL4 с использованием проточного цитометра Accuri C6.

Внутриклеточная фосфоспецифическая проточная цитометрия (сигналинг BCR).

Клетки Nu-DUL-1 культивировали в течение ночи в бессывороточной среде, чтобы свести к мини-

муму фоновое фосфорилирование до начала экспериментов с сигналингом. На следующий день добавляли PBS или 30 мкг/мл IdeS и клетки культивировали (37°C, 5% CO₂) в течение 30 мин. 1×10⁶ клеток удаляли и фиксировали в течение 5 мин в PFA, а затем в течение 10 мин пермеабилizовали в 70% этаноле на льду. Клетки промывали в PBS с добавлением 0,1% BSA и хранили при 4°C до анализа (нулевой образец). После сбора нулевого образца BCR оставшихся клеток сшивали путем добавления 10 мкг/мл козляного противочеловеческого F(ab')₂-специфического F(ab')₂ (Jackson № 109-006-097) и образцы клеток собирали в различные моменты времени, фиксировали и пермеабилizовали. Фиксированные клетки окрашивали для анализа путем проточной цитометрии с помощью APC-конъюгированного фосфоспецифического ERK1/2 (№ 17-9109-42, eBioscience) и PE-конъюгированного фосфоспецифического PLC-γ2 (№ 558490, BD). Клетки оценивали в FL2 и FL4 с использованием проточного цитометра Accuri C6.

Дифференцировка В-клеток памяти.

Периферическую кровь собирали у здоровых добровольцев в гепаринизированные пробирки (BD Vacutainer, № 367876) и выделяли PBMC путем разделения в градиенте плотности (Ficoll-PaquePLUS). Промежуточную фазу PBMC собирали, промывали в PBS и ресуспендировали в культуральной среде (RPMI 1640, дополненной 10% FCS и PEST). PBMC доводили до плотности 2×10⁶ клеток/мл и высевали либо с IdeS (конечная концентрация 0,3, 3 и 30 мкг/мл), либо с PBS. Клетки стимулировали смесью R848 и RIL-2 в соответствии с рекомендациями производителя (MabTech) и культивировали в течение 72-96 ч. Клетки, предназначенные для кратковременных обработок, оставляли в пробирках, дополненных PBS или IdeS, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, а затем промывали 3×12 мл PBS и 1×12 мл культуральной средой. Эти клетки высевали и обрабатывали R848/rIL-2, как описано выше.

Фильтровальные планшеты ELISpot предварительно смачивали 70% этанолом, промывали стерильной водой и инкубировали при 4°C в течение ночи с антителом захвата (набор ELISpotPLUS Mabtech № 3850-2HW-Plus для мониторинга IgG-продуцирующих клеток, набор ELISpotPLUS Mabtech № 3845-2HW-Plus для мониторинга IgM-продуцирующих клеток и набор ELISpotBASIC Mabtech № 3860-2H для мониторинга IgA-продуцирующих клеток). Фильтровальные планшеты ELISpot промывали и блокировали в течение по меньшей мере 30 мин с культуральной средой перед посевом клеток.

Клетки переносили в 15 мл пробирки, тщательно промывали, подсчитывали, доводили плотность до 0,5×10⁶ клеток/мл и готовили 2-кратные разведения, а затем клетки высевали в подготовленные фильтровальные планшеты ELISpot и культивировали в течение 24 ч. Планшеты ELISpot промывали и инкубировали с биотинилированными антителами обнаружения для анализа общего IgG, IgM и IgA (включены в названные наборы) в течение 2 ч при комнатной температуре. Планшеты промывали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со стрептавидин-HRP, а затем промывали и инкубировали с раствором ТМВ, готовым к использованию, и развивали реакцию до появления отдельных пятен. Планшеты промывали водопроводной водой и сушили в темноте. Фильтры фотографировали и пятна подсчитывали вручную.

В-клеточное обогащение и проточная цитометрия.

Для В-клеточного обогащения периферическую кровь собирали в гепаринизированные пробирки с 30 мкг/мл IdeS или PBS и инкубировали при 37°C, 5% CO₂, в течение 30 мин. 250 мкл смеси RosetteSep® Human B cell Enrichment (№ 07905, StemCell TechNO:logies) добавляли к 5 мл крови, хорошо перемешивали и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Образцы разводили равным объемом PBS, дополненным 2% FCS, а затем разделяли в градиенте плотности (Ficoll-PaquePLUS). Собранные В-клетки подсчитывали и их плотность доводили до 15×10⁴ клеток/мл в PBS, дополненном 10% FCS, а затем сеяли в V-образные 96-луночные планшеты для окрашивания в ходе проточной цитометрии. Планшеты центрифугировали со скоростью 1500 об/мин в течение 3 мин и супернатант удаляли. Для обнаружения F(ab')₂-части IgG использовали 10 мкг/мл биотинилированного IgG против CH1 (№ 710.3202.100, BAC), для обнаружения Fc-части IgG использовали 0,5 мкг/мл козляного противочеловеческого Fc-специфического F(ab')₂-фрагмента (№ 109-066-098, Jackson). Далее клетки дважды окрашивали PE-конъюгированным анти-CD19 (№ IP-305-T100, ExBio) или PE-конъюгированным анти-CD27 (№ 555441, Pharmingen), а затем стрептавидин-APC (№ 016-130-084, Jackson). Клетки оценивали в FL2 и FL4 с использованием проточного цитометра Accuri C6.

IDES расщепляет IgG-тип BCR в первом клиническом испытании на людях.

Фазу I, двойное слепое и рандомизированное испытание с отдельными увеличивающимися дозами IdeS, проводили в Лунде после утверждения шведскими нормативными и этическими органами (номер ClinicalTrials.gov: NCT01802697). Все субъекты подписывали информированное согласие перед началом каких-либо связанных с испытанием процедур. В качестве поисковой части исследования контролировали целостность IgG-типа BCR на CD19⁺ клетках в различные промежутки времени после внутривенного введения IdeS в дозе 0,12 или 0,24 мг/кг массы тела. Периферическую кровь собирали в гепаринизированные пробирки и PBMC выделяли в течение 2 ч с момента сбора путем разделения в градиенте плотности (Ficoll-PaquePLUS). Промежуточную фазу PBMC собирали, промывали в PBS и фиксировали в PFA в течение 30 мин на льду. Клетки промывали и хранили в PBS с добавлением 0,5% BSA до тех пор, пока не были собраны образцы во все моменты времени. Для обнаружения F(ab')₂-части IgG клетки ок-

рашивали с помощью 10 мкг/мл биотинилированного IgG против CH1 (№ 710.3202.100, BAC). Для обнаружения Fc-части IgG использовали 0,5 мкг/мл козьиного противочеловеческого Fc-специфического F(ab')₂-фрагмента (№ 109-066-098, Jackson). Далее клетки дважды окрашивали PE-конъюгированным анти-CD19 (№21270194, ImmuNO:tools) и стрептавидин-APC (№ 016-130-084, Jackson). Популяцию лимфоцитов гейтировали в образце перед введением дозы для каждого индивидуума, и затем этот гейт использовали для всех образцов в различные моменты времени для этого субъекта. Клетки CD19⁺ контролировали в FL2, а F(ab')₂/Fc-сигнал контролировали в FL4. Клетки CD19⁺ контролировали в M1 (FL2), и также эти клетки дополнительно контролировали на наличие сигнала при анти-Fc- и анти-Fab-окрашивании (FL4). Для каждого образца приведено число клеток в верхнем правом углу (UR), а также средняя интенсивность флуоресценции (MFI).

Кроме того, рассчитывали частоту дважды положительных клеток по следующей формуле:

$$\text{MFI в UR} \times \text{число клеток в UR} - \text{число клеток в M1}.$$

Эту формулу использовали для того, чтобы иметь возможность оценивать разницу в MFI, когда в UR присутствовало только низкое число клеток.

Результаты.

IdeS расщепляет IgG-тип BCR с такой же эффективностью, как растворимый IgG.

Четыре различных линии В-клеточных лимфом подвергали скринингу на наличие трансмембранного IgG или IgM с использованием подхода проточной цитометрии, включающего этап кислотного промывания, чтобы удалить IgG или IgM, не прикрепленные к мембране через трансмембранный домен (Gilden et al., 1978, Jennings et al., 2011). После выявления наличия IgG- или IgM-типа BCR на клеточных линиях Nu-DUL-1 (IgG-тип BCR) и Daudi (IgM-тип BCR) были выбраны в качестве моделей для дальнейшего анализа. Специфическое к Fab-фрагменту F(ab')₂-антитело использовали для обнаружения присутствия Fab-части BCR, так как антитело перекрестно реагирует с легкой цепью, присутствующей как в IgG, так и в IgM. Для того чтобы обнаружить присутствие Fc-части, использовали антитела, направленные против Fc-части IgG. Интактный мембраносвязанный IgG не мог быть обнаружен на поверхности клеток при концентрациях IdeS выше 4 мкг/мл. Клетки Daudi, имеющие IgM-тип BCR, не повреждались даже при высоких концентрациях IdeS (фиг. 19A). Клетки Nu-DUL-1 обрабатывали различными концентрациями IdeS и инкубировали при 37°C в течение 30 мин перед FACS-окрашиванием. Было показано, что IdeS эффективно удаляет F(ab')₂-часть IgG, присутствующего в BCR, оставляя отщепленную Fc-часть, прикрепленную к мембране (фиг. 19B).

Затем мы перешли к целевому расщеплению BCR на PBMC, выделенных от здоровых добровольцев. Из-за перекрестной реактивности Fab-специфического антитела с легкими цепями на IgM для окрашивания гетерогенной популяции PBMC использовали CH1-домен-специфический CaptureSelect-фрагмент против IgG. Кровь, собранную в пробирки с гепарином, обрабатывали в течение 30 мин (37°C) различными концентрациями IdeS. PBMC разделяли в градиенте плотности после обработки IdeS и собирали плазму и PBMC. Плазму анализировали на SDS-PAGE, чтобы подтвердить эффективность IdeS на растворимом IgG (фиг. 20A). ScIgG формировался уже при 0,9 мкг/мл IdeS, а полное расщепление было достигнуто при 9 мкг/мл.

Поскольку CD19 является отличительным признаком для В-клеточных линий, PBMC дважды окрашивали анти-CD19 и анти-Fab или анти-Fc, чтобы контролировать присутствие интактного IgG-BCR на В-клетках. Проточная цитометрия показала, что IdeS может удалять F(ab')₂-часть IgG с CD19⁺-клеток, оставляя Fc-часть в мембране (фиг. 20B). Поскольку однократно расщепленный мембраносвязанный IgG, присутствующий в BCR, все еще прикреплен к мембране, эффект не полностью виден при проточной цитометрии до тех пор, пока продукт scIgG присутствует и прикреплен к мембране. Полный эффект был достигнут на мембраносвязанном IgG в дозе IdeS 9 мкг/мл. Таким образом, эти результаты впервые показывают, что существует прямая корреляция между эффективностью IdeS на свободном IgG и мембраносвязанном IgG, соответственно присутствующем в В-клеточных рецепторах.

Для того чтобы более четко определить влияние IdeS на подгруппу В-клеток памяти, исследовали влияние на CD19⁺/CD27⁺ В-клетки памяти. CD19⁺ В-клетки составляют лишь несколько процентов от всей популяции PBMC. Поэтому CD19⁺ В-клетки обогащали путем отрицательной селекции (RosetteSep), которая давала более 90% CD19⁺-клеток (фиг. 21A). Примерно 10% этой популяции окрашивались дважды положительно на поверхностный IgG и CD27 перед обработкой IdeS (фиг. 21B). После обработки IdeS менее 1% CD19⁺/CD27⁺-клеток окрашивались положительно на IgG клеточной поверхности (фиг. 21B). Таким образом, эти данные впервые показывают, что BCR на В-клетках памяти с переключением класса, т.е. на клетках CD19⁺/CD27⁺/поверхностный IgG⁺, эффективно расщепляется под влиянием IdeS.

