



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113940996 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 18

(21) 申请号 202111207345.0

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2016.05.25

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 25/16 (2006.01)

15169367.8 2015.05.27 EP

A61P 25/08 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201680030517.2 2016.05.25

(71) 申请人 UCB生物制药私人有限公司

地址 比利时布鲁塞尔

(72) 发明人 P·M·C·戈达德

R·M·卡明斯基

K·J·J·莱克里尔克

J·M·M·范埃尔

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 李程达

权利要求书1页 说明书32页

序列表13页 附图8页

(54) 发明名称

用于治疗神经系统疾病的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于神经系统疾病的治疗和/或预防的CSF-1R活性抑制剂和神经系统疾病的新的治疗方法。

1. CSF-1R活性抑制剂在制备用于治疗神经系统疾病的药物中的用途,其中所述神经系统疾病选自帕金森氏病和癫痫发生,且所述抑制剂是结合CSF-1R的抗体或其功能活性片段。

2. 根据权利要求1的用途,其中抗体或其片段是单克隆或多克隆的。

3. 根据权利要求1的用途,其中抗体或其片段是嵌合的,人源化的或人的。

4. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中抗体或其片段是双特异性或多异性的。

5. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中抗体选自具有完整长度的重链和轻链的完整抗体分子或其片段,所述片段选自:Fab,改性Fab,Fab',改性Fab',F(ab')₂,Fv,scFv、双价、三价或四价抗体、Bis-scFv、双体、三体,四体或上述任意项的表位结合片段。

6. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中抗体或其片段与一个或多个效应分子缀合。

7. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中所述抗体或其片段穿过血脑屏障(BBB)以治疗有效量达到脑中,所述治疗有效量足够治疗和/或预防患有神经系统疾病的患者。

8. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中所述抗体或其片段包括重链和轻链,其中所述重链的可变结构域包含以下:具有SEQ ID NO:4中给出的序列的CDR-H1,具有SEQ ID NO:5中给出的序列的CDR-H2和具有SEQ ID NO:6中给出的序列的CDR-H3,以及其中所述轻链的可变结构域包含:具有SEQ ID NO:1中给出的序列的CDR-L1,具有SEQ ID NO:2中给出的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:3中给出的序列的CDR-L3。

9. 根据权利要求8的用途,其中所述重链包含SEQ ID NO:9中给出的序列。

10. 根据权利要求9的用途,其中所述轻链包含SEQ ID NO:7中给出的序列。

11. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中抗体或其片段具有包含SEQ ID NO:9中给出的序列的重链和包含SEQ ID NO:7中给出的序列的轻链。

12. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中所述抗体或其片段对人CSF-1R的结合亲和力[K_p]为10pM或小于10pM。

13. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中所述抗体或其片段以100pM或更少的亲和力[K_p]交叉阻断根据权利要求8中定义的抗体的结合。

14. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中所述抗体或其片段通过与其阻断的抗体结合相同的表位来交叉阻断所述结合。

15. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中所述抗体或其片段与权利要求8中定义的抗体或其片段或衍生物竞争结合SEQ ID NO:15的人c-fms的胞外结构域。

16. 根据权利要求1至3的任一项的用途,其中抗体或其片段与权利要求8中定义的抗体结合相同的人CSF-1R的表位。

17. 权利要求1的用途,其中抑制剂是编码根据权利要求1至16中任一项所述的抗体的重链和/或轻链的分离的DNA序列。

18. 根据权利要求1-17任一项所述的用途,其中所述CSF-1R活性抑制剂与一种或多种其他治疗活性化合物组合施用。

19. 根据权利要求18所述的用途,其中所述其他治疗活性化合物是另一种抗癫痫治疗剂。

用于治疗神经系统疾病的方法

[0001] 本申请是申请号201680030517.2的中国专利申请的分案申请。

[0002] 本发明主要涉及治疗神经系统疾病(neurological disease)的方法和更具体地涉及抗CSF-1R抗体用于神经系统疾病的治疗。

[0003] 存在各种各样的与神经炎症反应相关的神经系统疾病,最突出的是例如阿尔茨海默氏病,肌萎缩侧索硬化(ALS),孤独症,克雅病,脑脊膜炎,多发性硬化,帕金森氏病,中风,外伤性脑损伤或癫痫,癫痫和癫痫发作和一般抽搐。

[0004] 世界卫生组织(WHO)和国际抗癫痫联盟(ILAE)定义癫痫是一种慢性,反复发作,重复性的神经系统障碍,其包括由神经元脑细胞过度 and 混乱的放电造成的突发性现象。其发病有两个高峰:一个在童年和青春期,第二个更显著,是超过60岁。根据国际癫痫署(IBE),世界各地约5千万人患有癫痫,其中有20%-30%每月经历超过一次的癫痫发作(Forsgren等人,Eur J Neurol 2005;12:245-53)。

[0005] 全世界范围每年新的癫痫病例的数量为每10万个居民24至53例。在欧洲,根据不同国家、不同年份进行的流行病学研究,经过计算,90万名儿童和青少年,190万个年龄20至64岁的成年人,和60万个65岁以上的老年人患有癫痫(Forsgren等人,Eur J Neurol 2005;12:245-53)。

[0006] 癫痫被认为包括一组不同的特征在于癫痫发作的慢性神经系统疾病。这些癫痫发作可以是复发性和未受刺激的,或可以构成单独的癫痫发作,与脑改变组合,增加将来癫痫发作的可能性。癫痫发作通常源自脑中的异常,过度或超同步的神经元活动。

[0007] 癫痫是最常见的神经系统疾病之一,伴有全球人口约1%的患病率。根据由国际抗癫痫联盟提供的最新定义,“癫痫发作是脑异常过度或同步的神经元活动导致的体征和/或症状的暂时发生”和“癫痫是脑的障碍,特征在于产生癫痫发作的持久倾向,以及这种状况的神经生物学的、认知、心理学和社会后果。”(Fisher等人,2014)。

[0008] 因为全基因组测序技术和人类基因组的渐增理解的出现,对癫痫病因的知识迅速发展。此外,分子细胞生物学和遗传学中新的概念和技术已经彻底改变了我们的癫痫病理生理学的理解。现在神经影像学技术允许前所未有的对脑回路和涉及癫痫发作产生和癫痫发展的结构的理解。最后,神经生理技术,如脑电描记术(EEG),或体外电生理学提供了关于神经网络在癫痫中的作用的进一步信息。

[0009] 存在不同类型的癫痫发作和癫痫的病因,例如全身性癫痫发作,局灶性癫痫发作和未知起源的癫痫发作。局灶性癫痫发作被认为源自于限于一个半球的网络内某个点(涉及大脑皮质的特定区域),而全身性癫痫发作被认为源自双边分布式网络内的某个点并迅速接合双边分布式网络(涉及到整个大脑皮层)(Berg and Scheffer,2011)。由Berg等人、2010发表的国际抗癫痫联盟(ILAE)癫痫发作的现行的分类包括a)全身性癫痫发作,这意味着特定的强直阵挛(以任何组合),失神(典型,非典型,特殊特征的失神,肌阵挛性失神,眼睑肌阵挛),肌阵挛(肌阵挛,肌阵挛性失张力,肌阵挛性强直,阵挛,强直,失张力),b)局灶性癫痫发作,伴有和没有意识或认知损害和c)未知起源的癫痫发作(癫痫痉挛)。

[0010] 没有意识或认知损害的局灶性癫痫发作i)伴有可观察到的运动或自主组分。这大

致对应于“简单部分癫痫发作”的概念,从而“局灶性运动”和“自主的”是取决于癫痫发作表现充分地传达这个概念的术语。或ii)对应于仅涉及主观感觉或心理现象,这对应于“先兆”的概念。

[0011] 伴有意识或认知损害的局灶性癫痫发作粗略地对应于复合性部分癫痫发作的概念”,发展为双边,抽搐癫痫发作(涉及强直,阵挛,或强直和阵挛性组分)。该表达替换术语“继发性全身性癫痫发作。”

[0012] 此外,主病因因素现在被更好地确定:1)遗传原因:已知的或假定的遗传缺陷(其中癫痫发作是障碍的核心症状)的直接结果;2)结构/代谢原因:已经证明与显著增加的发展癫痫风险有关的独特的结构或代谢状况或疾病;3)不明原因,当基本原因的性无法确定时(Berg和Scheffer,2011)。

[0013] 此外,关于导致癫痫,即癫痫发生的过程的新概念,在这个领域中现在都被引入和驱动进一步的研究工作。癫痫发生是指能够产生自发性癫痫发作的组织的发展和延伸,导致(1)癫痫状况的发展和/或(2)状况成立时后的进展(Pitkänen等人,(2013)。疾病或综合征改变有两个组分:抗癫痫发生(antiepileptogenesis)和共病现象改变。

[0014] 抗癫痫发生(Antiepileptogenesis)是抵消癫痫发生的效果的过程,包括预防,癫痫发作改变和治愈。关于预防,完整的预防中止癫痫的发展。部分预防可延缓癫痫的发展或减轻其严重程度。例如,出现癫痫发作,但它们可以是频率更少,更短或更温和的癫痫发作类型(癫痫发作改变)。抗癫痫发生(Antiepileptogenesis)也可以在癫痫已经被建立之后防止或减少癫痫的进展。

