(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119452253 A
(43)申请公布日 2025.02.14

(21)申请号 202380050210.9
(22)申请日 2023.05.24
(30)优先权数据
63/365,458 2022.05.27 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/067438 2023.05.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/230538 EN 2023.11.30
(71)申请人 埃利登制药公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 史蒂文·N·佩兰
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞
(51)Int.Cl.
G01N 33/48(2006.01)
A61K 41/00(2020.01)

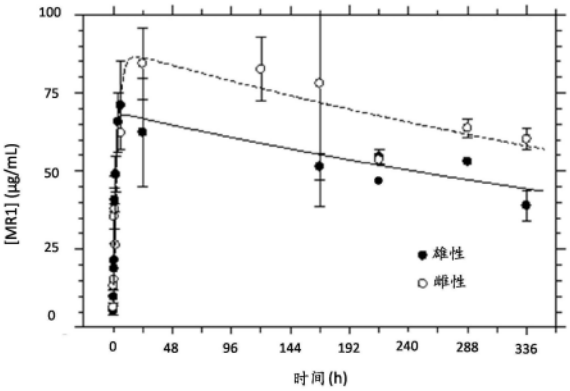
权利要求书4页 说明书45页
序列表（电子公布） 附图68页

(54)发明名称

用于治疗肌萎缩侧索硬化的方法

(57)摘要

本文提供了用于治疗神经系统变性疾病诸如肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病和脊髓小脑性共济失调的方法和试剂盒。还提供了通过测量样品中的生物标记物水平来预测或测量对治疗的反应的方法，以及调节生物标记物水平的方法。



CN 119452253 A

1.一种预测患有疾病或障碍的受试者对用针对CD40L或CD40的化合物治疗的反应的方法,所述方法包括:

收集来自所述受试者的样品;

测量所述样品中存在的至少一种生物标记物的浓度,其中所述至少一种生物标记物是NFL、MMP9、MMP3、IL6、IL18、IgA、TNFR2、TNFa、IL2ra、因子VIII、CRP、SAP、MCP1、En-Raged、MIG、vWF、IgE、IL8、IP10、C3和MMP2;

其中所述至少一种生物标记物的浓度预测所述受试者可能对用针对CD40L或CD40的化合物对所述疾病或障碍的治疗有反应。

2.如权利要求1所述的方法,其中所述疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。

3.如权利要求2所述的方法,其中所述神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。

4.如权利要求3所述的方法,其中所述神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。

5.如权利要求1所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物和/或人。

6.如权利要求1所述的方法,其中所述化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。

7.如权利要求1所述的方法,其中所述化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。

8.如权利要求1所述的方法,其中所述化合物是替格鲁特。

9.如权利要求1所述的方法,其中所述化合物是MR1或5c8。

10.一种治疗患有疾病或障碍的受试者的方法,所述方法包括:

施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,其中施用所述治疗有效剂量将所述受试者的血浆中的所述化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。

12.如权利要求11所述的方法,其中所述神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。

13.如权利要求12所述的方法,其中所述神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。

14.如权利要求10所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物和/或人。

15.如权利要求10所述的方法,其中所述化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。

16.如权利要求10所述的方法,其中所述化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。

17.如权利要求10所述的方法,其中所述化合物是替格鲁特。

18.如权利要求10所述的方法,其中所述化合物是MR1或5c8。

19.如权利要求10所述的方法,其中将所述化合物每两周至少施用一次。

20.如权利要求10所述的方法,其中将所述化合物施用至少12周的时间段。

21.如权利要求10所述的方法,其中将所述化合物以在200mg/kg与100mg/kg之间的剂

量、优选以在1mg/kg与8mg/kg之间的剂量、最优选以在2mg/kg与4mg/kg之间的剂量施用。

22.如权利要求10所述的方法,所述方法进一步包括施用第二药学上有效的化合物。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述第二化合物阻断CD28与CD86之间或CD28与CD80之间的相互作用。

24.如权利要求22所述的方法,其中所述第二化合物靶向选自由以下组成的组的生物标记物中的至少一种:白介素、细胞因子和促炎标记物。

25.如权利要求24所述的方法,其中所述第二化合物靶向选自由以下组成的组的生物标记物中的至少一种:NFL、CXCL13、CD40L、CXCL9、TNF-α、En-Raged、TNFR2、IgM、IgA、Il2r、CXCL10、CD40、B2M、VCAM、Il-18、Il-16、SAP、MIP1β、MDC、C3、CRP、纤维蛋白原、IgE、ICAM、因子VIII、Ena-78、Pal1、Rantes、TIMP1、vWF、Il-6、MCP1、MMP3、MMP9和MMP2。

26.如权利要求22所述的方法,其中所述第二化合物是CTLA4-Ig融合蛋白、阿巴西普、贝拉西普或加利昔单抗。

27.如权利要求10所述的方法,其中将所述化合物口服、肠胃外或局部施用。

28.如权利要求27所述的方法,其中将所述化合物肠胃外施用。

29.如权利要求28所述的方法,其中将所述化合物通过注射,最优选静脉内、肌内或皮下注射施用。

30.如权利要求1所述的方法,其中所述疾病或障碍是选自由以下组成的组的炎性或免疫性疾病或障碍:结肠炎、药物诱导的狼疮肾炎、移植物抗宿主病、免疫移植物应答、移植排斥和动脉粥样硬化。

31.如权利要求1所述的方法,其中所述疾病或障碍是选自由以下组成的组的自身免疫性疾病:系统性红斑狼疮、1型糖尿病、重症肌无力、炎性肠病、免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎、银屑病、艾迪生病、克罗恩病、葡萄膜炎、多发性硬化、溶血性贫血和格雷夫斯病。

32.如权利要求1所述的方法,其中靶向CD40L或CD40的所述化合物是这样的抗体,所述抗体包含:

(a)重链可变区(V_H),所述重链可变区包含:

i)包含SEQ ID NO:9所示的序列的CDRH1结构域;

ii)包含SEQ ID NO:10、11、12、13或14所示的序列的CDRH2结构域;和

iii)包含SEQ ID NO:15所示的序列的CDRH3结构域;以及

(b)轻链可变区(V_L),所述轻链可变区包含:

i)包含SEQ ID NO:16或17所示的序列的CDRL1结构域;

ii)包含SEQ ID NO:18或19所示的序列的CDRL2结构域;和

iii)包含SEQ ID NO:20所示的序列的CDRL3结构域。

33.如权利要求1-32中任一项所述的方法,其中靶向CD40L或CD40的所述化合物是这样的抗体,所述抗体包含:

(a)重链可变区(V_H),所述重链可变区具有如SEQ ID NO:1、2、3或4所示的氨基酸序列;以及

(b)轻链可变区(V_L),所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:5、6、7或8所示的氨基酸序列。

34.一种调节受试者中至少一种生物标记物的浓度的方法,所述方法包括:

向所述受试者施用治疗有效量的针对CD40L或CD40的化合物,其中所述至少一种生物标记物是NFL、CXCL13、CD40L、CXCL9、TNF-α、En-Raged、TNFR2、IgM、IgA、Il2r、CXCL10、CD40、B2M、VCAM、Il-18、Il-16、SAP、MIP1β、MDC、C3、CRP、纤维蛋白原、IgE、ICAM、因子VIII、Ena-78、Pal1、Rantes、TIMP1、vWF、Il-6、MCP1、MMP3、MMP9、MCP1、MIG、vWF、Il-8、IP10或MMP2。

35.如权利要求34所述的方法,其中所述至少一种生物标记物的浓度在施用所述化合物后增加。

36.如权利要求34所述的方法,其中所述至少一种生物标记物的浓度在施用所述化合物后降低。

37.如权利要求34所述的方法,其中在施用所述化合物后,所述至少一种生物标记物的浓度增加,并且至少一种其他生物标记物的浓度降低。

38.如权利要求34所述的方法,其中所述受试者患有疾病或障碍。

39.如权利要求38所述的方法,其中所述疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。

41.如权利要求40所述的方法,其中所述神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。

42.如权利要求34所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物和/或人。

43.如权利要求34所述的方法,其中所述化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。

44.如权利要求34所述的方法,其中所述化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。

45.如权利要求34所述的方法,其中所述化合物是替格鲁特。

46.如权利要求34所述的方法,其中所述化合物是MR1或5c8。

47.如权利要求34所述的方法,其中施用所述治疗有效剂量将所述受试者的血浆中的所述化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

48.如权利要求34所述的方法,其中将所述化合物每两周至少施用一次。

49.如权利要求34所述的方法,其中将所述化合物施用至少12周的时间段。

50.如权利要求34所述的方法,其中将所述化合物以在200mg/kg与100mg/kg之间的剂量、优选以在1mg/kg与8mg/kg之间的剂量、最优选以在2mg/kg与4mg/kg之间的剂量施用。

51.如权利要求34所述的方法,其中将所述化合物口服、肠胃外或局部施用。

52.如权利要求51所述的方法,其中将所述化合物肠胃外施用。

53.如权利要求52所述的方法,其中将所述化合物通过注射,最优选静脉内、肌内或皮下注射施用。

54.如权利要求34所述的方法,其中所述疾病或障碍是选自由以下组成的组的炎性或免疫性疾病或障碍:结肠炎、药物诱导的狼疮肾炎、移植物抗宿主病、免疫移植物应答、移植排斥和动脉粥样硬化。

55.如权利要求34所述的方法,其中所述疾病或障碍是选自由以下组成的组的自身免疫性疾病:系统性红斑狼疮、1型糖尿病、重症肌无力、炎性肠病、免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎、银屑病、艾迪生病、克罗恩病、葡萄膜炎、多发性硬化、溶血性贫血和格雷

夫斯病。

56.如权利要求34所述的方法,其中靶向CD40L或CD40的所述化合物是这样的抗体,所述抗体包含:

(a)重链可变区(V_H),所述重链可变区包含:

i)包含SEQ ID NO:9所示的序列的CDRH1结构域;

ii)包含SEQ ID NO:10、11、12、13或14所示的序列的CDRH2结构域;和

iii)包含SEQ ID NO:15所示的序列的CDRH3结构域;以及

(b)轻链可变区(V_L),所述轻链可变区包含:

i)包含SEQ ID NO:16或17所示的序列的CDRL1结构域;

ii)包含SEQ ID NO:18或19所示的序列的CDRL2结构域;和

iii)包含SEQ ID NO:20所示的序列的CDRL3结构域。

57.如权利要求34所述的方法,其中靶向CD40L或CD40的所述化合物是这样的抗体,所述抗体包含:

(a)重链可变区(V_H),所述重链可变区具有如SEQ ID NO:1、2、3或4所示的氨基酸序列;以及

(b)轻链可变区(V_L),所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:5、6、7或8所示的氨基酸序列。

58.一种维持或改善患有ALS的受试者的ALS-FRS得分的方法,所述方法包括:

施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,其中施用所述治疗有效剂量将所述受试者的血浆中的所述化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

59.一种对患有疾病或障碍的受试者进行预筛选并用针对CD40L或CD40的化合物治疗所述受试者的方法,所述方法包括:

收集来自所述受试者的样品;

检测流体中存在的至少一种生物标记物的浓度,其中所述至少一种生物标记物是NFL、MMP9、MMP3、IL6、IL18、IgA、TNFR2、TNFa、IL2ra、因子VIII、CRP、SAP、MCP1、En-Raged、MIG、vWF、IgE、IL8、IP10、C3或MMP2;

针对未患有所述疾病或障碍的受试者中所述至少一种生物标记物的浓度对所述至少一种生物标记物的浓度进行筛选;以及

施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,使得将所述受试者的血浆中所述化合物的浓度维持在5μg/mL与100μg/mL之间的剂量;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

60.如权利要求59所述的方法,其中如果所述受试者中所述至少一种生物标记物的浓度显著不同于未患有所述疾病或障碍的受试者中所述至少一种生物标记物的浓度,则向所述受试者施用所述化合物。

用于治疗肌萎缩侧索硬化的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2022年5月27日提交的美国临时申请号63/365458的优先权,将该临时申请通过援引以其全文并入。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。序列表作为创建于2023年4月20日的标题为“ELDN.010WO.xml”的文件提供,该文件的大小为27,094个字节。将电子格式的序列表中的信息通过援引以其全文并入本文。

[0005] 背景

[0006] 领域

[0007] 本披露涉及用于治疗神经系统变性疾病(诸如肌萎缩侧索硬化)的方法。还提供了预测和/或测量对治疗的反应的方法,这些方法包括测量一种或多种生物标记物的水平。实施例还涉及调节一种或多种生物标记物的水平的方法。

[0008] 相关技术说明

[0009] 肌萎缩侧索硬化(ALS)(有时称为卢伽雷氏病)是一种进行性的致命的神经系统障碍,其特征在于由脊柱和脑中的运动神经元变性引起的肌纤维萎缩。ALS影响大约30,000名美国公民,其中只有约10%的病例被归类为ALS的家族形式。在代谢酶超氧化物歧化酶1(SOD1)中具有突变的家族性患者亚组中,病理进展可能归因于与该酶的突变型形式相关的未知功能获得(SOD1依赖性)(Rosen,1993)。然而,在大多数ALS病例中,SOD1基因不含突变,SOD1酶的活性是正常的,并且疾病病理的机制是未知的(SOD1非依赖性)。因此,剩余90%的ALS病例被归类为没有良好表征的遗传组分或致病因子的散发病例。

[0010] 由于该疾病的散发发生形式的原因是未知的,研究人员已经转向转基因策略来创建该疾病的实验室模型。SOD1基因的鉴定作用已经导致ALS的转基因啮齿动物模型的产生。携带23个拷贝的人$SOD1^{G93A}$转基因的转基因小鼠品系(“G93A小鼠”)是最广泛使用的ALS鼠模型,并且被接受为用于ALS治疗研究的标准模型(“G93A小鼠”)(参见Tu PH等人(1996)Proc Natl Acad Sci U S A[美国国家科学院院刊]93:3155-3160和Gurney ME(1997)J Neuro Sci[神经科学杂志]152增刊1:S67-S73)。

[0011] 尽管ALS的特征在于脊髓中运动神经元的丧失(导致肌肉萎缩),但是该疾病本身也表现为轴突运输的变化、蛋白质聚集、兴奋性毒性、星形细胞增生、线粒体功能障碍、小胶质细胞激活和突触重塑。小胶质细胞激活、星形细胞增生和来自外周的浸润性炎性细胞的存在已经被充分描述。存在ALS患者的脊髓中IgG免疫反应性沉积物的积累,淋巴细胞、树突细胞、单核细胞和巨噬细胞向ALS的脊髓中的浸润。尽管对浸润性免疫细胞的作用知之甚少,但是最近的工作将表明浸润性T细胞群体是神经保护性的而不是细胞毒性的。尽管ALS具有由小胶质细胞和星形胶质细胞的激活介导的免疫组分,但是它不被认为是自身免疫性障碍。与已经描述了涉及特定免疫调节途径(例如,共刺激途径)的疾病(诸如类风湿性关节炎或系统性红斑狼疮)不同,尚未描述ALS涉及此类途径。

[0012] 目前,医生治疗ALS的选择有限。此时,利鲁唑是FDA已经批准用于治疗ALS的唯一

药物。在临床试验中,利鲁唑在适度增加存活时间方面仅显示出轻微益处。因此,迫切需要用于ALS的有效疗法。

[0013] 概述

[0014] 本文披露了一种预测患有疾病或障碍的受试者对用针对CD40L或CD40的化合物治疗的反应的方法。在一些实施例中,该方法包括收集来自该受试者的样品;测量该样品中存在的至少一种生物标记物的浓度,其中该至少一种生物标记物是NFL、MMP9、MMP3、IL6、IL18、IgA、TNFR2、TNFa、IL2ra、因子VIII、CRP、SAP、MCP1、En-Raged、MIG、vWF、IgE、IL8、IP10、C3和MMP2;其中该至少一种生物标记物的浓度预测该受试者可能对用针对CD40L或CD40的化合物对该疾病或障碍的治疗有反应。在一些实施例中,该疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。在一些实施例中,该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。在一些实施例中,该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。在一些实施例中,该受试者是哺乳动物和/或人。在一些实施例中,该化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。在一些实施例中,该化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。在一些实施例中,该化合物是替格鲁特(tegoprubart)。在一些实施例中,该化合物是MR1或5c8。

[0015] 本文还披露了一种治疗患有疾病或障碍的受试者的方法。在一些实施例中,该方法包括施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,其中施用该治疗有效剂量将该受试者的血浆中的该化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。在一些实施例中,该疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。在一些实施例中,该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。在一些实施例中,该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。在一些实施例中,该受试者是哺乳动物和/或人。在一些实施例中,该化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。在一些实施例中,该化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。在一些实施例中,该化合物是替格鲁特。在一些实施例中,该化合物是MR1或5c8。在一些实施例中,将该化合物每两周至少施用一次。在一些实施例中,将该化合物施用至少12周的时间段。在一些实施例中,将该化合物以在200mg/kg与100mg/kg之间的剂量、优选以在1mg/kg与8mg/kg之间的剂量、最优选以在2mg/kg与4mg/kg之间的剂量施用。在一些实施例中,该方法进一步包括施用第二药学上有效的化合物。在一些实施例中,该第二化合物阻断CD28与CD86之间或CD28与CD80之间的相互作用。在一些实施例中,该第二化合物靶向选自由以下组成的组的生物标记物中的至少一种:白介素、细胞因子和促炎标记物。在一些实施例中,该第二化合物靶向选自由以下组成的组的生物标记物中的至少一种:NFL、CXCL13、CD40L、CXCL9、TNF-α、En-Raged、TNFR2、IgM、IgA、Il2r、CXCL10、CD40、B2M、VCAM、Il-18、Il-16、SAP、MIP1β、MDC、C3、CRP、纤维蛋白原(Fibrogen)、IgE、ICAM、因子VIII、Ena-78、Pal1、Rantes、TIMP1、vWF、Il-6、MCP1、MMP3、MMP9和MMP2。在一些实施例中,该第二化合物是CTLA4-Ig融合蛋白、阿巴西普、贝拉西普或加利昔单抗。在一些实施例中,将该化合物口服、肠胃外或局部施用。在一些实施例中,将该化合物肠胃外施用。在一些实施例中,将该化合物通过注射,最优选静脉内、肌内或皮下注射施用。在一些实施例中,该疾病或障碍是选自由以下组成的组

的炎性或免疫性疾病或障碍:结肠炎、药物诱导的狼疮肾炎、移植物抗宿主病、免疫移植物应答、移植排斥和动脉粥样硬化。在一些实施例中,该疾病或障碍是选自由以下组成的组的自身免疫性疾病:系统性红斑狼疮、1型糖尿病、重症肌无力、炎性肠病、免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎、银屑病、艾迪生病、克罗恩病、葡萄膜炎、多发性硬化、溶血性贫血和格雷夫斯病。在一些实施例中,靶向CD40L或CD40的该化合物是这样的抗体,该抗体包含重链可变区(V_H),该重链可变区包含:(1)包含SEQ ID NO:9所示的序列的CDRH1结构域;(2)包含SEQ ID NO:10、11、12、13或14所示的序列的CDRH2结构域;和(3)包含SEQ ID NO:15所示的序列的CDRH3结构域;并且还包含轻链可变区(V_L),该轻链可变区包含:(4)包含SEQ ID NO:16或17所示的序列的CDRL1结构域;(5)包含SEQ ID NO:18或19所示的序列的CDRL2结构域;和(6)包含SEQ ID NO:20所示的序列的CDRL3结构域。在一些实施例中,靶向CD40L或CD40的该化合物是这样的抗体,该抗体包含重链可变区(V_H),该重链可变区具有如SEQ ID NO:1、2、3或4所示的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L),该轻链可变区具有如SEQ ID NO:5、6、7或8所示的氨基酸序列。

[0016] 本文还披露了一种调节受试者中至少一种生物标记物的浓度的方法。在一些实施例中,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的针对CD40L或CD40的化合物,其中该至少一种生物标记物是NFL、CXCL13、CD40L、CXCL9、TNF-α、En-Raged、TNFR2、IgM、IgA、Il2r、CXCL10、CD40、B2M、VCAM、Il-18、Il-16、SAP、MIP1β、MDC、C3、CRP、纤维蛋白原、IgE、ICAM、因子VIII、Ena-78、Pal1、Rantes、TIMP1、vWF、Il-6、MCP1、MMP3、MMP9、MCP1、MIG、vWF、Il-8、IP10或MMP2。在一些实施例中,该至少一种生物标记物的浓度在施用该化合物后增加。在一些实施例中,该至少一种生物标记物的浓度在施用该化合物后降低。在一些实施例中,在施用该化合物后,该至少一种生物标记物的浓度增加,并且至少一种其他生物标记物的浓度降低。在一些实施例中,该受试者患有疾病或障碍。在一些实施例中,该疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。在一些实施例中,该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。在一些实施例中,该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。在一些实施例中,该受试者是哺乳动物和/或人。在一些实施例中,该化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。在一些实施例中,该化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。在一些实施例中,该化合物是替格鲁特。在一些实施例中,该化合物是MR1或5c8。在一些实施例中,该方法包括施用该治疗有效剂量将该受试者的血浆中的该化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。在一些实施例中,将该化合物每两周至少施用一次。在一些实施例中,将该化合物施用至少12周的时间段。在一些实施例中,将该化合物以在200mg/kg与100mg/kg之间的剂量、优选以在1mg/kg与8mg/kg之间的剂量、最优选以在2mg/kg与4mg/kg之间的剂量施用。在一些实施例中,将该化合物口服、肠胃外或局部施用。在一些实施例中,将该化合物肠胃外施用。在一些实施例中,将该化合物通过注射,最优选静脉内、肌内或皮下注射施用。在一些实施例中,该疾病或障碍是选自由以下组成的组的炎性或免疫性疾病或障碍:结肠炎、药物诱导的狼疮肾炎、移植物抗宿主病、免疫移植物应答、移植排斥和动脉粥样硬化。在一些实施例中,该疾病或障碍是选自由以下组成的组的自身免疫性疾病:系统性红斑狼疮、1型糖尿病、重症肌无力、炎性肠病、免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎、银屑病、艾迪生病、

克罗恩病、葡萄膜炎、多发性硬化、溶血性贫血和格雷夫斯病。在一些实施例中,靶向CD40L或CD40的该化合物是这样的抗体,该抗体包含重链可变区(V_H),该重链可变区包含:(1)包含SEQ ID NO:9所示的序列的CDRH1结构域;(2)包含SEQ ID NO:10、11、12、13或14所示的序列的CDRH2结构域;和(3)包含SEQ ID NO:15所示的序列的CDRH3结构域;并且进一步包含轻链可变区(V_L),该轻链可变区包含:(4)包含SEQ ID NO:16或17所示的序列的CDRL1结构域;(5)包含SEQ ID NO:18或19所示的序列的CDRL2结构域;和(6)包含SEQ ID NO:20所示的序列的CDRL3结构域。在一些实施例中,靶向CD40L或CD40的该化合物是这样的抗体,该抗体包含重链可变区(V_H),该重链可变区具有如SEQ ID NO:1、2、3或4所示的氨基酸序列;以及轻链可变区(V_L),该轻链可变区具有如SEQ ID NO:5、6、7或8所示的氨基酸序列。

[0017] 本文还披露了一种维持或改善患有ALS的受试者的ALS-FRS得分的方法。在一些实施例中,该方法包括施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,其中施用该治疗有效剂量将该受试者的血浆中的该化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

[0018] 本文还披露了一种对患有疾病或障碍的受试者进行预筛选并用针对CD40L或CD40的化合物治疗该受试者的方法。在一些实施例中,该方法包括收集来自该受试者的样品;检测流体中存在的至少一种生物标记物的浓度,其中该至少一种生物标记物是NFL、MMP9、MMP3、IL6、IL18、IgA、TNFR2、TNFa、IL2ra、因子VIII、CRP、SAP、MCP1、En-Raged、MIG、vWF、IgE、IL8、IP10、C3或MMP2;针对未患有该疾病或障碍的受试者中该至少一种生物标记物的浓度对该至少一种生物标记物的浓度进行筛选;以及施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,使得将该受试者的血浆中该化合物的浓度维持在5μg/mL与100μg/mL之间的剂量;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。在一些实施例中,如果该受试者中该至少一种生物标记物的浓度显著不同于未患有该疾病或障碍的受试者中该至少一种生物标记物的浓度,则向该受试者施用该化合物。

附图说明

[0019] 图1A使用线性浓度(Y)轴示出了随时间的MR1浓度。

[0020] 图1B使用log浓度(Y)轴示出了随时间的MR1浓度。

[0021] 图2是对照组和治疗组从第40天开始至达到体重峰值的平均每日体重测量结果的图。

[0022] 图3描绘了对照组和治疗组从体重峰值至死亡的平均每日体重测量结果。

[0023] 图4描绘了基于从研究开始至神经功能得分为2的进展时间的疾病发作时间。

[0024] 图5是表示每组在给定神经功能得分为0至4时的年龄中值(X轴)以及每组在给定得分时稳定的天数(Y轴)的图。

[0025] 图6示出了如通过Cox比例风险模型计算的对照组和治疗组的卡普兰-迈耶存活率图。

[0026] 图7A是对照组和MR1治疗组从第40天开始至达到体重峰值的平均每日体重测量结果的图。

[0027] 图7B是描绘了对照组和MR1治疗组从体重峰值至死亡的平均每日体重测量结果的图。

[0028] 图7C示出了在对照组和MR1治疗组中基于至神经功能得分为2的进展时间的疾病发作时间。

[0029] 图7D示出了对照组和MR1治疗组从体重峰值至死亡的平均每日体重测量结果。

[0030] 图8是示出了JB5抗体(圆形,虚线)、hu5c8抗体(正方形-实线)和对照CTLA4-IgG1(三角形)与人CD40L的相对结合的图。

[0031] 图9提供了hu5c8和JB5 VL区(SEQ ID NO:1)、hu5c8和JB5 VH区(SEQ ID NO:2)、Fc区(SEQ ID NO:3)、JB5 Fc区(SEQ ID NO:4)、JB5-R28K VL区(SEQ ID NO:5)、JB5-K74R VH区(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列和JB5轻链氨基酸序列(SEQ ID NO:7)。

[0032] 图10提供了编码抗CD40L抗体JB5的轻链合成核苷酸序列(SEQ ID NO:8),大写字母表示合成基因的外显子并且小写字母表示合成基因的内含子序列;并且还提供了抗CD40L抗体JB5的重链氨基酸序列(SEQ ID NO:9)。

[0033] 图11提供了编码抗CD40L抗体JB5重链的合成核酸序列(SEQ ID NO:10),大写字母表示合成基因的外显子,并且小写字母表示合成基因的内含子序列。

[0034] 图12提供了抗CD40L抗体JB5-R28K的氨基酸序列(SEQ ID NO:11);编码抗CD40L抗体JB5-R28K轻链的合成核酸序列(SEQ ID NO:12),大写字母表示合成基因的外显子并且小写字母表示合成基因的内含子序列;并且还提供了抗CD40L抗体JB5-K74R的重链氨基酸序列(SEQ ID NO:13)。

[0035] 图13提供了编码抗CD40L抗体JB5-K74R重链的合成核酸序列(SEQ ID NO:14),大写字母表示合成基因的外显子,并且小写字母表示合成基因的内含子序列。

[0036] 图14提供了抗CD40L抗体JB5重链和轻链的CDR的氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:15-20)和hu5C8重链的氨基酸序列(SEQ ID NO:21)。

[0037] 图15A是示出了相比于抗CD40L抗体5c8,16个抗体克隆的排序效力的条形图。排序效力是IC50克隆/5c8的IC50 x 100。

[0038] 图15B是示出了相比于抗CD40L抗体AT-1501,16个抗体克隆的排序效力的条形图。排序效力是IC50克隆/AT-1501的IC50 x 100。

[0039] 图16A-图16G和图16I-图16Q示出了来自每个克隆的抗体的结合曲线与5c8的结合曲线。图16H示出了AT-1501和5c8的结合曲线。

[0040] 图17A-图17G和图17I-图17Q示出了来自每个克隆的抗体的结合曲线与AT-1501的结合曲线。图17H示出了AT-1501和5c8的结合曲线。

[0041] 图18A和图18B是这样的图,其中的每一个示出了八个抗体克隆、5c8、AT-1501和阿巴西普与Fcγ RI的结合。唯一具有显著结合的抗体是5c8抗体。

[0042] 图19A和图19B是这样的图,其中的每一个示出了八个抗体克隆、5c8、AT-1501和阿巴西普与Fcγ RIIa的结合。唯一具有显著结合的抗体是5c8抗体。

[0043] 图20A和图20B是这样的图,其中的每一个示出了八个抗体克隆、5c8、AT-1501和阿巴西普与Fcγ RIIIa的结合。没有抗体显示出与Fcγ RIIIa的显著结合。

[0044] 图20C和图20D是这样的图,其中的每一个示出了八个抗体克隆、5c8、AT-1501和阿巴西普与Fcγ RIIIb的结合。没有抗体显示出与Fcγ RIIIb的显著结合。

[0045] 图21A和图21B是这样的图,每一个示出了八个抗体克隆、5c8、AT-1501和阿巴西普与C1q的结合。唯一与C1q具有显著结合的抗体是5c8抗体。

[0046] 图22示出了作为实例1中概述的临床试验的一部分,向人类受试者施用AT-1501的时间点的示意图。在第-28天至第-4天,对受试者进行血液(生物样品)收集用于“预筛选”基线评估,然后每两周向受试者施用一次给药,持续总共101天。在每个给药日,在药物施用前收集血液用于预筛选,并且在输注后2小时再次收集血液。

[0047] 图23示出了以1mg/kg、2mg/kg、4mg/kg或8mg/kg给药的受试者中AT-1501随时间的浓度。X轴是自初始给药起的天数,并且Y轴是血浆中存在的AT-1501的浓度(以μg/mL计)。

[0048] 图24A-图24I示出了九个ADA阳性样品、血液中AT-1501的浓度和检测到ADA的时间(圆形)。这些图示出了患者103202(图24A)、104202(图24B)、105202(图24C)、105205(图24D)、105206(图24E)、108202(图24F)、108203(图24G)、108204(图24H)和108205(图24I)的血浆中ADA滴度的阳性检出。

[0049] 图25示出了暴露于1、2、4或8mg/kg的AT-1501后受试者的蛋白质变化的热图。

[0050] 图26A-图26B示出了在4、6、8、10和12周暴露于1、2、4或8mg/kg的AT-1501后,人类受试者中生物标记物CXCL13与基线相比的变化百分比。图26B是第12周的数据的近视图。

[0051] 图27A-图27B示出了在4、6、8、10和12周暴露于1、2、4或8mg/kg的AT-1501后,人类受试者中生物标记物CD40L与基线相比的变化百分比。图27B是第12周的数据的近视图。“*”表示在0.05与0.01之间的p值;“**”表示在0.01与0.001之间的p值;“***”表示小于0.001的p值。

[0052] 图28A-图28B示出了在4、6、8、10和12周暴露于1、2、4或8mg/kg的AT-1501后,人类受试者中生物标记物CD40与基线相比的变化百分比。图28B是第12周的数据的近视图。“*”表示在0.05与0.01之间的p值;“**”表示在0.01与0.001之间的p值;“***”表示小于0.001的p值。

[0053] 图29A-图29L示出了在用靶向CD40L/CD40的化合物治疗12周后,人类受试者的血浆中蛋白质浓度的变化百分比。每个图示出了给药1、2、4或8mg/kg的AT-1501的患者中蛋白质的平均变化。相应的图各自示出了所评估的蛋白质中总蛋白质浓度的最高减少,这些图分别针对CD40L(图29A)、CXCL13(图29B)、CXCL9(图29C)、TNF-α(图29D)、En-Raged(图29E)、TNFR2(图29F)、IgM(图29G)、IgA(图29H)、Il2r(图29I)、CXCL10(图29J)、CD40(图29K)和B2M(图29L)。“*”表示在0.05与0.01之间的p值;“**”表示在0.01与0.001之间的p值;“***”表示小于0.001的p值。

[0054] 图30A-图30L示出了在用靶向CD40L/CD40的化合物治疗12周后,人类受试者的血浆中蛋白质浓度的变化百分比。每个图示出了给药1、2、4或8mg/kg的AT-1501的患者中蛋白质的平均变化。相应的图各自示出了分别针对以下的总蛋白质浓度的减少:VCAM(图30A)、IL-18(图30B)、IL-16(图30C)、SAP(图30D)、MIP1-β(图30E)、MDC(图30F)、C3(图30G)、CRP(图30H)、血纤蛋白原(图30I)、IgE(图30J)、ICAM(图30K)和MCP1(图30L)。“*”表示在0.05与0.01之间的p值;“**”表示在0.01与0.001之间的p值;“***”表示小于0.001的p值。

[0055] 图31A-图31E示出了在用靶向CD40L/CD40的化合物治疗12周后,人类受试者的血浆中蛋白质浓度的变化百分比。每个图示出了给药1、2、4或8mg/kg的AT-1501的患者中蛋白质的平均变化。相应的图各自示出了分别针对以下的总蛋白质浓度的增加:IL-6(图31A)、ENA-78(图31B)、RANTES(图31C)、MMP3(图31D)和MMP9(图31E)。“*”表示在0.05与0.01之间的p值;“**”表示在0.01与0.001之间的p值;“***”表示小于0.001的p值。

[0056] 图32示出了在用1、2、4或8mg/kg剂量的AT-1501治疗12周后,人类受试者的血浆中NFL浓度的变化百分比。

[0057] 图33A-图33D示出了人类受试者队列的ALS-FRS得分在11周内的总变化。由临床医生评估ALS-FRS得分。根据接受1mg/kg的AT-1501治疗、2mg/kg的AT-1501治疗、4mg/kg的AT-1501治疗、8mg/kg的AT-1501治疗或无治疗“Proact”的那些人类受试者队列将数据分开。图33A是临床试验中所涉及的所有患者的综合得分。图33B去除了不再符合招募标准的患者的得分。图33C去除了报告治疗相关不良反应的患者的得分。图33D去除了除了对治疗反应最佳的那些患者的所有患者得分。

[0058] 图34示出了人类受试者的ALS-FRS得分在7周内的变化。在此情况下,不合并受试者,并且根据对用AT-1501治疗的反应者(灰色)和无反应者(深灰色)将数据分组。

[0059] 图35示出了在治疗前受试者的蛋白质浓度(以log2计)的巢式点图。根据蛋白质的类型(X轴)以及根据对随后的用AT-1501治疗的无反应者(左,浅灰色)和反应者(右,深灰色)将值分开。每个集群中的水平线表示该集群的平均值。

具体实施方式

[0060] 在以下具体实施方式中参考了形成其一部分的附图。除非上下文另外规定,否则在附图中,类似的符号典型地标识类似的组分。在具体实施方式、附图和权利要求中描述的说明性实施例并非意在是限制性的。在不脱离本文呈现的主题的精神或范围的情况下,可以利用其他实施例,并且可以进行其他改变。将容易理解的是,如本文总体上所述和在附图中所展示,本披露的方面可以以各种各样的不同配置来安排、替换、组合、分离和设计,所有这些在本文中都明确地考虑在内。将本文所引用的所有参考文献都通过援引以其全文明确地并入本文,并且用于本文引用的具体披露内容。

[0061] 本披露描述了通过施用治疗有效量的阻断CD40与CD40L的相互作用的化合物来治疗患有神经系统变性或神经肌肉障碍的患者的方法。本披露还描述了通过共同施用阻断CD40与CD40L的相互作用的化合物与阻断CD28与CD86之间或CD28与CD80之间的相互作用的化合物来治疗患者的方法。一些实施例涉及预测和/或测量对治疗的反应的方法,这些方法包括测量一种或多种生物标记物的水平。实施例还涉及调节一种或多种生物标记物的水平的方法。

[0062] 缩写与定义

[0063] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。除非另外说明,否则将本文引用的所有专利、申请、公开的申请和其他出版物都通过援引以其全文并入本文。除非另外说明,否则在对于本文的术语存在多个定义的情况下,以在该章节中的那些定义为准。

[0064] 本领域普通技术人员将理解,除了具体例示的那些之外的起始材料、生物和化学材料、生物和化学试剂、合成方法、纯化方法、分析方法、测定方法和生物方法可以在不诉诸于过度实验的情况下用于实践实施例。任何此类材料和方法的所有本领域已知的功能等效物都旨在包括在本披露中。

[0065] 如本文所用,“一个/一种(a)”或“一个/一种(an)”可以意指一个或多于一个/一种或多于一种。

[0066] 如本文所用,术语“约”或“大约”具有如本领域技术人员所理解的其通常含义,因此指示某个值包括用于确定某个值的方法的固有误差变化或在多次确定中存在的变化。

[0067] 连词“或”的使用与“其中的至少一个/至少一种”可互换地使用。例如:在组合物包含A或B的情况下,该方法必须包含A和B中的至少一个,但是还可以包含A和B两者。同样地,包含“A、B、C或D”的组合物必须包含A、B、C和D的组中的至少一个,但是还可以包含A、B、C和D的全部或任何组合。

[0068] 按照惯例表示氨基酸取代,其中标识出原始氨基酸、指定序列中氨基酸的位置和替代氨基酸,例如C11S将指示多肽序列的位置11处的半胱氨酸被丝氨酸替代。

[0069] 人源化抗体是从非人物种产生的抗体,其蛋白质序列已经被修饰以增加它们与人中天然产生的抗体变体的相似性。“人源化”过程通常应用于开发用于向人施用的单克隆抗体(例如,开发为抗癌药物的抗体)。

[0070] 目前,通常通过将来自在非人动物中产生的抗体的相关CDR插入人抗体“支架”中来使非人抗体人源化。人源化抗体的“直接”产生可以通过将适当的CDR编码区段(负责所需结合特性)插入人抗体“支架”中来完成。这可以通过使用适当载体的重组DNA方法和在哺乳动物细胞中表达来实现。也就是说,在抗体被开发为在小鼠(或其他非人)中具有所需特性后,可以分离编码该抗体的DNA,将其克隆到载体中并且进行测序。然后可以确定对应于抗体CDR的DNA序列。一旦已知所需CDR的精确序列,就可以设计用于将这些序列适当地插入含有人抗体变体的DNA的构建体中的策略。CDR也可以在插入支架中之前改变,例如以增加特异性。

[0071] 术语“人”抗体是指这样的抗体,其具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列和/或已经使用任何用于制备人抗体的技术制备。人抗体的此定义特别地排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0072] 如本文所用的术语“变体”被定义为野生型序列的经修饰的或经改变的形式,例如其中一个或多个氨基酸可以被基本上不显著影响功能的其他一个或多个氨基酸或一个或多个非氨基酸替代。在一些实施例中,变体可以含有至少一个氨基酸残基的经改变的侧链。

[0073] 如本文所用的术语“抗原”被定义为可以刺激抗体产生并且与它们特异性结合的实体和/或引发免疫系统应答的实体。例如,细胞表面蛋白或其特定的线性或非线性部分。本文的该术语可以缩写为“Ag”。

[0074] “抗原结合抗体片段”是指并非完整抗体的分子,其包含结合完整抗体所结合的抗原的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab’、Fd片段、dAb片段、Fab’-SH、F(ab’)2;双抗体;三抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如,scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体、由模拟抗体高变区的氨基酸残基组成的最小识别单位(例如,分离的互补决定区(CDR),诸如CDR3肽)。如本申请中披露的抗原结合片段与抗原CD40L结合。

[0075] 抗体的抗原结合片段将典型地包含至少一个可变结构域。可变结构域可以具有任何大小或是任何氨基酸组成,并且将通常包含至少一个CDR,其与一个或多个框架序列相邻或与其同框。在具有与VL结构域缔和的VH结构域的抗原结合片段中,VH和VL结构域可以相对于彼此处于任何合适的排列。例如,可变区可以是二聚体的,并且含有VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。可替代地,抗体的抗原结合片段可以含有单体VH或VL结构域。

[0076] 分离的抗体包括双特异性抗体,其中抗体的每个臂或抗原结合片段与不同的靶标

或表位结合。

[0077] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换地使用以指代具有与天然抗体结构基本上类似的结构或具有含有Fc区的重链的抗体。

[0078] “5c8”是指结合CD40L并由杂交瘤产生并且描述于美国专利号5,474,771中的小鼠抗人抗体,该杂交瘤可从ATCC获得,登录号为HB10916。“hu5c8”是指5c8的人源化形式,其序列披露于Karpusas等人,Structure[结构]第9卷,第321-329页,(2001)中。

[0079] 术语“特异性结合”等意指抗体或其抗原结合片段与抗原形成在生理条件下相对稳定的复合物。特异性结合的特征可以在于平衡解离常数(KD)为约3000nM或更小(即,更小的KD表示更紧密的结合);约2000nM或更小;约1000nM或更小;约500nM或更小;约300nM或更小;约200nM或更小;约100nM或更小;约50nM或更小;约1nM或更小;或约0.5nM。

[0080] 对特定抗原或表位的特异性结合可以例如由抗体对抗原或表位具有以下KD来展现:至少约1x 10^{-4}M、至少约1x 10^{-5}M、至少约1x 10^{-6}M、至少约1x 10^{-7}M、至少约1x 10^{-8}M、至少约1x 10^{-9}M、可替代地至少约1x 10^{-10}M、至少约1x 10^{-11}M、至少约1x 10^{-12}M或更大,其中KD是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。典型地,相对于抗原或表位,特异性结合抗原的抗体对对照分子将具有大20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、5,000倍、10,000倍或更多倍的KD。此外,对特定抗原或表位的特异性结合可以例如由抗体对抗原或表位具有以下Ka来展现:相对于对照,对表位大至少20倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、5,000倍、10,000倍或更多倍,其中Ka是指特定抗体-抗原相互作用的缔合速率。

[0081] 术语“中和抗体”包括能够抑制和/或中和CD40L的生物活性的抗体,例如抑制或防止或减弱CD40L与CD40的结合并且因此抑制或减少由CD40L触发的信号传导途径和/或抑制或减少CD40L与CD40的结合的抗CD40L抗体或其抗原片段。

[0082] 术语“拮抗性抗体”或“拮抗剂抗体”在本文中等效地使用,并且包括能够抑制和/或中和CD40L的生物信号传导活性的抗体,如同上针对中和抗体所述。

[0083] 本文已经采用的术语和表达被用作说明性而非限制性的术语,并且并非旨在使用此类术语和表达而将所示出和描述的特征的任何等效物或其一部分排除在外,但是将认识到的是各种修改在要求保护的实施例的范围内都是可能的。因此,应当理解的是,尽管本披露的方面已经由可以包括优选实施例、示例性实施例和任选特征的各种实施例具体披露,但是本领域技术人员可以诉诸于本文披露的概念的修改和变化。此类修改和变化被认为在如所述和如可以由所附权利要求定义的本披露的实施例的范围内。

[0084] 在本说明书中提及多肽或氨基酸序列之间的同一性百分比。两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数量的函数,考虑了空位数量和每个空位的长度,需要引入它们以用于两个序列的最佳比对。同一性可以作为“局部同一性”或“整体同一性”测量。局部同一性是指多肽之间的序列相关性的程度,如通过此类序列串之间的匹配所确定。整体同一性是指与参考多肽的全长相比,多肽的序列相关性的程度。除非另外说明,否则如本文所用,同一性意指整体同一性。出于本披露的目的,使用Needleman和Wunsch((1970)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]48:444-453)算法使用Blossum 62评分矩阵(空位罚分为12,空位延伸罚分为4,并且移码空位罚分为5)来计算整体同一性的百分比。有许多公开可用的并入了Needleman和Wunsch算法的软件程序,例如GCG软件包中的GAP程序。

[0085] CD40L也被称为CD154、gp39、T-BAM、5c8抗原或TNF相关激活蛋白(TRAP)。

[0086] 贯穿本说明书,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)”将被理解为意指包括一个所述步骤或要素或多个步骤或要素的组,但是不排除任何其他一个步骤或要素或多个步骤或要素的组。“由……组成”意指包括并且限于短语“由……组成”之后的任何内容。因此,短语“由……组成”指示所列出的要素是要求的或强制性的,并且可以不存在其他要素。“基本上由……组成”意指包括短语后所列出的任何要素,并且限于不干扰或有助于所列出的要素的在本披露中指定的活性或作用的其他要素。因此,短语“基本上由……组成”指示所列出的要素是要求的或强制性的,但是其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在,这取决于它们是否实质上影响所列出的要素的活性或作用。

[0087] 如本文所用的术语“功能”和“功能性”具有如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义,并且是指生物功能、酶功能或治疗功能。

[0088] 如本文所用的术语任何给定物质、化合物或材料的“产率”具有如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义,并且是指相对于预期总量,物质、化合物或材料的实际总量。例如,物质、化合物或材料的产率为、为约、为至少、为至少约、不大于或不大于约预期总量的80%、81%、82%、83%、84%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%,包括其间的所有小数。产率可能受反应或过程的效率,不想要的副反应,降解,输入物质、化合物或材料的量,或在生产的任何步骤期间所需物质、化合物或材料的损失的影响。

[0089] 如本文所用,术语“分离的”具有如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义,并且是指这样的物质和/或实体,其已经(1)与最初产生(无论在自然界中和/或在实验环境中)时和与其相关的至少一些组分分开,和/或(2)由人工产生、制备和/或制造。分离的物质和/或实体可以与等于、约、至少、至少约、不大于或不大于约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约98%、约99%、基本上100%或100%(或包括和/或跨越上述值的范围)的与它们最初相关的其他组分分开。在一些实施例中,分离的药剂为、为约、为至少、为至少约、不大于或不大于约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%、基本上100%或100%(或包括和/或跨越上述值的范围)纯的。如本文所用,“分离的”物质可以是“纯的”(例如,基本上不含其他组分)。如本文所用,术语“分离的细胞”可以指代不包含在多细胞生物体或组织中的细胞。

[0090] 术语“分离的蛋白质”或“分离的多肽”(例如,分离的抗体或分离的抗原结合片段)是这样的蛋白质或多肽,该蛋白质或多肽就其来源或衍生来源而言不与在其天然状态下伴随它的天然相关组分相关;基本上不含来自相同物种的其他蛋白质;由来自不同物种的细胞表达;或不在自然界中存在。因此,化学合成的或在与其天然来源的细胞不同的细胞系统中合成的多肽将与其天然相关组分是“分离的”。可以使用本领域熟知的蛋白质纯化技术通过分离使蛋白质基本上不含天然相关组分。

[0091] 如本文所用,“体内”以如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义给出,并且是指方法在活生物体(通常是动物、哺乳动物(包括人)和植物)或构成这些活生物体(与组织提取物或死生物体相反)的活细胞内进行。

[0092] 如本文所用,“离体”以如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义给出,并且

是指方法在活生物体外进行而几乎不改变自然条件。

[0093] 如本文所用,“体外”以如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义给出,并且是指方法在生物条件外(例如,在培养皿或试管中)进行。

[0094] 如本文所用,“核酸”、“核酸分子”或“核苷酸”是指多核苷酸或寡核苷酸,诸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、由聚合酶链式反应(PCR)产生的片段以及通过连接、断裂、核酸内切酶作用、核酸外切酶作用中的任一种产生和通过合成产生而产生的片段。核酸分子可以由作为天然存在的核苷酸(诸如DNA和RNA)或天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的对映异构体形式)或两者的组合的单体构成。经修饰的核苷酸可以在糖部分和/或嘧啶或嘌呤碱基部分中具有改变。糖修饰包括例如用卤素、烷基、胺和叠氮基替代一个或多个羟基,或者糖可以被官能化为醚或酯。此外,整个糖部分可以被空间上和电子上类似的结构(诸如氮杂糖和碳环糖类似物)替代。碱基部分中的修饰的实例包括烷基化嘌呤和嘧啶、酰化嘌呤或嘧啶或其他熟知的杂环取代物。核酸单体可以通过磷酸二酯键或此类连接的类似物连接。磷酸二酯连接的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenoate)、二硒代磷酸酯(phosphorodiselenoate)、苯胺硫代磷酸酯(phosphoroanilothioate)、苯胺磷酸酯(phosphoranilidate)、氨基磷酸酯等。术语“核酸分子”还包括所谓的“肽核酸”,其包含与聚酰胺骨架附接的天然存在的或经修饰的核酸碱基。核酸可以是单链的或双链的。

[0095] 如本文所用的术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”具有如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义,并且是指由通过肽键连接的氨基酸构成的大分子。肽、多肽和蛋白质的许多功能是本领域已知的,并且包括但不限于酶、结构、转运、防御、激素或信号传导。肽、多肽和蛋白质通常但不总是通过核糖体复合物使用核酸模板生物产生,尽管化学合成也是可用的。通过操纵核酸模板,可以进行肽、多肽和蛋白质突变(诸如多于一种肽、多肽或蛋白质的取代、缺失、截短、添加、重复或融合)。多于一种肽、多肽或蛋白质的这些融合物可以相邻地连接在同一分子中,或者与其间的额外氨基酸(例如,接头、重复序列、表位或标签)或为、为约、为至少、为至少约、不多于或不多于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、200或300个碱基长或由上述长度的任两个定义的范围内的任何长度的任何其他序列连接。如本文所用的关于多肽的术语“下游”具有如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义,并且是指在先前序列的C末端后的序列。如本文所用的关于多肽的术语“上游”具有如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义,并且是指在后续序列的N末端前的序列。

[0096] 如本文所用的术语“基因”具有如根据本说明书所理解的其简单且普通的含义,并且通常是指编码蛋白质或功能性RNA的核酸的一部分;然而,该术语可以任选地涵盖调节序列。本领域普通技术人员将理解,术语“基因”可以包括基因调节序列(例如,启动子、增强子等)和/或内含子序列。将进一步理解,基因的定义包括提及不编码蛋白质而是编码功能性RNA分子(诸如tRNA和miRNA)的核酸。在一些情况下,基因包括涉及转录或信息产生或组成的调节序列。在其他实施例中,基因包含编码蛋白质、多肽或肽的转录序列。与本文所述的术语一致,“分离的基因”可以包含基本上与其他此类序列(诸如其他天然存在的基因、调节序列、多肽或肽编码序列等)分离的一种或多种转录核酸、调节序列、编码序列等。在此方面,术语“基因”用于简单地指代包含经转录的核苷酸序列及其互补序列的核酸。如本领域

技术人员将理解的,此功能性术语“基因”包括基因组序列、RNA或cDNA序列,或更小的经工程化的核酸区段,包括基因的非转录部分的核酸区段,包括但不限于基因的非转录启动子或增强子区。更小的经工程化的基因核酸区段可以表达或可以适于使用核酸操作技术来表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白、突变体和/或类似物。

[0097] 如本文所用的术语“个体”、“受试者”、“宿主”或“患者”具有如本领域技术人员所理解的通常含义,因此包括人或非人哺乳动物。术语“哺乳动物”以其通常的生物学意义使用。因此,它具体包括但不限于灵长类动物(包括猿猴(黑猩猩、猿、猴)、人)、牛、马、绵羊、山羊、猪、兔、狗、猫、啮齿类动物、大鼠、小鼠或豚鼠。

[0098] 本文披露的尺寸和值不应被理解为严格限于所列举的确切数值。相反,除非另外规定,否则每个这样的尺寸都旨在意指所列举的值和围绕该值的功能等效范围两者。例如,披露为“20mm”的尺寸旨在意指“约20mm”。

[0099] 在本文中使用以下缩写:肌萎缩侧索硬化(ALS);超氧化物歧化酶-1(SOD1);T细胞受体(TCR);主要组织相容性复合体(MHC);抗原呈递细胞(APC);磷酸盐缓冲盐水(PBS);互补决定区(CDR)。“IP”意指腹膜内,并且“IV”意指静脉内。

[0100] MR1是与小鼠CD40配体结合的仓鼠单克隆抗体。如本文所用的“野生型”意指非转基因小鼠。如本文所用,“小分子”意指分子量小于2000道尔顿的化合物。如本文所用的“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”包括预防性治疗和治疗性治疗。短语“治疗有效量”意指化合物或其药学上可接受的盐足以抑制或允许改善特定受试者或受试者群体的用单独施用或与另一种药剂或治疗联合施用所治疗的障碍或病症的量。

[0101] 药剂(例如,药物配制品)的“有效量”是指在必要的剂量和持续必要的时间段的情况下有效实现所需治疗或预防结果的量。

[0102] “亲和力”是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外说明,否则如本文所用,“结合亲和力”是指内在结合亲和力,其反映了结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以由抗体与其抗原之间的平衡解离常数(KD)(k_{off}/k_{on}的比率)来表示。KD和亲和力是反向相关的。KD值与抗体的浓度(特定实验所需的抗体量)相关,因此KD值越低(浓度越低),则抗体的亲和力越高。亲和力可以通过本领域已知的常规方法(包括本文所述的那些方法)测量。用于测量结合亲和力的特定的、说明性的和示例性的实施例可以通过放射免疫测定(RIA);BIAcore®仪器(通用电气医疗集团欧洲有限公司(GE Healthcare Europe GmbH),瑞士苏黎士州)上的表面等离子体共振(SPR),通过将抗体捕获在蛋白A偶联的CM5研究级传感器芯片(通用电气医疗集团欧洲有限公司,瑞士苏黎士州;BR-1000-14)上使用人CD40配体多肽作为分析物进行测量。其他方法可以包括放射免疫测定和动力学排阻测定。动力学排阻测定是通用型免疫测定平台,其能够测量抗原/抗体相互作用的平衡解离常数以及缔合速率常数和解离速率常数。

[0103] “ALS-TDI”是ALS疗法开发研究所(ALS Therapy Development Institute)的缩写。如本文所用的“hSOD1G93A临床前小鼠模型”、“hSOD1G93A小鼠模型”、“G93A临床前小鼠模型”和“G93A小鼠模型”具有相同的含义。如本文所用的“hSOD1G93A小鼠”和“G93A小鼠”具有相同的含义。

[0104] TMB是3,3′,5,5′-四甲基联苯胺的缩写。

[0105] 如本文所用的“CDR结构域”意指具有或不具有侧翼序列的抗体互补决定区。

[0106] “效应子功能”是指可归因于抗体Fc区的那些生物活性,其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬;细胞表面受体(例如,B细胞受体)的下调;和B细胞激活。一种效应子功能是抗体的Fc或恒定区结合包括但不限于以下的蛋白质的能力:Fc受体(FcR)(例如,高亲和力IgG Fc区受体Ia(FCγRIa)(CD64)(SEQ ID NO:34)、低亲和力免疫球蛋白γFc区受体IIa(FCγRIIa)(CD32)(SEQ ID NO:35)、低亲和力免疫球蛋白γFc区受体IIIa(FCγRIIIA)(CD16a)(SEQ ID NO:36)、低亲和力免疫球蛋白γFc区受体IIIb(FCγRIIIb)(CD16b)(SEQ ID NO:37))。在一些实施例中,在抗体及其抗原结合片段具有Fc结构域的情况下,Fc结构域已经被工程化以减少或消除一种或多种Fc效应子功能。在优选实施例中,Fc结构域已经被工程化以减少或消除血小板激活和/或血小板聚集以及伴随的血栓栓塞风险。