Расщепленный BCR быстро регенерирует на клеточных линиях и на PBMC и не влияет на жизнеспособность клеток.

Для того чтобы исследовать мембранный круговорот IgG-типа BCR, клетки Nu-DUL-1 обрабатывали различными концентрациями IdeS, промывали, чтобы удалить IdeS, и культивировали. Фракции клеток удаляли через 1 ч и через 24 ч после обработки и анализировали на мембраносвязанный IgG с помощью проточной цитометрии. Через час после обработки IgG не обнаруживался при концентрациях IdeS более 4 мкг/мл, а через 24 ч после обработки Fab-специфический сигнал возвращался к исходным уров-

ням, демонстрируя, что мембраносвязанный IgG восстанавливался (фиг. 22A). Клетки Nu-DUL-1 также анализировали на пролиферативную способность путем встраивания BrdU, и не было никакой разницы в пролиферации после расщепления IgG-типа BCR, даже если обработку IdeS продолжали в течение 24 ч (фиг. 22B). Вещества с известной антипролиферативной способностью (пуромицин и цитохалазин D) имели сильное антипролиферативное влияние на клетки. Жизнеспособность клеток Nu-DUL-1 исследовали также путем обработки клеток высокой дозой IdeS (30 мкг/мл) в течение 24 ч, а также жизнеспособность анализировали с использованием анализа ССК-8, и после обработки IdeS не было обнаружено никакого влияния на жизнеспособность клеток (фиг. 22C).

Можно было ожидать того, что IgG-тип BCR будет регенерировать в течение 24 ч на высокопролиферирующих лимфотических клеточных линиях, поскольку мембранный круговорот на пролиферирующих клетках, как правило, является очень высоким. PBMC от здоровых добровольцев подвергали аналогичной обработке для дальнейшего исследования круговорота IgG-типа BCR на первичных клетках. Кровь собирали в пробирки с гепарином и обрабатывали высокой дозой (30 мкг/мл) IdeS. После обработки крови PBMC разделяли на Ficoll. PBMC промывали большими объемами буфера для того, чтобы удалить весь IdeS перед культивированием. Фракцию клеток отбирали в различные моменты времени, фиксировали и окрашивали с помощью анти-CD19 для В-клеточной линии, а также окрашивали с помощью анти-Fab или анти-Fc для мониторинга IgG-BCR. IgG-тип BCR быстро регенерировал также и на нормальных CD19⁺-клетках человека, и уже через 16 ч после расщепления число анти-Fab-положительных клеток возвращалось к уровням до обработки, хотя все еще не достигало полного MFI. Это указывает на то, что через 16 ч после обработки PBMC посредством IdeS клетки снова имели инактивные IgG-BCR на поверхности, даже если все IgG-BCR еще не были заменены (фиг. 23A). Анти-Fc-сигнал не зависел от обработки, демонстрируя, что обработка IdeS отщепляла F(ab')₂ от IgG-типа BCR (фиг. 23B). Поскольку В-клетки составляют лишь несколько процентов от общей численности популяции PBMC, мы также использовали набор для обогащения В-клеток (RosetteSep), который давал более 90% CD19⁺-клеток. Примерно 20% CD19-обогащенной популяции клеток окрашивалось положительно на IgG с использованием как F(ab')₂, так и Fc-специфических реагентов (фиг. 24). Эксперимент по восстановлению клеточной поверхности повторяли с использованием этих очищенных клеток, и обработка IdeS эффективно удаляла F(ab')₂-часть мембраносвязанного IgG, оставляя Fc-часть интактной (фиг. 24A и 24B). Опять же, круговорот был быстрым, и уже через 16 ч после обработки уровень IgG клеточной поверхности восстанавливался (фиг. 24A). Далее жизнеспособность клеток оценивали в течение нескольких дней с помощью анализа ССК-8, чтобы оценить выживаемость первичных человеческих В-клеток с интактным BCR или без него. При временном удалении IgG-типа BCR из CD19-обогащенных клеток путем обработки IdeS (фиг. 25) не наблюдалось никакого существенного влияния на жизнеспособность клеток.

Обработка IdeS ингибирует BCR-сигналинг.

BCR-сигналинг играет важную роль в активации, выживании и дифференцировке В-лимфоцитов. Исходным событием после взаимодействия BCR является активация Lyn и Syk, которая затем распространяется на активацию PLC-γ2 и ERK1/2. Описанные эксперименты ясно показали, что IdeS может расщеплять IgG-тип BCR, что может иметь последствия для BCR-сигналинга. Чтобы это проверить, фосфорилирование PLC-γ2 и ERK1/2 контролировали как последующий индикатор сигнального каскада BCR. В серии экспериментов, в которых BCR на клетках Nu-DUL-1 был сшит с помощью F(ab')₂-специфического антитела, было показано, что клетки не могут передавать сигнал через BCR после обработки IdeS (фиг. 26A и 26B). Ни PLC-γ2, ни ERK1/2 не фосфорилировались в ответ на попытки лигировать BCR с использованием F(ab')₂-специфического антитела после обработки IdeS. Ложно обработанные клетки отвечали нормально. Эти данные свидетельствуют о том, что обработанные IdeS клетки с расщепленным IgG-типом BCR не могут отвечать на антигенную стимуляцию.

IdeS блокирует В-клеточное созревание.

В связи с обнаружением того факта, что IdeS не влияет на жизнеспособность клеточных линий или первичных В-клеток, но делает их неспособными отвечать на антиген, мы решили дополнительно изучить функциональность первичных В-клеток памяти. Для этого PBMC собирали, обрабатывали IdeS и стимулировали рекомбинантным IL2 и R848, чтобы активировать В-клетки памяти и дифференцировать их в Ig-продуцирующие клетки (Jahnmatz et al., 2013). После 72-96 ч клетки интенсивно промывали, чтобы удалить IdeS, и анализировали на частоту Ig-продуцирующих клеток. IdeS также добавляли на третий день IL2/R848-культуры в качестве дополнительного контроля. В этот момент невозможно остановить секрецию IgG IL2/R848-дифференцированными В-клетками. Этот контроль также показывает, что потеря сигнала возникает не из-за преходящего влияния IdeS, мешающего антителам в ELISPOT-анализе (фиг. 27A). В большинстве экспериментов IdeS присутствовал в течение всего периода стимуляции (96 ч), и результаты показали, что обработка IdeS ингибирует дифференцировку В-клеток памяти и число IgG-продуцирующих клеток, при этом не оказывает никакого влияния на созревание IgM- или IgA-продуцирующих клеток (фиг. 27A и 27B). При всех исследованных концентрациях IdeS от 0,3 до 30 мкг/мл имело место значительное влияние на дифференцировку В-клеток (фиг. 27C). Вторая серия экспериментов, в которых IdeS вымывали перед стимуляцией посредством IL2 и R848, также привела к зна-

чительному сокращению числа IgG-продуцирующих клеток (фиг. 27D), показывая, что первоначальное удаление антигенсвязывающей части IgG-BCR является важным этапом в ингибировании активации В-клеток памяти в Ig-продуцирующих клетках.

IdeS расщепляет IgG-mun BCR *in vivo* у людей.

IdeS недавно был испытан в первом исследовании на людях, в котором здоровые люди получали одну возрастающую внутривенную дозу (номер ClinicalTrials.gov: NCT01802697) (представленная рукопись). Самая высокая протестированная доза, которую вводили четырем субъектам, составляла 0,24 мг/кг массы тела. Разведочная часть испытания заключалась в анализе целостности IgG-типа BCR на циркулирующих CD19⁺-лимфоцитах в разные моменты времени точки после введения IdeS. Периферическую кровь собирали и РВМС очищали перед введением дозы, через 2 ч, 24 ч, 48 ч и 96 ч после введения. Клетки немедленно фиксировали, чтобы предотвратить дальнейший клеточный метаболизм, и хранили до тех пор, пока все временные точки от субъекта не были готовы для анализа. РВМС дважды окрашивали на CD19 и F(ab')₂ и Fc-фрагменты и анализировали с помощью проточной цитометрии. Этот способ позволяет измерять частоту и среднюю интенсивность флуоресценции клеток, имеющих F(ab')₂ (т.е. интактный IgG-тип BCR) и Fc на их клеточной поверхности. Тем не менее, этот способ не позволяет различать интактный и однократно расщепленный BCR.

Результаты показали, что число CD19⁺-клеток, которые окрашивались положительно на F(ab')₂, снижалось уже через 2 ч после обработки IdeS (0,24 мг/кг массы тела), в то время как число клеток, окрашенных положительно на Fc, не снижалось (фиг. 28). Это ясно показывает, что IdeS *in vivo* расщепляет поверхностный IgG на CD19⁺-клетках. Данные от четырех субъектов, плюс два плацебо, показали, что IdeS эффективно расщепляет IgG-тип BCR у людей, и что частота CD19⁺-клеток, которые были положительными в отношении поверхностного IgG, постепенно восстанавливалась в течение нескольких дней после введения (фиг. 29).

Обсуждение.

Представленные здесь данные ясно показывают, что IdeS расщепляет IgG-тип BCR и полностью ингибирует BCR-сигналинг в ответ на связывание рецептора. Таким образом, В-клетки с IdeS-расщепленным IgG-типом BCR оказываются неспособными связывать антиген, что приводит к потере основных клеточных событий после связывания рецептора, т.е. интернализации, обработки и представления на молекулах МНС класса II. В-клетки являются очень мощными антигенпредставляющими клетками (Lanzavecchia 1990, Avalos & Plough 2015) и могут с высокой эффективностью представлять антиген на HLA после специфического BCR-опосредованного эндоцитоза, поэтому потеря антигенсвязывающего фрагмента BCR при IdeS-расщеплении может повлиять на представление антигена CD4⁺ Т-клеткам.

Расщепление IgG-типа BCR не оказывает влияния на жизнеспособность клеток ни на клеточных линиях, ни на В-клетках, полученных от здоровых людей (фиг. 22, 23 и 25). Тем не менее, клетки, по-видимому, восстанавливаются после обработки несколько медленнее *in vivo*, чем *in vitro* (фиг. 29). Из-за очень ограниченного числа клеток, доступных для анализа в испытании фазы I на людях, другие В-клеточные маркеры не могли быть исследованы в этом поисковом испытании. Следовательно, не представляется возможным сделать выводы о судьбе какой-либо конкретной субпопуляции В-клеток. Данные согласуются с восстановлением IgG-типа BCR на расщепленных клетках за счет круговорота мембраны, как мы уже видели *in vitro*, но нельзя исключить, что небольшая задержка в восстановлении, наблюдаемая *in vivo*, происходит из-за созревания новых В-клеток, а не просто из-за круговорота мембраны.

Результаты, представленные здесь, показывают, что IdeS блокирует развитие IgG-, но не IgA- или IgM-секретирующих клеток, если IdeS используется перед активацией с поликлональной стимуляцией (IL2 и R848). Тем не менее, если IdeS используется позднее, он не имеет никакого блокирующего эффекта. При *in vitro* стимуляции РВМС в культуре антигены, связанные с BCR, интернализуются и загружаются на молекулы МНС II и представляются Т-клеткам, которые индуцируют пролиферацию и дифференцировку В-клеток (Tangye & Tralington, 2009). При отсутствии антигенной стимуляции, т.е. как в случае, когда IgG-BCR расщепляется под влиянием IdeS, В-клетка не получает второй сигнал и пролиферирует.