[0015] 共病现象的改变是指减轻或逆转癫痫相关的共病现象,如焦虑,抑郁,躯体运动受损或认知能力下降的症状性发展或进展的治疗。

[0016] 根治疗法被定义为癫痫的一个完整的和永久的逆转,使得治疗停止后没有发生癫痫发作(Pitkänen等人,2013年)。

[0017] 当疾病改性剂(disease-modifying agent)可在癫痫发作之前或后给予时提出新的治疗方法,其目的在于癫痫中的疾病改性。如果这样的治疗在癫痫发作之前给予,它可以防止或延缓癫痫的发展。当这种治疗在癫痫的诊断后给予,它可能减轻癫痫发作严重性,防止或减少癫痫的进展,或将癫痫发作从药物抗性的癫痫发作改变成药物敏感性的癫痫发作。

[0018] 上述的治疗概念根本上不同于癫痫护理的目前标准,其包括抗癫痫药(AED),其靶向神经元兴奋性的机制,从而仅提供抗癫痫发作的作用。这些药物不解决癫痫的根源或病理生理学并且癫痫患者的30-40%患有不受控制的癫痫发作和与所述疾病相关的共病现象,尽管市场上存在超过20种抗癫痫药物的令人印象深刻的医疗设备。

[0019] 这创造了一个重要的未满足的医疗需求,即提供具有神经系统疾病改性特性的更有效的药物。

[0020] 认识到炎症在人类癫痫和癫痫发生的病理生理学中的指示性的作用。特别是,小胶质细胞活化与在人颞叶癫痫(TLE),TLE和癫痫发生的实验模型中观察到的主要促炎途径的诱导相关。这主要是由一系列的对从患TLE的患者和啮齿动物模型获得的脑组织进行的研究表明,这表明与免疫/炎症途径、包括一些趋化因子和促炎细胞因子相关的基因的强烈上调。据推测,长期活化的小胶质细胞释放促炎细胞因子(如TNF α ,IL1b),其然后发挥作

用以增加神经元兴奋性和触发癫痫发作。这最好地针对IL1b而被记录,IL1b能够加剧实验模型癫痫发作活动,而IL1b生产的基因敲低或抑制具有抗惊厥作用,并且可以改性本病在实验模型中的疾病过程。

[0021] 然而目前可获得的经验证的控制小胶质细胞的活动的药物靶标相当稀少,并且现有的治疗方法主要集中于新化学实体(NCE)。例如Elmore等人,2014年发表的作品,其中使用小分子化合物(PLX3397),以抑制集落刺激因子1受体(CSF-1R),提供的数据证实了该受体是小胶质细胞的功能和存活的关键调节剂。

[0022] 所述集落刺激因子1(CSF-1)和结构上相似但序列无关的分子白细胞介素34(IL-34)是CSF1R的两个内源性配体,其是专门由巨噬细胞和小胶质细胞表达。集落刺激因子1(CSF-1),也称为巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)是由多种细胞产生的细胞因子。CSF-1是由两个“单体”多肽构成,其形成生物活性的二聚体CSF-1蛋白。CSF-1存在于至少三个成熟形式,其原因在于选择性RNA剪接,蛋白前体的蛋白水解加工和翻译后修饰,包括蛋白聚糖的糖基化和加成(参见,Cerretti DP等人1988,Mol Immunol,25(8),761;Pixley FJ和Stanley ER,2004,Trends in Cell Biology,14(11)628-38;Douglass,TG等人,2008,Int Immunopharmacol,8,1354-76)。各种形式的CSF-1蛋白包括两个分泌的分子,一个是糖基化的,其他的一个包括较长的氨基末端序列和蛋白聚糖修饰。另一种变体是糖基化的、但没有蛋白聚糖部分的跨膜(TM)分子。这种膜形式可以通过蛋白水解切割被脱落,以释放活性的、可溶性分子。所有形式被产生为前体多肽,其在氨基末端具有32个氨基酸的信号序列,羧基末端附近具有约23个氨基酸的推定的跨膜区域和短的胞质C00H-末端尾部。该前体肽随后通过氨基末端和羧基末端蛋白水解切割进行加工以产生CSF-1的成熟形式,其具有残基1-149,其是相同的和构成受体结合结构域。在体内,CSF-1单体被糖基化,并且经由二硫键二聚化。CSF-1属于促进血细胞生产的生物激动剂的组。具体而言,其用作单核吞噬细胞谱系骨髓祖细胞的生长、分化和存活因子。此外,CSF-1通过应答细胞上特异的受体刺激巨噬细胞的存活、增殖和功能。其他的实验表明,巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)改变来自具有难治TLE的患者活检后培养的成人小胶质细胞表型(Smith等人,2013)。最近的其它数据表明,CSF-1R基因的突变导致遗传性弥漫性脑白质营养不良(leukoencephalopathies),其与癫痫发作和癫痫相关联(Rademakers等人,2011;Guerreiro等人,2013)。

[0023] CSF-1受体(CSF-1R)也被称为c-fms基因产物或CD115。CSF-1R是属于III型受体酪氨酸激酶家族的165kDa 1型TM糖蛋白。此外,CSF-1受体负责单核吞噬细胞、包括小胶质细胞的增殖,分化,和存活的调节。缺乏CSF-1R的小鼠显示外周组织中巨噬细胞的减少的数量。重要的是,CSF-1R缺乏的小鼠在脑中也缺乏小胶质细胞,这与致死表型相关联。事实上,小胶质细胞是在正常条件下表达CSF-1R的脑的唯一细胞,但CSF-1R的低水平已在培养的神经元中观察到。配体CSF-1至CSF-1R的结合通过酪氨酸激酶结构域的作用导致受体在一种或多种酪氨酸残基上的磷酸化。这种磷酸化作用可被检测到,因为只有磷酸化后抗体才能与受体结合(例如来自Cell Signaling Technology的Phospho-M-CSF-Receptor(Tyr546)抗体#3083)。

[0024] CSF-1R的抗体是本领域中公知的。Sherr,C.J.等人,Blood 73(1989)1786-1793描述了针对CSF-1R的抗体,其抑制CSF-1活性(Sherr,C.J.等人,Blood 73(1989)1786-1793)。W009/026303公开了结合人CSF-1R的抗CSF-1R抗体和使用抗鼠CSF-1R抗体的体内小鼠肿瘤

模型。W011/123381中公开了抗CSF-1R抗体,其内化CSF-1R和具有ADCC活性。W011/123381公开了使用抗鼠CSF-1R抗体的体内小鼠肿瘤模型。W011/140249公开了阻断CSF-1与CSF-1R的结合的抗CSF-1R抗体,其被认为可用于治疗癌症。W009/112245公开了抑制CSF-1与CSF-1R结合的抗CSF-1R IgG1抗体,据称可用于治疗癌症,炎症性肠病和类风湿性关节炎。W011/131407公开了抗CSF-1R抗体,其抑制CSF-1结合到CSF-1R和被描述为适用于治疗骨损失和癌症。W011/107553中公开了抗CSF-1R抗体,其抑制CSF-1结合到CSF-1R和被描述为适用于骨损失和癌症的治疗。W011/070024公开了抗CSF-1R抗体,其结合人CSF-1R片段de1D4。W015/028455公开了抗CSF-1R抗体,其抑制CSF-1结合到CSF-1R和被描述为适用于纤维化和癌症的治疗。

[0025] 然而,仍然存在与大生物分子(例如抗体)的血脑屏障(BBB)渗透性相关的严重限制和担忧。到目前为止,通过大分子或抗体来调节脑部炎症尚未被证明是成功的。而且,已经显示,与IgG1抗体融合的临床使用的重组TNF受体依那西普在啮齿类动物全身施用后不会穿过血脑屏障(BBB)并且不影响脑中TNF- α 驱动的炎症(Zhou等,2011)。对于系统性注射(其为典型的临床给药途径)抗体的中枢介导的治疗效果的潜力仍存在重大疑虑。这对于抗CSF1R抗体是特别有问题的,因为CSF1R也在脑毛细血管的内皮细胞中表达,并且通过其天然配体IL-34活化该受体已显示恢复BBB完整性并限制其渗透性(Jin等,2014)。

[0026] 因此,目前对改善的、安全和有效的治疗和/或预防神经系统疾病的医疗需求尚未得到满足。因此,本发明的目的是提供一种治疗神经系统疾病、更具体地是癫痫的新方法。

[0027] 发明概述

[0028] 一方面,本发明提供CSF-1R活性抑制剂,其用于治疗和/或预防神经系统疾病。

[0029] 一方面,本发明的抑制剂是一种核酸。另一方面,本发明的抑制剂是抗体或其功能活性片段或衍生物。

[0030] 在一个方面,本发明提出的结果表明在颞叶癫痫(TLE)动物模型中的抗CSF-1R抗体的全身注射能够调节小胶质细胞的功能,这由小胶质细胞基因的表达变化所证明。因此,所呈现的结果提供有效可行的治疗性生物学实体(NBE),其作为CSF-1R活性抑制剂用于治疗和/或预防神经系统疾病。

[0031] 因此,本发明解决了未满足的需求并提供了CSF-1R活性抑制剂,其用于治疗和/或预防神经系统疾病。本发明进一步提供CSF-1R活性抑制剂,其用于治疗和/或预防癫痫,癫痫发生,癫痫发作和惊厥。

[0032] 在本发明的一个方面,提供了CSF-1R活性抑制剂在制备用于神经系统疾病的治疗和或预防的药物中的用途。

[0033] 本发明进一步提供了包含CSF-1R活性抑制剂的药物组合物。另外,本发明提供了用于治疗和/或预防患有神经系统疾病或处于发展神经系统疾病风险的人类受试者的方法,其包括给予治疗有效量的CSF-1R活性抑制剂。