[0107] 化合物的体内评价

[0108] 可以使用G93A小鼠模型来评价在本披露的方法中使用的化合物的功效[参见Tu PH等人Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]1996;93:3155-60和Gurney ME.等人J Neurol Sci[神经科学杂志]1997;152(增刊1):S67-73]。此模型是通过将23个拷贝的人SOD1基因(其在位置93处含有甘氨酸到丙氨酸的突变)插入小鼠基因组中构建的。这些小鼠准确地重现了人类散发性和家族性形式的疾病的病理学的大多数主要点,使得此模型成为目前用于测试疾病改变干预的最佳可用选择。

[0109] 在出生时G93A小鼠中不存在可辨别的异常表型表达。可见的疾病迹象直到约90日龄时才表达,于是它经历后肢功能的进行性丧失,在约134日龄时导致完全瘫痪和死亡。虽然肌肉消瘦是由运动神经元的死亡或功能障碍引起的,但是这些细胞的死亡与周围细胞(包括小胶质细胞和星形胶质细胞)相关并且部分地由与周围细胞的相互作用引起。显著的星形细胞增生首先在约80日龄时出现,而主要由小胶质细胞介导的神经炎症在约100日龄时出现,并且扩大直到死亡。

[0110] 虽然人类疾病可能在任何运动区开始,但是小鼠疾病首先可靠地影响颈区和腰区。在G93A小鼠中,运动神经元数量在可见症状发作时(大约在第85天)已经显著下降,并且在死亡时达到超过50%的丧失。在疾病的病程期间在神经元中观察到细胞骨架、神经丝、轴突运输、高尔基体、内质网、线粒体、凋亡机制、蛋白酶体和胞质蛋白处理的异常。

[0111] 虽然人类疾病可能在任何运动区开始,但是小鼠疾病首先可靠地影响腰区和骶区。在G93A小鼠中,运动神经元数量在可见症状发作时(大约在第85天)已经显著下降,并且在死亡时达到超过50%的丧失。在疾病的病程期间在神经元中观察到细胞骨架、神经丝、轴突运输、高尔基体、内质网、线粒体、凋亡机制、蛋白酶体和胞质蛋白处理的异常。

[0112] 迄今为止,已经有至少50篇出版物描述了延长此小鼠的寿命的治疗剂。然而,除了利鲁唑之外,没有治疗剂显示出相应的临床功效。ALS疗法开发研究所已经描述了在G93A小鼠模型中进行的经优化的治疗药物筛选,从而控制噪声变量[Scott S.等人Amyotrophic Lateral Sclerosis[肌萎缩侧索硬化]2008;9:4-15,将其通过援引特此并入]。Scott等人描述了G93A小鼠模型的最小研究设计,其解决并管理由固有的混淆生物变量引起的噪声。在验证此研究设计时,最大程度地在不同剂量下评价先前已经被报道在临床前模型中有效

且随后在人类临床试验中失败的九种化合物。这些分子中有几种是抑制肿瘤坏死因子(TNF)信号传导和小胶质细胞激活的抗炎分子,包括Celebrex®、米诺环素、沙利度胺和肌酸。据报道Celebrex®在G93A模型中将寿命提高19%(24天),然而强有力(high-powered)研究未能检测到存活期的任何变化(1.8天,0.52%)(Scott等人)。米诺环素(先前报道,提高15.8%;强有力研究,-0.60%)、肌酸(先前报道,17.8%;强有力研究,0.67%)和沙利度胺(先前报道,存活期提高16%;强有力研究,-1.9%)获得类似的结果。

[0113] 候选化合物的鉴定

[0114] 在疾病进展期间的不同时间点对野生型小鼠和G93A小鼠进行全基因组表达谱分析。对被鉴定为在两组之间差异表达的基因进行分析,并且使用所得数据来聚焦待筛选药物的选择。差异表达的基因包括涉及免疫应答和细胞粘附的基因,包括CD86、CD44、ICAM、ITGAM、ITGA ITGAX、ITGB2、H2-K1(MHC II)、H2-AB1(MHC II)、H2-D1(MHCII)和H2-Eb1(MHC II)。这些数据显示,炎性特征在疾病进展期间增加,并且与共刺激途径的涉及一致。共刺激途径涉及细胞类型之间经由CD28/CD80或CD28/CD86或CD40/CD40L相互作用(其中的一些在基因表达分析中被鉴定出)的相互作用。

[0115] 为了鉴定适于治疗剂开发的分子途径,在G93A小鼠模型中在疾病进展期间表征基因表达模式的变化。使用Affymetrix GeneChip®小鼠表达组430vII MOE430vII基因芯片研究全基因组转录谱分析。采用将G93A骨骼肌和脊髓与非转基因同窝仔畜进行比较的纵向研究设计。在G93A小鼠模型中,症状发作首先作为大约在第75天开始的尾部麻痹被观察到,其中后肢、然后是前肢、最后是隔膜出现进行性麻痹。G93A动物群的平均存活期为134天。纵向研究设计在第30天、第50天、第60天、第80天、第90天、第100天、第110天和120天(第0天是出生日期)从G93A动物和野生型同窝仔畜收集小腿肌肉(腓肠肌)和脊髓。对于每个时间点,从5只野生型和5只G93A动物收集组织,并且独立处理总共160个组织。

[0116] 根据IACUC方案,在上述适当的时间点对动物实施安乐死。立即收获组织,并且将其在液氮中快速冷冻。将冷冻组织在-80℃下储存。如制造商所述,使用Qiagen RNaEasy试剂盒从组织中同时分离总RNA。使用Ambion Message AMPII T7体外转录试剂盒使用掺入生物素化核苷酸的标准T7线性扩增来扩增分离的总RNA。将经标记的探针片段化,并且根据制造商的方案与Affymetrix GeneChip® 小鼠表达组430vII杂交。在Affymetrix GeneChip®Fluids Station 450中洗涤基因芯片以去除未杂交的探针。在Affymetrix GeneChip® 3000 7G扫描仪中扫描基因芯片。

[0117] 使用来自生物传导公司(Bioconductor)的R开发语言2.6版进行所有计算处理和建模。独立地对脊髓和腓肠肌数据集进行分析。使用Affymetrix CEL文件进行所有数据预处理。每个数据集中的所有CEL文件都使用生物传导公司包(vignette)SIMPLE AFFY、AFFY和AFFY PLM进行质量控制。使用LIMMA包评估在给定时间点G93A与野生型组织之间的基因表达的统计学变化。使用贝叶斯模型来确定各组之间的表达变化的显著性。

[0118] 这些数据显示,炎性特征在疾病进展期间增加。这些基因表达变化反映了抗原呈递细胞(诸如树突细胞、巨噬细胞和B细胞)的激活。阻断相互作用可以改善使ALS的疾病进展加剧的免疫应答。可以通过阻断CD-28/CD80或CD-28/CD86或CD40/CD40L相互作用来抑制共刺激途径。

[0119] 共刺激途径连同其他相互作用一起涉及B细胞上的CD40与T细胞上的CD40L(也称为CD154、gp39、T-BAM、5c8抗原、CD40CR和TRAP)的结合。人CD40在成熟B细胞以及巨噬细胞、树突细胞、成纤维细胞和经激活的内皮细胞上表达。认为CD40:CD40L结合的阻断促进I型T辅助细胞应答的形成。

[0120] 使用阻断这些相互作用并抑制共刺激信号的化合物,大量的工作已经证明了在移植和自身免疫的临床前模型中阻断CD40L、CD80或CD86中的一种或多种的免疫调节作用。用封闭抗体阻断CD40L功能或用腺病毒表达CD40L-Ig使同种异体移植物移植期提高30至90天。用CTLA4-Ig阻断APC上的CD80/CD86或用腺病毒表达CTLA4-Ig的类似研究使同种异体移植物移植存活期瞬时提高。这些模型中的移植排斥是短暂的,并且随时间接着发生移植物排斥。通过用CTLA4-Ig阻断共刺激途径和用抗CD40L抗体阻断APC的CD40L激活都可以实现移植排斥的长期抑制。

[0121] 在小鼠中针对CD40L的封闭抗体或CD40L的遗传缺失已经证明,CD40L在实验性变应性脑脊髓炎(EAE)的临床前模型(多发性硬化、胶原诱导的关节炎和系统性狼疮的模型)中改善疾病进展、存活期和疾病的替代标记物。CD40:CD40L结合的阻断显现降低了巨噬细胞产生一氧化氮(其介导巨噬细胞的许多促炎活性)的能力。

[0122] 从此类研究看出,阻断CD40:CD40L相互作用和/或阻断CD28:CD80或CD28:CD86相互作用可以调节免疫应答。

[0123] 免疫组织化学数据显示与基因表达数据良好相关,并且这些数据将巨噬细胞在G93A小鼠中鉴定为在疾病进展期间浸润骨骼肌的抗原呈递细胞。

[0124] 为了确定来自G93A和野生型动物的腓肠肌中潜在的抗原呈递细胞的存在和定位,在第110天对从G93A和野生型小鼠收获的腓肠肌组织进行免疫组织化学。收获后立即将组织包埋在OCT中。将冷冻切片进行H&E染色,并且与针对髓磷脂的抗体(抗S100b抗体)或针对造血细胞谱系(包括T细胞(抗CD3抗体)、B细胞(CD45R泛B细胞抗体)和巨噬细胞(抗CD11b抗体))的抗体杂交。在第110天,存在CD11b阳性巨噬细胞浸润,并且巨噬细胞显现定位于支配骨骼肌的神经的轴突。巨噬细胞的定位并不分散在整个肌肉中,这表明炎症不是由于肌肉萎缩或肌纤维重塑。

[0125] 为了证实在第110天骨骼肌中单核细胞谱系细胞的身份并且阐明这些细胞与非转基因动物相比的相关性,用一组对巨噬细胞谱系具有特异性的抗体进行另外的免疫组织化学。利用抗S100b抗体标记支配骨骼肌的髓磷脂相关轴突。所有巨噬细胞特异性抗体(抗CD11b抗体、抗CD86抗体和抗MAC1抗体)都将巨噬细胞定位于支配G93A小鼠骨骼肌的神经的轴突,而野生型动物的轴突上不存在巨噬细胞。巨噬细胞的定位是支配肌肉的神经所特有的,而在肌肉的肌纤维上不存在巨噬细胞。

[0126] 基因表达数据表明,在脊髓以及骨骼肌两者中与共刺激途径相关的基因在疾病进展期间都暂时增加(图1A-图1B)。为了表征巨噬细胞浸润到骨骼肌中的时间,在G93A小鼠中对来自第60天、第80天和第100天的腓肠肌切片进行免疫组织化学。在第60天没有巨噬细胞浸润和定位于轴突的证据。巨噬细胞在第80天是明显的,并且如先前在第110天针对骨骼肌所述其被定位于支配肌肉的轴突。巨噬细胞的数量在第80天与第100天之间增加,并且巨噬细胞的积累是支配骨骼肌的轴突所特有的。

[0127] 为了定量巨噬细胞浸润的增加,将来自5只G93A和5只野生型动物的代表性切片与

抗CD86抗体杂交,并且对每10,000平方微米的巨噬细胞数量进行计数。在60天、80天和110天时间点野生型动物中巨噬细胞的数量是相同的。如可以在图2中观察到的,巨噬细胞在第80天与第100天之间暂时积累在骨骼肌中,并且有非常少的巨噬细胞存在于野生型骨骼肌中。

[0128] 总之,免疫组织化学数据与基因表达数据非常良好地相关,并且将巨噬细胞在G93A小鼠模型中鉴定为在疾病进展期间浸润骨骼肌的抗原呈递细胞。出乎意料的发现是巨噬细胞浸润显现特异性靶向支配骨骼肌的轴突,如通过用针对髓磷脂和巨噬细胞的抗体标记而定位。

[0129] MR1在G93A组织中的药代动力学分析

[0130] 使用夹心形式的基质匹配的非竞争性酶联免疫吸附测定(ELISA)来确定针对鼠CD40L的MR1的组织水平。在每个板上包括七点标准曲线。使用掺入PBS稀释剂溶液中的经纯化的MR1来制备标准品。将PBS稀释剂溶液与相等稀释度的未知样品下的正常小鼠组织进行基质匹配,以校正由组织裂解物引起的任何非特异性作用。

[0131] 在雌性和雄性G93A小鼠两者中,在给药(10mg/kg,IP)后两周的时间段内采集84个血浆样品用于药代动力学分析。

[0132] 消除半衰期在雌性(23d)和雄性(22d)中是类似的,并且与典型的小鼠IgG2基抗体在小鼠中的半衰期类似。没有观察到抗仓鼠抗体应答的迹象。

[0133] 与雄性相比,雌性所显示出的MR1的分布体积略小,因此当给予相同的10mg/kg剂量时显示出更高的血浆水平。雄性显示出更快的清除和更高的分布体积。因此,为了达到类似的血浆水平,雄性将需要更高的剂量。图1A使用线性浓度(Y)轴示出了随时间的MR1浓度。图1B使用log浓度(Y)轴示出了随时间的MR1浓度。

[0134] 将36只雌性G93A小鼠进行同窝匹配,并且随机分为两个研究组。将18只G93A小鼠置于MRI治疗组中,并且将其他18只G93A小鼠置于对照组中。研究天数基于从出生起的天数。

[0135] 在第50天腹膜内(IP)施用56μg MR1的单次注射。在推注后,通过腹膜内注射施用18μg MR1的每周维持注射。在媒介物(磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.3))中制备剂量,至总体积为200μl。向对照动物施用200μl PBS。从第54天开始,在整个研究过程中每天监测动物,并且测量每日体重测量结果以及神经功能得分。

[0136] 从50日龄开始,每天评估每只小鼠两条后腿的神经功能得分。神经功能得分采用0-4的量表。(Scott等人,ALS Journal[ALS杂志]2008年1月)。简言之,当将小鼠通过其尾部悬吊,并且小鼠可以将其保持2秒,悬吊2-3次时,分配0得分的动物的后腿完全伸展离开侧中线。当动物在尾部悬吊期间表现出腿部向侧中线伸展垮塌或部分垮塌(虚弱)或后腿震颤时,动物得分为1。当脚趾在12英寸行走期间至少两次卷曲,或者脚部的任何部分沿着笼子底部/桌子拖动时,动物得分为2。当动物具有僵硬性瘫痪或最小的关节运动,或者不使用脚部向前运动时,动物得分为3。当动物从任一侧在30秒内无法自我纠正时,动物得分为4。如果一条后腿被评分为2,则将食物颗粒留在垫料上。如果两条后腿都被评分为2,则除了垫料上的食物颗粒之外,还提供Nutra-Gel® (博仕公司(Bio-Serve)#S4798)作为食物,并且将长吸管置于水瓶上。

[0137] 记录每只小鼠的死亡日期和原因。出于人道原因,使用严重濒死的标准在实际死

亡前密切监测动物,并且在濒死时将其处死。为了可靠且人道地确定存活期的持续时间,使用濒死状态,定义为小鼠在被置于一侧后30秒无法自我纠正(神经功能得分为4)。将濒死小鼠评分为“死亡”,并且使用二氧化碳对其实施安乐死。

[0138] 标准程序是在统计分析前去除治疗组和对照组两者中的非ALS相关死亡。在此情况下,对照组或治疗组中的所有动物死亡都归因于ALS。因此,没有动物由于非ALS相关死亡而被删失。

[0139] 突变型SOD1转基因动物在新生儿时表现出正常的体重(BW)特征,并且与非转基因动物相比体重正常增加到成年期。根据转基因中遗传突变的性质和突变型转基因的拷贝数,体重减轻在成年动物中变得明显并且持续直到死亡。治疗组和对照组的体重减轻的分析可以提供对推定的治疗对疾病发作和进展速率的影响的见解。为了评估MR1治疗对体重的影响,检查两个汇总参数(1)从研究开始至达到体重峰值的BW变化,这可以反映对疾病发作的影响;(2)从体重峰值至死亡的BW变化,这可以反映对疾病进展的影响。

[0140] 比较性的MR1治疗组和对照组的从第40天至达到体重峰值的时间的时间-事件曲线示于图2中。对照组达到体重峰值的时间中值为50天,相比之下MR1治疗组为51天。当通过卡普兰-迈耶使用对数秩和威尔科克森统计模型、Cox比例风险模型或参数统计检验进行分析时,此差异不显著。

[0141] 比较性的MR1治疗组和对照组的从体重峰值至死亡的时间的时间-事件曲线示于图3中。在经MRI治疗的动物中,从体重峰值至死亡的时间在统计学上显著晚15天。对照动物在达到体重峰值后更快死亡的风险比经MR1治疗的动物高2.4至4.7倍。在对照组中从体重峰值至死亡的时间中值为26天,而在MR1治疗组中它为41天。以几种方式计算此实例中每种分析的显著性,以便更好地评价显著性。当使用几种方法进行分析时,延迟是统计学上显著的。(卡普兰-迈耶,对数秩,p=0.0110和威尔科克森,p=0.0069;Cox比例风险模型,p=0.05151;参数统计模型,p=0.0122)。基于体重数据,MR1显现对G93A小鼠模型的疾病发作具有较小的影响,但是在减缓从体重峰值直到死亡的体重减轻速率方面具有显著的影响。

[0142] 还通过对盐水治疗组和MR1治疗组的每日神经功能得分进行分析来表征疾病发作的时间。在研究开始(第50天)时,所有动物的神经功能得分都为0,没有可观察到的症状或瘫痪。可以通过检查从神经功能得分为0至神经功能得分为2(当动物明显拖动后肢时)的神经功能得分进展来表征疾病发作。MR1和对照组动物进展到神经功能得分为2时的年龄和神经功能得分为2的天数的时间-事件图示于图4中。每组的神经功能得分为2的时间中值绘制于图5中。在对照组中达到得分为2的时间为115天,并且对于MR1治疗组为122天。基于神经功能得分数据,MR1将G93A小鼠模型的疾病发作延迟大约7天,并且当使用几种方法进行分析时,延迟是统计学上显著的。(卡普兰-迈耶,对数秩(p=0.0378)和威尔科克森(p=0.0591);Cox比例风险模型(p=0.0521);参数分析(p=0.0582))。在图5中,将在每个神经功能得分水平下花费的天数相对于该得分水平下的年龄中值作图。

[0143] 与对照动物相比,治疗动物的存活时间晚13天。比较性的MR1治疗组和对照组的从体重峰值至死亡的时间的时间-事件曲线示于图6中。对照组的存活时间中值为128天,并且MR1治疗组的存活期中值为141天。对照动物的更快死亡的风险比经MR1治疗的动物高2.8至3.2倍。当使用几种方法进行分析时,延迟是统计学上显著的。(卡普兰-迈耶,对数秩(p=0.0040)和威尔科克森检验(p=0.0109);Cox比例风险模型(p=0.0060);参数分析(p=

0.0049))。

[0144] 将60只雌性和36只雄性G93A小鼠进行同窝匹配,并且随机分配到治疗组或对照组。从第50天开始用MR1治疗30只雌性小鼠和18只雄性小鼠。研究天数是基于出生的。

[0145] 在第50天,在雌性或雄性中分别腹膜内施用5.22mg/kg或6.75mg/kg MR1的单次推注。在推注后,经由腹膜内注射,雌性接受1mg/kg MR1的每周注射,并且雄性接受1.34mg/kg MR1的每周注射。在媒介物(磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH 7.3))中制备剂量,至总体积为200μl。向对照动物施用200μl PBS。如先前所述监测动物的体重、神经功能得分、非相关ALS死亡和安乐死标准。

[0146] 比较性的MR1治疗组和对照组的从第40天至达到体重峰值的时间的时间-事件曲线示于图7A中。对照组达到体重峰值的时间中值为49天,相比之下MR1治疗组为53天。当通过卡普兰-迈耶使用对数秩和威尔科克森统计模型、Cox比例风险模型或参数统计检验进行分析时,此差异不显著。

[0147] 比较性的MR1治疗组和对照组的从体重峰值至死亡的时间的时间-事件曲线示于图7B中。在经MRI治疗的动物中,从体重峰值至死亡的时间在统计学上显著晚6天。在对照组中从体重峰值至死亡的时间中值为29天,而在MR1治疗组中它为35天。以几种方式计算此实例中每种分析的显著性,以便更好地评价显著性。当使用以下几种统计模型进行分析时,延迟是统计学上显著的:卡普兰-迈耶,对数秩(p=0.0413)和威尔科克森(p=0.0732);以及Cox比例风险模型(p=0.0460)。基于体重数据,MR1显现对G93A小鼠模型的疾病发作具有较小的影响,但是在减缓从体重峰值直到死亡的体重减轻速率方面具有显著的影响。

[0148] MR1和对照组动物进展到神经功能得分为2时的年龄和神经功能得分为2的天数的时间-事件图示于图7C中。在对照组中达到得分为2的时间为113天,并且对于MR1治疗组为121天。基于神经功能得分数据,MR1将G93A小鼠模型的疾病发作延迟大约8天,并且当使用以下几种分析模型进行分析时,延迟是统计学上显著的:卡普兰-迈耶,对数秩(p=0.0038)和威尔科克森(p=0.0017);以及Cox比例风险模型(p=0.0010)。

[0149] 与对照动物相比,治疗动物的存活时间晚9天。对照组的存活时间中值为124天,并且MR1治疗组的存活期中值为133天,如图7D所示。当使用以下几种统计模型进行分析时,延迟是统计学上显著的:卡普兰-迈耶,对数秩(p=0.0043)和威尔科克森检验(p=0.0040);以及Cox比例风险模型(p=0.0030)。

[0150] 应理解的是,本文所述的实例和实施例仅出于说明目的,并且将对本领域技术人员建议鉴于此的各种修改或变化且这些修改或变化将被包括在本申请的精神和范围内以及所附权利要求的范围内。

[0151] 编码所需抗体的重链和轻链的核酸序列被设计为适合于在哺乳动物细胞(诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)中表达。然后人工合成核酸,并且使用标准分子生物学技术将其连接到抗体表达载体BPJPuro中。BPJPuro是针对免疫球蛋白在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中的具选择性且稳定的表达而优化的双基因哺乳动物表达载体。然后将载体转染到CHO细胞中,并且选择稳定的转染子。

[0152] 类似地,合成编码具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链的核酸(SEQ ID NO:10)和编码具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的轻链的核酸(SEQ ID NO:8),并且将其连接到抗体表达载体BPJPuro中。

[0153] 使用脂质体介导的转染将编码重链和轻链的所得表达载体转染到CHO系(CHO SA,塞莱克蒂斯股份有限公司(Cellectis SA),法国巴黎)中。通过嘌呤霉素选择来分离稳定的转染子并且进行亚克隆以提供克隆细胞系。使候选细胞系适应无血清悬浮培养,并且针对IgG产生和稳健生长进行筛选。选择一种细胞系并且将其命名为JB5,将该细胞系在中试规模生物反应器中培养,并且通过顺序浓缩、蛋白A/G亲和色谱法和尺寸排阻色谱法从条件培养基中纯化抗体JB5。

[0154] 使用三部分夹心ELISA测定来确定JB5抗体相对于亲本抗体hu5c8的结合动力学。使用250μl PBS的3次洗涤来进行所有洗涤。在4℃下将96孔聚苯乙烯板用100μl/孔JB5或hu5c8抗体(2μg/ml)包被16小时。洗涤板,然后在室温下将其用2%牛血清白蛋白/PBS封闭1小时。洗涤板,并且将重组人CD40L蛋白(圣克鲁斯生物科技公司(Santa Cruz Biotechnology),美国加利福尼亚州圣克鲁斯)添加到板中,以2000ng/ml开始通过2倍稀释进行滴定。在结合和洗涤后,使用100μl生物素化的山羊抗人CD40L多克隆抗体(200ng/ml)和100μl链霉亲和素-辣根过氧化物酶缀合物(100ng/ml)来检测结合的CD40L蛋白。用显色剂TMB(3,3′,5,5′-四甲基联苯胺)进行比色检测,并且对450nm处的吸收进行分光光度分析。所得结合曲线(图8)显示,相对于亲本抗体hu5c8(正方形),JB5(圆形)具有高度类似的CD40L结合。具有与JB5相同的Fc结构域的对照蛋白CTLA4-IgG1(三角形)未显示出显著结合。hu5c8和JB5的计算的EC50分别为114和137nM。JB5-R28K和JB5-K74R显示出与JB5的结合类似的结合。

[0155] 为了比较来自所有16个克隆的抗体相比于5c8或AT-1501的CD40L结合,使用2个克隆(在同一96孔测定板上运行的5c8和AT-1501)运行结合测定。使用三部分夹心ELISA测定来确定与参考抗体5c8-19和AT1501相比,本披露的抗体的结合水平。将96孔聚苯乙烯板用重组人CD40L(百进公司(BioLegend)目录号591706)(使用在PBS中的2μg/ml)进行包被,并且将50μl/孔添加到Costar 96孔1/2面积高结合测定板(康宁公司(Corning)3690)中,并且在4℃下孵育过夜。在室温下将板用(1X)PBS/1.0% BSA(140μl/孔)封闭1小时以防止背景结合。添加5C8或AT1501(从2μg/ml开始连续2倍稀释液)(50μl/孔)的结合曲线,并且在室温下孵育1小时。洗涤板,并且在室温下将其用1:10,000稀释度的HRP-(Fab2)驴抗人IgG(Fc特异性)(杰克逊免疫研究公司(Jackson Immuno.)709-036-098)(50μl/孔)孵育1小时。洗涤板,并且添加TMB底物(Surmodics BioFX公司TMBW-1000-01)(50μl/孔)。在室温下5分钟后,用25μl2NH_2SO_4停止显色。使用SoftMax Pro 6.2.2程序在Molecular Devices SpectraMax M5读板仪上读取板,以确定450nm处的吸光度。

[0156] 如下计算相对CD40L结合效力:[IC50(克隆)/IC50(5c8或AT-1501)X100%]。16个克隆相比于5c8的排序效力示于图15A中,并且相比于AT-1501的排序效力示于图15B中。所得结合曲线示于图16A-图16Q(16个克隆相比于5c8的比较,图16H示出了AT-1501与5c8之间的比较)和图17A-图17Q(16个克隆相比于AT-1501的比较,图17H示出了AT-1501与5c8之间的比较)中。每个克隆的IC50、LCL、UCL和相对效力示于表1(与5c8比较)和表2(与AT-1501比较)中。

[0157] 表1:

[0158]

图号	克隆	IC50	LCL	UCL	相对效力
16A	16-3	0.022	0.017	0.026	46
	5c8	0.047	0.040	0.054	
16B	8-3	0.036	0.028	0.043	51
	5c8	0.070	0.062	0.078	
16C	12-4	0.020	0.013	0.027	47
	5c8	0.042	0.038	0.046	
16D	8-4	0.036	0.030	0.041	51

[0159]

图号	克隆	IC50	LCL	UCL	相对效力
	5c8	0.070	0.062	0.078	
16E	13-2	0.020	0.013	0.027	48
	5c8	0.041	0.038	0.045	
16F	4-4	0.037	0.029	0.045	51
	5c8	0.072	0.064	0.081	
16G	17-1	0.028	0.023	0.033	63
	5c8	0.044	0.036	0.053	
16H	AT-1501	0.049	0.043	0.056	95
	5c8	0.052	0.046	0.058	
16I	5-3	0.055	0.047	0.063	76
	5c8	0.072	0.064	0.081	
16J	6-6	0.065	0.059	0.070	106
	5c8	0.061	0.054	0.068	
16K	18-2	0.041	0.036	0.046	92
	5c8	0.044	0.036	0.053	
16L	10-4	0.075	0.065	0.086	113
	5c8	0.067	0.058	0.076	
16M	10-1	0.079	0.070	0.089	119
	5c8	0.067	0.058	0.076	
16N	7-5	0.102	0.094	0.111	168
	5c8	0.061	0.054	0.068	
16O	15.4	0.063	0.056	0.069	133

[0160]

图号	克隆	IC50	LCL	UCL	相对效力
	5c8	0.047	0.040	0.054	
16P	11-5	0.092	0.071	0.112	177
	5c8	0.052	0.046	0.058	
16Q	15-1	0.081	0.073	0.089	163
	5c8	0.050	0.046	0.053	

[0161] 表2：

[0162]

图号	克隆	IC50	LCL	UCL	相对效力
17A	12-4	0.020	0.013	0.027	45
	AT-1501	0.044	0.039	0.049	
17B	8-3	0.036	0.028	0.043	59
	AT-1501	0.060	0.053	0.068	
17C	13-2	0.020	0.013	0.027	45
	AT-1501	0.044	0.038	0.049	
17D	8-4	0.036	0.030	0.041	59
	AT-1501	0.060	0.053	0.068	
17E	16-3	0.022	0.017	0.026	48
	AT-1501	0.045	0.039	0.051	
17F	4-4	0.037	0.029	0.045	60
	AT-1501	0.062	0.054	0.070	
17G	17-1	0.028	0.023	0.033	66
	AT-1501	0.042	0.035	0.050	

[0163]

图号	克隆	IC50	LCL	UCL	相对效力
17H	5c8	0.052	0.046	0.058	105
	AT-1501	0.049	0.043	0.056	
17I	5-3	0.055	0.047	0.063	89
	AT-1501	0.062	0.054	0.070	
17J	10-4	0.075	0.065	0.086	115
	AT-1501	0.066	0.056	0.076	
17K	18-2	0.041	0.036	0.046	96
	AT-1501	0.042	0.035	0.050	
17L	10-1	0.079	0.070	0.089	121
	AT-1501	0.066	0.056	0.076	
17M	6-6	0.065	0.059	0.070	132
	AT-1501	0.049	0.047	0.051	
17N	11-5	0.092	0.071	0.112	174
	AT-1501	0.053	0.050	0.056	
17O	15-4	0.063	0.056	0.069	139
	AT-1501	0.045	0.039	0.051	
17P	7-5	0.102	0.094	0.111	210
	AT-1501	0.049	0.047	0.051	
17Q	15-1	0.081	0.073	0.089	159
	AT-1501	0.051	0.046	0.055	

[0164] 用具有两个突变P238S和N297G的IgG1 Fc(SEQ ID NO:21)构建16个VH/VL抗体克隆。测定这些抗体克隆的与人Fcγ RI、Fcγ RIIa和Fcγ RIIIa结合的Fc效应子功能。

[0165] 将抗CD40L抗体(包括阿巴西普作为阴性对照)在(1X)PBS中稀释至2μg/ml,并且将50μl/孔添加到Costar 96孔1/2面积高结合测定板(康宁公司3690)中,用于在4℃下孵育过

夜。在室温下将板用(1X)PBS/1.0％BSA(140μl/孔)封闭1小时以防止背景结合。添加重组人FcγRI、IIa、IIIa和IIIb(从5μg/ml开始连续2倍稀释液)(50μl/孔)的结合曲线,并且在室温下孵育1小时。洗涤板,并且在室温下将其用2μg/ml的小鼠抗人CD16(抗FcRIII);CD32(抗FcRIIa)或CD64(抗FcRI)(e生物科学公司(eBioSciences)/英杰公司(Invitrogen)14-0168-82;16-0329-81;14-0649-82)(50μl/孔)孵育1小时。洗涤板,并且在室温下将其用1:10,000稀释度的HRP-(Fab_2)山羊抗小鼠IgG(Fc特异性)(杰克逊免疫研究公司116-036-071)(50μl/孔)孵育1小时。洗涤板,并且添加TMB底物(Surmodics BioFX公司TMBW-1000-01)(50μl/孔)。在室温下5min后,用(25μl/孔)2NH_2SO_4停止显色。使用SoftMax Pro 6.2.2程序在Molecular Devices SpectraMax M5读板仪上读取板,以确定450nm处的吸光度。

[0166] 如可以在图中观察到的,本申请披露的克隆与三种Fc受体的结合呈阴性,而5c8与FcγRI、FcγRIIa结合,但是不与FcγRIIIa或FcγRIIIb结合。图18A和图18B各自示出了与5c8、AT-1501和阿巴西普的结合曲线相比,八个抗体克隆与FcγRIa的结合。图19A和图19B各自示出了与5c8、AT-1501和阿巴西普的结合曲线相比,八个抗体克隆与FcγRIIa的结合。图20A和图20B各自示出了与5c8、AT-1501和阿巴西普的结合曲线相比,八个抗体克隆与FcγRIIIa的结合。图20C和图20D各自示出了与5c8、AT-1501和阿巴西普的结合曲线相比,八个抗体克隆与FcγRIIIb的结合。(图18A、图19A、图20A和图20B示出了来自抗体克隆4-4、5-3、6-6、7-5、8-3、8-4、10-1和10-4的结果;图18B、图19B、图20C和图20D示出了来自抗体克隆11-5、12-4、13-2、15-1、15-4、16-3、17-1和18-2的结果)。

[0167] 将抗CD40L抗体(包括阿巴西普作为阴性对照)在(1X)PBS中稀释至2μg/ml,并且将50μl/孔添加到Costar 96孔1/2面积高结合测定板(康宁公司3690)中,用于在4℃下孵育过夜。在室温下将板用(1X)PBS/1.0％BSA(140μl/孔)封闭1小时以防止背景结合。添加天然人C1q蛋白(艾博抗公司(Abcam)ab96363)(从10μg/ml开始连续2倍稀释液)(50μl/孔)并且在室温下持续1小时的结合曲线。洗涤板,并且添加1:400稀释度的HRP-绵羊抗人C1q(艾博抗公司ab46191)(50μl/孔),并且在室温下孵育1小时。洗涤板,并且添加TMB底物(Surmodics BioFX公司TMBW-1000-01)(50μl/孔)。在室温下5分钟后,用(25μl/孔)2NH_2SO_4停止显色。使用SoftMax Pro 6.2.2程序在Molecular Devices SpectraMax M5读板仪上读取板,以确定450nm处的吸光度。

[0168] 如可以在图中观察到的,来自本申请披露的所有十六个抗体克隆的抗体与C1q的结合都呈阴性,而5c8显示出显著结合。图21A和图21B各自示出了与5c8、AT-1501和阿巴西普的结合曲线相比,八个抗体克隆与C1q的结合。图21A示出了来自抗体克隆4-4、5-3、6-6、7-5、8-3、8-4、10-1和10-4的结果;图21B示出了来自抗体克隆11-5、12-4、13-2、15-1、15-4、16-3、17-1和18-2的结果。

[0169] 由于遗传表达数据表明涉及共刺激途径,在G93A模型中评价MRI的功效。MR1与CD40L结合,从而阻断其与CD40的相互作用,后者参与涉及免疫应答的共刺激途径。在文献中已经报道,MR1可有效治疗类风湿性关节炎和移植物抗宿主病,这两者都具有强的免疫组分。类风湿性关节炎是自身免疫性疾病,并且当宿主的机体对移植物组织产生强烈的免疫应答时,出现移植物抗宿主病。

[0170] 尽管ALS具有由小胶质细胞和星形胶质细胞的激活介导的免疫组分,但是它不被认为是自身免疫性障碍。几种抗炎药未能在临床前或临床测试中显示出功效,包括TNFα抑

制剂、Celebrex®、米诺环素和沙利度胺。因此,出乎意料地发现MR1在G93A ALS模型中显示出功效。

[0171] 根据本披露的方法包括治疗患有神经系统变性障碍和/或神经肌肉障碍的患者的方法,这些方法是通过向患者施用阻断CD40L与CD40的相互作用和/或阻断CD28与CD80的相互作用和/或阻断CD28与CD86的相互作用的化合物。一个实施例是治疗患有阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病和脊髓小脑性共济失调的患者的方法,该方法是通过向患者施用阻断CD40L与CD40的相互作用的化合物。在另一个实施例中,治疗患者的方法是通过施用抗CD40L抗体。

[0172] 在一些实施例中,治疗化合物包括阻断CD40与CD40L的相互作用的任何化合物。例如,许多动物研究描述了能够阻断CD40:CD40L结合的药剂(参见例如,US2005158314和US 7173046,将其通过援引特此并入)。此外例如,已经产生和表征了许多抗CD40L抗体。(参见例如,百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb)的美国专利号5,876,950,将其通过援引特此并入)。可用于本披露的方法中的抗CD40L抗体包括但不限于MR1,一种仓鼠单克隆抗体,可从泰康利公司(Taconic)(纽约州哈德逊)和BD生物科学公司(BD Biosciences)(加利福尼亚州圣何塞)获得;5c8,一种人源化抗体,描述于美国专利号5,474,771(将其通过援引特此并入)中;仓鼠人嵌合抗体IDEC 131/E6040,其是一种包含具有鼠单克隆抗体克隆24-31的CDR的人γ-1重链和人κ轻链的人源化单克隆抗体,可从安塞尔公司(Ancell)商购获得(目录号X 353-020,明尼苏达州贝波特);ABI 793;Sgn-40;ImxM90(伊姆尼斯公司(Immunex));ImxM91(伊姆尼斯公司);ImxM92(伊姆尼斯公司);以及可从健赞公司(Genzyme)商购获得的抗CD40L mAb(马萨诸塞州剑桥,目录号80-3703-01)。还可商购获得的是来自法明根公司(PharMingen)的抗CD40L mAb(圣地亚哥,目录号33580D)。根据本披露的实施例包括治疗患有神经系统变性障碍或神经肌肉障碍的患者的方法,这些方法包括施用治疗有效量的抗CD40L抗体。一个实施例是治疗患有神经系统变性障碍或神经肌肉障碍的患者的方法,该方法包括施用治疗有效量的选自以下的抗CD40L抗体:MR1、5c8、IDEC 131/E6040、克隆24-31、ABI 793、ImxM90、ImxM91、ImxM92或Sgn-40。在一个实施例中,抗体是5c8。在另一个实施例中,抗体是MR1。

[0173] 在一些实施例中,神经系统变性障碍或神经肌肉障碍是阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。一个实施例是治疗患有肌萎缩侧索硬化的患者的方法,该方法包括施用治疗有效量的抗CD40L抗体。在特定实施例中,抗CD40L抗体是MR1。在另一个特定实施例中,抗CD40L抗体是5c8。

[0174] 在另一个实施例中,治疗方法包括施用治疗有效量的抗CD40抗体。在一些实施例中,抗CD40L化合物是Fab片段、$F(ab')_2$、F(ab')、单链抗体、多肽、多肽的融合构建体等。在一些实施例中,这些化合物是能够阻断CD40:CD40L相互作用的小分子化合物。在其他实施例中,这些化合物包括BIO3417或美国专利号7,173,046中披露的具有阻断CD40:CD40L相互作用的能力的任何化合物。

[0175] 可以将阻断CD40:CD40L相互作用的化合物与其他化合物组合施用。因此,另一个实施例是治疗患有神经系统变性障碍或神经肌肉障碍的患者的方法,该方法包括施用阻断CD40L与CD40的相互作用的化合物与阻断CD80与CD28之间的相互作用的化合物的组合。另

一个实施例是治疗患者的方法,该方法是通过施用阻断CD40L与CD40的相互作用的化合物与阻断CD86与CD28之间的相互作用的化合物的组合。在一个实施例中,阻断CD80与CD28的相互作用的化合物是加利昔单抗、或H1f1和h3d1、或16C10、或7C10。在一个实施例中,阻断CD86与CD28之间的相互作用的化合物是CTLA4-Ig蛋白缀合物,诸如阿巴西普或贝拉西普。根据本披露的实施例还包括治疗患有神经系统变性障碍或神经肌肉障碍的患者的方法,该方法包括施用阻断CD40L与CD40的相互作用的化合物与阻断CD80与CD28之间的相互作用的化合物的组合,或者施用治疗有效量的阻断CD40L与CD40的相互作用的化合物与阻断CD86与CD28之间的相互作用的化合物的组合,其中神经系统变性障碍或神经肌肉障碍是阿尔茨海默病、帕金森病、肌萎缩侧索硬化、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。在某些实施例中,阻断CD40L与CD40的相互作用的化合物是MR1,并且阻断CD28与CD86之间或CD28与CD80之间的相互作用的化合物是阿巴西普、加利昔单抗或贝拉西普。在其他实施例中,阻断CD40L与CD40的相互作用的化合物是5c8。另一个实施例是治疗患有肌萎缩侧索硬化的患者的方法,该方法包括施用治疗有效量的MR1与阿巴西普或贝拉西普的组合。另一个实施例是治疗患有肌萎缩侧索硬化的患者的方法,该方法包括施用治疗有效量的5c8与阿巴西普或贝拉西普的组合。

[0176] 药物组合物和施用方法

[0177] 为了治疗任何前述障碍,可以使用一种或多种生理上可接受的载体以常规方式配制用于根据本披露的方法使用的药物组合物。药学上可接受的载体部分地通过所施用的具体组合物以及通过用于施用组合物的具体方法来确定。因此,存在可用于本披露的方法中的化合物的各种各样的合适的配制品(参见例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药学科学与实践],第20版,Gennaro等人编辑,Lippincott Williams and Wilkins[利平科特·威廉斯·威尔金斯公司],2000)。

[0178] 适合于口服施用的配制品包括例如固体、半固体和液体系统,诸如片剂;含有多或纳米微粒、液体或粉末的软或硬胶囊剂;锭剂(包括液体填充的);咀嚼剂;凝胶剂;快速分散剂型;膜剂;卵形剂(ovule);喷雾剂;以及口腔贴剂/粘膜粘附贴剂。

[0179] 适合于肠胃外施用的配制品包括水性和非水性等渗无菌注射溶液(其可以含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使配制品与预期接受者的血液等渗的溶质),以及水性和非水性无菌混悬液(其可以包括助悬剂、增溶剂、增稠剂、稳定剂和防腐剂)。

[0180] 根据本披露,这些化合物可以通过任何合适的方式施用,这些方式可以根据所治疗的障碍的类型和化合物本身的性质而变化。例如,可以将化合物口服、肠胃外或局部施用。对于蛋白质(诸如抗体),施用途径优选地包括肠胃外,例如肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下。优选地,将肠胃外给药通过注射,最优选静脉内、肌内或皮下注射给予。待施用的量将取决于多种因素,诸如临床症状、个体的体重以及是否施用其他药物。应当理解,适当的剂型、剂量和施用途径的确定在制药领域和医学领域的普通技术人员的水平内,并且在下文进行了描述。

[0181] 在含有抗CD40L抗体或其抗原结合片段的一种示例性药物组合物中,将组合物配制为抗CD40L抗体或其抗原结合片段的无菌无防腐剂溶液,用于静脉内或皮下施用。配制品可以作为一次性预填充笔、作为一次性(例如,含有约1mL)预填充玻璃注射筒或作为一次性机构使用小瓶提供。优选地,含有抗CD40L抗体或其抗原结合片段的药物组合物是透明且无

色的,pH为约5.0至约6.9,优选地pH为约5.0至约6.5,甚至更优选地pH范围为约5.0至约6.0。在各种实施例中,当重构并施用至受试者时,包含药物组合物的配制品可以每mL溶液含有从约500mg至约1mg、或从约400mg至约10mg、或从约300mg至约30mg、或从约200mg至约50mg的抗CD40L抗体或其抗原结合片段。

[0182] 选择治疗剂的施用方案取决于几种因素,包括实体的血清或组织周转速率、症状水平、实体的免疫原性、以及生物基质中靶细胞的可及性、患者的一般健康状况、患者的先前病史等。优选地,施用方案使递送至患者的治疗剂的量最大化,与可接受的副作用水平相符。因此,递送的生物制剂的量部分地取决于具体实体和所治疗的病症的严重程度。应当理解,适当的剂型、剂量和施用途径的确定在制药领域和医学领域的普通技术人员的水平内。

[0183] 剂量和暴露

[0184] 本披露的药物配制品可以含有从约0.001至约200mg/kg的抗CD40L抗体或其抗原结合片段,例如可以将抗CD40L抗体或其抗原结合片段的从约0.001mg/kg至约100mg/kg、或从约0.001mg/kg至约50mg/kg、或从约0.001mg/kg至约10mg/kg静脉内注射液作为推注给予,并且可以将其余的抗体剂量通过静脉内注射施用。可以将预定剂量的抗CD40L抗体或其抗原结合片段例如经一小时至两小时至五小时的时间段施用。

[0185] 在另外的实施例中,将剂量的一部分通过皮下注射和/或输注以推注的形式施用,并且将其余的剂量通过输注抗体配制品施用。在一些示例性剂量中,可以将抗体配制品以抗CD40L抗体或其抗原结合片段的范围从约0.001至约200mg/kg(例如,从约0.001mg/kg至约100mg/kg、或从约0.001mg/kg至约50mg/kg、或从约0.001mg/kg至约10mg/kg)静脉内注射液的剂量皮下施用。在一些实施例中,可以将剂量作为推注给予,并且可以将其余的抗体剂量通过皮下或静脉内注射施用。可以将预定剂量的抗CD40L抗体或其抗原结合片段例如经一小时的时间段、或两小时的时间段、或三小时的时间段、或四小时的时间段或五小时或更长时间的时间段施用。

[0186] 在一些实施例中,以恒定速率施用剂量,诸如以维持血浆中的稳定状态。在一些实施例中,每两周施用剂量。在一些实施例中,施用化合物,使得将受试者的血浆中化合物的浓度维持在1μg/mL与1mg/mL之间的剂量。在一些中,施用化合物,使得将受试者的血浆中化合物的浓度维持在1μg/mL与500μg/mL之间的剂量。在一些实施例中,施用化合物,使得将受试者的血浆中化合物的浓度维持在1μg/mL与250μg/mL之间的剂量。在一些实施例中,施用化合物,使得将受试者的血浆中化合物的浓度维持在5μg/mL与100μg/mL之间的剂量。在一些实施例中,施用化合物,使得将受试者的血浆中化合物的浓度维持在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

[0187] 生物标记物

[0188] 本申请的一些实施例涉及用靶向CD40/CD40L的化合物治疗来修饰受试者中的生物标记物。在一些实施例中,生物标记物是涉及CD40/CD40L活性的蛋白质。在一些实施例中,生物标记物是CD40。在一些实施例中,生物标记物是CD40L。在一些实施例中,生物标记物是NFL。在一些实施例中,生物标记物是促炎标记物或与炎症相关。在一些实施例中,生物标记物与ALS相关。在一些实施例中,生物标记物与神经系统变性或神经肌肉疾病或障碍相关。在一些实施例中,生物标记物是细胞因子和/或白介素。在一些实施例中,生物标记物是以下中的一种或多种:NFL、CXCL13、CD40L、CXCL9、TNF-α、En-Raged、TNFR2、IgM、IgA、I12r、

CXCL10、CD40、B2M、VCAM、Il-18、Il-16、SAP、MIP1β、MDC、C3、CRP、纤维蛋白原、IgE、ICAM、因子VIII、Ena-78、Pal1、Rantes、TIMP1、vWF、Il-6、MCP1、MMP3、MMP9、MCP1、MIG、vWF、Il-8、IP10和MMP2。

[0189] 在一些实施例中,用靶向CD40/CD40L的化合物治疗使一种或多种生物标记物的浓度增加。在一些实施例中,用靶向CD40/CD40L的化合物治疗使一种或多种生物标记物的浓度降低。在一些实施例中,用靶向CD40/CD40L的化合物治疗使至少一种生物标记物浓度增加,并且使至少一种其他生物标记物浓度降低。在一些实施例中,至少一种生物标记物的基线水平充当患有疾病、障碍或病症的受试者对用靶向CD40/CD40L的化合物治疗的反应的预测因子。

[0190] 组合疗法

[0191] 本文所述的抗体或其抗体片段可以单独施用(单一疗法)或组合施用(即,与其他药剂组合)。例如,在一个实施例中,组合疗法可以包括一种或多种另外的治疗剂。在另一个实施例中,组合疗法包括标准护理治疗,其可以包括或可以不包括另外的治疗剂(基本上由抗体或其抗体片段组成)。

[0192] 辅助或组合施用(共同施用)包括同时施用本文所述的任何抗体或其抗原结合片段和处于相同或不同剂型的一种或多种药剂,或单独施用多肽和一种或多种药剂(例如,顺序施用)。这种同时或顺序施用优选地导致多肽和一种或多种药剂两者同时存在于所治疗的患者中。

[0193] 试剂盒和制品

[0194] 进一步提供了含有本文所述的抗体或其抗原结合片段和使用说明书的试剂盒。试剂盒典型地包括预定量的试剂与指示试剂盒内容物的预期用途的说明书和标签的包装组合。术语标签或说明书包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供的或以其他方式在试剂盒的制造、运输、销售或使用期间的任何时间伴随试剂盒的任何书写或记录材料。它可以呈由管理药物或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式,该公告反映该机构对制造、使用或销售的批准以供向人施用或兽用。标签或说明书还可以涵盖广告传单和小册子、包装材料以及音频或视频说明书。

[0195] 抗CD40L抗原结合分子

[0196] 本文提供的一些实施例涉及作为抗CD40L抗体hu5c8的修饰形式的抗体,其包含具有hu5c8的可变轻链和可变重链CDR序列的人IgG1共有框架,其中Fc结构域被修饰以防止血小板激活。

[0197] 表3提供了本申请中引用的SEQ ID NO的描述。

[0198] 表3:

[0199]

SEQ ID NO:	序列描述
1	轻链可变区氨基酸序列（hu5c8 和 JB5）
2	重链可变区氨基酸序列（hu5c8 和 JB5）
3	Fc 区氨基酸序列（hu5c8）
4	JB5 Fc 区氨基酸序列
5	JB5-R28K 轻链可变区氨基酸序列
6	JB5-K74R 重链可变区氨基酸序列
7	JB5 轻链氨基酸序列
8	JB5 轻链核酸序列
9	JB5 重链氨基酸序列
10	JB5 重链核酸序列
11	JB5-R28K 轻链氨基酸序列
12	JB5-R28K 轻链合成基因核酸序列
13	JB5-K74R 重链氨基酸序列
14	JB5-K74R 重链合成基因核酸序列
15	JB5 可变轻链氨基酸序列的 CDR-1
16	JB5 可变轻链氨基酸序列的 CDR-2
17	JB5 可变轻链氨基酸序列的 CDR-3

[0200]

18	JB5 可变重链氨基酸序列的 CDR-1
19	JB5 可变重链氨基酸序列的 CDR-2
20	JB5 可变重链氨基酸序列的 CDR-3
21	hu5c8 重链氨基酸序列

[0201] 一个实施例(实施例A)是与CD40L结合并且包含轻链和重链的分离的抗体,其中轻链包含含有与SEQ ID NO:1具有至少90％、或至少91％、或至少92％、或至少93％、或至少94％、或至少95％、或至少96％或至少97％、或至少98％或至少99％序列同一性的氨基酸序列的轻链可变区,并且重链包含可变重链区和Fc区,其中重链可变区包含与SEQ ID NO:2具

有至少90％、或至少91％、或至少92％、或至少93％、或至少94％、或至少95％、或至少96％、或至少97％、或至少98％、或至少99％序列同一性的氨基酸序列，并且Fc区包含与SEQ ID NO:3具有至少90％、或至少91％、或至少92％、或至少93％、或至少94％、或至少95％、或至少96％、或至少97％、或至少98％、或至少99％序列同一性的氨基酸序列，其中Fc区包含选自由以下组成的组的一个取代或取代的组合:C11S、C14S和P23S。

[0202] 另一个实施例(实施例B)是根据实施例A的分离的抗体，其中Fc区进一步包含氨基酸取代C5S。

[0203] 在实施例A和B的变型中，抗体包含不含有取代T33W、S26D和Q27E中的任一个的轻链可变区。

[0204] 在实施例A和B的其他变型中，轻链可变区包含取代R28K。

[0205] 在实施例A和B的一些变型中，重链和轻链的CDR具有表4中所列出的序列。

[0206] 表4：

[0207]

CDR1 轻链	ISCRASQRVSSSTYSYMH（SEQ ID NO: 15）
CDR2 轻链	YASNLES（SEQ ID NO: 16）

[0208]

CDR3 轻链	QHSWEIPPT（SEQ ID NO: 17）
CDR1 重链	SYYMY（SEQ ID NO: 18）
CDR2 重链	EINPSNGDTNFNEKFKS（SEQ ID NO: 19）
CDR3 重链	SDGRNDMDS（SEQ ID NO: 20）

[0209] 在实施例A和B的又其他变型中，轻链可变区包含氨基酸序列ICRRASQRVSSSTYSYMH(SEQ ID NO:15)。在仍其他实施例中，轻链可变区包含氨基酸序列ICRRASQRVSSSTYSYMH(SEQ ID NO:15)以及氨基酸序列YASNLES(SEQ ID NO:16)和QHSWEIPPT(SEQ ID NO:17)中的一个或两个。

[0210] 在实施例A和B的一些变型中，轻链可变区包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列。在又其他实施例中，轻链可变区由SEQ ID NO:1的氨基酸组成。在一些实施例中，轻链基本上由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。在其他实施例中，轻链由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。在仍其他实施例中，轻链包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。在又其他实施例中，轻链基本上由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。在仍其他实施例中，轻链由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成。

[0211] 在实施例A和B的其他变型中，抗体包含不含有取代T30H、Y33W或S54N中的任一个的重链可变区。在实施例A和B的抗体的一些实施例中，轻链可变区不包含取代T33W、S26D和Q27E中的任一个。在实施例A和B的其他变型中，轻链可变区不包含取代T33W、S26D和Q27E中的任一个，并且重链可变区不包含取代T30H、Y33W或S54N中的任一个。

[0212] 在实施例A和B的又其他变型中，重链可变区包含取代K74R。在一个实施例中，重链可变区包含氨基酸序列SYYMY(SEQ ID NO:18)、EINPSNGDTNFNEKFKS(SEQ ID NO:19)和

SDGRNDMDS(SEQ ID NO:20)中的一个或任何组合。

[0213] 在另一个实施例中,重链可变区包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在又另一个实施例中,重链可变区基本上由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。在仍另一个实施例中,重链可变区由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。在一些实施例中,重链可变区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在又其他实施例中,重链可变区基本上由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成。在仍其他实施例中,重链可变区由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成。

[0214] 本文提供的一些实施例涉及分离的抗体,其中轻链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列,并且重链由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

[0215] 本文提供的一些实施例涉及分离的抗体,其中轻链由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成,并且重链由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

[0216] 本文提供的一些实施例涉及分离的抗体,其中轻链可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列,并且重链由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

[0217] 仍另一个实施例是分离的抗体,其中轻链由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成,并且重链由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

[0218] 又另一个实施例是分离的抗体,其中轻链由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成,并且重链由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成。

[0219] 另一个实施例是分离的抗体,其中轻链由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成,并且重链由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成。

[0220] 本文提供的一些实施例涉及以下枚举的替代方案。

[0221] 一种预测患有疾病或障碍的受试者对用针对CD40L或CD40的化合物治疗的反应的方法,该方法包括:收集来自该受试者的样品;测量该样品中存在的至少一种生物标记物的浓度,其中该至少一种生物标记物是NFL、MMP9、MMP3、IL6、IL18、IgA、TNFR2、TNFa、IL2ra、因子VIII、CRP、SAP、MCP1、En-Raged、MIG、vWF、IgE、IL8、IP10、C3和MMP2;其中该至少一种生物标记物的浓度预测该受试者可能对用针对CD40L或CD40的化合物对该疾病或障碍的治疗有反应。