Кроме того, это свидетельствует о важной роли комплекса IgG-BCR в ответе на стимуляцию даже в отсутствие антигена, т.е. в поддержании тонизирующего сигнала. Было опубликовано, что мутация одной аминокислоты во внеклеточной области CD79b в BCR приводит к агаммаглобулинемии (Dobbs et al., 2007). Этот факт указывает на то, что взаимодействие между белками в BCR на внеклеточной части имеет важное значение для активации клеток, и мы предполагаем, что взаимодействие между CD79a/b и IgG имеет важное значение для образования надлежащей сигналысомы в ответ на внешние стимулы. Дальнейшее подтверждение этой теории исходит из публикации, касающейся внеклеточного домена CD79b с использованием нелигандного антитела (Hardy et al., 2014). Эти авторы обнаружили, что связывание с CD79b приводило к В-клеточной анергии и потере IgG-продуцирующих клеток как *in vitro*, так и *in vivo*. Мы полагаем, что разборка BCR путем отщепления F(ab')₂-части IgG приводит к невосприимчивости к антигензависимой активации из-за потери надлежащей внутриклеточной сборки белка и образования функциональной сигналысомы.

IdeS в настоящее время разработан для десенсибилизации высокосенсибилизированных пациентов, находящихся в списке ожидания на трансплантацию почки. У этих пациентов развиваются антитела против большинства доноров и существует мало шансов найти подходящего донора. При удалении донор-специфических антител (DSA) с помощью IdeS перед трансплантацией пациент может получить право на трансплантацию, несмотря на положительный результат перекрестного теста перед началом лечения. Дополнительный эффект введения IdeS заключается в мгновенном образовании свободных F(ab')₂-фрагментов из DSA с сохраненной связывающей способностью. Эти F(ab')₂-фрагменты могут связываться и блокировать эпитопы в трансплантате, и поскольку F(ab')₂-фрагменты потеряли свои Fc-опосредованные функции, такие как связывание комплемента (CDC), антителозависимая цитотоксичность (ADCC) и антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), то F(ab')₂-фрагменты могут иметь возможность блокировать IgM и новообразованные IgG DSA и тем самым обеспечивают дополнительную защиту трансплантата. Представленные здесь результаты показывают, что IdeS также расщепляет IgG-тип BCR на CD27⁺ В-клетках памяти и делает их неспособными отвечать на антигенную стимуляцию. Таким образом, не только DSA удаляются под влиянием IdeS, но также и DSA-специфические В-клетки памяти изначально не способны отвечать на донорные антигены. Это может потенциально оказывать долгосрочное влияние на исход выживаемости трансплантата, так как исходная активация В-клеток памяти и образование долгоживущих плазматических клеток может повлиять на лечение посредством IdeS.

Ссылки.

- Avalos A. M. & Ploegh H. (2014) Early BCR Events and Antigen Capture, Processing and Loading on MHC Class II on B cells. *Front. Immunol.* March 10:5:92
- Dal Porto JM, Gauld SB, Merrell KT, Mills D, Pugh-Bernard AE, Cambier J. B cell antigen receptor signaling 101. *Mol. Immunol.* 41(6-7), 599–613 (2004).
- Dobbs AK, Yang T, Farmer D, Kager L, Parolini O, Conley ME. (2007) Cutting edge: a hypomorphic mutation in Igbeta (CD79b) in a patient with immunodeficiency and a leaky defect in B cell development. *J Immunol.* 15;179(4):2055-9
- Hardy I, Anceriz N, Rousseau F, Seefeldt M, Irla M et al. (2014) Anti-CD79 Antibody Induces B Cell Anergy That Protects against Autoimmunity. *J Immunol.* 192: 1641–1650
- Jahnmatz M, Kesa G, Netterlid E, Buisman AM, Thorstensson R, et al. (2013) Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. *J Immunol Methods* 391: 50–59
- Johansson BP, Shannon O, Björck L (2008) IdeS: a bacterial proteolytic enzyme with therapeutic potential. *PLoS One* 3: e1692
- Johnson GL and Lapadat R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298, 1911–1912
- Kurosaki T. Regulation of B-cell signal transduction by adaptor proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 2(5), 354–363 (2002)
- Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* (1990) 8:773–93
- Manz R, Hauser A, Hiepe F, Radbruch A. (2005) Maintenance Of Serum Antibody Levels. *Annu. Rev. Immunol.* 2005. 23:367–86
- Nandakumar KS, Johansson BP, Björck L, Holmdahl R (2007) Blocking of experimental arthritis by cleavage of IgG antibodies in vivo. *Arthritis Rheum* 56: 3253-3260
- Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 1996;381(6585):751-8
- Reth M. Antigen receptor tail clue. *Nature* 338(6214), 383–384 (1989)

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

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

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

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

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

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

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

von Pawel-Rammingen U, Johansson B P and Björck L, (2002). IdeS, a novel streptococcal cysteine proteinase with unique specificity for immunoglobulin G. *EMBO J* 21: 1607-15

Wenig K, Chatwell L, von Pawel-Rammingen U, Björck L, Huber R and Sonderrmann P, (2004). Structure of the streptococcal endopeptidase IdeS, a cysteine proteinase with strict specificity for IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17371-6

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

Пример 4.

Следующее исследование было проведено с целью определения, можно ли нацелить BCR B-клетки, которая была обработана IdeS.

Материалы и методы.

Вкратце, двухступенчатые разведения клеток (Nu-DUL-1, B-клеточная лимфома с IgG-типом BCR; ACC 579 из DSMZ) от 80000/лунка до 1250/лунка в среде R10 (RPMI1640, PEST и 10% FCS) высевали в двух повторах в 96-луночные плоскодонные полистирольные планшеты и использовали в качестве калибратора жизнеспособных клеток. 20000 клеток/лунка высевали в планшет и инкубировали с 30 мкг/мл IdeS или без него при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 1 ч. Анти-Fab, анти-Fc или контроль добавляли в тестируемые лунки в конечной концентрации 10 мкг/мл, и планшет инкубировали при 37°C в CO₂-инкубаторе. Первый планшет удаляли через 3 ч, второй через 24 ч, а третий через 48 ч. После удаления планшета из инкубатора добавляли реагент ССК-8 (из набора для подсчета клеток ССК-8; Dojindo Laboratories, Япония) и продолжали инкубацию в течение 1 ч, а затем с планшета считывали сигнал при длине волны 450 нм в ELISA-планшетном ридере (спектрофотометре). Анализ ССК-8 является чувствительным колориметрическим анализом для определения жизнеспособности клеток в анализах клеточной пролиферации и цитотоксичности. Используемым анти-Fab-агентом был F(ab')₂-специфический козлий F(ab')₂-фрагмент (Jackson № 109-006-097, 1,3 мг/мл). Используемым анти-Fc-агентом был Fc-специфический козлий F(ab')₂-фрагмент (Jackson № 109-006-098, 1,3 мг/мл). Контролем был мышинный γ-глобулин (Jackson № 015-000-002, 11,4 мг/мл). Контроль был выбран так, чтобы он был от того же производителя, что и тестируемый анти-Fab и анти-Fc, и потому, что мышинный IgG не расщепляется под влиянием IdeS.

	Анти-Fab			Анти-FC			Контроль IgG			
	3 ч	24 ч	48 ч	3 ч	24 ч	48 ч	3 ч	24 ч	48 ч	
PBS	25665	18514	7969	21569	8568	3112	21569	23598	24386	Среднее число жизне- способных клеток
IdeS	25026	29347	25211	23005	9104	979	21569	21583	22469	
PBS	1013	288	212	1015	332	446	884	504	1114	Ст. откл.
IdeS	1718	664	355	1940	1780	427	1665	489	374	

Результаты и выводы.

Результаты показывают, что сшивание BCR на клетке-мишени, экспрессирующей IgG-тип BCR (в данном случае клеточной линии В-клеточной лимфомы), индуцирует клеточную гибель с использованием антител, направленных против F(ab')₂- или Fc-части. Непосредственное применение BCR в качестве мишени, тем не менее, не представляется возможным у людей перед введением IdeS из-за наличия нормальных IgG-уровней (примерно 10 мг/мл) в кровотоке. Тем не менее, предварительное введение IdeS может уменьшить уровни антител, оставшихся в кровотоке, при этом оставляя Fc-фрагмент на клетках-мишенях по-прежнему доступным для терапевтического вмешательства. Нацеливание на Fc-фрагмент после IdeS-расщепления, по меньшей мере, является столь же эффективным на IdeS-обработанных клетках, как на мнимо обработанных клетках. Терапевтическое вмешательство может быть осуществлено с помощью антитела, нацеленного на эпитоп, который создается в BCR как следствие расщепления IdeS, или даже путем нацеливания на общий эпитоп на Fc (как показано здесь). Терапевтическое антитело предпочтительно является таким, которое не расщепляется IdeS и имеет высокую степень Fc-эффекторных функций, т.е. CDC, ADCC и ADCP. Антитело также может быть соединено с цитотоксическим агентом, т.е. радиоизотопом или токсином.

Другая возможность обеспечивается значительно более быстрым восстановлением интактных IgG на мембраносвязанном BCR по сравнению с восстановлением IgG в кровотоке. Это дает возможность использовать в качестве мишени F(ab')₂-часть, а не только Fc-часть. Восстановление IgG-BCR на В-клетках памяти открывает возможность применения антигенов (связанных с токсинами или радиоизотопами) для специфического нацеливания на В-клетки памяти с определенными нежелательными специфичностями (т.е. против HLA или против инсулина).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения преимуществ терапии для субъекта, который включает: (а) введение субъекту белка, обладающего активностью IgG-цистеинпротеазы, который представляет собой IdeS; и (b) последующее проведение указанной терапии у субъекта, где

указанная терапия представляет собой трансплантацию органа;

количество вводимого указанного белка является достаточным для того, чтобы устранить Fc-рецепторное связывание, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке крови субъекта; а также

этапы (а) и (b) разделены временным интервалом, который является достаточным для устранения Fc-рецепторного связывания, по существу, всеми молекулами IgG, присутствующими в сыворотке крови субъекта, и составляет от 1 ч до не более 6 ч;

где, кроме того, количество вводимого IdeS находится в диапазоне от 0,01 до 1 мг/кг массы тела, и где субъектом является человек.

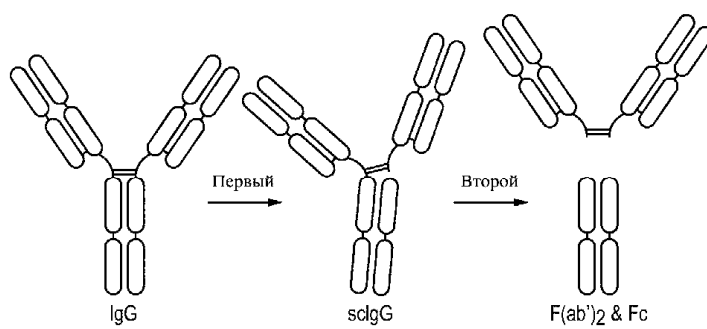
2. Способ по п.1, в котором указанный белок вводят путем внутривенной инфузии.

3. Способ по любому из пп.1, 2, в котором временной интервал между этапами (а) и (b) составляет от 1 до 2 ч, от 1 до 3 ч, от 1 до 4 ч, от 1 до 5 ч, от 1 до 6 ч, от 2 до 3 ч, от 2 до 4 ч, от 2 до 5 ч, от 2 до 6 ч, от 3 до 4 ч, от 3 до 5 ч, от 3 до 6 ч, от 4 до 5 ч, от 4 до 6 ч или от 5 до 6 ч.