发明内容

[0034] 在本发明的一个实施方案中,提供用于治疗和/或预防神经系统疾病的CSF-1R活性抑制剂,其是核酸。在进一步的方面,本发明的抑制剂是抗体或其功能活性片段或衍生物。

[0035] 在本发明中,术语“神经系统疾病”是指下列疾病:阿尔茨海默氏病,肌萎缩侧索硬化(ALS),Angelman综合征,注意力缺陷多动障碍,自闭症谱系,双相情感障碍,脑损害,脑损伤,脑肿瘤,中枢性疼痛综合征,脑萎缩,慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP),慢性疼痛,复合性区域疼痛综合征,克雅氏病,老年痴呆症,唐氏综合征,Dravet综合征,脑炎,特发性震颤,弗里德赖希共济失调(Friedreich's ataxia),脆性X综合征(Fragile X syndrome),脆性X-相关震颤/共济失调综合征(FXTAS),头部损伤,头痛,带状疱疹,亨廷顿氏病,缺氧,免疫介导性脑脊髓炎,婴儿痉挛症,颅内高压,拉福拉病,Landau-Kleffner综合征,Lennox-Gastaut综合征,脑白质营养不良,具有消损白质的脑白质病,Lewy体痴呆,无脑回畸形,莱姆病-神经系统后遗症,巨脑,脑脊膜炎(Meningitis),小头畸形,偏头痛,小中风(Mini-stroke)(短暂性脑缺血发作),运动神经元病-见肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis),多发性梗死性痴呆,多发性硬化,婴儿肌阵挛性脑病,肌阵挛,艾滋病的神经系统表现(Neurological manifestations of AIDS),狼疮的神经系统后遗症,神经元蜡样质脂褐质沉积病,神经病,尼曼-匹克病,大田原综合征,帕金森氏病,副肿瘤性疾病,原发性侧索硬化,朊病毒病,进行性多灶性脑白质病,进行性核上性麻痹,拉斯穆森脑炎,不宁腿综合征,Rett综合征,僵人综合征,中风,短暂性脑缺血发作,外伤性脑损伤,震颤,结节性硬化症,翁-伦病(Unverricht-Lundborg disease),钩突癫痫(Uncinate epilepsy),West综合征,威尔逊氏病。

[0036] 神经系统疾病的优选实例包括Angelman综合征,注意力缺陷多动障碍,自闭症谱系,脑损伤,脑肿瘤,克雅氏病,唐氏综合征,Dravet综合征,脑炎,脆性X综合征,脆性X关联震颤/共济失调综合征(FXTAS),头部损伤,带状疱疹,缺氧,免疫介导性脑脊髓炎,婴儿痉挛症,拉福拉病,Landau-Kleffner综合征,Lennox-Gastaut综合征,脑白质营养不良,具有消损白质的脑白质病,无脑回畸形,莱姆病-神经系统后遗症,脑脊膜炎,多发性硬化,婴儿肌阵挛性脑病,肌阵挛,狼疮的神经系统后遗症,大田原综合征,朊病毒疾病,拉斯穆森脑炎,Rett综合征,外伤性脑损伤,结节性硬化症,Unverricht-Lundborg病,钩突癫痫或West综合征。

[0037] 在本发明中治疗神经系统疾病优选涉及癫痫,癫痫发生,癫痫发作障碍和惊厥。

[0038] 按照发病年龄排列的癫痫综合征的例子是新生儿期(良性家族性新生儿癫痫(BFNE),早期肌阵挛性脑病(EME),大田原综合征),婴儿(具有迁移局灶性癫痫发作的婴儿癫痫,West综合征,婴儿肌阵挛性癫痫(MEI),良性婴儿癫痫,良性家族性婴儿癫痫,dravet综合征,在非进展性障碍中的肌阵挛性脑病),儿童(热性癫痫发作加(febrile seizures plus)(FS+),它可以在婴儿期开始,panayiotopoulos综合征,伴肌阵挛失张力(以前称为不安定)癫痫发作的癫痫,伴中央颞区棘的良性癫痫(benign epilepsy with centrotemporal spikes)(BECTS),常染色体显性遗传夜间额叶癫痫(ADNFLE),晚发性儿童枕部癫痫(Gastaut型),伴肌阵挛性失神的癫痫,Lennox-Gastaut综合征,在睡眠期间伴有连续棘波和波的癫痫性脑病(CSWS)b,Landau-Kleffner综合征(LKS),儿童期失神癫痫(CAE)),青春期/成人(青少年失神癫痫(JAE),青少年肌阵挛性癫痫(JME),癫痫全身强直-阵挛性发作孤独(epilepsy with generalized tonic-clonic seizures alone),渐进性肌阵挛癫痫(PME),常染色体显性遗传性癫痫伴听觉功能(autosomal dominant epilepsy with auditory features)(ADEAF),其他家族性颞叶癫痫),更少特定年龄关系(家族局灶

性癫痫伴有可变灶(童年到成人),反射性癫痫),独特的群(有或没有海马硬化的近中颞叶癫痫(有或无HS的MTLE),Rasmussen综合征,痴笑发作伴有下丘脑错构瘤,单侧惊厥-偏瘫-癫痫,不符合任何这些诊断类别的癫痫可以首先基于已知结构或代谢状况(推测原因)的存在或不存在、然后基于癫痫发作发病的主要模式而被区分(全身性与局灶性)),归因于结构性代谢原因和由结构性代谢原因编组的癫痫(皮质发育的畸形(半侧巨脑畸形,异位等),神经皮肤综合征(复合型结节性硬化症,斯特季-韦伯二氏病(Sturge-Weber)等),肿瘤,感染,外伤,血管瘤,围产期损伤,中风),原因和状况不明的癫痫,其伴有在传统上未被诊断为癫痫本身的形式形式的癫痫发作(良性新生儿癫痫发作(BNS),热性癫痫发作(FS))。

[0039] 在更优选的实施方案中,本发明提供了抑制剂,其用于治疗和/或预防癫痫,其中癫痫的类型选自由以下组成的组:全身性癫痫发作,局灶性癫痫发作和未知起源的癫痫发作。在最优选的实施方案中,本发明提供了抑制剂,其用于治疗和/或预防颞叶癫痫(TLE)。

[0040] 如本文所使用的术语“CSF-1R活性”是指本领域中理解的CSF-1R活性谱,特别是人CSF-1R的活性和它们的同种型,例如1,2,3或所有同种型。例如,配体与受体的结合在特定的酪氨酸残基(Bourette RP和Rohrschneider LR,2000,Growth Factors 17:155-166)诱导CSF-1R的磷酸化和信号转导事件的随后级联(ensuing cascade)可介导细胞迁移,存活,分化和增殖(Suzu S等人,1997,J Immunol,159,1860-7;Yeung Y-G和Stanley ER,2003,Mol Cell Proteomics,2,1143-55;Yu W等人2008,J Leukoc Biol84(3),852-63)。在包含代替选择的酪氨酸残基的苯丙氨酸残基的突变体CSF-1R受体分子的转染的细胞中的表达揭示了特定酪氨酸残基与细胞结果如存活,增殖和形态的关联(Yu等人JLeukoc Biol 2008Sep 84(3):852-863)。使用抗磷酸酪氨酸抗体与分子特异性抗体的蛋白质组学方法和免疫印迹技术,已经确定了在配体刺激受体之后介导这些细胞功能的一些细胞内分子(Yeung Y-G等人,1998,JBiol Chem.13,273(46):17128-37;Husson H等人,1997,Oncogene15,14(19):2331-8。

[0041] 根据本发明CSF-1R活性抑制剂是干扰、例如减少/抑制、阻断CSF-1R的活性(特别是CSF-1R在神经系统疾病中的活性)或与CSF-1R的活性(特别是CSF-1R在神经系统疾病中的活性)竞争的试剂。特别优选的是在阿尔茨海默氏病,帕金森氏病,癫痫,癫痫发生,癫痫发作和惊厥中干扰CSF-1R活性的试剂。根据本发明的抑制剂可以部分地或完全地抑制CSF-1R的活性。在本发明中使用的抑制剂包括但不限于,能够与IL-34、CSF-1或CSF-1受体(CSF-1R)或编码IL-34、CSF-1或CSF-1R的核酸分子相互作用(例如结合,或识别),或能够抑制IL-34、CSF-1或CSF-1R的表达,或者能够抑制CSF-1R与CSF-1和/或IL-34之间的相互作用的抑制剂。这样的抑制剂可以是而限于抗体,核酸(例如DNA,RNA,反义RNA和siRNA),碳水化合物,脂质,蛋白质,多肽,肽,肽模拟物和其他药物。

[0042] 合适的抑制剂的实例包括,但不限于,结合CSF-1并干扰与天然CSF-1受体的结合的CSF-1受体的合成功能片段,结合CSF-1受体并干扰与天然CSF-1受体的结合的CSF-1受体的合成功能片段,结合CSF-1受体并干扰与天然CSF-1受体的结合的IL-34的合成功能片段,结合CSF-1或IL-34或CSF-1受体并干扰CSF-1受体-配体相互作用的抗体,特异性杂交编码CSF-1、IL-34或CSF-1受体的mRNA的反义核酸分子或其它抑制IL-34、CSF-1或CSF-1R的活性的药物。

[0043] CSF-1受体活性的抑制剂在本领域中是已知的,鉴定和生产这类抑制剂的方法也

是已知的。中和抗CSF-1抗体已被以下描述：例如Weir等人,1996,J Bone Miner.Res.11, 1474-1481和Haran-Ghera等人,1997,Blood,89,2537-2545,其也描述抗CSF-1R抗体。CSF-1的反义拮抗剂也已经被描述(EP1223980)。