[0222] 如替代方案1所述的方法,其中该疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。

[0223] 如替代方案2所述的方法,其中该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。

[0224] 如替代方案3所述的方法,其中该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。

[0225] 如替代方案1-4中任一项所述的方法,其中该受试者是哺乳动物和/或人。

[0226] 如替代方案1-5中任一项所述的方法,其中该化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。

[0227] 如替代方案1-6中任一项所述的方法,其中该化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。

[0228] 如替代方案1-7中任一项所述的方法,其中该化合物是替格鲁特。

[0229] 如替代方案1-8中任一项所述的方法,其中该化合物是MR1或5c8。

[0230] 一种治疗患有疾病或障碍的受试者的方法,该方法包括:施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,其中施用该治疗有效剂量将该受试者的血浆中的该化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

[0231] 如替代方案10所述的方法,其中该疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。

[0232] 如替代方案11所述的方法,其中该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。

[0233] 如替代方案12所述的方法,其中该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。

[0234] 如替代方案10-13中任一项所述的方法,其中该受试者是哺乳动物和/或人。

[0235] 如替代方案10-14中任一项所述的方法,其中该化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。

[0236] 如替代方案10-15中任一项所述的方法,其中该化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。

[0237] 如替代方案10-16中任一项所述的方法,其中该化合物是替格鲁特。

[0238] 如替代方案10-17中任一项所述的方法,其中该化合物是MR1或5c8。

[0239] 如替代方案10-18中任一项所述的方法,其中将该化合物每两周至少施用一次。

[0240] 如替代方案10-19中任一项所述的方法,其中将该化合物施用至少12周的时间段。

[0241] 如替代方案10-20中任一项所述的方法,其中将该化合物以在200mg/kg与100mg/kg之间的剂量、优选以在1mg/kg与8mg/kg之间的剂量、最优选以在2mg/kg与4mg/kg之间的剂量施用。

[0242] 如替代方案10-21中任一项所述的方法,该方法进一步包括施用第二药学上有效的化合物。

[0243] 如替代方案22所述的方法,其中该第二化合物阻断CD28与CD86之间或CD28与CD80之间的相互作用。

[0244] 如替代方案22所述的方法,其中该第二化合物靶向选自由以下组成的组的生物标记物中的至少一种:白介素、细胞因子和促炎标记物。

[0245] 如替代方案24所述的方法,其中该第二化合物靶向选自由以下组成的组的生物标记物中的至少一种:NFL、CXCL13、CD40L、CXCL9、TNF-α、En-Raged、TNFR2、IgM、IgA、Il2r、CXCL10、CD40、B2M、VCAM、Il-18、Il-16、SAP、MIP1β、MDC、C3、CRP、纤维蛋白原、IgE、ICAM、因子VIII、Ena-78、Pal1、Rantes、TIMP1、vWF、Il-6、MCP1、MMP3、MMP9和MMP2。

[0246] 如替代方案22所述的方法,其中该第二化合物是CTLA4-Ig融合蛋白、阿巴西普、贝拉西普或加利昔单抗。

[0247] 如替代方案10-26中任一项所述的方法,其中将该化合物口服、肠胃外或局部施用。

[0248] 如替代方案27所述的方法,其中将该化合物肠胃外施用。

[0249] 如替代方案28所述的方法,其中将该化合物通过注射,最优选静脉内、肌内或皮下注射施用。

[0250] 如替代方案1-29中任一项所述的方法,其中该疾病或障碍是选自由以下组成的组的炎性或免疫性疾病或障碍:结肠炎、药物诱导的狼疮肾炎、移植物抗宿主病、免疫移植物应答、移植排斥和动脉粥样硬化。

[0251] 如替代方案1-30中任一项所述的方法,其中该疾病或障碍是选自由以下组成的组的自身免疫性疾病:系统性红斑狼疮、1型糖尿病、重症肌无力、炎性肠病、免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎、银屑病、艾迪生病、克罗恩病、葡萄膜炎、多发性硬化、溶血性贫血和格雷夫斯病。

[0252] 如替代方案1-31中任一项所述的方法,其中靶向CD40L或CD40的该化合物是这样的抗体,该抗体包含:(a)重链可变区(V_H),该重链可变区包含:i)包含SEQ ID NO:9所示的序列的CDRH1结构域;ii)包含SEQ ID NO:10、11、12、13或14所示的序列的CDRH2结构域;和iii)包含SEQ ID NO:15所示的序列的CDRH3结构域;以及(b)轻链可变区(V_L),该轻链可变区包含:i)包含SEQ ID NO:16或17所示的序列的CDRL1结构域;ii)包含SEQ ID NO:18或19所示的序列的CDRL2结构域;和iii)包含SEQ ID NO:20所示的序列的CDRL3结构域。

[0253] 如替代方案1-32中任一项所述的方法,其中靶向CD40L或CD40的该化合物是这样的抗体,该抗体包含:(a)重链可变区(V_H),该重链可变区具有如SEQ ID NO:1、2、3或4所示的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区(V_L),该轻链可变区具有如SEQ ID NO:5、6、7或8所示的氨基酸序列。

[0254] 一种调节受试者中至少一种生物标记物的浓度的方法,该方法包括:向该受试者施用治疗有效量的针对CD40L或CD40的化合物,其中该至少一种生物标记物是NFL、CXCL13、CD40L、CXCL9、TNF-α、En-Raged、TNFR2、IgM、IgA、I12r、CXCL10、CD40、B2M、VCAM、Il-18、Il-16、SAP、MIP1β、MDC、C3、CRP、纤维蛋白原、IgE、ICAM、因子VIII、Ena-78、Pal1、Rantes、TIMP1、vWF、Il-6、MCP1、MMP3、MMP9、MCP1、MIG、vWF、Il-8、IP10或MMP2。

[0255] 如替代方案34所述的方法,其中该至少一种生物标记物的浓度在施用该化合物后增加。

[0256] 如替代方案34所述的方法,其中该至少一种生物标记物的浓度在施用该化合物后降低。

[0257] 如替代方案34所述的方法,其中在施用该化合物后,该至少一种生物标记物的浓度增加,并且至少一种其他生物标记物的浓度降低。

[0258] 如替代方案34-37中任一项所述的方法,其中该受试者患有疾病或障碍。

[0259] 如替代方案38所述的方法,其中该疾病或障碍是炎症、神经系统变性疾病或神经肌肉疾病。

[0260] 如替代方案39所述的方法,其中该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化、阿尔茨海默病、帕金森病、重症肌无力、多灶性运动神经病、原发性侧索硬化、脊髓性肌萎缩、肯尼迪病或脊髓小脑性共济失调。

[0261] 如替代方案40所述的方法,其中该神经系统变性疾病或神经肌肉疾病是肌萎缩侧索硬化(ALS)。

[0262] 如替代方案34-41中任一项所述的方法,其中该受试者是哺乳动物和/或人。

[0263] 如替代方案34-42中任一项所述的方法,其中该化合物阻断CD40与CD40L的相互作用。

[0264] 如替代方案34-43中任一项所述的方法,其中该化合物是抗CD40L抗体或抗CD40抗体。

[0265] 如替代方案34-44中任一项所述的方法,其中该化合物是替格鲁特。

[0266] 如替代方案34-45中任一项所述的方法,其中该化合物是MR1或5c8。

[0267] 如替代方案34-46中任一项所述的方法,其中施用该治疗有效剂量将该受试者的血浆中的该化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

[0268] 如替代方案34-47中任一项所述的方法,其中将该化合物每两周至少施用一次。

[0269] 如替代方案34-48中任一项所述的方法,其中将该化合物施用至少12周的时间段。

[0270] 如替代方案34-49中任一项所述的方法,其中将该化合物以在200mg/kg与100mg/kg之间的剂量、优选以在1mg/kg与8mg/kg之间的剂量、最优选以在2mg/kg与4mg/kg之间的剂量施用。

[0271] 如替代方案34-50中任一项所述的方法,其中将该化合物口服、肠胃外或局部施用。

[0272] 如替代方案51所述的方法,其中将该化合物肠胃外施用。

[0273] 如替代方案52所述的方法,其中将该化合物通过注射,最优选静脉内、肌内或皮下注射施用。

[0274] 如替代方案34-53中任一项所述的方法,其中该疾病或障碍是选自由以下组成的组的炎性或免疫性疾病或障碍:结肠炎、药物诱导的狼疮肾炎、移植物抗宿主病、免疫移植物应答、移植排斥和动脉粥样硬化。

[0275] 如替代方案34-54中任一项所述的方法,其中该疾病或障碍是选自由以下组成的组的自身免疫性疾病:系统性红斑狼疮、1型糖尿病、重症肌无力、炎性肠病、免疫性血小板减少性紫癜、类风湿性关节炎、银屑病、艾迪生病、克罗恩病、葡萄膜炎、多发性硬化、溶血性贫血和格雷夫斯病。

[0276] 如替代方案34-55中任一项所述的方法,其中靶向CD40L或CD40的该化合物是这样的抗体,该抗体包含:(a)重链可变区(V_H),该重链可变区包含:i)包含SEQ ID NO:9所示的序列的CDRH1结构域;ii)包含SEQ ID NO:10、11、12、13或14所示的序列的CDRH2结构域;和iii)包含SEQ ID NO:15所示的序列的CDRH3结构域;以及(b)轻链可变区(V_L),该轻链可变区包含:i)包含SEQ ID NO:16或17所示的序列的CDRL1结构域;ii)包含SEQ ID NO:18或19所示的序列的CDRL2结构域;和iii)包含SEQ ID NO:20所示的序列的CDRL3结构域。

[0277] 如替代方案34-56中任一项所述的方法,其中靶向CD40L或CD40的该化合物是这样的抗体,该抗体包含:(a)重链可变区(V_H),该重链可变区具有如SEQ ID NO:1、2、3或4所示的氨基酸序列;以及(b)轻链可变区(V_L),该轻链可变区具有如SEQ ID NO:5、6、7或8所示的氨基酸序列。

[0278] 一种维持或改善患有ALS的受试者的ALS-FRS得分的方法,该方法包括:施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,其中施用该治疗有效剂量将该受试者的血浆中的该化合物维持在5μg/mL与100μg/mL之间的浓度;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

[0279] 一种对患有疾病或障碍的受试者进行预筛选并用针对CD40L或CD40的化合物治疗该受试者的方法,该方法包括:收集来自该受试者的样品;检测流体中存在的至少一种生物

标记物的浓度,其中该至少一种生物标记物是NFL、MMP9、MMP3、IL6、IL18、IgA、TNFR2、TNFa、IL2ra、因子VIII、CRP、SAP、MCP1、En-Raged、MIG、vWF、IgE、IL8、IP10、C3或MMP2;针对未患有该疾病或障碍的受试者中该至少一种生物标记物的浓度对该至少一种生物标记物的浓度进行筛选;以及施用治疗有效剂量的针对CD40L或CD40的化合物,使得将该受试者的血浆中该化合物的浓度维持在5μg/mL与100μg/mL之间的剂量;优选在30μg/mL与60μg/mL之间的剂量。

[0280] 如替代方案59所述的方法,其中如果该受试者中该至少一种生物标记物的浓度显著不同于未患有该疾病或障碍的受试者中该至少一种生物标记物的浓度,则向该受试者施用该化合物。

[0281] 实例

[0282] 本文提供的实施例在以下实例中进一步定义。应当理解的是,这些实例仅通过说明的方式给出。根据上文的讨论和这些实例,本领域技术人员可以确定本披露的本质特征,并且在不违背其精神和范围的情况下,可以做出本披露的实施例的各种变化和修饰以使其适应各种用途和条件。因此,除了本文显示和描述的那些修改之外,实施例的各种修改将根据前述描述而对本领域的技术人员变得清楚。这样的修改也旨在落入所附权利要求的范围内。将本文所示的每个参考文献的披露内容都通过援引以其全文并入本文,并且用于本文引用的披露内容。

[0283] 实例1

[0284] 临床研究设计

[0285] 在临床试验中评估靶向CD40L或CD40的化合物的有效性。总共涉及54名人类受试者;这些受试者是基于阳性ALS诊断,或通过实验室支持的修订版El Escorial标准得出的可能的、很可能的或确定的诊断而选出的。每名受试者还具有35或更高的ALSFRS-R总得分,并且自他们初次诊断以来不超过24个月。此外,为试验选择的每名受试者进行了气管造口术,或者使用永久性辅助通气系统。所选受试者的人口统计学如表5所示。

[0286] 表5:

[0287]

	1 mg/kg (N = 9)	2 mg/kg(N = 9)	4 mg/kg (N = 18)	8 mg/kg (N = 18)	所有受试者 (N = 54)
年龄平均值 (岁)	61.2	59.0	56.4	60.3	59.0
年龄 < 65 岁	7 (77.8%)	6 (66.7%)	15 (83.3%)	11 (61.1%)	39 (72.2%)
性别 - 男性	6 (66.7%)	7 (77.8%)	12 (66.7%)	10 (55.6%)	35 (64.8%)

[0288]

种族 - 西班牙裔/拉丁裔	0	0	0	3（16.7%）	3（5.6%）
人种 - 白种人	9（100%）	8（88.9%）	17（94.4%）	18（100%）	52（96.3%）
人种 - 亚洲人	0	1（11.1%）	1（5.6%）	0	2（3.7%）
BMI 平均值	26.2	27.6	25.1	26.0	26.0
ALSFRS-R（筛选）平均值（最小值，最大值）	41.1（38，46）	40.2（38，43）	39.7（35，47）	39.2（35，45）	39.9（35，47）
ALSFRS-R（基线）平均值（最小值，最大值） **ALSFRS-R <= 34***	40.4 （38，46） 0（0%）	40.0 （37，43） 0（0%）	39.6 （34，47） 1（3%）	38.6 （29，47） 3（17%）	39.5 （29，47） 4（7%）
ALS 延髓域 <= 4（基线）	0（0%）	0（0%）	2（11%）	4（22%）	6（11%）

[0289] 有以下四个给药队列:1mg/kg(n＝9)、2mg/kg(n＝9)、4mg/kg(n＝18)、8mg/kg(n＝18)。如图22示意性概述,在第一次给药化合物前-28天或-4天时,从每名受试者收集两个血液生物样品作为基线数据。在第0天,再收集两个后续生物样品。这些生物样品由用于分析pK/ADA的1个血浆样品和用于分析生物标记物水平的1个血浆样品组成。

[0290] 在生物样品收集后,每名受试者立即接受1mg/kg、2mg/kg、4mg/kg或8mg/kg的化合物AT-1501(也称为替格鲁特)的静脉内输注。将收集血浆生物样品、然后以设定剂量施用AT-1501的这种模式每14天重复一次,持续总共101天。在第0天、第15天、第29天、第43天、第57天和第71天给予输注。输注后两小时,再收集两个生物样品。

[0291] 在剂量试验完成后,所分析的终点包括:安全性和耐受性,药代动力学,和抗药物抗体水平,CD40L靶标接合,促炎标记物的变化,以及ALSFRS-R、呼吸功能和神经丝轻链(NFL)水平的变化。

[0292] 安全性

[0293] 超过90％的受试者完成了临床试验,如表6中所总结。一名受试者(在表格中标注在“其他”下)在筛选时合格,但是未接受剂量,并且改为由另一名参与者替代。

[0294] 表6:

[0295]

	1 mg/kg(N = 9)	2 mg/kg (N = 9)	4 mg/kg (N = 18)	8 mg/kg (N = 18)	所有受试者 (N = 54)
筛选					70
招募					55
筛选失败					15
治疗	9	9	18	18	54
按方案	9 (100%)	8 (88.9%)	18 (100%)	17 (94.4%)	52 (96%)
完成	8 (88.9%)	7 (77.8%)	18 (100%)	16 (88.9%)	49 (90.7%)
停止	1 (11.1%)	2 (22.2%)	0	2 (11.1%)	5 (9.3%)
D/C 的原因					
AE	1 (11.1%)	1 (11.1%)	0	0	2 (3.7%)
撤回同意书	0	0	0	2 (11.1%)	2 (3.7%)
其他	0	1 (11.1%)	0	0	1 (1.9%)

[0296] 通过在临床试验的过程中对受试者的治疗中出现的不良事件(TEAE)的数量进行计数来评估AT-1501的安全性。结果如表7所总结。总的来说,替格鲁特是良好耐受的,没有治疗相关的严重不良事件,也没有任何显著的抗药物抗体应答。

[0297] 表7:

[0298]

	1 mg/kg(N = 9)	2 mg/kg (N = 9)	4 mg/kg (N = 18)	8 mg/kg (N = 18)	所有受试者(N = 54)
TEAE 的数量	30	66	54	67	217

[0299]

具有至少一例 TEAE 的受试者的数量	8（88.9%）	8（88.9%）	10（55.6%）	16（88.9%）	42（77.8%）
严重 TEAE 的数量	0	1	0	0	1
具有至少一例严重 TEAE 的受试者的数量	0	1（11.1%）	0	0	1（1.9%）
具有相关 TEAE 的受试者的数量	3（33.3%）	5（55.6%）	4（22.2%）	7（38.9%）	19（35.2%）
具有严重相关 TEAE 的受试者的数量	0	0	0	0	0

[0300] 不良反应的具体症状和自报告这些症状的那些受试者的百分比如表8所总结。

[0301] 表8：

[0302]

所报告的症状	**受试者的数量（%）**
疲劳	25.9
跌倒	22.2
头痛	20
肌肉痉挛	11.1
关节痛	9.3
头晕	9.3
呼吸困难	9.3
肌无力	9.3
挫伤	7.4
抑郁	7.4
恶心	7.4

[0303]

血压升高	5.6
感觉减退	5.6
肌肉僵硬	5.6
鼻咽炎	5.6
颈部疼痛	5.6

[0304] 实例2

[0305] 药代动力学和抗药物抗体浓度

[0306] 如实例1所讨论,在通过输注给药前和给药后两小时从受试者收集血浆生物样品。在临床试验的第0天、第15天、第29天、第43天、第57天和第71天进行输注。使用这些生物样品来部分地评估血液中存在的AT-1501药物水平的浓度。图23所示为每名受试者的血浆中AT-1501的水平随时间的叠加。根据此分析,AT-1501的半衰期被确定为超过14天。因此,受试者的暴露水平随时间增加,因此未达到稳态。

[0307] 此外,不存在中和ADA的证据。7名受试者的215个样品中存在九种ADA(图24A-图24I)。当受试者不再使用测试品时,在第14周检测到这九种ADA中的四种。一名受试者(102201)在试验前具有预先存在的ADA滴度。呈ADA阳性的受试者和出现时间如表9所示。所有九种ADA都具有非常低的滴度,并且在测定中处于检测截止点。这些ADA是非中和性的,并且不影响向这些受试者给予的药物替格鲁特(AT-1501)的水平。

[0308] 表9:

[0309]

受试者 ID	**剂量(mg/kg)**	**周**	**连续稀释**
103202	1	14	2
108204	1	14	2
104202	1	14	4
104203	2	6	2

[0310]

110202	4	14	4
110204	8	4	4
102201	2	2	1
102201	2	4	1
102201	2	6	1

[0311] 实例3

[0312] 通用生物标记物分析

[0313] 还评估了在临床试验期间从受试者收集的每个生物样品的分子生物标记物的变化。这些标记物包括用作CD40L靶标接合的量度的那些标记物(CXCL13、IgA和CD40L)以及用作炎症的量度的那些标记物(TNF-α、IL-6、En-Raged、MCP-1、IL-1、IL1-β和CRP)。采用以下两种分析方法来检查生物标记物变化:(1)计算回归模型并且绘制所有受试者的所有分析物,以及(2)归一化数据,然后计算生物标记物随时间的倍数变化且并且针对错误发现率进行校正。

[0314] 在分析前,进行数据预处理以去除异常值,诸如在延髓子域中得分小于4的受试者以及在第0天ALSFRS小于35的受试者。作为异常值去除的受试者如表10所总结。

[0315] 表10:

[0316]

受试者:	109202	111203	103204	103205	107202	114203	114205
剂量:	4 mg/kg	4 mg/kg	8 mg/kg	8 mg/kg	8 mg/kg	8 mg/kg	8 mg/kg
基线得分:	延髓 <= 4	延髓 <= 4 并且总计 <= 34	延髓 <= 4 并且总计 <= 34	总计 <= 34	延髓 <= 4	延髓 <= 4 并且总计 <= 34	延髓 <= 4

[0317] 此外,过滤具有稀少阳性信号的蛋白质。这些蛋白质包括:AFP、CA-125、CA-19-9、嗜酸性粒细胞趋化因子-1、EPO、G-CSF、GH、GM-CSF、hCG、INFg、IL1-a、IL1-b、IL10、IL12-p40、IL12-p70、IL-13、IL-17、IL1-ra、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6(Luminex)、IL-7、MCP-2、MICA、MIP1-A、PSA-F、SCF和TNFa(Luminex)。

[0318] 在分析后,发现在替格鲁特治疗后,显著数量的蛋白质下调(图25)。蛋白质的增加或下调的程度是剂量依赖性的。

[0319] 靶标接合的生物标记物

[0320] 通过监测受试者的CXCL13、CD40L和CD40的水平来评估AT-1501对CD40L和CD40的接合。AT-1501暴露以剂量依赖性方式使所有三种蛋白质水平降低(图26A、图26B、图27A、图27B、图28A和图28B)。在4mg/kg和8mg/kg剂量下,降低是统计学上显著的。到向患者给药AT-1501的第二天达到最大的降低。这证明,CD40L/CD40的靶标在治疗后显著接合。

[0321] 促炎细胞因子生物标记物

[0322] 还评估了在用AT-1501治疗受试者后促炎标记物和其他相关应激蛋白的水平的浓度变化。在所评估的那些中,CD40L、CXCL13、CXCL9、TNF-α、En-Raged、TNFR2、IgM、IgA、IL2r、CXCL10、CD40和B2M在AT-1501治疗后具有最高的蛋白质浓度降低(图29A-图29L)。还检测到蛋白质VCAM、IL-18、IL-16、SAP、MIP1-β、MDC、C3、CRP、血纤蛋白原、IgE、ICAM和MCP1的浓度的显著降低(图30A-图30L)。在受试者暴露于AT-1501后,几种蛋白质的浓度增加;这些蛋白质包括IL-6、ENA-78、RANTES、MMP3和MMP9(图31A-图31E)。总的来说,用AT-1501治疗受试者使超过50%的与炎症和共刺激信号传导相关的所检查的蛋白质的表达降低。

[0323] 还在第12周评估了神经丝轻链(NFL)水平的浓度(图32)。在任何剂量下NFL浓度都

没有统计学上显著的变化。然而,招募时的NFL水平确实与进展速率相关。

[0324] 实例4

[0325] ALS功能评定量表

[0326] 在临床试验期间每两周,由临床医生评估受试者的ALS功能评定量表(ALS-FRS)的变化。绘制所有受试者随时间的ALS-FRS得分的变化;总的来说,每个队列以与未经治疗的患者的一般速率相当的速率恶化,如数据库Pro-ACT所提供(图33A)。

[0327] 接下来,修正数据以排除在十二周时不再符合初始招募标准的患者(图33B)。虽然这降低了每组的总误差,但是ALS-FRS得分的总体趋势与未经治疗的患者的速率强烈相关。

[0328] 进一步修正数据以排除具有治疗相关反应(TE)的患者(图33C)。这主要降低了给予低水平AT-1501的受试者的FRS的下降,但是对较高剂量队列没有显著影响。

[0329] 最后,修正数据以仅包括显现对用AT-1501的治疗反应最佳的那些患者(下文称为“反应者”)(图33D)。这使数据最显著地改变,其中与未经治疗的受试者相比,经治疗的受试者(尤其是4mg/kg剂量队列中的那些受试者)的ALS-FRS得分的下降降低。

[0330] 按剂量组的人类受试者的ALS-FRS每月变化的总体斜率如表11所示。这些列是:“所有”(不排除患者)、“EC”(排除不符合招募标准的那些患者)、“TE”(排除具有治疗相关不良反应的那些患者)和“Res”(仅包括对药物治疗呈阳性反应的那些患者)。“Pro-Act”行表示取自Pro-ACT数据库的未经治疗的患者的ALS-FRS数据。

[0331] 表11:

[0332]

组	所有	EC	EC/TE	Res
1mg/kg	-0.83	-0.83	-063	-0.63
2mg/kg	-0.94	-0.94	-0.75	-0.75
4mg/kg	-0.5	-0.48	-0.48	-0.36
8mg/kg	-1.79	-0.93	-0.93	-0.88
ProAct	-0.83	-0.83	-0.83	-0.83

[0333] 反应者与无反应者

[0334] 为什么一些患者显现对AT-1501反应良好(称为“反应者”),而其他患者则不呢(称为“无反应者”)?为了回答此问题,绘制每个个体随时间的ALS-FRS得分。这些个体中的16名(8名反应者和8名无反应者)的ALS-FRS得分值如表12所示,并且以图形式绘制于图34中。

[0335] 表12:

[0336]

剂量	受试者	筛选值	基线值	第3周	第5周	第7周	第9周	第11周	总变化
反应者									
1.0 mg/kg	105206	46	46	46	47	46	46	46	0
2.0 mg/kg	105209	41	41	41	41	41	41	41	0
4.0 mg/kg	104205	47	47	47	47	47	47	47	0
4.0 mg/kg	106201	43	43	43	43	43	43	43	0
4.0 mg/kg	109203	45	46	46	45	45	45	45	0
4.0 mg/kg	111204	41	45	40	44	44	42	41	0
4.0 mg/kg	115205	35	36	38	37	37	36	35	0
8.0 mg/kg	104211	41	41	41	41	40	41	41	0
无反应者									
1.0 mg/kg	108202	41	41	37	37	37	37	34	-7
2.0 mg/kg	102201	42	42	37	32	32	30	34	-8
4.0 mg/kg	105211	35	35	32	31	31	29	29	-6
4.0 mg/kg	112201	38	38	37	40	37	24	31	-7
4.0 mg/kg	115203	39	39	36	34	31	32	33	-6
8.0 mg/kg	103204	35	29	28	28	24	24	18	-17

[0337]

8.0 mg/kg	107202	37	35	34	31	26	27	20	-17
8.0 mg/kg	114203	35	34	34	34	29	28	26	-9

[0338] 如可以在图34和上表中观察到的,“反应者”亚组的ALS-FRS从基线到第12周没有显著变化。另一方面,“无反应者”以与未经治疗的患者一致的速率下降。这表明,“无反应者”组没有从AT-1501获得可检测的益处,而“反应者”组在用AT-1501治疗后获得了对ALS-FRS得分的下降的显著抵抗。

[0339] 接下来,通过多重线性回归分析来比较用AT-1501治疗前每名受试者的蛋白质浓度(基线值)。如图35和表13-表14所示,有几种蛋白质在以下受试者的血浆中以显著更高的

浓度存在,这些受试者随后对用AT-1501的治疗具有阳性反应。表13示出了在基线血浆水平下每种蛋白质的平均蛋白质浓度差异的F统计量和p值,如针对强度归一化。还使用线性回归来分析基线时每种蛋白质的差异作为ALS-FRS变化的斜率的预测因子;这些值如表14所示。其中,最显著的是NFL的初始浓度(由于标度差异未在图35中示出),其具有几乎50点F统计量。此外,最显著的初始蛋白质浓度包括MMP9、MMP3、I12ra、TNF-α和IL-18。

[0340] 表13:

[0341]

蛋白质	F 统计量	p 值
MMP3	90.02	2.2E-16
TNFa	35.11	7.206E-09
IL18	34.64	8.961E-09
SAP	33.28	1.70E-07
NFL	26.18	5.04E-07
MCP1	14.38	0.0001751
Enraged	14	0.0002119
MIG	8.559	0.003652

[0342]

vWF	8.065	0.004765
IgE	7.634	0.006016
MMP9	5.981	0.01493
IL8	5.969	0.01503
IP10	5.926	0.0154
C3	5.65	0.0197
MMP2	5.002	0.02591

[0343] 表14:

[0344]

蛋白质	F统计量	p值
NFL	44.08	1.41E-10
MMP9	10.77	0.00113
MMP3	10.76	0.001138

IL6	9.978	0.001716
IL18	9.746	0.00194
IgA	9.537	0.002167
TNFR2	7.211	0.007575
TNFa	7.077	0.01629
IL2ra	5.651	0.01796
因子VIII	5.302	0.02186
CRP	4.108	0.0434

[0345] 如图35和表12-表13所示,在任何治疗前,无反应者与反应者之间的蛋白质标记物表达有统计学上显著的差异。这些蛋白质水平都不与协变量(诸如种族、性别、年龄或治疗时间)显著相关。

[0346] 这一发现是极其有意义的,因为早期评估ALS患者的血浆中这些蛋白质的浓度可以充当这些患者对AT-1501治疗的反应性的预测因子。也就是说,如果个体具有与反应者队列相对应的浓度的生物标记物,则他们可能从用靶向CD40L/CD40的化合物的治疗中显著受益。

[0347] 总结

[0348] 总的来说,替格鲁特展示出良好的安全特性,具有线性pK和剂量比例性与低的ADA发生率。此外,替格鲁特展示出靶标接合与T细胞标记物CD40L和B细胞标记物CXCL13、IgA和IgE的剂量依赖性降低以及随着剂量递增而增加的患者应答。替格鲁特还以剂量依赖性方式使4种前瞻性地选择的促炎标记物中的3种TNFa、MCP1和En-Raged降低,患者反应增加。IL1b低于多重ELISA中的检测限,并且IL6不被替格鲁特下调。

[0349] 替格鲁特使所测定的32种促炎蛋白中的23种的表达降低,清楚地证明了已经被描述在多种自身免疫和移植的临床前模型中抑制CD40L的促炎信号传导的下游调节。促炎信号传导的降低趋向于疾病进展的改善,如通过ALS FRS所测量。线性回归鉴定出与ALSFRS随时间的变化相关的几种蛋白质。

[0350] 同样,本申请中报道的发现表明,ALS患者的血浆中选定蛋白质的早期定量可以充当这些患者对用靶向CD40L/CD40的化合物的治疗的反应性的预测因子。

[0351] 如本文所用,章节标题仅出于组织目的,并不应被解释为以任何方式限制所描述的主题。将本申请中所引用的所有文献和类似材料(包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、论文和互联网网页)都出于任何目的通过援引以其全文明确地并入,包括本文具体引用的披露内容。当并入的参考文献中术语的定义显现不同于本教导中提供的定义时,应以本教导中提供的定义为准。将理解,在本教导中所讨论的温度、浓度、时间等之前存在隐含的“约”,使得轻微的和非实质性的偏差在本文的教导的范围内。

[0352] 尽管已经在某些实施例和实例的背景下披露了本披露,但是本领域技术人员将理解的是,本披露延伸超出具体披露的实施例,延伸到其他替代性实施例和/或实施例的用途及其明显的修改和等效物。此外,虽然已经详细显示并描述了本披露的几种变化,但是基于本披露的其他修改(其在本披露的范围内)对于本领域技术人员而言将容易变得清楚。还考虑到可以对实施例的特定特征和方面做出各种组合或子组合,并且这些组合或子组合仍落在实施例的范围内。应当理解的是,所披露的实施例的各种特征和方面可以相互组合或替

换以便形成不同模式或实施例。因此,意图是本披露的范围不应当受上述具体披露的实施例的限制。

[0353] 然而,应当理解的是,此具体实施方式虽然指示优选实施例但仅以说明的方式给出,因为本披露的精神和范围内的各种变化和修改对于本领域技术人员而言将变得清楚。

[0354] 本文呈现的说明书中使用的术语不旨在以任何受限方式或限制性方式进行解释。相反,术语仅结合对系统、方法和相关组分的实施例的详细描述加以利用。此外,实施例可以包括几种新型特征,其中没有单独一个特征单独负责其所需属性或被认为是实践实施例所必需的。

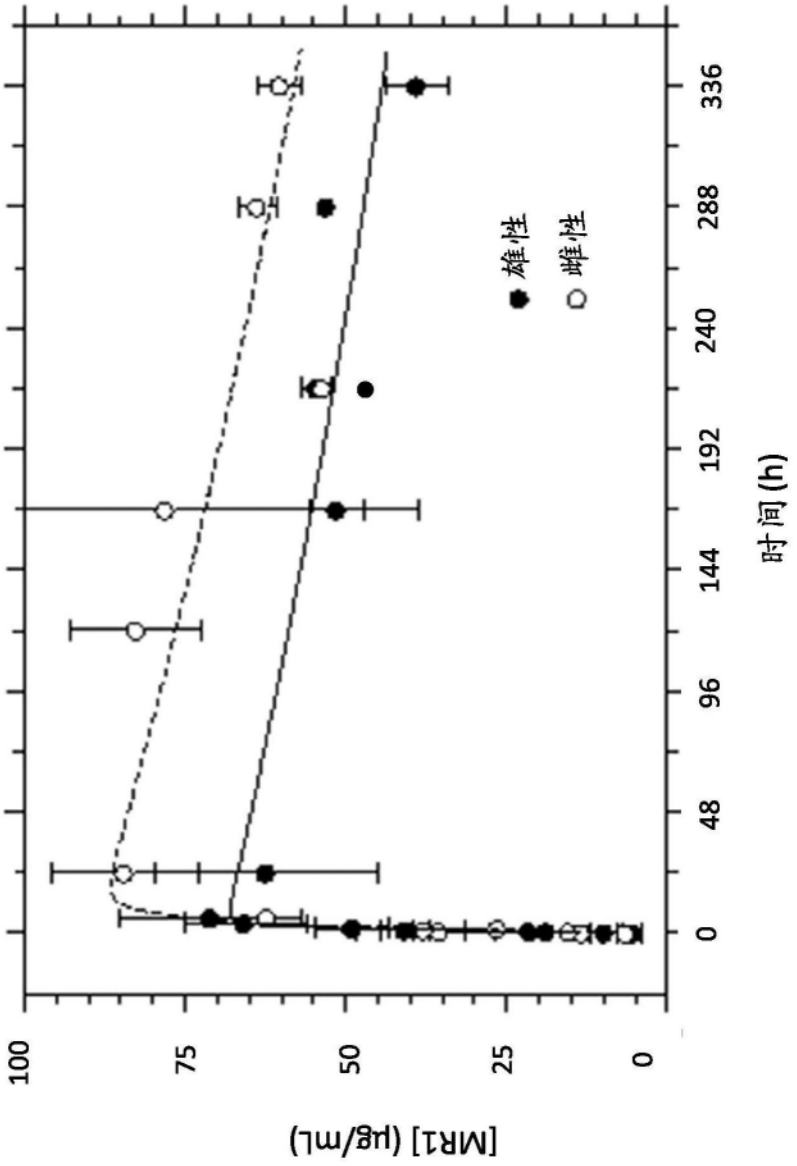


图1A

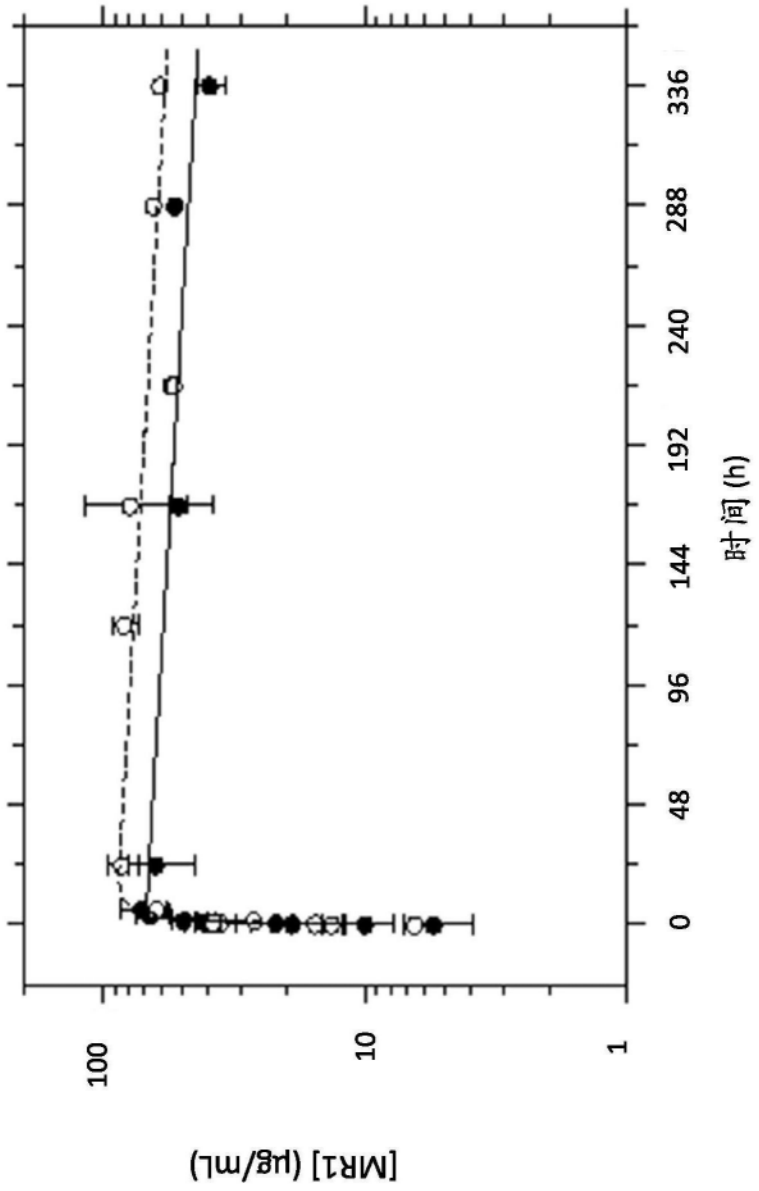


图1B

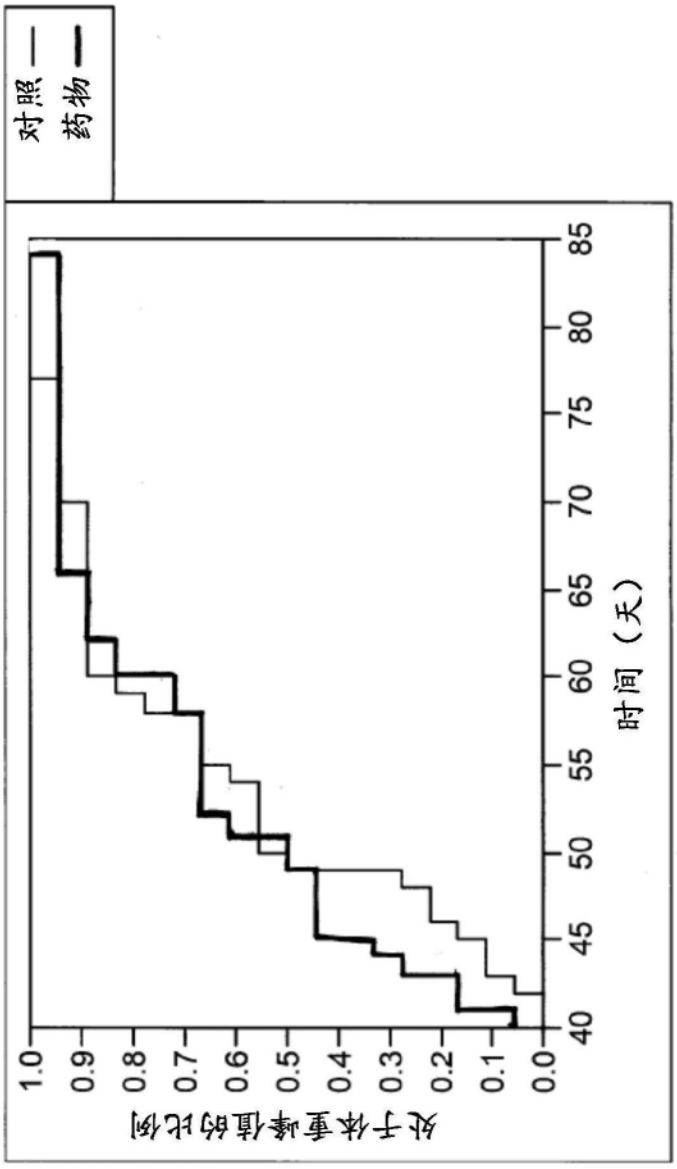

对照
药物
处于体重峰值的比例
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
40
45
50
55
60
65
70
75
80
85
时间（天）

图2

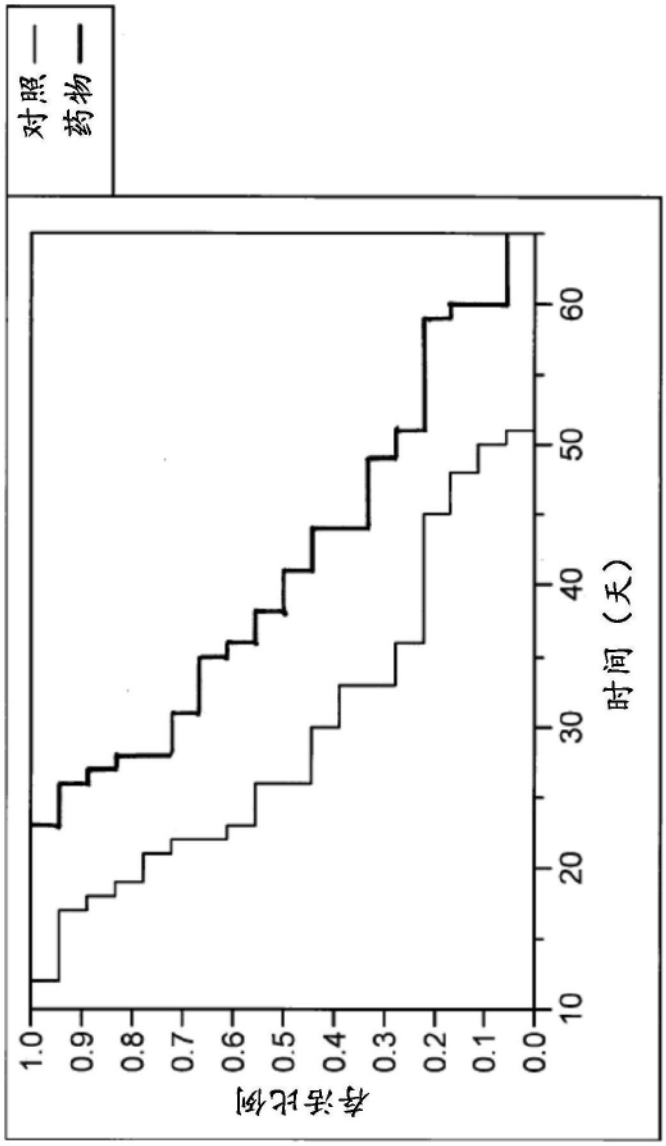


图3

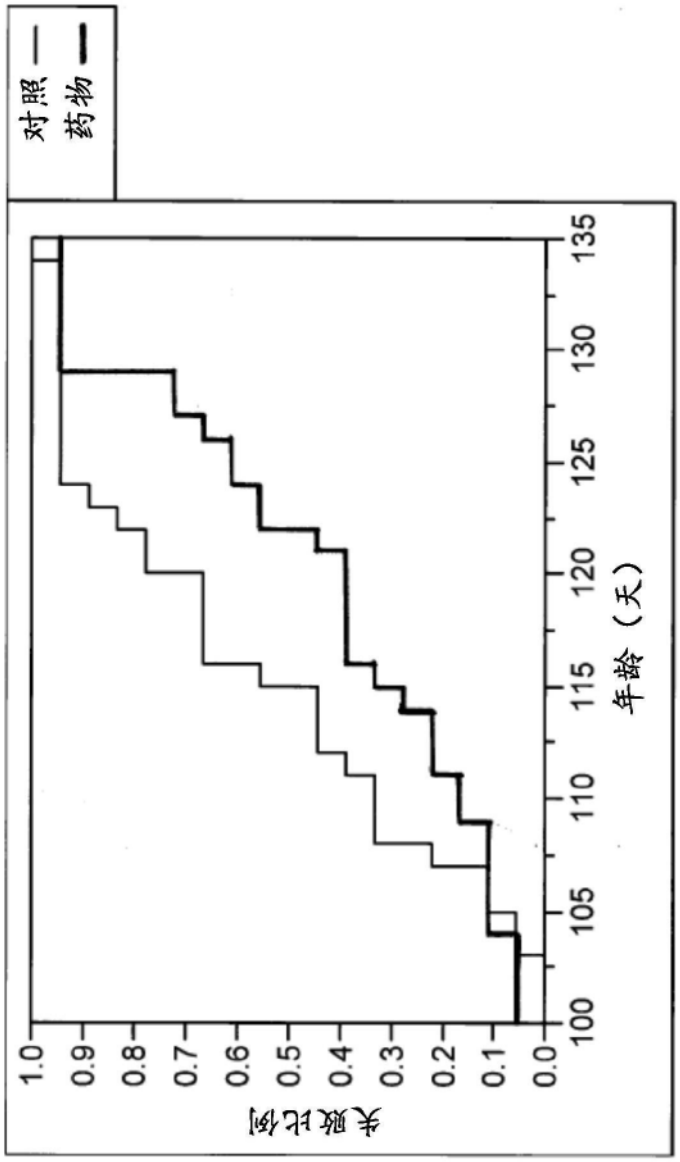

对照
药物
失败比例
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
100
105
110
115
120
125
130
135
年龄（天）

图4

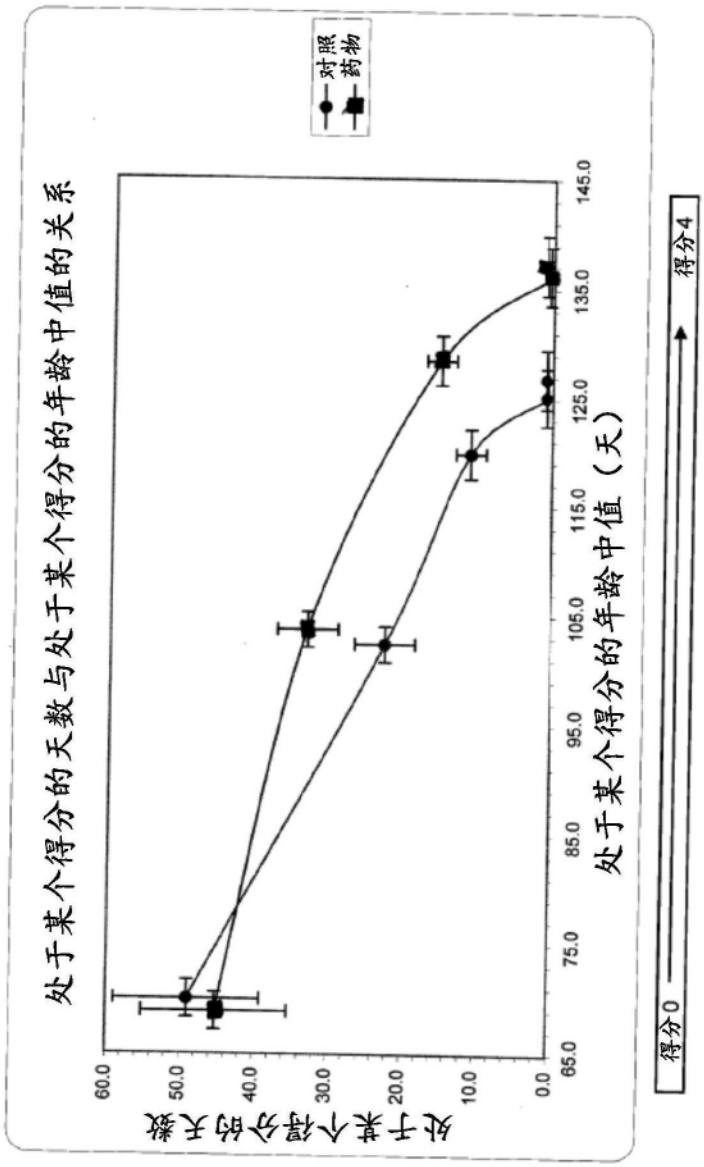

处于某个得分的天数与处于某个得分的年龄中值的关系
对照
药物
处于某个得分的天数
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
65.0
75.0
85.0
95.0
105.0
115.0
125.0
135.0
145.0
处于某个得分的年龄中值（天）
得分0
得分4

图5

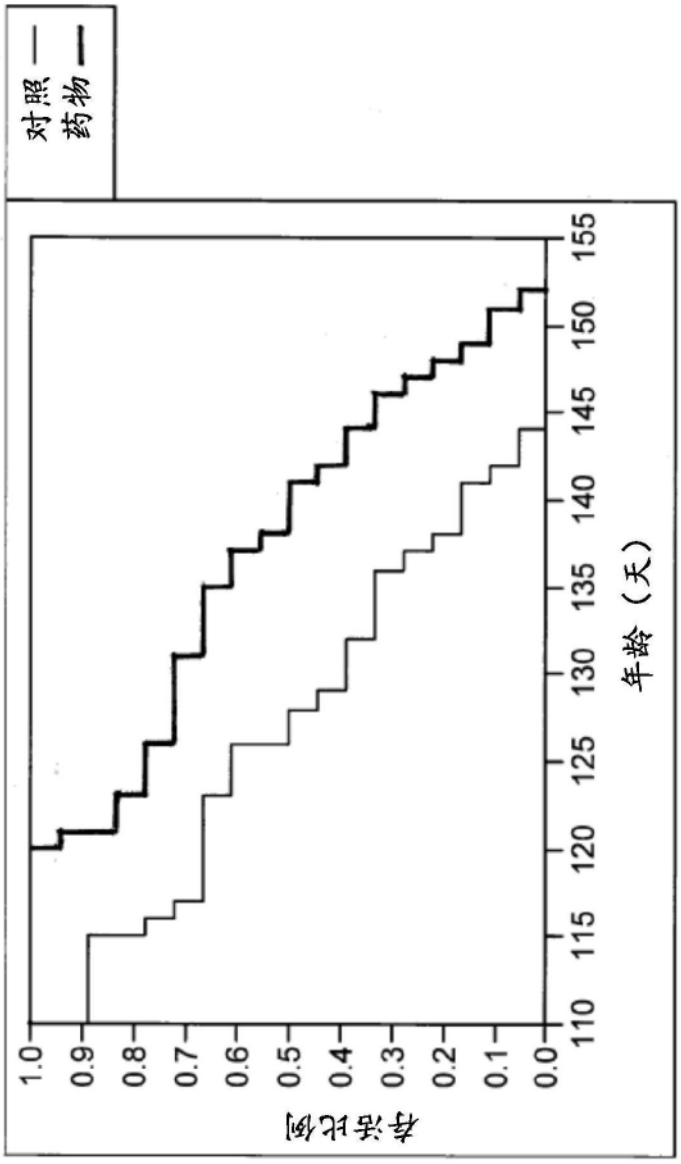

对照
药物
存活比例
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
110
115
120
125
130
135
140
145
150
155
年龄（天）

图6

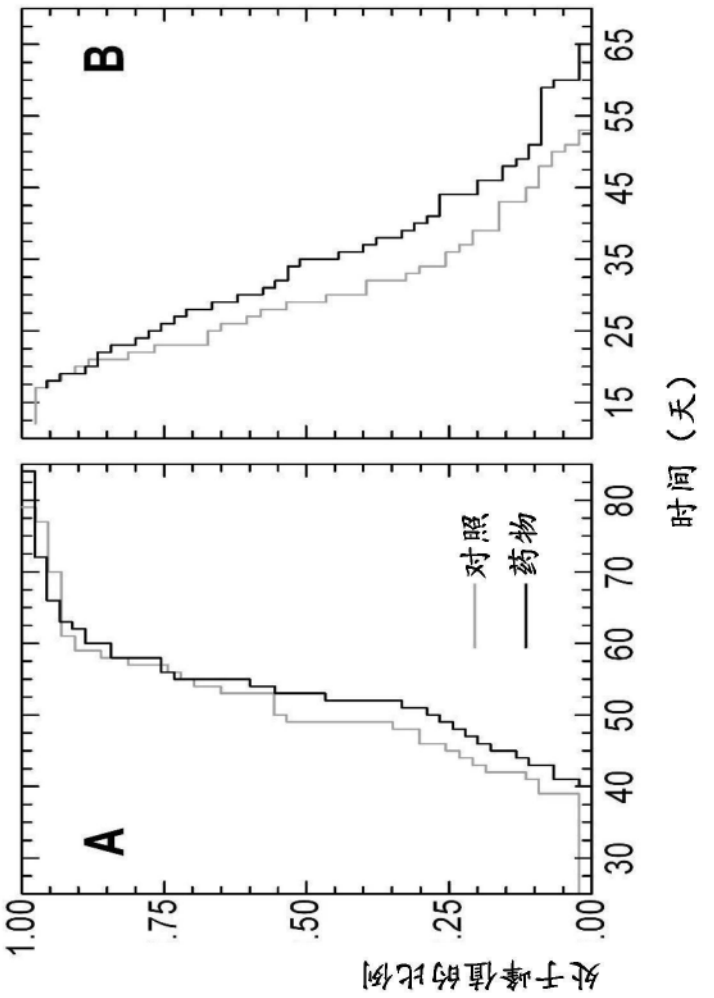


图 7A 图 7B

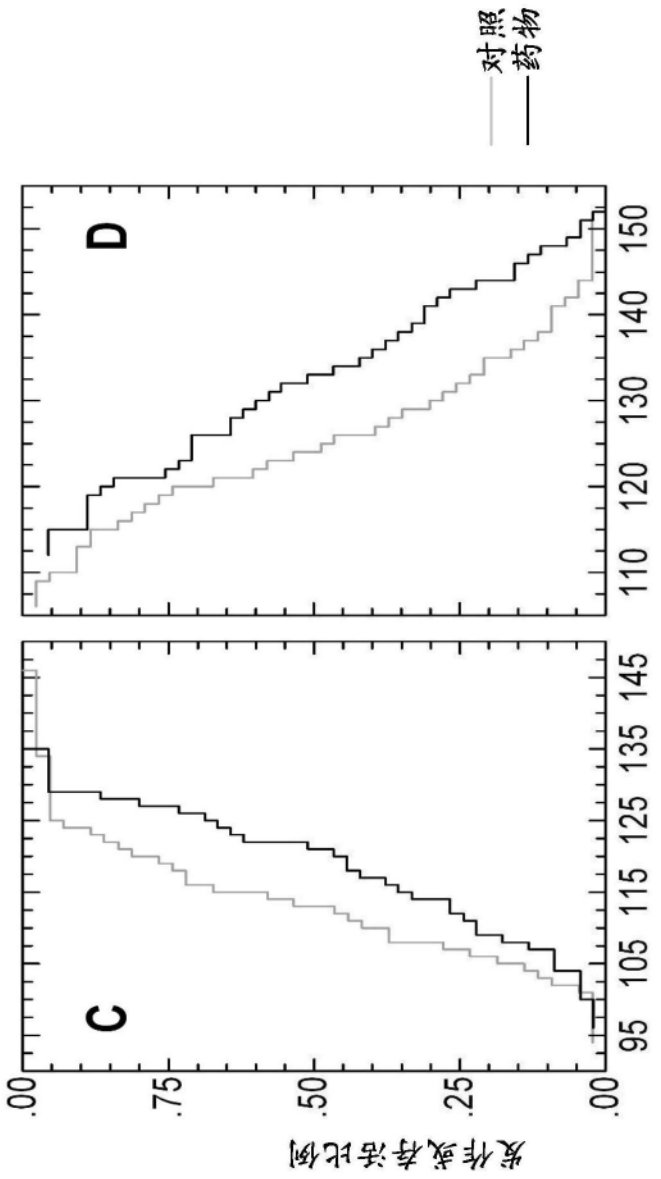

对照
药物
C
D
.00
.25
.50
.75
.00
95 105 115 125 135 145
110 120 130 140 150
年龄（天）
发作或存活比例