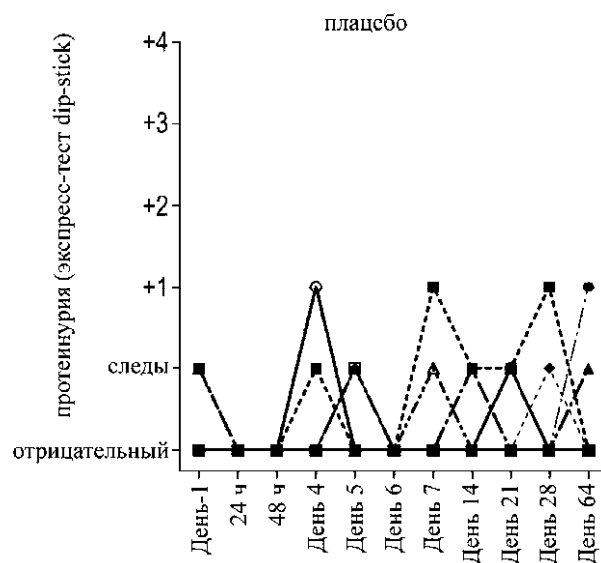
4. Способ по любому из пп.1-3, где указанная трансплантация органа представляет собой трансплантацию почки, печени, сердца, поджелудочной железы, легкого или тонкого кишечника.

5. Способ по любому из пп.1-4, который также включает этап, проводимый во время или непосредственно перед трансплантацией, который включает индукцию супрессии Т-клеток и/или В-клеток у пациента.

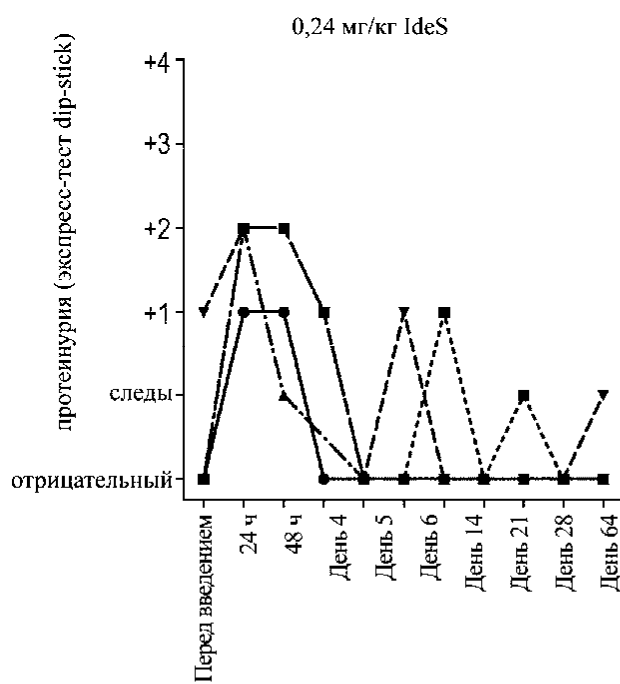
6. Способ по п.5, где указанная индукция супрессии включает введение эффективного количества по меньшей мере одного из муромонаба, базиликсимаба, даклизумаба, антитела против тимоцитарного глобулина (ATG), лимфоцитарного иммуноглобулина, препарата глобулина против тимоцитов (ATGAM) или ритуксимаба.