[0044] 可以是合适的抑制剂的试剂可以从各种各样的候选试剂中选择。候选试剂的实例包括但不限于,核酸(例如DNA和RNA),碳水化合物,脂质,蛋白质,多肽,肽,肽模拟物和其他药物。可使用任何在本领域中已知的组合文库方法来获得试剂,所述文库包括:生物文库,空间可寻址的平行固相或溶液相文库;合成文库方法需要解卷积(synthetic library methods requiring deconvolution);“一珠一化合物”文库方法和使用亲和层析选择的合成文库法。生物文库方法适合于肽文库,而其它四种方法适用于肽,非肽寡聚物或化合物文库(Lam,1997,Anticancer Drug Des.12:145;U.S.5,738,996;和U.S.5,807,683)。

[0045] 基于本说明书用于合成分子文库的合适方法的例子可在本领域中找到,例如在以下中找到:DeWitt等人,1993,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6909;Erb等人,1994,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:11422;Zuckermann等人,1994,J.Med.Chem.37:2678;Cho等人,1993,Science 261:1303;Carrell等人,1994,Angew.Chem.int.Ed.Engl.33:2059;Carrell等人,1994,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.33:2061;和Gallop等人,1994,J.Med.Chem.37:1233。

[0046] 化合物的文库可以被呈现,例如,在溶液中(例如Houghten,1992,Bio/Techniques 13:412-421),或在珠(Lam,1991,Nature 354:82-84),芯片(Fodor,1993,Nature 364:555-556),细菌(US 5,223,409),孢子(US 5,571,698;5,403,484;和5,223,409),质粒(Cull等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:1865-1869)或噬菌体上(Scott和Smith,1990,Science 249:386-390;Devlin,1990,Science 249:404-406;Cwirla等人,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:6378-6382;和Felici,1991,J.Mol.Biol.222:301-310)。

[0047] 在一个实例中,用于本发明中的抑制剂可以是核酸。特别的是,CSF-1、IL-34或CSF-1R核酸分子可被用作反义分子,以通过结合互补核酸而改变它们各自多肽的表达。CSF-1、IL-34或CSF-1R核酸可以使用标准克隆技术从例如基因组DNA或cDNA得到,或可以使用公知的并且可商购的技术来合成。该CSF-1、IL-34或CSF-1R核酸可在CSF-1、IL-34或CSF-1R核酸的核苷酸序列中含有一个或多个核苷酸取代,添加或缺失。本领域技术人员已知的标准技术可用于引入突变,包括,例如,定点诱变和PCR介导的诱变。根据本发明的反义核酸包括CSF-1、IL-34或CSF-1R核酸,其能够通过与其编码相应多肽的RNA部分(优选mRNA)的一些序列互补性而进行杂交。反义核酸可以与编码这样的多肽的mRNA的编码和/或非编码区互补。最优选的是,反义核酸导致抑制CSF-1、IL-34或CSF-1R多肽的表达。本发明还提供了CSF-1R活性抑制剂,其用于治疗 and/或预防患有神经系统疾病或处于发展神经系统疾病风险的人类受试者,包括向所述受试者施用治疗有效量的CSF-1R活性抑制剂,其为分离的DNA,包含至少8个核苷酸(例如15至22个核苷酸,如15,16,17,18,19,20,21或22个核苷酸),所述核苷酸反义于编码CSF-1、IL-34或CSF-1R多肽的基因或cDNA。

[0048] 在一个实施方案中,用于治疗 and/或预防神经系统疾病的抑制剂是与CSF-1或IL-34相互作用(例如结合或识别)的抗体。在另一个实施方案中,所述抗体选择性地与CSF-1或IL-34相互作用。选择性相互作用(例如识别或结合)是指抗体对CSF-1或IL-34多肽的亲合力大于对其它多肽的亲合力。合适的抗体的实例是那些通过以下抑制CSF-1的活性的抗体:

通过以防止CSF-1或IL-34在生物学上有活性的方式结合CSF-1或IL-34,例如通过防止CSF-1或IL-34结合其受体。

[0049] 本发明的一个实施方案提供用于治疗 and/或预防神经系统疾病的抑制剂,其中所述抗体或其片段或衍生物结合CSF-1R。最优选的是,用于治疗 and/或预防神经系统疾病的抑制剂是与CSF-1R相互作用(即,结合或识别)并抑制CSF-1R的活性的抗体。在一个实施方案中,抗体选择性地与CSF-1R相互作用。选择性相互作用(例如识别或结合)意味着该抗体对CSF-1R多肽的亲合力大于对其它多肽的亲合力。合适的抗体的实例是那些通过以防止CSF-1R在生物学上具有活性的方式结合CSF-1R而抑制CSF-1R活性的抗体。

[0050] 在一个实施方案中,抗体识别CSF-1R的同种型,例如人CSF-1R和其同种型。

[0051] 在一个实施方案中,根据本发明的用于治疗 and/或预防神经系统疾病的CSF-1R活性抑制剂阻断CSF-1与受体CSF-1R的结合。

[0052] 本文采用的“阻断”是指物理阻断,诸如封闭所述受体,但也包括以下情况:其中该抗体或片段结合表位,其导致,例如构象改变,这意味着天然配体与受体不再结合。(这里简称为变构阻断或变构抑制)。

[0053] 在一个实施方案中,本发明的抗体结合CSF-1R的所有同种型,例如那些具有在ECD结构域中的变异、如V23G、A245S、H247P、V279M的同种型,及具有所述变异的两个、三个或四个组合的同种型。CSF-1和IL-34都是CSF-1R的配体,并且用于本发明的抗体优选在功能性细胞筛选中抑制CSF-1和IL-34两者的活性。用于本发明的抗体也优选不引起CSF-1R活化和/或CSF-1R内化。

[0054] 本文实施例描述了适合于确定抗体阻断CSF-1R的能力的测定,参见实施例2。

[0055] BIAcore是用于测量结合动力学的测定的实例,使用单核细胞或THP-1细胞的ELISA测定或基于细胞的测定也可能是有用的。CSF-1和IL-34都是CSF-1R的配体,抗CSF-1R抗体可以阻断CSF-1或IL-34结合到CSF-1R但优选阻断CSF-1和IL-34两者与CSF-1R结合。抗CSF-1R抗体也优选不引起CSF-1R活化或CSF-1R内化。适于测定抗体引起CSF-1R活化或CSF-1R内化的能力的测定在实施例中描述,参见实施例2,其描述了测量CSF-1依赖性增殖的测定。

[0056] CSF-1、IL-34或CSF-1R多肽或表达所述多肽的细胞可用于产生特异性识别所述多肽的抗体。

[0057] CSF-1, IL-34和CSF-1R多肽可以是“成熟”多肽或其生物学活性片段或衍生物。优选地,CSF-1多肽含有被认为对于生物活性是重要的氨基酸1-149。

[0058] 本文所用的CSF-1R是指命名为CSF-1R(如SEQ ID NO:11中所示)的蛋白,其同种型或其生物活性片段。SEQ ID NO:11示出了人CSF1-R的全部972个氨基酸序列,其中残基1-19是预测的信号肽。优选地,CSF-1R多肽含有人类的氨基酸20-517,其代表CSF-1R的序列的预测的细胞外区域。CSF-1R的替换形式是已知的。在一个实施方案中CSF-1R是人蛋白质或其同种型。通常,本发明中使用的抗体将被引导到CSF-1R的细胞外结构域。如图2(SEQ ID NO:15)中所示的人CSF-1R在UniProt数据库中以P07333注册。

[0059] CSF-1和CSF-1R多肽可以通过本领域中公知的方法从包含表达系统的遗传工程化的宿主细胞来制备,或者它们可以从天然生物来源回收。在一个实施方案中,如在图2(SEQ ID NO:15)中所示的序列可以被转染入适当的细胞系和在所述细胞表面表达多肽。氨基酸

片段可以与GPI锚(anchor)融合以促进表达。细胞可以用于免疫宿主。

[0060] 在本申请中,术语“多肽”包括肽,多肽和蛋白质。这些可互换使用,除非另有规定。CSF-1、IL-34或CSF-1R多肽可以在一些情况下是更大的蛋白质的一部分,例如一个例如与亲和标签融合的融合蛋白。

[0061] 针对这些多肽产生的抗体可以通过以下获得:将多肽或表达所述多肽的细胞施用至动物、优选非人类的动物,使用公知的和常规的方案,参见例如Handbook of Experimental Immunology,D.M.Weir(ed.),Vol4,Blackwell Scientific Publishers,Oxford,England,1986。许多温血动物,例如兔,小鼠,大鼠,绵羊,牛或猪可进行免疫。但是,小鼠,兔,猪和大鼠通常是优选的。

[0062] 在一个实施方案中,本发明提供的抑制剂是抗体或其功能活性片段或衍生物。在另一个实施方案中,由本发明提供的抑制剂是单克隆抗体或多克隆抗体。在另一个实施方案中,本发明提供的抑制剂是抗体或其片段或衍生物,所述抗体是嵌合的、人源化的或人抗体。

[0063] 单克隆抗体可以通过本领域中已知的任何方法来制备,所述方法例如杂交瘤技术(Kohler和Milstein,1975,Nature,256:495-497),三源杂交瘤技术,人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,1983,Immunology Today,4:72)和EBV-杂交瘤技术(Cole等人,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,p77-96,Alan R Liss,Inc.,1985)。

[0064] 本发明中使用的抗体还可以通过克隆和表达免疫球蛋白可变区cDNA、使用单一淋巴细胞抗体方法产生,所述cDNA产生自单一淋巴细胞,所述单一淋巴细胞被选择用于产生特异性抗体,通过例如由以下描述的方法:Babcock,J.等人,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA93(15):7843-7848,W092/02551和W02004/051268和W02004/106377。