图 7C 图 7D

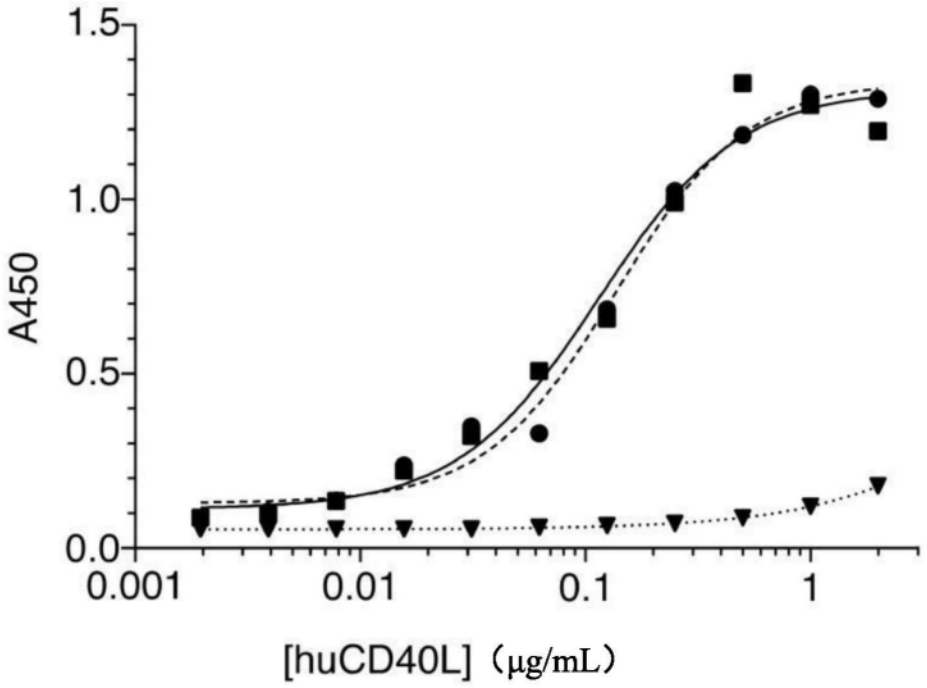


图8

SEQ ID NO:	描述	序列
1	hu5c8 和 JB5 VL 区	DIVLTQSPATLSVSPGERATISCRASQRVSSSTYSYMHWYQQKPGQPPKL LIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFATYYCQHSWEIPP TFGGGTKLEIK
2	hu5c8 和 JB5 VH 区	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYYMYWVKQAPGQGLEWIGE INPSNGDTNFNEKFKSKATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSD GRNDMDSWGQGTLVTVSS
3	Fc 区	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	JB5 Fc 区	EPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	JB5-R28K VL 区	DIVLTQSPATLSVSPGERATISCRASQKVSSSTYSYMHWYQQKPGQPPKL LIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFATYYCQHSWEIPP TFGGGTKLEIK
6	JB5-K74R VH 区	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYYMYWVKQAPGQGLEWIGE INPSNGDTNFNEKFKSKATLTVDRSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSD GRNDMDSWGQGTLVTVSS
7	JB5 轻链氨基酸序列	DIVLTQSPATLSVSPGERATISCRASQRVSSSTYSYMHWYQQKPGQPPKL LIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFATYYCQHSWEIPP TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

图9

SEQ ID NO:	描述	序列
8	JB 轻链核苷酸序列	GACATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGA GAGGGCCACCATCTCCTGCAGGGCCTCCCAGAGGGTGTCCTCCTCCACCT ACTCCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCCAAGCTG CTGATCAAGTACGCCTCCAACCTGGAGTCCGGCGTGCCCGCCAGGTTCTC CGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCGTGGAGC CCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCACTCCTGGGAGATCCCCCCC ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGgaaatcaaaCGTACGGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGTTAGTGA
9	JB5 重链氨基酸序列	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYYMYWVKQAPGQGLEWIGE INPSNGDTNFNEKFKSKATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSD GRNDMDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图10

SEQ ID NO:	描述	序列
10	JB5 重链核酸序列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCCCGGCGCCTC CGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACATCTTCACCTCCTACTACA TGTACTGGGTGAAGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGAG ATCAACCCCTCCAACGGCGACACCAACTTCAACGAGAAGTTCAAGTCCAA GGCCACCCTGACCGTGGACAAGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGT CCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGGTCCGAC GGCAGGAACGACATGGACTCCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTC CTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCAGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG*g* *tgagaggccagcacagggagggagggtgtctgctggaagccaggctcagc* *gctcctgcctggacgcatcccggctatgcagccccagtccagggcagcaa* *ggcaggccccgtctgcctcttcacccggaggcctctgcccgccccactca* *tgctcagggagagggtcttctggctttttccccaggctctgggcaggcac* *aggctaggtgcccctaacccaggccctgcacacaaaggggcaggtgctgg* *gctcagacctgccaagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaa* *gcccaccccaaaggccaaactctccactccctcagctcggacaccttctc* *tcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcag*AGCCCAAATC TAGTGACAAAACTCACACAAGCCCACCGAGCCCAG*gtaagccagcccagg* *cctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcatc* *cagggacaggccccagccgggtgctgacacgtccacctccatctcttcct* *cag*CACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG*gtgggacccgtggggtg* *cgagggccacatggacagaggccggctcggcccaccctctgccctgagag* *tgaccgctgtaccaacctctgtccctacag*GGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA *taatga*

图11

SEQ ID NO:	描述	序列
11	JB5-R28K 轻链氨基酸序列	DIVLTQSPATLSVSPGERATISCRASQKVSSSTYSYMHWYQQKPGQPPKL LIKYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISSVEPEDFATYYCQHSWEIPP TFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC
12	JB5-R28K 轻链核酸序列	GACATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGCCACCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGA GAGGGCCACCATCTCCTGCAGGGCCTCCCAGAAGGTGTCCTCCTCCACCT ACTCCTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCCAGCCCCCCAAGCTG CTGATCAAGTACGCCTCCAACCTGGAGTCCGGCGTGCCCGCCAGGTTCTC CGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCTCCGTGGAGC CCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCACTCCTGGGAGATCCCCCCC ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGgaaatcaaaCGTACGGTGGCTGCACC ATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTG CCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGA CGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTC ACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGTTAGTGA
13	JB5-K74R 重链氨基酸	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYYMYWVKQAPGQGLEWIGE INPSNGDTNFNEKFKSKATLTVDRSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSD GRNDMDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTSPPSPAPELLGGSSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图12

SEQ ID NO:	描述	序列
14	JB5-K74R 重链核酸序列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTGGTGAAGCCCGGCGCCTC CGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACATCTTCACCTCCTACTACA TGTACTGGGTGAAGCAGGCCCCCGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCGAG ATCAACCCCTCCAACGGCGACACCAACTTCAACGAGAAGTTCAAGTCCAA GGCCACCCTGACCGTGGACAGGTCCGCCTCCACCGCCTACATGGAGCTGT CCTCCCTGAGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCACCAGGTCCGAC GGCAGGAACGACATGGACTCCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTC CTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGCACAGCAGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG CGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCA GCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGg *tgagaggccagcacagggagggagggtgtctgctggaagccaggctcagc* *gctcctgcctggacgcatcccggctatgcagccccagtccagggcagcaa* *ggcaggccccgtctgcctcttcacccggaggcctctgcccgccccactca* *tgctcagggagagggtcttctggctttttccccaggctctgggcaggcac* *aggctaggtgcccctaacccaggccctgcacacaaaggggcaggtgctgg* *gctcagacctgccaagagccatatccgggaggaccctgcccctgacctaa* *gcccaccccaaaggccaaactctccactccctcagctcggacaccttctc* *tcctcccagattccagtaactcccaatcttctctctgcag*AGCCCAAATC TAGTGACAAAACTCACACAAGCCCACCGAGCCCAG*gtaagccagcccagg* *cctcgccctccagctcaaggcgggacaggtgccctagagtagcctgcatc* *cagggacaggccccagccgggtgctgacacgtccacctccatctcttcct* *cag*CACCTGAACTCCTGGGGGGATCCTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAA CCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC AACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG*gtgggacccgtggggtg* *cgagggccacatggacagaggccggctcggcccaccctctgccctgagag* *tgaccgctgtaccaacctctgtccctacag*GGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA *taatga*

图13

SEQ ID NO:	描述	序列
15	JB5 CDR-L1	ISCRASQRVSSSTYSYMH
16	JB5 CDR-L2	YASNLES
17	JB5 CDR-L3	QHSWEIPPT
18	JB5 CDR-H1	SYYMY
19	JB5 CDR-H2	EINPSNGDTNFNEKFKS
20	JB5 CDR-H3	SDGRNDMDS
21	Hu5c8 重链	QVQLVQSGAEVVKPGASVKLSCKASGYIFTSYYMYWVKQAPGQGLEWIGEINPSNGDTN FNEKFKSKATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRSDGRNDMDSWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

图14

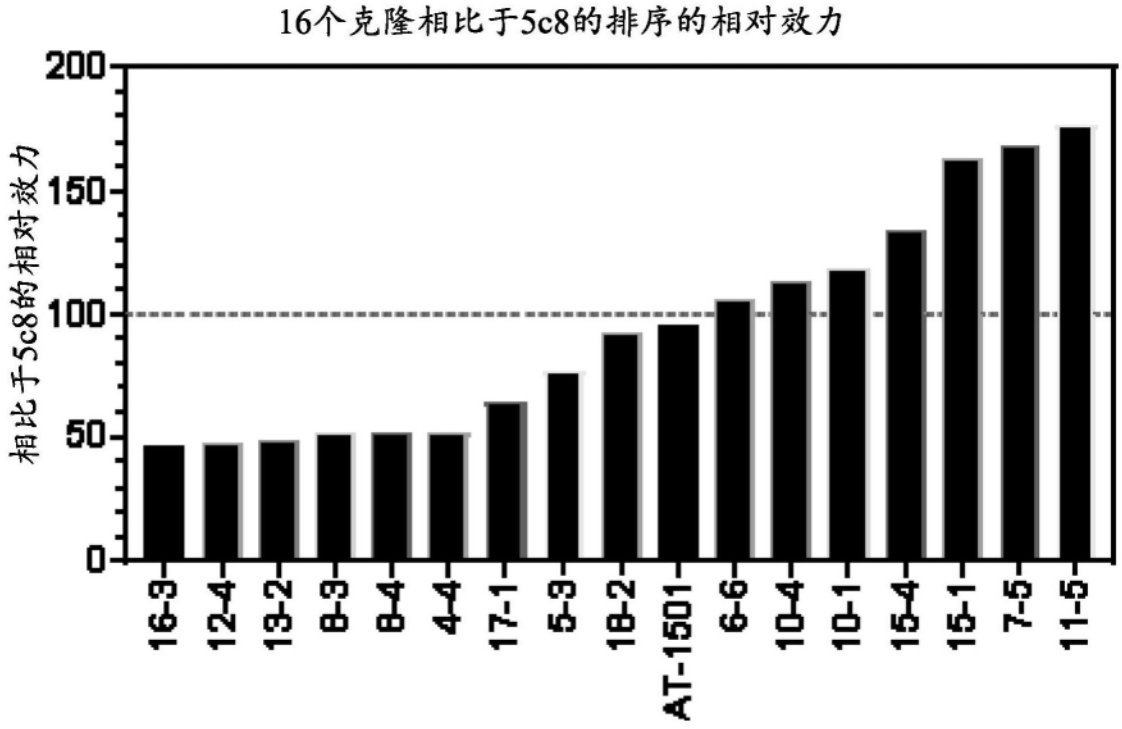


图15A

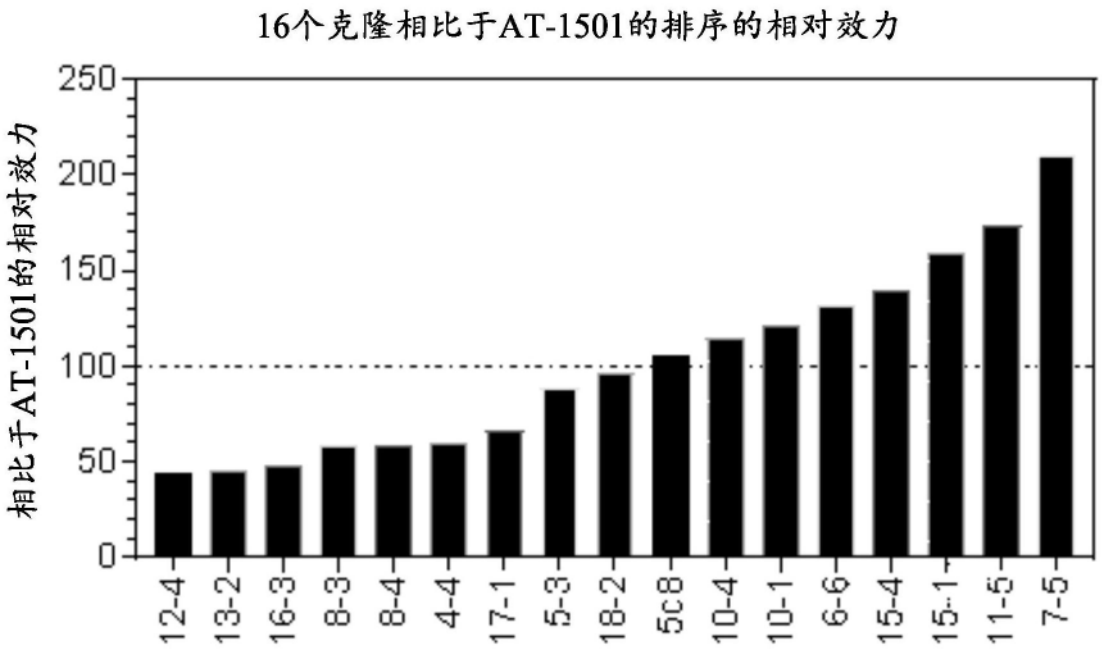

16个克隆相比于AT-1501的排序的相对效力
相比于AT-1501的相对效力
250
200
150
100
50
0
12-4
13-2
16-3
8-3
8-4
4-4
17-1
5-3
18-2
5c8
10-4
10-1
6-6
15-4
15-1
11-5
7-5

图15B

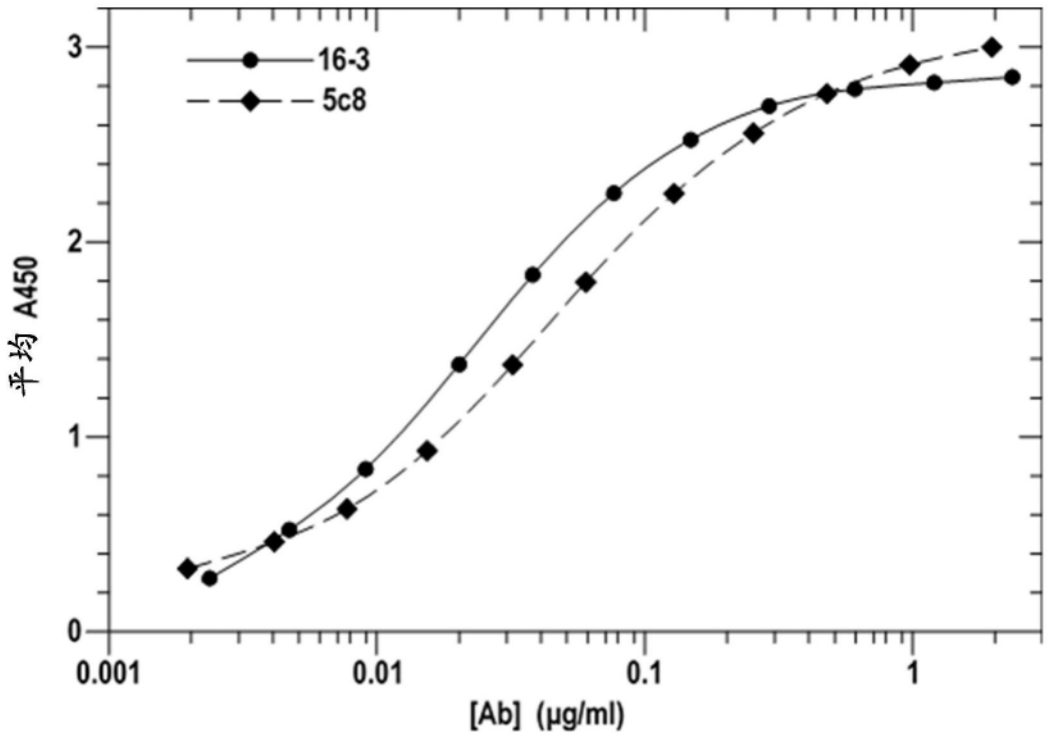

16-3
5c8
平均 A450
3
2
1
0
0.001
0.01
0.1
1
[Ab] (μg/ml)

