



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110831975 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201880040765.4

(22)申请日 2018.04.20

(30)优先权数据

2017901462 2017.04.21 AU

2018900762 2018.03.08 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2018/050357 2018.04.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/191786 EN 2018.10.25

(71)申请人 因普利西特生物科学私人有限公司

地址 澳大利亚昆士兰州

(72)发明人 加里·卢埃林·雷德里希

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

代理人 李敏春 郑霞

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 25/02(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

权利要求书7页 说明书32页

序列表11页 附图3页

(54)发明名称

用于治疗神经退行性疾病的CD14拮抗剂抗体

(57)摘要

本发明总体上涉及用于治疗神经退行性疾病的发展或进展的剂和方法。特别地,本发明涉及CD14拮抗剂,用于在治疗神经退行性疾病,包括运动神经元疾病(MND)和痴呆疾病或相关症状的发展或进展中使用。本发明还提供了包含这样的剂的组合物。

1. 一种抑制或减少由患有神经退行性疾病的受试者的外周的哺乳动物细胞产生促炎介质的方法,所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:使膜结合的CD14(mCD14)或可溶性CD14(sCD14)与足以抑制或减少由外周细胞产生促炎介质的量的CD14拮抗剂抗体接触。

2. 一种用于治疗受试者的神经退行性疾病或其症状的发展或进展的方法,所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向所述受试者全身施用有效量的CD14拮抗剂抗体。

3. CD14拮抗剂抗体用于治疗神经退行性疾病的发展或进展的用途,其中所述CD14拮抗剂抗体被全身施用。

4. 根据权利要求3所述的用途,其中所述CD14拮抗剂抗体被制造为用于所述应用的药物。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体抑制或减少由所述受试者的外周细胞产生一种或更多种促炎介质。

6. 根据权利要求5所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体结合mCD14和sCD14两者。

7. 根据权利要求1、权利要求5或权利要求6所述的方法或用途,其中所述外周细胞是免疫细胞。

8. 根据权利要求7所述的方法或用途,其中所述免疫细胞选自单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或T细胞。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法或用途,其中所述促炎介质是选自以下中的一种或更多种的细胞因子:肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1) - α 、IL-6、IFN- γ 、IFN- β 、IL-1 β 、IL-8、IL-17和IL-18。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法或用途,还包括鉴定所述受试者患有神经退行性疾病或具有发展神经退行性疾病的风险,合适地在所述CD14拮抗剂抗体的施用之前鉴定。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法或用途,其中所述神经退行性疾病或紊乱选自MND或痴呆。

12. 根据权利要求11所述的方法或用途,其中所述MND选自由以下组成的组:肌萎缩性侧索硬化(ALS)、原发性侧索硬化(PLS)、进行性肌萎缩(PMA)、进行性延髓麻痹(PBP)、假性延髓麻痹。

13. 根据权利要求12所述的方法或用途,其中所述MND是ALS。

14. 根据权利要求11所述的方法或用途,其中所述痴呆选自由以下组成的组:阿尔茨海默病、路易体痴呆、额颞叶痴呆(FTD)和血管性痴呆。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体选自:

(1) 一种抗体,包含:

VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGNSFMHWYQQKAGQPPKSSIYRAANLESGI
PARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFCQQSYEDPWTFGGGTKLGNQ [SEQ ID NO: 1] (3C10 VL)

VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

LVKPGGSLKLSCVASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGTTYYPDNVKGRI
TISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYICARGYYDYHYWGQGTTLTVSS [SEQ ID NO: 2] (3C10 VH)

;

(2) 一种抗体,包含:

VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQS
GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCCQQSNEDPTTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 3] (28C5 VL)

;

VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSY
NPSLKSRIITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTTLTVSA [SEQ ID NO: 4] (28C5 VH)

;

(3) 一种抗体,包含:

VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

QTPSSLSASLGDRVTISCRASQDIKNYLNWYQQPGGTVKVLIIYTSRLHSGVPSRFSG
SGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQRGDTLPWTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 5] (18E12 VL)

;

VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

LESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTNYDISWIRQPPGKGLEWLGVIWTSGGTNYS
AFMSRLSITKDENSEQVFLKMNGLTDDTGIYYCVRGDGNFYLYNFDYWGGTTLTV
SS [SEQ ID NO: 6] (18E12 VH)

。

16. 根据权利要求15所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:上述权利要求13中定义的抗体的VL和VH CDR序列。

17. 根据权利要求16所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体选自:

(1) 一种抗体,包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH [SEQ ID NO: 7] (3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES [SEQ ID NO: 8] (3C10 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT [SEQ ID NO: 9] (3C10 L-CDR3);以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列SYAMS [SEQ ID NO: 10] (3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG [SEQ ID NO: 11] (3C10 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GYDYHY [SEQ ID NO: 12] (3C10 H-CDR3);

(2) 一种抗体,包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原

结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (28C5 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15] (28C5 L-CDR3);以及b)抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (28C5 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (28C5 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (28C5 H-CDR3);以及

(3)一种抗体,包含:a)抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19] (18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20] (18E12 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21] (18E12 L-CDR3);以及b)抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22] (18E12 H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23] (18E12 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24] (18E12 H-CDR3)。

18.根据权利要求17所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体是人源化的。

19.根据权利要求18所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体包含VL结构域和VH结构域,其中:

所述VL结构域包含氨基酸序列:

METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLH
WYQQKPGQPPLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRDFTLTINPVEADDVATYYCQQSN
EDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC [SEQ ID NO: 25]

;

并且

所述VH结构域包含氨基酸序列:

MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQLQQSGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQ
FPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVR
GLRFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRV
ESKYGPSPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLG
K [SEQ ID NO: 26]

。

20.根据权利要求19所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体是IC14或其抗原结合片段。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂与一种或更多种治疗所述神经退行性疾病或其症状的辅助抗神经退行性剂组合施用。

22. 根据权利要求21所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体和所述辅助抗神经退行性剂以协同有效量施用。

23. 根据权利要求22所述的方法或用途,其中所述CD14拮抗剂抗体和所述辅助抗神经退行性剂同时或顺序施用。

24. 根据权利要求23所述的方法或用途,其中所述辅助抗神经退行性剂是抗炎剂。

25. 根据权利要求24所述的方法或用途,其中所述抗炎剂是补体途径抑制剂。

26. 根据权利要求25所述的方法或用途,其中所述补体途径抑制剂是C5a抑制剂。

27. 根据权利要求26所述的方法或用途,其中所述C5a抑制剂是PMX205或依库珠单抗。

28. 根据权利要求23所述的方法或用途,其中所述辅助抗神经退行性剂是阻断CD40和CD40配体之间相互作用的剂。

29. 根据权利要求28所述的方法或用途,其中所述剂是特异性地结合CD40和/或CD40配体的抗体。

30. 根据权利要求29所述的方法或用途,其中所述抗体是AT-1502。

31. 根据权利要求20所述的方法或用途,其中所述辅助抗神经退行性剂是利鲁唑或依达拉奉。

32. 一种用于治疗神经退行性疾病或其症状的进展或发展的药物组合物,所述药物组合物包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:CD14拮抗剂抗体,连同药学上可接受的载体或稀释剂,其中所述组合物被配制用于全身施用。

33. 根据权利要求32所述的药物组合物,其中所述CD14拮抗剂抗体结合sCD14和mCD14两者,并且抑制或减少由所述受试者的外周细胞产生一种或更多种促炎介质。

34. 根据权利要求33所述的药物组合物,其中所述细胞是免疫细胞。

35. 根据权利要求34所述的药物组合物,其中所述免疫细胞选自单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或T细胞。

36. 根据权利要求32至35中任一项所述的药物组合物,其中所述促炎介质是选自以下的一种或更多种的细胞因子:肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1)- α 、IL-6、IFN- γ 、IFN- β 、IL-1 β 、IL-8、IL-17和IL-18。

37. 根据权利要求32至36中任一项所述的药物组合物,还包括鉴定所述受试者患有神经退行性疾病或具有发展神经退行性疾病的风险,合适地在所述CD14拮抗剂抗体的施用之前鉴定。

38. 根据权利要求32至37中任一项所述的药物组合物,其中所述神经退行性疾病或紊乱选自MND或痴呆。

39. 根据权利要求38所述的药物组合物,其中所述MND选自由以下组成的组:肌萎缩性侧索硬化(ALS)、原发性侧索硬化(PLS)、进行性肌萎缩(PMA)、进行性延髓麻痹(PBP)、假性延髓麻痹。

40. 根据权利要求38所述的药物组合物,其中所述MND是ALS。

41. 根据权利要求38所述的药物组合物,其中所述痴呆选自由以下组成的组:阿尔茨海默病、路易体痴呆、额颞叶痴呆(FTD)和血管性痴呆。

42. 根据权利要求32至41中任一项所述的药物组合物,其中所述CD14拮抗剂抗体选自:

(1) 一种抗体,包含:

VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGNSFMHWYQQKAGQPPKSSIYRAANLESGI

PARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFCQQSYEDPWTFGGGTKLGNQ [SEQ ID NO: 1] (3C10 VL) 以及

;

VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

LVKPGGSLKLSCVASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGTTYYPDNVKGRF

TISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYCCARGYYDYHYWGQGTTLTVSS [SEQ ID

NO: 2] (3C10 VH)

;

(2) 一种抗体,包含:

VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQS

GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCCQQSNEDPTTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 3] (28C5 VL) ; 以

NO: 3] (28C5 VL)

及

VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSY

NPSLKSRIITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTLTVSA

以及

[SEQ ID NO: 4] (28C5 VH)

;

(3) 一种抗体,包含:

VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

QTPSSLSASLGDRVTISCRASQDIKNYLNWYQQPGGTVKVLIIYTSRLHSGVPSRFSG

SGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQRGDTLPWTFGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 5]

(18E12 VL)

;

以及

VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

LESGPGLVAPSQSLSLTCTVSGFSLTNYDISWIRQPPGKGLEWLGVIWTSGGTNYNS

AFMSRLSITKDENSEQVFLKMNGLQTDDTGIYYCVRGDGNFYLYNFDYWQGTTTLTV

SS [SEQ ID NO: 6] (18E12 VH)

。

43. 根据权利要求42所述的药物组合物,其中所述CD14拮抗剂抗体包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:上述权利要求10中定义的抗体的VL和VH CDR序列。

44. 根据权利要求43所述的药物组合物,其中所述CD14拮抗剂抗体选自:

(1) 一种抗体,包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7] (3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8] (3C10 L-CDR2);并且L-CDR3

包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9] (3C10 L-CDR3);以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10] (3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11] (3C10 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GYDYHY[SEQ ID NO:12] (3C10 H-CDR3);

(2) 一种抗体,包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (28C5 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15] (28C5 L-CDR3);以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (28C5 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (28C5 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (28C5 H-CDR3);以及

(3) 一种抗体,包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19] (18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20] (18E12 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21] (18E12 L-CDR3);以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22] (18E12 H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23] (18E12 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24] (18E12 H-CDR3)。

45. 根据权利要求44所述的药物组合物,其中所述CD14拮抗剂抗体是人源化的。

46. 根据权利要求45所述的药物组合物,其中所述CD14拮抗剂抗体包含VL结构域和VH结构域,其中:

所述VL结构域包含氨基酸序列:

METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLH
WYQQKPGQPPLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSN
EDPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC [SEQ ID NO: 25]

以及

;

所述VH结构域包含氨基酸序列:

MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQ
FPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRI SITRDT SKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVR
GLRFAYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRV
ESKYGPSPCSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
K [SEQ ID NO: 26]

47. 根据权利要求46所述的药物组合物,其中所述CD14拮抗剂抗体是IC14或其抗原结合片段。

48. 根据权利要求31至46中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物还包含辅助抗神经退行性剂,其中所述辅助剂治疗所述疾病或其症状。

49. 根据权利要求48所述的药物组合物,其中所述辅助抗神经退行性剂是抗炎剂。

50. 根据权利要求49所述的药物组合物,其中所述抗炎剂是补体抑制剂。

51. 根据权利要求50所述的药物组合物,其中所述补体抑制剂是C5a抑制剂。

52. 根据权利要求51所述的药物组合物,其中所述C5a抑制剂是PMX205或依库珠单抗。

53. 根据权利要求48所述的药物组合物,其中所述辅助抗神经退行性剂是阻断CD40和CD40配体之间相互作用的剂。

54. 根据权利要求53所述的药物组合物,其中所述剂是特异性地结合CD40和/或CD40配体的抗体。

55. 根据权利要求54所述的药物组合物,其中所述抗体是AT-1502。

56. 根据权利要求48所述的药物组合物,其中所述辅助抗神经退行性剂是利鲁唑或依达拉奉。

用于治疗神经退行性疾病的CD14拮抗剂抗体

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2017年4月21日提交的题为“Agents for treating or preventing motor neurone disease and uses therefor”的澳大利亚临时申请第2017901462号和于2018年3月8日提交的题为“Agents for treating disease and uses therefor”的澳大利亚临时申请第2018900762号的优先权,所述临时申请的内容通过引用以其整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及用于治疗神经退行性疾病的发展或进展的剂和方法。特别地,本发明涉及CD14拮抗剂,用于在治疗神经退行性疾病,包括运动神经元疾病(MND)和痴呆疾病或相关症状的发展或进展中使用。本发明还提供了包含这样的剂的组合物。

[0004] 发明背景

[0005] 神经退行性疾病是高度令人衰弱的状况,其特征在于神经元的结构和功能的逐渐丧失,最终导致神经元死亡,这对于生活质量具有不利影响,并最终导致早期死亡。这对于周围的家庭成员和社区也具有重大的社会影响。随着人口老龄化,患有神经退行性紊乱的患者所需的姑息护理(palliative care)正在成为社区的一项重大健康成本。仅在美国,对于神经退行性疾病患者的管理和生产力损失每年就达到数百亿美元。马萨诸塞州剑桥市ALS治疗发展研究所估计,美国的运动神经元疾病(MND)患者数量超过30,000人,并且全世界至少450,000人。在2010年,全球的痴呆花费估计为6040亿美元,约占世界国内生产总值的1%,而在美国,阿尔茨海默病协会估计阿尔茨海默病(AD)患者的护理成本为2000亿美元/年。如果目前的趋势继续下去,预计到2050年该成本将增长至1.1万亿美元/年。尽管寻找治愈这些令人衰弱的状况的方法的重要研究仍在进行中,但要找到逆转或防止神经退化的影响的成功治疗,可能还有数十年。

[0006] 最常见的神经退行性疾病包括MND,例如肌萎缩性侧索硬化(ALS)、原发性侧索硬化(PLS)、进行性肌萎缩(PMA)、进行性延髓麻痹(PBP)和假性延髓麻痹,以及痴呆(例如阿尔茨海默病、路易体痴呆(Lewy body dementias)-路易体痴呆(dementia with Lewy bodies)(DLB)和帕金森病痴呆(PDD)、血管性痴呆和额颞叶痴呆(FTD)、帕金森病和亨廷顿病。

[0007] 运动神经元疾病(MND)是一种毁灭性的进行性疾病,通常在发作后4-6年内导致死亡。MND的发病率相当一致,为每100,000人每年2-3例,对于散发性疾病,发作的高峰年龄为58-63岁,并且对于家族性疾病,发作的高峰年龄为47-52岁(Kiernan M.C.,等人Lancet 377:942-955(2011))。病理上,MND的特征在于运动皮质、脑干和脊髓中运动神经元的丧失。患者通常表现为进行性肌萎缩、瘫痪、痉挛和反射亢进,并且这最终通过呼吸肌衰竭导致死亡(Zhao W.,等人Glia 58:231-243(2010))。MND的治疗选择极为有限。尽管许多疗法已经在啮齿动物模型中证明了功效,并且在小规模2期临床试验中显示有效,但在过去23年中,仅有两种化合物利鲁唑(riluzole)(Rilutek®/Teglutik®)和依达拉奉(edaravone)(Radicava®/Radicut®)得到了美国食品和药物管理局(FDA)的批准。两者都具有有限的

功效,将患者生存期延长3-4个月而没有改善生活质量。目前处于III期试验的另一种药物是Genervon的药物候选GM604,它是一种内源性胚胎期酪氨酸激酶运动神经元营养因子调节剂,与人类神经系统的胰岛素受体、IGF1受体和IGF2结合。尽管在临床试验中显示出与肌萎缩性侧索硬化(ALS)(MND的最常见形式)症状相关的若干个积极作用,但用该公司自己的话说,该药物本身并不能“治愈”。治愈性ALS试验的一致失败和AD试验的99.6%失败率证明,单一/基因靶向简化论(reductionism)的普遍且主导的药物开发范式不能治愈ALS和其他神经性和神经退行性多因素疾病。这意味着在神经退行性疾病及其症状的治疗的治疗性发展方面有相当大的改进空间,并且强调了未被满足的医疗需求。