[0065] 如本文所用的特异性是指,只识别抗体特异于的抗原的抗体,对抗体特异于的抗原具有的结合亲和力比对抗体不特异于的抗原具有的结合亲和力显著更高的抗体,例如至少5、6、7、8、9、10倍更高的结合亲和力。

[0066] 嵌合抗体是由免疫球蛋白基因所编码的那些抗体,所述免疫球蛋白基因已被基因工程化,使得轻和重链基因由属于不同物种的免疫球蛋白基因区段组成。这些嵌合抗体可能具有较小的抗原性。二价抗体可以通过在本领域中已知的方法来制备(Milstein等人,1983,Nature305:537-539;W093/08829,Traunecker等人,1991,EMBO J.10:3655-3659)。多价抗体可以包含多重特异性或可以是单特异性的(参见例如W092/22853)。

[0067] 如本文所用,术语“人源化抗体分子”指这样的抗体分子,其中重链和/或轻链含有,从供体抗体(例如,鼠单克隆抗体)移植到受体抗体(例如人抗体)的重链和/或轻链可变区框架的一个或多个CDR(包括,如果需要,一种或多种修饰的CDR)(参见,例如US5,585,089;W091/09967)。对于综述,参见Vaughan等人,Nature Biotechnology,16,535-539,1998。

[0068] 在一个实施方案中,不是整个CDR被转移,而只有一个或多个来自CDR的任何一个人的特异性决定性残基被转移给人类抗体框架(见例如Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。在一个实施方案中,只有来自一个或多个上述的CDR的特异性决定性残基转移到人类抗体框架。在另一个实施方案中,仅来自每个上述CDR的特异性决定性残基转移到人类抗体

框架。

[0069] 在本发明的人源化抗体中,框架区域不需要有与受体抗体完全相同的序列。例如,不常见的残基可改变为更频繁出现的残基,这是针对受体链类或类型。另外,在受体框架区选定的残基可能会发生变化,使得它们对应于在供体抗体的同一位置发现的残基(见Reichmann等人,1998,Nature,332,323-324)。这种变化应保持在恢复供体抗体亲和力所需的最低限度。用于选择可能需要改变的受体框架区域中的残基的方案被列于W091/09967。

[0070] 当CDR或特异性决定性残基被移植时,任何适当的受体可变区框架序列可被使用,其依据CDR源自的供体抗体的类别/类型,包括小鼠、灵长类动物和人类框架区。

[0071] 适当的人源化抗体具有可变的结构域,其包括人类受体框架区以及一个或多个CDR。因此,在一个实施方案中提供了人源化抗体,其结合人类CSF-1、IL-34或CSF-1R,其中可变的结构域包括人受体框架区和非人供体CDR。

[0072] 可用于本发明的人类框架的例子是KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY和POM(Kabat等人,同上)。例如,KOL和NEWM可以用于重链,REI可用于轻链,并且EU、LAY和POM可用于重链和轻链两者。另外,人类种系序列可被使用;这些都是可以在以下获得的:<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>。

[0073] 在本发明的人源化抗体中,受体的重链和轻链不一定需要来自相同的抗体,如果需要的话,可以包括有来自不同链的框架区域的复合链。

[0074] 本发明中使用的抗体也可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法产生,包括由以下公开的方法:Brinkman等人(in J.Immunol.Methods,1995,182:41-50),Ames等人(J.Immunol.Methods,1995,184:177-186),Kettleborough等人(Eur.J.Immunol.1994,24:952-958),Persic等人(Gene,1997 187 9-18),Burton等人(Advances in Immunology,1994,57:191-280)和W0 90/02809;W0 91/10737;W0 92/01047;W0 92/18619;W0 93/11236;W0 95/15982;W0 95/20401;和US 5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743和5,969,108。对于生产单链抗体的技术,如在US 4,946,778中描述的那些也可用于产生CSF-1,IL-34或CSF-1R多肽的单链抗体。此外,转基因小鼠,或其他生物,包括其他哺乳动物,可以用来表达人源化抗体。

[0075] 本实施方案提供了CSF-1R活性抑制剂的抗体,其是抗体或其片段或衍生物,其是双特异性或多异性的。在本发明的另一实施方案中,用于治疗和/或预防神经系统疾病的抗体可以选自具有完整长度的重链和轻链的完整抗体分子或其片段,所述片段选自:Fab,改性Fab,Fab',改性Fab',F(ab')₂,Fv,单结构域抗体(例如,VH或VL或VHH)、scFv、双价、三价或四价抗体、Bis-scFv、双体、三体,四体和上述任意项的表位结合片段(参见例如Holliger和Hudson,2005,Nature Biotech.23(9):1126-1136;Adair和Lawson,2005,Drug Design Reviews-Online2(3),209-217)。

[0076] 创造和制造这些抗体片段的方法是本领域公知的(例如见Verma等人,1998,Journal of Immunological Methods,216,165-181)。用于本发明的其他抗体片段包括在国际专利申请W02005/003169、W02005/003170和W02005/003171描述的Fab和Fab'片段。多价抗体可能包括多个特异性如双特异性或可以是单特异性的(见例如W0 92/22853,W005/113605,W02009/040562和W02010/035012)。

[0077] 在一个实施方案中,抗体被提供为CSF-1, IL-34或CSF-1R结合性抗体融合蛋白,其包含免疫球蛋白部分(例如Fab或Fab'片段)和直接或者间接地与其连接的一个或两个单域抗体(dAb),例如如在以下中描述的:W02009/040562, W02010/035012, W02011/030107, W02011/061492和W02011/086091,前述全部以引用的方式并入本文。

[0078] 在一个实施方案中,融合蛋白包含两个结构域抗体,例如可选地通过二硫键连接的可变重(VH)和可变轻(VL)配对。

[0079] 在一个实施方案中,融合蛋白的Fab或Fab'元件对单结构域抗体具有相同或相似的特异性。在一个实施方案中,Fab或Fab'对单结构域抗体具有不同的特异性,也就是说融合蛋白是多价的。在一个实施方案中,根据本发明的多价融合蛋白具有白蛋白结合位点,例如其中的VH/VL对提供白蛋白结合位点。

[0080] 抗体片段及其制备方法在本领域是公知的,参见例如Verma等人,1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181。用于本发明的抗体片段的具体实例是具有天然或修饰的铰链区的Fab'片段。已经描述了许多修饰的铰链区,例如在US 5,677,425, W099/15549和W098/25971中所述,并且这些文献通过引用并入本文。用于本发明的特定抗体片段的其它实例包括在以下中所述的那些片段:国际专利申请PCT/GB2004/002810, PCT/GB2004/002870和PCT/GB2004/002871(均于2004年7月1日提交)。具体而言,国际专利申请PCT/GB2004/002810中描述的修饰的抗体Fab片段是优选的。

[0081] 在一个实施方案中,抗体重链包含CH1结构域,并且抗体轻链包含CL结构域,其为 κ 或 λ CL结构域。

[0082] 在一个实施方案中,抗体重链包含CH1结构域,CH2结构域和CH3结构域,抗体轻链包含CL结构域,其为 κ 或 λ CL结构域。

[0083] 如果存在的话,本发明的抗体分子的恒定区结构域可以根据所提出的抗体分子的功能、特别是可能需要的效应子功能来选择。例如,恒定区结构域可以是人IgA, IgD, IgE, IgG或IgM结构域。特别地,当抗体分子打算用于治疗用途并且需要抗体效应子功能时,可以使用人IgG恒定区结构域,尤其是IgG1和IgG3同种型(isotype)。或者,当抗体分子用于治疗目的并且不需要抗体效应子功能时,可以使用IgG2和IgG4同种型(isotype)。

[0084] 在一个具体实施例中,本发明的抗体是IgG2或IgG4抗体。还将认识到,这些恒定区结构域的序列变体也可以被使用。例如其中241位丝氨酸已变为脯氨酸的IgG4分子(如在Angal等人,1993, *Molecular Immunology*, 1993, 30:105-108中所述)可以被使用。单一的氨基酸取代废除嵌合鼠/人(IgG4)抗体的异质性。*Mol. Immunol.* 30:105-108)描述了一个定点突变的方法,其用于最少化IgG4抗体半分子的形成。在这个报告中,核心铰链内单一的氨基酸取代S241P导致实质更少的半分子形成。因此,在其中抗体是IgG4抗体的实施方案中,该抗体可包括突变S241P。不同IgG同种型(isotype)诱导的差异化ADCC依赖于这些残基对Fc γ Rs的亲和力。在人类中,众所周知的是IgG1和IgG3诱导效应子功能,而IgG2和IgG4更弱地诱导效应子功能。在一个优选实施方案中,用于本发明的抗体是IgG2或IgG4抗体,其更弱地诱导效应子功能,包括ADCC。特别优选的是,本发明的用于治疗神经系统疾病的抗体具有有限的效应子功能,其原因在于具有效应子功能的抗体的使用可能会导致表达CSF-1R的细胞的增加的消耗,这有可能增加患者中的副作用。

[0085] 本领域技术人员还将理解,抗体可经历多种翻译后修饰。这些修饰的类型和程度

通常取决于用于表达抗体的宿主细胞系以及培养条件。这种修饰可以包括糖基化,甲硫氨酸氧化,二酮哌嗪形成,天冬氨酸异构化和天冬酰胺脱酰胺化的变化。常见的修饰是由于羧肽酶的作用而丧失羧基末端碱性残基(如赖氨酸或精氨酸)(如Harris,RJ.Journal of Chromatography 705:129-134,1995中所述)。因此,抗体重链的C-末端赖氨酸可以不存在。