图16A

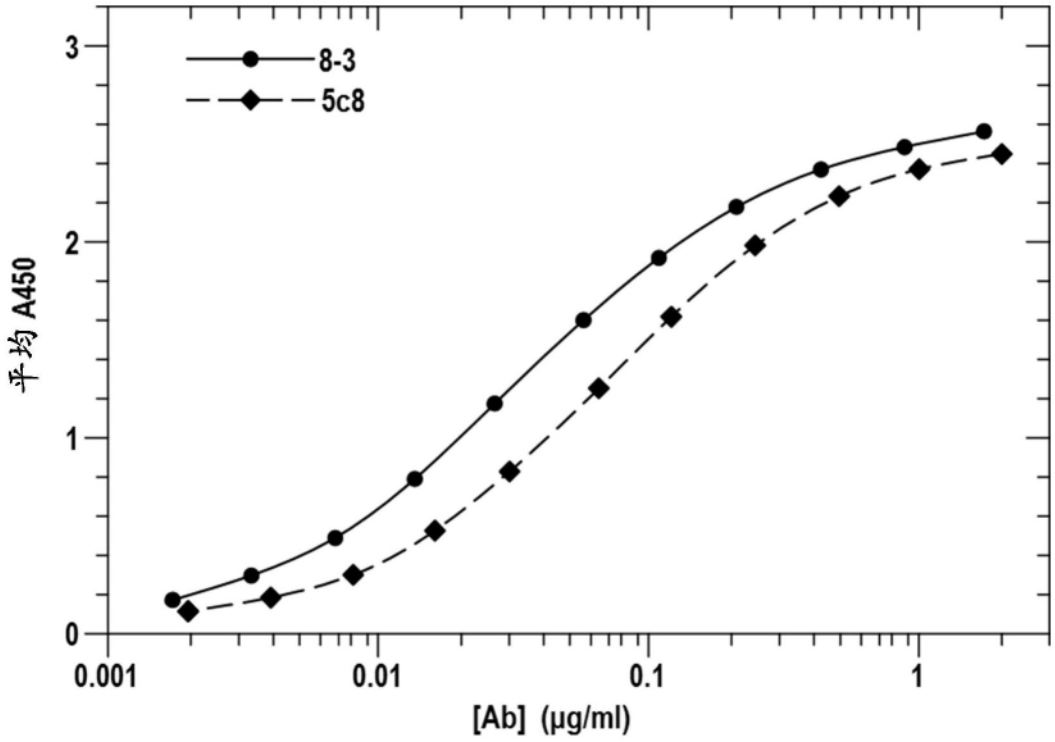

8-3
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16B

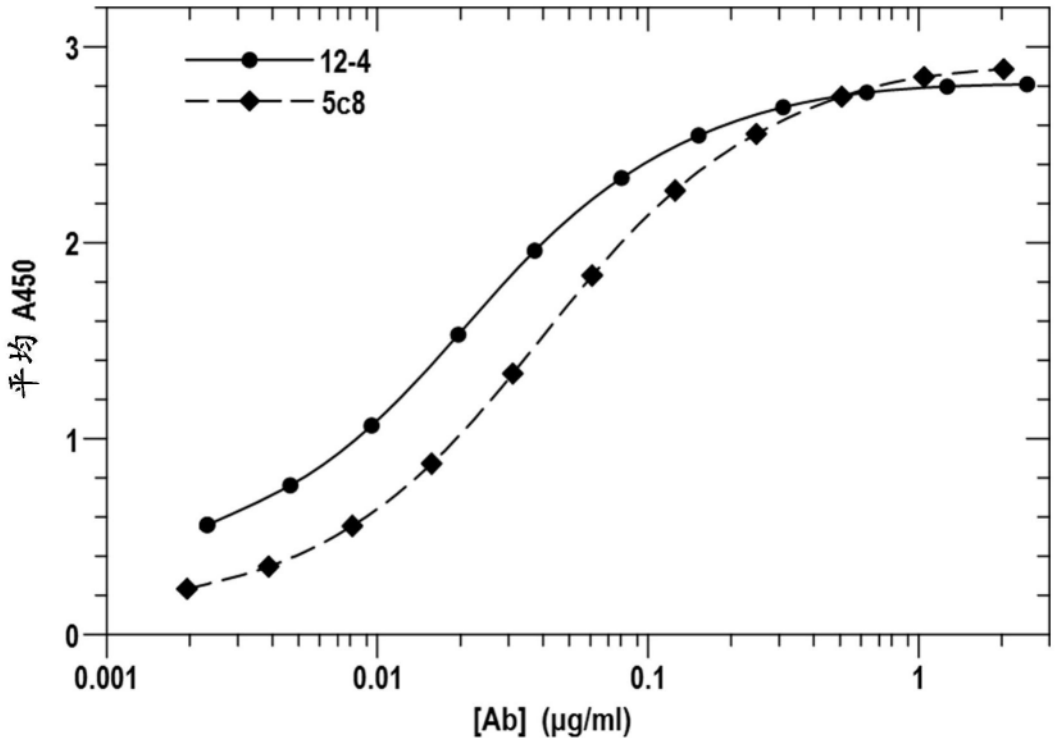

12-4
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16C

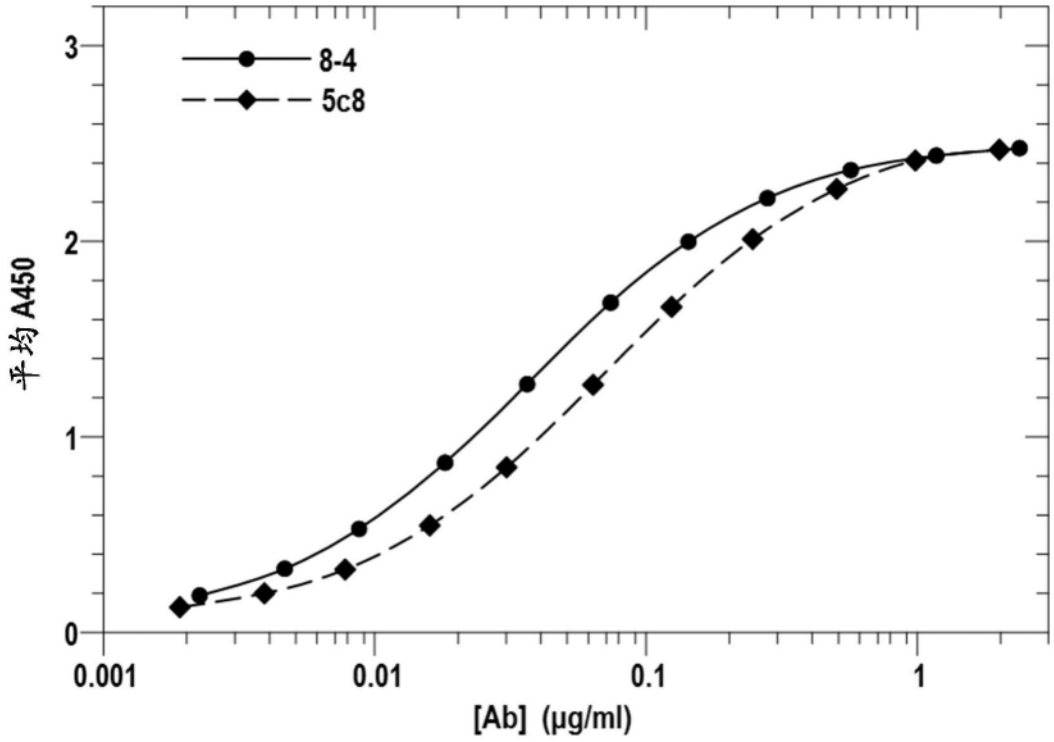

8-4
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16D

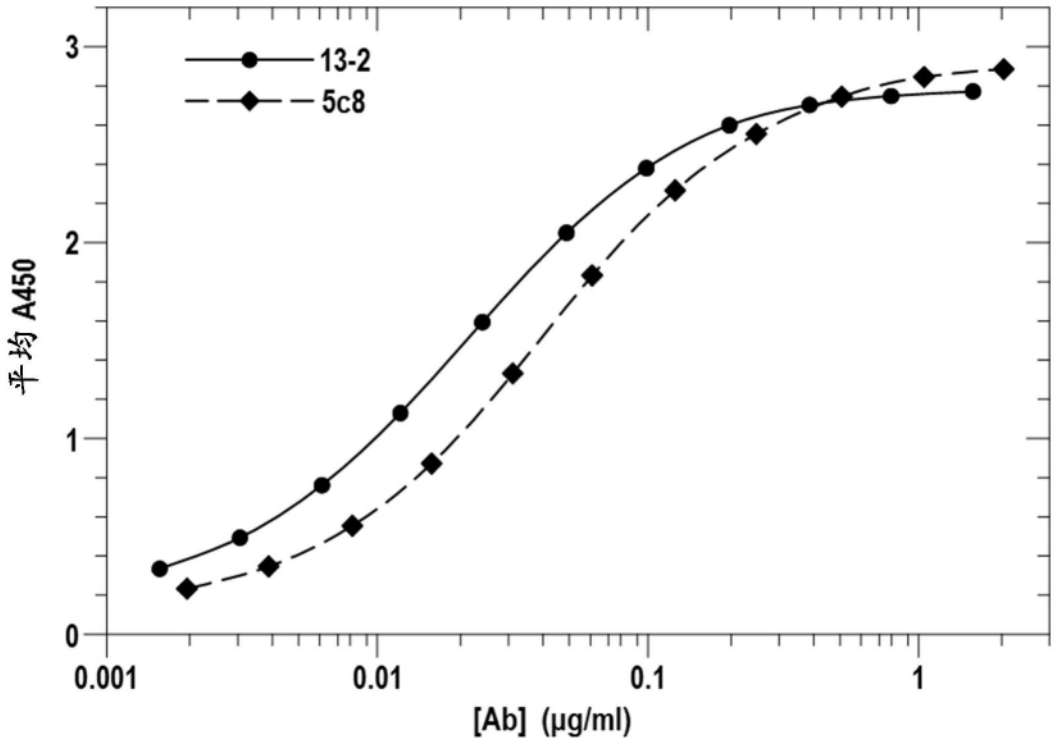

13-2
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16E

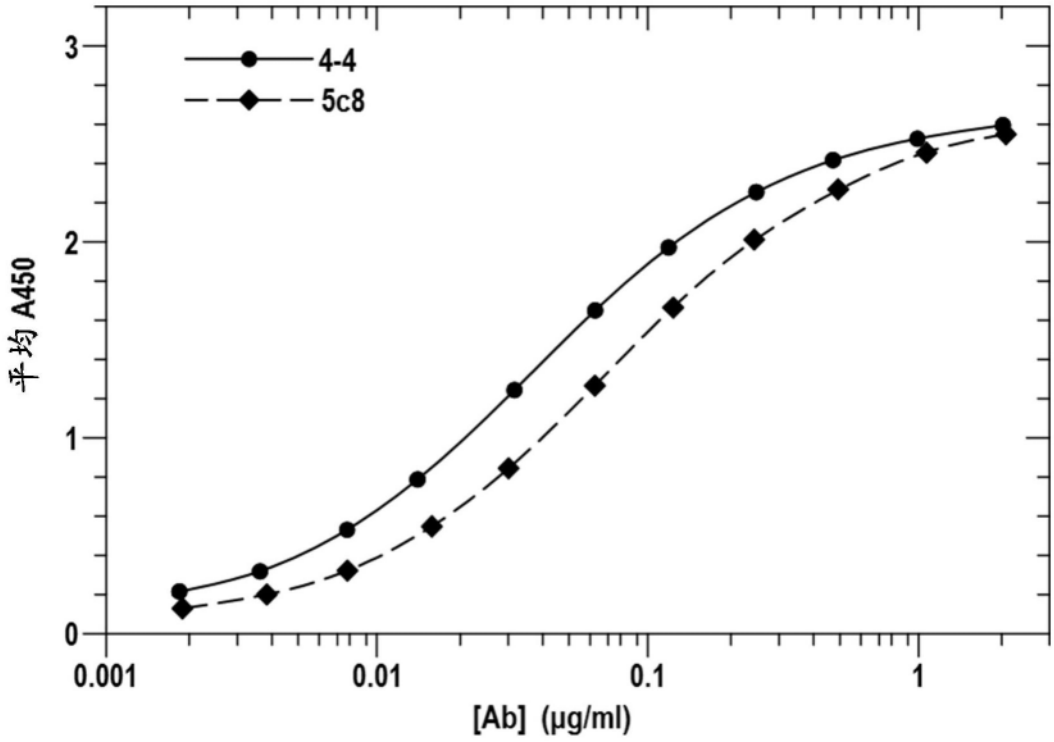

4-4
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16F

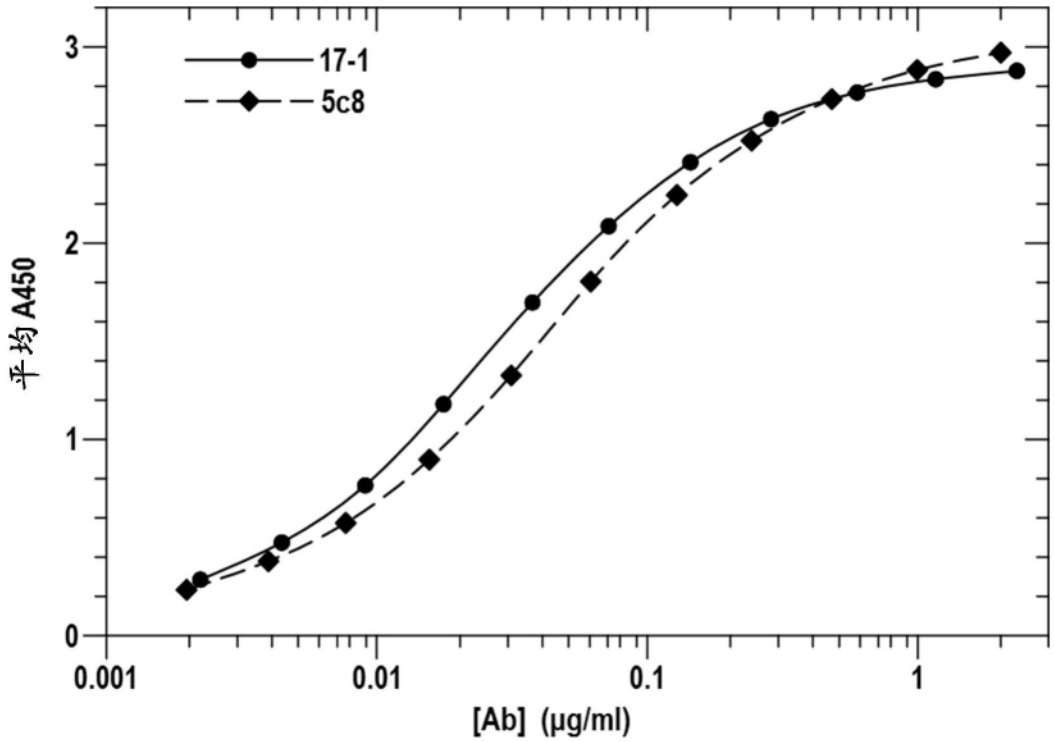

17-1
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16G

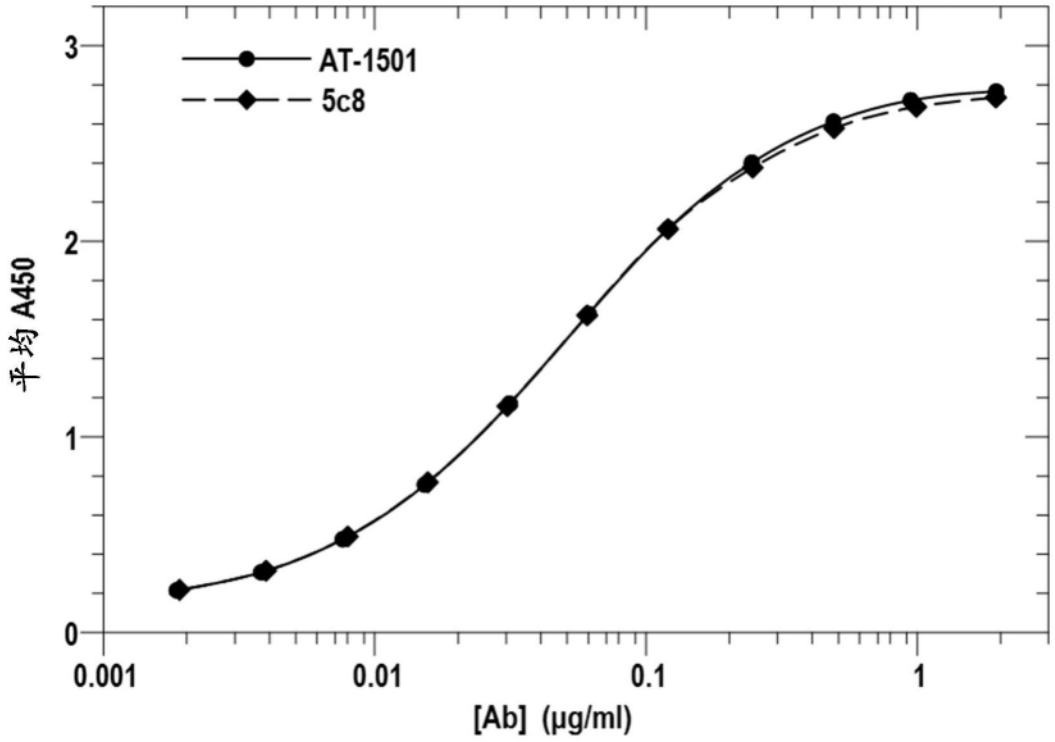

AT-1501
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16H

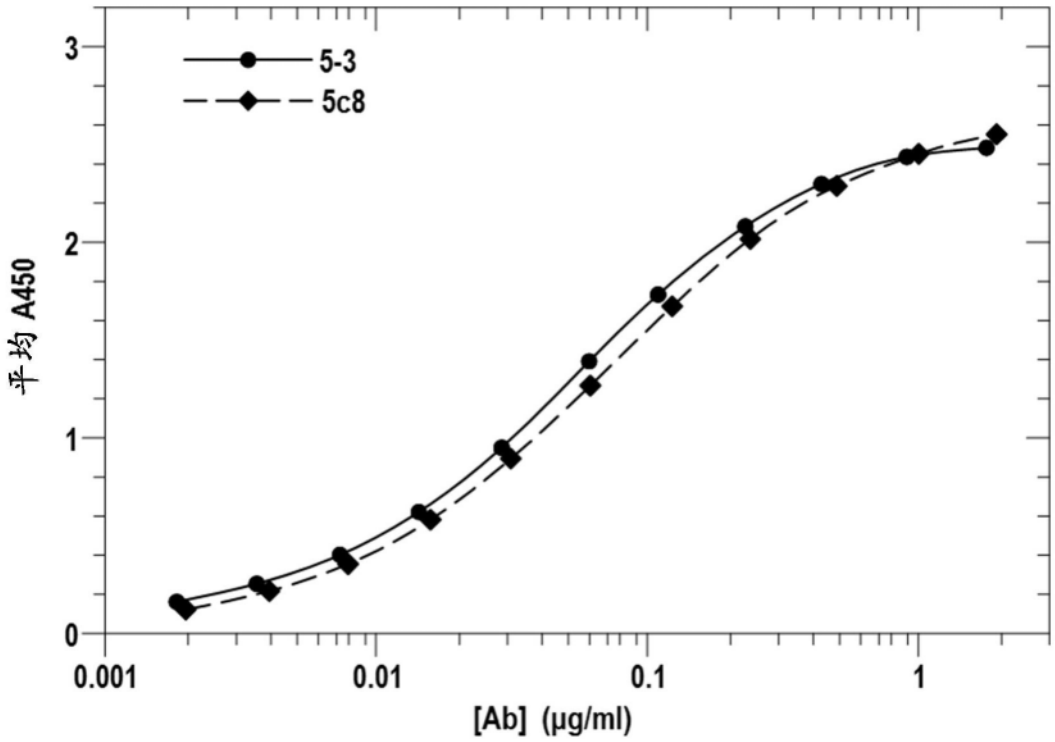

5-3
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16I

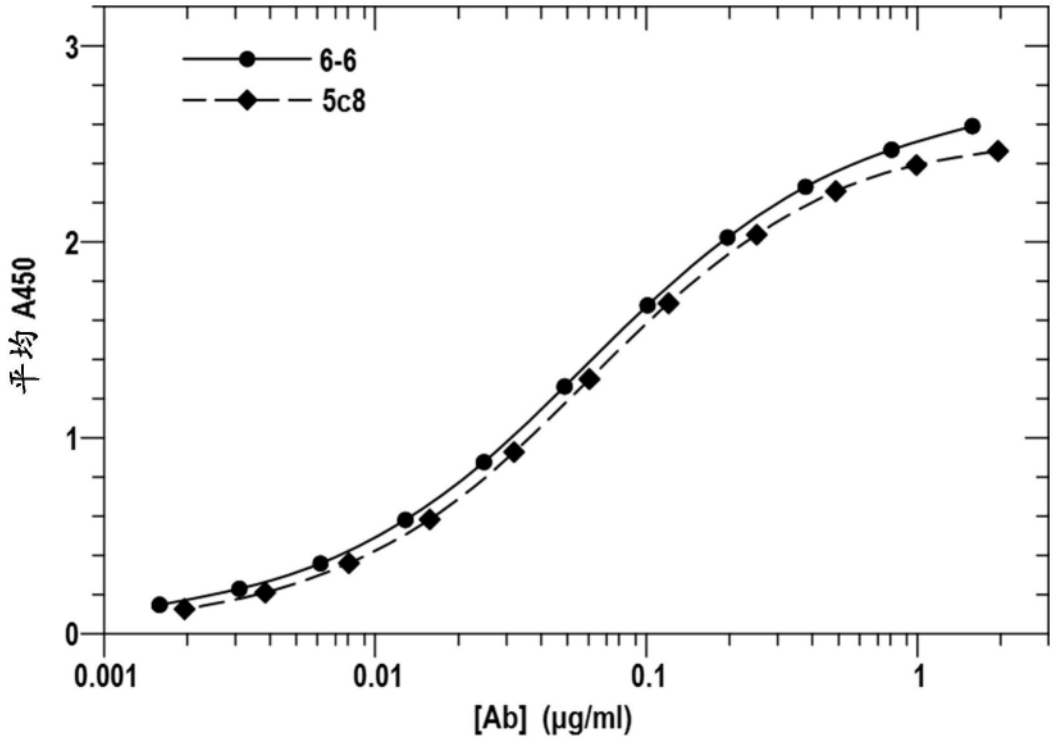

6-6
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16J

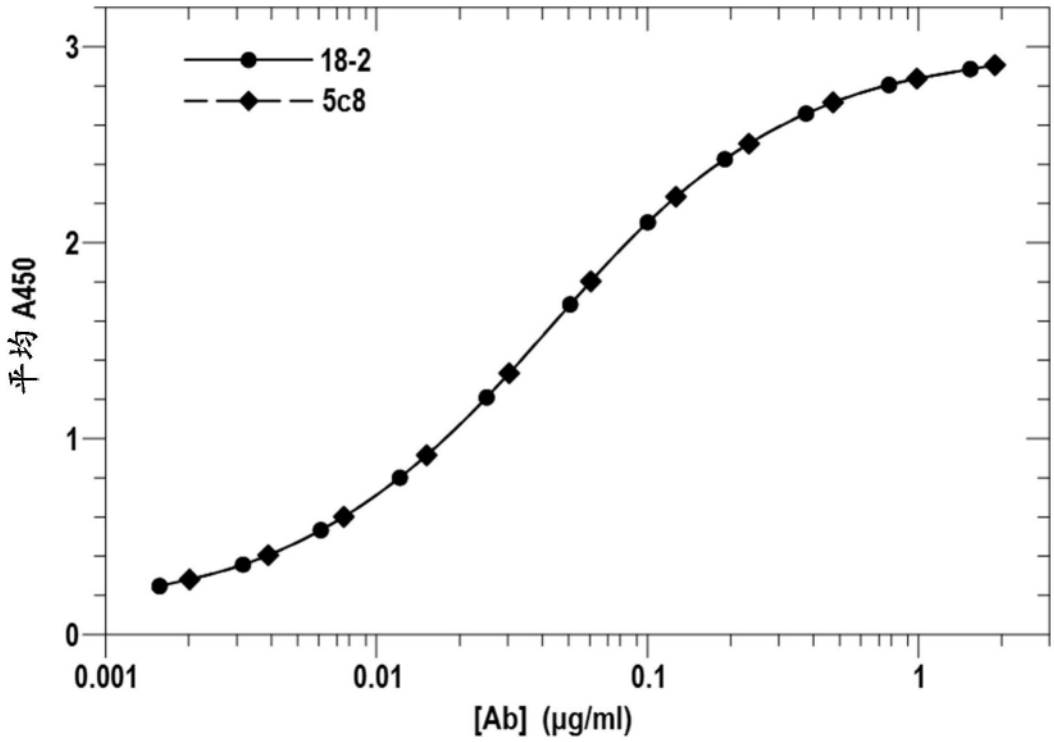

18-2
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16K

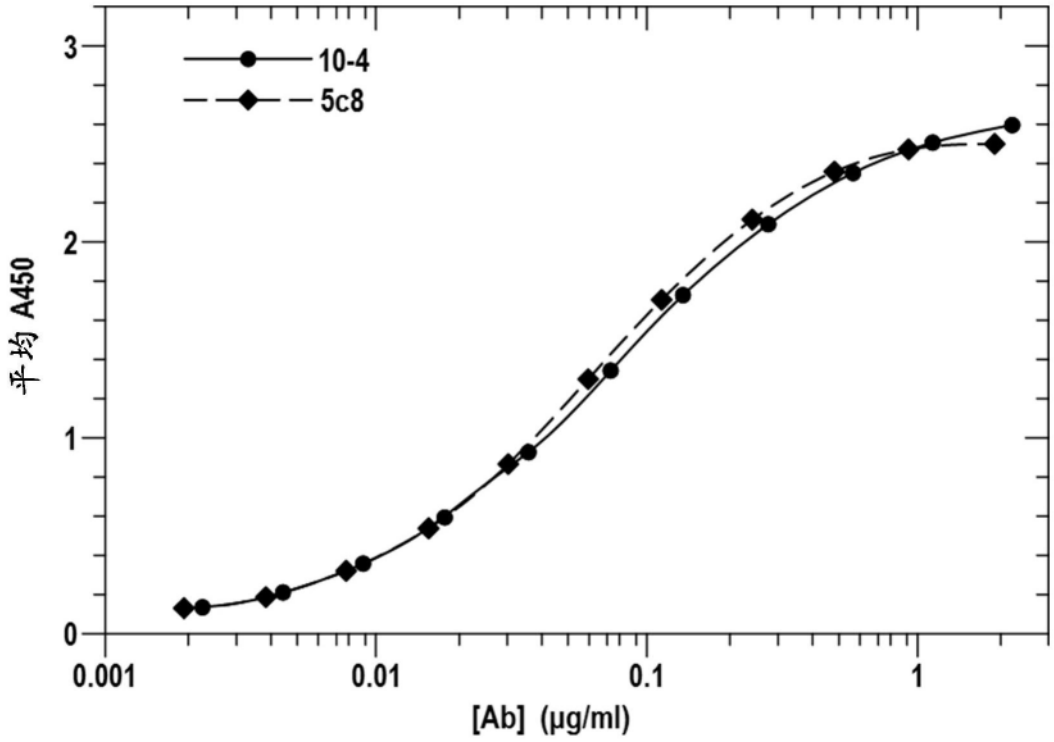

10-4
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16L

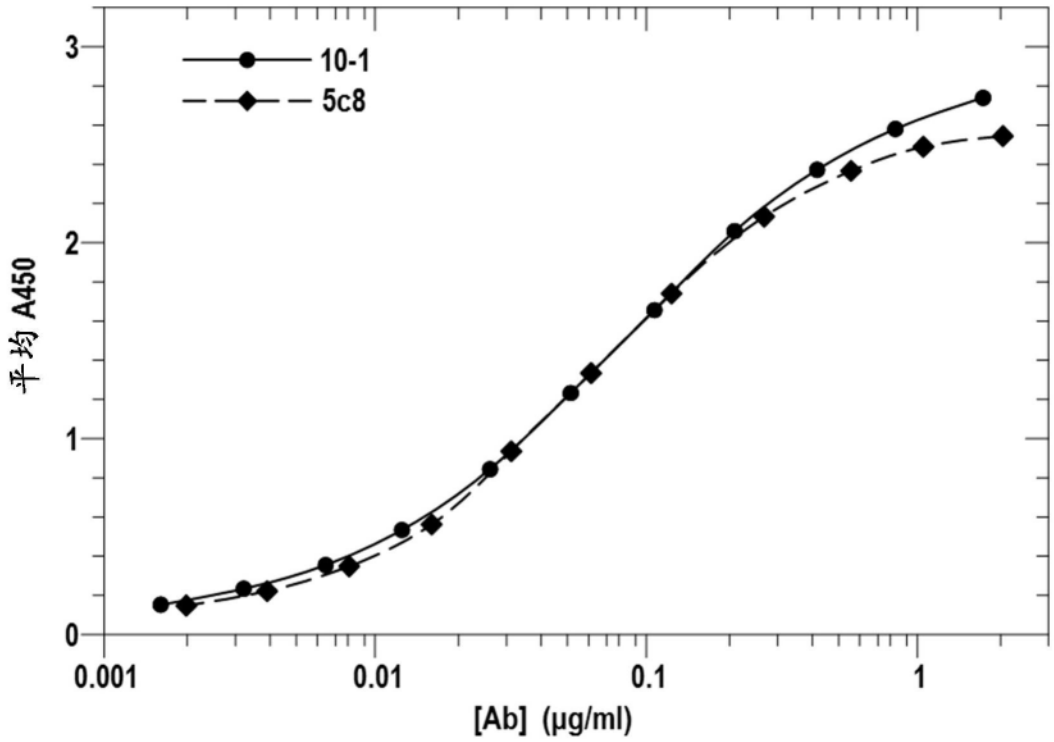

10-1
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16M

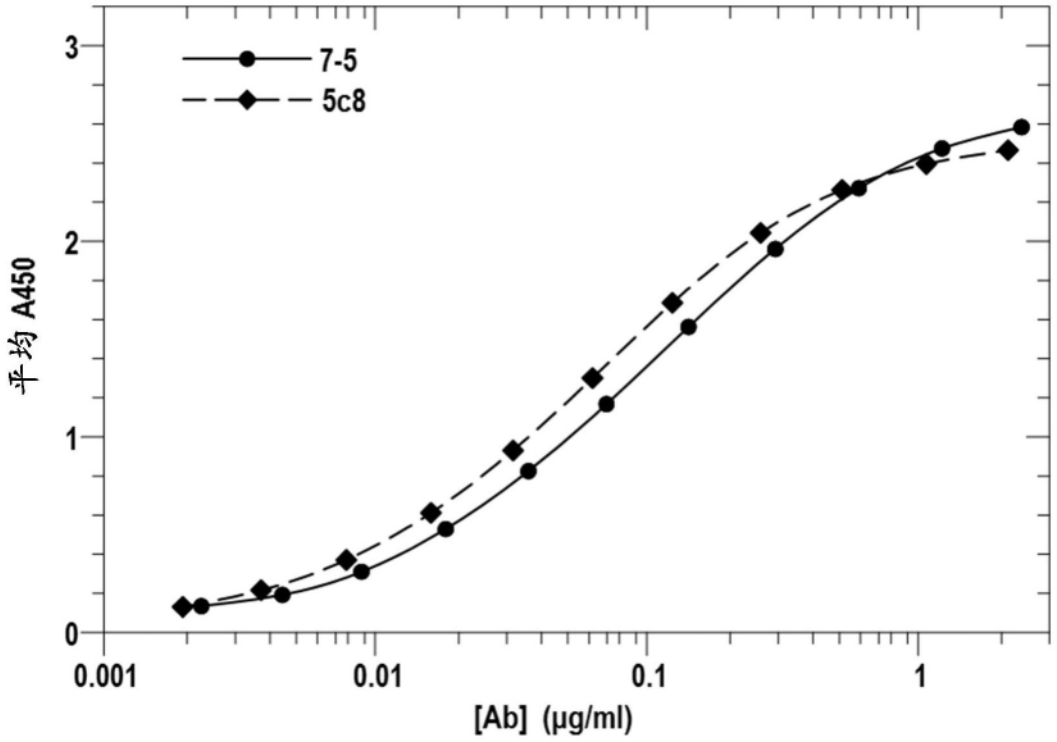

7-5
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16N

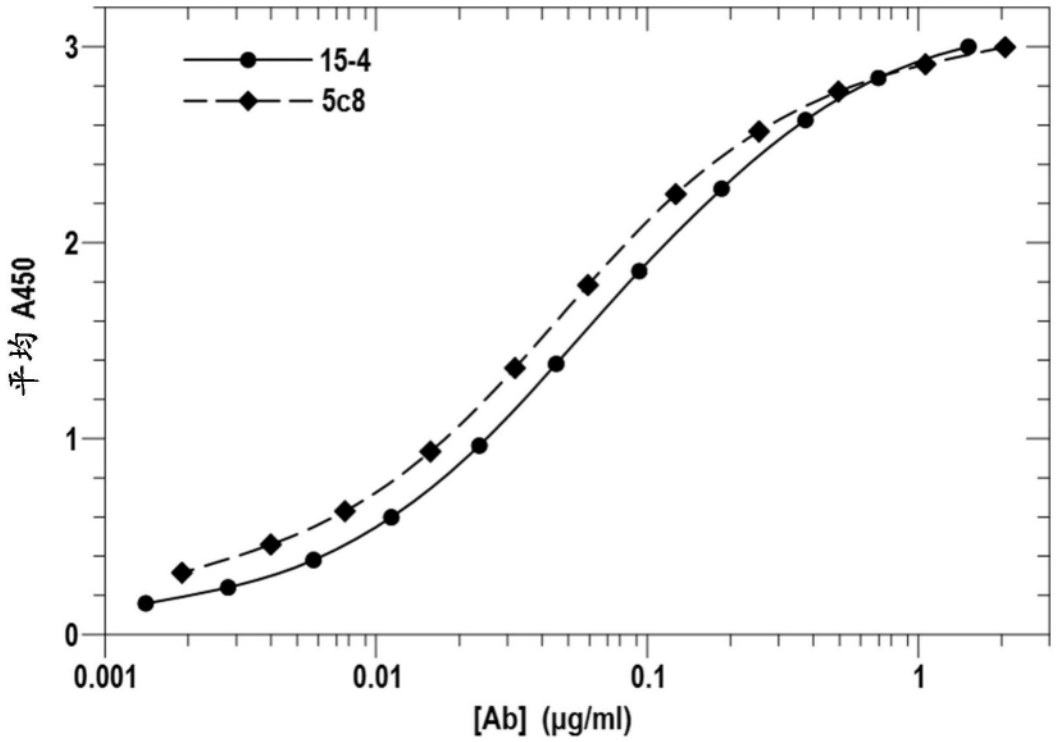

15-4
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图160

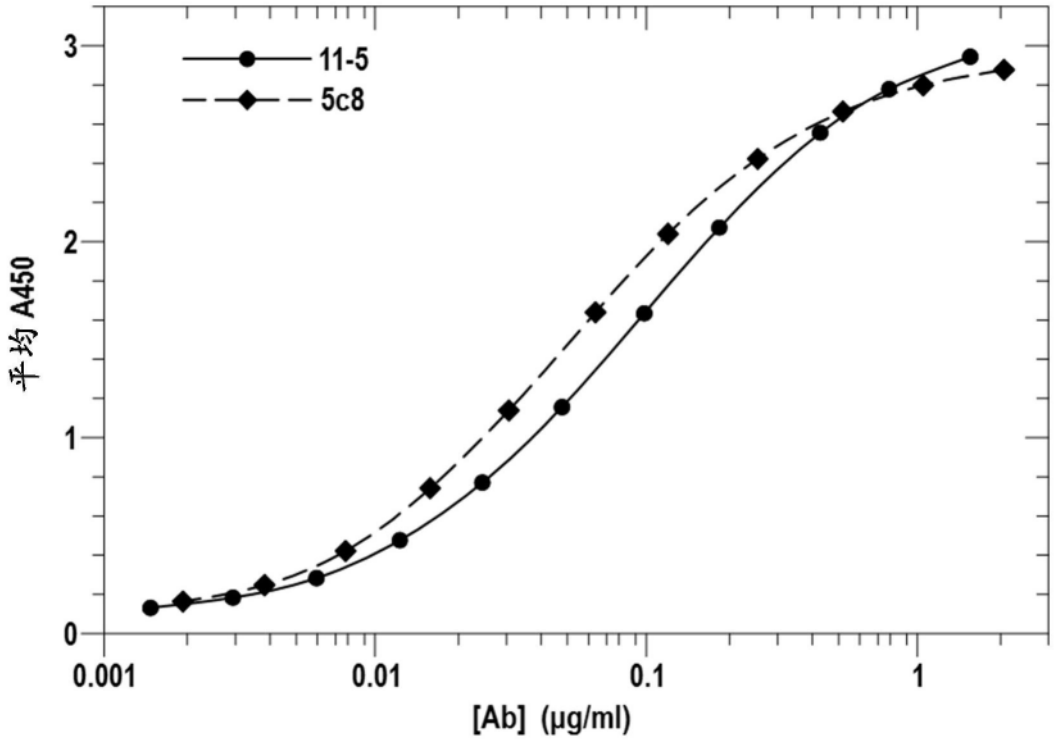

11-5
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16P

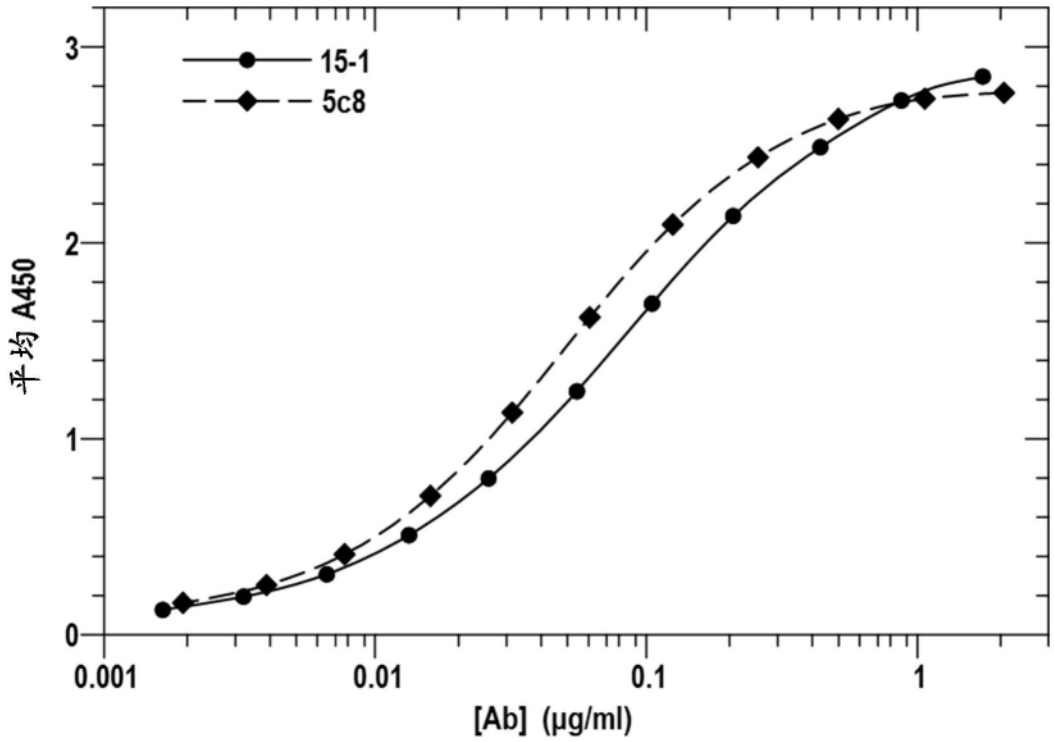

15-1
5c8
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图16Q

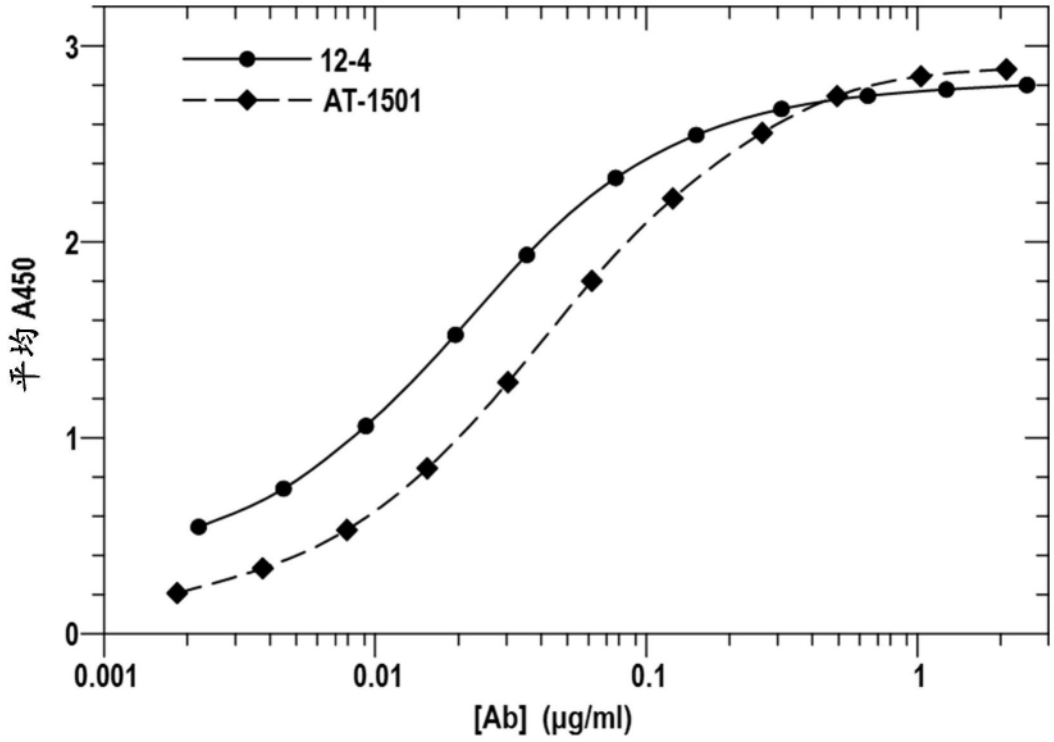

12-4
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17A

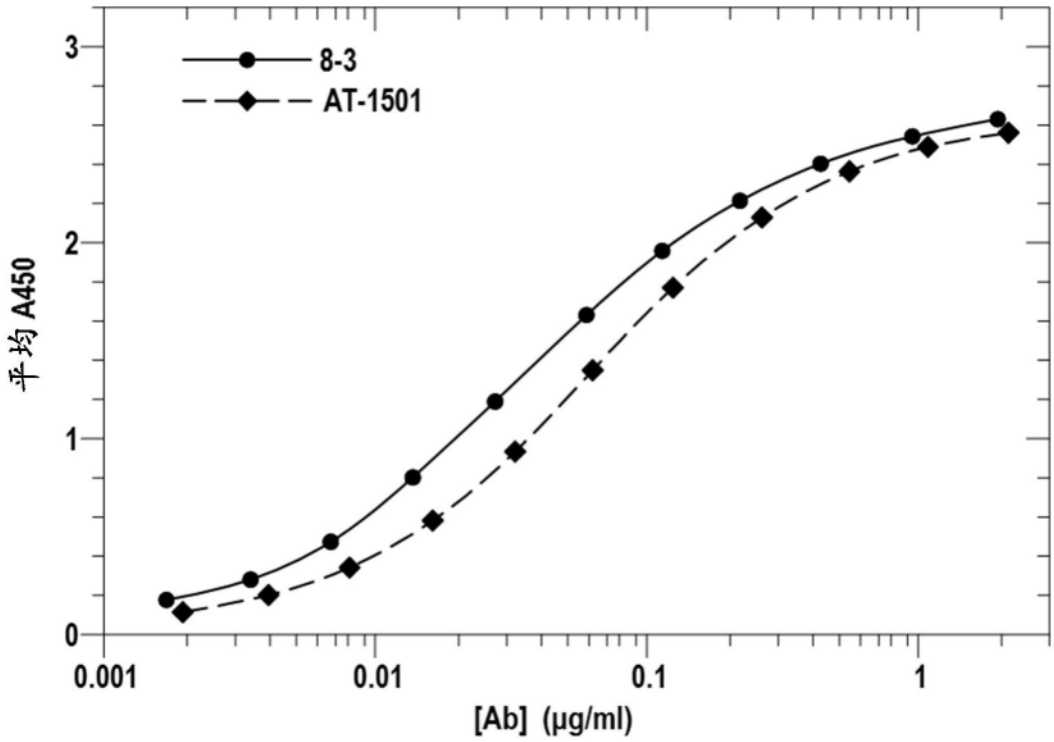

8-3
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17B

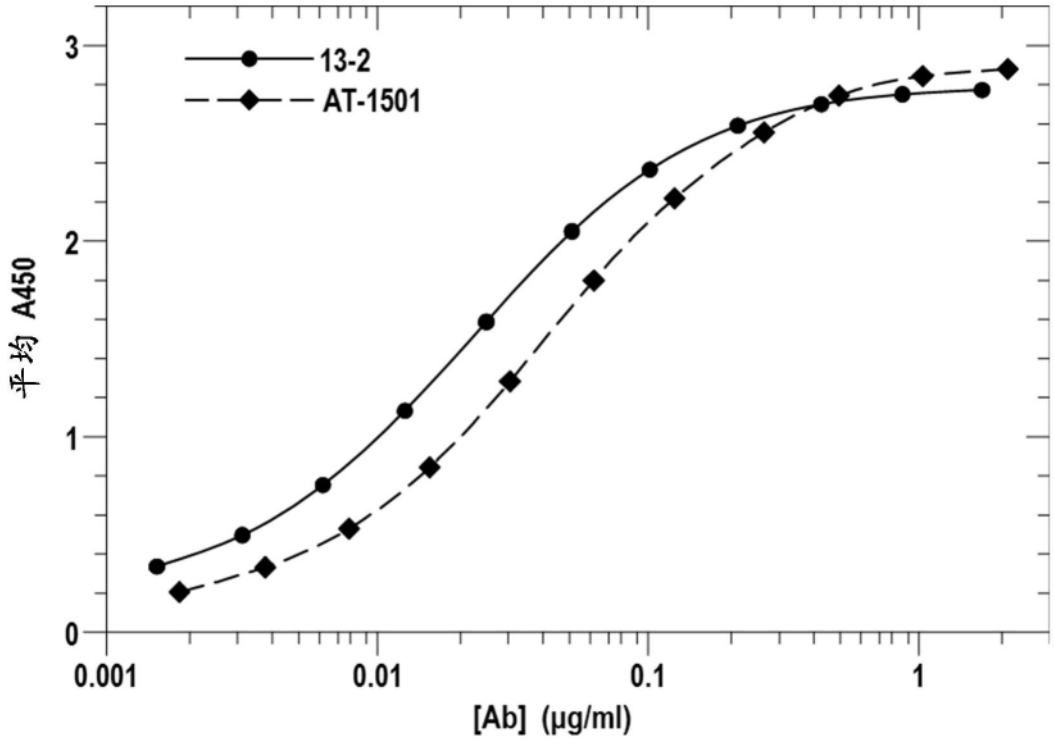

13-2
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17C

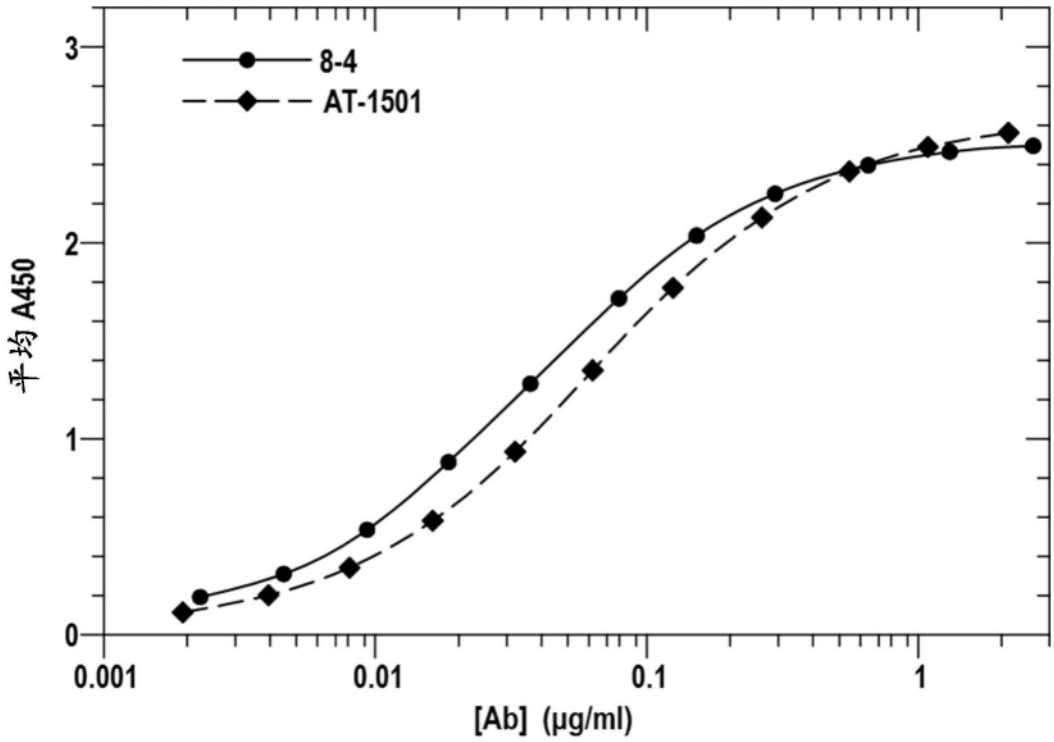

8-4
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17D

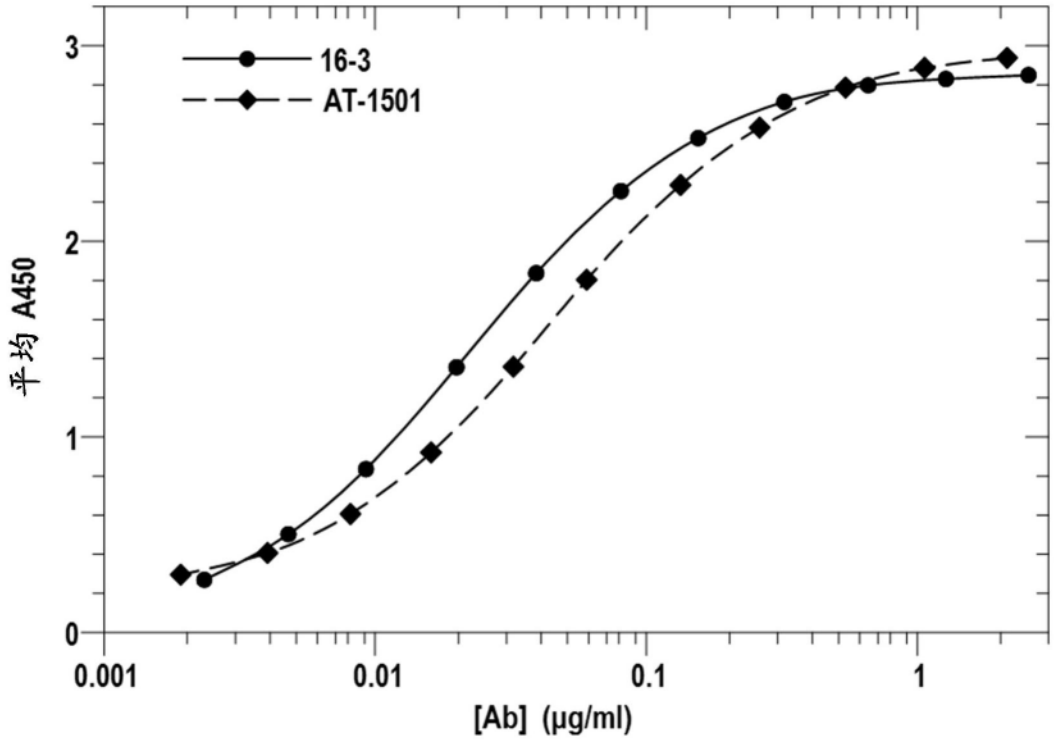

16-3
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17E

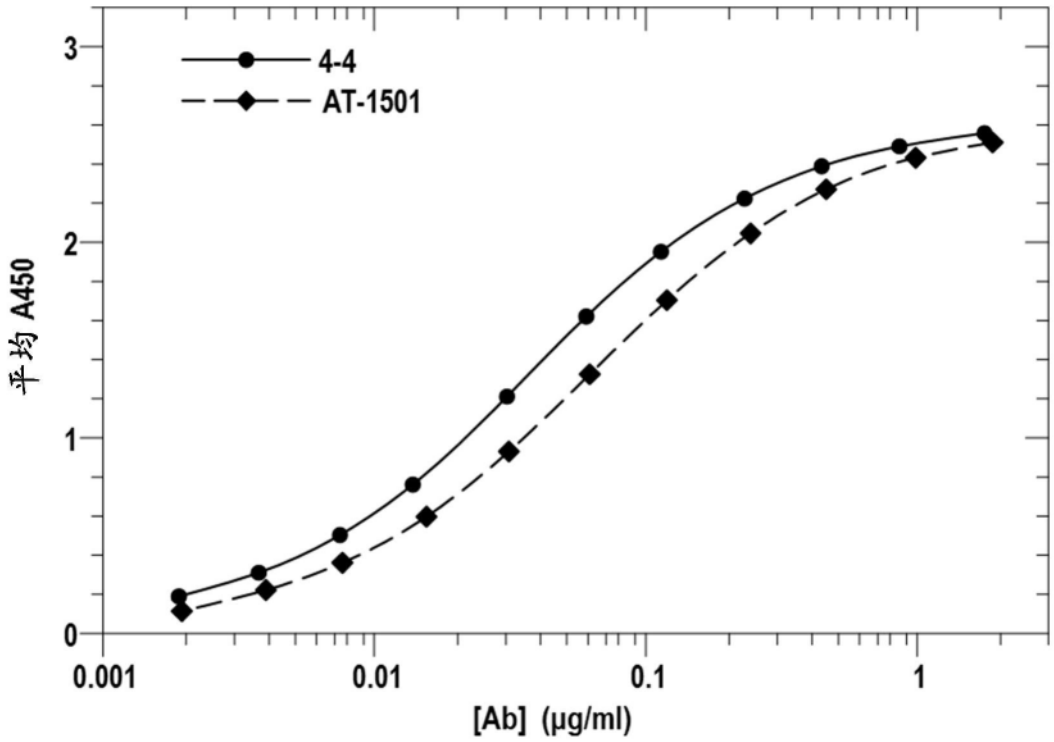

4-4
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17F

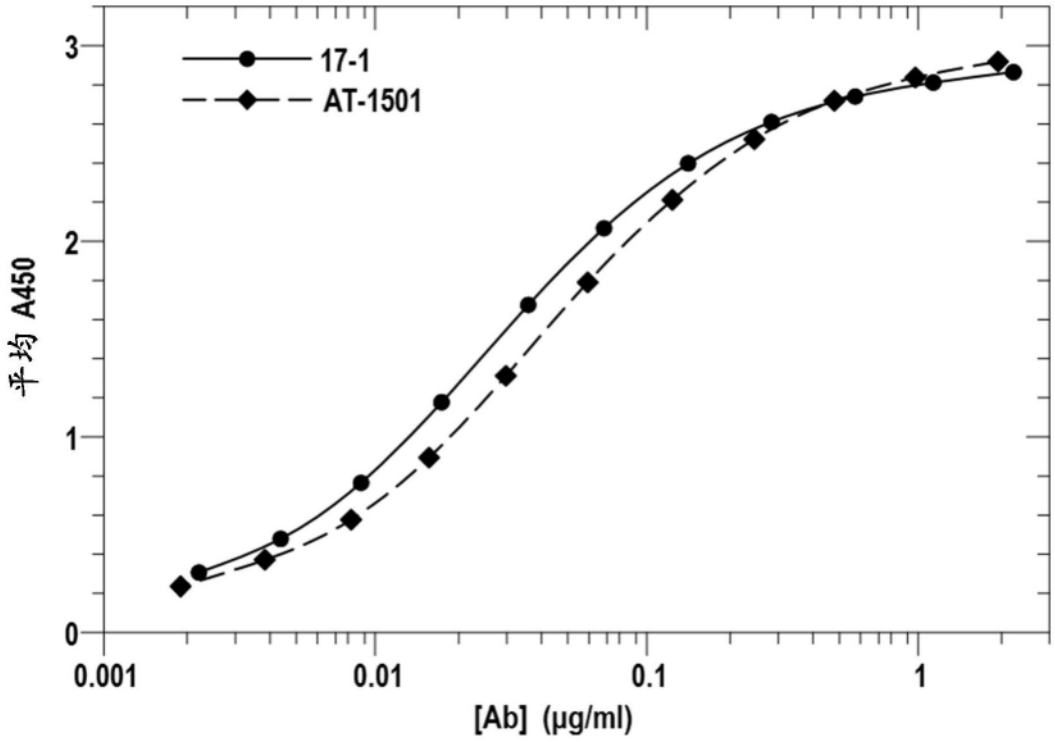

17-1
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17G

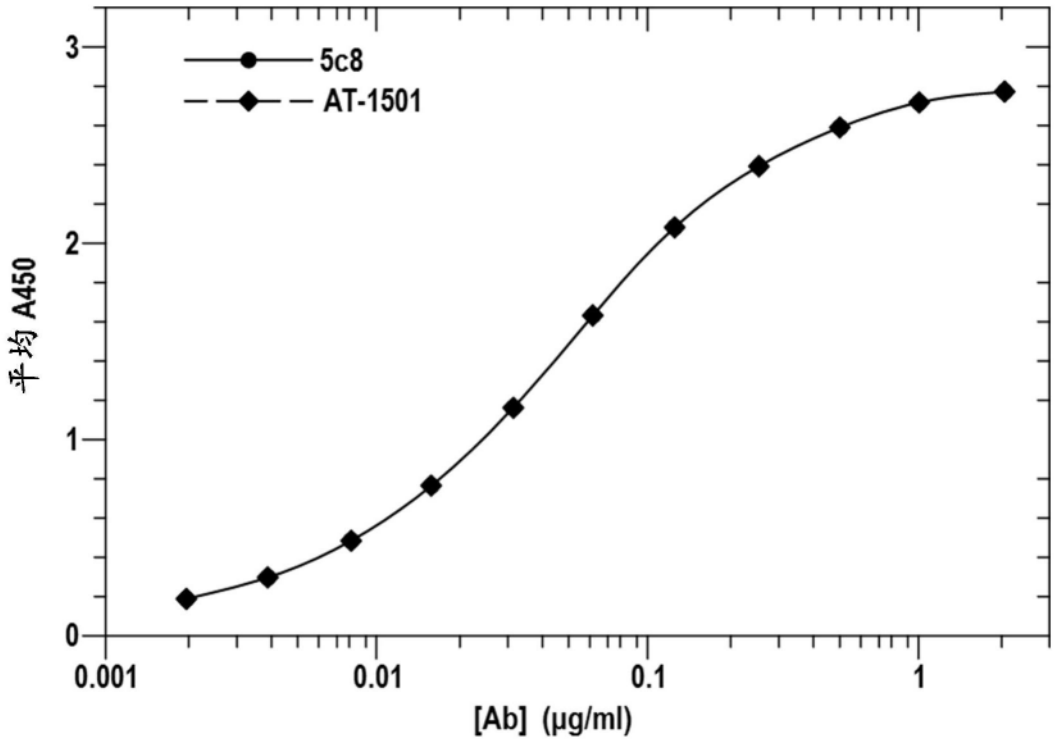

5c8
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17H

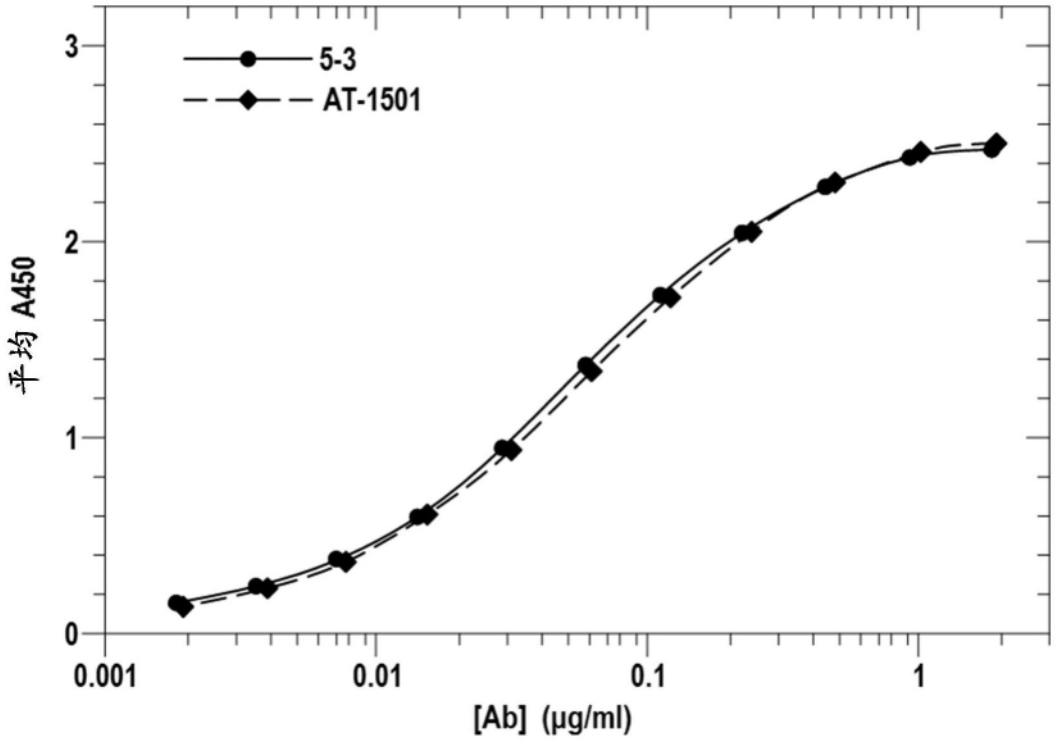

5-3
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17I

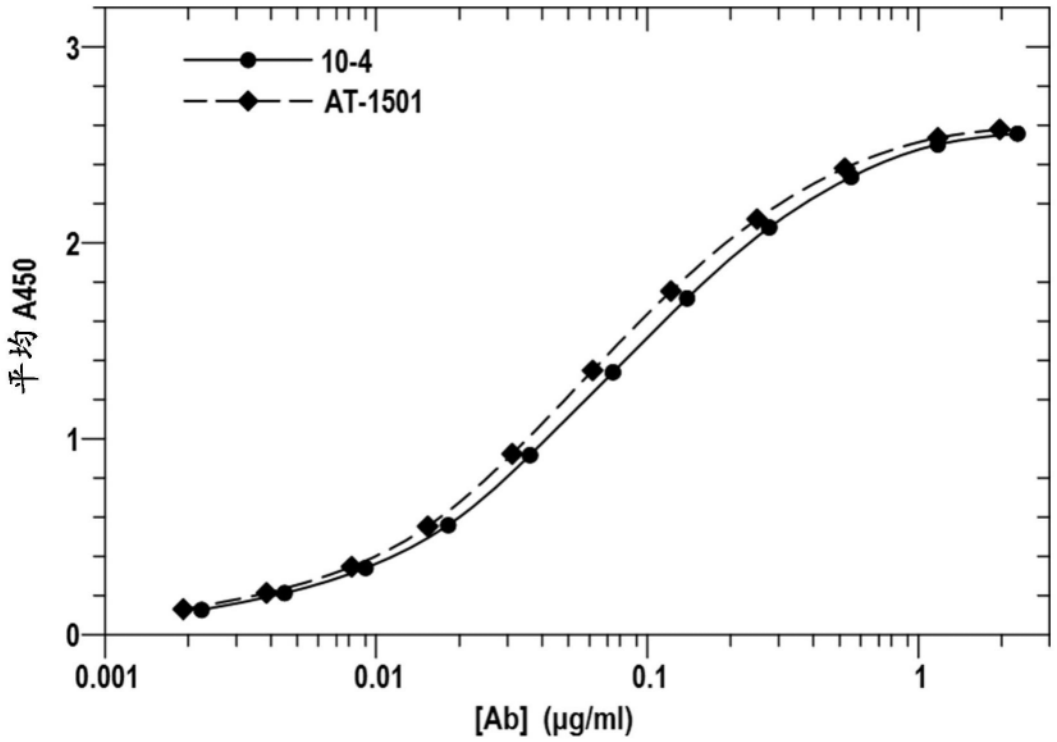

10-4
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17J

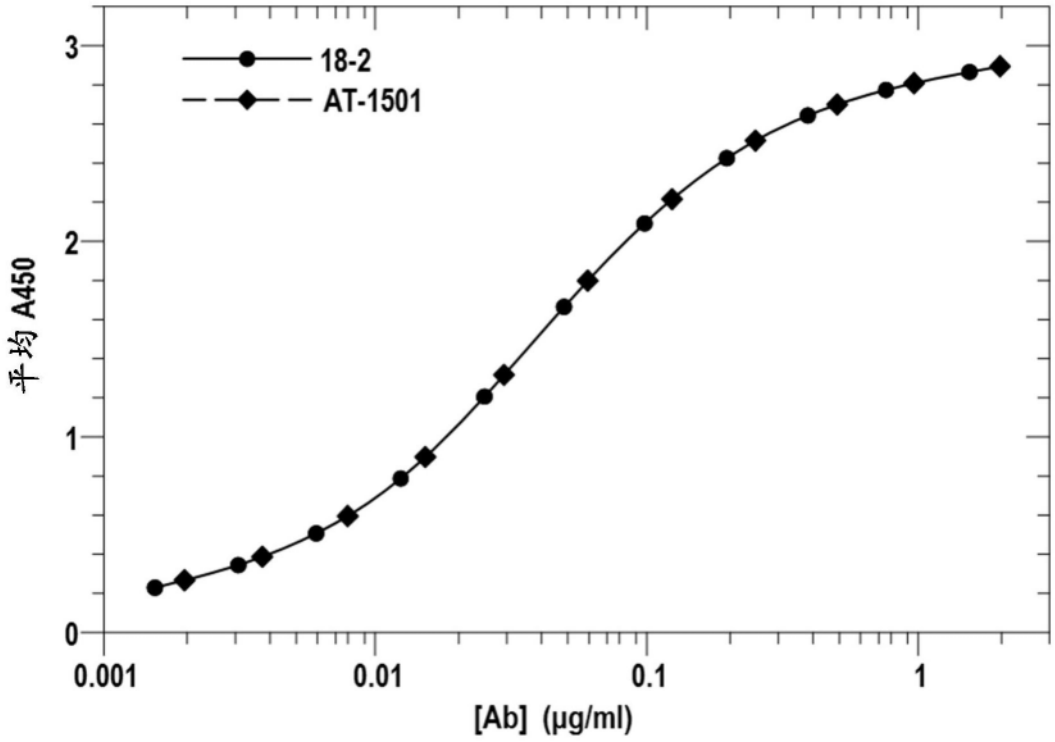

18-2
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17K

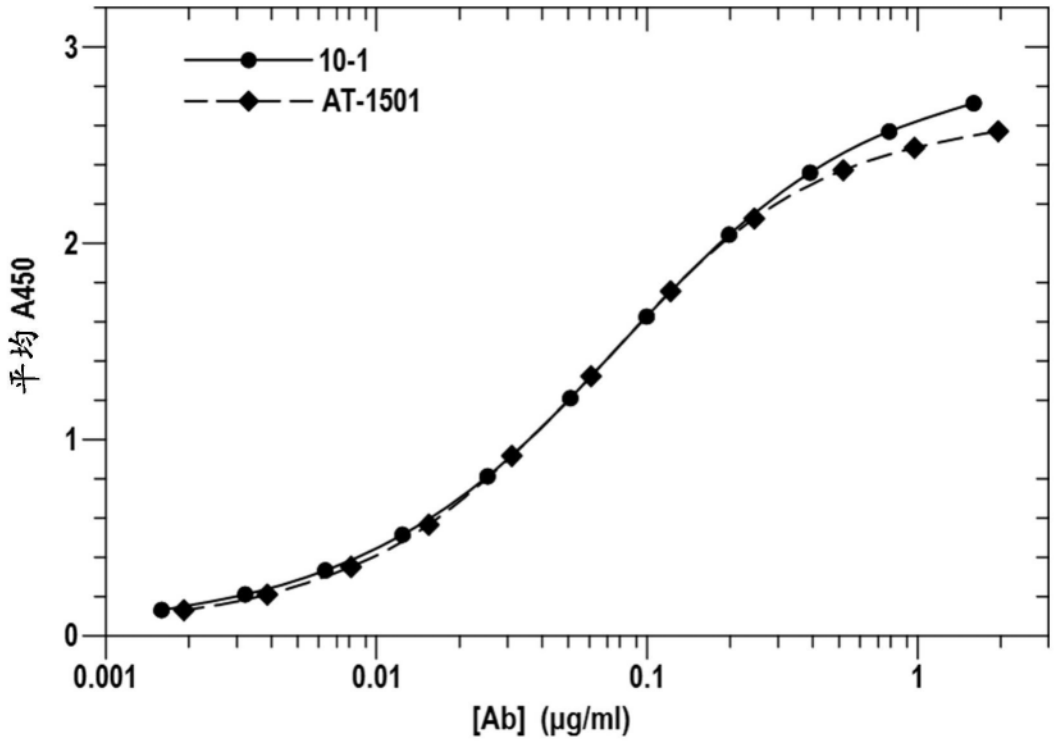

10-1
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17L

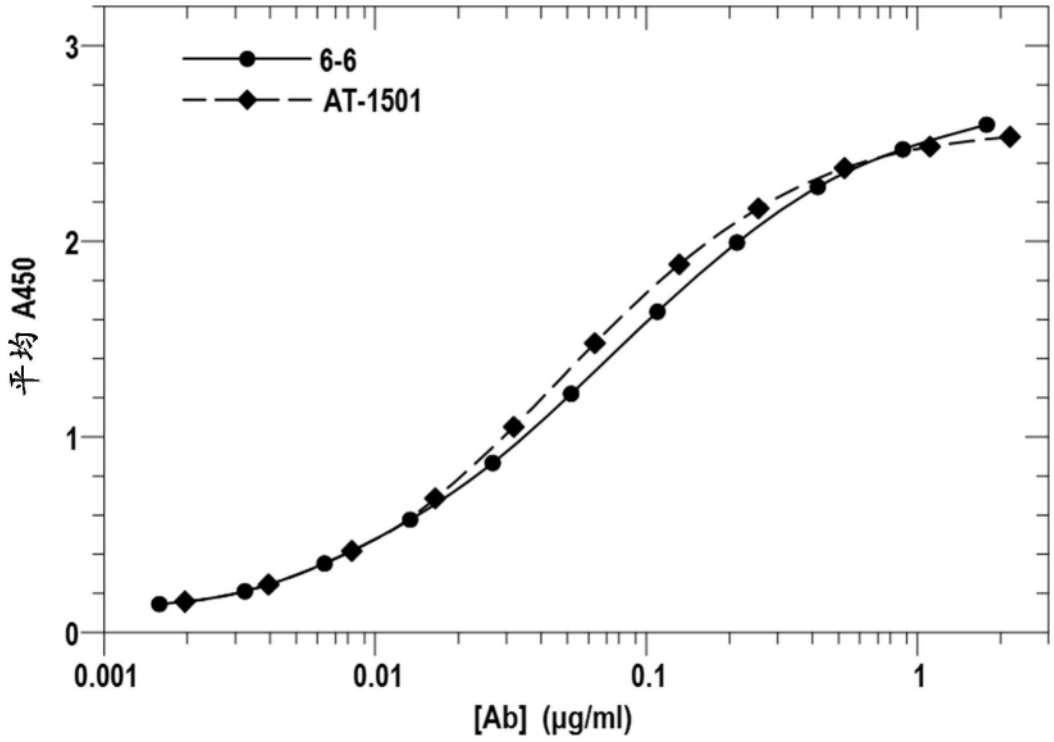

6-6
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17M

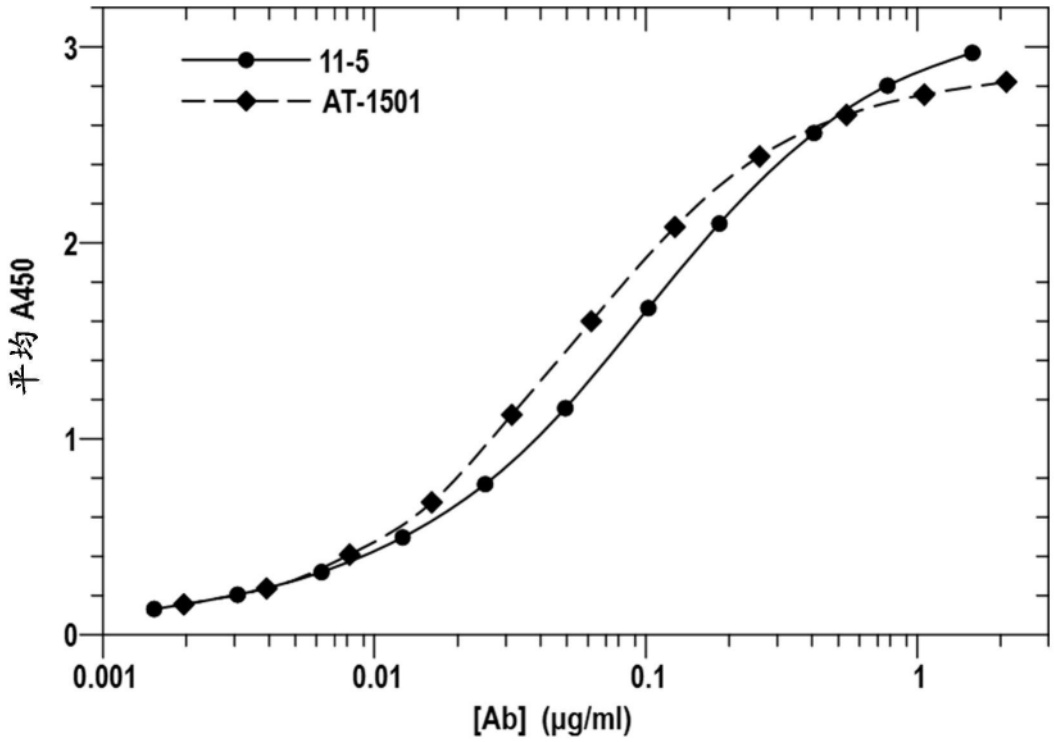

11-5
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17N

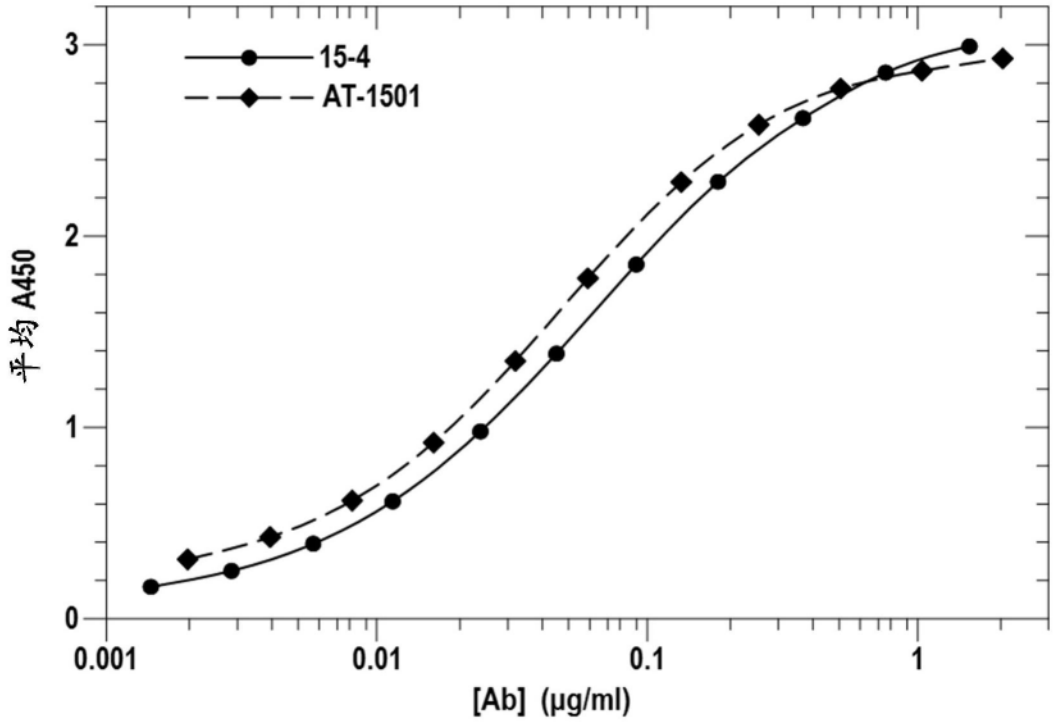

15-4
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图170

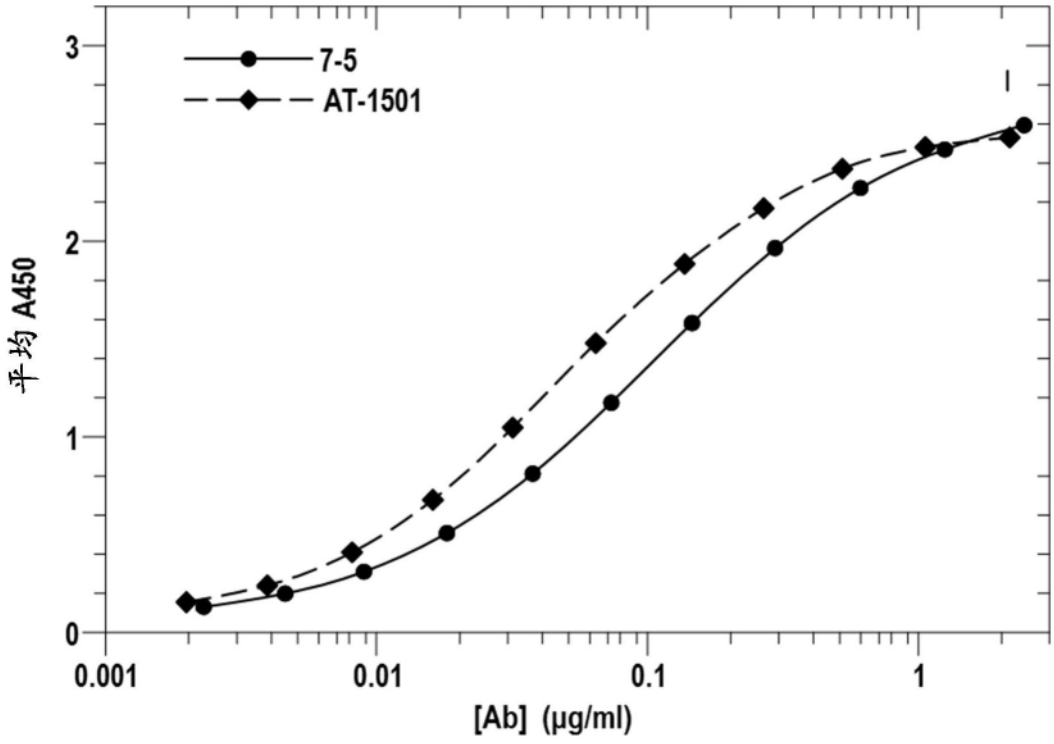

7-5
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17P

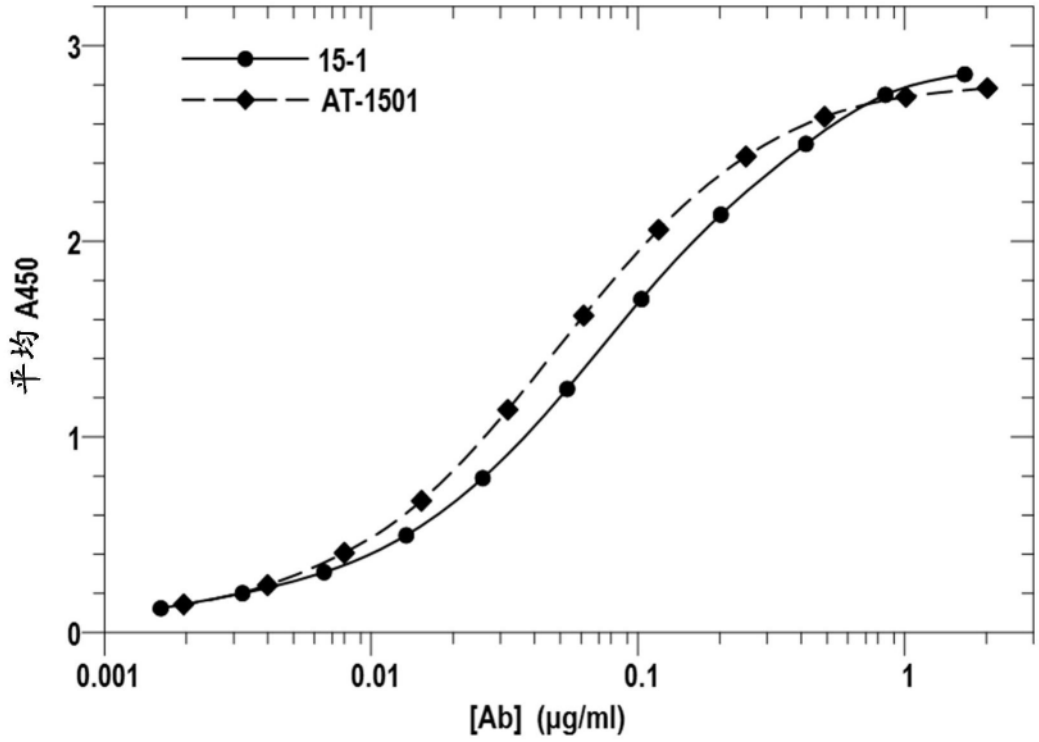

15-1
AT-1501
平均 A450
[Ab] (μg/ml)
0
1
2
3
0.001
0.01
0.1
1

图17Q

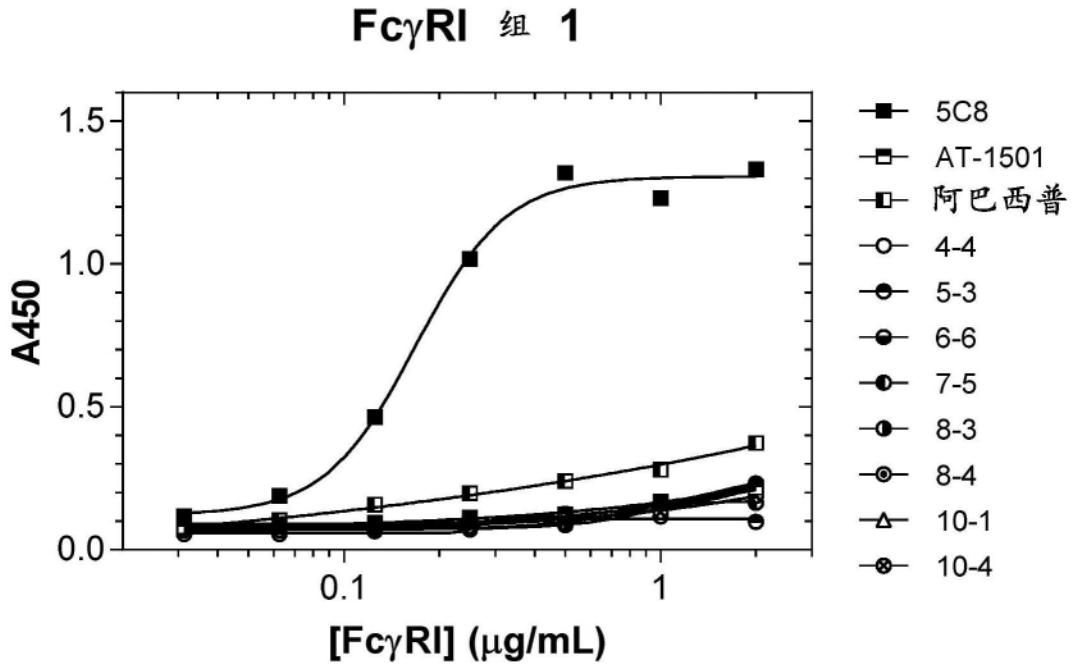

FcγRI 组 1
A450
[FcγRI] (μg/mL)
0.0
0.5
1.0
1.5
0.1
1
5C8
AT-1501
阿巴西普
4-4
5-3
6-6
7-5
8-3
8-4
10-1
10-4

图18A

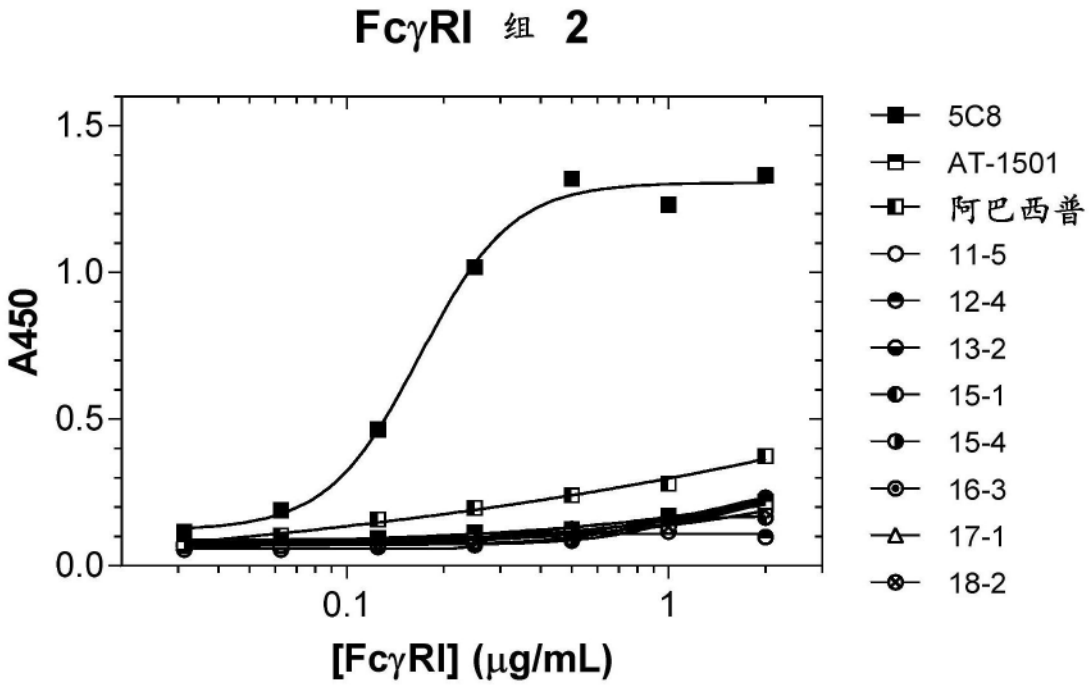

FcγRI 组 2
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
[FcγRI] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
11-5
12-4
13-2
15-1
15-4
16-3
17-1
18-2

图18B

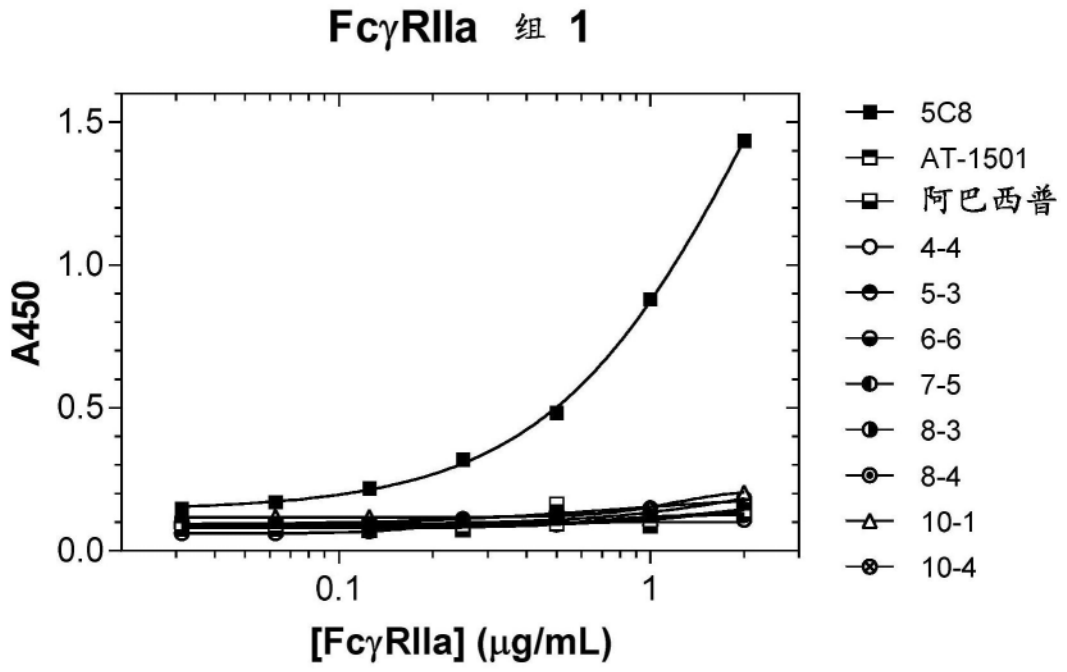

FcγRIIa 组 1
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
[FcγRIIa] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
4-4
5-3
6-6
7-5
8-3
8-4
10-1
10-4

图19A

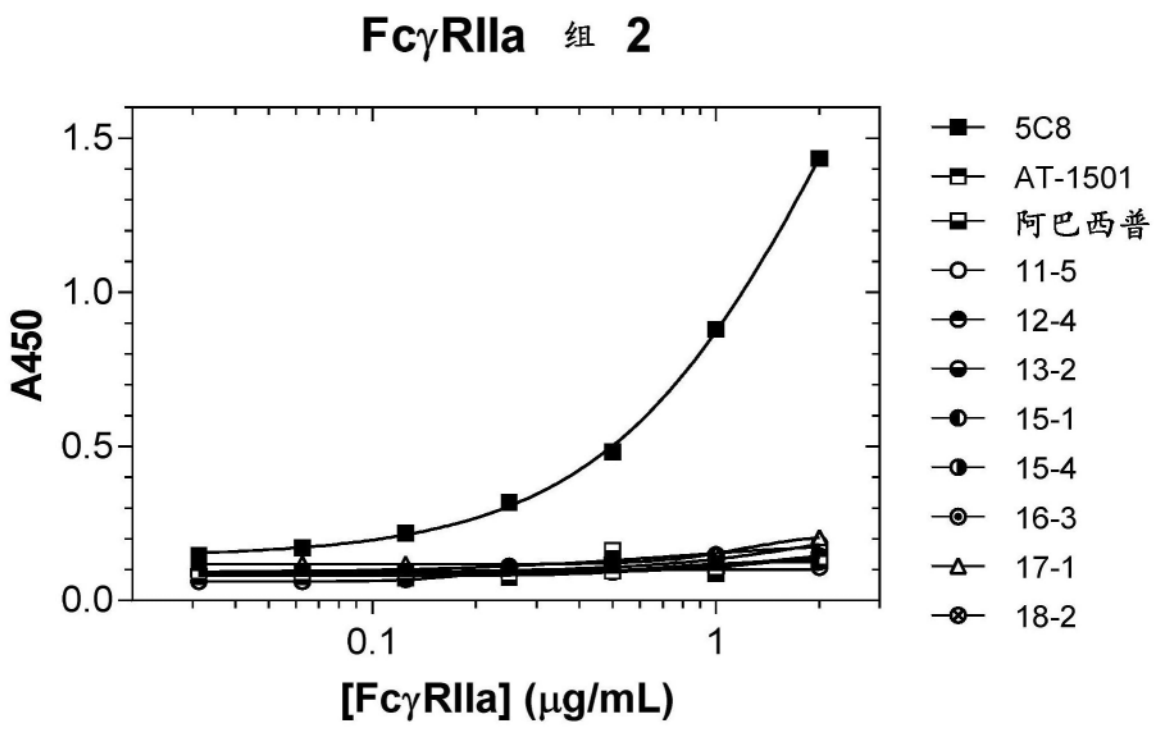

FcγRIIa 组 2
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
[FcγRIIa] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
11-5
12-4
13-2
15-1
15-4
16-3
17-1
18-2