[0008] ALS占有MND病例的约60%-70%。在美国,ALS通常被称为“卢伽雷病(Lou Gehrig's disease)”,并影响每100,000人中的约7人。存在两种形式的ALS,其中受试者表现出基因的遗传突变的家族性ALS,以及散发性ALS。与ALS(以及其他形式的MND)相关的(linked)具有突变的基因包括C9ORF72(ALS最常见的遗传原因)、Cu/Zn超氧化物歧化酶(SOD1)、NEK1、TAR DNA结合蛋白43(TDP-43)、肉瘤中的融合(FUS)和泛醌蛋白-2(UBQLN2)。在少数患者中也发现了包括以下的基因中的突变:VCP(含缬酪肽的蛋白)、ALS2(alsin)、SETX(senataxin)、ANG(血管生成素)、PFN1(肌动蛋白抑制蛋白-1)、MATR3(基质蛋白-3)、CHCHD10(含卷曲螺旋-螺旋-卷曲螺旋-螺旋结构域10(coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10))、TUBA4A(微管蛋白, α 4A)、TBK1(TANK结合激酶1)、C21orf2和OPTN(视神经蛋白)。

[0009] ALS的致病性质是多样的,并且就这一点而言,这种疾病可以被认为是谱系障碍。ALS的特征在于快速进行性肌萎缩、构音障碍和呼吸困难。约40个月之后,肌肉和神经元之间的中断(disconnect)导致呼吸衰竭。存在上运动神经元和下运动神经元的退化,导致由于肌肉没有工作能力引起的肌肉衰弱和萎缩。最终,存在彻底的衰弱。虽然通常认知功能得以保留,但肌萎缩足以显著降低患者的生活质量。

[0010] 近年来,人们越来越认识到炎症在神经性疾病的进展中的重要性。炎症在神经元疾病中的作用早已在多发性硬化中得到认识,导致免疫调节药物的引入,这些药物具有重要的治疗影响(Ransohoff, R.M., 等人Nat. Rev. Neurol. 11, 134-142 (2015))。

[0011] 脑和脊髓中的免疫应答主要由脑的常驻型免疫细胞小胶质细胞介导。通过对中枢神经系统(CNS)的病理变化的激活作出应答,例如,从受损组织释放危险信号,诸如损伤相关的分子模式(DAMP),它们充当第一道防线,并且在启动促炎介质的产生和维持神经炎症性应答中发挥关键作用。研究已经表明,在MND患者和在小鼠MND模型两者中,小胶质细胞在运动神经元损伤部位的活化,具有由活体MND患者的脑的PET扫描可检测的广泛的小胶质细胞活化(Turner M.R., 等人Neurobiol. Dis. 15:601-9 (2004); Corcia P., 等人PLoS One 7:6-12 (2012))。已经证明了MND患者的上运动神经元标志的严重程度与运动皮质的小胶质细胞活化水平之间的相关性(Turner M.R., 等人Neurobiol. Dis. 15:601-9 (2004))。小鼠MND模型也支持了小胶质细胞在疾病进展中的作用,表明MND活化的小胶质细胞在疾病发作前发生,并且随着疾病进展到晚期疾病而增加(Henkel J.S. 等人Mol. Cell. Neurosci. 31:427-37 (2006); Alexianu M.E. 等人, Neurology 57:1282-9 (2001)),小胶质细胞活化的强度与运动神经元变性并行(parallel),并且支持小胶质细胞的积极作用。

[0012] 已经在阿尔茨海默病患者的脑中鉴定了许多DAMP。这些包括HMGB1、S100家族成员

S100A9和S100B、嗜铬粒蛋白、循环DNA和热休克蛋白 (HSP)。除了HSP之外,所有这些DAMP都已经显示出在疾病中升高,与A β 斑块物理上相关,并且与持续的 (ongoing) 神经炎症有关 (Venegas, C. 和 Heneka, M. T. J. *Leukoc. Biol.* 101, 87-98 (2017))。用A β 刺激小胶质细胞导致引发许多促炎应答,包括细胞因子和趋化因子产生。

[0013] 小胶质细胞活化还与额颞叶痴呆 (FTD) 和路易体痴呆 (LBD) 的神经变性相关,额颞叶痴呆 (FTD) 和路易体痴呆 (LBD) 包括两种密切相关的状况,路易体痴呆 (dementia with lewy bodies) (DLB) 和帕金森病痴呆 (PDD),帕金森病痴呆 (PDD) 是老年人痴呆的第二最常见的原因。这些退行性脑部疾病与被称为 α -突触核蛋白的蛋白的异常团块 (clump) 有关。FTD是脑的颞叶和额叶的进行性变性导致的一组相关状况,并且特征在于TDP-43沉积。脑的这些区域在决策、行为控制、情感和语言方面发挥重要作用。 α -突触核蛋白和TDP-43两者都可以充当DAMP。小胶质细胞活化也与帕金森病早期多巴胺能丧失有关。这种小胶质细胞活化也与认知功能负相关,表明它可能与疾病病理学有关。

[0014] 中枢神经系统疾病的诊断和治疗可以受益于高特异性单克隆抗体作为药物的应用。然而,开发用于神经退行性紊乱的治疗的一个困难是将药物递送跨过血脑屏障 (BBB) 进入CNS至靶部位的问题。这限制了靶向脑部疾病的药物的效率,并且使使用生物医药治疗脑部疾病变得具有挑战性。因为即使是小抗体片段 (Fv、Fab) 的尺寸也严重限制了通过被动扩散穿过完整BBB来增加递送的尝试,评估的方法试图通过直接施用至脑脊液或脑组织中来绕过屏障,或者通过高渗溶液来暂时破坏屏障。这两种方法都需要侵入性技术。

[0015] 鉴于神经退行性疾病的严重性和有限的可用的治疗选择,对于用于治疗神经退行性疾病的剂和方法存在需求。

[0016] 发明概述

[0017] 本发明部分地源于这样的确定:在患有ALS的受试者的中枢神经系统 (CNS) 外全身施用CD14拮抗剂抗体抑制受试者外周的细胞产生促炎介质 (例如细胞因子),导致疾病进展的减弱和/或CNS中ALS症状的改善,由此解决了与产生和维持炎性过程相关的因果信号 (causal signal),而不是治疗衍生的炎性效应物。

[0018] CD14是一种糖蛋白,其以可溶性形式 (sCD14) 和细胞膜结合形式 (mCD14) 存在于各种细胞的表面,包括例如免疫细胞诸如巨噬细胞、单核细胞、枯否细胞 (Kupffer cell)、中性粒细胞、树突状细胞和B细胞,以及内皮细胞和上皮细胞 (Jersmann, HPA, 2005. *Immunol Cell Biol.* 83:462-467)。

[0019] CD14是参与经由模式识别受体 (PRR) 家族介导细胞活化的关键分子,模式识别受体 (PRR) 家族是参与识别源自病原体 (病原体相关分子模式 (PAMP)) 的危险信号或由通过Toll样受体 (TLR) 的内源性组织损伤或应激 (损伤相关分子模式 (DAMP)) 导致的危险信号以及随后炎性级联的启动的分子。CD14也被认为是革兰氏阴性菌的脂多糖 (LPS) (也被称为内毒素) 的受体,脂多糖 (LPS) 是示例性的PAMP,CD14从血液中的LPS结合蛋白 (LBP) 接受LPS以形成复合体。LPS还与sCD14结合,并且所得的复合体可以诱导mCD14非依赖性的促炎介质 (包括促炎细胞因子) 产生。将人类CD4⁺CD45RO⁺记忆T细胞与可溶性CD14一起培养也已被示出足以上调视黄酸相关的孤儿受体- γ 胸腺和IL-17产生 (Ilarregui J. M., 等人 *Immunol. Cell Biol.* 94: (2016))。

[0020] 除了革兰氏阴性菌的组分LPS之外,CD14还充当其他PAMP的共受体,包括例如革兰

氏阳性菌的肽聚糖和脂磷壁酸、分枝杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖和病毒包膜蛋白。CD14还识别宿主来源的DAMP配体,该宿主来源的DAMP配体是由于与多种炎症情况相关的组织损伤和炎症导致的应激、损伤或死亡细胞释放的内源性分子。DAMP通过与TLR家族成员的相互作用来发挥它们的活性,并且CD14已被描述为介导许多这些DAMP的活性所需要的,这些DAMP包括SOD1、TDP-43、热休克蛋白家族成员以及HMGB1、S100A和与神经退行性紊乱相关的多种错误折叠的蛋白质。

[0021] 患有神经退行性疾病的患者的循环中存在与疾病严重程度相关的促炎细胞和细胞因子。已经在MND患者和在鼠MND模型的循环中观察到改变的水平的炎症单核细胞(Butovsky O.等人J.Clin.Invest.122:3063 (2012).;Murdock B.J.,等人Neurol.Neuroimmunol.Neuroinflammation3:e242 (2016))。此外,涉及用静脉内的托珠单抗(tocilizumab) (一种针对IL-6R的人源化抗体) 治疗MND患者的小规模的研究表明,静脉给药在患者的一个亚组中降低了血清炎症细胞因子水平并减弱了疾病进展(Fiala M.,等人Am.J.Neurodegener.Dis.2:129-139 (2013))。已经考虑了靶向与MND病理学相关的炎症应答的疗法。然而,这些疗法与靶向针对炎症的效应物的IL-6受体有关,而不是与靶向驱动变性和疾病的主要引发物有关。由于CD14在经由mCD14和直接经由sCD14启动炎症级联和促炎介质产生中的作用,本文提出抑制或降低CD14介导的炎症应答将通过解决炎症的原因而不是影响来为与神经退行性疾病相关的炎症提供更有效治疗。

[0022] 如本文描述的,使用CD14拮抗剂抗体抑制或减少位于患有神经退行性疾病的患者的CNS外部的细胞产生促炎介质可以治疗疾病或其症状的发展或进展,包括CNS中的疾病或其症状的发展或进展。

[0023] 因此,在一个方面中,本发明提供了抑制或减少患有神经退行性疾病或具有发展神经退行性疾病风险的受试者的外周中存在的哺乳动物细胞中促炎介质(例如细胞因子)的产生的方法。在一个实施方案中,这些方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:使包含mCD14的外周细胞与足以抑制或减少由所述细胞产生促炎介质的量的抗CD14拮抗剂抗体接触。

[0024] 在另一个实施方案中,所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:使外周循环sCD14与足以抑制或减少由外周细胞产生促炎介质的量的抗CD14拮抗剂抗体接触。

[0025] 合适地,外周细胞是免疫细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或T细胞)。

[0026] 促炎介质通常是细胞因子,例如,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1)- α 、IL-6、IFN- γ 、IFN- β 、IL-1 β 、IL-8、IL-17或IL-18。

[0027] 在相关方面中,上文定义的方法用于治疗神经退行性疾病介导的症状。这些方法通常包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:使包含mCD14的外周细胞或循环sCD14与CD14拮抗剂抗体接触从而治疗症状,所述CD14拮抗剂抗体合适地为足以抑制或减少外周细胞中促炎介质的CD14依赖性产生的量。在特定实施方案中,疾病是MND病或痴呆。合适地,当疾病是MND(例如ALS)时,症状包括例如进行性肌萎缩、瘫痪、痉挛、呼吸变化和反射亢进。在一个实施方案中,疾病是痴呆,并且症状包括例如记忆丧失、抑郁、交流障碍、判断力差、定向障碍、意识模糊(confusion)、睡眠障碍、运动症状、幻觉、神经安定药敏感性(neuroleptic sensitivity)、行为改变以及说话困难、吞咽困难和行走困难。

[0028] 本发明的又一个方面提供了用于治疗受试者的神经退行性疾病或其症状的发展

或进展的方法。这些方法通常包括以下、由以下组成或基本上由以下组成：向受试者全身施用有效量的CD14拮抗剂抗体，从而治疗受试者的神经退行性疾病或其症状的发展或进展。在一些实施方案中，受试者的外周细胞中一种或更多种促炎介质的产生被抑制或减少。合适地，促炎介质是细胞因子。

[0029] 在相关方面中，本发明提供了CD14拮抗剂抗体用于抑制或减少患有神经退行性疾病或具有发展或进展神经退行性疾病风险的受试者的外周细胞产生一种或更多种促炎介质（例如细胞因子）的用途，或者用于治疗神经退行性疾病的发展或进展的用途。在一些实施方案中，CD14拮抗剂作为用于这些应用中的任一种或更多种的药物被制造。

[0030] 在一些实施方案中，所述方法还包括鉴定受试者患有神经退行性疾病或具有发展或进展神经退行性疾病的风险，合适地在CD14拮抗剂抗体的施用之前鉴定。在这种类型的说明性实例中，所述方法包括确定合适地取自受试者的生物样品中神经退行性疾病的标志物的存在，合适地在CD14拮抗剂抗体的施用之前确定，所述生物样品的说明性实例包括血液、血清、血浆、唾液、脑脊液、尿液、皮肤或其他组织或其级分。

[0031] 在实施方案中，疾病是MND，并且标志物选自例如以下中的一种或更多种：SOD1、TDP-43、FUS、C9ORF72、ALS2、ALS4、ALS8、NEK1、UBQLN2、VCP、SETX、ANG、PFN1、MATR3、CHCHD10、TUBA4A、TBK1、C21orf2和OPTN或其表达产物。在该实施方案中，神经退行性疾病的标志物的存在合适地通过检测生物样品中标志物基因的表达产物的存在或过表达和/或标志物基因中突变的存在（例如，SOD1、TDP-43、FUS、C9ORF72、ALS2、ALS4、ALS8、NEK1、UBQLN2、VCP、SETX、ANG、PFN1、MATR3、CHCHD10、TUBA4A、TBK1、C21orf2和OPTN mRNA或多肽）。在MND的一些实施方案中，也可以确定TDP-43阳性内含物的细胞质沉积的存在和/或神经丝的升高的血清和/或CSF水平。

[0032] 在另一个实施方案中，疾病是痴呆，包括阿尔茨海默病、FTD、LBD（DLB和PDD）和血管性痴呆，并且标志物选自以下：编码淀粉样前体蛋白（APP）和衰老蛋白（presenilin）1和2的基因中的一种或更多种突变；载脂蛋白E（APOE）基因的 $\epsilon 4$ 、 $\epsilon 2$ 和 $\epsilon 3$ 等位基因（APOE- $\epsilon 4$ 、APOE- $\epsilon 2$ 、APOE- $\epsilon 3$ ）中的突变；骨髓细胞2（TREM2）基因上表达的触发受体中的突变；第17号染色体上的MAPT基因，其制造蛋白 τ ；第17号染色体上的GRN基因，也被称为PGRN基因，其制造前颗粒蛋白；在第1号染色体上的TARDBP基因，其产生43-kDa分子量的反式活性应答DNA结合蛋白（TDP-43）；在第9号染色体上的VCP基因，其编码含缬氨酸的蛋白；以及第3号染色体上的CHMP2B基因，其表达带电的多泡体蛋白2B（也被称为染色质修饰蛋白2B）。还可以确定 α -突触核蛋白、S100A9和S100B、嗜铬粒蛋白、循环DNA、热休克蛋白和淀粉样蛋白的升高的血清和/或CSF水平。

[0033] 在其他实施方案中，具有神经退行性疾病风险的受试者还可以通过确定外周血单核细胞（PBMC）中与疾病相关的促炎标志物中的一种或更多种的升高的水平的存在来鉴定，所述促炎标志物例如TNF- α 、白细胞介素-1（IL-1）- α 、IL-6、IFN- γ 、IFN- β 、IL-1 β 、IL-8、IL-18、C-反应性蛋白（CRP）、IL-17、趋化因子、CD14⁺-高单核细胞和炎性介质mRNA转录物。在实施方案中，疾病是MND，并且所检测的细胞因子选自IL-6或IL-17中的一种或更多种。在实施方案中，疾病是痴呆，并且所检测的细胞因子选自IL-1、IL-6和TNF- α 。

[0034] 在优选的实施方案中，CD14拮抗剂抗体是IC14或其抗原结合片段。

[0035] CD14拮抗剂抗体可以单独施用或与一种或更多种治疗神经退行性疾病或其症状

的发展或进展的辅助剂组合施用。因此,在仍另一个方面中,本发明提供了配制用于全身施用的药物组合物,该药物组合物合适地用于治疗神经退行性疾病或其症状的发展或进展。这些组合物包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:CD14拮抗剂抗体,任选地连同药学上可接受的载体或稀释剂。在实施方案中,组合物还包含辅助抗神经退行性剂。

[0036] 在相关方面中,本发明提供了用于治疗受试者的神经退行性疾病或其症状的发展或进展的方法。这些方法通常包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向受试者同时施用有效量的全身施用的CD14拮抗剂抗体和有效量的辅助抗神经退行性剂,从而治疗受试者的神经退行性疾病或其症状的发展或进展。合适地,CD14拮抗剂抗体和辅助抗神经退行性剂以协同有效量施用。

[0037] 在特定实施方案中,辅助抗神经退行性剂是抗炎剂。在实施方案中,疾病是MND(例如ALS),并且辅助抗神经退行性剂选自利鲁唑(Rilutek®/Teglutik®);补体途径抑制剂(例如PMX205或依库珠单抗(eculizumab));阻断CD40和CD40配体之间相互作用的剂,包括特异性地结合CD40和/或CD40配体的抗体(例如AT-1502);NurOwn干细胞疗法(BrainStorm Cell Therapeutics);GM604;依达拉奉(Radicava®/Radicut®);马赛替尼(Masitinib);美金刚(Memantine)或Tirasemtiv。在实施方案中,疾病是痴呆,诸如LBD、AD或FTD,并且辅助抗神经退行性剂是胆碱酯酶抑制剂。在另一个实施方案中,疾病是AD,并且辅助剂是选自例如安理申(Aricept)、加兰他敏(Razadyne)、盐酸美金刚(Namenda)、艾斯能(Exelon)和Namzaric的经批准的治疗剂。