[0086] 在另一个实施方案中,CSF-1R活性抑制剂可以用于治疗和/或预防神经系统疾病,其是穿过血脑屏障(BBB)以治疗有效量达到脑中的抗体或其片段或衍生物,所述治疗有效量足够治疗和/或预防患有神经系统疾病的患者。

[0087] 如本文所用,术语“治疗有效量”是指治疗、改善或预防靶疾病或状况,或显示可检测的治疗、药理或预防效果所需的治疗剂的量。对于任何抗体,治疗有效量可以在细胞培养测定或动物模型中进行初始估计,通常在啮齿动物,兔,狗,猪或灵长类中。动物模型也可用于确定适当的浓度范围和给药途径。然后可以使用这些信息来确定用于人类施用的有效剂量和途径。

[0088] 人受试者的精确治疗有效量将取决于疾病状态的严重程度,受试者的一般健康状况,受试者的年龄,体重和性别,饮食,施用的时间和频率,药物组合,反应敏感性和对治疗的耐受/响应。这个量可以通过常规实验来确定,并在临床医师的判断之内。通常,治疗有效量将为0.01mg/kg至500mg/kg,例如0.1mg/kg至200mg/kg,如100mg/kg。

[0089] 在另一个实施方案中,用于治疗和/或预防神经系统疾病的抑制剂是包含重链和轻链的抗体或其片段或衍生物,其中重链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有CDR-H1的SEQ ID NO:4中给出的序列的CDR,具有CDR-H2的SEQ ID NO:5中给出的序列的CDR,以及具有CDR-H3的SEQ ID NO:6中给出的序列的CDR。

[0090] 本发明还提供用于治疗和/或预防神经系统疾病的抑制剂,其中抗体或其片段或衍生物包含重链和轻链,其中轻链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有CDR-L1的SEQ ID NO:1中给出的序列的CDR,具有CDR-L2的SEQ ID NO:2中给出的序列的CDR和CDR-L3的具有SEQ ID NO:3中给出的序列的CDR。

[0091] 在另一个实施方案中,用于治疗和/或预防神经系统疾病的抑制剂是包含重链和轻链的抑制剂,其中重链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有SEQ ID NO:4中给出的序列的CDR-H1,具有SEQ ID NO:5中给出的序列的CDR-H2和具有SEQ ID NO:6中给出的序列的CDR-H3,并且其中轻链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有SEQ ID NO:1中给出的序列的CDR-L1,具有SEQ ID NO:2中给出的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:3中给出的序列的CDR-L3。

[0092] 在另一个实施方案中,用于治疗和/或预防神经系统疾病的抑制剂是其中重链包含SEQ ID NO:9中给出的序列的抑制剂。

[0093] 本发明还提供了用于治疗和/或预防神经系统疾病的抑制剂,其中所述轻链包含SEQ ID NO:7中给出的序列。

[0094] 本发明还提供了用于治疗和/或预防神经系统疾病的抑制剂,其具有包含SEQ ID NO:9中给出的序列的重链和包含SEQ ID NO:7中给出的序列的轻链。

[0095] 在本发明的一个方面,提供了抗CSF-1R抗体或其结合片段或衍生物,其中重链的可变结构域包含三个CDR,并且CDR-H1的序列与SEQ ID NO:4中给出的序列具有至少60%、70、80%、90%或95%的同一性或相似性,CDR-H2的序列与SEQ ID NO:5中给出的序列具有

至少60%、70%、80%、90%或95%的同一性或相似性,CDR-H-3的序列与SEQ ID NO:6中给出的序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%的同一性或相似性。优选地,抗CSF-1R抗体或其结合片段还包含轻链,其中轻链的可变结构域包含三个CDR并且CDR-L1的序列与SEQ ID NO:1中给出的序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%的同一性或相似性,CDR-L2的序列与SEQ ID NO:2中给出的序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%的同一性或相似性和CDR-L3的序列与SEQ ID NO:3中给出的序列具有至少60%的同一性或相似性。在一个实施方案中,提供的可变区与本文公开的可变区序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%的同一性或相似性。

[0096] 如本文所用,“同一性”表示在比对序列中的任何特定位置,氨基酸残基在序列之间是相同的。如本文所用,“相似性”表示在比对序列中的任何特定位置处,氨基酸残基在序列之间具有相似的类型。例如,亮氨酸可以被异亮氨酸或缬氨酸取代。其他可以经常被另一种氨基酸取代的氨基酸包括但不限于:

[0097] -苯丙氨酸,酪氨酸和色氨酸(具有芳族侧链的氨基酸);

[0098] -赖氨酸,精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);

[0099] -天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);

[0100] -天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸);和

[0101] -半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。

[0102] 可以容易地计算同一性和相似性程度(Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991, the BLASTTM software available from NCBI (Altschul, S.F. 等人, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410; Gish, W. & States, D.J. 1993, Nature Genet. 3: 266-272. Madden, T.L. 等人, 1996, Meth. Enzymol. 266: 131-141; Altschul, S.F. 等人, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402; Zhang, J. & Madden, T.L. 1997, Genome Res. 7: 649-656)。

[0103] 在本发明的一个实施方案中,用于治疗和/或预防神经系统疾病的抑制剂是,其中具有根据BIAcore方法确定的10pM或小于10pM的对人CSF-1R的结合亲和力[K_D]的抗体或其片段或衍生物的抑制剂。

[0104] 在本发明的一个实施方案中,用于治疗和/或预防神经系统疾病的抑制剂是,其中抗体或其片段或衍生物以根据BIAcore方法确定的100pM或更少的[K_D]的亲和力交叉阻断抗CSF-1R抗体的结合。

[0105] 本发明的抗体或其片段或衍生物合适地具有高结合亲和力。亲和力可以使用本领域已知的任何合适的方法来测量,包括例如以下的技术:使用分离的天然或重组CSF-1R或合适的融合蛋白/多肽的,表面等离子共振,例如BIAcore。例如,可以使用重组人CSF-1R细胞外结构域来测量亲和力。用于使用的重组人CSF-1R细胞外结构域可以是单体。适合用于本发明的抗体分子对分离的人CSF-1R具有约1nM或小于1nM的结合亲和力。在一个实施方案

中,本发明的抗体分子具有约500pM或更低的结合亲和力。在一个实施方案中,本发明的抗体分子具有约250pM或更低的结合亲和力。在一个实施方案中,本发明的抗体分子具有约200pM或更低的结合亲和力。在一个实施方案中,本发明提供具有约100pM或更低的结合亲和力的抗CSF-1R抗体。在一个实施方案中,本发明提供了具有约100pM或更低,优选约10pM或更低,更优选约5pM或更低的结合亲和力的人源化抗CSF-1R抗体。在另一个实施方案中,本发明提供了具有约100pM或更低,优选约10pM或更低,更优选约5pM或更低的结合亲和力的人源化抗CSF-1R抗体。

[0106] 亲和力的数值越低,抗体或片段对抗原的亲和力越高。

[0107] 在本发明的一个实施方案中,用于治疗 and/或预防神经系统疾病的抑制剂是其中抗体或其片段或衍生物通过与其阻断的抗体结合相同表位来交叉阻断结合的抑制剂。W015/028455中描述了合适的交叉阻断测定的例子。

[0108] 本发明还提供了用于治疗 and/或预防神经系统疾病的抑制剂,其中抗体或其片段或衍生物与抗CSF-1R抗体的抗体或其片段或衍生物竞争结合SEQ ID NO:15的人c-fms的细胞外结构域。

[0109] 当在竞争相同表位的抗原结合蛋白(例如中和抗原结合蛋白或中和抗体)的上下文中使用时,术语“竞争”是指抗原结合蛋白之间的竞争通过测定来确定,在所述测定中受试的抗原结合蛋白(例如,抗体或其免疫功能片段或衍生物)阻止或抑制参考抗原结合蛋白(例如,配体或参考抗体)与共同抗原(common antigen)(例如,c-fms或其片段)的特异性结合。可以使用许多类型的竞争性结合测定,例如:固相直接或间接放射免疫测定(RIA),固相直接或间接酶免疫测定(EIA),夹心竞争测定(参见例如Stahli等人.,1983,Methods in Enzymology_2:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见例如,Kirkland等人,1986,J Immunol.137:3614-3619)固相直接标记的测定,固相直接标记的夹心测定法(参见例如Harlow和Lane,1988,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press);使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见例如Morel等人,1988,Molec.Immunol.25:7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见,例如,Cheung,等人,1990,Virology 176:546-552);和直接标记的RIA(Moldenhauer等人,1990,Scand.J Immunol.32:77-82)。通常,这样的测定涉及使用结合到固体表面的纯化的抗原或带有这些的任一种的细胞,未标记的测试抗原结合蛋白和标记的参考抗原结合蛋白。竞争性抑制通过确定在存在测试抗原结合蛋白的情况下与固体表面或细胞结合的标记的量来测量。通常测试抗原结合蛋白过量存在。通过竞争测定鉴定的抗原结合蛋白(竞争性抗原结合蛋白)包括与参考抗原结合蛋白结合相同表位的抗原结合蛋白和结合到与参考抗原结合蛋白结合的表位足够近以发生空间位阻的相邻表位的抗原结合蛋白。通常,当竞争性抗原结合蛋白过量存在时,它将抑制参照抗原结合蛋白与共同抗原的特异性结合至少40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%或75%。在一些情况下,结合被抑制至少80%,85%,90%,95%或97%或更多。