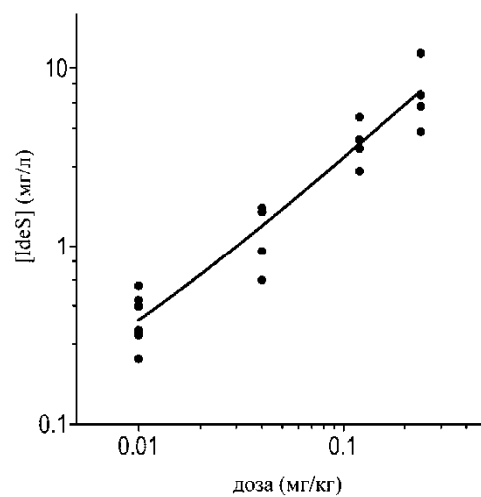
Фиг. 1



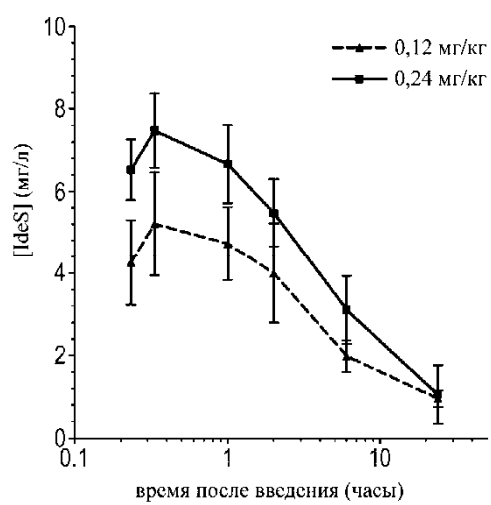
Фиг. 2А



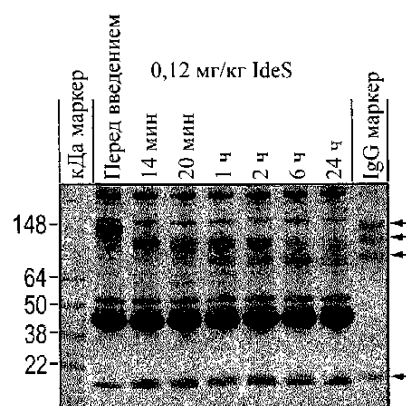
Фиг. 2В



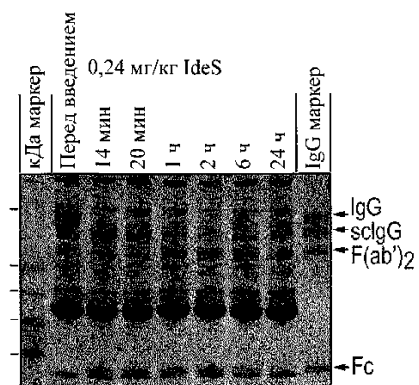
Фиг. 3А



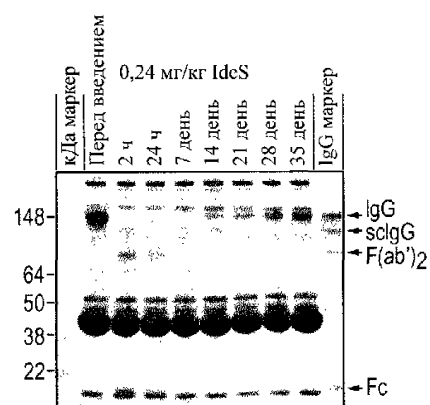
Фиг. 3В



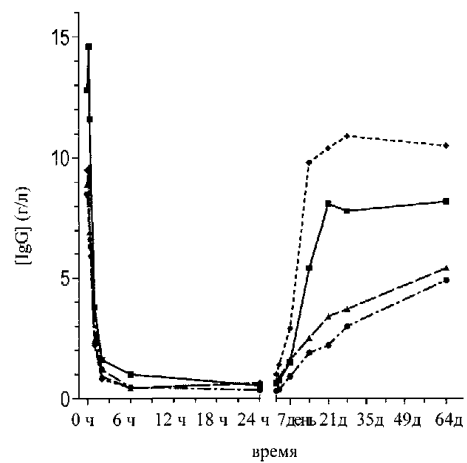
Фиг. 4А



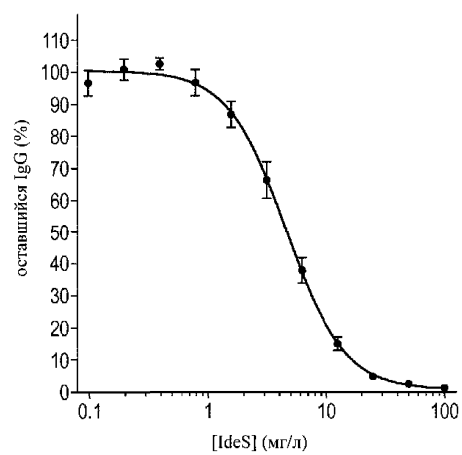
Фиг. 4В



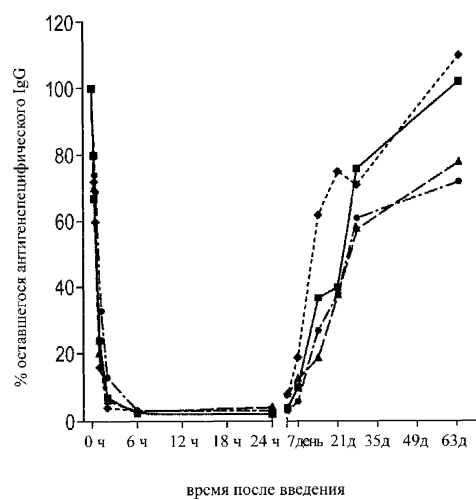
Фиг. 4С



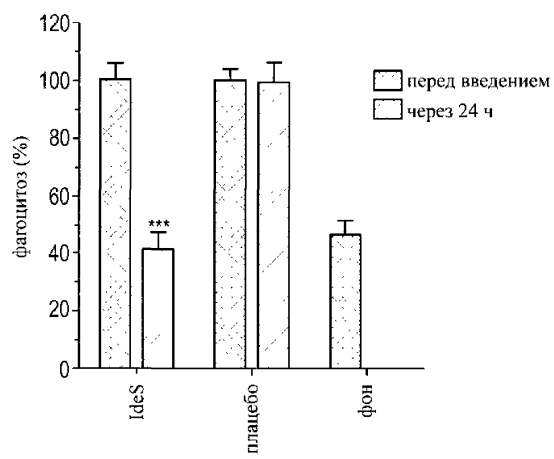
Фиг. 5



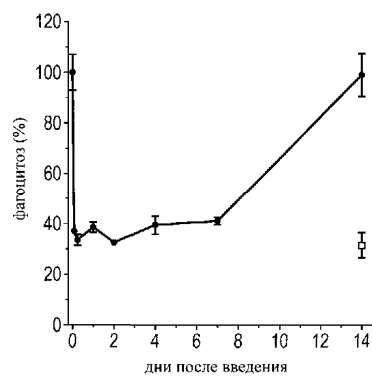
Фиг. 6



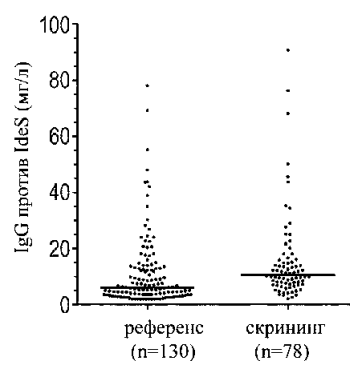
Фиг. 7



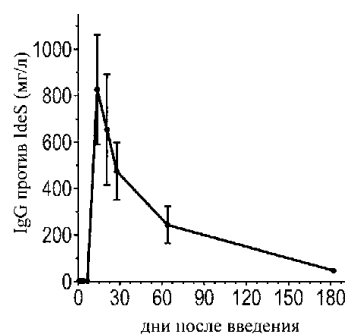
Фиг. 8А



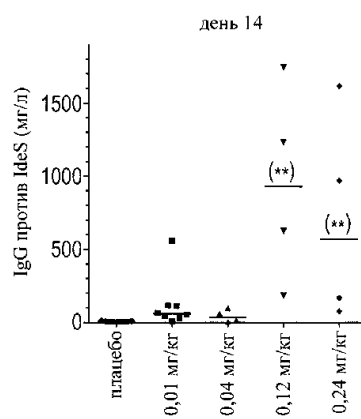
Фиг. 8В



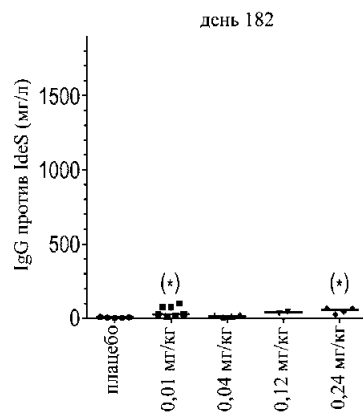
Фиг. 9А



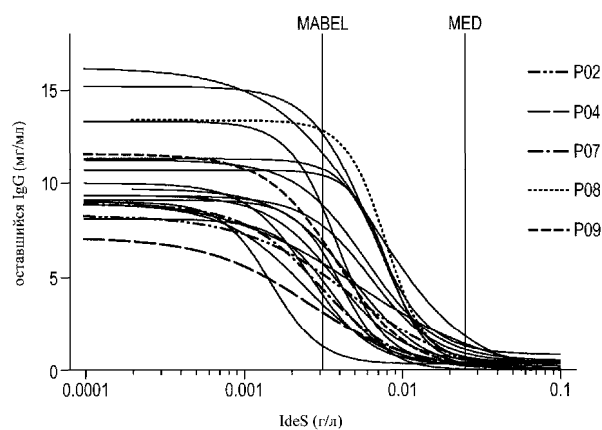
Фиг. 9В



Фиг. 9С

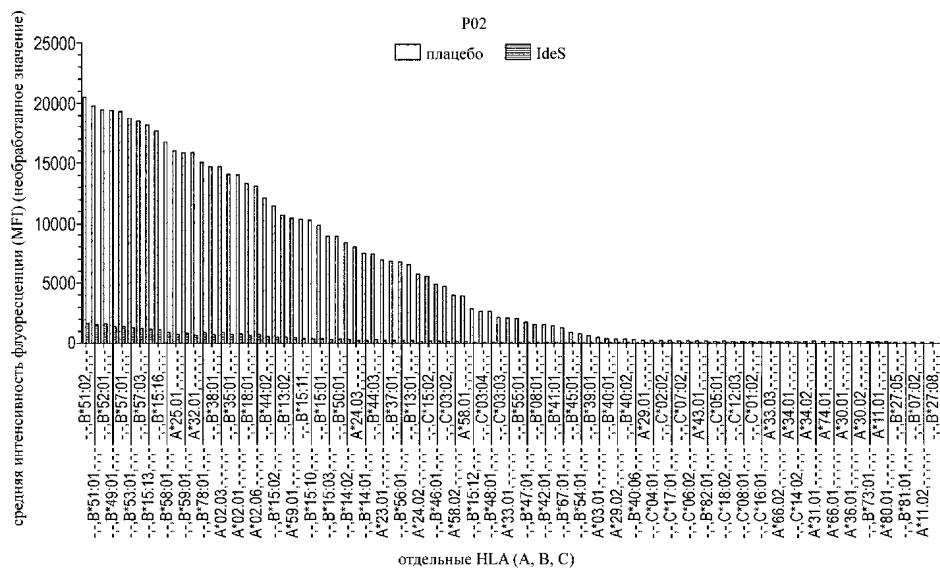


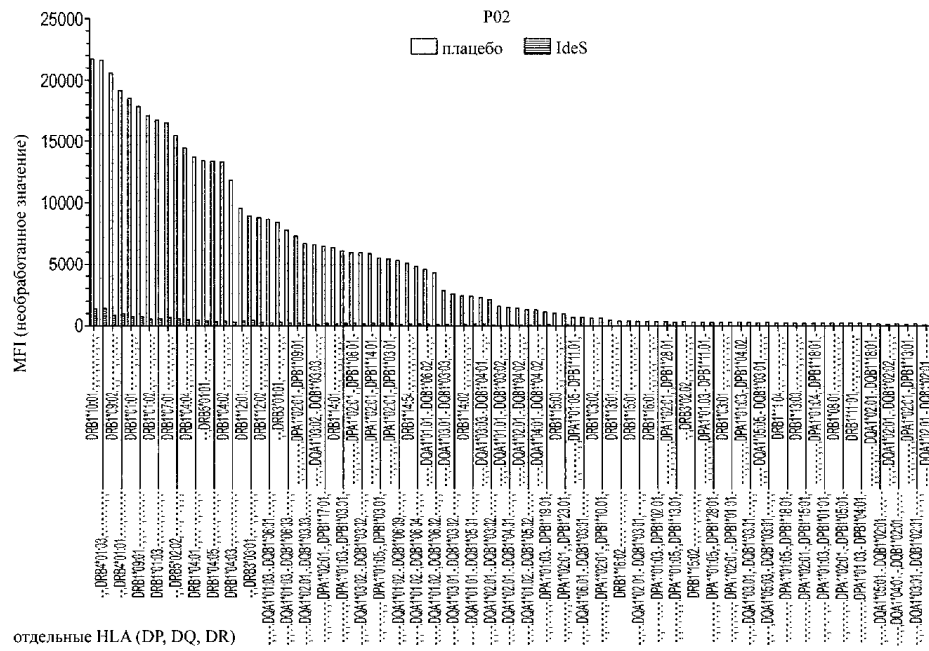
Фиг. 9D



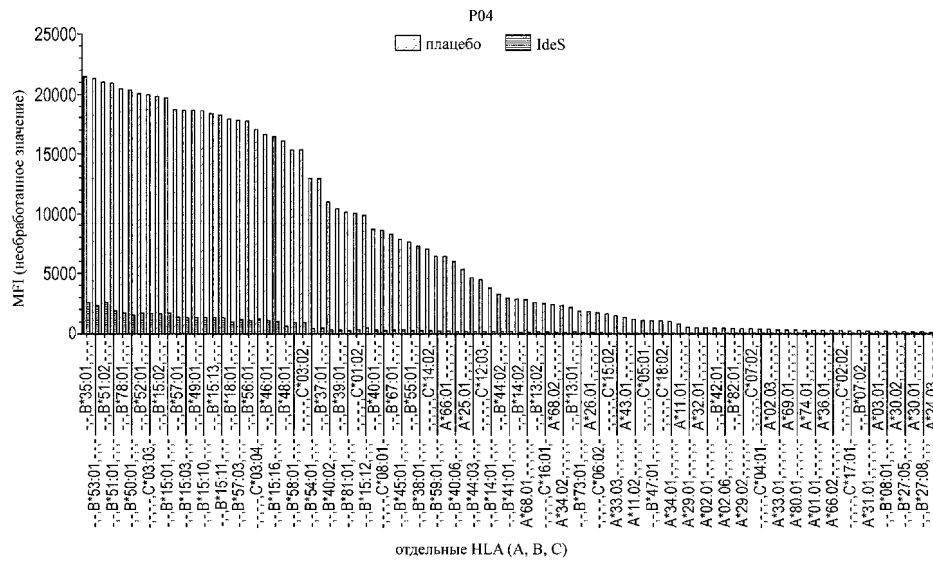
MABEL - доза, оказывающая минимальное ожидаемое биологическое действие
MED - минимальная действующая доза