[0038] 在另一个相关方面中,本发明提供了CD14拮抗剂抗体和辅助抗神经退行性剂用于治疗神经退行性疾病或其症状的发展或进展的用途。在一些实施方案中,CD14拮抗剂抗体和辅助抗神经退行性剂被制造为用于该应用的全身施用的药物。合适地,CD14拮抗剂抗体和辅助抗神经退行性剂被配制用于同时施用。

[0039] 附图简述

[0040] 本文参考以下附图仅通过非限制性实例的方式来描述本公开内容的实施方案。

[0041] 图1示出了在研究第1天以4mg/kg的剂量并且在研究第2天、第3天和第4天以2mg/kg的剂量对MND患者静脉内给药IC14之后CSF中的IL-17、神经丝轻链(NFL)和IL-1 β 的水平。

[0042] 图2示出了在TDP-43活化原代人类小胶质细胞后,评估IC14对于细胞因子或趋化因子水平的影响的体外测定的结果。原代人类小胶质细胞用IC14或对照IgG4抗体预处理持续2小时,然后用(A)突变体TDP-43(mTDP43)或(B)野生型TDP-43(wtTDP43)刺激细胞持续48小时。收集上清液用于多重细胞因子分析。未经处理的细胞既不接受抗体也不接受TDP-43,并且反映细胞因子或趋化因子产生的基础水平。表达以相对荧光单位(RFU)测量,并且代表每个样品三个孔的平均值和SEM。

[0043] 发明详述

[0044] 1. 定义

[0045] 除非另外定义,否则本文使用的全部技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然类似于或等效于本文描述的方法和材料的任何方法和材料可以用于实践或测试本发明,但描述了优选的方法和材料。出于本发明的目的,在下文中定义了以下术语。

[0046] 冠词“一(a)”和“一(an)”在本文中用于指一个或多个(即至少一个)的该冠词的语法对象。举例来说,“要素(an element)”意指一个要素或多个要素。

[0047] 如本文使用的,“和/或”指的是并且涵盖一个或多个相关的所列项目的任何和所有可能的组合,以及当以替换物(或)解释时缺少组合。

[0048] 术语“并行施用(administration concurrently)”或“并行施用(administering concurrently)”或“共施用(co-administering)”以及类似术语是指含有两种或更多种剂的单一组合物的施用,或各个剂作为单独的组合物和/或通过单独的途径递送而同期地(contemporaneously)或同时地(simultaneously)或在足够短的时间段内顺序地施用使得有效结果等同于当所有此类剂作为单一组合物施用时获得的结果。“同时地”意味着剂在基本上相同的时间被施用,并且理想地在同一制剂中一起施用。“同期地”意味着剂在时间上紧接地施用,例如,一种剂在施用另一种剂之前或之后约一分钟至约一天内施用。任何同期的时间都是有用的。然而,通常情况是,当不被同时地施用,剂将在约1分钟内至约8小时内,并且合适地在少于约1小时至约4小时内被施用。当被同期地施用,剂合适地在受试者的相同部位施用。术语“相同部位”包括准确的位置,但也可以在约0.5厘米至约15厘米内,优选地在从约0.5厘米至约5厘米内。如本文使用的术语“单独地(separately)”意味着,剂以间隔被施用,例如以约一天至数周或数月的间隔被施用。剂可以以任一顺序被施用。如本文使用的术语“顺序地(sequentially)”意味着,剂按顺序以例如数分钟、数小时、数天或数周的一个或多个间隔被施用。如果适当,剂可以以规律重复周期被施用。

[0049] 术语“ALS”、“MND”和“卢伽雷病”在本文中可以互换使用,以指相同的状况。家族性ALS和散发性ALS两者都可以通过本方法治疗,或者其发展或进展可以通过本方法延迟。本文预期了所有形式的ALS。

[0050] 术语“激动剂”是指刺激与其结合的受体的配体。根据经典定义,激动剂,无论是正构激动剂、变构激动剂、反向激动剂还是共激动剂,都具有结合受体、改变其受体状态并且导致生物作用的性质,所述生物作用包括直接或间接活化化学或物理信号传导级联,从而导致细胞的行为、物理或生物状态的可定义变化。因此,激动被定义为激动剂产生生物作用的性质。在本发明的上下文中,CD14激动剂包括通过结合细胞表面的mCD14或循环中的sCD14而引发促炎应答的任何激动剂,诸如例如损伤相关分子模式(DAMP)或病原体相关分子模式(PAMP)分子和LPS。DAMP的非限制性实例包括,SOD1、TDP-43、热休克蛋白家族成员以及HMGB1、S100A、S100A9、S100B、 α -突触核蛋白、嗜铬粒蛋白、循环DNA和RNA、淀粉样蛋白以及任何其他错误折叠的蛋白质,所述错误折叠的蛋白质由于突变而产生并且通过与细胞表面上的mCD14或循环中的sCD14结合而引发促炎应答。PAMP的非限制性实例包括LPS、革兰氏阳性菌的其他肽聚糖和脂磷壁酸、分枝杆菌的脂阿拉伯甘露聚糖和病毒包膜蛋白。

[0051] 术语“拮抗剂抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括抑制或降低该抗体所结合的抗原(例如,CD14)的生物活性的抗体。例如,拮抗剂抗体可以部分地或完全地阻断受体(例如,CD14)和配体(例如,DAMP或PAMP)之间的相互作用,或者可以由于受体的三级结构改变或下调而实际地减少相互作用。因此,CD14拮抗剂抗体涵盖结合CD14并且以任何有意义的程度(包括显著地)阻断、抑制(inhibit)、抵消、拮抗、压制(suppress)、降低(decrease)或降低(reduce)CD14激动剂活性的抗体,所述CD14激动剂活性包括活化下游途径,诸如Toll样受体(TLR)信号传导途径(例如,TLR4信号传导途径)和含有TIR结构域的衔接子诱导的

IFN- β (TRIF) 途径,或引发针对被CD14配体(例如,DAMP或PAMP)结合的CD14的细胞应答(例如,产生包括促炎细胞因子的促炎介质)。

[0052] 本文中的术语“抗体”以最广泛的意义使用,并且具体地涵盖天然存在的抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)、抗体片段或任何其他抗原结合分子,只要它们表现出期望的免疫交互性。天然存在的“抗体”在其范围内包括包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的免疫球蛋白。每条重链包含重链可变区(在本文中被缩写为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含特定的CH结构域(例如,CH1、CH2和CH3)。每条轻链包含轻链可变区(在本文中被缩写为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,CL。VH区和VL区可以被进一步细分为被称为互补决定区(CDR)的高变区,其中散布着被称为框架区(FR)的更保守的区域。每个VH和VL包含按照以下顺序从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应物细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)。抗体可以是任何同种型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)、子类或其修饰版本(例如,携带L234A和L235A双突变的IgG1同种型(IgG1-LALA))。抗体可以是任何种类的、嵌合的、人源化的或人类的。在其他实施方案中,抗体是缺乏第一恒定区结构域(CH1)但保留了原本完整的重链并且能够通过抗原结合结构域结合抗原的同聚(homomeric)重链抗体(例如,骆驼抗体)。抗体模块识别结构域(MRD)融合中的重链和轻链的可变区将包含与感兴趣的抗原相互作用的功能结合结构域。

[0053] 本文使用的“可变结构域”(轻链的可变结构域(VL),重链的可变结构域(VH))表示直接参与抗体与抗原的结合的轻链结构域和重链结构域对中的每一个。轻链可变结构域和重链可变结构域具有相同的一般结构,并且每个结构域包含四个序列广泛保守的、由三个CDR或“高变区”连接的FR。FR采用 β -片层构象,并且CDR可以形成连接 β -片层结构的环。每条链中的CDR被FR保持在其三维结构中,并且与来自另一条链中的CDR一起形成抗原结合位点。

[0054] 当在本文中使用时,术语“抗原结合部分”是指通常负责抗原结合的抗体的氨基酸残基,其通常包含来自CDR的氨基酸残基。因此,“CDR”或“互补性决定区”(也被称为“高变区”)在本文中可互换使用,指形成有助于抗原结合位点形成的三维环结构的抗体的轻链和重链的氨基酸序列。重链和轻链的可变区各存在三个CDR,可变区的每一个被命名为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。本文使用的术语“CDR集合(CDR set)”是指在结合抗原的单一可变区中出现的三个CDR的组。这些CDR的确切边界根据不同的系统被不同地定义。Kabat描述的系统(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)和(1991))不仅提供了可应用于抗体的任何可变区的明确的残基编号系统,还提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可以被称为“Kabat CDR”。Chothia和同事(Chothia和Lesk,1987.J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等人,1989.Nature 342:877-883)发现,尽管在氨基酸序列的水平上具有大的多样性,但Kabat CDR中的某些子部分采用几乎相同的肽骨架构象。这些子部分被命名为“L1”、“L2”和“L3”,或“H1”、“H2”和“H3”,其中“L”和“H”分别指轻链区和重链区。这些区域可以被称为“Chothia CDR”,其具有与Kabat CDR重叠的边界。定义与Kabat CDR重叠的CDR的其他边界

由Padlan (1995.FASEB J.9:133-139) 和MacCallum (1996.J.Mol.Biol.262 (5):732-745) 描述。其他CDR边界定义可能不严格遵循这些系统中的一个,但仍将与Kabat CDR重叠,尽管根据特定残基或残基组或甚至整个CDR不显著影响抗原结合的预测或实验发现,它们可能缩短或延长。

[0055] 如本文使用的,术语“框架区”或“FR”是指可变区减去CDR的剩余的序列。因此,抗体的轻链和重链可变结构域从N末端至C末端包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。CDR和FR通常根据Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md. (1991)的标准定义和/或来自“高变环”的那些残基确定。

[0056] 如本文使用的,术语“轻链可变区”(“VL”)和“重链可变区”(VH)分别指轻链和重链的N末端部分处的区域或结构域,它们对每种抗体具有不同的一级氨基酸序列。抗体的可变区通常由轻链和重链的氨基末端结构域组成,因为它们折叠在一起以形成抗原的三维结合位点。基于结构相似性,已经定义了VH和VL的若干种亚型,例如在Kabat数据库中列出的。

[0057] 术语“嵌合抗体”是指包含来自一种物种的重链和轻链可变区序列和来自另一种物种的恒定区序列的抗体,诸如具有与人类恒定区连接的鼠重链可变区和轻链可变区的抗体。

[0058] 非人类(例如,啮齿动物)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,所述嵌合抗体包含源自非人类免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下,人源化抗体是人类免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的高变区的残基被具有期望的特异性、亲和力和能力的来自非人类物种的高变区的残基(供体抗体)替代,所述非人类物种诸如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类动物。在一些情况下,人类免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人类残基替代。因此,人源化抗体的FR和CDR不需要精确对应于亲本(即,供体)序列,例如,供体抗体CDR或共有框架可以通过取代、插入和/或缺失至少一个氨基酸残基而被诱变,使得该位点的CDR或FR既不对应于供体抗体也不对应于共有框架。然而,这样的突变通常将不是广泛的,并且通常将避免参与结合抗原的“关键残基”。通常,至少80%,优选地至少85%,更优选地至少90%,并且最优选地至少95%的人源化抗体残基将对应于亲本FR和CDR序列的那些。如本文使用的,术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文使用的,术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列的家族中最常出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见,例如,Winnaker,From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft,Weinheim,1987))。因此,“共有免疫球蛋白序列”可以包含“共有框架区”和/或“共有CDR”。在免疫球蛋白的家族中,共有序列中的每个位置都被家族中在该位置最常出现的氨基酸占据。如果两种氨基酸同等频繁地出现,则任一种氨基酸可以被包含在共有序列中。通常,人源化抗体将包含至少一个并且通常是两个这样的可变结构域的大体上全部,在该可变结构域中全部或大体上全部的高变环对应于非人类免疫球蛋白的那些高变环,并且全部或大体上全部的FR是人类免疫球蛋白序列的那些FR。人源化抗体任选地还将包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人类免疫球蛋白的恒定区。进一步的详情参见Jones等人(1986.Nature 321:522-525),Riechmann等人(1988.Nature 332:323-329)和Presta (1992.Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596)。人源化抗体可以选自任何类的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化

抗体可以包含来自多于一个类或同种型的序列,并且可以使用本领域熟知的技术来选择特定的恒定结构域来优化期望的效应物功能。如本文使用的,术语“关键残基”是指可变区内对于抗体特别是人源化抗体的结合特异性和/或亲和力具有更大影响的某些残基。关键残基包括但不限于以下中的一种或更多种:邻近CDR的残基,潜在糖基化位点(可以是N-糖基化位点或O-糖基化位点),稀有残基,能够与抗原相互作用的残基,能够与CDR相互作用的残基,经典残基(canonical residue),重链可变区和轻链可变区之间的接触残基,Vernier区(Vernier zone)内的残基,以及可变重链CDR1的Chothia定义和第一重链框架的Kabat定义之间重叠的区域中的残基。

[0059] 如本文使用的,“Vernier”区是指可以调节CDR结构并且微调与抗原的匹配的框架残基的子集,如Foote和Winter(1992.J.Mol.Biol.224:487-499)描述的。Vernier区残基形成在CDR下方的层,并且可以影响CDR的结构和抗体的亲和力。

[0060] 如本文使用的,术语“经典(canonical)”残基是指CDR或框架中定义了如Chothia等人(1987.J.Mol.Biol.196:901-917;1992.J.Mol.Biol.227:799-817,两者都通过引用并并入本文)所定义的特定经典CDR结构的残基。根据Chothia等人,尽管在氨基酸序列的水平上有大的多样性,但许多抗体的CDR的关键部分具有几乎相同的肽骨架构象。每个经典结构主要为形成环的氨基酸残基的连续区段指定一组肽骨架扭转角。

[0061] 如本文使用的,术语“供体”和“供体抗体”是指向“受体抗体”提供一个或多个CDR的抗体。在一些实施方案中,供体抗体是来自与获得或衍生FR的抗体不同物种的抗体。在人源化抗体的上下文中,术语“供体抗体”是指提供一个或多个CDR的非人类抗体。

[0062] 如本文使用的,术语“受体”和“受体抗体”是指提供一个或多个FR的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列的抗体。在一些实施方案中,术语“受体”是指提供恒定区的抗体氨基酸序列。在其他实施方案中,术语“受体”是指提供一个或多个FR和恒定区的抗体氨基酸序列。在特定实施方案中,术语“受体”是指提供一个或多个FR的至少80%、优选地至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列的人类抗体氨基酸序列。根据该实施方案,受体可以包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或至少10个在人类抗体的一个或多个特定位置上不存在的氨基酸残基。受体框架区和/或受体恒定区可以例如源自或获得自种系抗体基因、成熟抗体基因、功能性抗体(例如,本领域熟知的抗体、开发中的抗体或商购可得的抗体)。

[0063] 如本文使用的,术语“人类抗体”意图包括具有源自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人类抗体可以包括不被人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),所述氨基酸残基例如在CDR中并且特别是在CDR3中。然而,如本文使用的术语“人类抗体”不意图包括其中源自另一个哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已经被接枝到人类框架序列上的抗体。

[0064] 术语“重链可变区CDR1”和“H-CDR1”可互换使用,术语“重链可变区CDR2”和“H-CDR2”、术语“重链可变区CDR3”和“H-CDR3”、术语“轻链可变区CDR1”和“L-CDR1”、术语“轻链可变区CDR2”和“L-CDR2”以及术语“轻链可变区CDR3”和“L-CDR3”抗体片段也可互换使用。在整个说明书中,除非另外说明,否则互补性决定区(“CDR”)根据Kabat定义来定义。Kabat定义是用于对抗体中的残基进行编号的标准,并且通常用于识别CDR区(Kabat等人,

(1991),第5版,NIH publication No.91-3242)。

[0065] 抗原结合可以通过完整抗体的“片段”或“抗原结合片段”进行。在本文中,这两个术语可互换使用。术语抗体的“抗体片段”中涵盖的结合片段的实例包括Fab片段,即由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab')₂片段,即包含通过铰链区的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;单结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,1989.Nature341:544-546),它由VH结构域组成;以及分离的互补决定区(CDR)。

[0066] “单链可变片段(scFv)”是一种单一蛋白质链,其中VL区和VH区配对以形成单价分子(被称为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人,1988.Science242:423-426;和Huston等人,1988.Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。虽然VL和VH这两个结构域由单独的基因编码,但它们可以使用重组方法通过人工肽接头连接,所述人工肽接头使它们能够被制造为单一蛋白质链。这样的单链抗体包括一个或更多个抗原结合部分。这些抗体片段使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