[0110] 在本发明的一个实施方案中,用于治疗 and/或预防神经系统疾病的抑制剂与CSF-1R抗体一样,结合人CSF-1R的表位。

[0111] 在本发明的一个实施方案中,用于治疗 and/或预防神经系统疾病的抑制剂是结合人CSF-1R的表位的抗体。

[0112] 人CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽的该特定区域或表位可通过本领域已知的任何合适的表位作图方法与本发明提供的任何一种抗体组合来鉴定。这样的方法的实例包括筛选来源于CSF-1R的不同长度的肽,该筛选针对与本发明的抗体的结合,其具有最小的片段,所述最小的片段可以特异性结合所述抗体,含有被所述抗体识别的表位序列。CSF-1, IL-34或CSF-1R肽可通过合成或通过蛋白水解消化CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽而产生。结合抗体的肽可以通过例如质谱分析来鉴定。在另一个实例中,可以使用NMR光谱学或X射线晶体学来鉴定由本发明的抗体结合的表位。一旦鉴定,如果需要,可以使用结合本发明抗体的表位片段作为免疫原以获得结合相同表位的其他抗体。

[0113] 生物分子如抗体或片段含有酸性和/或碱性官能团,由此给该分子带来净正电荷或负电荷。总“观察到的”电荷的量将取决于实体的绝对氨基酸序列,3D结构中带电荷的基团的局部环境以及分子的环境条件。等电点(pI)是特定分子或溶剂可接近表面不携带净电荷的pH。在一个实例中,可以将CSF-1, IL-34或CSF-1R抗体和片段工程化以具有合适的等电点。这可能导致抗体和/或片段具有更稳健的性质,特别是合适的溶解度和/或稳定性特征和/或改善的纯化特性。

[0114] 因此,在一个方面,本发明提供了工程化为具有与最初鉴定的抗体不同的等电点的人源化CSF-1, IL-34或CSF-1R抗体。抗体可以例如通过用一个或多个碱性氨基酸残基替代氨基酸残基(例如替代酸性氨基酸残基)来工程化。或者,可以引入碱性氨基酸残基或可以除去酸性氨基酸残基。或者,如果分子具有不可接受的高pI值,则可根据需要引入酸性残基以降低pI。重要的是,当操纵pI时,必须注意保持抗体或片段的期望的活性。因此,在一个实施方案中,工程化抗体或片段具有与“未修饰”抗体或片段相同或基本相同的活性。

[0115] 程序如**ExpASY http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html和

[0116] http://www.iut-arles.univ-mrs.fr/w3bb/d_abim/compo-p.html,可以用来预测抗体或片段的等电点。

[0117] 应该理解的是,可以使用本领域已知的任何合适的方法来改变由本发明提供的抗体的亲和力。因此,本发明还涉及对CSF-1, IL-34或CSF-1R具有改善的亲力的本发明抗体分子的变体。这些变体可以通过许多亲和力成熟方案获得,包括突变CDR (Yang等人, J.Mol.Biol., 254, 392-403, 1995), 链改组 (Marks等人, Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), 使用大肠杆菌 (E.coli) 的变异株 (Low等人, J.Mol.Biol., 250, 359-368, 1996), DNA改组 (Patten等人, Curr.Opin.Biotechnol., 8, 724-733, 1997), 噬菌体展示 (Thompson等人, J.Mol.Biol., 256, 77-88, 1996) 和有性PCR (sexual PCR) (Cramer等人, Nature, 391, 288-291, 1998)。Vaughan等人 (同上) 讨论了这些亲和力成熟的方法。

[0118] 如果需要,用于本发明的抗体可以缀合至一种或多种效应分子。本发明的一个实施方案提供用于治疗 and/或预防神经系统疾病的抗体,其中所述抗体或其片段或衍生物与一种或多种效应分子缀合。

[0119] 应理解,效应分子可以包含单个效应分子或两个或更多个这样的分子,所述分子如此连接以形成可以连接至本发明的抗体的单个部分。当需要获得与效应分子连接的抗体片段时,这可以通过标准化学或重组DNA程序来制备,其中抗体片段直接或通过偶联剂连接至效应分子。用于将此类效应分子缀合至抗体的技术是本领域所熟知的 (参见, Hellstrom等人, Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., Robinson等人, eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe

等人,1982,Immunol.Rev.,62:119-58and Dubowchik等人,1999,Pharmacology and Therapeutics,83,67-123)。具体的化学方法包括例如在以下中所述的那些:WO 93/06231,WO 92/22583,WO 89/00195,WO 89/01476和WO 03/031581。或者,在效应分子是蛋白质或多肽的情况下,可使用重组DNA程序实现连接,例如如WO 86/01533和EP0392745中所述。

[0120] 本文使用的术语效应分子包括例如抗肿瘤剂,药物,毒素,生物活性蛋白,例如酶,其它抗体或抗体片段,合成的或天然存在的聚合物,核酸及其片段,例如DNA,RNA及其片段,放射性核素,特别是放射性碘化物,放射性同位素,螯合金属,纳米颗粒和报道分子基团如荧光化合物或可以通过NMR或ESR光谱检测的化合物。

[0121] 效应分子的实例可以包括细胞毒素或细胞毒性剂,包括对细胞有害(例如杀死细胞)的任何试剂。实例包括:孔布尔他汀类(combrestatin),多拉司他汀类(dolastatin),埃博霉素类,星形孢菌素类(staurosporin),美登素类化合物类(maytansinoids),海绵抑制素类(spongistatin),根霉素(rhizoxin),软海绵素类(halichondrins),杆孢菌素类(roridins),hemiasterlins,泰素(taxol),松胞菌素B(cytochalasin B),短杆菌肽D,溴化乙锭,依米丁,丝裂霉素,依托泊苷,替尼泊苷(tenoposide),长春新碱,长春碱,秋水仙碱,多柔比星,柔红霉素,二羟基炭疽菌素二酮,米托蒽醌,光辉霉素,放线菌素D,1-去氢睾酮,糖皮质激素类,普鲁卡因,丁卡因,利多卡因,普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。

[0122] 效应分子还包括,但不限于,抗代谢药物(如甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟脲嘧啶氮烯咪胺)、烷化剂(如氮芥、噻替哌、苯丁酸氮芥(thioepa chlorambucil)、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU),环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C、和顺-二氯二氨基铂(II)(DDP)顺铂),葱环类药物(如柔红霉素(原名道诺霉素)和多柔比星),抗生素(如更生霉素(原名放线菌素)、博来霉素、光辉霉素(普卡霉素)(mithramycin)、氨基霉素(AMC),刺孢霉素类(calicheamicins)或多卡米星类(duocarmycins),和抗有丝分裂剂(如长春新碱和长春碱)。

[0123] 其他效应分子可能包括螯合放射性核素如 ^{111}In 和 ^{90}Y , Lu^{177} ,铋 ^{213} ,铟 ^{252} ,铈 ^{192} 和钨 ^{188} /铼 ^{188} ;或药物,例如但不限于烷基磷酸胆碱,拓扑异构酶I抑制剂,紫杉烷类和苏拉明。

[0124] 其他效应分子包括蛋白质、肽类和酶。关注的酶包括,但不限于,蛋白水解酶,水解酶,裂解酶、异构酶、转移酶。关注的蛋白质,多肽和肽包括但不限于免疫球蛋白,毒素如相思豆毒素蛋白,蓖麻蛋白A,假单胞菌外毒素或白喉毒素,蛋白质如胰岛素,肿瘤坏死因子, α -干扰素, β -干扰素,神经生长因子,血小板衍生生长因子或组织纤溶酶原活化物,血栓形成剂或抗血管生成剂,例如血管生成抑制素(angiostatin)或内皮抑素(endostatin),或生物响应调节剂如淋巴因子,白细胞介素-1(IL-1),白细胞介素-2(IL-2),粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF),粒细胞集落刺激因子(G-CSF),神经生长因子(NGF)或其他生长因子和免疫球蛋白。

[0125] 其他效应分子可以包括可用于例如诊断的可检测物质。可检测物质的实例包括各种酶,辅基,荧光物质,发光物质,生物发光物质,放射性核素,正电子发射金属(用于正电子发射断层摄影术)和非放射性顺磁性金属离子。关于可以与抗体结合以用作诊断剂的金属离子,通常参见美国专利第4,741,900号。合适的酶包括辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基包括链霉抗生物素蛋白(streptavidin),抗生物素

蛋白 (avidin) 和生物素;合适的荧光物质包括伞形酮,荧光素,异硫氰酸荧光素,罗丹明 (rhodamine),二氯三嗪基胺荧光素,丹磺酰氯 (dansyl chloride) 和藻红蛋白;合适的发光物质包括鲁米诺;合适的生物发光物质包括萤光素酶,萤光素和水母发光蛋白;和合适的放射性核素包括¹²⁵I,¹³¹I,¹¹¹In和⁹⁹Tc。

[0126] 在另一个例子中,效应分子可以增加抗体在体内的半衰期,和/或降低抗体的免疫原性和/或增强抗体穿过上皮屏障到达免疫系统的递送。这种类型的合适的效应分子的例子包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物,如W005/117984中所描述的。

[0127] 在一个实施方案中,由独立于CSF-1R的效应分子提供的半衰期是有利的。

[0128] 当效应分子是聚合物时,其通常可以是合成的或天然存在的聚合物,例如任选经取代的直链或支链聚亚烷基、聚亚烯基或聚氧化亚烷基聚合物或支链或无支链多糖,例如同多糖或异多糖。