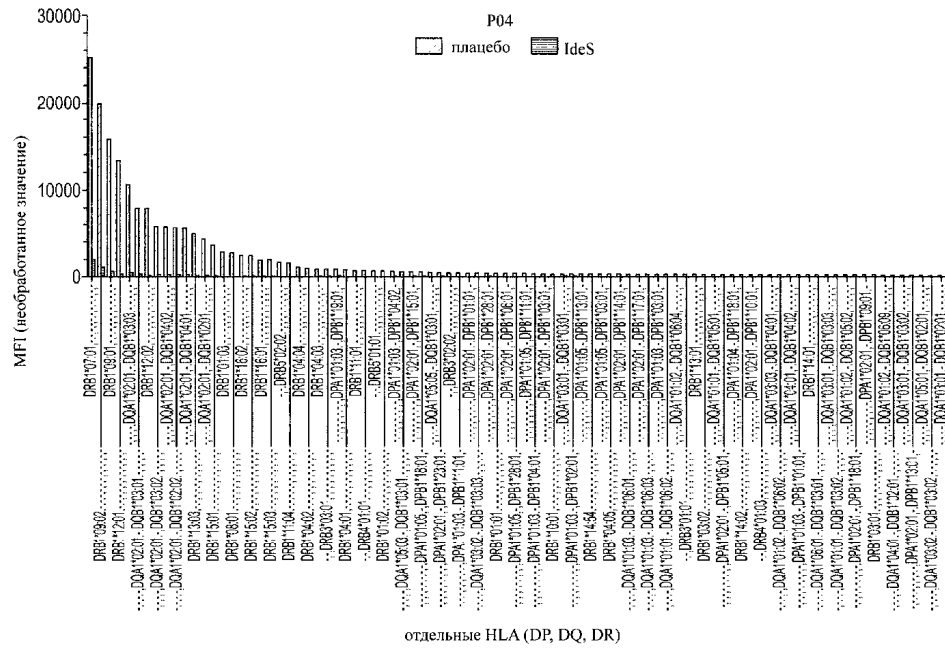
Фиг. 10



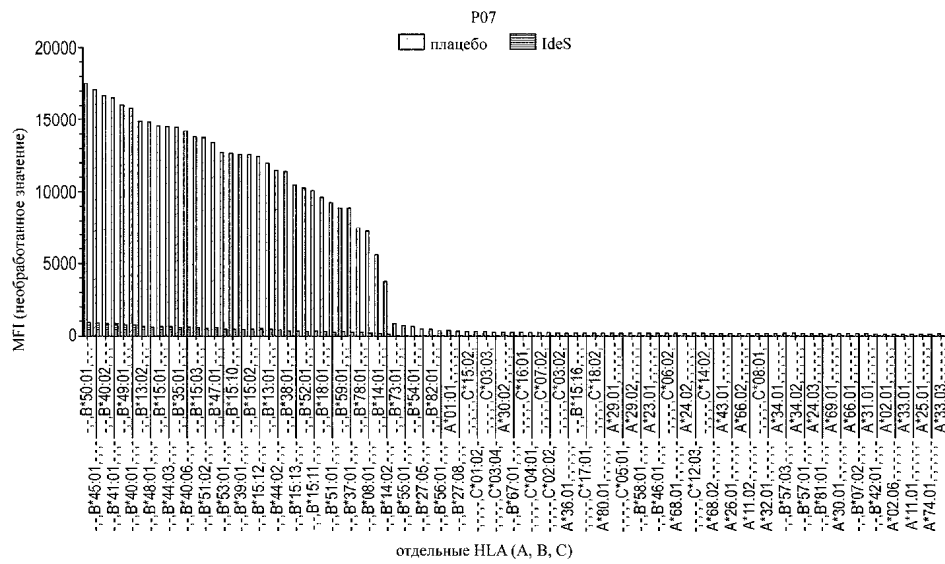


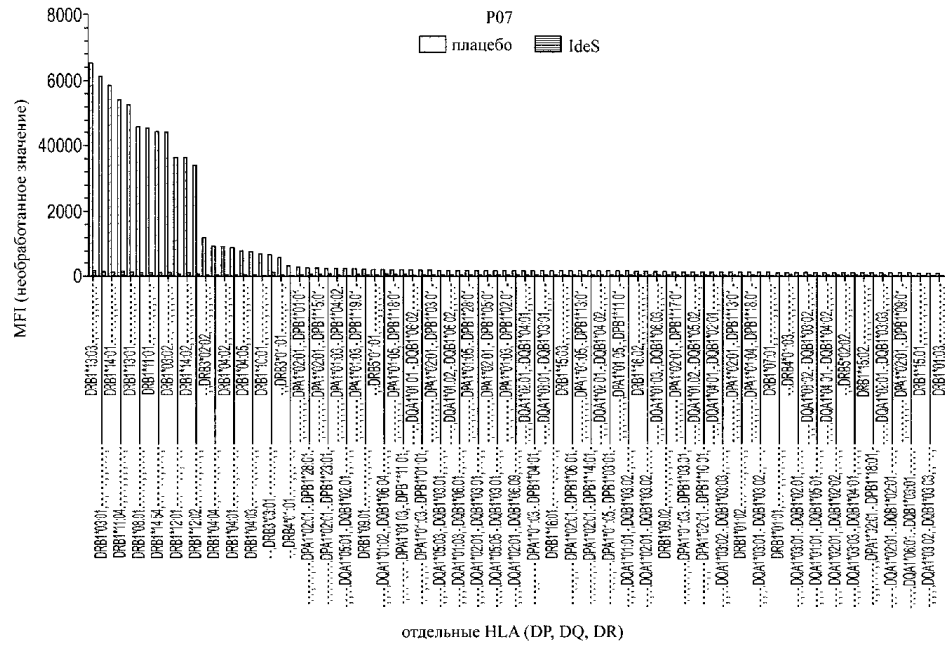
Фиг. 11



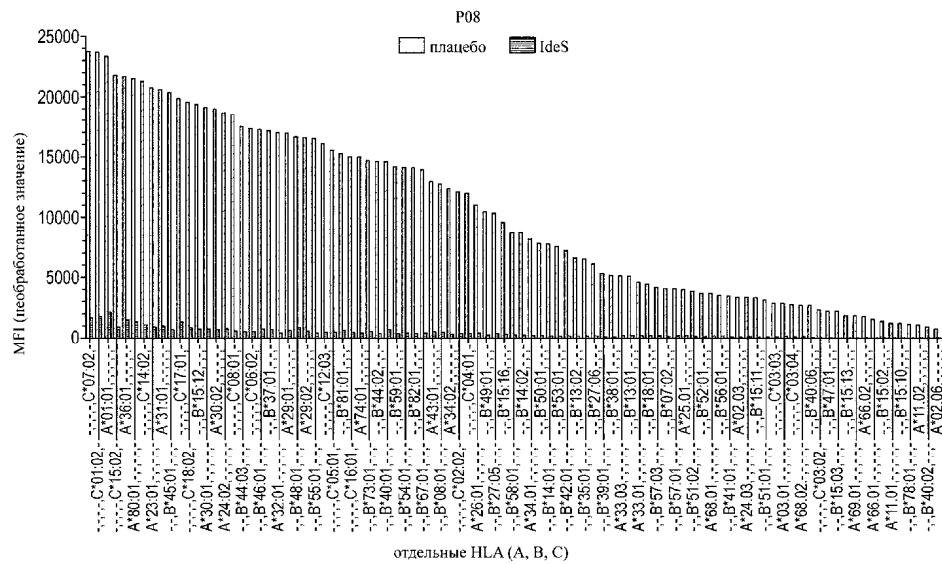


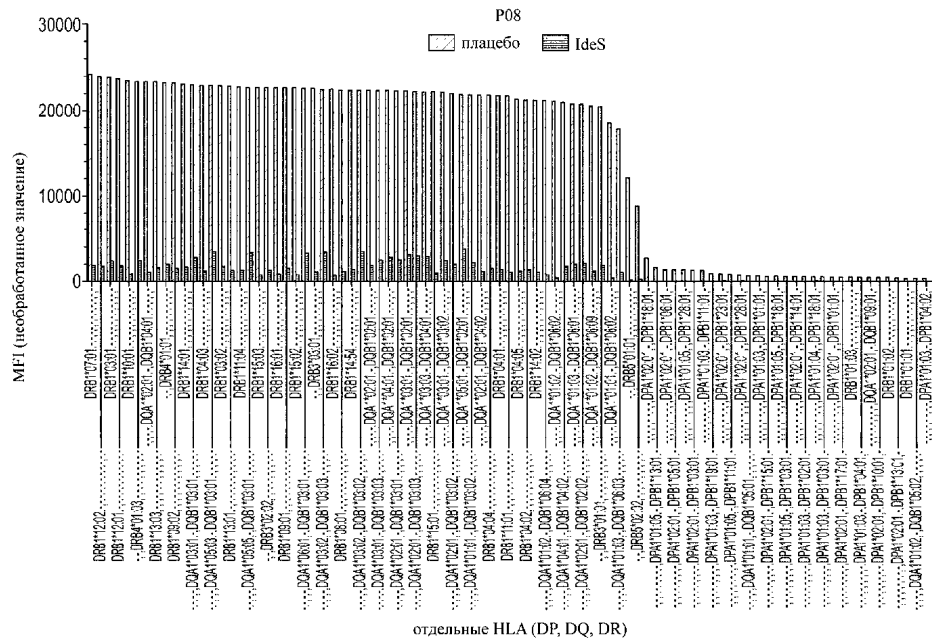
Фиг. 12



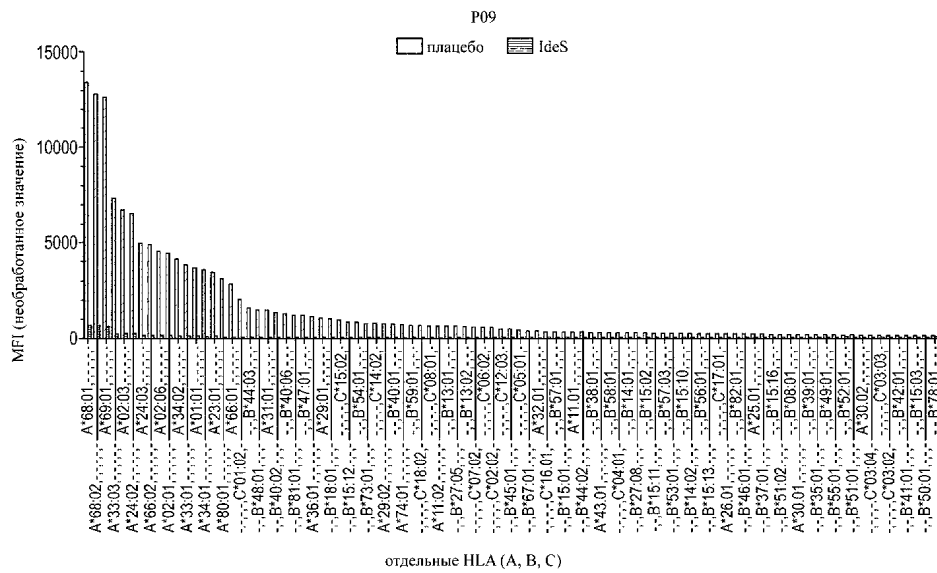


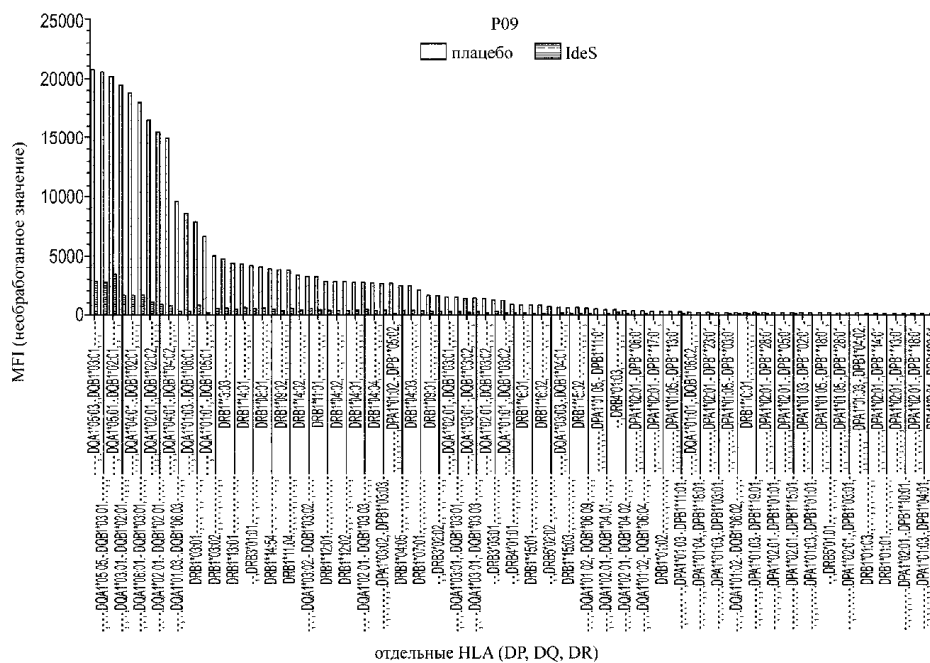
Фиг. 13



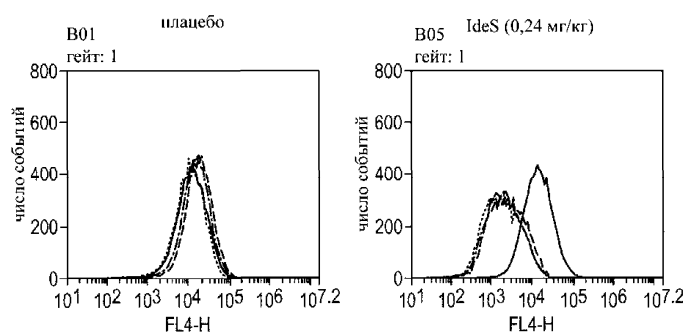


Фиг. 14

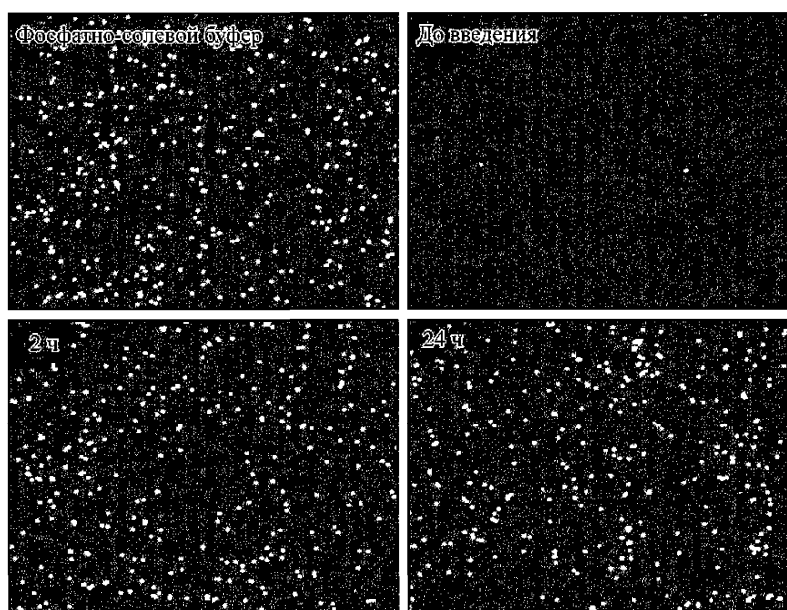




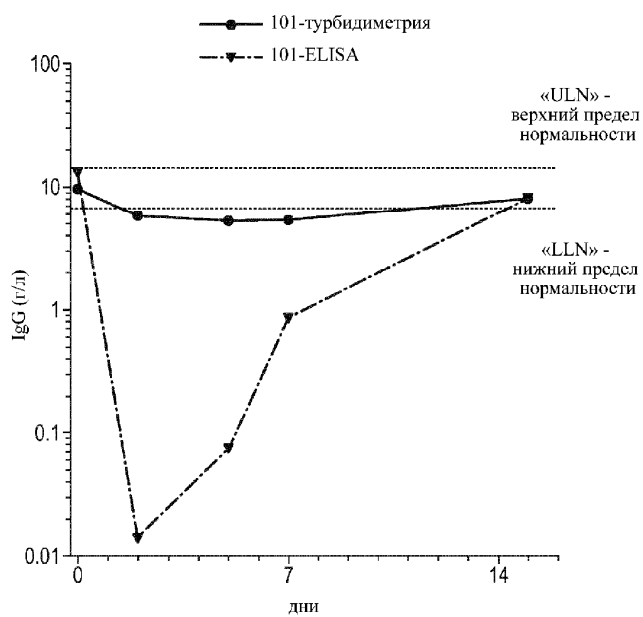
Фиг. 15



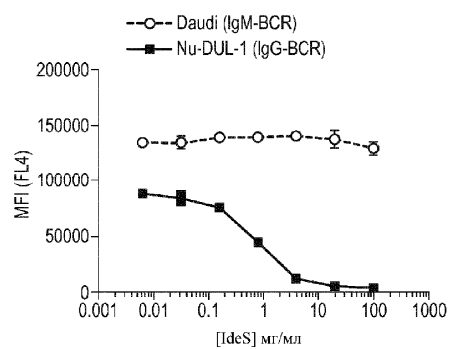
Фиг. 16