[0067] 如本文使用的术语“单克隆抗体”和缩写“MAb”和“mAb”是指从大体上同质的抗体的群体中获得的抗体,即,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变之外,构成该群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同的抗体的多克隆抗体制备物不同,每种mAb针对抗原上的一种决定簇。修饰语“单克隆”不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。单克隆抗体可以通过例如产生抗体的细胞的单克隆,包括杂交瘤产生。术语“杂交瘤”通常是指培养的赘生性淋巴细胞和表达亲本细胞的特异性免疫潜能的引发的B或T淋巴细胞之间的细胞融合的产物。

[0068] “结合”感兴趣的抗原(例如,CD14)的抗体是以足够的亲和力结合该抗原,使得该抗体可用作靶向表达该抗原的细胞或组织的治疗剂,并且不与其他蛋白显著地交叉反应的抗体。在这样的实施方案中,抗体与“非靶”蛋白的结合的程度将小于抗体-寡肽或其它有机分子与其特定靶蛋白的结合的约10%,如例如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀或放射免疫沉淀(RIA)测定的。因此,拮抗其所结合的CD14的抗体合适地抑制或减少促炎介质,包括促炎细胞因子/趋化因子的产生。关于抗体与靶分子的结合,术语“特异性结合”或“特异性地结合至”特定多肽或特定多肽靶上的表位意指与非特异性相互作用或“对”特定多肽或特定多肽靶上的表位“特异性”意指与非特异性相互作用测量上不同(measurably different)的结合。特异性结合可以通过例如与对照分子的结合相比确定分子的结合来测量,所述对照分子通常是不具有结合活性的具有类似结构的分子。例如,特异性结合可以通过与类似于靶的对照分子竞争来测定,所述靶为例如过量的未标记的靶。在这种情况下,如果标记的靶与探针的结合被过量的未标记的靶竞争性抑制,则表明特异性结合。抗体结合的抗原的特异性区域通常被称为“表位”。术语“表位”广义上包括抗原上被抗体或T细胞受体特异性识别或以其他方式与分子相互作用的位点。通常表位是诸如氨基酸或碳水化合物或糖侧链的分子的活性表面组群(grouping),并且通常可以具有特定的三维结构特性以及特定的电荷特性。如本领域技术人员将理解的,实际上抗体可以特异性地结合的任何物质都可以是表位。

[0069] 如本文使用的术语“细胞”是指存在于CNS外部的包含mCD14并产生促炎介质(例如

细胞因子)的任何哺乳动物细胞。非限制性实例是免疫细胞、上皮细胞、成骨细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞。

[0070] 在整个说明书中,除非上下文另外要求,否则词语“包含/包括(comprise)”、“包含/包括(comprises)”和“包含/包括(comprising)”将被理解为暗示包含陈述的步骤或要素或步骤或要素的组,但不排除任何其他步骤或要素或步骤或要素的组。因此,术语“包含/包括”以及类似术语的使用表示列出的要素是必需的或强制的,但其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在。“由...组成(consisting of)”意指包括并且限于短语“由...组成”之间的任何事物。因此,短语“由...组成(consisting of)”表示列出的要素是必需的或强制的,并且不可以存在其他要素。“基本上由...组成(consisting essentially of)”意指包括短语之间列出的任何要素,并且限于不干扰或不促成本公开内容对列出的要素指定的活性或作用的其他要素。因此,短语“基本上由...组成(consisting essentially of)”表示列出的要素是必需的或强制的,但其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在,这取决于它们是否影响列出的要素的活性或作用。

[0071] 如本文使用的,提及“痴呆”是指属于这样的综合征的任何疾病,其中存在认知功能(即处理思维的能力)超出可由正常衰老预期的退化。在不将本发明限于任一种疾病的情况下,痴呆的实例包括AD、路易体痴呆-路易体痴呆(DLB)和帕金森病痴呆、血管性痴呆和额颞叶痴呆(FTD)。

[0072] 在治疗状况的上下文中,“有效量”意指向需要这样的治疗或预防的个体以单剂量或作为系列的一部分施用一定量的剂或组合物,该量对预防引起该状况的症状、控制(holding in check)该状况的此类症状和/或治疗该状况的现有症状有效。有效量将取决于待治疗个体的年龄、健康和身体状况以及疾病的症状是否明显,待治疗个体的分类群体,组合物的配制,医学情况的评估和其他相关因素而变化。最佳给药时间表可以从受试者体内药物累积的测量结果计算。最佳剂量可以取决于个体受试者的相对效力而变化,并且可以通常基于发现在体外和体内动物模型中有效的EC50值来估计。普通技术人员可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。预期该量将落入可以通过常规试验确定的相对宽的范围内。

[0073] “杂交”在本文中用于表示互补核苷酸序列产生DNA-DNA杂合体或DNA-RNA杂合体的配对。互补碱基序列为通过碱基配对规则相关的那些序列。在DNA中,A与T配对,并且C与G配对。在RNA中,U与A配对,并且C与G配对。在这点上,如本文使用的术语“匹配”和“错配”是指互补核酸链中配对的核苷酸的杂交潜力。匹配的核苷酸有效杂交,诸如上文提及的经典A-T和G-C碱基对。错配是不有效杂交的核苷酸的其他组合。在本发明中,优选的配对机制包括氢键键合,其可以是寡聚化合物链的互补核苷或核苷酸碱基(核碱基)之间的沃森-克里克、Hoogsteen或反向Hoogsteen氢键键合。例如,腺嘌呤和胸腺嘧啶为通过形成氢键配对的互补的核碱基。杂交可以在本领域技术人员已知的不同情况下发生。

[0074] 如本文使用的,术语“免疫细胞”是指存在于CNS外部的属于免疫系统的细胞。免疫细胞包括造血来源的细胞,诸如但不限于T淋巴细胞(T细胞)、B淋巴细胞(B细胞)、自然杀伤(NK)细胞、粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞,以及任何前述细胞的特定形式,例如,浆细胞样树突状细胞、朗格汉斯细胞(Langerhans cell)、浆细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、辅助T细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

[0075] 本文中提及“免疫相互作用”及其语法等同物包括提及分子之间的任何相互作用、反应或其他形式的缔合,并且特别地其中一种分子为免疫系统的组分或模拟免疫系统的组分。

[0076] 如本文使用的,与细胞的“促炎介质的产生”相关的术语“抑制(inhibit)”、“抑制(inhibiting)”、“降低(decrease)”或“降低(decreasing)”以及类似术语是指外周细胞产生的一种或更多种促炎介质的水平或量的至少小但可测量的降低。在实施方案中,细胞的促炎介质的产生相对于未经治疗的对照相比被抑制或降低至少20%;在更多实施方案中,抑制或降低为至少50%;在仍然更多的实施方案中,抑制或降低为至少70%,并且在实施方案中,抑制或降低为至少80%。在体内实施方案中,促炎介质产生的这样的降低能够减少炎性介质级联的有害影响。

[0077] 合适的体外测定(例如ELISA、RT-PCR)可以用于评估CD14拮抗剂抗体在抑制或减少外周细胞的促炎介质产生方面的功效。例如,竞争性RT-PCR技术可以用于测量从细胞内获得的细胞因子mRNA的水平,并且从细胞释放的表达的细胞因子的水平可以通过夹心ELISA来测量,所述夹心ELISA使用例如一种或更多种特异性地结合特定细胞因子的单克隆抗体进行。体内筛选也可以通过以下本领域熟知的程序进行。例如,向动物模型(例如,小鼠)施用CD14拮抗剂抗体,并且收集血液以评估各种细胞因子的水平。技术人员将精通可用于测量细胞因子产生的技术。基于结果,还可以确定适当的剂量范围和全身施用途径。

[0078] “分离的”意指大体上或基本上不含在其天然状态下通常伴随其的组分的材料。

[0079] 如本文使用的术语“配体”是指能够结合受体的任何分子。

[0080] 如本文使用的短语“运动神经元疾病(MND)”是指选择性地破坏运动神经元的神经性紊乱。

[0081] 短语“神经退行性疾病”意指以进行性神经系统功能障碍为特征的疾病。神经退行性疾病包括具有许多不同的病因的中枢或外周神经系统疾病的异质组。这样的状况可以是但不限于遗传性的、继发于毒性过程或代谢过程的并且可以由感染引起。神经退行性状况是可以与年龄相关的或慢性的进行性状况。这样的状况的特征可以在于脑的相对特定区域或神经元的特定群体的异常。不同神经退行性状况中受影响的特定细胞群组通常决定该状况的临床表型。特别地,神经退行性状况可以与特定的受影响的中枢或外周神经系统结构的萎缩相关。

[0082] 示例性神经退行性疾病或状况包括但不限于运动神经元疾病(MND),包括肌萎缩性侧索硬化(ALS)(也被称为卢伽雷病)、原发性侧索硬化(PLS)、进行性肌萎缩(PMA)、进行性延髓麻痹(PBP)和假性延髓麻痹。其他示例性神经退行性疾病或状况包括痴呆,诸如阿尔茨海默病、帕金森综合征、路易体痴呆(DLB和PDD)、血管性痴呆、额颞叶痴呆、中脑边缘皮质痴呆(mesolimbocortical dementia)、伴有痉挛性瘫痪的家族性痴呆和AIDS相关的痴呆。

[0083] 其他示例性神经退行性疾病包括帕金森病、脊髓性肌萎缩、遗传形式的脊髓性肌萎缩、夏科-马里-图思病(Charcot-Marie-Tooth Disorder)、肯尼迪病和小儿麻痹综合征后多发性硬化(post-polio syndrome multiple sclerosis)、弥漫性脑皮质萎缩、皮克病、丘脑变性、亨廷顿舞蹈症、皮质-纹状体-脊髓变性、皮质-基底神经节变性、大脑小脑变性、葡聚糖体病、夏-德综合征、橄榄体脑桥小脑萎缩(olivopontocerebellar atrophy)、进行性核上性麻痹、畸形性肌张力障碍、哈勒沃登-施帕茨病、梅格斯综合征、家族性震颤、抽动

秽语综合征(Gilles de la Tourette syndrome)、acanthocytic舞蹈症、弗里德赖希共济失调、Holmes家族性皮质小脑萎缩、Gerstmann-Straussler-Scheinker病、遗传性肌萎缩、痉挛性下肢麻痹、腓骨肌萎缩、肥厚性间质性多神经病、多神经炎型遗传性共济失调(heredopathia atactica polyneuritiformis)、视神经病变。技术人员理解,其中潜在的炎症组分导致疾病病理学的这些和其他轻度、中度或重度神经退行性状况可以根据本发明的方法治疗。

[0084] 常见的是,人们患有混合型痴呆-两种或更多种疾病的组合,其中至少一种是痴呆。例如,一些人同时患有阿尔茨海默病和血管性痴呆,少数受FTD影响的人还发展了运动神经元疾病(FTD/MND)(有时称为伴有肌萎缩性侧索硬化的FTD或FTD/ALS)。因此,还应理解,如本文使用的,提及“神经退行性疾病”是提及被诊断患有的一种或更多种神经退行性疾病或具有发展一种或更多种神经退行性疾病风险的受试者。

[0085] 本文中可互换使用的术语“患者”、“受试者”或“个体”是指已经被诊断患有神经退行性疾病或被鉴定为具有发展神经退行性疾病的增加的可能性的任何受试者,特别是脊椎动物受试者,甚至更特别是哺乳动物受试者。患者可以是健康的或显示出神经退行性疾病的初步迹象,诸如但不与肌肉疲劳或记忆丧失有关。可选择地,受试者可以具有该疾病的遗传倾向。

[0086] 虽然“受试者”通常是人类受试者,但在以下方面中神经退行性疾病和状况的发展或进展的治疗也可以是重要的:诸如治疗马的马运动神经元疾病、治疗狗的犬脊髓肌萎缩以及进行动物研究。因此,本文中提及“患者”、“受试者”或“个体”包括人类和非人类哺乳动物,诸如但不限于马,伴侣动物诸如狗和猫,以及实验室试验动物诸如小鼠、大鼠、豚鼠、仓鼠、兔、猪和非人类灵长类动物。

[0087] 如本文使用的,术语“全身施用(systemic administration)”或“全身施用(administered systemically)”或“全身施用(systemically administered)”是指将剂引入受试者的中枢神经系统外部。全身施用涵盖除了直接施用于脊柱或脑之外的任何施用途径。因此,鞘内施用和硬膜外施用以及颅注射或植入显然不在术语“全身施用(systemic administration)”、“全身施用(administered systemically)”或“全身施用(systemically administered)”的范围内。将理解,全身施用并不排除在CNS中产生治疗效果。

[0088] 适用于本发明的药物组合物可以被全身施用,例如,以任何可接受的形式诸如片剂、液体、胶囊、粉末或类似物口服施用;通过静脉内、腹膜内、肌内、皮下或肠胃外注射施用;通过透皮扩散或电泳施用;和通过微型泵或其他植入的延长释放装置或制剂施用。根据一些实施方案,全身施用通过选自由以下组成的组的途径进行:腹膜内、静脉内、皮下和鼻内施用及其组合。

[0089] 如本文使用的,提及“外周”包括发现其中细胞表达mCD14或循环sCD14的身体任何部分(所述任何部分不是CNS的一部分),包括例如循环系统(例如心血管系统和淋巴系统)和外周神经系统。

[0090] “药学上可接受的载体”意指药物媒介物,所述药物媒介物包含不是生物学上或以其他方式不希望的材料,即,该材料可以与选择的活性剂一起被施用至受试者而不引起任何或实质的不良反应。载体可以包括赋形剂和其他添加剂,诸如稀释剂、去垢剂、着色剂、湿

润剂或乳化剂、pH缓冲剂、防腐剂、转染剂等。

[0091] 类似地,如本文提供的化合物的“药理学上可接受的”盐、酯、酰胺、前药或衍生物不是生物学上或其他方面不希望的盐、酯、酰胺、前药或衍生物。

[0092] 术语“多核苷酸”、“遗传物质”、“遗传形式”、“核酸”和“核苷酸序列”包括RNA、cDNA、基因组DNA、合成形式和混合的聚合物、有义链和反义链两者,并且如本领域技术人员将容易理解的,可以是化学或生物化学修饰的,或者可以包含非天然或衍生的核苷酸碱基。

[0093] 术语“促炎介质”意指促进(favor)炎症的免疫调节剂。这样的剂包括细胞因子,诸如趋化因子、白细胞介素(IL)、淋巴因子和肿瘤坏死因子(TNF)以及生长因子。在特定实施方案中,促炎介质是“促炎细胞因子”。通常,促炎细胞因子包括主要负责早期应答的IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 。其他促炎介质包括LIF、IFN- γ 、IFN- β 、IFN- α 、OSM、CNTF、TGF- β 、GM-CSF、TWEAK、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-8、IL-16、IL-22、IL-23、IL-31和IL-32(Tato等人,2008.Cell 132:900;Cell 132:500,Cell132:324)。促炎介质可以充当内源性热原(IL-1、IL-6、IL-17、TNF- α),上调由巨噬细胞和间充质细胞(包括成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞)二者的次级介质和促炎细胞因子的合成,刺激急性期蛋白的产生,或吸引炎性细胞。在特定实施方案中,术语“促炎细胞因子”涉及TNF- α 、IL-1 α 、IL-6、IFN- β 、IL-1 β 、IL-8、IL-17和IL-18。

[0094] 术语“受体”表示与被成为“配体”的生物活性分子结合的细胞缔合的(cell-associated)蛋白。这种相互作用介导了配体对细胞的作用。一般而言,配体与受体的结合导致受体的构象变化,这导致受体与细胞表面上或细胞内部的其他分子之间的相互作用,进而导致细胞代谢的改变。通常与受体-配体相互作用相关的(linked)代谢事件包括基因转录、磷酸化、去磷酸化、环AMP产生增加、细胞钙动员、膜脂质动员、细胞粘附、肌醇脂质水解、磷脂水解和细胞途径调节(例如,刺激或抑制一种或更多种促炎介质的产生)。

[0095] 本文使用的术语“序列同一性”是指在比较窗口内基于逐个核苷酸(nucleotide-by-nucleotide)或基于逐个氨基酸(amino acid-by-amino acid)的序列相同的程度。因此,“序列同一性百分比(percentage of sequence identity)”如下计算:在比较窗口内比较两个最佳比对的序列,确定两个序列中出现的相同的核酸碱基(例如,A、T、C、G、I)或相同的氨基酸残基(例如,Ala、Pro、Ser、Thr、Gly、Val、Leu、Ile、Phe、Tyr、Trp、Lys、Arg、His、Asp、Glu、Asn、Gln、Cys和Met)的位置的数目以产生匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗口中位置的总数目(即,窗尺寸),并且将结果乘以100以得到序列同一性的百分比。为了本发明的目的,“序列同一性”将被理解为意指通过适当方法计算的“匹配百分比”。例如,序列同一性分析可以使用如软件附带的参考手册中使用的标准缺省值,使用DNASIS计算机程序(windows版本2.5;可从Hitachi Software engineering Co.,Ltd.,South San Francisco,California,USA获得)进行。

[0096] “相似性(Similarity)”是指如表1中定义的不同氨基酸或构成保守取代的氨基酸的百分数。

[0097] 表1

[0098]