图19B

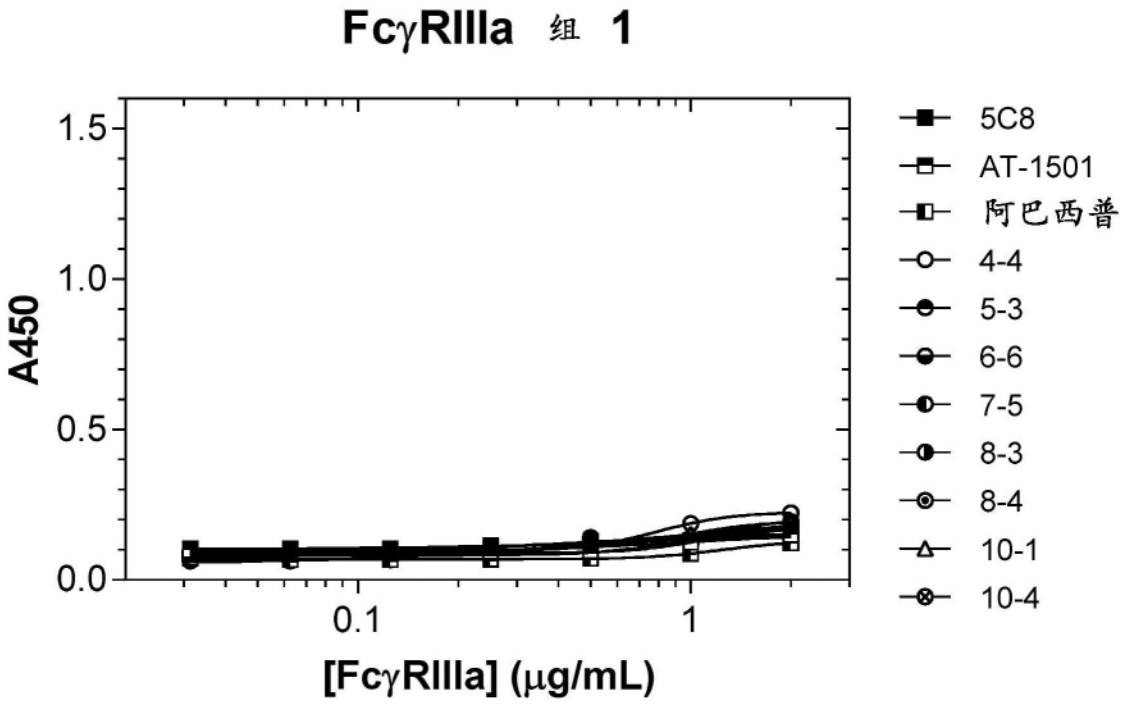

FcγRIIIa 组 1
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
[FcγRIIIa] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
4-4
5-3
6-6
7-5
8-3
8-4
10-1
10-4

图20A

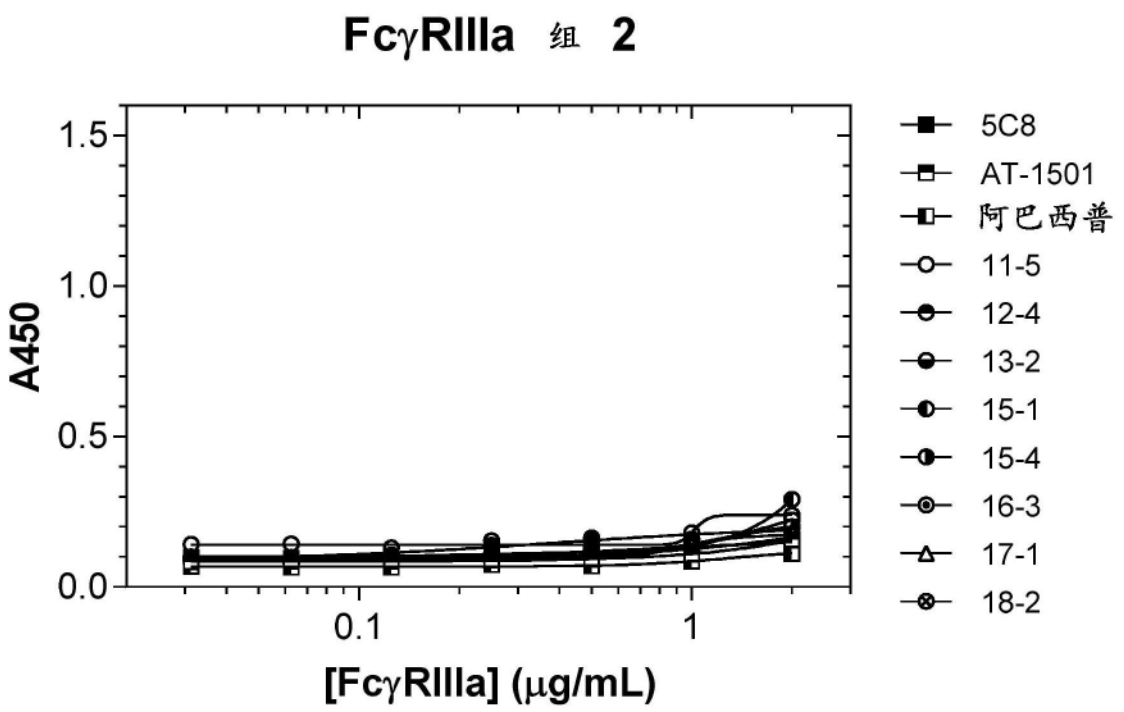

FcγRIIIa 组 2
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
[FcγRIIIa] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
11-5
12-4
13-2
15-1
15-4
16-3
17-1
18-2

图20B

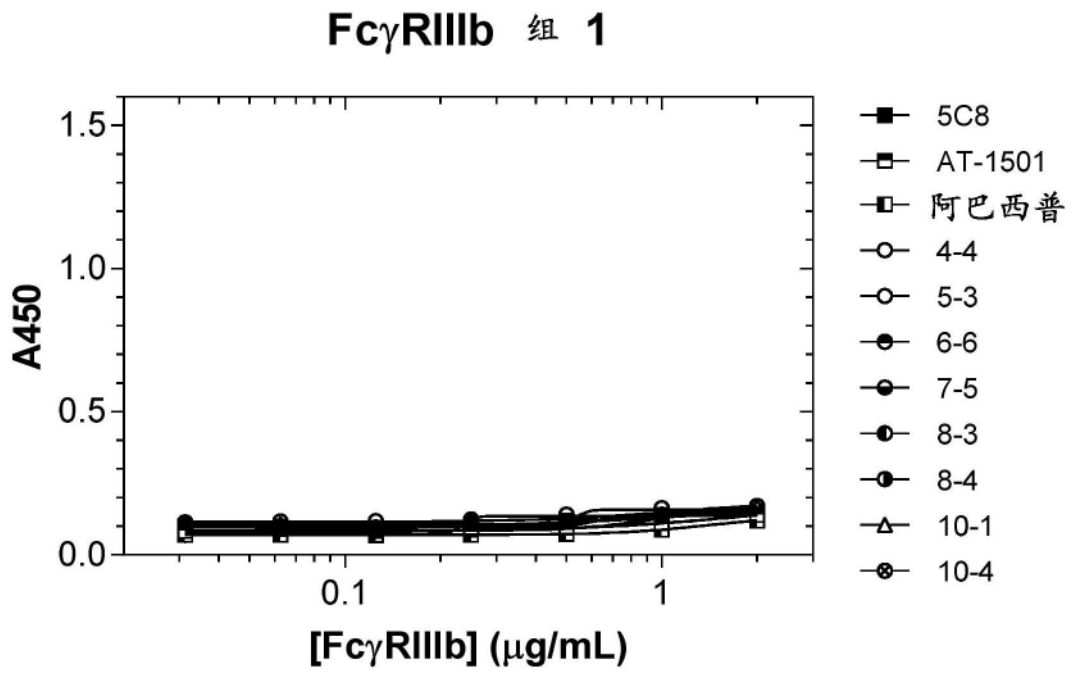

FcγRIIIb 组 1
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
[FcγRIIIb] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
4-4
5-3
6-6
7-5
8-3
8-4
10-1
10-4

图20C

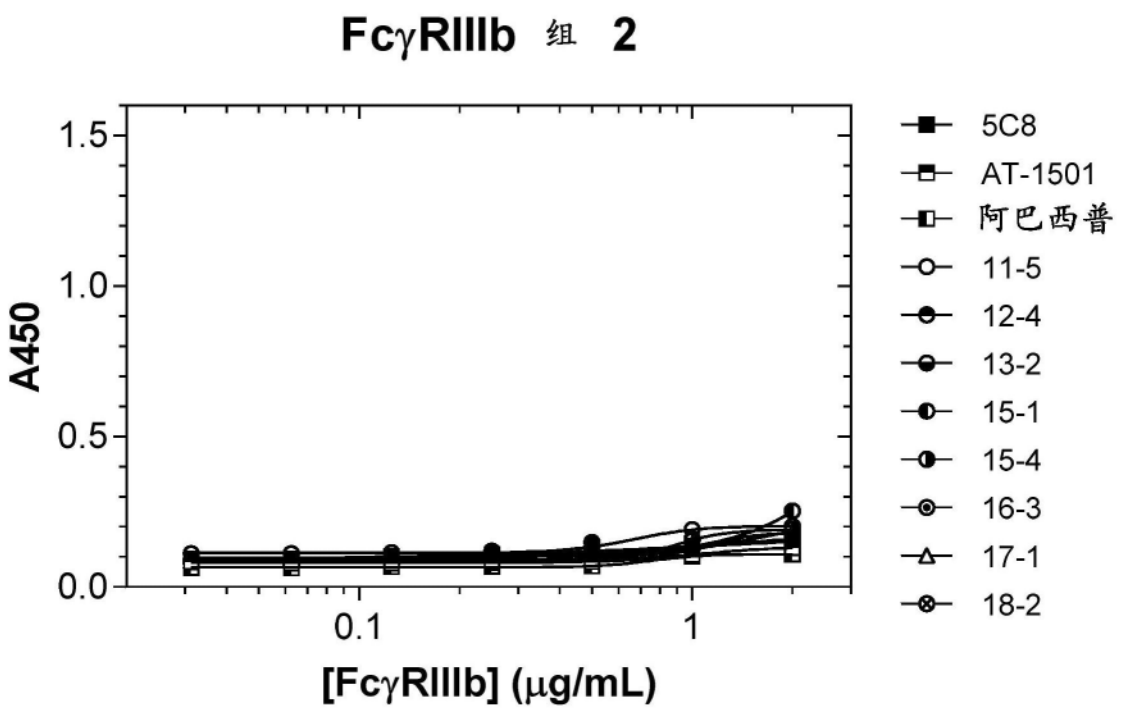

FcγRIIIb 组 2
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
[FcγRIIIb] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
11-5
12-4
13-2
15-1
15-4
16-3
17-1
18-2

图20D

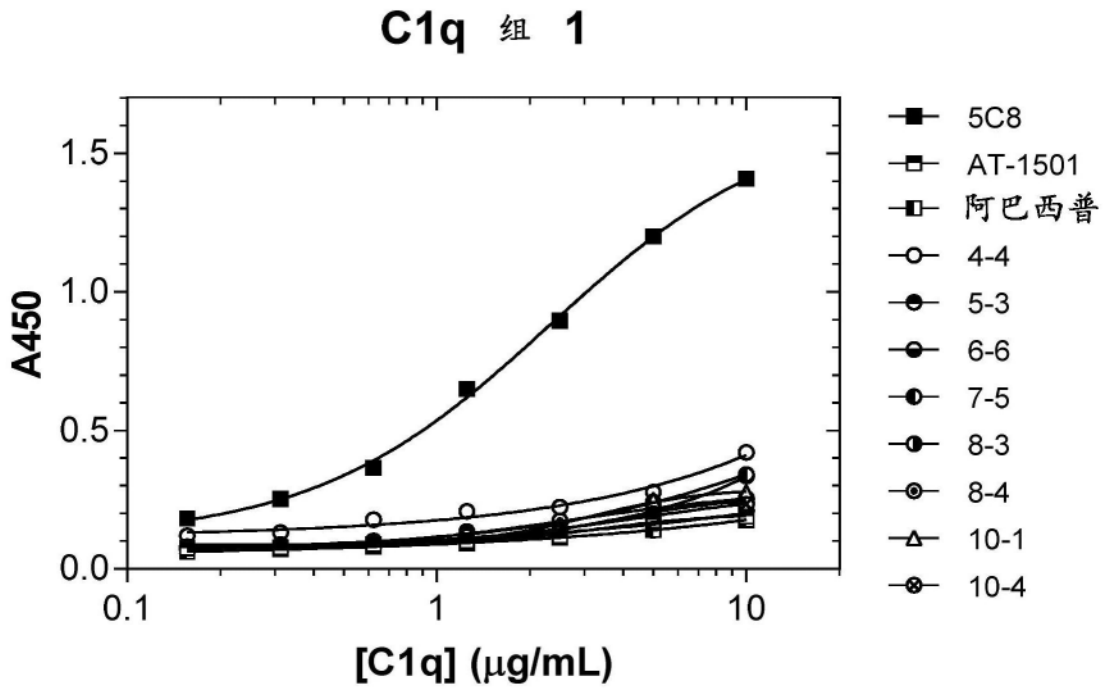

C1q 组 1
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
[C1q] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
4-4
5-3
6-6
7-5
8-3
8-4
10-1
10-4

图21A

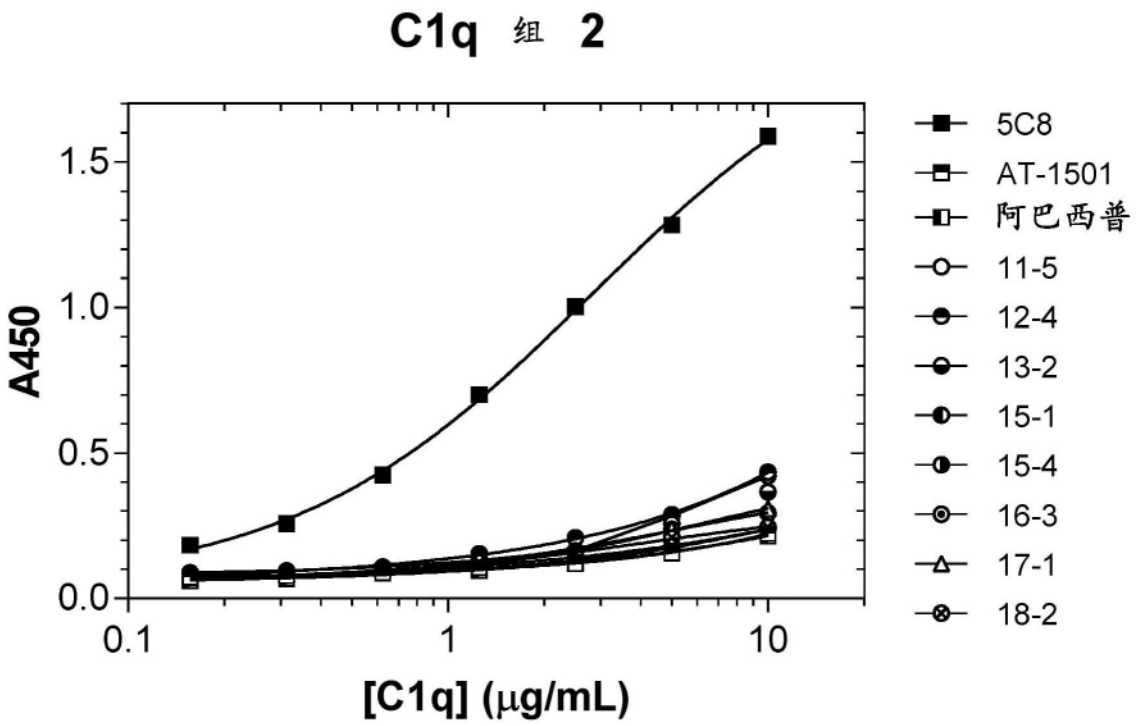

C1q 组 2
A450
1.5
1.0
0.5
0.0
0.1
1
10
[C1q] (μg/mL)
5C8
AT-1501
阿巴西普
11-5
12-4
13-2
15-1
15-4
16-3
17-1
18-2

图21B

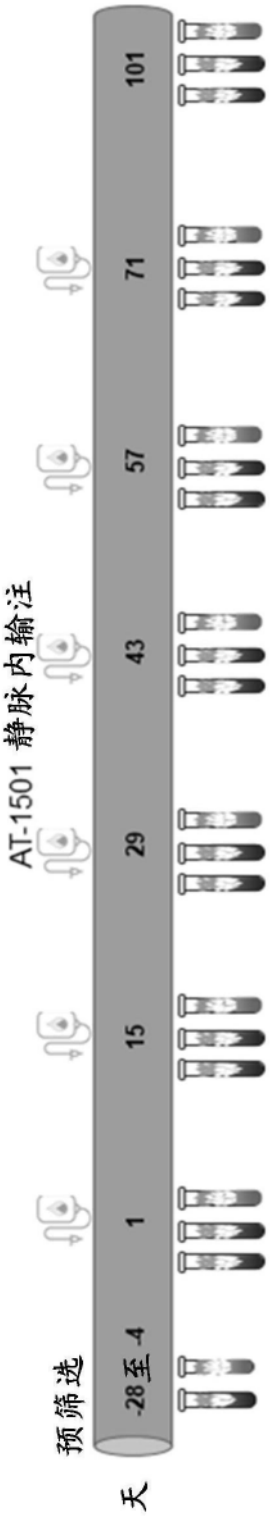


图22

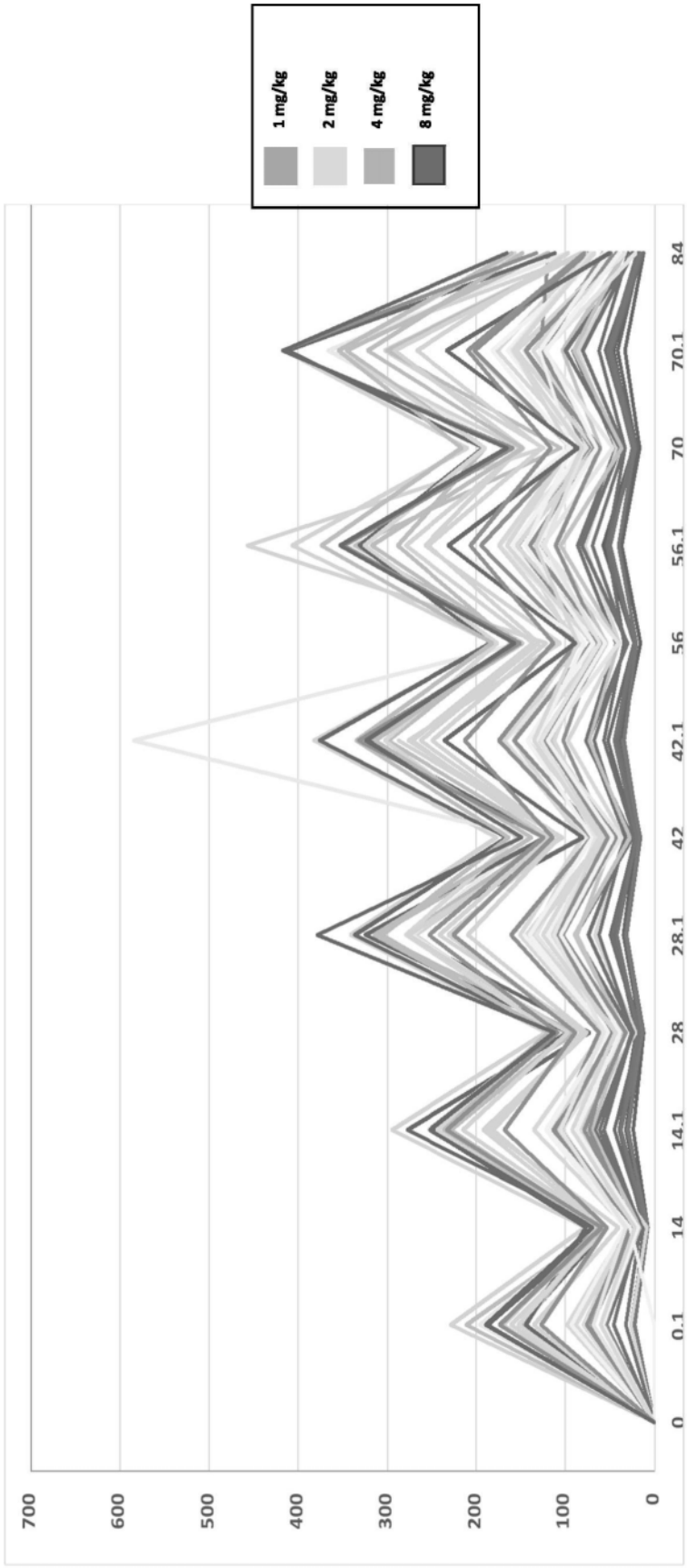

1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
700
600
500
400
300
200
100
0
0
0.1
14
14.1
28
28.1
42
42.1
56
56.1
70
70.1
84

图23

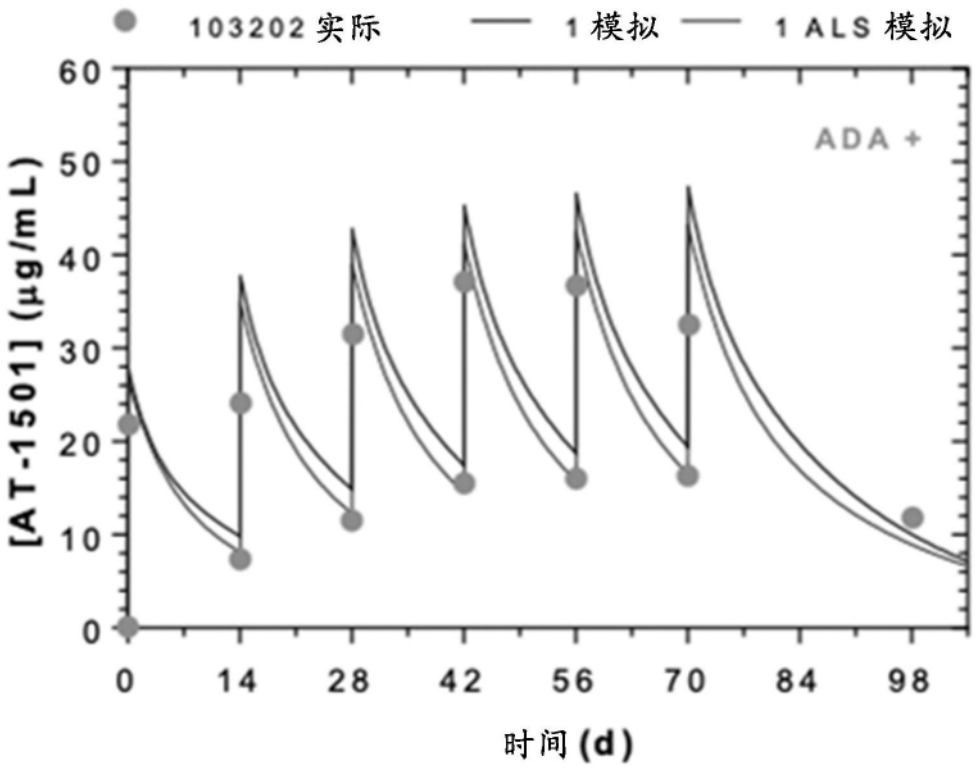

103202 实际
1 模拟
1 ALS 模拟
ADA +
[AT-1501] (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24A

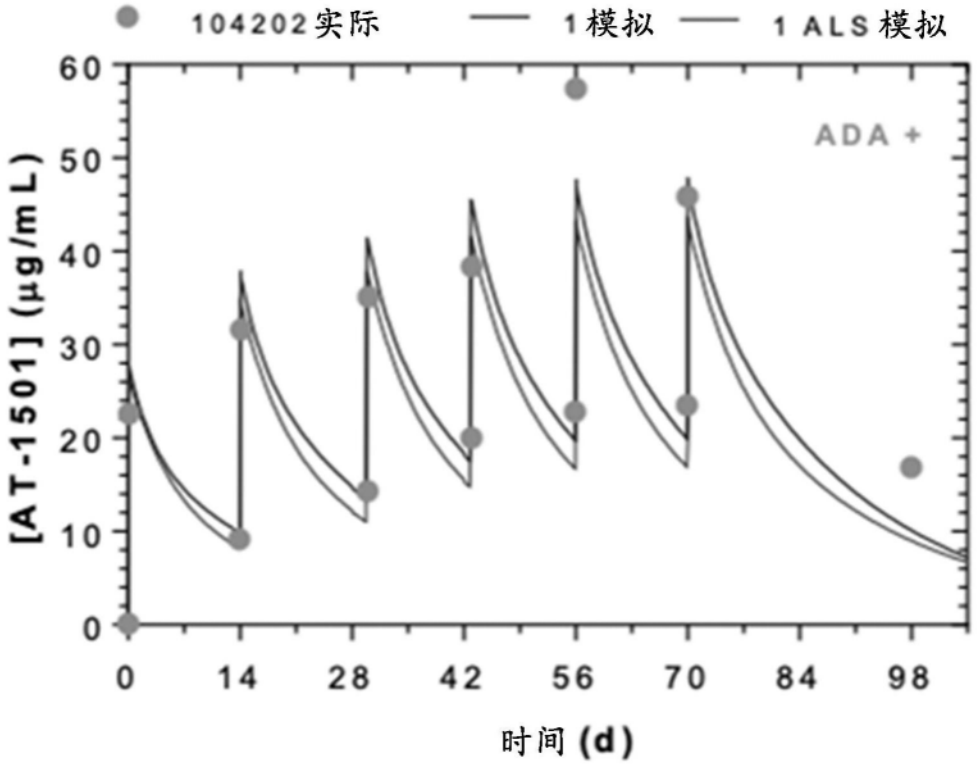

104202 实际
1 模拟
1 ALS 模拟
ADA +
[AT-1501] (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24B

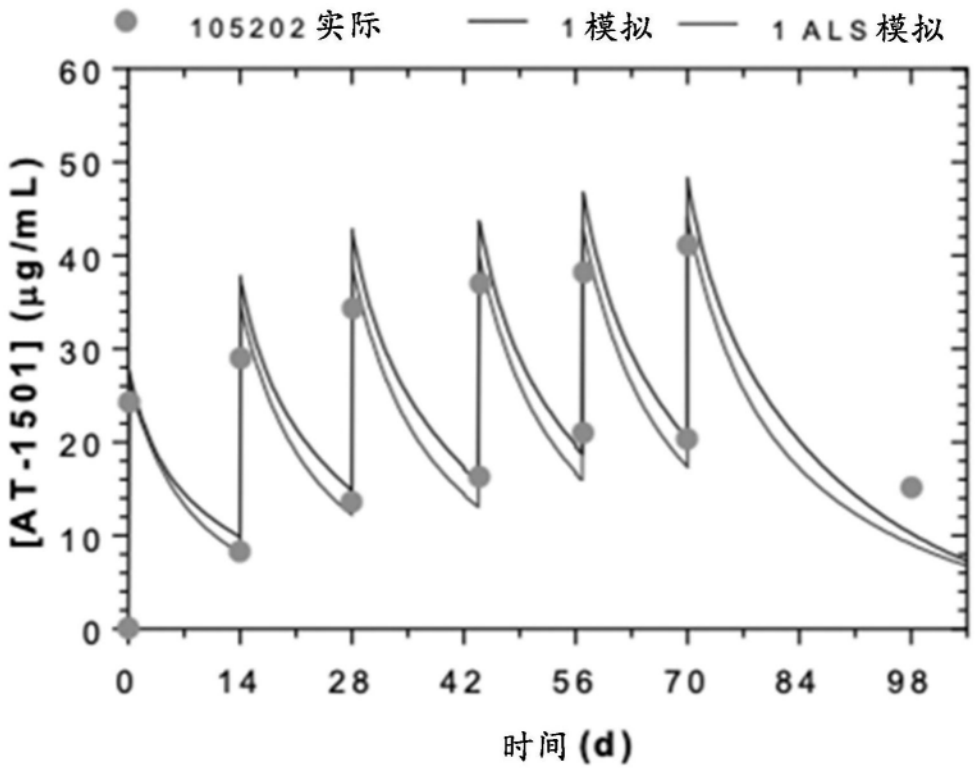

105202 实际
1 模拟
1 ALS 模拟
[AT-1501] (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24C

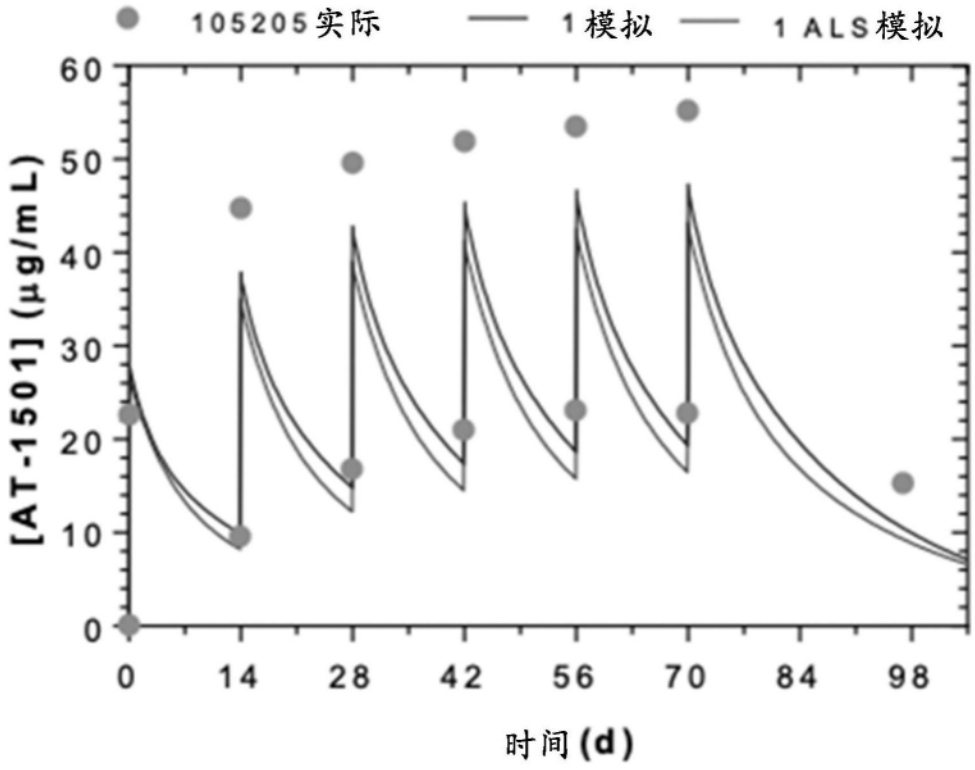

105205 实际
1 模拟
1 ALS 模拟
[AT-1501] (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24D

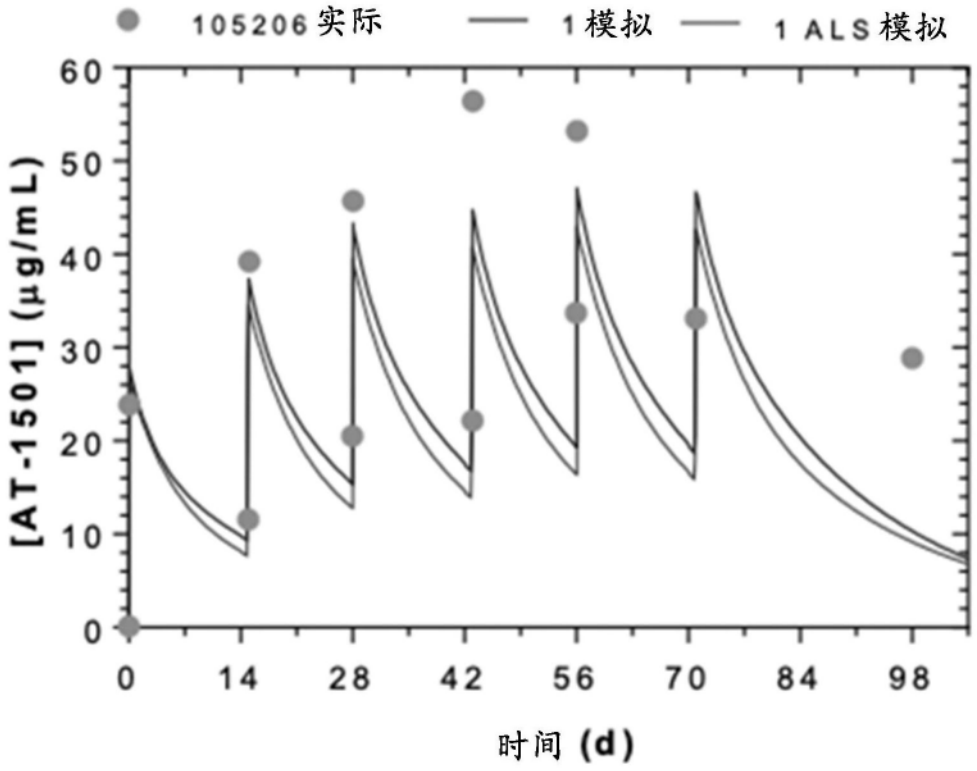

105206 实际
1 模拟
1 ALS 模拟
[AT-1501] (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24E

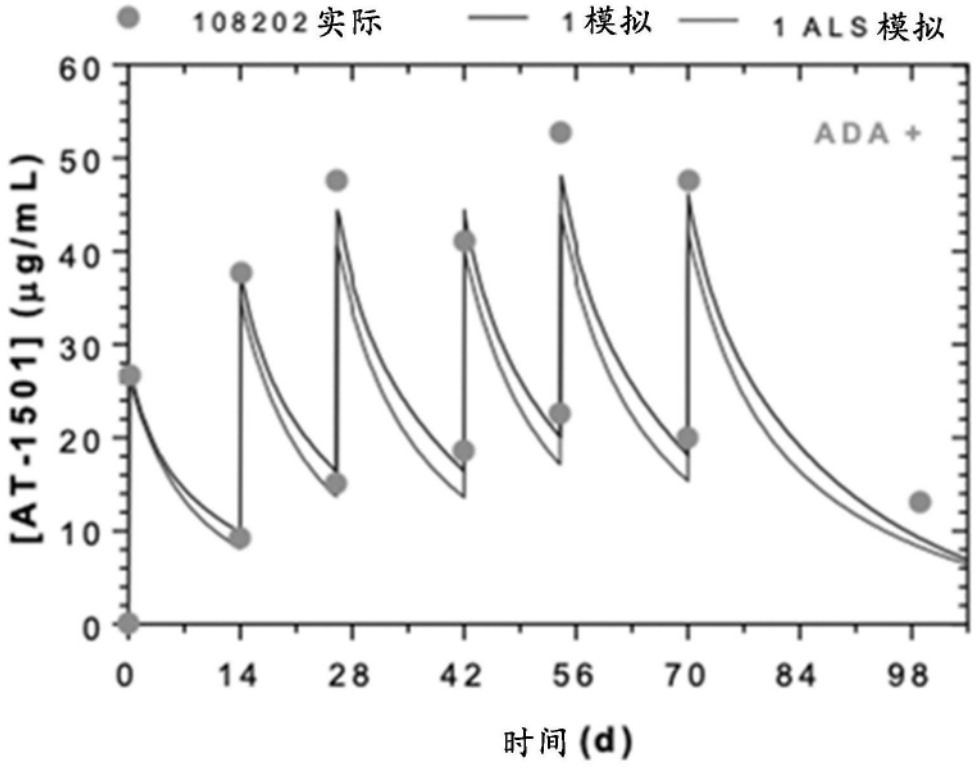

108202 实际
1 模拟
1 ALS 模拟
ADA +
[AT-1501] (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24F

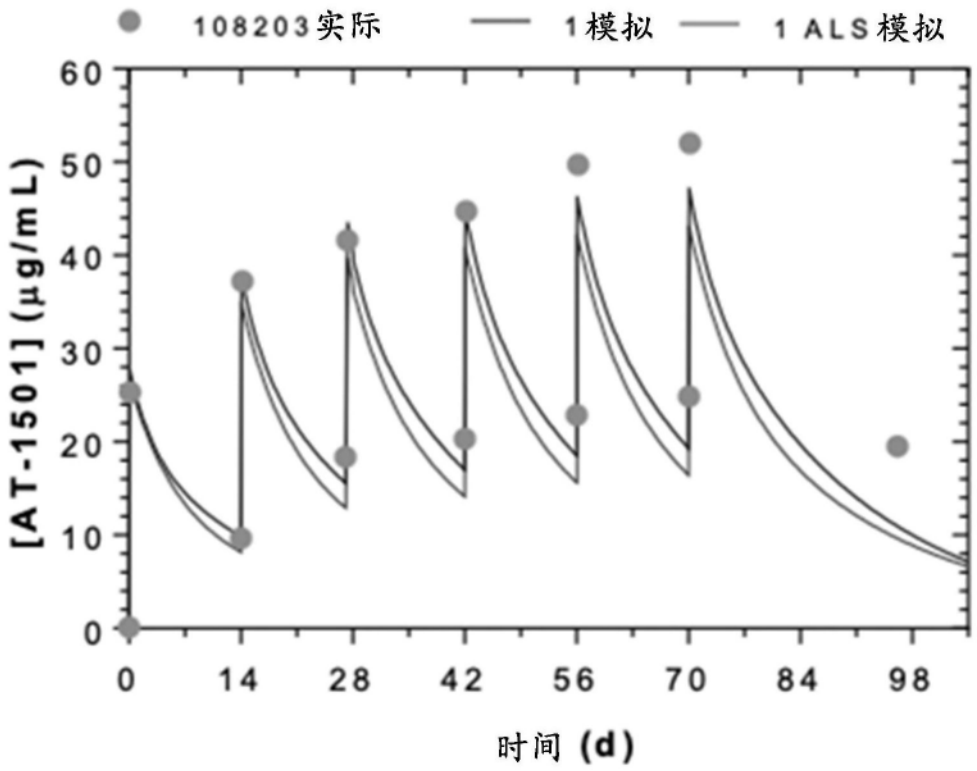

108203实际
1模拟
1 ALS模拟
[AT-1501] (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24G

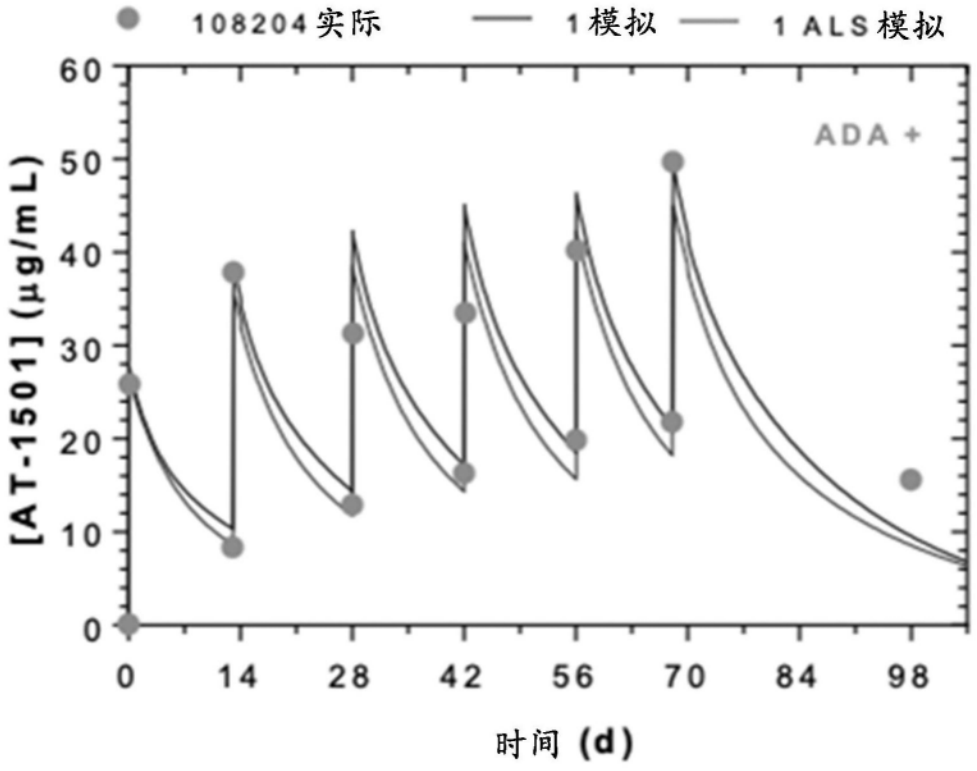

108204实际
1模拟
1 ALS模拟
ADA +
[AT-1501] (μg/mL)
0
10
20
30
40
50
60
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24H

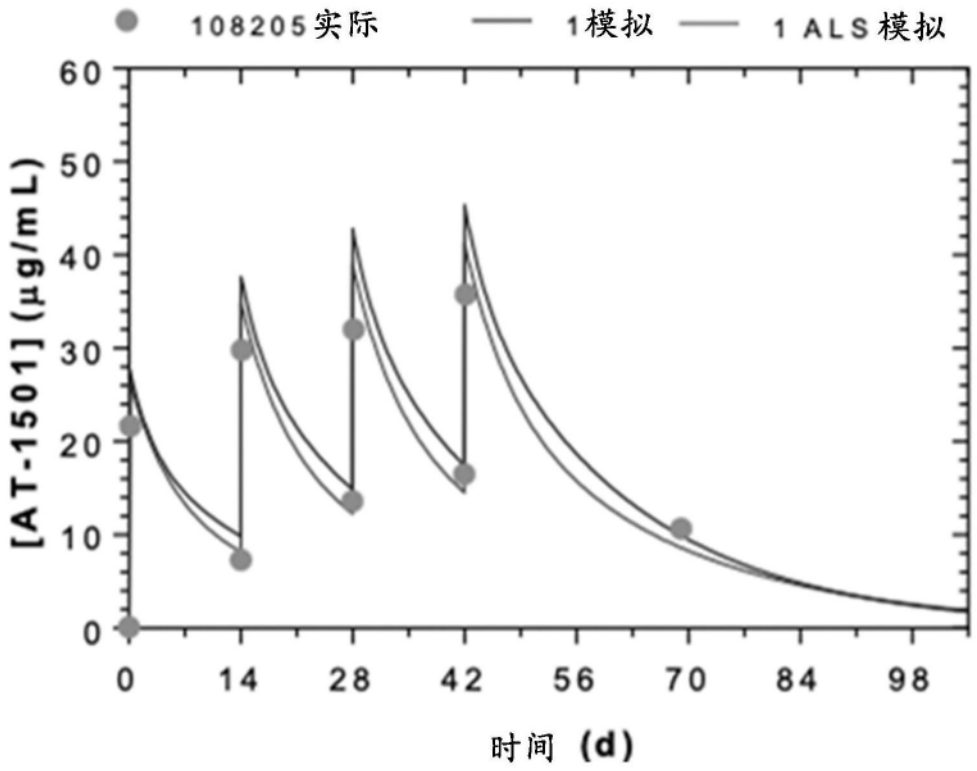

108205实际
1模拟
1 ALS模拟
[AT-1501] (μg/mL)
60
50
40
30
20
10
0
0
14
28
42
56
70
84
98
时间 (d)

图24I

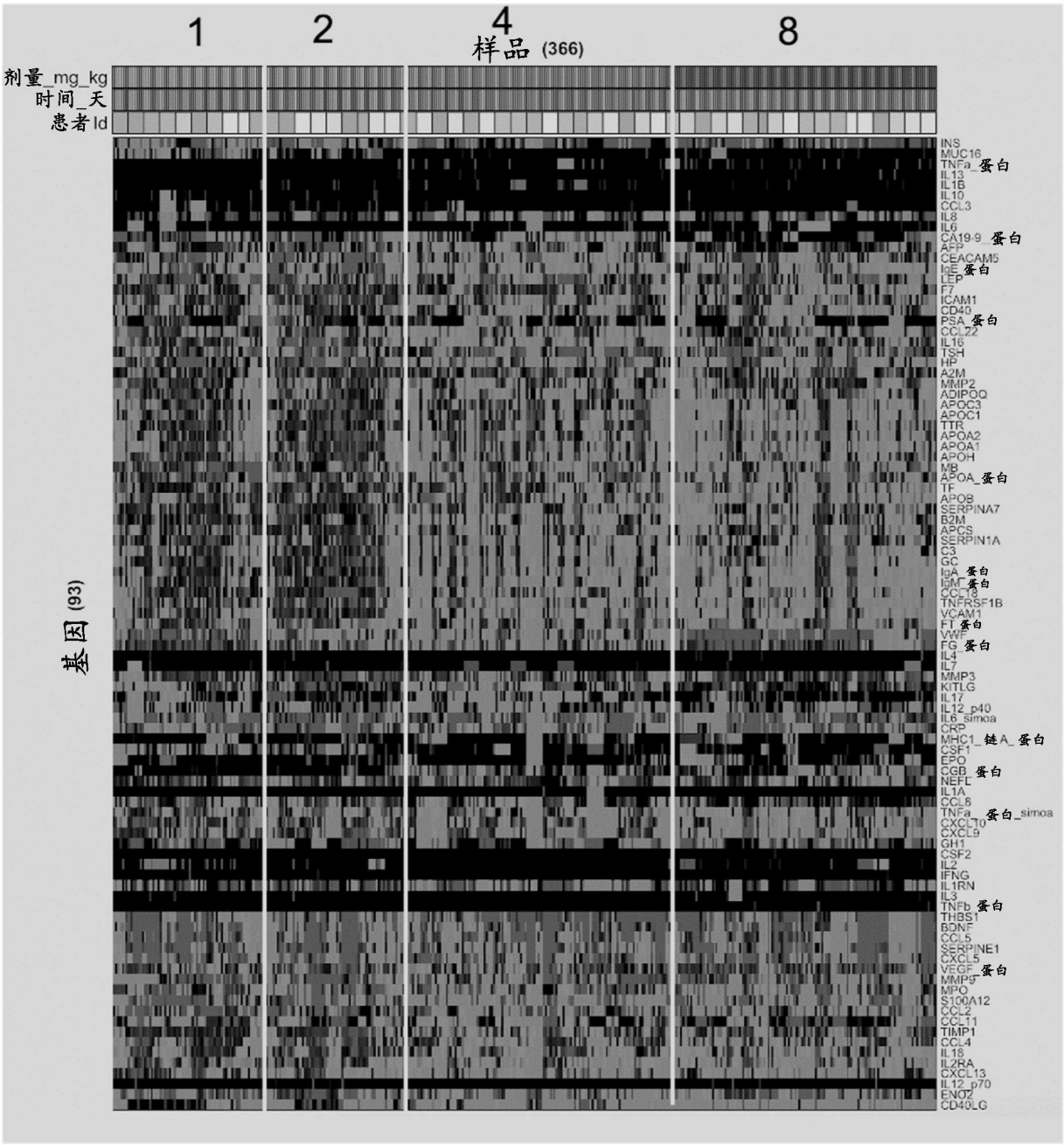

1
2
4
8
样品 (366)
剂量_mg_kg
时间_天
患者Id
基因 (93)
INS
MUC16
TNFa_蛋白
IL13
IL1B
IL10
CCL3
IL8
IL6
CA19-9_蛋白
AFP
CEACAM5
IgE_蛋白
LEP
F7
ICAM1
CD40
PSA_蛋白
CCL22
IL16
TSH
HP
A2M
MMP2
ADIPOQ
APOC3
APOC1
TTR
APOA2
APOA1
APOH
MB
APOA_蛋白
TF
APOB
SERPINA7
B2M
APCS
SERPIN1A
C3
GC
IgA_蛋白
IgM_蛋白
CCL19
TNFRSF1B
VCAM1
FT_蛋白
VWF
FG_蛋白
IL4
IL7
MMP3
KITLG
IL17
IL12_p40
IL6_simoa
CRP
MHC1_链A_蛋白
CSF1
EPO
CGB_蛋白
NEFL
IL1A
CCL8
TNFa_蛋白_simoa
CXCL10
CXCL9
GH1
CSF2
IL2
IFNG
IL1RN
IL3
TNFb_蛋白
THBS1
BDNF
CCL5
SERPINE1
CXCL5
VEGF_蛋白
MMP9
MPO
S100A12
CCL2
CCL11
TIMP1
CCL4
IL18
IL2RA
CXCL13
IL12_p70
ENO2
CD40LG
log2比率
0.5
0
-0.5

图25

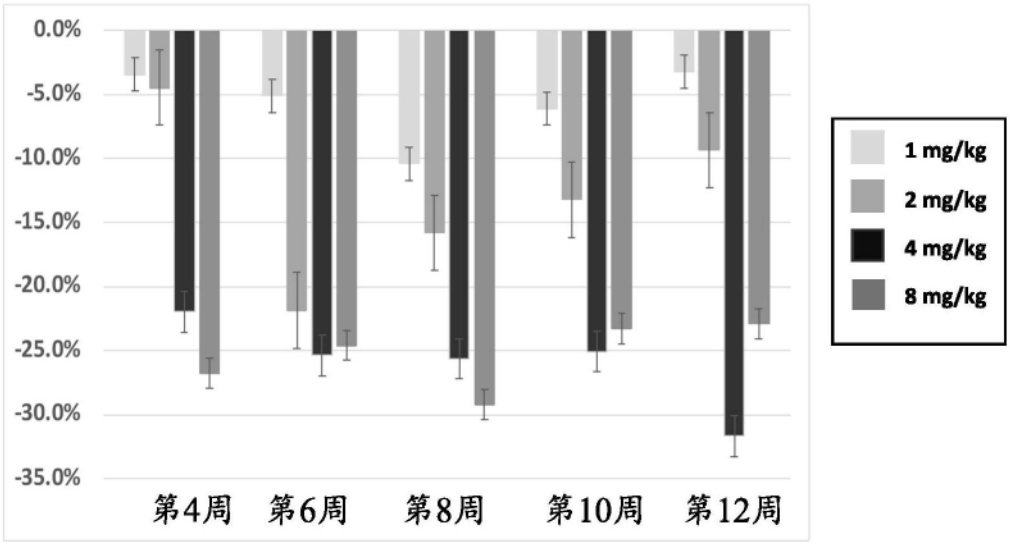

0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
-35.0%
第4周
第6周
第8周
第10周
第12周
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg

图26A

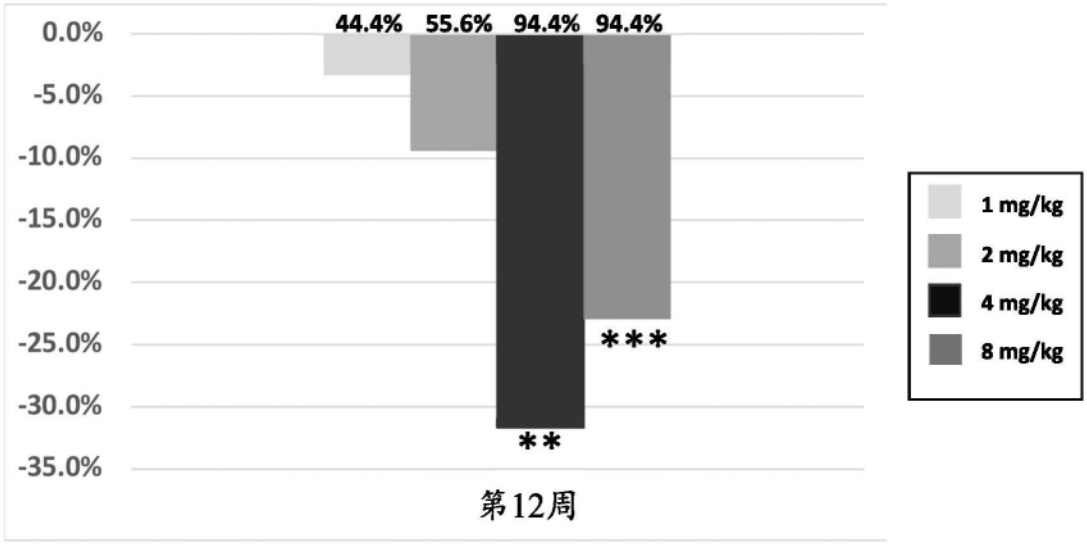

0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
-35.0%
44.4%
55.6%
94.4%
94.4%
**
***
第12周
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg

图26B

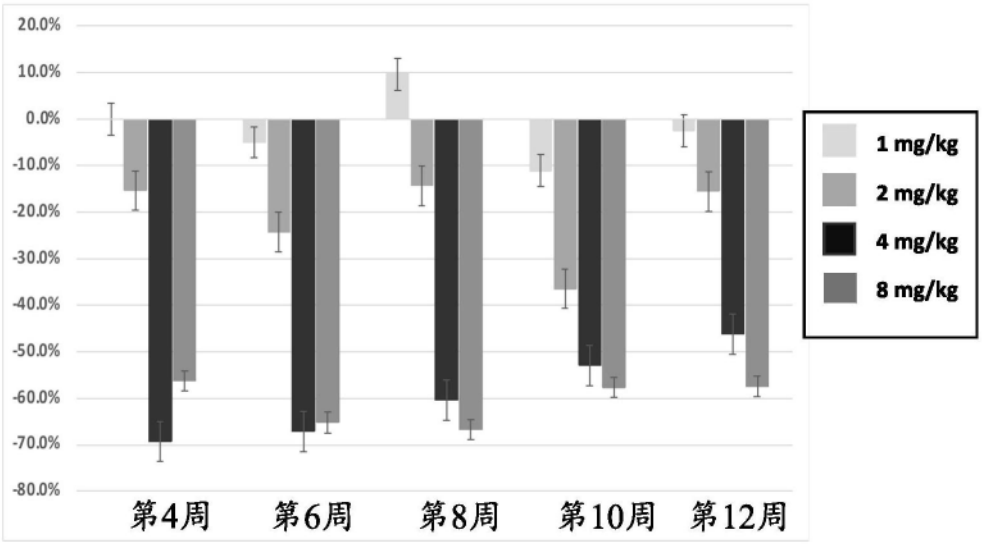

20.0%
10.0%
0.0%
-10.0%
-20.0%
-30.0%
-40.0%
-50.0%
-60.0%
-70.0%
-80.0%
第4周
第6周
第8周
第10周
第12周
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg