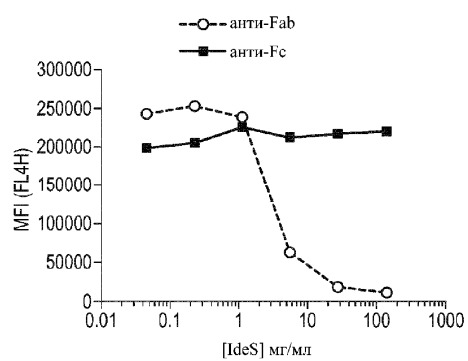
Фиг. 17



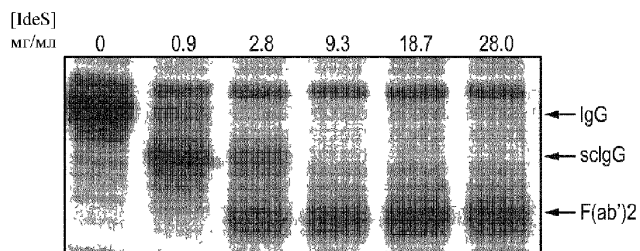
Фиг. 18



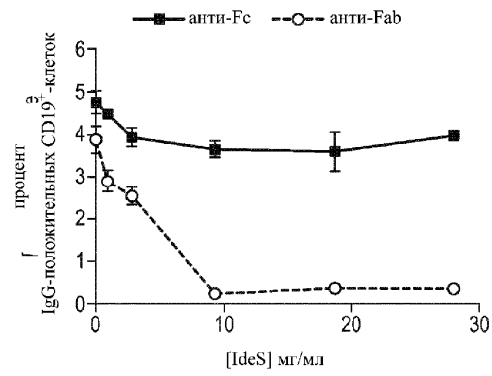
Фиг. 19А



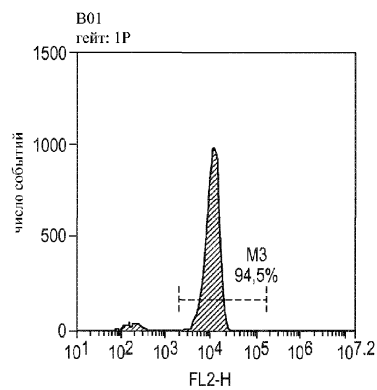
Фиг. 19В



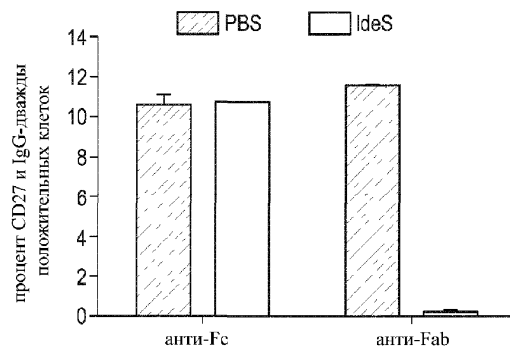
Фиг. 20А



Фиг. 20В

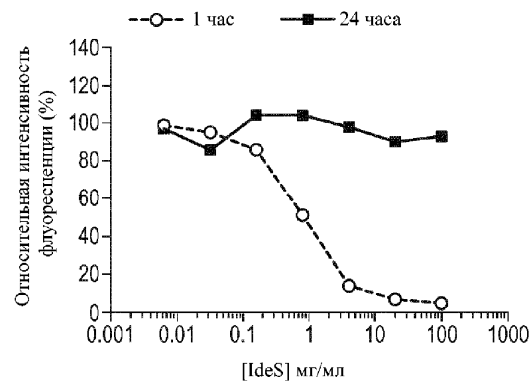


Фиг. 21А



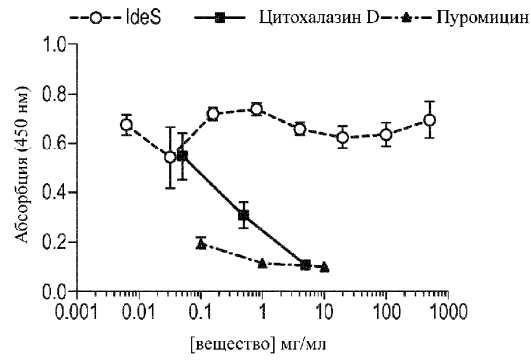
«PBS» - фосфатно-солевой буфер

Фиг. 21В



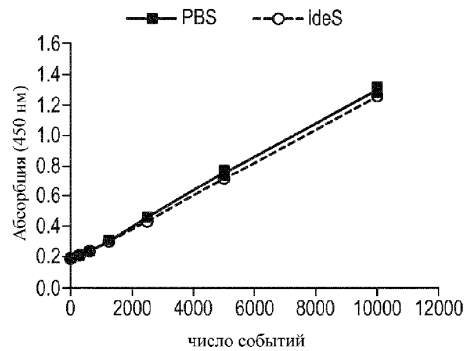
Фиг. 22А

пролиферация (встраивание BrdU)



Фиг. 22В

жизнеспособность (ССК-8)