原始残基	示例性取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln、His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn、Gln
Ile	Leu、Val
Leu	Ile、Val
Lys	Arg、Gln、Glu
Met	Leu、Ile、

[0099]

Phe	Met、Leu、Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp、Phe
Val	Ile、Leu

[0100] 相似性可以使用序列比较程序例诸如GAP (Deveraux等人,1984.Nucleic Acids Res.12,387-395) 确定。以这种方式,可以通过在比对中插入空位来比较与本文提及的那些序列长度相似或大体上不同的序列,这样的空位例如由GAP使用的比较算法确定。

[0101] 用于描述两个或更多个多核苷酸或多肽之间的序列关系的术语包括“参考序列(reference sequence)”、“比较窗口(comparison window)”、“序列同一性(sequence identity)”、“序列同一性百分比(percentage of sequence identity)”和“实质同一性

(substantial identity)”。“参考序列”的长度为至少12个但经常为15至18个并且通常为至少25个单体单元,所述单体单元包括核苷酸和氨基酸残基。因为两个多核苷酸可以各自包含(1)在两个多核苷酸之间相似的序列(即,仅完整多核苷酸序列的部分),和(2)在两个多核苷酸之间不同的序列,两个(或更多个)多核苷酸之间的序列比较通常通过在“比较窗口”上比较两个多核苷酸的序列进行,以鉴定和比较序列相似性的局部区域。“比较窗口”是指至少6个连续位置,通常约50个至约100个连续位置,更通常约100个至约150个连续位置的概念区段,其中在两个序列被最佳比对后,将序列与具有相同数目的连续位置的参考序列进行比较。为了两个序列的最佳比对,与参考序列(其不包含添加或缺失)相比,比较窗口可以包含约20%或更少的添加或缺失(即,空位)。用于比对比较窗口的最佳序列比对可以通过算法的计算机化实现(Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group,575Science Drive Madison, WI, USA)或通过检查进行,并且选择多种方法的任一种产生的最佳比对(即,导致比较窗口上最高的同源性百分比)。还可以参考例如由Altschul等人,1997.Nucleic Acids Res.25:3389公开的BLAST程序家族。序列分析的详细讨论可以在Ausubel等人,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley&Sons Inc,1994-1998,第15章的19.3单元中找到。

[0102] 如本文使用的“严格性”是指在杂交期间温度和离子强度条件,以及某些有机溶剂的存在或不存在。严格性越高,观察到的序列之间的互补性程度将越高。如本文使用的“严格条件”是指在该条件下仅有具有高比例的互补碱基的多核苷酸,优选地具有精确互补性的多核苷酸将杂交的温度和离子条件。所要求的严格性为核苷酸序列依赖性的,并且取决于杂交期间存在的各种组分,并且当使用核苷酸类似物时,严格性极大地变化。通常,严格条件被选择为比特定序列在定义的离子强度和pH的热解链温度(thermal melting point)(T_m)低约10°C至20°C。 T_m 是在定义的离子强度和pH下50%靶序列与互补探针杂交的温度。将理解,多核苷酸将至少在低严格性条件下、优选地至少在中等严格性条件下并且更优选地,多核苷酸将至少在高严格性条件下与靶序列杂交。本文中提及低严格性条件包括和涵盖从至少约1% v/v至至少约15% v/v甲酰胺和从至少约1M至至少约2M盐用于在42°C杂交,以及至少约1M至至少约2M盐用于在42°C洗涤。低严格性条件还可以包括1%牛血清白蛋白(BSA)、1mM EDTA、0.5M NaH_2PO_4 (pH 7.2)、7% SDS用于在65°C杂交,以及(i) 2×SSC、0.1% SDS;或(ii) 0.5% BSA、1mM EDTA、40mM NaH_2PO_4 (pH 7.2)、5% SDS用于在室温洗涤。中等严格性条件包括并且涵盖从至少约16% v/v至至少约30% v/v甲酰胺和从至少约0.5M至至少约0.9M盐用于在42°C杂交,以及至少约0.5M至至少约0.9M盐用于在42°C洗涤。中等严格性条件还可以包括1%牛血清白蛋白(BSA)、1mM EDTA、0.5M NaH_2PO_4 (pH 7.2)、7% SDS用于在65°C杂交,以及(i) 2×SSC、0.1% SDS;或(ii) 0.5% BSA、1mM EDTA、40mM NaH_2PO_4 (pH 7.2)、5% SDS用于在42°C洗涤。高严格性条件包括并且涵盖从至少约31% v/v至至少约50% v/v甲酰胺和从至少约0.01M至至少约0.15M盐用于在42°C杂交,以及至少约0.01M至至少约0.15M盐用于在42°C洗涤。高严格性条件还可以包括1% BSA、1mM EDTA、0.5M NaH_2PO_4 (pH 7.2)、7% SDS用于在65°C杂交,以及(i) 0.2×SSC、0.1% SDS;或(ii) 0.5% BSA、1mM EDTA、40mM NaH_2PO_4 (pH 7.2)、1% SDS用于在超过65°C的温度洗涤。高严格性条件的一个实施方案包括在约45°C在6×SSC中杂交,随后在65°C在0.2×SSC、0.1% SDS中洗涤一次或更多次。非常高严格性条件的一个实

施方案包括在65℃在0.5M磷酸钠、7%SDS中杂交,随后在65℃在0.2×SSC、1%SDS中洗涤一次或更多次。其他严格条件是本领域中熟知的。熟练的处理人员(skilled addressee)将认识到,多种因素可以被操作,以优化杂交的特异性。最终洗涤的严格性的优化可以用于确保高程度的杂交。对于详细的实例,参见CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(同上),在2.10.1至2.10.16页以及MOLECULAR CLONING.A LABORATORY MANUAL(Sambrook等人,编辑)(Cold Spring Harbor Press 1989)在1.101至1.104节。

[0103] 如本文使用的,提及神经退行性疾病的“症状”是被认为指示疾病的身体或精神特征。非限制性MND介导的疾病症状包括进行性肌萎缩、瘫痪、痉挛、反射亢进和其他症状,诸如吞咽困难、肢体无力、说话含糊不清、步态受损、面部无力、呼吸变化和肌痉挛。非限制性痴呆疾病症状包括难以记住最近的谈话、姓名或事件;冷漠和抑郁(早期症状);交流障碍;判断力差;定向障碍;混乱;行为改变以及说话困难、吞咽困难和行走困难(后期症状)。可以指示神经退行性疾病或与神经退行性疾病相关的其他症状的实例包括例如幻觉、睡眠障碍、运动症状和精神抑制敏感性。通常,受试者将表现一种或若干种症状,这取决于疾病和个体受试者。确定哪些症状被认为指示了特定的神经退行性疾病将完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0104] 如本文使用的,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”以及类似术语是指在需要治疗的受试者,即患有神经退行性疾病或被诊断为患有神经退行性疾病的受试者或者具有发展神经退行性疾病风险的受试者中获得期望的药理作用和/或生理作用。“治疗”意指:

[0105] (a) 延迟神经退行性疾病的发展和/或进展;

[0106] (b) 改善神经退行性疾病的症状;

[0107] (c) 抑制神经退行性疾病或其症状;和/或

[0108] (d) 改善或延长生活质量。

[0109] 提及“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”或“治疗(treating)”并不一定意指治愈受试者或无限期地防止疾病进展。受试者可能最终屈服于神经退行性疾病,然而,由于疾病或状况的发展被延迟,因此生活质量延长了比不治疗更长的时间段。

[0110] 成功“治疗”的标志,包括任何客观或主观参数,诸如消除;缓解;对病人来说更容易忍受的记忆减退或状况;变性或疾病衰退或恶化的速度减缓;使恶化的最终点的虚弱性降低;或者改善受试者的身体或心理健康。症状的治疗或改善可以基于客观或主观参数;包括身体检查、神经检查和/或精神评估的结果。

[0111] 如本文使用的,与在没有任何下划线或斜体的情况下的基因名称指示的蛋白产物相比,基因名称加下划线或斜体应该指示基因。例如,“CD14”应意指CD14基因,而“CD14”应指示由“CD14”基因的转录和翻译和/或可选择的剪接产生的一种或更多种蛋白产物。

[0112] 除非另外特别说明,否则本文描述的每个实施方案被加以必要的改变以用于每个实施方案。

[0113] 2. 用于治疗神经退行性疾病或其症状的发展或进展的组合物和方法

[0114] 本发明提供了包括CD14拮抗剂抗体的方法和组合物,其用于治疗神经退行性疾病或其症状的发展或进展。

[0115] 2.1 CD14拮抗剂抗体

[0116] 本发明预期了任何CD14拮抗剂抗体,所述CD14拮抗剂抗体结合CD14(例如mCD14或sCD14)并且阻断DAMP或PAMP与CD14结合,和/或结合CD14并且抑制或减少CD14激动剂介导的响应,该响应导致促炎介质的产生,包括促炎细胞因子的产生。在一些实施方案中,本发明的CD14拮抗剂抗体抑制CD14激动剂(合适地是DAMP或PAMP)与CD14的结合,由此抑制或减少促炎细胞因子的产生。在这种类型的说明性实例中,CD14拮抗剂抗体选自结合包含在人类CD14的从氨基酸7至氨基酸14的区域的至少一部分中的表位的3C10抗体(van Voohris等人,1983.J.Exp.Med.158:126-145;Juan等人,1995.J.Biol.Chem.270(29):17237-17242),结合包含在CD14的从氨基酸57至氨基酸64的区域的至少一部分中的表位的MEM-18抗体(Bazil等人,1986.Eur.J.Immunol.16(12):1583-1589;Juan等人,1995.J.Biol.Chem.270(10):5219-5224),4C1抗体(Adachi等人,1999.J.Endotoxin Res.5:139-146;Tasaka等人,2003.Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.;2003.29(2):252-258),以及抑制LPS的结合和抑制促炎细胞因子的产生的28C5和23G4抗体,和部分地抑制LPS的结合和抑制促炎细胞因子的产生的18E12抗体(Leturcq等人的美国专利第5,820,858号、第6,444,206号和第7,326,569号)。在一些实施方案中,本发明的CD14拮抗剂抗体抑制CD14与TLR诸如TLR4的结合,从而阻断CD14激动剂介导的响应,其说明性实例包括国际公布W02002/42333中公开的F1024抗体。与CD14拮抗剂抗体相关的以上参考文献中的每一篇都通过引用以其整体并入本文。CD14拮抗剂抗体可以是全长免疫球蛋白抗体或完整抗体的抗原结合片段,所述抗原结合片段的代表性实例包括Fab片段、F(ab')₂片段、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段、单结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,1989.Nature341:544-546),其由VH结构域组成;以及分离的CDR。合适地,CD14拮抗剂抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人类抗体。

[0117] 在一些实施方案中,CD14拮抗剂抗体选自美国专利第5,820,858号中公开的抗体:

[0118] (1) 一种抗体,包含:

[0119] VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

QSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSFGNSFMH WYQQKAGQPPKSSIIY RAANLES

[0120] GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFC QQSYEDPWT FGGGTKLGNG [SEQ ID NO: 1]
(3C10 VL)

;

[0121] 以及

[0122] VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

LVKPGGSLKLSCVASGFTFS SYAMS WVRQTPEKRLEWVA SISSGGTTYYPDNVKG

[0123] RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCAR GYYDYHY WGQGTTLTVSS [SEQ ID NO: 2]
(3C10 VH)

;

[0124] (2) 一种抗体,包含:

[0125] VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:

- QSPASLAVSLGQRATISC RASESVDSYVNSFLH WYQQKPGQPPLLIY RASNLQS
- [0126] GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCC QQSNEPTT FGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 3] (28C5 VL) ;
- [0127] 以及
- [0128] VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:
- LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSIT SDSAWN WIRQFPGNRLEWMG YISYSGSTSYNPSLKS
- [0129] RISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVR GLRFAY WGQGLTVTSA [SEQ ID NO: 4] (28C5 VH) ;
- [0130] 以及
- [0131] (3) 一种抗体,包含:
- [0132] VL结构域,所述VL结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:
- QTPSSLSASLGDRVTISC RASQDIKNYLN WYQQPGGTVKVLII YTSRLHS
- [0133] GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFC QRGDTLPWT FGGGTKLEIK [SEQ ID NO: 5] (18E12 VL) ;
- [0134] 以及
- [0135] VH结构域,所述VH结构域包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成:
- LESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLT NYDIS WIRQPPGKGLEWLG VIWTSGGTNYNSAFMS
- [0136] RLSITKDNSESQVFLKMNGLQTDGTGIYYCVR GGNFYLYNFDY WGQGTTLTVSS [SEQ ID NO: 6] (18E12 VH) ;
- [0137] 还预期了包含上述抗体的VL和VH CDR序列的抗体,其代表性实施方案包括:
- [0138] (1) 一种抗体,包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7] (3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8] (3C10 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9] (3C10 L-CDR3);以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10] (3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11] (3C10 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GYDYHY[SEQ ID NO:12] (3C10 H-CDR3);
- [0139] (2) 一种抗体,包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13] (28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14] (28C5 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSNEPTT[SEQ ID NO:15] (28C5 L-CDR3);以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16] (28C5 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17] (28C5 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18] (28C5 H-

CDR3);以及

[0140] (3) 一种抗体,包含:a) 抗体VL结构域或其抗原结合片段,所述抗体VL结构域或其抗原结合片段包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19] (18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20] (18E12 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21] (18E12 L-CDR3);以及b) 抗体VH结构域或其抗原结合片段,所述抗体VH结构域或其抗原结合片段包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22] (18E12 H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23] (18E12 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24] (18E12 H-CDR3)。

[0141] 在一些实施方案中,CD14拮抗剂抗体是人源化的。在这种类型的说明性实例中,人源化CD14拮抗剂抗体合适地包含对应于CD14拮抗剂抗体(例如,上文描述的CD14拮抗剂抗体中的一种)的供体CDR集合和人类受体框架。人类受体框架可以在选自以下组成的组的关键残基处包含相对于人类种系受体框架的至少一个氨基酸取代:邻近CDR的残基;糖基化位点残基;稀有残基;经典残基;重链可变区和轻链可变区之间的接触残基;Vernier区内的残基;以及在Chothia定义的VH CDR1和Kabat定义的第一重链框架之间重叠的区域中的残基。用于产生人源化mAb的技术在本领域中是众所周知的(参见,例如,Jones等人,1986.Nature 321:522-525;Riechmann等人1988.Nature 332:323-329;Verhoeyen等人,1988.Science 239:1534-1536;Carter等人,1992.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-4289;Sandhu,JS.,1992.Crit.Rev.Biotech.12:437-462,和Singer等人,1993.J.Immunol.150:2844-2857)。嵌合的或鼠单克隆抗体可以通过将小鼠CDR从小鼠免疫球蛋白的重可变链和轻可变链转移至人类抗体的相应可变结构域中来人源化。嵌合单克隆抗体中的小鼠框架区(FR)也被人类FR序列替代。由于简单地将小鼠CDR转移至人类FR中常常导致抗体亲和力的降低甚至丧失,因此可能需要另外的修饰以便恢复鼠抗体的原始亲和力。这可以通过用FR区中的一个或多个人类残基替代为鼠对应物,以获得对其表位具有良好结合亲和力的抗体来实现。参见,例如,Tempest等人(1991.Biotechnology 9:266-271)和Verhoeyen等人(1988同上)。通常,与其鼠对应物不同并且位于一个或多个CDR氨基酸残基附近或与之接触的那些人类FR氨基酸残基将是用于取代的候选。

[0142] 在优选的实施方案中,CD14拮抗剂抗体是IC14抗体(Axtelle等人,2001.J.Endotoxin Res.7:310-314;和美国专利申请第2006/0121574号,所述文献通过引用以其整体并入本文)或其抗原结合片段。IC14抗体是特异性地结合人类CD14的嵌合(鼠/人类)单克隆抗体。该抗体的鼠亲本是上文提到的28C5(参见,Leturcq等人的专利第5,820,858号、第6,444,206号和第7,326,569号,以及Leturcq等人,1996.J.Clin.Invest.98:1533-1538)。IC14抗体包含VL结构域和VH结构域,其中:

[0143] VL结构域包含氨基酸序列:

METDTILLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQP
PKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRDTFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKEIKRTVA
[0144] APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [SEQ ID NO: 25]

;

[0145] 并且

[0146] VH结构域包含氨基酸序列：

MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQLQQSGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWM
GYISYSGSTSYNPSLKSRISTRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGLTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGKTQTCNVDPKPSNTKVDKRVEVKYGPCCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
[0147] VTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK [SEQ ID
NO: 26]