图27A

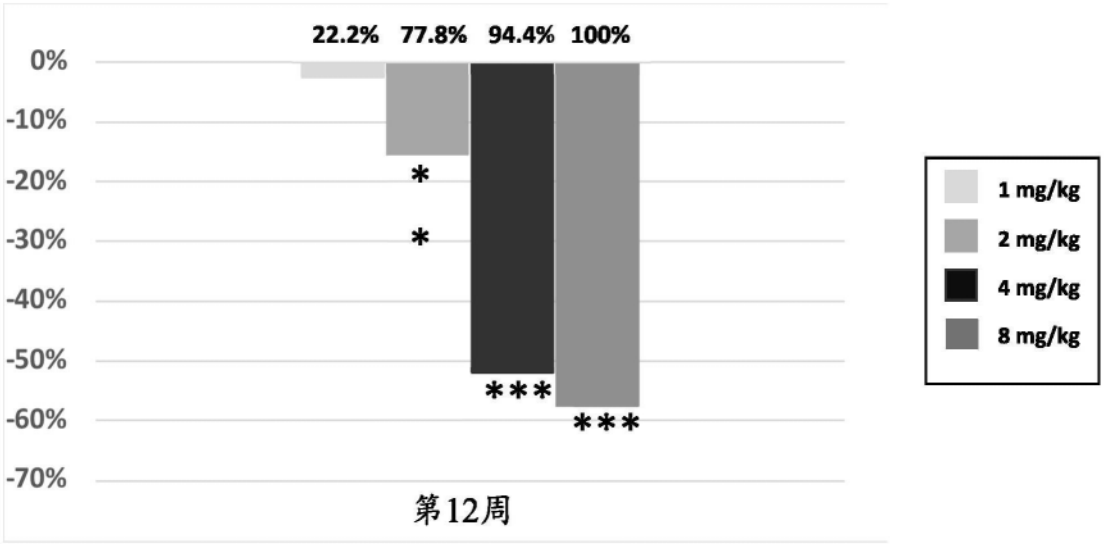

22.2%
77.8%
94.4%
100%
0%
-10%
-20%
-30%
-40%
-50%
-60%
-70%
*
*
***
***
第12周
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg

图27B

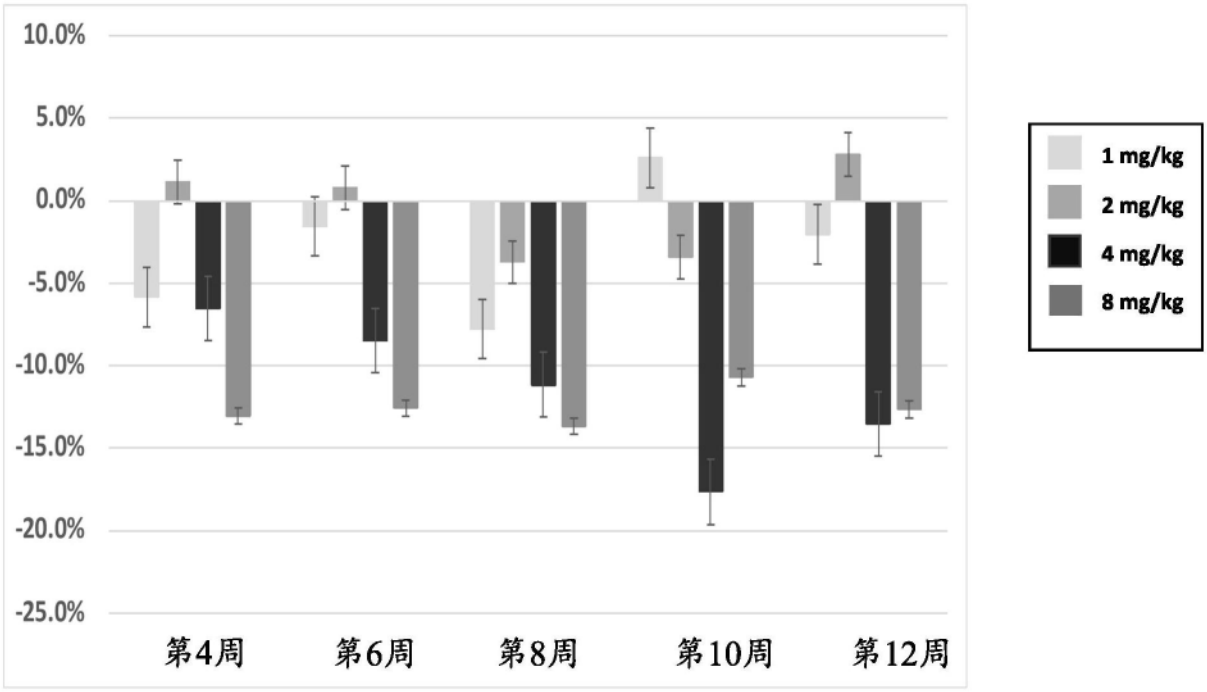

10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
第4周
第6周
第8周
第10周
第12周
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg

图28A

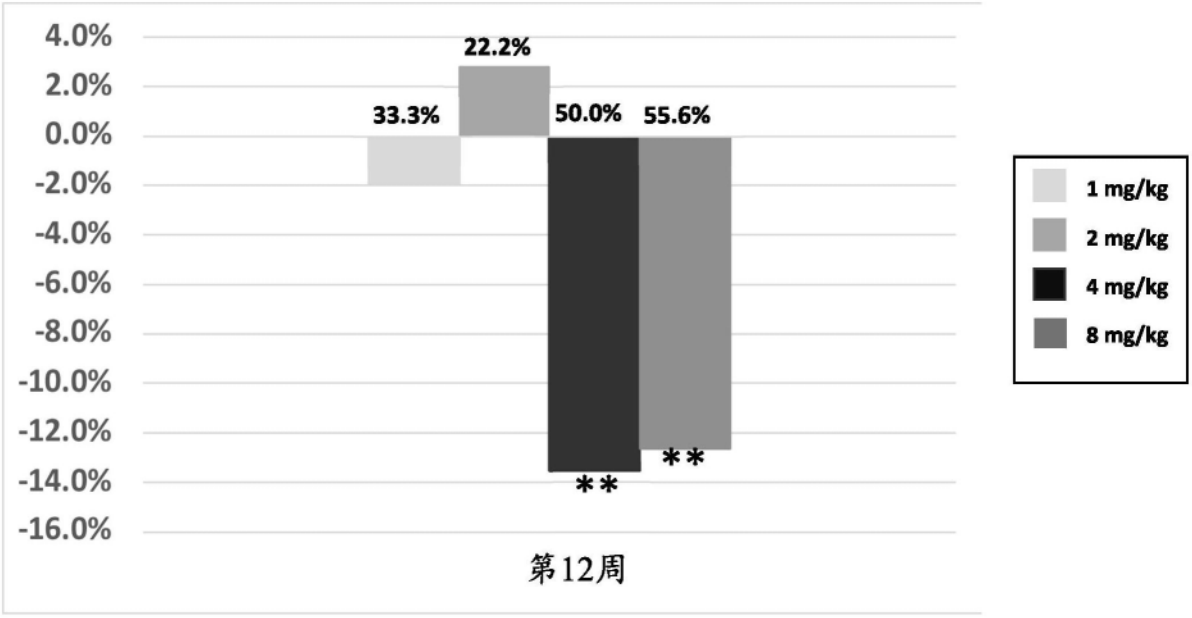

4.0%
2.0%
0.0%
-2.0%
-4.0%
-6.0%
-8.0%
-10.0%
-12.0%
-14.0%
-16.0%
33.3%
22.2%
50.0%
55.6%
**
**
第12周
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg

图28B

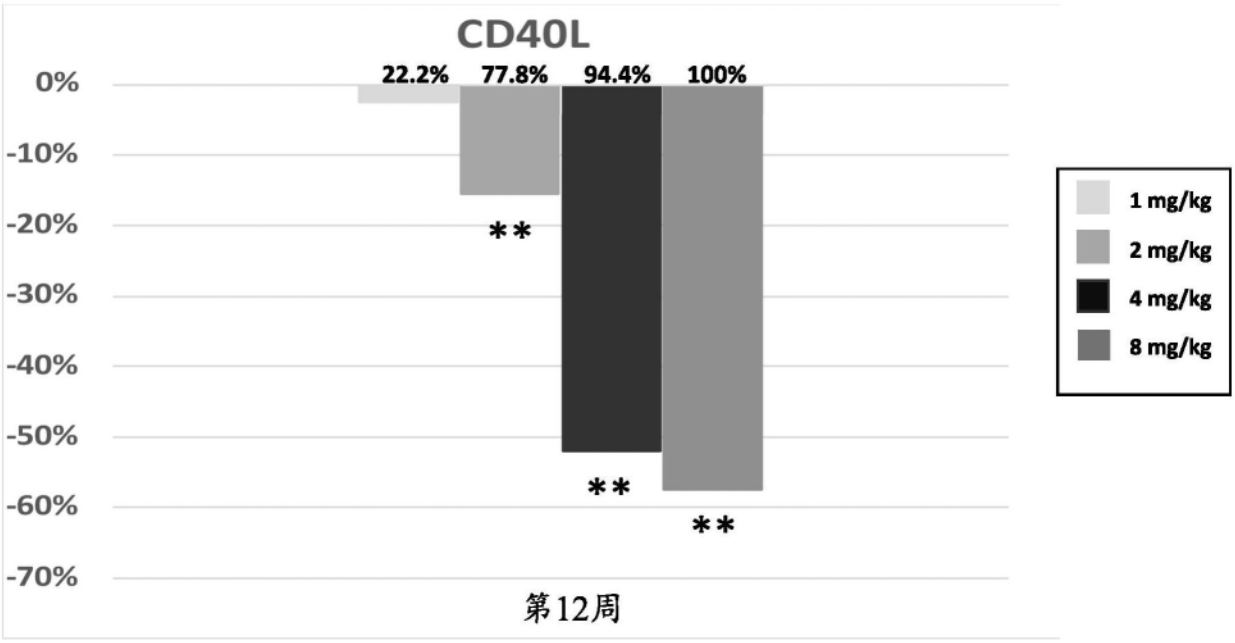

CD40L
22.2%
77.8%
94.4%
100%
0%
-10%
-20%
-30%
-40%
-50%
-60%
-70%
**
**
**
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29A

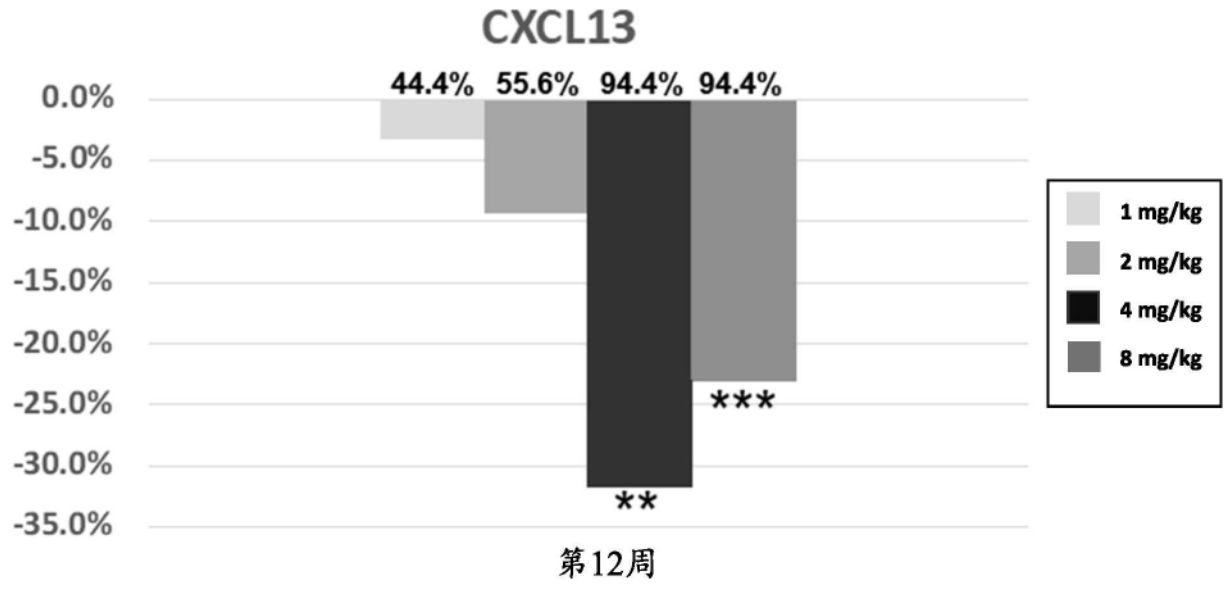

CXCL13
44.4%
55.6%
94.4%
94.4%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
-35.0%
**
***
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29B

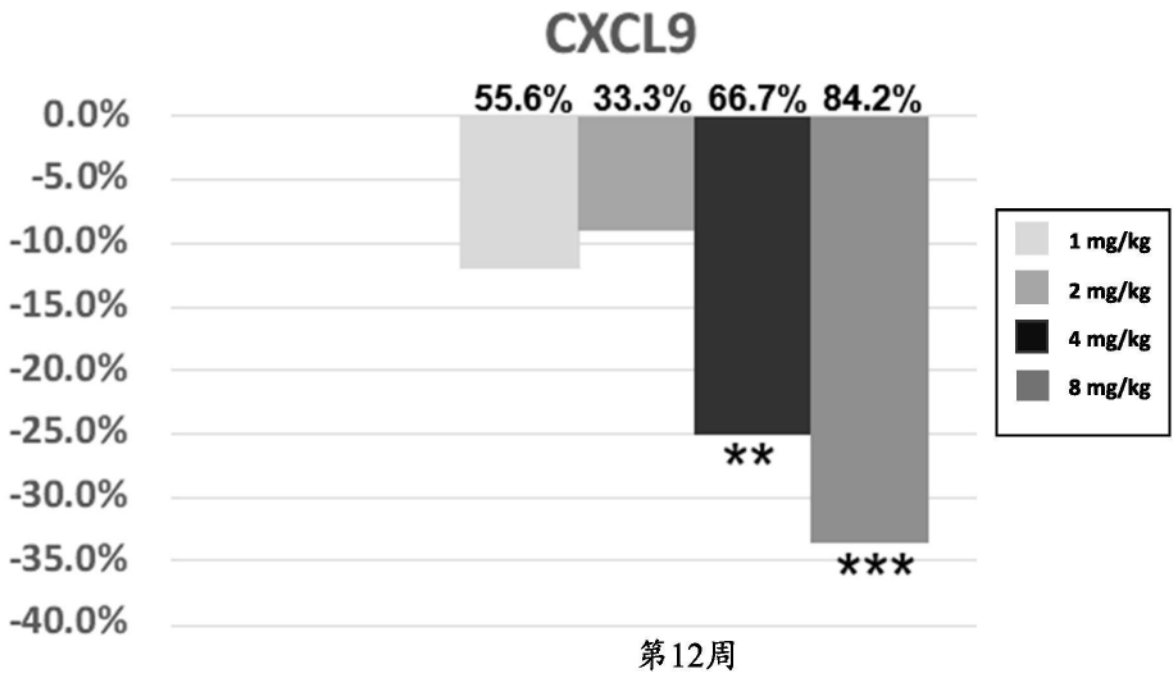

CXCL9
55.6%
33.3%
66.7%
84.2%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
-35.0%
-40.0%
**
***
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29C

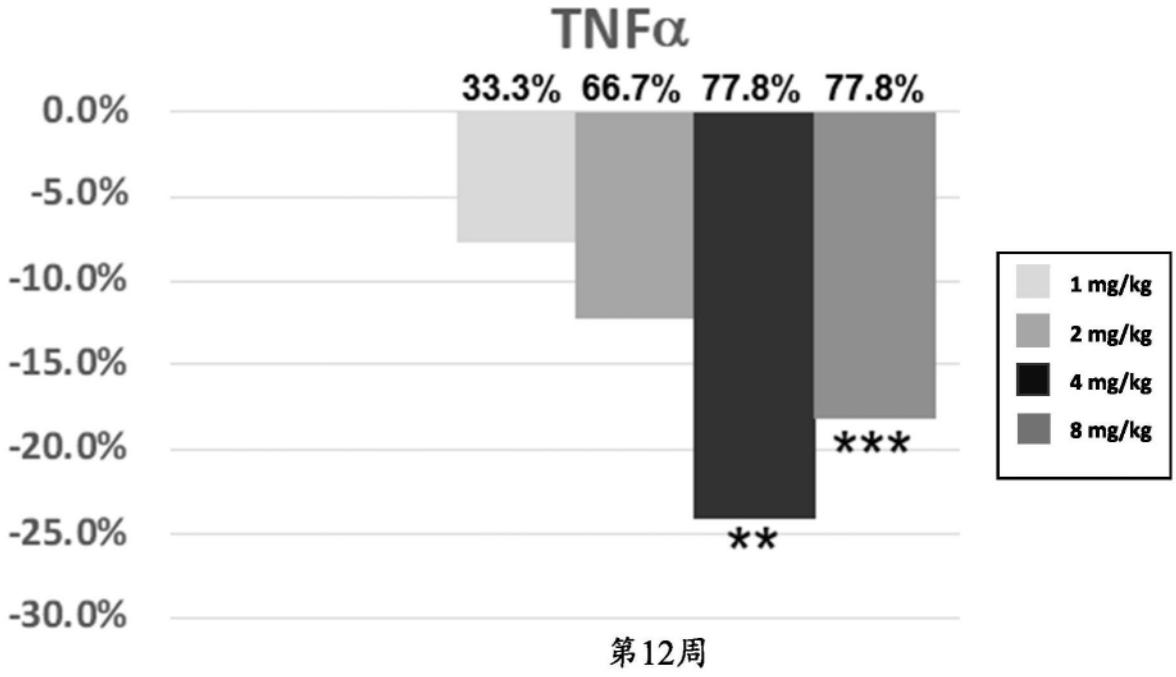

TNFα
33.3%
66.7%
77.8%
77.8%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
***
**
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29D

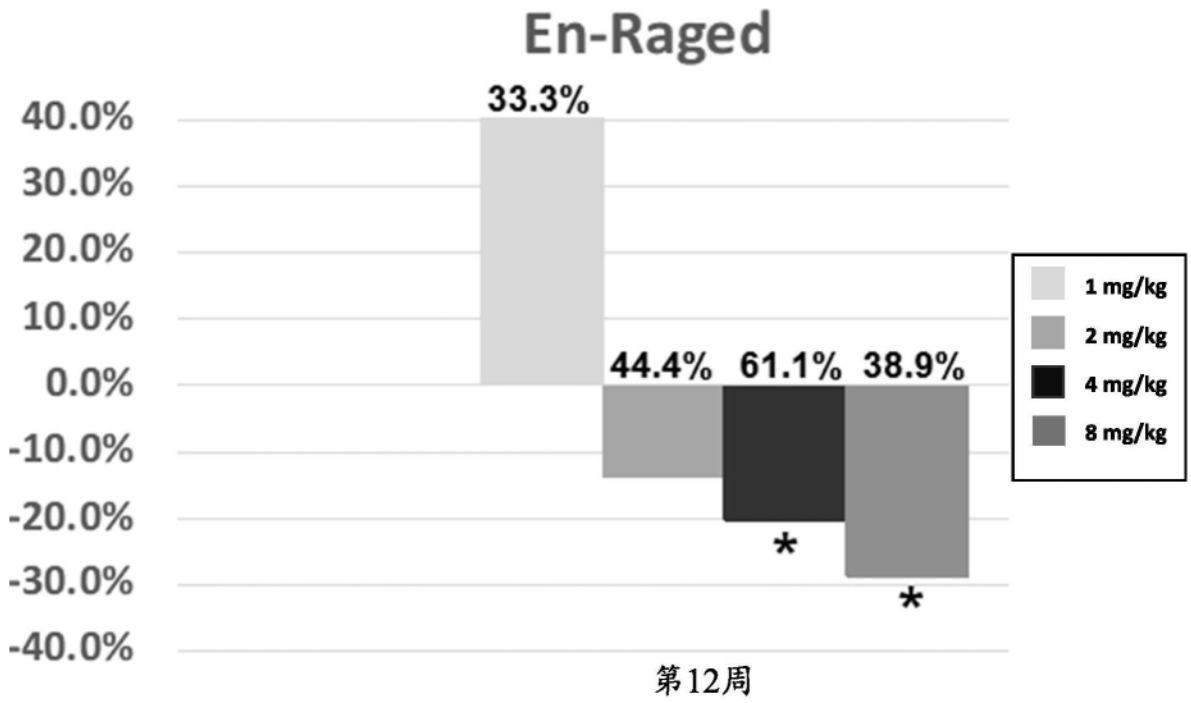

En-Raged
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
-10.0%
-20.0%
-30.0%
-40.0%
33.3%
44.4%
61.1%
38.9%
*
*
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29E

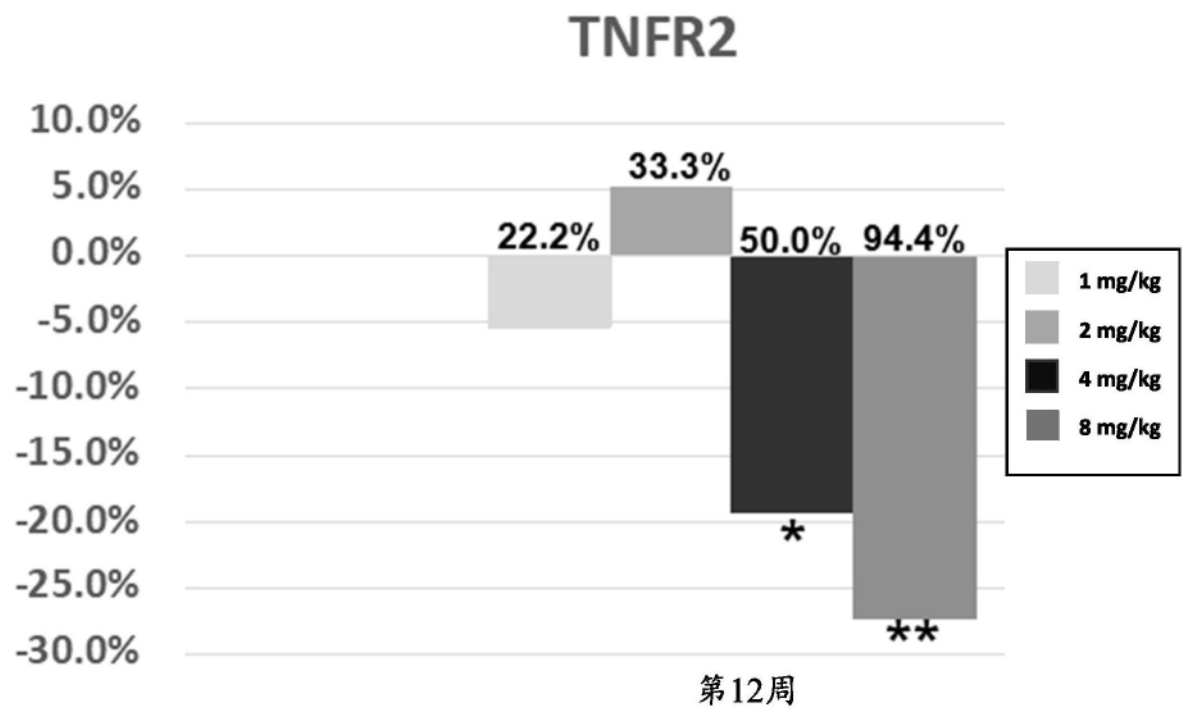

TNFR2
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
22.2%
33.3%
50.0%
94.4%
*
**
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29F

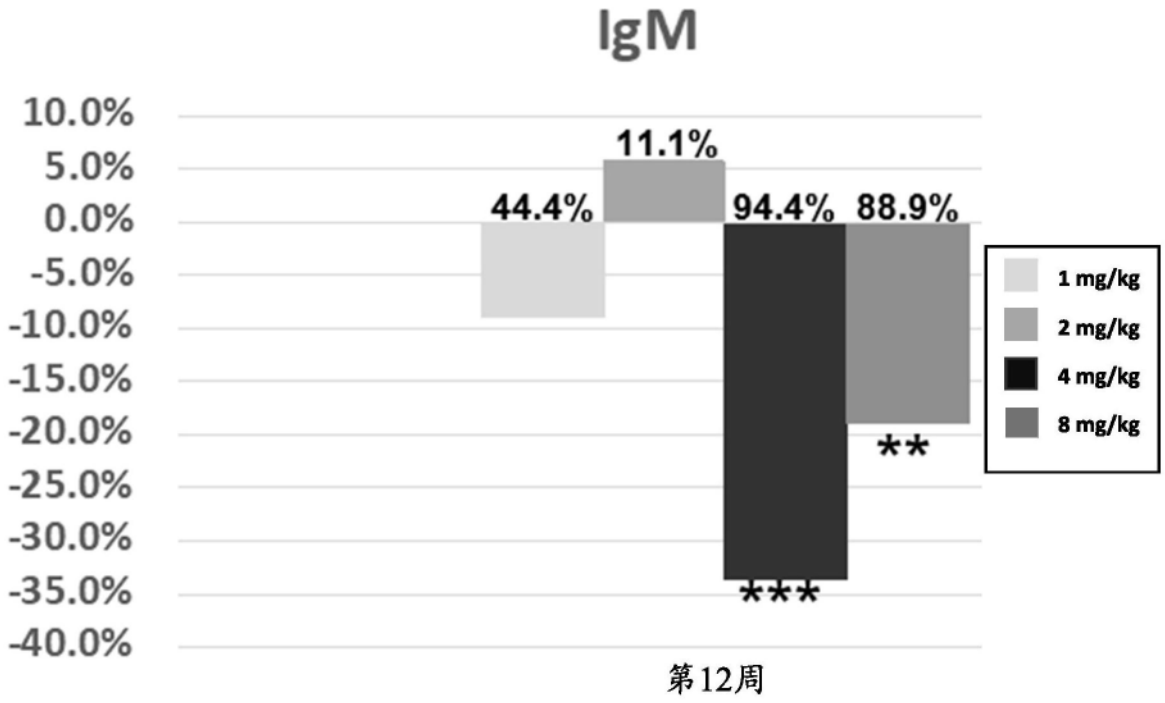

IgM
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
-35.0%
-40.0%
44.4%
11.1%
94.4%
88.9%
**
***
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29G

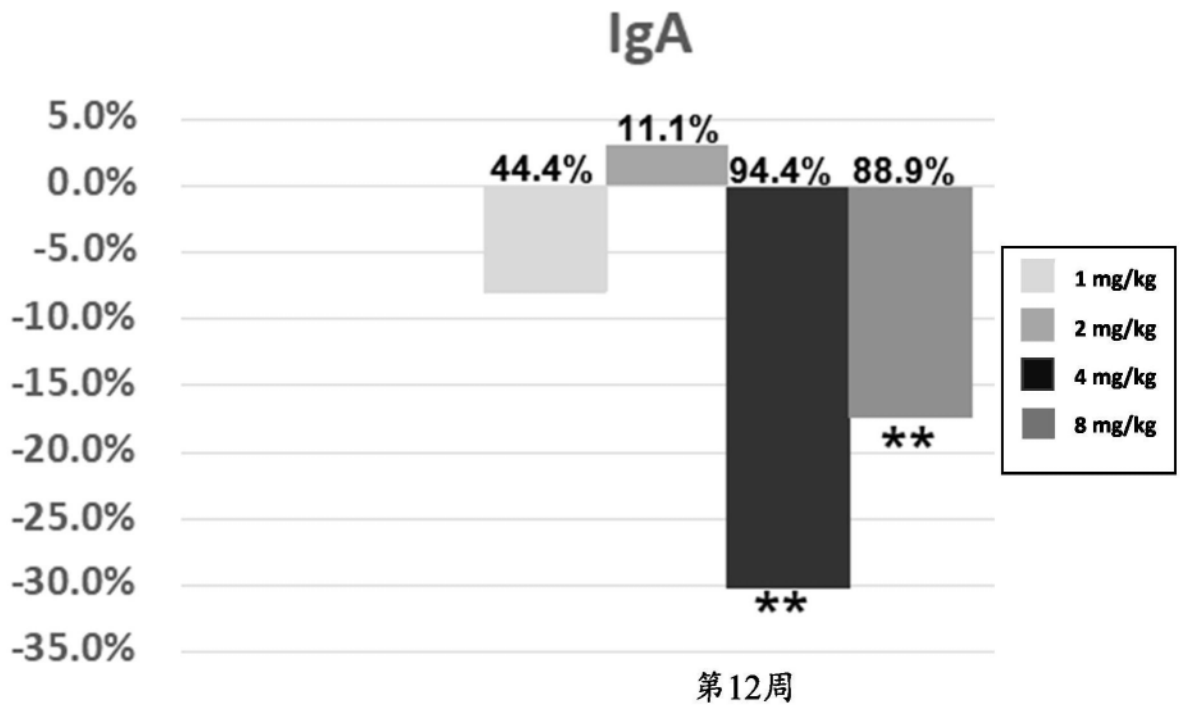

IgA
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
-35.0%
44.4%
11.1%
94.4%
88.9%
**
**
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29H

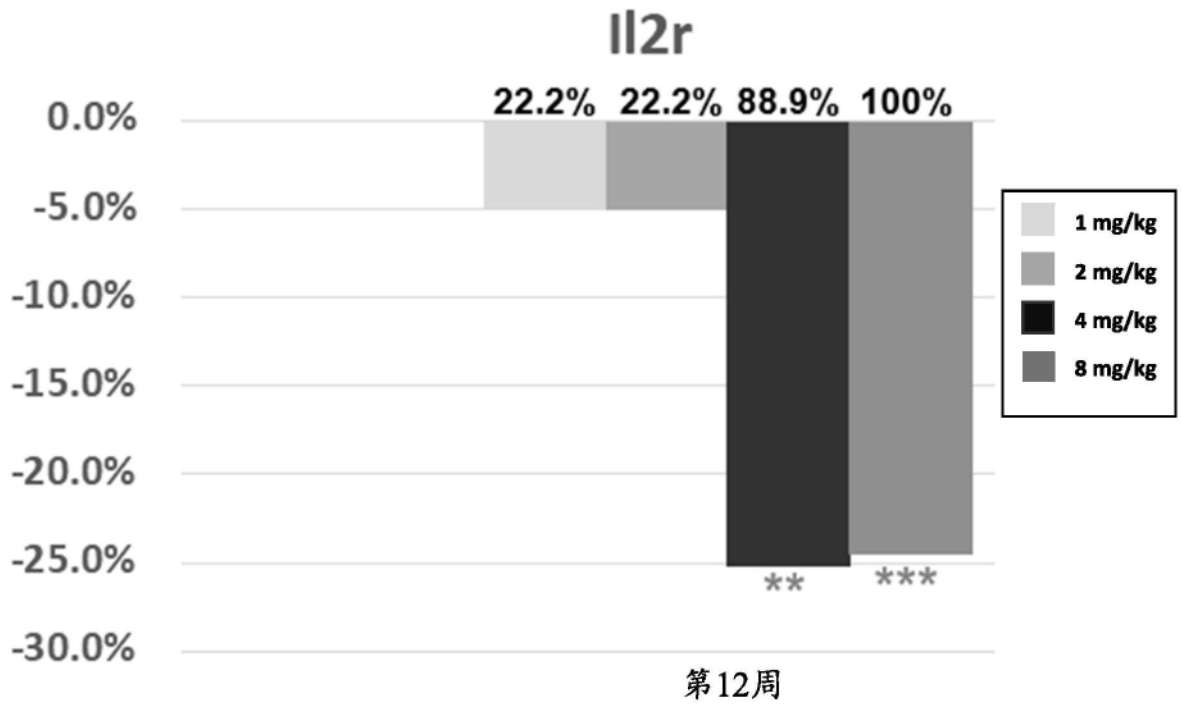

Il2r
22.2%
22.2%
88.9%
100%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
**
***
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29I

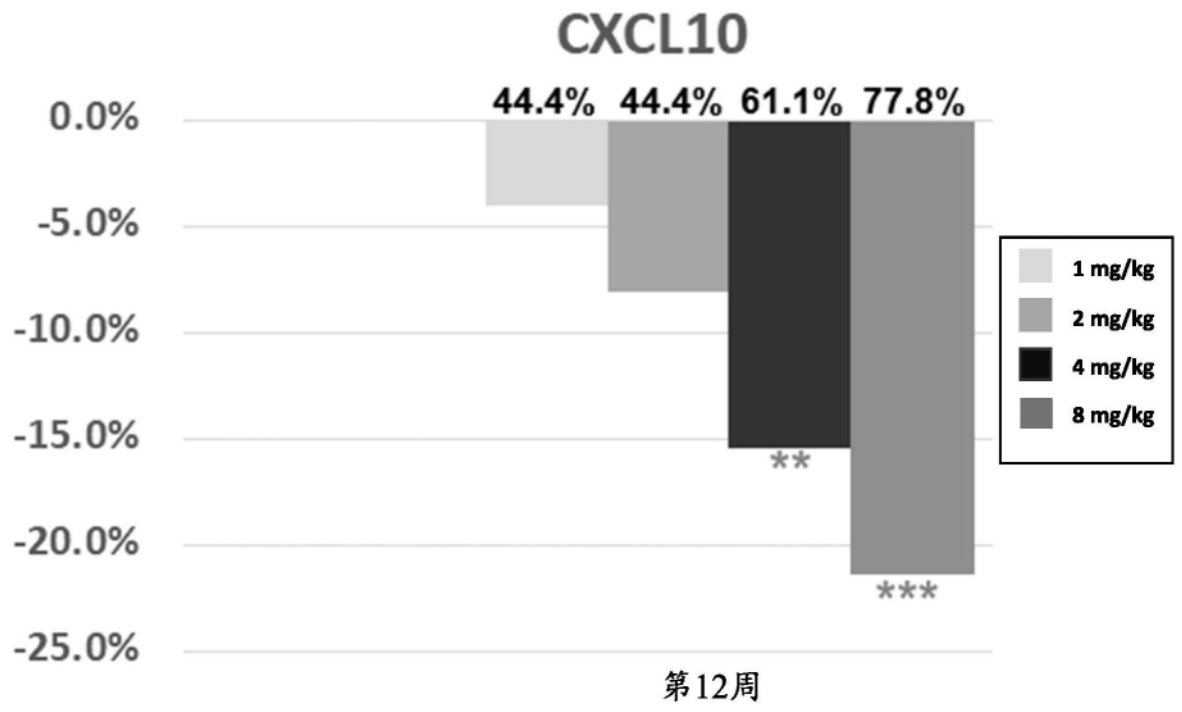

CXCL10
44.4%
44.4%
61.1%
77.8%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
**
***
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29J

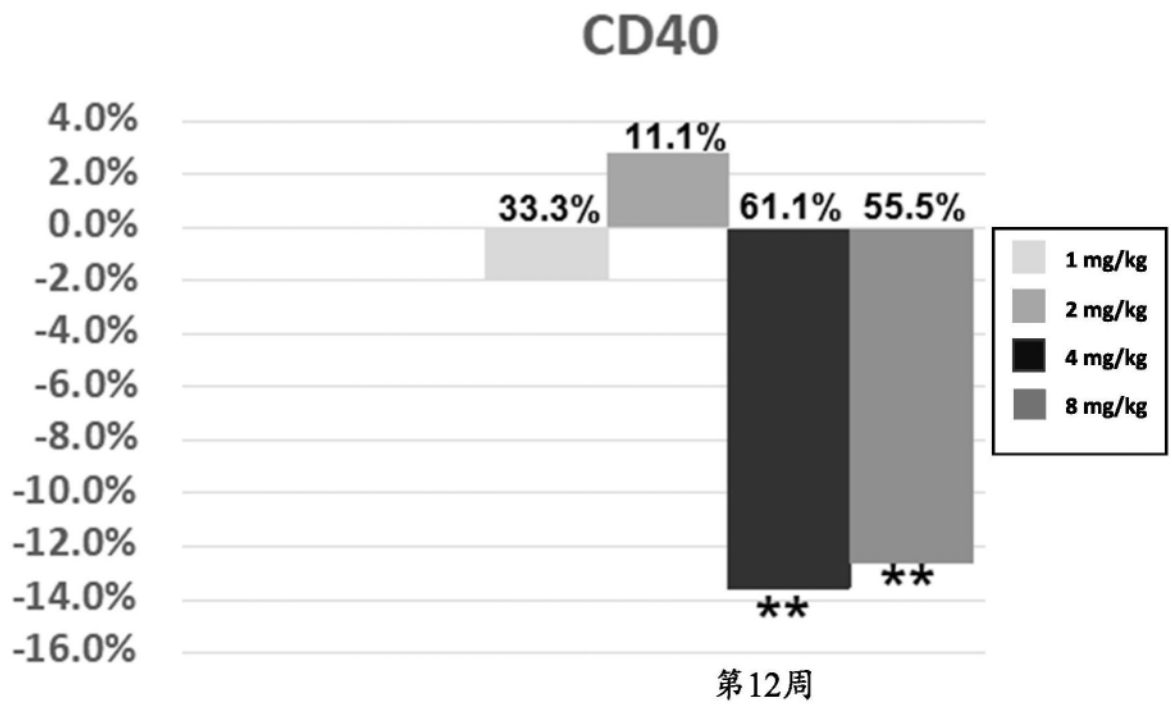

CD40
4.0%
2.0%
0.0%
-2.0%
-4.0%
-6.0%
-8.0%
-10.0%
-12.0%
-14.0%
-16.0%
33.3%
11.1%
61.1%
55.5%
**
**
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29K

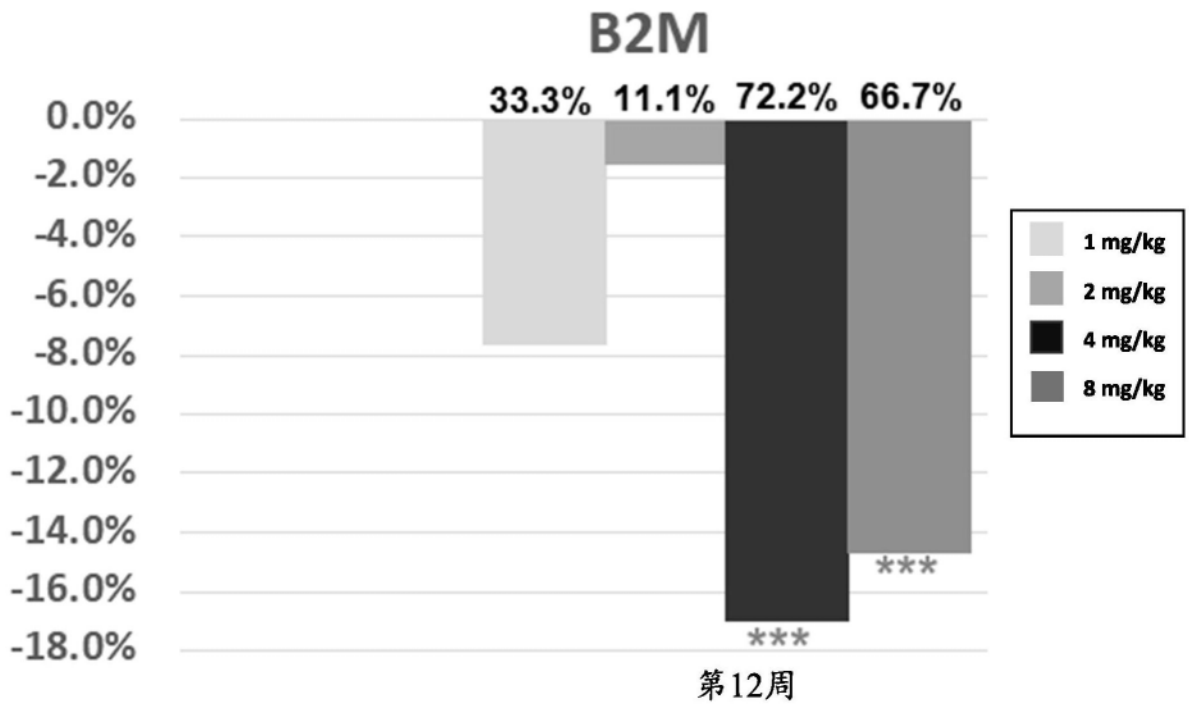

B2M
0.0%
-2.0%
-4.0%
-6.0%
-8.0%
-10.0%
-12.0%
-14.0%
-16.0%
-18.0%
33.3%
11.1%
72.2%
66.7%
***
***
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图29L

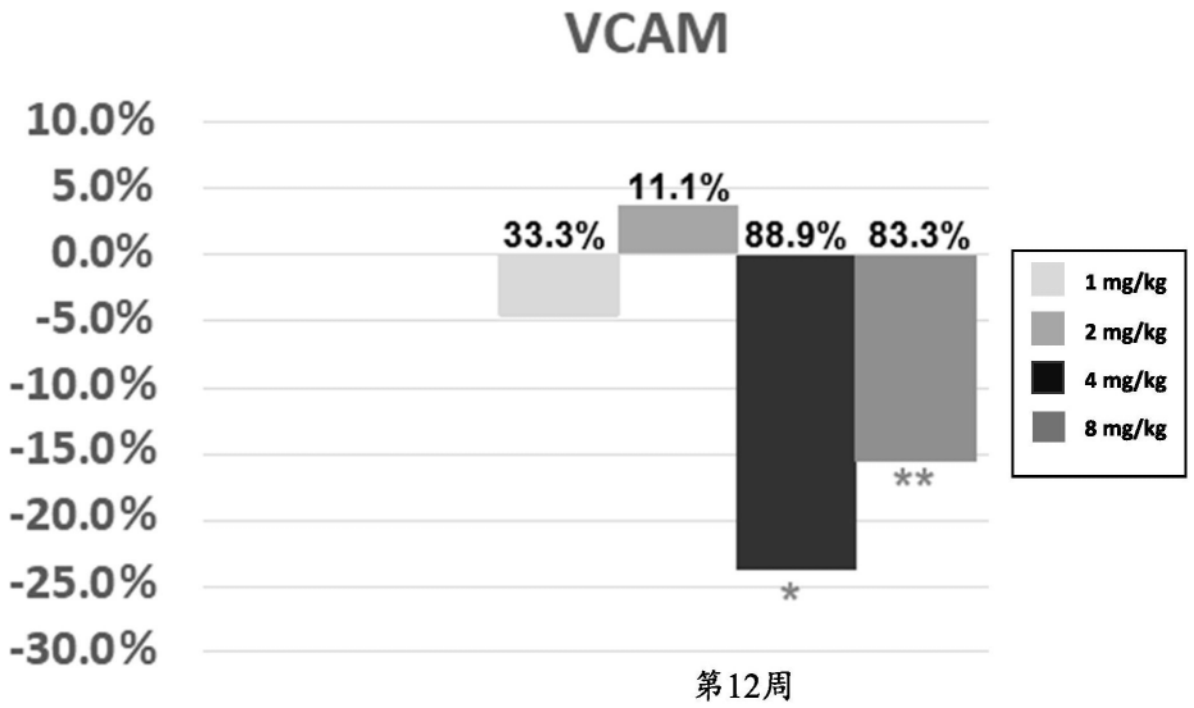

VCAM
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
33.3%
11.1%
88.9%
83.3%
**
*
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30A

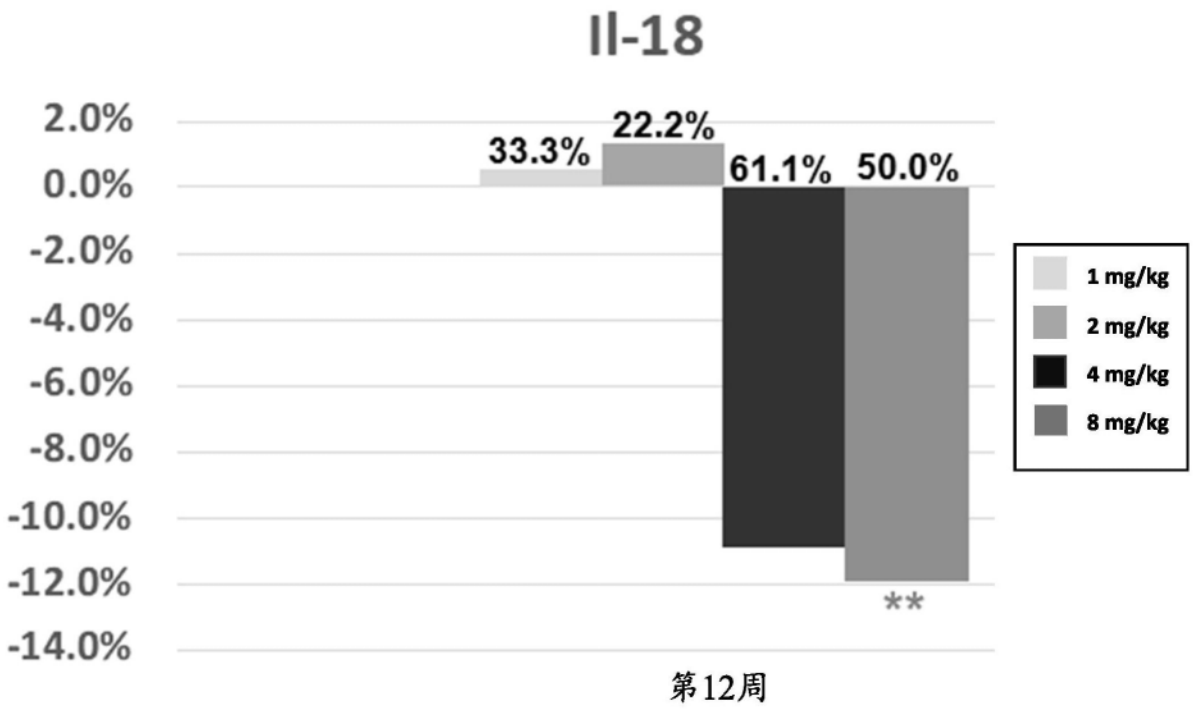

Il-18
2.0%
0.0%
-2.0%
-4.0%
-6.0%
-8.0%
-10.0%
-12.0%
-14.0%
33.3%
22.2%
61.1%
50.0%
**
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30B

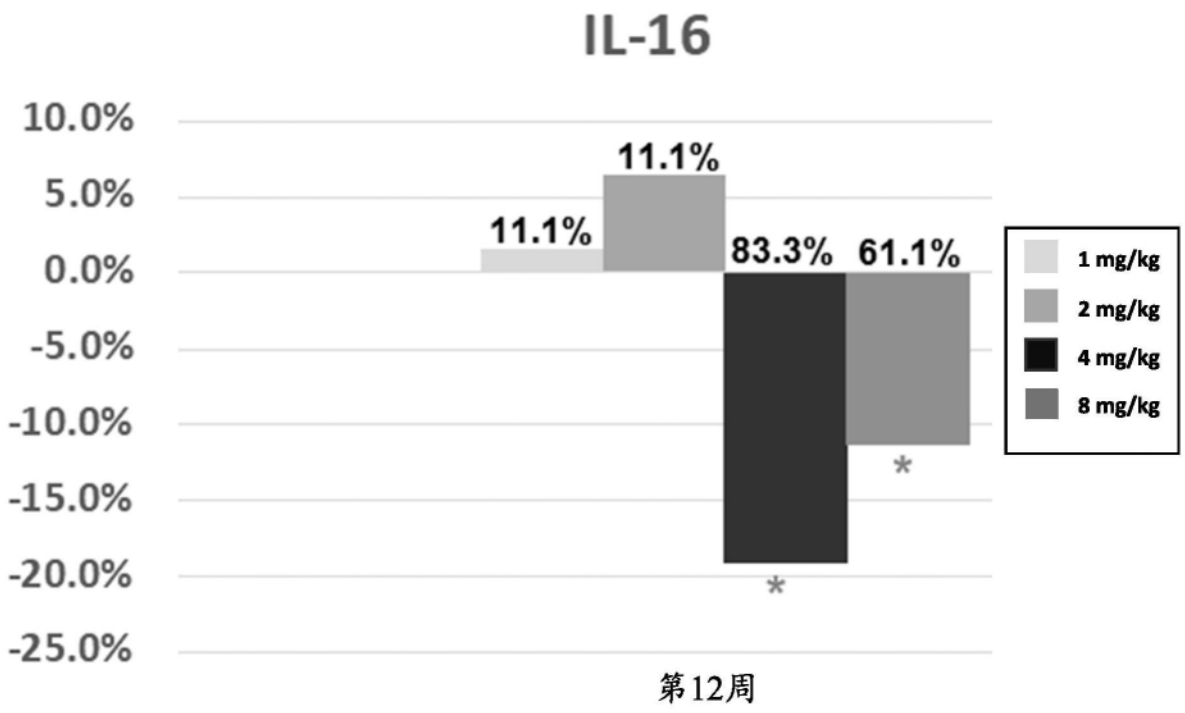

IL-16
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
11.1%
11.1%
83.3%
61.1%
*
*
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30C

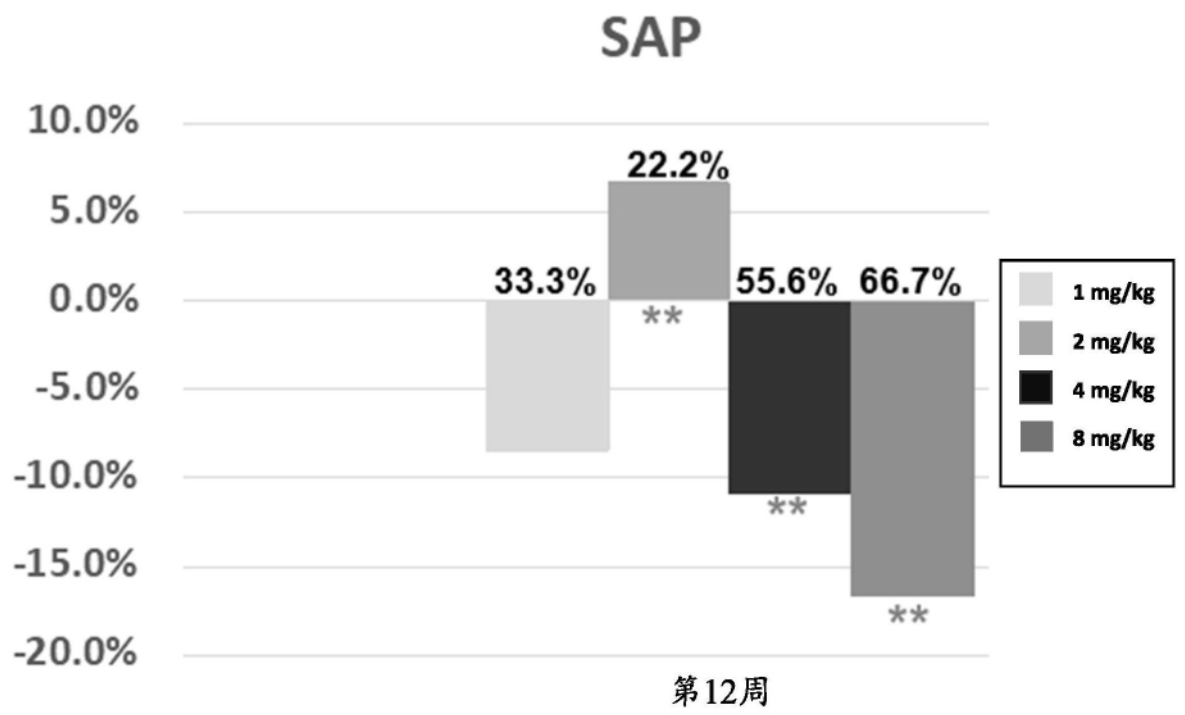

SAP
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
33.3%
22.2%
55.6%
66.7%
**
**
**
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30D

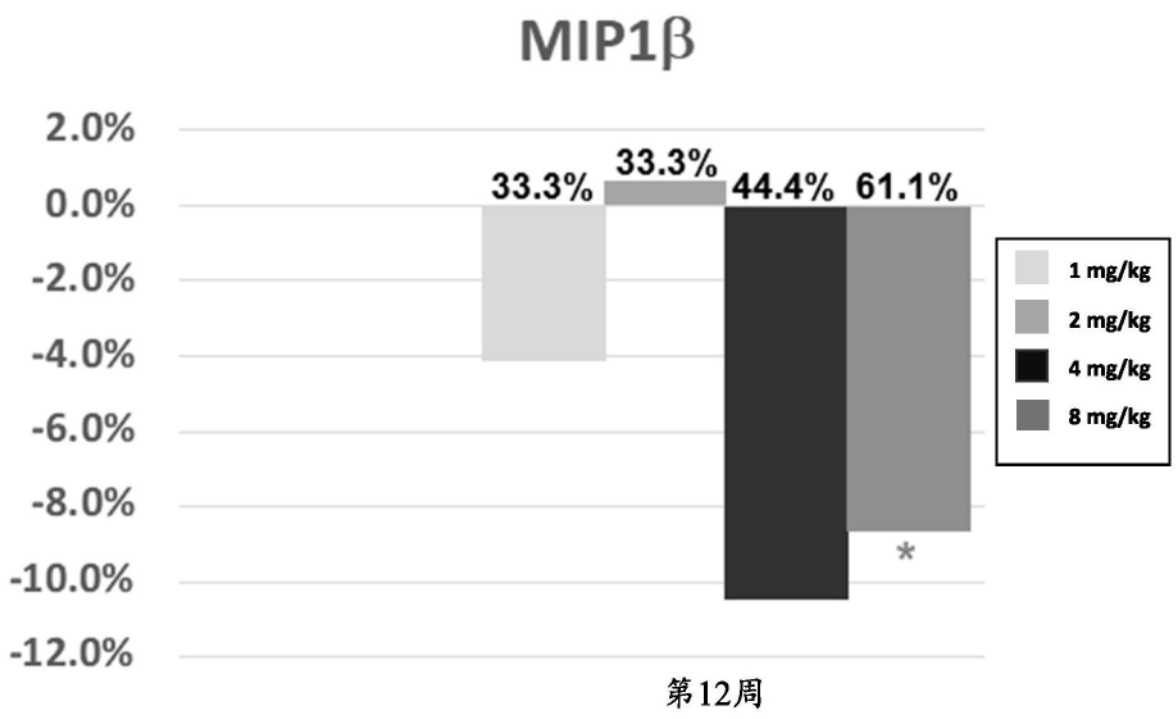

MIP1β
2.0%
0.0%
-2.0%
-4.0%
-6.0%
-8.0%
-10.0%
-12.0%
33.3%
33.3%
44.4%
61.1%
*
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30E