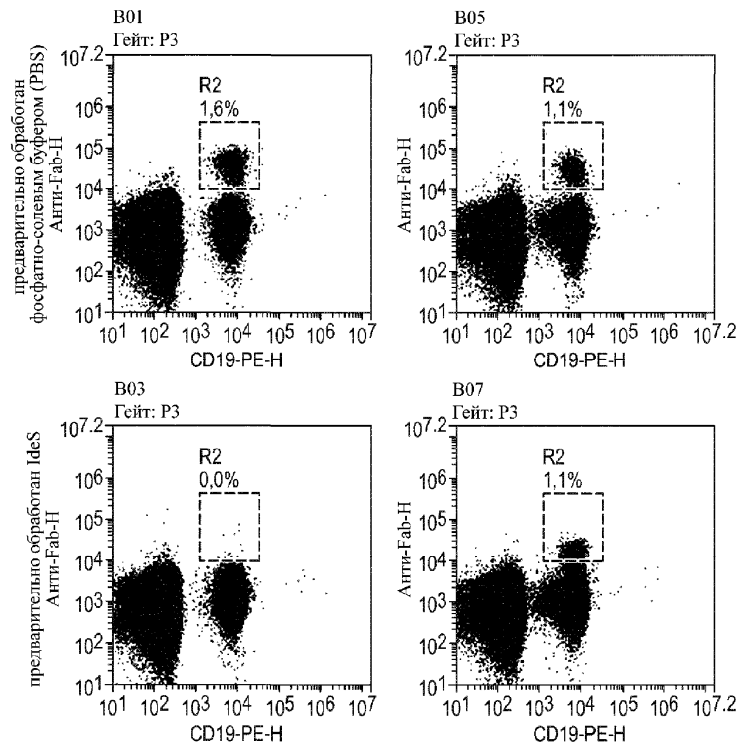


«PBS» - фосфатно-солевой буфер

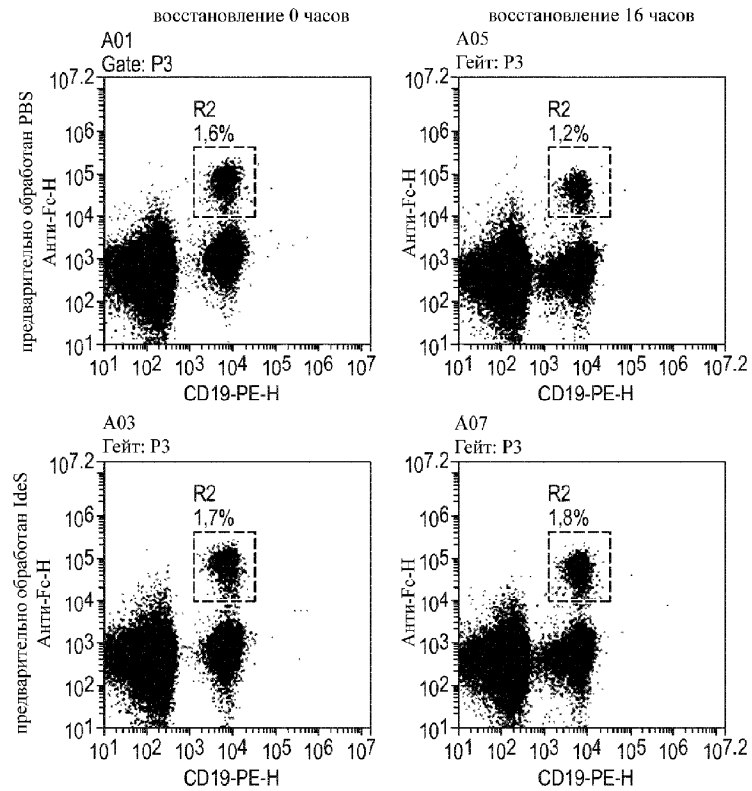
Фиг. 22С

восстановление 0 часов

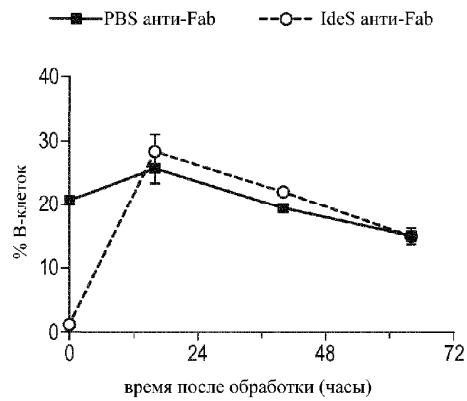
восстановление 16 часов



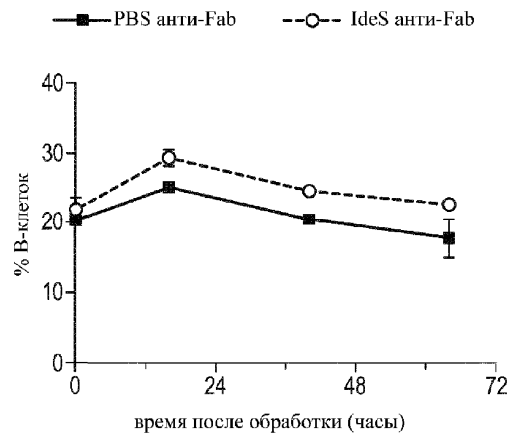
Фиг. 23А



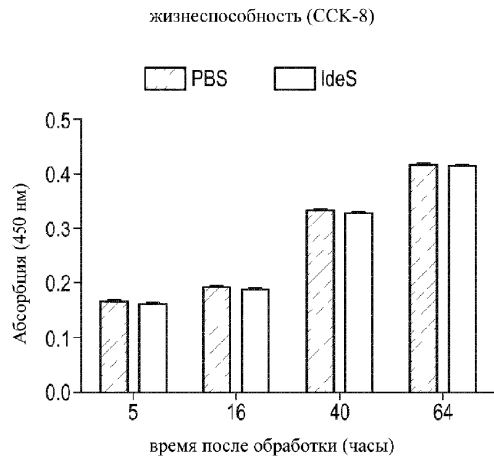
Фиг. 23В



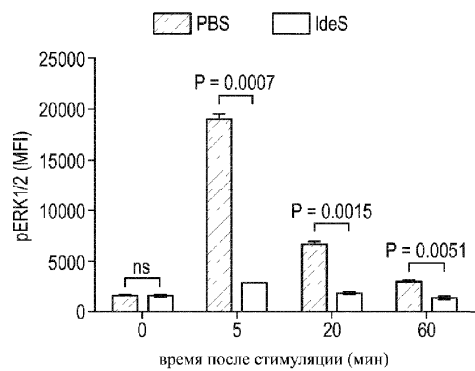
Фиг. 24А



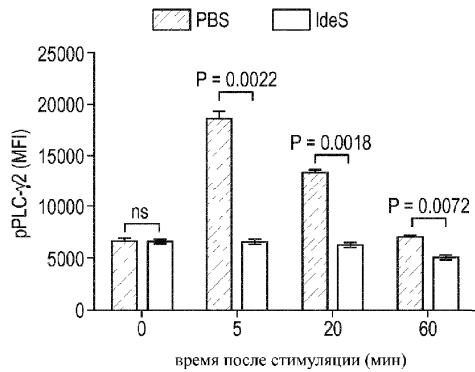
Фиг. 24В



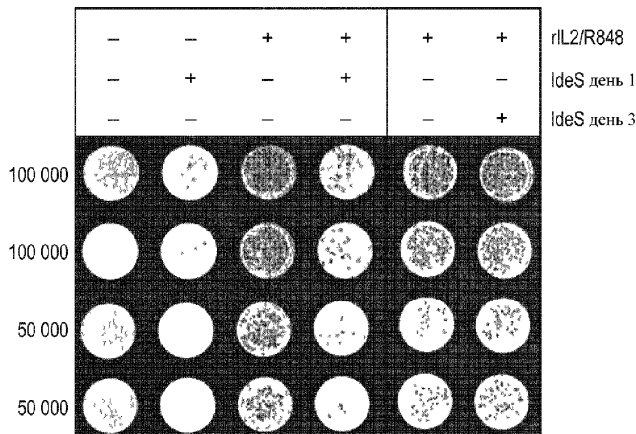
Фиг. 25



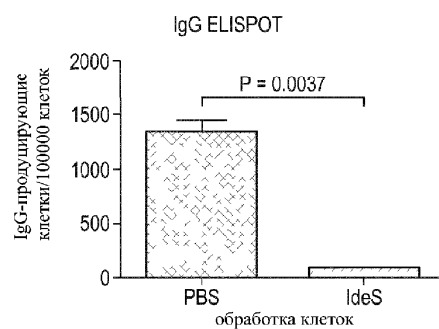
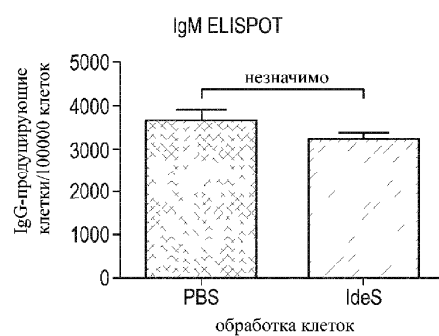
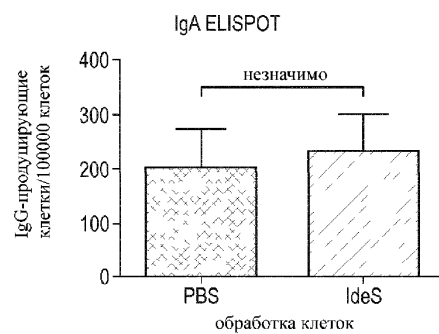
Фиг. 26А



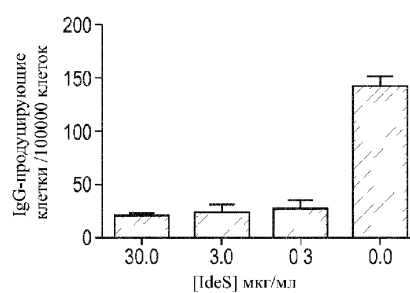
Фиг. 26В



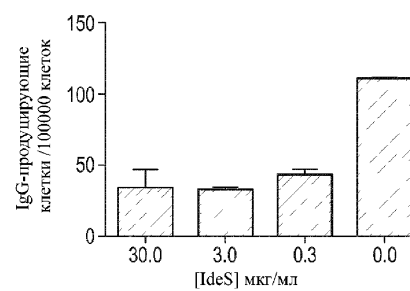
Фиг. 27А



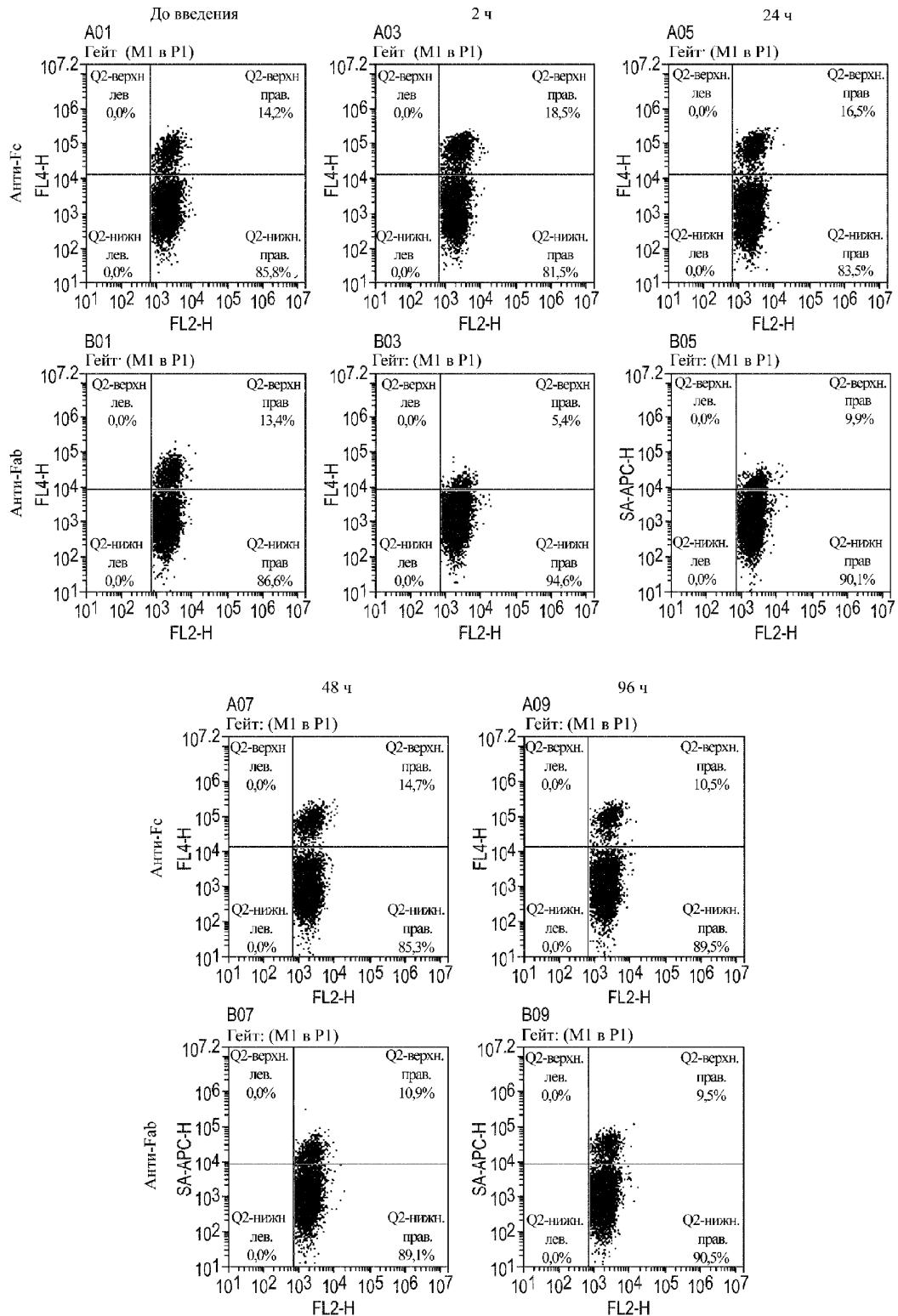
Фиг. 27В



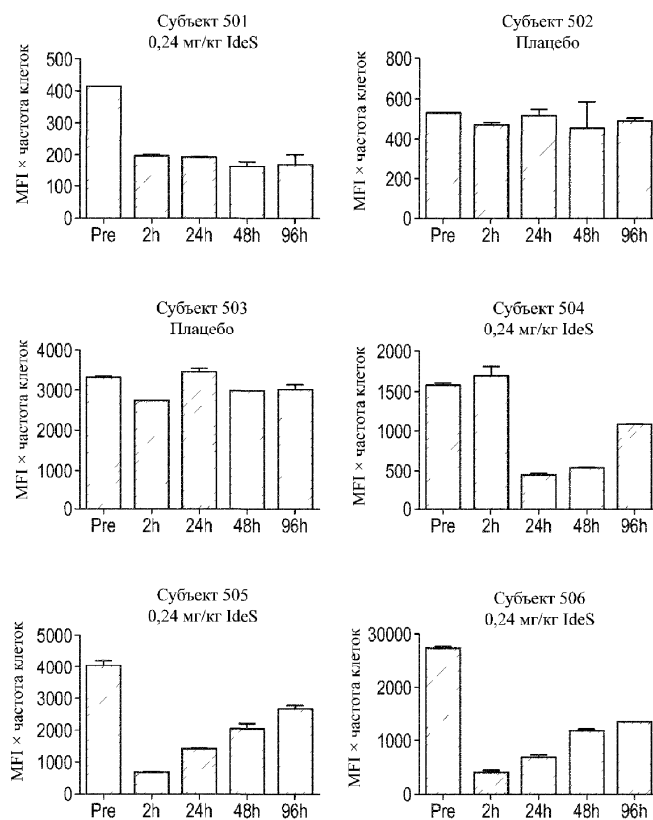
Фиг. 27С



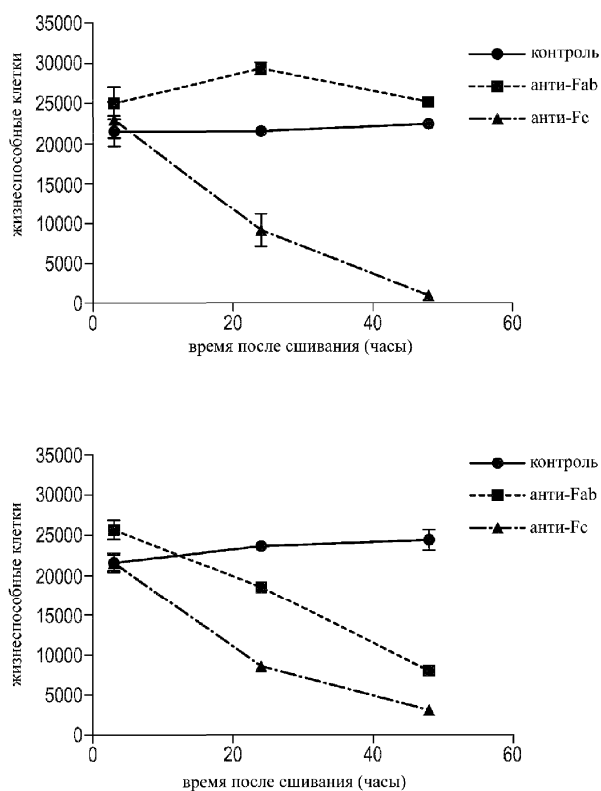
Фиг. 27D



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30