[0148] 2.2筛选方法

[0149] 本发明还提供了用于鉴定适用于在神经退行性疾病或其症状的发展或进展的治疗中使用的CD14的拮抗剂抗体的方法。这些方法通常包括确定测试剂是否能够直接拮抗CD14。例如，所述方法可以包括确定测试剂是否能够抑制或降低CD14的量或激动剂活性，其中抑制或降低CD14的量或激动剂活性的能力表明测试剂可以适用于在治疗本文描述的神经退行性疾病或其症状的发展或进展中使用。在一些实施方案中，使测试剂与CD14或在其表面表达CD14的细胞或表达CD14的核酸序列接触，合适地在CD14激动剂诸如DAMP或PAMP的存在下接触，其中当与对照相比时，在激动剂的存在下CD14的量或激动剂活性的降低表明测试剂结合至CD14并且直接拮抗CD14。CD14激动剂活性的降低或抑制，包括例如抑制或降低下游途径诸如TLR信号传导途径（例如，TLR4信号传导途径）和TRIF途径的活化，或引发细胞应答（例如，产生包括促炎细胞因子的促炎介质）。在实施方案中，拮抗剂抗体与受试者的表达mCD14的外周细胞或sCD14的结合抑制或降低了一种或更多种与疾病病理学相关的促炎细胞因子的产生。

[0150] 本发明的筛选方法可以在体内、离体或在体外进行。特别地，使测试剂与CD14或与其表面上表达CD14的细胞（例如，免疫细胞）接触的步骤可以在体内、离体或在体外进行。本发明的筛选方法可以在基于细胞的系统或无细胞系统中进行。例如，本发明的筛选方法可以包括使其表面上表达CD14的细胞与测试剂接触，并且确定细胞与测试剂的接触是否导致CD14的量或激动剂活性降低的步骤。

[0151] 在这样的基于细胞的测定中，CD14和/或测试剂可以是宿主细胞内源性的、可以被引入宿主细胞或组织中、可以通过引起或允许表达构建体或载体的表达而被引入宿主细胞或组织中、或者可以通过刺激或活化来自细胞的内源性基因的表达而被引入宿主细胞中。在这样的基于细胞的方法中，CD14的活性量可以在存在或不存在测试剂的情况下进行评估，以便确定剂是否改变细胞中CD14的量，诸如通过调节细胞中CD14表达或通过破坏细胞中CD14蛋白的稳定性来改变细胞中CD14的量，或者是否改变了细胞的CD14激动剂活性。在存在测试剂的情况下，存在较低的CD14激动剂活性或细胞表面上CD14量的降低表明，测试剂可以是根据本发明用于治疗患有神经退行性疾病或其症状的个体的合适的CD14拮抗剂。

[0152] 在一个实施方案中，这样的基于细胞的测定可以在源自待治疗患者的细胞或组织上在体外或离体进行。因此，可以确定测试剂是否能够降低该受试者的细胞中CD14的活性或量。在实施方案中，细胞是干细胞或巨噬细胞。

[0153] 在优选的实施方案中，所述方法还包括确定测试剂是否缺乏与另一种细胞组分的

实质性或可检测的结合,所述另一种细胞组分合适地是CD14的结合配偶体,诸如分泌的(例如,MD2)或位于细胞膜上(例如,TLR4)的CD14结合配偶体,从而确定测试剂是CD14的特异性拮抗剂。在这种类型的非限制性实例中,测试剂在CD14激动剂诸如DAMP或PAMP的存在下接触(1)在其表面上表达CD14的野生型细胞(例如,免疫细胞诸如巨噬细胞),和(2)CD14阴性细胞(例如,与(1)相同但CD14基因功能丧失的免疫细胞)。如果测试剂抑制野生型细胞的CD14激动剂活性,但不抑制CD14阴性细胞的CD14激动剂活性,这表明测试剂是CD14特异性拮抗剂。这种类型的细胞可以使用常规程序或动物来构建。

[0154] 在其他实施方案中,本发明的筛选方法可以使用无细胞测定。例如,CD14可以存在于无细胞环境中。合适的无细胞测定可以在细胞提取物中进行。例如,本发明的方法的接触步骤可以在从可以表达、产生或以其他方式包含CD14和/或测试剂的细胞获得的提取物中进行。包含CD14的无细胞系统可以与本发明方法的其他组分诸如测试剂一起孵育。

[0155] 本发明的方法的接触步骤可以包括各种组分的孵育。这样的孵育可以在任何合适的温度进行,通常在4°C和40°C之间。孵育期(incubation period)可以针对最佳活性选择,但也可以被优化以促进快速高通量筛选。在接触和任选的孵育步骤之后,本发明的方法还可以包括除去未结合的组分的洗涤步骤,其中当需要除去在检测期间将产生背景信号的标记物时,通常采用这样的洗涤步骤,所述标记物诸如放射性或荧光标记的非特异性结合的组分。

[0156] 基于细胞的测定系统或无细胞测定系统中的孵育可以在微量滴定板(例如,96孔板或其他微孔板)中进行。此外,孵育可以以自动化方式进行(例如,用于高通量筛选)。

[0157] 本发明的筛选方法可以在体内进行。例如,筛选方法可以在动物模型中进行。在这样的体内模型中,测试剂的效果可以在循环(例如,血液)中或者在其他器官诸如肝、肾或心脏中评估。合适地,动物是非人类动物,诸如小鼠或大鼠。这样的模型可以用于评估测试剂的体内效果。例如,这样的模型可以用于评估测试剂是否能够在体内降低CD14的活性或量。在这样的方法中,可以评估CD14的量和/或激动剂活性。

[0158] 体内模型还可以用于确定测试剂是否具有任何不希望的副作用。例如,本发明的方法可以将测试剂对CD14的作用与其对其他受体或细胞组分(例如,CD14结合配偶体诸如MD2和TLR4)的作用进行比较,以便确定测试剂是否是特异性的。MND的体内动物模型是本领域技术人员所熟知的。

[0159] 在如本文描述的体内模型或如本文描述的体外模型诸如基于细胞的测定模型或无细胞测定模型中,可以将测试剂对CD14的作用与同一剂对细胞组分(包括CD14结合配偶体诸如MD2和TLR4)的作用进行比较。如上文讨论的,用于在如本文描述的治疗和预防的方法中使用的期望的CD14拮抗剂抗体可以是特异性地拮抗CD14的抗体。因此,本发明的筛选方法可以包括评估测试剂是否对一种或更多种其他这样的细胞组分的活性或量具有任何作用的另外的步骤。在这样的方法中,如果发现测试剂降低CD14的活性或量,但不降低、不显著降低、不显著降低、不改变或不显著改变一种或更多种其他细胞组分(包括CD14结合配偶体诸如MD2和TLR4)的活性或量,则测试剂可以被鉴定为合适的CD14拮抗剂抗体。

[0160] 在本文描述的筛选方法中,在测试剂存在的情况下,存在较低的CD14激动剂活性或减少的量的CD14表明,测试剂可以是根据本发明用于治疗个体的神经退行性疾病或其症状的发展或进展的CD14的合适拮抗剂抗体。

[0161] 作为CD14的拮抗剂的测试剂在测试剂的存在下可以导致CD14活性或水平与不存在该测试剂的情况相比降低至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少60%、至少75%或至少85%或更多。作为CD14的拮抗剂的测试剂可以导致CD14激动剂活性或水平的降低,使得CD14的激动剂活性或水平在测试剂的存在下不再可检测。这样的降低可以在被测试的样品中看到,或者例如在所述方法在动物模型中,特别是在来自动物的组织,诸如循环中或其他器官诸如肝、肾或心脏中进行时看到。

[0162] 作为CD14的拮抗剂的测试剂优选地是如上文描述的CD14的特异性拮抗剂。然而,这并不意味着CD14的特异性拮抗剂完全没有脱靶拮抗活性。就这一点而言,CD14的特异性拮抗剂可以具有对其他细胞组分的可忽略的或微小的直接结合和作用,使得非CD14细胞组分的活性、信号传导或表达的拮抗作用比该剂的直接结合和对CD14的活性、信号传导或表达的作用小于15%、小于10%、小于5%、小于1%或小于0.1%。

[0163] CD14的水平或量可以通过评估CD14基因的表达来测量。基因表达可以通过观察mRNA产生或水平或者观察蛋白产生或水平来评估。表达产物诸如mRNA和蛋白可以通过本领域已知的方法鉴定或定量。这样的方法可以利用杂交来特异性地鉴定感兴趣的mRNA。例如,这样的方法可以包括PCR或实时PCR方法。鉴定或定量感兴趣的蛋白的方法可以包括使用结合该蛋白的抗体。例如,这样的方法可以包括蛋白印迹法。CD14基因表达的调控可以在存在和不存在测试剂的情况下进行比较。因此,可以鉴定与不存在测试剂的情况下相比降低CD14基因表达的测试剂。这样的测试剂可以是根据本发明的合适的CD14拮抗剂。

[0164] 筛选方法可以评估CD14的激动剂活性。例如,这样的方法可以使用外周血单核细胞进行。这样的细胞将响应于用例如LPS的刺激产生细胞因子,诸如IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、IFN- β 、IL-1 β 、IL-17和IL-8。因此,筛选方法可以包括将外周血单核细胞与测试剂或媒介物组合,并添加LPS。然后将细胞孵育持续一段时间(例如,24小时),以允许产生促炎介质,诸如细胞因子。然后可以评估细胞在该时间段内产生的细胞因子诸如IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、IFN- β 、IL-1 β 、IL-17和IL-8的水平。如果测试剂具有抗CD14性质,那么与媒介物处理的细胞相比,这样的细胞因子的产生应当降低。

[0165] 还可以进行另外的测试,以便确认测试剂适用于在请求保护的方法中使用。例如,如上文说明的,CD14的合适的拮抗剂抗体应能够减少促炎介质产生(通常也被称为细胞因子风暴)的有害后果。因此,本发明的筛选方法可以包括另外的步骤,诸如上文讨论的那些步骤,这些步骤包括评估在产生促炎介质的动物(例如,患有ALS的动物)中测试剂的效果,并且将该效果与在不存在测试剂的情况下观察到的效果进行比较。合适的CD14拮抗剂将能够改善测试动物中神经退行性疾病的至少一些影响。

[0166] 2.3辅助抗神经退行性剂

[0167] 如上所述,根据本发明的化合物可以单独施用或与其他剂(本文中也被称为“辅助抗神经退行性剂”)组合施用,所述其他剂特别地包括本发明的其他化合物或者不是直接CD14拮抗剂并且以其他方式被公开为适用于治疗神经退行性疾病或其症状的发展或进展的化合物。对于MND,包括肌萎缩性侧索硬化(ALS)(也被称为卢伽雷病)、原发性侧索硬化、进行性肌萎缩、假性延髓麻痹、进行性延髓麻痹和下运动神经元疾病,本文预期的辅助抗神经退行性剂的非限制性实例包括利鲁唑(Miller RG等人The Cochrane Database of Systematic Reviews.3:CD001447中公开);阻断CD40和CD40配体之间相互作用的剂,包括

特异性地结合CD40和/或CD40配体的抗体(例如,AT-1502),以及抗炎剂,例如补体途径的阻断剂,诸如C5a受体激动剂(例如,PMX205或依库珠单抗(Lee J.D.等人,(2017) British Journal of Pharmacology,174(8))。可以在针对MND的组合物中使用的其他剂的非限制性实例包括NurOwn干细胞疗法(BrainStorm Cell Therapeutics)、GM604、Radicava(Radicut)、马赛替尼、美金刚或Tirasemtiv。对于痴呆诸如LBD、FTD或AD,本文预期的示例性辅助抗神经退行性剂是胆碱酯酶抑制剂(例如,多奈哌齐(donepezil)(安理申)、卡巴拉汀(rivastigmine)(艾斯能)和加兰他敏(Galantamine)(加兰他敏(Reminyl)和加兰他敏(Razadyne))。预期针对AD的示例性辅助抗神经退行性剂包括但不限于选自例如安理申、加兰他敏、盐酸美金刚、艾斯能和Namzaric的经批准的治疗剂。选择用于在CD14拮抗剂抗体的组合物中使用的适当的辅助抗神经退行性剂将是本领域技术人员所熟知的。

[0168] 辅助抗神经退行性剂可以与CD14拮抗剂抗体组合使用,为了它们对神经退行性疾病(例如MND和痴呆)的附加活性或治疗谱,并且在某些情况下,为了它们与本发明的化合物组合时的协同效应。

[0169] 当需要组合物时,CD14拮抗剂抗体与辅助剂单独地、同时地或顺序地施用。在一些实施方案中,这可以通过全身施用包含两种类型的剂的单一组合物或药物制剂来实现,或者通过同时施用两种单独的组合物或制剂来实现,其中一种组合物包含CD14拮抗剂抗体并且另一种组合物包含辅助剂。在其他实施方案中,使用CD14拮抗剂抗体的治疗可以在用辅助剂的治疗之前或之后间隔从数分钟至数天的范围内。

[0170] 在CD14拮抗剂抗体与辅助剂单独应用的实施方案中,人们通常将确保在每次递送的时间之间不会有相当长的时间段期满(expire),使得CD14拮抗剂抗体将仍然能够与辅助剂一起发挥抑制CD14介导的作用方面的有利的组合作用,包括抑制或降低外周细胞(例如,免疫细胞诸如但不限于巨噬细胞、单核细胞,树突状细胞或T细胞)产生促炎介质,并且特别是维持或增强受试者逆转或抑制疾病或其症状的发展的能力。

[0171] 在一些情况下,两种形式可以在彼此约1-12小时内,更合适地,在彼此约2-6小时内施用。在一些情况下,可以期望显著延长治疗的时间段,然而,其中在各个施用之间经过若干小时(2小时、3小时、4小时、5小时、6小时或7小时)至若干天(1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天)。在特定实施方案中,辅助剂在CD14拮抗剂抗体的施用之前施用。

[0172] 在辅助剂与CD14拮抗剂抗体单独施用的实施方案中,取决于神经退行性剂及其治疗的疾病或症状,将理解,辅助剂可以通过不同于对CD14拮抗剂抗体的施用方法的方法来施用,例如辅助剂可以全身施用或直接施用于CNS。

[0173] 可以想象,将期望CD14拮抗剂抗体或辅助剂的多于一次的施用。如以下示例的,可以使用各种组合,其中CD14拮抗剂抗体是“A”,并且辅助剂是“B”:

[0174] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B。

[0175] 当两种或更多种治疗剂“结合”或“并行地”施用于受试者时,它们可以以单一组合物同时施用,或者以单独的组合物同时施用,或者以单独的组合物在单独的时间施用。

[0176] 本发明的方法还可以补充其他医学干预或组合其他医学干预来实施,诸如经由片剂、口服溶液、贴剂或静脉内注射或其他肠胃外施用方式。例如,在导致减弱的肺功能的神

经退行性疾病诸如ALS中,干预可以是机械的,诸如非侵入性通气装置,或者可以使用药物来缓解呼吸困难。本发明的方法还可以组合非医学治疗来实施,包括但不限于物理治疗、言语治疗、心理治疗、职业治疗。

[0177] 2.4组合物

[0178] 如本文描述的,CD14拮抗剂抗体的使用,无论是单独使用还是与辅助抗神经退行性剂组合使用,都可以通过结合表达mCD14的细胞或经由结合sCD14来抑制或降低由外周细胞产生促炎介质,包括促炎细胞因子,并且减少该产生的后遗症,并且更特别地,以治疗神经退行性疾病及其症状的发展或进展。

[0179] CD14拮抗剂抗体和任选的辅助抗神经退行性剂可以以它们自身施用或与药学上可接受的载体一起施用。

[0180] 为了在本文描述的方法中使用,CD14拮抗剂抗体可以使用一种或更多种药学上可接受的载体、稳定剂或赋形剂(媒介物)以常规方式配制,以形成本领域,特别是关于蛋白质活性剂已知的药物组合物。载体在与组合物的其他成分是相容并且对其接受者(例如患者)无害的意义上是“可接受的”。合适的载体通常包括生理盐水或乙醇、多元醇诸如甘油或丙二醇。

[0181] 抗体可以被配制为中性形式或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与游离氨基基团形成),以及无机酸诸如盐酸或磷酸或者与有机酸诸如乙酸、草酸、酒石酸和马来酸形成的盐。与游离羧基基团形成的盐也可以衍生自无机碱诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸和普鲁卡因。

[0182] 组合物可以被合适地配制用于全身施用,包括静脉内、肌内、皮下或腹膜内施用,并且方便地包含抗体的无菌水性溶液,其优选地与接受者的血液等渗。这样的制剂通常通过以下来制备:将固体活性成分溶于包含生理学上相容的物质诸如氯化钠、甘氨酸以及类似物质并且具有与生理学条件相容的缓冲pH的水中,以产生水性溶液,并且使所述溶液无菌。这些制剂可以在单位或多剂量容器,例如,密封的安瓿瓶或小瓶中制备。

[0183] 组合物可以掺入稳定剂,诸如例如聚乙二醇、蛋白、糖类(例如海藻糖)、氨基酸、无机酸及其混合物。稳定剂以适当的浓度和pH的水性溶液使用。水性溶液的pH被调节至5.0-9.0的范围内,优选在6-8的范围内。在配制抗体时,可以使用抗吸附剂。其他合适的赋形剂通常可以包括抗氧化剂诸如抗坏血酸。组合物可以被配制为控制释放制剂,这可以通过使用聚合物来复合或吸附蛋白来实现。用于控制释放制剂的适当的聚合物包括例如聚酯、聚氨基酸、聚乙烯基吡咯烷酮、乙烯乙酸乙烯酯和甲基纤维素。用于控制释放的另一种可能的方法是将抗体掺入聚合物材料诸如聚酯、聚氨基酸、水凝胶、聚(乳酸)或乙烯乙酸乙烯酯共聚物的颗粒中。可选择地,作为将这些剂掺入聚合物颗粒中的替代,可以将这些材料包埋在微囊中,所述微囊例如分别通过凝聚技术或通过界面聚合来制备,例如羟甲基纤维素或明胶微囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微囊,或者包埋在胶体药物递送系统中,例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊或粗乳液(macroemulsion)中。