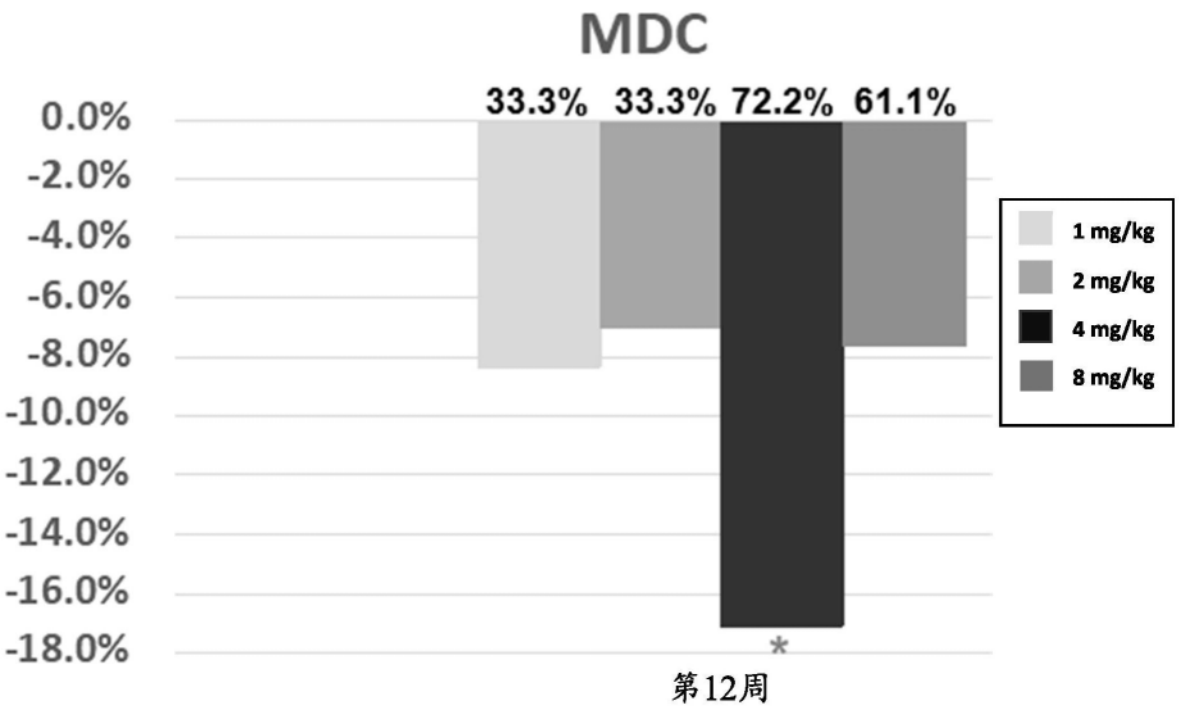

MDC
0.0%
-2.0%
-4.0%
-6.0%
-8.0%
-10.0%
-12.0%
-14.0%
-16.0%
-18.0%
33.3%
33.3%
72.2%
61.1%
*
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30F

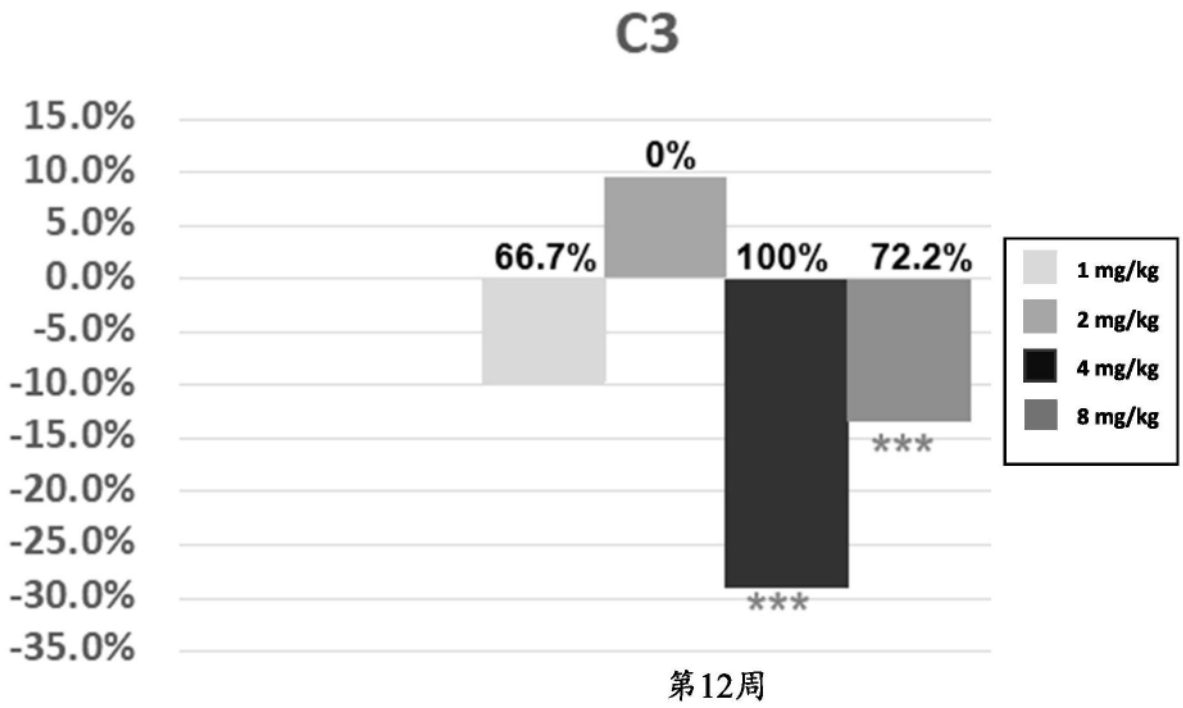

C3
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
-35.0%
66.7%
0%
100%
72.2%
***
***
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30G

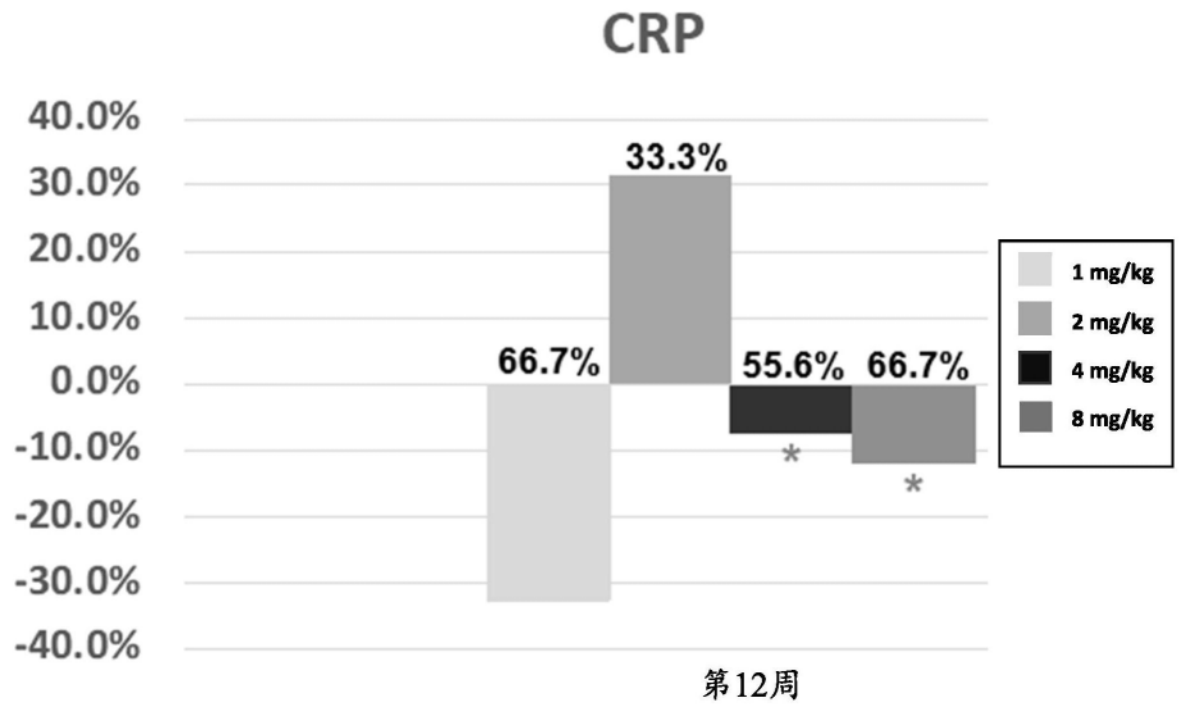

CRP
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
-10.0%
-20.0%
-30.0%
-40.0%
66.7%
33.3%
55.6%
66.7%
*
*
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30H

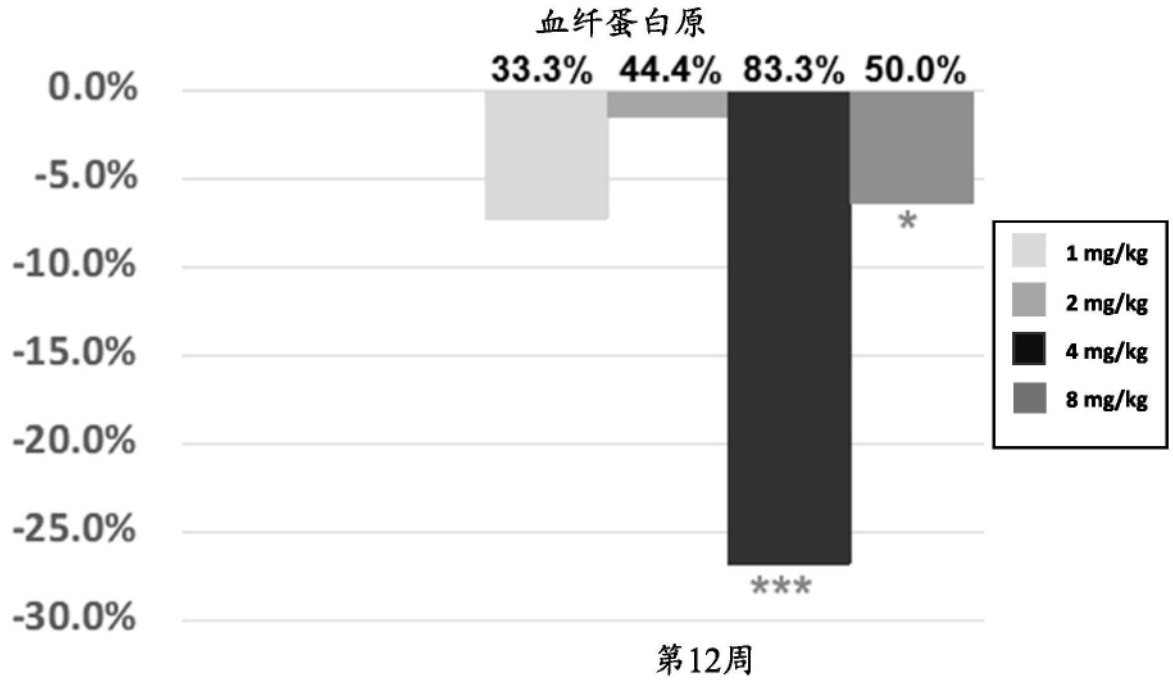

血纤蛋白原
33.3%
44.4%
83.3%
50.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
-30.0%
*
***
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30I

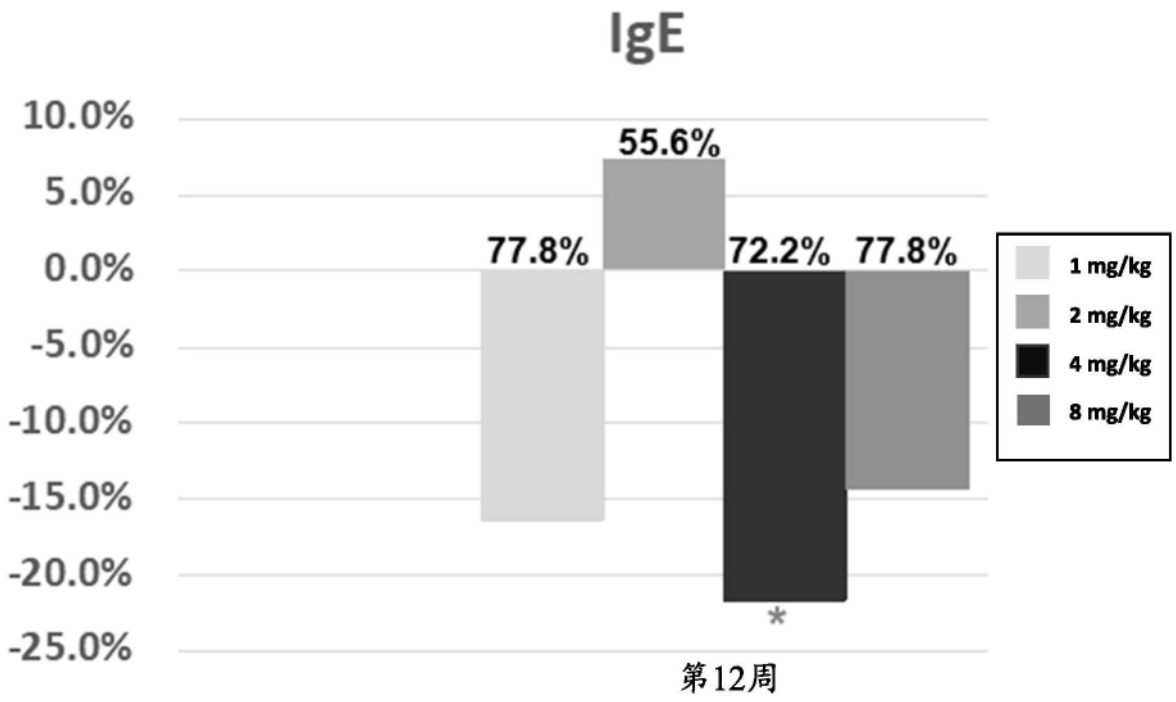

IgE
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
-20.0%
-25.0%
77.8%
55.6%
72.2%
77.8%
*
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30J

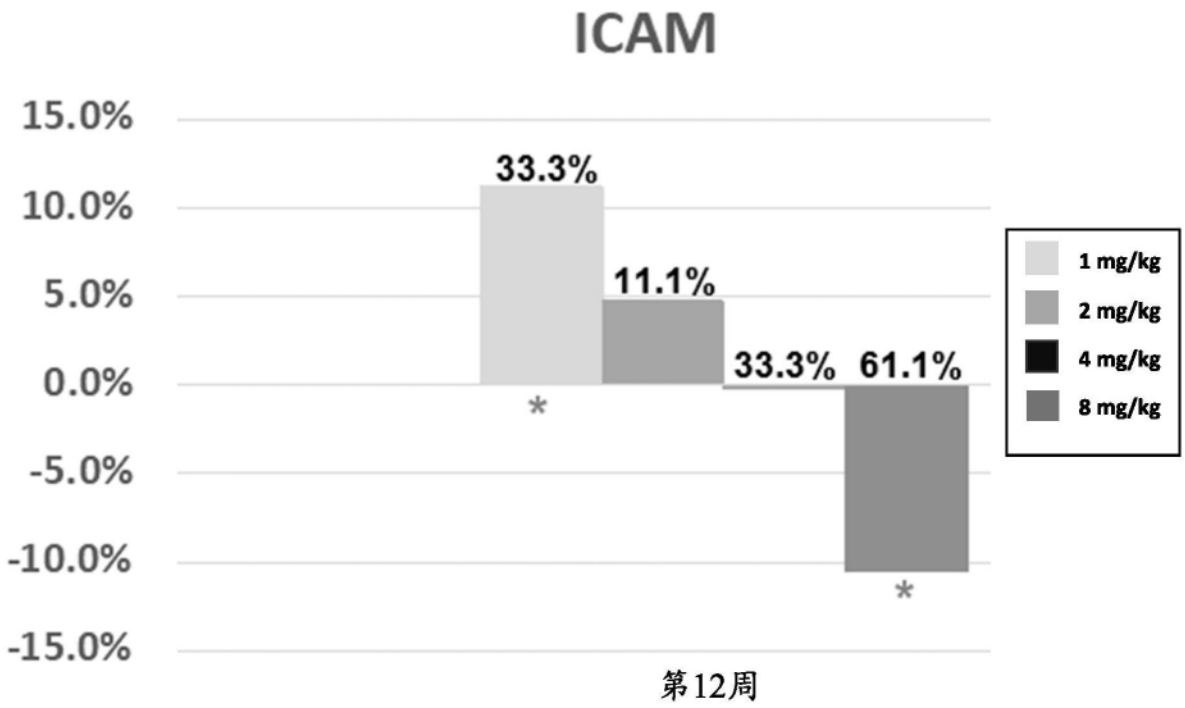

ICAM
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
33.3%
11.1%
33.3%
61.1%
*
*
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30K

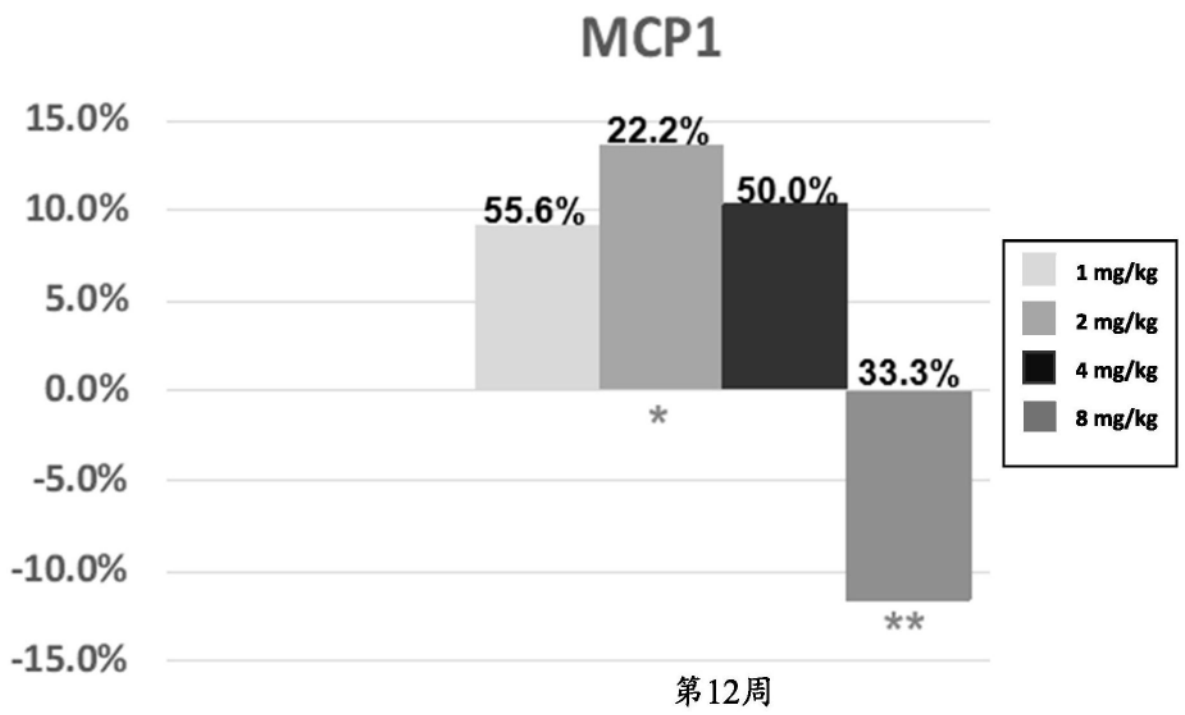

MCP1
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
-15.0%
55.6%
22.2%
50.0%
33.3%
*
**
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图30L

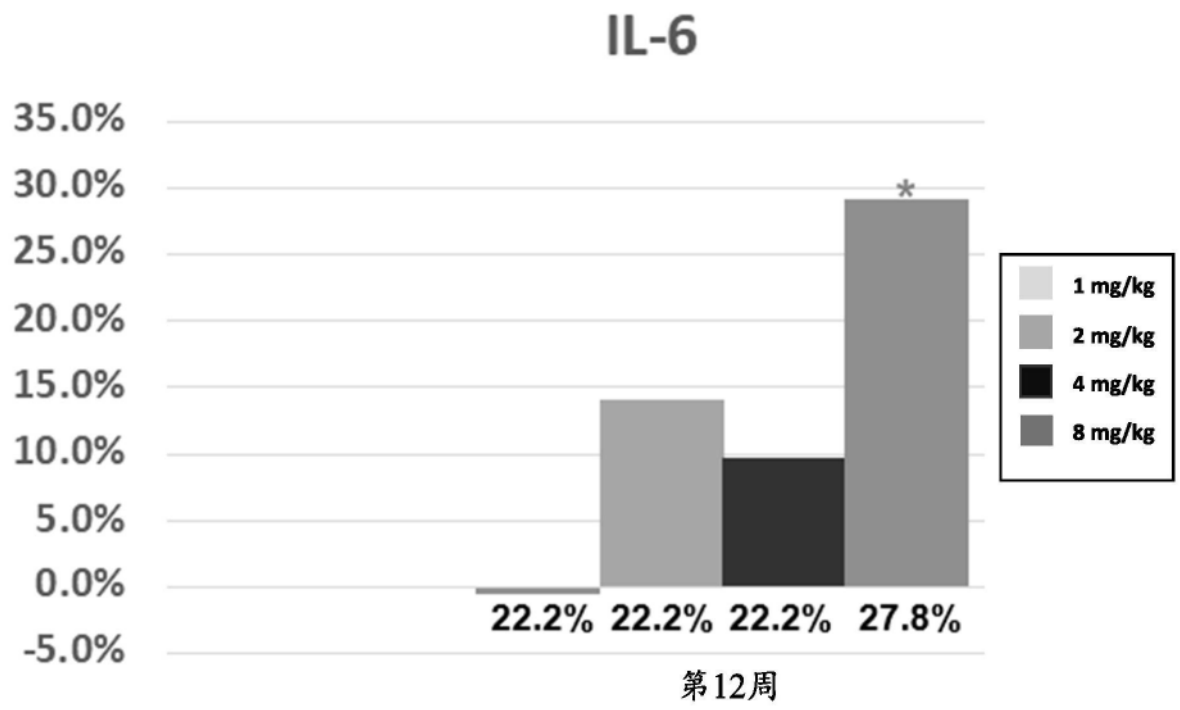

IL-6
35.0%
30.0%
25.0%
20.0%
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
*
22.2%
22.2%
22.2%
27.8%
第12周
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg

图31A

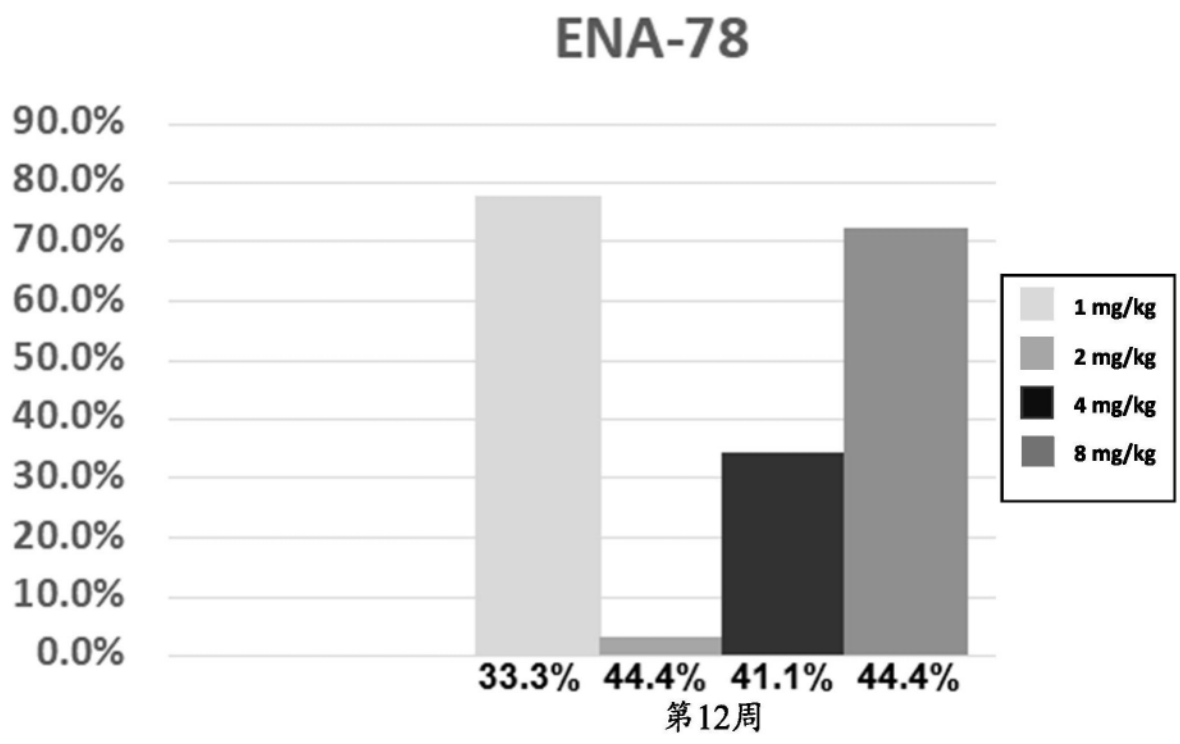

ENA-78
90.0%
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
33.3%
44.4%
41.1%
44.4%
第12周
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg

图31B

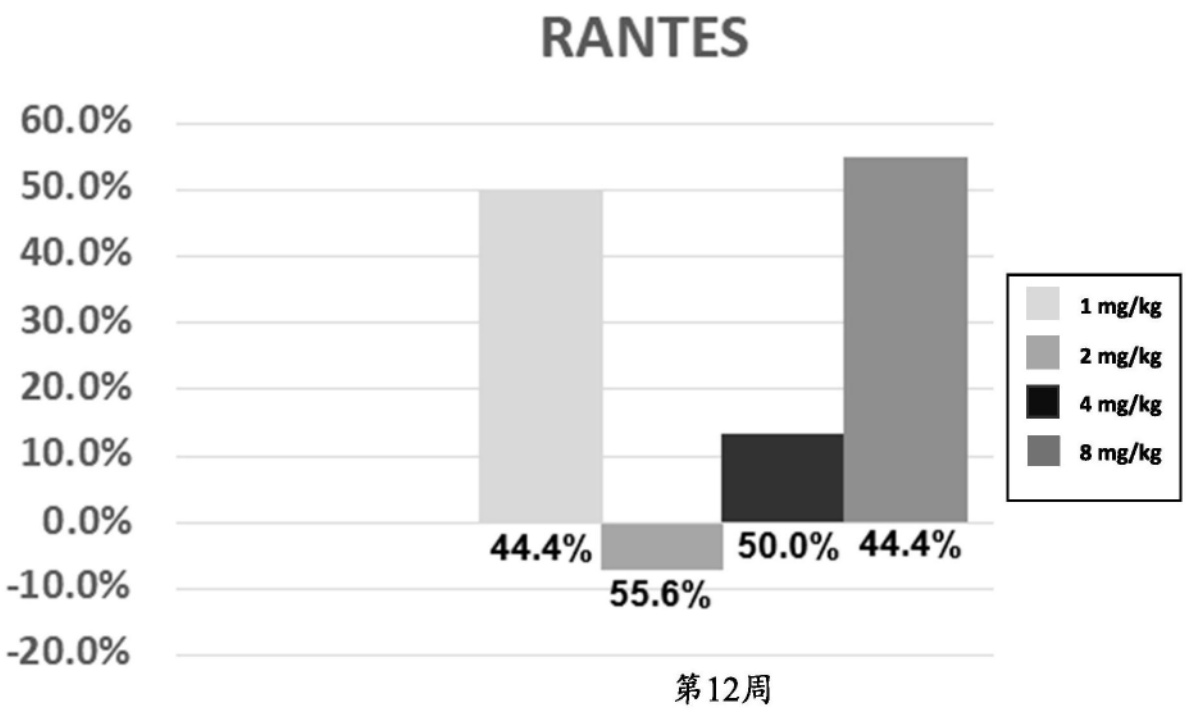

RANTES
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
-10.0%
-20.0%
44.4%
55.6%
50.0%
44.4%
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图31C

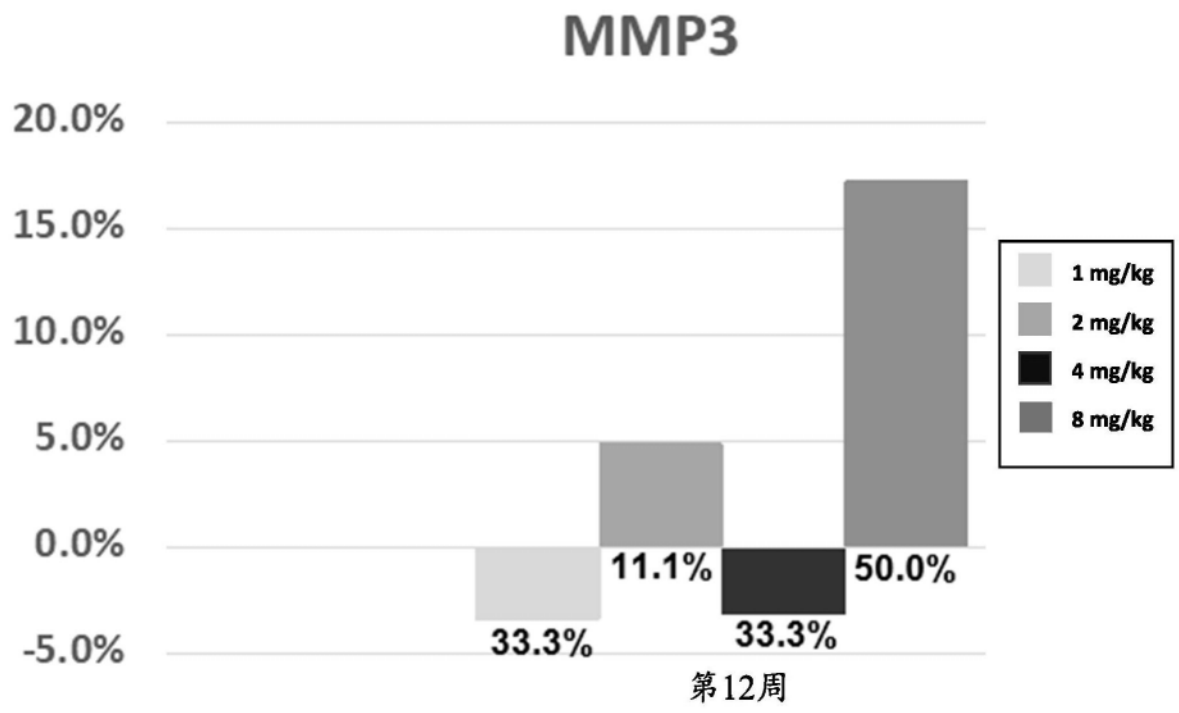

MMP3
20.0%
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
33.3%
11.1%
33.3%
50.0%
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图31D

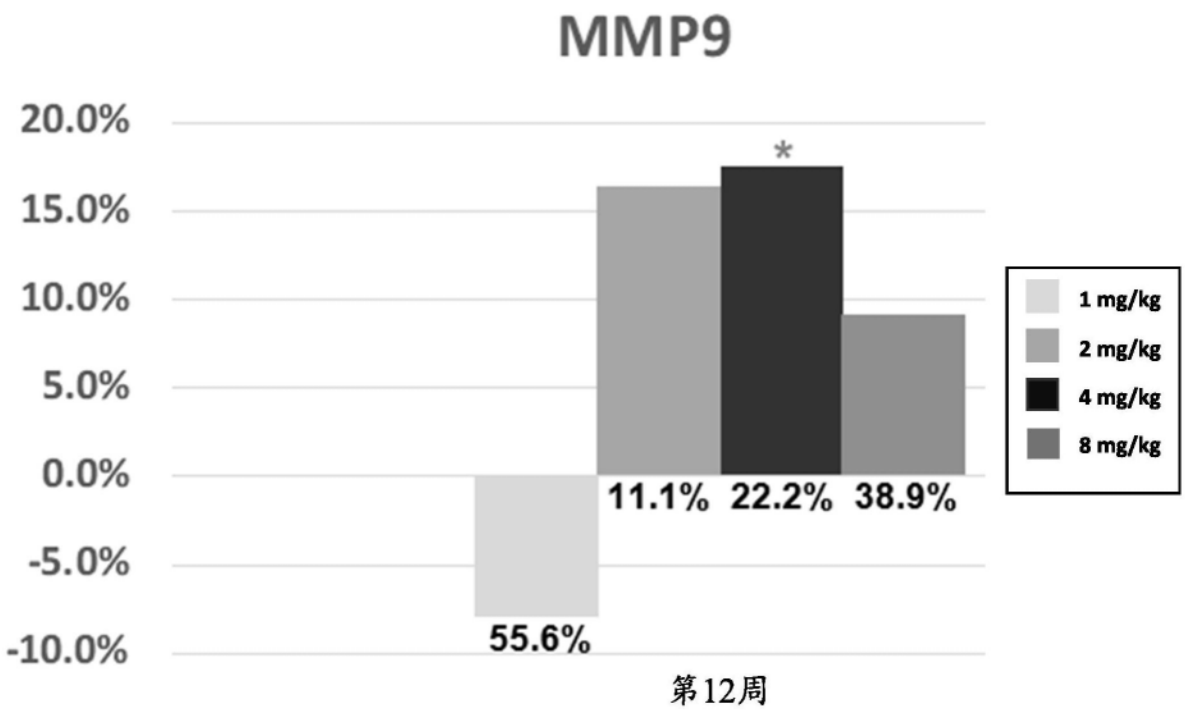

MMP9
20.0%
15.0%
10.0%
5.0%
0.0%
-5.0%
-10.0%
*
11.1%
22.2%
38.9%
55.6%
1 mg/kg
2 mg/kg
4 mg/kg
8 mg/kg
第12周

图31E

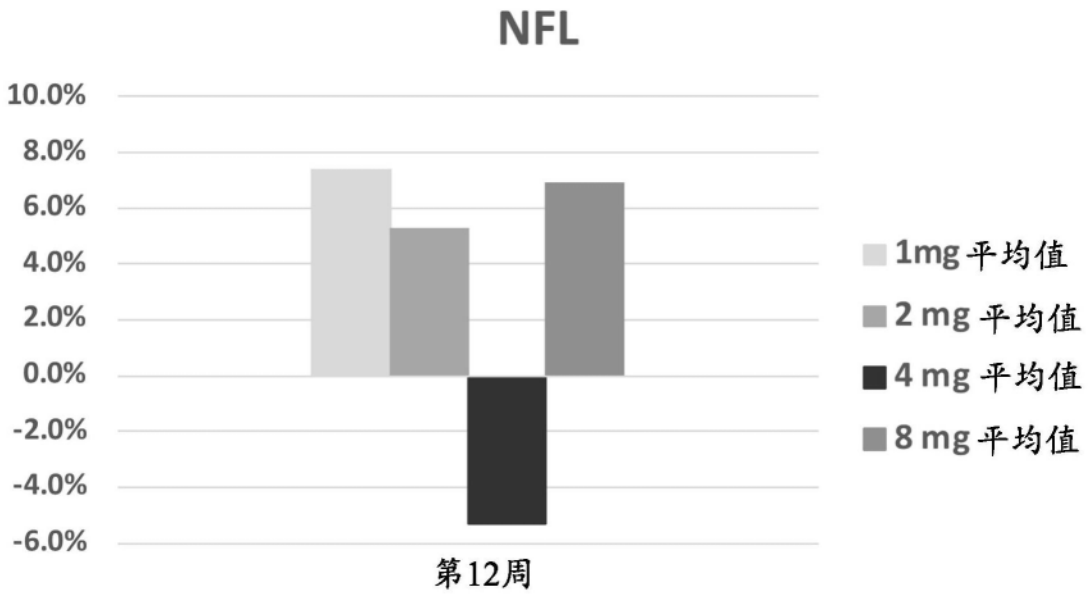

NFL
10.0%
8.0%
6.0%
4.0%
2.0%
0.0%
-2.0%
-4.0%
-6.0%
1mg平均值
2 mg平均值
4 mg平均值
8 mg平均值
第12周

图32

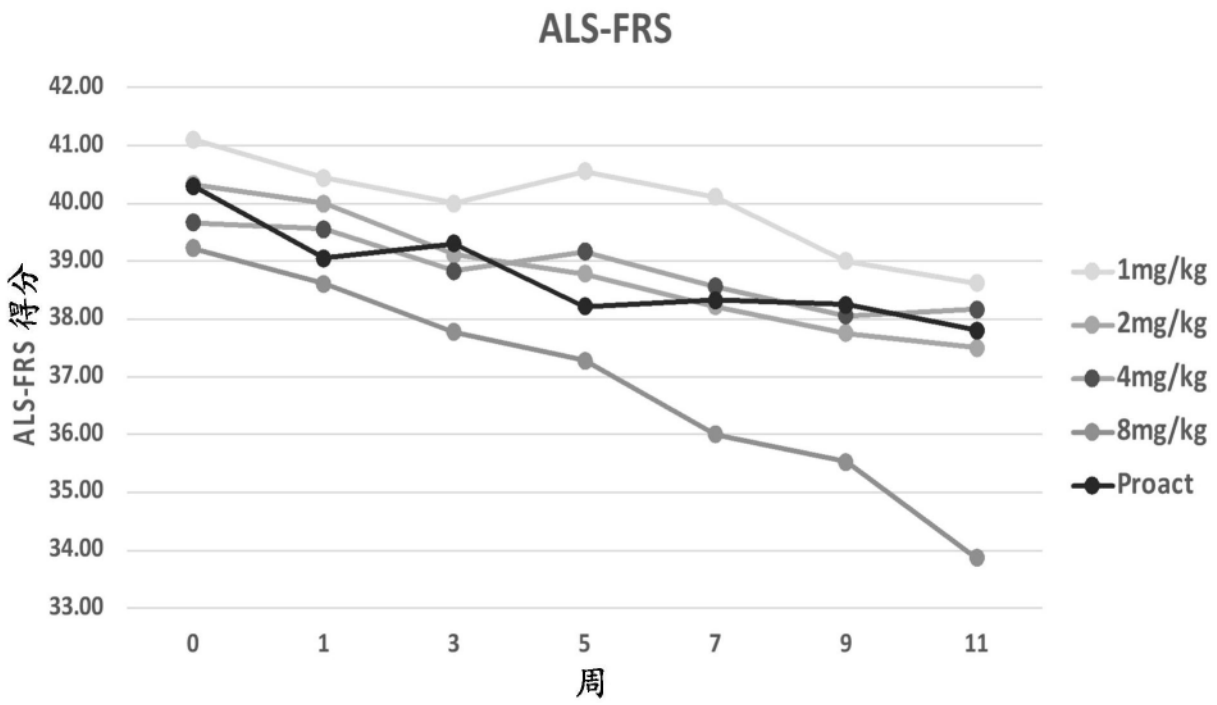

ALS-FRS
42.00
41.00
40.00
39.00
38.00
37.00
36.00
35.00
34.00
33.00
ALS-FRS 得分
0
1
3
5
7
9
11
周
1mg/kg
2mg/kg
4mg/kg
8mg/kg
Proact

图33A

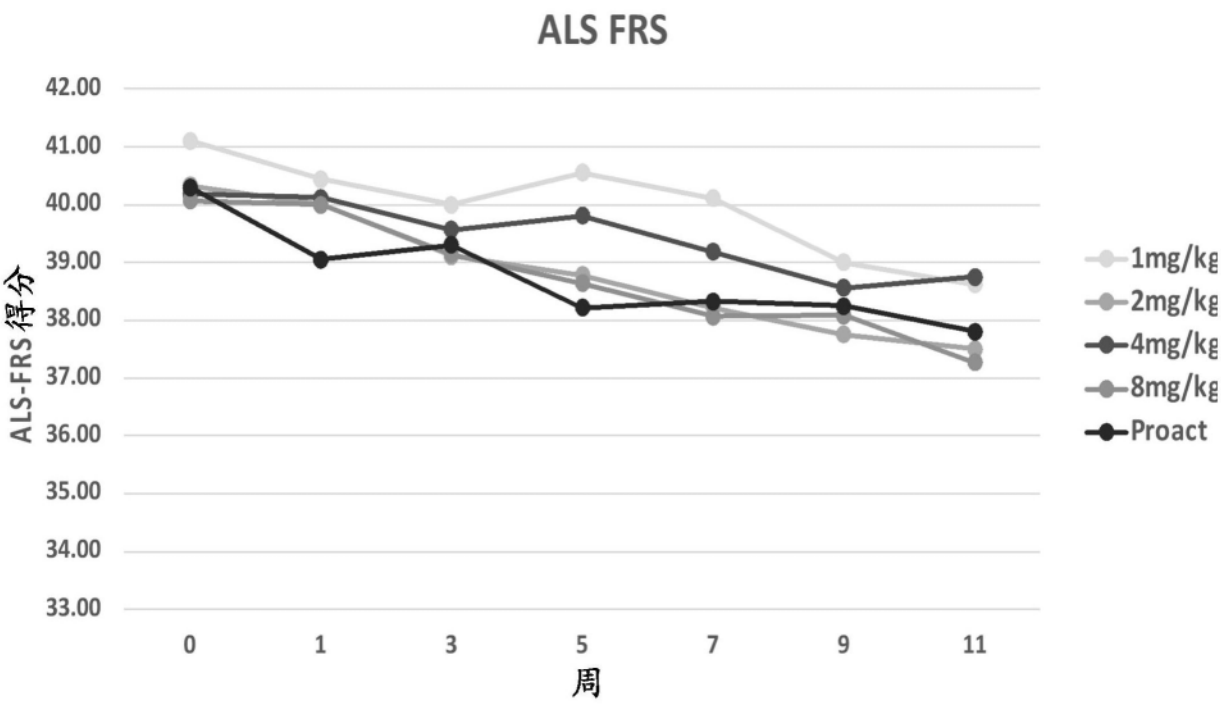

ALS FRS
42.00
41.00
40.00
39.00
38.00
37.00
36.00
35.00
34.00
33.00
ALS-FRS得分
0
1
3
5
7
9
11
周
1mg/kg
2mg/kg
4mg/kg
8mg/kg
Proact

图33B

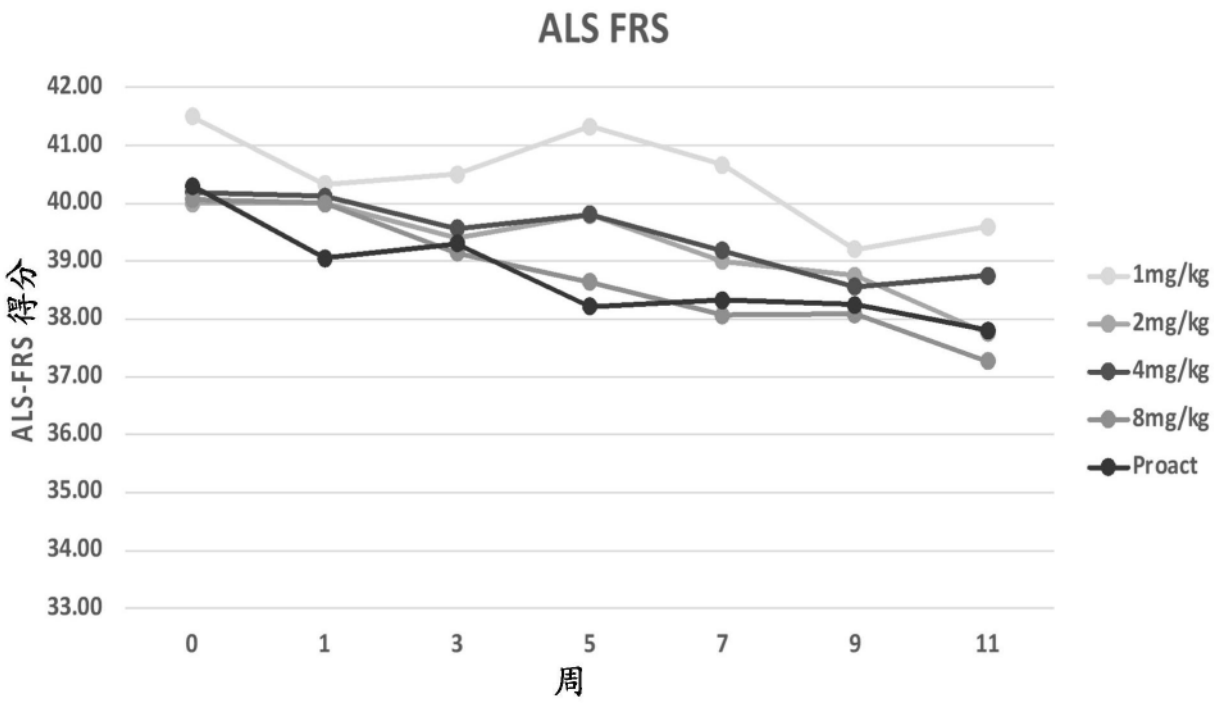

ALS FRS
42.00
41.00
40.00
39.00
38.00
37.00
36.00
35.00
34.00
33.00
ALS-FRS 得分
0
1
3
5
7
9
11
周
1mg/kg
2mg/kg
4mg/kg
8mg/kg
Proact

图33C

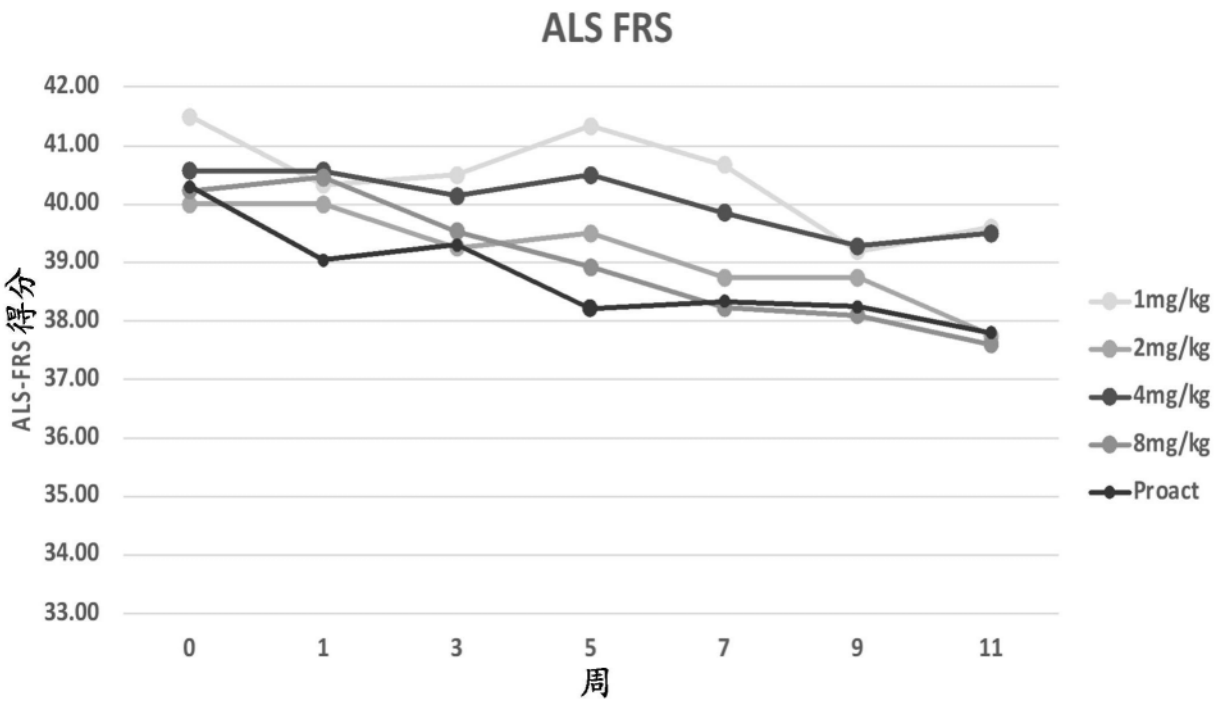

ALS FRS
42.00
41.00
40.00
39.00
38.00
37.00
36.00
35.00
34.00
33.00
ALS-FRS 得分
0
1
3
5
7
9
11
周
1mg/kg
2mg/kg
4mg/kg
8mg/kg
Proact

图33D

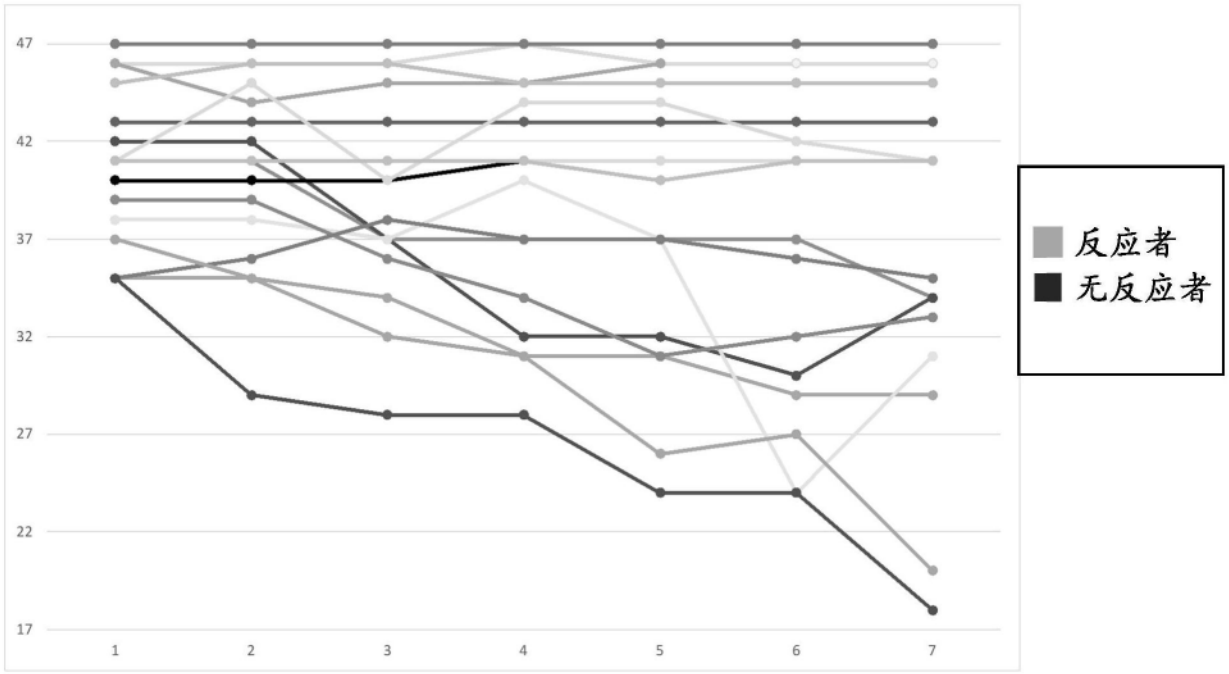


图34

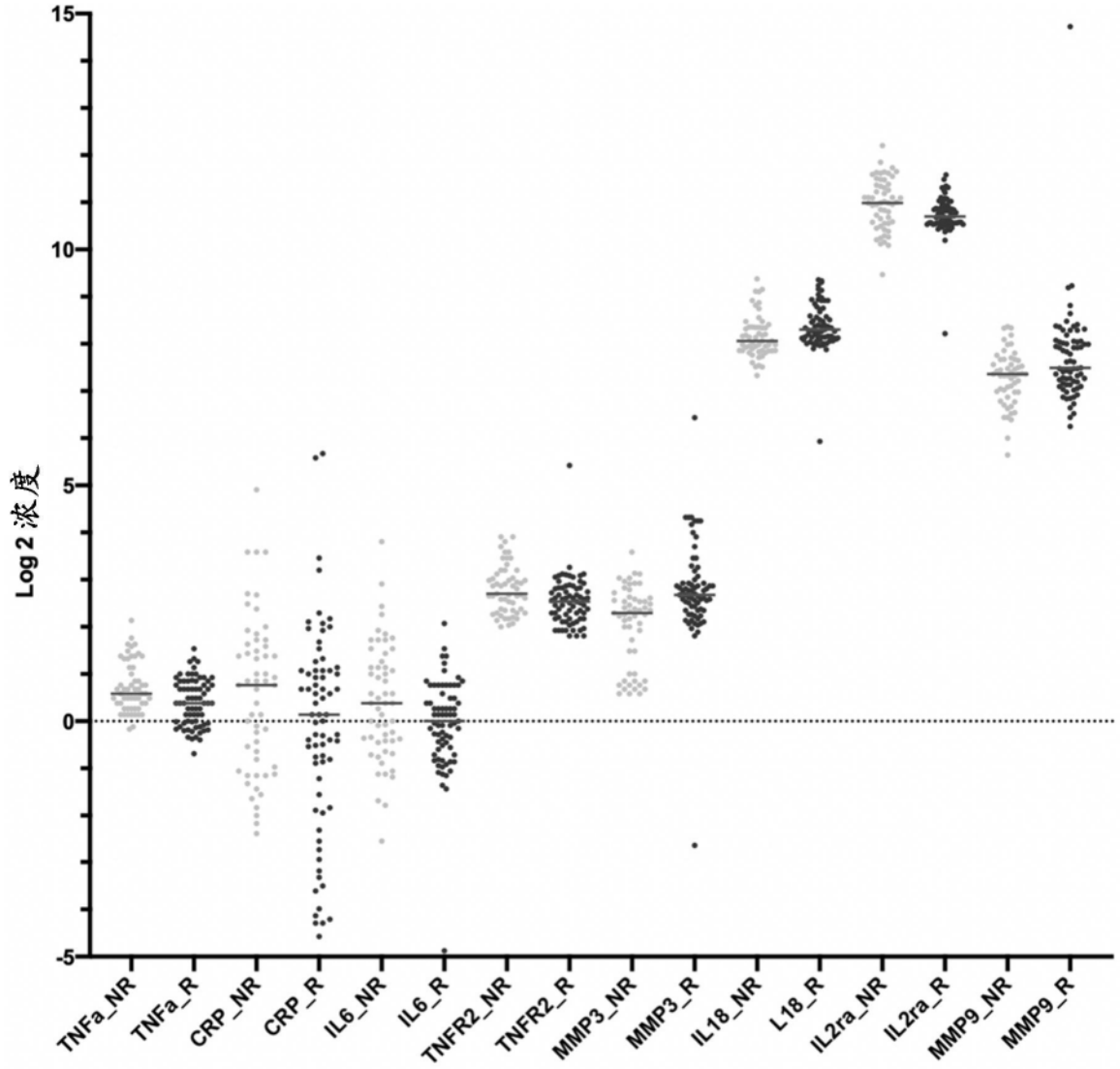

15
10
5
0
-5
Log 2 浓度
TNFa_NR
TNFa_R
CRP_NR
CRP_R
IL6_NR
IL6_R
TNFR2_NR
TNFR2_R
MMP3_NR
MMP3_R
IL18_NR
L18_R
IL2ra_NR
IL2ra_R
MMP9_NR
MMP9_R

图35