[0184] CD14拮抗剂抗体和任选的辅助抗神经退行性剂也可以以气雾剂的形式直接施用于气道。为了作为气雾剂使用,溶液或悬浮液中的本发明的抑制剂可以与合适的推进剂连同常规佐剂一起包装在加压气雾剂容器中,合适的推进剂例如烃类推进剂如丙烷、丁烷或

异丁烷。本发明的材料也可以以非加压形式施用,诸如在喷雾器(nebulizer)或雾化器(atomizer)中。

[0185] 本领域技术人员将认识到,制剂根据其预期用途,即施用途而常规地设计。

[0186] 3. 治疗方法

[0187] 本发明提供了治疗患有神经退行性疾病或具有发展神经退行性疾病风险(或易患神经退行性疾病)的受试者的治疗方法。这些方法在其范围内包括治疗人类和动物(例如,兽医应用)的神经退行性疾病以及与这样的疾病相关的症状的发展或进展。这样的疾病包括例如选自ALS、PLS、PMA、进行性延髓麻痹(PBP)和假性延髓麻痹的MND。这样的疾病还包括例如选自阿尔茨海默病、路易体痴呆(DLB和PDD)、额颞叶痴呆(FTD)和血管性痴呆的痴呆。

[0188] 本发明预期了通过向受试者全身施用本发明的CD14拮抗剂抗体和任选的辅助抗神经退行性剂来治疗受试者的神经退行性疾病或其症状的发展或进展的方法。CD14拮抗剂抗体和任选的辅助抗神经退行性剂(在本文中也被称为“治疗剂”)可以以“有效量”施用,以在受试者中实现预期目的,诸如减轻与疾病相关的症状。施用于患者的治疗剂的剂量应足以在受试者中随时间获得有益的响应,诸如降低至少一种与神经退行性疾病相关的症状。

[0189] 在实施方案中,疾病是MND,并且存在选自以下中的至少一种症状的降低:进行性肌萎缩、麻痹、痉挛、反射亢进、呼吸功能,以及其他症状诸如吞咽困难、四肢无力、构音障碍、说话含糊不清、步态受损、面部无力和肌痉挛。在实施方案中,疾病是痴呆,并且存在选自以下中的至少一种症状的降低:记忆丧失、抑郁、沟通障碍、判断力差、定向障碍、混乱、行为改变、运动症状、幻觉、精神抑制敏感性和说话困难、吞咽困难和行走困难。

[0190] 待被施用的治疗剂的量或剂量频率可以取决于待治疗的受试者,包括其年龄、性别、体重以及一般健康状况。就这一点而言,用于施用的治疗剂的精确量将取决于从业者的判断。本领域技术人员将能够通过常规实验来确定包含在本发明的药物组合物中以达到期望的治疗结果的CD14拮抗剂抗体以及任选地本文描述的辅助抗神经退行性剂的有效无毒量。

[0191] 在一些实施方案中,治疗剂的“有效量”是其中活性成分以有效达到预期目的的量被包含的量。更具体地,治疗有效量意指有效抑制或降低一种或更多种促炎介质的产生,以治疗神经退行性疾病(例如,ALS或AD)的症状,从而延长被治疗的受试者的存活的活性成分(CD14拮抗剂)的量。治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力内,特别是根据本文提供的详细公开内容。

[0192] 患有神经退行性疾病或具有神经退行性疾病风险的受试者包括具有一种或更多种疾病严重程度的生物标志物或指示发展神经退行性疾病的敏感性的生物标志物的患者。在实施方案中,疾病是MND,并且生物标志物选自例如以下中的一种或更多种:SOD1、TDP-43、FUS、C9ORF72、ALS2、ALS4、ALS8、NEK1、UBQLN2、VCP、SETX、ANG、PFN1、MATR3、CHCHD10、TUBA4A、TBK1、C21orf2和OPTN或其表达产物。在该实施方案中,神经退行性疾病的标志物的存在通过检测生物样品中标志物基因的表达产物的存在或过表达和/或标志物基因中突变的存在(例如,SOD1、TDP-43、FUS、C9ORF72、ALS2、ALS4、ALS8、NEK1、UBQLN2、VCP、SETX、ANG、PFN1、MATR3、CHCHD10、TUBA4A、TBK1、C21orf2和OPTN mRNA或多肽)来合适地确定。在MND的一些实施方案中,还可以确定TDP-43阳性内含物的细胞质沉积和/或神经丝的升高的血清和/或CSF水平的存在。

[0193] 在另一个实施方案中,疾病是痴呆,包括阿尔茨海默病、FTD、LBD (DLB和PDD) 和血管性痴呆,并且标志物选自以下中的一种或更多种:编码淀粉样前体蛋白 (APP) 和衰老蛋白 1和2的基因中的突变;载脂蛋白E (APOE) 基因的 $\epsilon 4$ 、 $\epsilon 2$ 和 $\epsilon 3$ 等位基因 (APOE- $\epsilon 4$ 、APOE- $\epsilon 2$ 、APOE- $\epsilon 3$) 中的突变;骨髓细胞2上表达的触发受体 (TREM2) 基因中的突变;MAPT基因;GRN基因,也被称为PGRN基因;TARDBP基因;VCP基因和CHMP2B基因。还可以确定 α -突触核蛋白、S100A9和S100B、嗜铬粒蛋白、循环DNA、热休克蛋白和淀粉样蛋白的升高的血清和/或CSF水平。

[0194] 在其他实施方案中,具有神经退行性疾病风险的受试者还可以通过确定外周血单核细胞 (PBMC) 中存在与疾病相关的一种或更多种促炎细胞因子的升高的水平来鉴定,所述促炎细胞因子例如TNF、IL-1- α 、IL-6、IFN- β 、IL-1 β 、IL-8、IL-18、C-反应性蛋白 (CRP)、IL-17、趋化因子、CD14+高单核细胞和炎性介质mRNA转录物。在实施方案中,疾病是MND,并且细胞因子选自IL-6或IL-17中的一种或更多种。在实施方案中,疾病是痴呆,并且细胞因子选自IL-1、IL-6和TNF- α 。

[0195] 将理解,神经退行性疾病的任何已知生物标志物可以用于鉴定患有疾病或具有患病风险的受试者。

[0196] 预防剂的施用可以在神经退行性疾病的特征性症状出现之前进行,使得疾病被抑制或可选择地延迟其进展。

[0197] 为了可以容易地理解并实践本发明,现在将通过以下非限制性实施例的方式来描述特定的优选实施方案。

实施例

[0198] 实施例1

[0199] 通过全身施用单克隆抗体IC14治疗和预防患有MND的患者实验设计

[0200] 将招募10名家族性或散发性MND患者 (根据Awaji-Shima共识建议定义为临床上可能的 (possible)、有可能的 (probable) 或确定的), 所述患者在知情同意的3年内表现出MND的第一个症状并且年龄在18岁和75岁之间。

[0201] 剂量方案

[0202] 患者将被分配以非盲方式接受IC14的两种剂量方案中的一种:所有剂量都将在2小时的时间段内作为输注液IV递送:

[0203] • 对于最初的3名患者:IC14在研究第1天以2mg/kg的剂量,然后在研究第3-5天每天一次地以1mg/kg递送,共4次剂量。

[0204] • 对于随后的7名患者:IC14在研究第1天以4mg/kg的剂量,然后在研究第2-4天每天一次地以2mg/kg递送,共4次剂量。

[0205] 研究参与将持续直到最后一剂研究药物之后28天。

[0206] 剂型:

[0207] 含有IC14的无菌玻璃小瓶,5mg/mL IC14于30mL小瓶中 (125mg在25mL中递送)。研究药物将在250mL注射用无菌生理盐水中制备,以便经两小时静脉内输注。

[0208] 研究终点:

[0209] 研究的主要终点是IC14的安全性、耐受性和缺乏免疫原性。IC14的安全性和耐受

性将通过检查由治疗引起的毒性和不良事件确定。安全性参数将包括来自病史和体检、生命体征、不良事件和实验室发现 (Chem-20、CBC、血小板计数、凝聚研究) 的临床征象和症状的评估。免疫原性研究将测量针对IC14的抗体。

[0210] 次要终点是:

[0211] • 施用初始剂量后峰值血清IC14浓度, 治疗过程后峰值血清和脑脊液 (CSF) 浓度以及施用初始剂量后和治疗过程后血清IC14浓度对时间曲线下面积 (AUC)。

[0212] • 采用修订的肌萎缩性侧索硬化功能评定量表 (ALSFRS-R) 量化的疾病严重程度的治疗相关变化, 采用坐姿用力肺活量 (seated forced vital capacity) (FVC) 以及其他RFT参数, 以及采用鼻吸气压 (SNP) 测试量化的呼吸功能的治疗相关变化。

[0213] • 采用ALS特定生活质量-修订版 (ALSSQOL-R) 评分量化的生活质量的治疗相关变化, 以及采用爱丁堡认知和行为评估 (ECAS) 评分量化的认知功能的治疗相关变化。

[0214] • 疾病生物标志物谱的治疗相关变化, 包括CRP、IL-6、IL-17、IL-1 β 和神经丝重链和轻链。

[0215] 样品收集和患者评估:

[0216] 样品将从患者收集, 详见表2:

[0217] 表2

[0218] 样品收集

[0219]

程序	患者 1-3	患者 4-10
腰椎穿刺, 用于生物标志物分析、药代动力学	基线, 第 5、8 天	基线, 第 4、8 天
血清, 用于药代动力学	基线, 第 1、2、5、6、8 天	基线, 第 1、2、4、5、8 天
血清, 用于 sCD14/sCD14-ST, 全血, 用于 CD14 受体饱和	基线, 第 1、5 天	基线, 第 1、4 天
血清, 用于生物标志物分析	基线, 第 5、33 天	基线, 第 4、32 天
血清, 用于抗 IC14 抗体滴度	基线, 第 33 天	基线, 第 32 天
血液, 用于血液学、化学和凝集分析	筛选, 基线, 第 2、5、15、22、33 天	筛选, 基线, 第 2、4、15、22、32 天
ALSFRS-R 评估, 完成 ALSSQOL-R 问卷和 ECAS 问卷	基线, 第 33 天	基线, 第 32 天
RFT, 包括坐姿 FVC 和鼻吸气压测试	筛选, 第 5 天和第 33 天	筛选, 第 4 天和第 32 天
裂隙灯检查	筛选, 第 33 天	筛选, 第 32 天

[0220] 数据分析

[0221] 将测量MND生物标志物, 包括反式应答元件 (TAR) -DNA结合蛋白 (TDP) -43和神经丝的血浆浓度。可以评估血清和CSF神经丝。

[0222] 将评估一个或更多的其他潜在生物标志物包括外周血单核细胞 (PBMC) 中的 CRP、SOD1、IL-1 β 、IL-6、IL-17、趋化因子、CD14⁺ 高单核细胞和炎性介质 mRNA 转录物。将在体外评估血清和 CSF 抑制炎性基因活化的能力。

[0223] 药效动力学评估将通过在基线时以及研究药物的剂量 1 和剂量 4 之后立即测量单核细胞上 CD14 的饱和度和循环 sCD14 的水平进行。血清中 IC14 的药代动力学测量将在基线时；剂量 1 之后立即以及剂量 1 之后 6 小时和 22 小时；剂量 4 之前、剂量 4 之后立即以及剂量 4 之后 24 小时；以及洗出 (washout) 时进行。CSF 中 IC14 的药代动力学测量将在基线时、IC14 的第四剂量之后和洗出期间进行。

[0224] 研究参与将持续直到最后一剂研究药物之后 28 天。研究参与将持续总计 32-33 天，加上多达 4 周用于筛选评估。

[0225] 研究日被定义为从首次研究药物施用的开始时间 (研究第 1 天) 开始的连续日历日。从首次研究药物施用的开始时间 (研究第 1 天) 开始，研究药物将以约 24 小时的间隔施用 (或对于给药的前三名患者的第一剂量和第二剂量之间，48 小时的间隔)。

[0226] 将收集 MND 患者的血液和 CSF 中 IC14 的药代动力学和药效动力学信息，包括：

[0227] • 初始剂量施用后基线、峰值和洗出血清 IC14 浓度，以及治疗过程后基线、峰值和洗出血清和脑脊液 (CSF) 浓度。

[0228] • 初始剂量施用后和治疗过程后血清 IC14 浓度相对时间曲线下面积 (AUC)。

[0229] • 循环单核细胞 CD14 受体结合和 sCD14 \pm sCD14-ST (presepsin) 水平将在基线时、以及剂量 1 和剂量 4 之后计算。

[0230] 外周血和 CSF 中疾病生物标志物谱的治疗相关变化的信息，包括免疫细胞、炎性细胞因子和趋化因子的水平以及其他生物标志物包括神经丝 (NF) 重链和轻链水平的变化。

[0231] 化合物

[0232] 研究药物 IC14 将由 Implicit Bioscience Ltd. (Queensland, Australia) 供应。IC14 是针对人类 CD14 的重组嵌合 (鼠/人类) 单克隆抗体。鼠亲本是命名为 28C5 的抗体。IC14 是从中国仓鼠卵巢细胞分泌的 L2H2 γ 4 免疫球蛋白。

[0233] 结果

[0234] 对于接受了 IC14 的全剂量 (即在研究第 1 天的 4mg/kg 的剂量，然后在研究第 2-4 天的每天一次的 2mg/kg，共 4 次剂量) 的单个患者获得了结果。如上文描述的，在基线时和在研究第 4 天和第 8 天进行腰椎穿刺，并且收集 CSF。IL-17 和 IL-1 β 的水平通过多重分析测量，并且神经丝轻链 (NFL) 的水平通过 ELISA 测量。如图 1 中示出的，用 IC14 治疗导致第 8 天 CSF 中炎性标志物 IL-17 和 IL-1 β 的水平降低，并且也导致作为疾病标志物的 NFL 的降低。IL-17 和 IL-1 β 在 ALS/MND 患者和 ALS/MND 疾病模型中都与疾病相关 (Rentzos 等人 (2010) *Acta Neurol. Scand.* 122, 425-9; Fiala 等人 (2010) *Neuroinflammation* 7, 76; Meissner 等人 (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 13046-13050; van der Meer 和 Simon. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12741-2; 以及 Zhao 等人 (2015) *Exp. Neurol.* 273, 24-35)，而 NFL 已被描述为神经变性的标志物。当 IC14 全身递送至患有 MND 的受试者时，IC14 调节 CSF 中这些分子水平的能力表明，静脉内 IC14 治疗在抑制驱动 ALS/MND 的神经炎性过程中具有治疗效用。

[0235] 实施例 2

[0236] IC14抑制TDP-43驱动的原代人类小胶质细胞的激活。

[0237] 大脑和脊髓中的免疫应答主要由小胶质细胞介导,小胶质细胞充当第一道防线,并且在引发和维持驱动神经退行性疾病(包括ALS)的神经炎性响应中发挥关键作用(Salter和Stevens (2017) Nat.Med.23,1018-1027)。

[0238] SOD1和TDP-43是与ALS有关的细胞内蛋白。使用小鼠小胶质细胞的体外系统已经证明,这两种蛋白都能够充当损伤相关分子模式(DAMP)、活化小胶质细胞、诱导促炎细胞因子和促进神经毒性。这些响应利用TLR和NLRP3信号传导,通过针对TLR2、TLR4或CD14的阻断抗体来抑制DAMP驱动活化(Zhao等人(2010) Glia 58,231-243;以及Zhao等人(2015) Exp.Neurol.273,24-35),指出了CD14的阻断在抑制神经炎症中的作用。

[0239] 用于原代人类小胶质细胞生长的组织培养系统被用于确定DAMP TDP-43是否活化人类小胶质细胞,以便鉴定该活化过程的炎性读出(inflammatory readout),并且评估IC14抑制该活化的能力。

[0240] 材料和方法

[0241] 试剂

[0242] IC14由Implicit Bioscience Ltd (IC14-3, Lot 1-FIN-0779) 提供,并且该GMP抗体的活性和稳定性通过稳定性测试证实。作为IC14的对照,同种型对照人类IgG4抗体得自Australian Biosearch (Ultra-LEAF™纯化的人类IgG4同种型,目录#403402)。

[0243] 在大肠杆菌(E.coli)中以野生型和突变体(Q331K)形式产生的重组TDP-43由麦考瑞大学(Macquarie University)的副教授Julie Atkins提供。

[0244] 小胶质细胞培养

[0245] 原代人类小胶质细胞培养物使用修改的Guillemin等人描述的方案(J.Neurosci.Res.(1997) 49,576-591)建立。简言之,在获得知情同意之后,从治疗终止后收集的14至19周龄流产胎儿中收集胎儿人类脑组织(由麦考瑞大学人类研究伦理委员会批准;HREC 5201600719)。通过外科解剖将1克的这种材料等分至24孔组织培养板(Corning)的24个孔中,并且在具有10%热灭活胎牛血清(FCS)的DMEM中在37℃在5%CO₂中培养持续5天。通过2分钟的胰蛋白酶化步骤来除去非小胶质细胞,随后用DMEM加FCS中和,留下粘附至板的小胶质细胞。在治疗之前将小胶质细胞培养持续另外48小时。

[0246] 小胶质细胞刺激

[0247] 一周龄的原代小胶质细胞培养物用IC14或对照IgG4 mAb抗体按照以下浓度预处理持续2小时:未经治疗;1μg/ml、100ng/ml或10ng/ml的最终浓度的IC14;1μg/ml、100ng/ml或10ng/ml的最终浓度的对照IgG4。

[0248] 然后添加野生型或突变体TDP-43直到500ng/ml的最终浓度。对照孔不接受TDP-43。

[0249] 将培养物在具有10%热灭活FCS的DMEM中在37℃在5%CO₂中孵育持续48小时。收集上清液用于多重细胞因子分析,并且使用65重(65-plex)细胞因子和趋化因子阵列(人类细胞因子/趋化因子65重板,Eve Technologies,Calgary,Alberta)以一式三份地分析,并且用于犬尿氨酸途径代谢物的谱分析(profiling)。

[0250] 结果细胞因子/趋化因子诱导

[0251] 在不存在任何外部刺激的情况下,原代人类小胶质细胞产生一系列细胞因子和趋

化因子,包括已经在患有ALS的患者的循环或CSF中鉴定的许多细胞因子和趋化因子(图2)。这些分子中的大部分以低水平表达,但当用野生型或突变体TDP-43(Q331K)刺激时显示出显著的上调,所述TDP-43已经显示出在患有家族性和散发性MND的患者中突变,并且已经被描述为具有促炎性质的蛋白(Zhao等人(2015) *Exp. Neurol.* 273, 24-35)。检测到野生型或突变体TDP-43活化小胶质细胞的能力的微小差异,这与赵等人的观察结果一致。产生的细胞因子和趋化因子包括促炎细胞因子 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL}1\alpha$ 和 IL-12p40 ,以及趋化因子CXCL10和CCL5,它们在促进炎性细胞募集到炎症部位中发挥作用(图2A和图2B)。因此,TDP-43可以通过活化小胶质细胞、局部产生炎性介质以及随后将炎性细胞募集到神经元损伤部位来启动和维持ALS中的运动神经元损伤。

[0252] 用同种型对照抗体预处理小胶质细胞培养物对于这种TDP-43驱动细胞因子产生没有影响。IC14的包含导致野生型和突变体TDP-43驱动细胞因子和趋化因子产生的剂量依赖性抑制,包括 $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\alpha$ 、 IL12p40 和CXCL10的抑制(图2A和图2B)。对于这些分析物中的许多分析物,TDP-43刺激之后的表达水平升高超过了标准曲线的范围(例如, $\text{TNF}\alpha$ 、CXCL10),这妨碍了表达水平的精确表征。然而,在这些极端条件下检测到了细胞因子或趋化因子产生的抑制,表明IC14在利用更多生理学DAMP驱动的刺激条件的体外测定中可以是有效的。

[0253] 本文引用的每篇专利、专利申请和公布的公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0254] 本文中任何参考文献的引用不应被解释为承认这样的参考文献作为本申请的“现有技术”可用。

[0255] 在整个说明书中,目的是描述本发明的优选的实施方案,而不将本发明限制于任何一个实施方案或特定的特征集合。因此,本领域技术人员将理解,根据本公开内容,可以在所示例的特定实施方案中进行各种修改和改变,而不偏离本发明的范围。所有这样的修改和改变被意图包括于所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 因普利西特生物科学私人有限公司

<120> 用于治疗疾病的剂及其用途

<130> 35283585/VPA/TKU

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化VL结构域

<400> 1

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

<210> 2

<211> 105

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化VH结构域

<400> 2

Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly
1				5					10					15	
Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu
				20					25				30		

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

<210> 3

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化VL结构域

<400> 3

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

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化VH结构域

<400> 4

Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser

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

<210> 5

<211> 101

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化VL结构域

<400> 5

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

<210> 6

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化VH结构域

<400> 6

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

<210> 7

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化CDR1

<400> 7

```
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Phe Gly Asn Ser Phe Met His
1           5           10           15
```

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化L-CDR2

<400> 8

```
Arg Ala Ala Asn Leu Glu Ser
1           5
```

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化L-CDR3

<400> 9

Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Trp Thr

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化H-CDR1

<400> 10

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化H-CDR2

<400> 11

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Lys Gly

1 5 10 15

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化H-CDR3

<400> 12

Gly Tyr Tyr Asp Tyr His Tyr

1 5

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化L-CDR1

<400> 13

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Val Asn Ser Phe Leu His

1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化L-CDR2

<400> 14

Arg Ala Ser Asn Leu Gln Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化L-CDR3

<400> 15

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Thr Thr

1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化H-CDR1

<400> 16

Ser Asp Ser Ala Trp Asn

1 5

<210> 17

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化H-CDR2

<400> 17

Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人源化H-CDR3
<400> 18
Gly Leu Arg Phe Ala Tyr
1 5
<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人源化L-CDR1
<400> 19
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人源化L-CDR2
<400> 20
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial sequence)
<220>
<223> 人源化L-CDR3
<400> 21
Gln Arg Gly Asp Thr Leu Pro Trp Thr
1 5
<210> 22
<211> 5
<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化H-CDR1

<400> 22

Asn Tyr Asp Ile Ser

1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化H-CDR2

<400> 23

Val Ile Trp Thr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser

1 5 10 15

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化H-CDR3

<400> 24

Gly Asp Gly Asn Phe Tyr Leu Tyr Asn Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化VL结构域

<400> 25

Met Glu Thr Asp Thr Ile Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Val Asp Ser Tyr Val Asn Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
 145 150 155 160
 Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175
 Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205
 Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220
 Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 26

<211> 460

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial sequence)

<220>

<223> 人源化VH结构域

<400> 26

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

Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln
				85				90				95			
Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr
				100				105				110			
Tyr	Cys	Val	Arg	Gly	Leu	Arg	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
				115				120				125			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
				130				135				140			
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
145				150				155				160			
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
				165				170				175			
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
				180				185				190			
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
				195				200				205			
Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn
210				215				220							
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro
225				230				235				240			
Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
				245				250				255			
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
				260				265				270			
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe
				275				280				285			
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
290				295				300							
Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
305				310				315				320			
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
				325				330				335			
Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
				340				345				350			
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln
355				360				365							
Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
370				375				380							
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro

385					390					395					400
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
					405					410					415
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu
					420					425					430
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
					435					440					445
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys				
					450					455					460

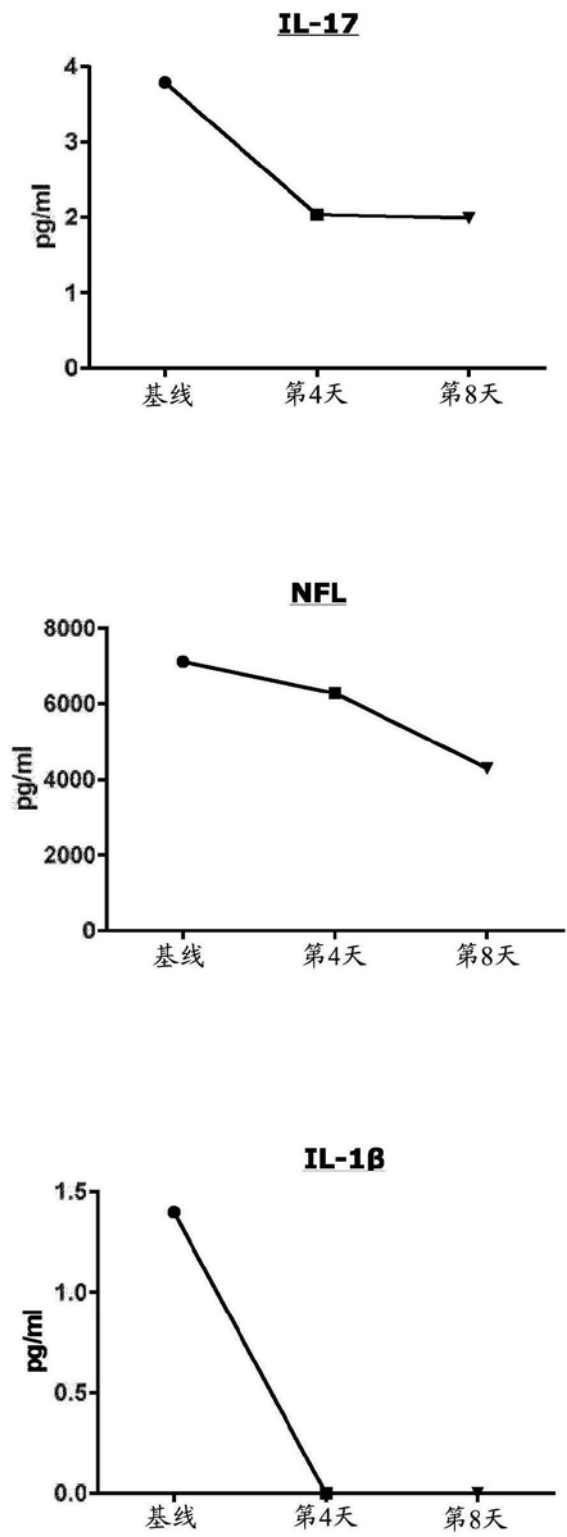


图1

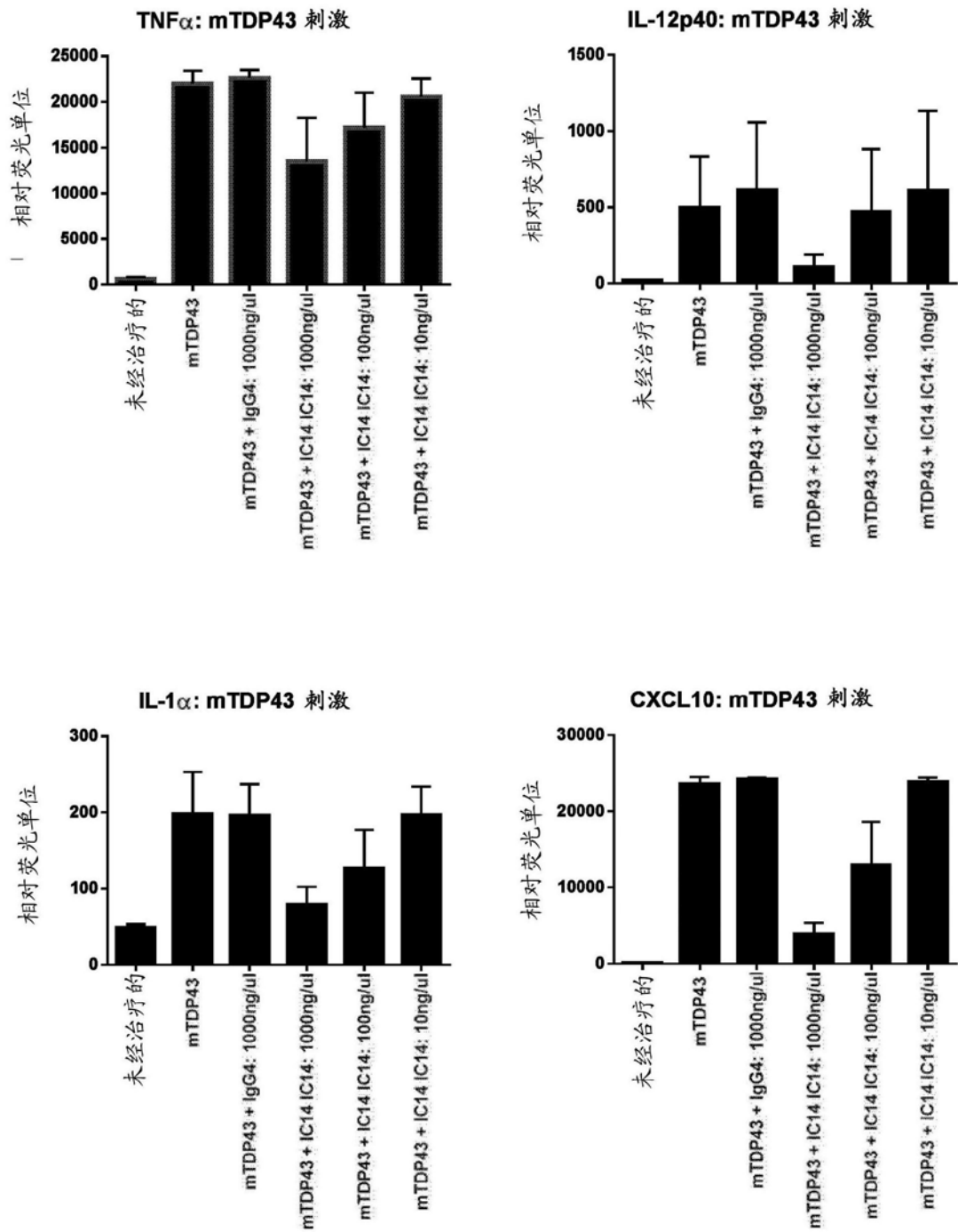
A.

图2

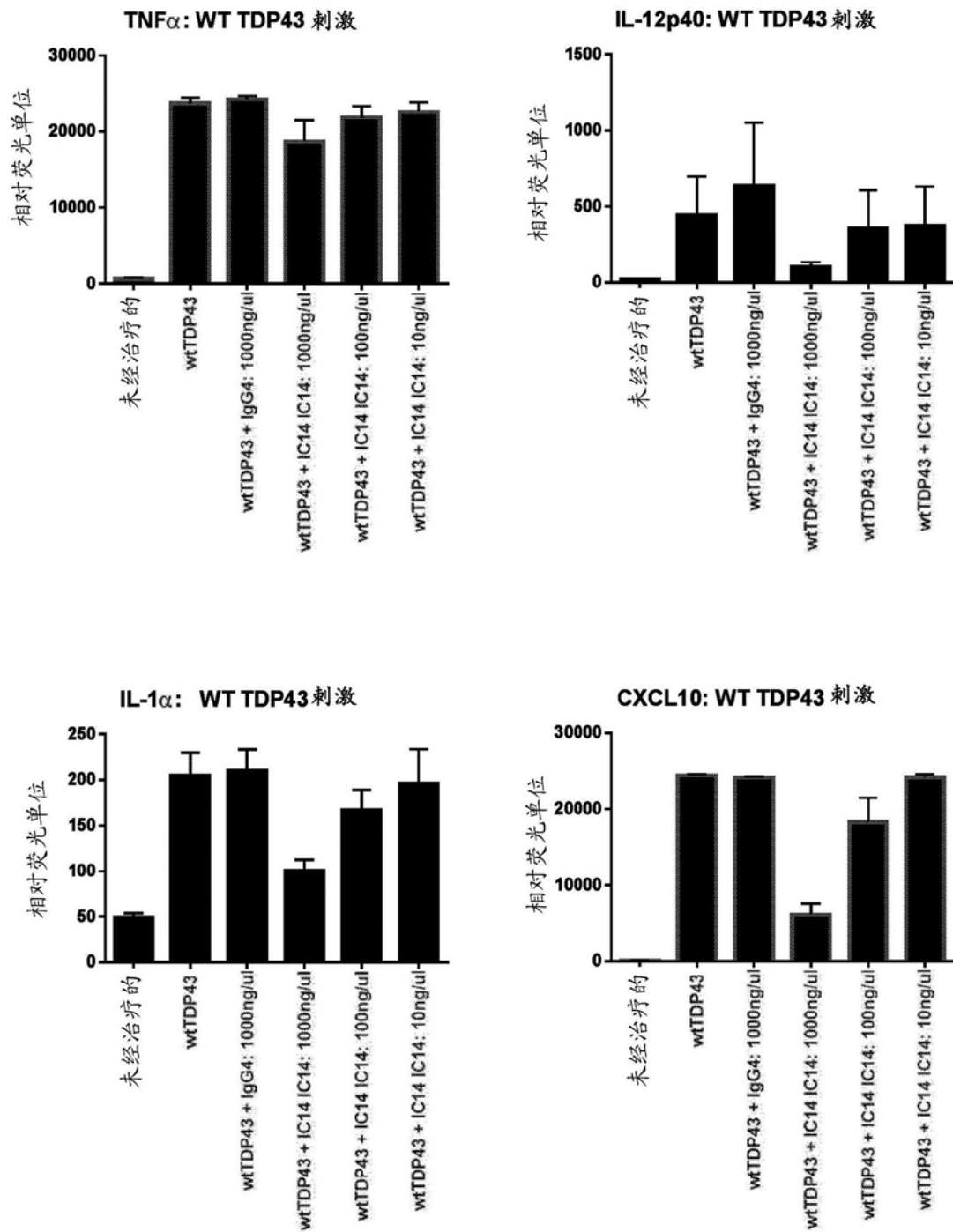
B.

图2(续)