[0129] 可以存在于上述合成聚合物上的特定的任选取代基包括一个或多个羟基,甲基或甲氧基。

[0130] 合成聚合物的具体实例包括任选经取代的直链或支链聚(乙二醇),聚(丙二醇)聚(乙烯醇)或其衍生物,特别是任选经取代的聚(乙二醇)如甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物。

[0131] 特定的天然存在的聚合物包括乳糖,直链淀粉,葡聚糖,糖原或其衍生物。

[0132] 在一个实施方案中,聚合物是白蛋白或其片段,如人血清白蛋白或其片段。

[0133] 用于本发明的“衍生物”旨在包括反应性衍生物,例如硫醇选择性反应性基团如马来酰亚胺类等。反应性基团可以直接连接或通过接头段连接到聚合物上。可以理解,这种基团的残基在某些情况下将形成产物的部分,作为抗体片段与聚合物之间连接基团。

[0134] 聚合物的大小可以根据需要变化,但是通常在500Da至50000Da,例如5000至40000Da,例如20000至40000Da的平均分子量范围内。聚合物大小可以特别根据产品的预期用途来选择,例如定位于某些组织如脑,肿瘤或延长循环半衰期的能力(综述参见Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545)。因此,例如,当期望产品离开循环并穿透组织,例如用于治疗脑或肿瘤时,使用小分子量聚合物可能是有利的,例如分子量约5000Da。对于产品保持在循环中的应用,使用更高分子量的聚合物(例如具有20000Da至40000Da的分子量)可能是有利的。

[0135] 合适的聚合物包括聚亚烷基聚合物,例如聚(乙二醇)或者尤其是甲氧基聚(乙二醇)或其衍生物,并且尤其具有约15000Da至约40000Da范围内的分子量。

[0136] 在一个实例中,用于本发明的抗体连接到聚(乙二醇) (PEG) 部分。在一个具体实例中,抗体是抗体片段,并且PEG分子可以通过位于抗体片段中的任何可用的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团而被连接,所述氨基酸侧链或末端氨基酸官能团例如任何游离氨基,亚氨基,巯基,羟基或羧基。这样的氨基酸可以在抗体片段中天然存在或可以使用重组DNA方法(参见例如US 5,219,996;US 5,667,425;W098/25971,W02008/038024)工程化到片段中。在一个实例中,本发明的抗体分子是修饰的Fab片段,其中所述修饰是向其重链的C端末端添加一个或多个氨基酸以允许效应分子的连接。合适地,另外的氨基酸形成修饰的铰链区,该修饰的铰链区含有效应分子可以连接的一个或多个半胱氨酸残基。可以使用多个位点来连接两个或多个PEG分子。

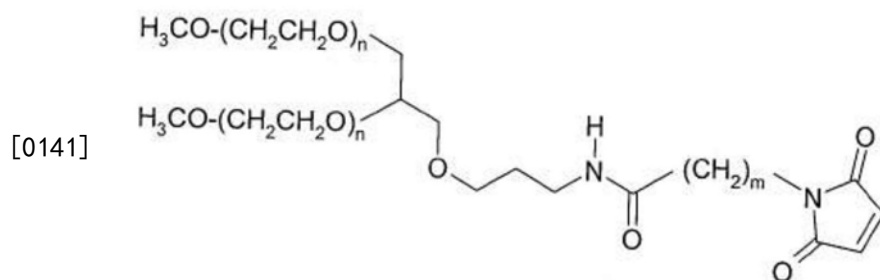
[0137] 合适地,PEG分子通过位于抗体片段中的至少一个半胱氨酸残基的巯基共价连接。

连接至修饰的抗体片段的每个聚合物分子可以共价连接至位于片段中的半胱氨酸残基的硫原子。共价连接一般是二硫键,或者特别是硫-碳键。当巯基用作连接点时,可以使用适当活化的效应分子,例如硫醇选择性衍生物如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。如上所述,可以使用活化的聚合物作为制备聚合物修饰的抗体片段的起始材料。活化的聚合物可以是任何含硫醇反应性基团的聚合物,如 α -卤代羧酸或酯,例如碘乙酰胺,酰亚胺,例如马来酰亚胺,乙烯基砜或二硫化物。这样的起始材料可以商业获得(例如从Nektar,以前的Shearwater Polymers Inc.,Huntsville,AL,USA)或者可以使用常规的化学方法由市售原料制备。具体的PEG分子包括20K甲氧基-PEG-胺(可从Nektar,以前的Shearwater;Rapp Polymere;和SunBio获得)和M-PEG-SPA(可从Nektar,以前的Shearwater获得)。

[0138] 在一个实施方案中,抗体是聚乙二醇化的修饰的Fab片段,Fab'片段或diFab,即具有与其共价连接的PEG(聚(乙二醇)),所述聚乙二醇化根据EP 0948544或EP1090037中所公开的方法[也参见“Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications”,1992,J.Milton Harris(ed),Plenum Press,New York,“Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications”,1997,J.Milton Harris and S.Zalipsky(eds),American Chemical Society,Washington DC and“Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences”,1998,M.Aslam and A.Dent,Grove Publishers,New York;Chapman,A.2002,Advanced Drug Delivery Reviews 2002,54:531-545]。在一个实例中,PEG连接至铰链区中的半胱氨酸。在一个实例中,PEG修饰的Fab片段具有与修饰的铰链区中的单个巯基共价连接的马来酰亚胺基团。赖氨酸残基可以与马来酰亚胺基团共价连接,并且赖氨酸残基上的每个胺基团可以连接分子量约20,000Da的甲氧基聚(乙二醇)聚合物。因此连接到Fab片段的PEG的总分子量可以是约40,000Da。

[0139] 具体的PEG分子包括N,N'-双(甲氧基聚(乙二醇)MW20,000)修饰的赖氨酸的2-[3-(N-马来酰亚胺基)丙酰胺基]乙基酰胺,也称为PEG2MAL40K(可从Nektar,以前的Shearwater获得)。

[0140] PEG接头的替代来源包括提供GL2-400MA3(其中下文结构中的m为5)和GL2-400MA(其中m为2)且n约为450的NOF:



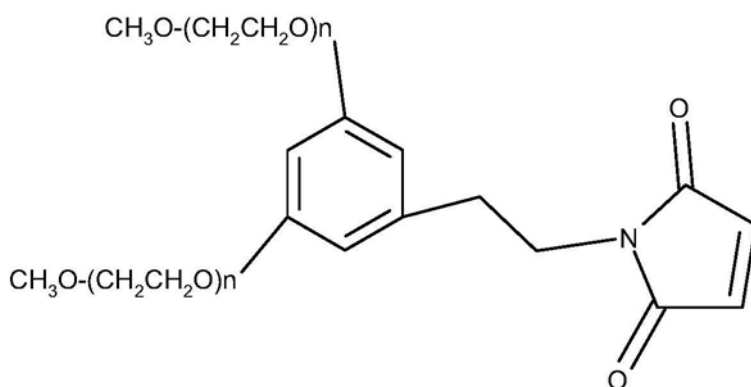
[0142] m是2或5

[0143] 也就是说每个PEG约为20,000Da。

[0144] 因此,在一个实施方案中,PEG是2,3-双(甲基聚氧乙烯-氧基)-1-{[3-(6-马来酰亚胺基-1-氧代己基)氨基]丙氧基}己烷(2分支的PEG, $-(CH_2)_3NHCO(CH_2)_5-MAL$, Mw40,000,称为SUNBRIGHT GL2-400MA3。

[0145] 下列类型的其他可选的PEG效应分子:

[0146]



[0147] 在一个实施方案中,提供了抗体(例如全长抗体),其被聚乙二醇化(例如用本文描述的PEG),通过在链中的氨基酸226(例如重链氨基酸226)(按顺序编号)处或附近的半胱氨酸氨基酸残基进行连接。

[0148] 在一个实施方案中,本公开提供了包含一种或多种PEG聚合物(例如1或2种聚合物,例如40kDa的一种聚合物或多种聚合物)的Fab'PEG分子。根据本公开的Fab-PEG分子可以是特别有利的,因为它们具有独立于Fc片段的半衰期。在一个实施方案中,提供了与聚合物(例如PEG分子,淀粉分子或白蛋白分子)缀合的scFv。在一个实施方案中,抗体或片段与淀粉分子缀合,例如以增加半衰期。将淀粉与蛋白质缀合的方法如在US 8,017,739中所述,将其通过引用并入本文。

[0149] 为了鉴定CSF-1R活性的抑制剂,本领域技术人员可以采取多种不同的方法。在一个实例中,通过以下鉴定抑制剂:首先鉴定与CSF-1, IL-34或CSF-1R相互作用的试剂,随后测试那些试剂以鉴定抑制CSF-1R活性的试剂。在一个这样的例子中,该试剂是抗体。

[0150] 可以使用任何合适的方法鉴定与CSF-1, IL-34或CSF1-R相互作用的试剂或抑制剂,例如通过使用无细胞或基于细胞的测定系统,其中CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽与候选试剂接触,并确定候选试剂与多肽相互作用的能力。优选地,将候选试剂与CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽相互作用的能力与参考范围或对照进行比较。如果需要,该测定可用于使用多个CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽样品、筛选多个候选试剂(例如文库)。在无细胞测定的一个例子中,将包含天然或重组CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽的第一和第二样品与候选试剂或对照试剂接触,并且通过比较候选试剂和对照试剂之间的相互作用的差异来确定候选试剂与多肽相互作用的能力。优选地,首先通过以下固定多肽:例如通过使多肽与特异性识别和结合多肽的固定化抗体接触,或通过使多肽的纯化制品与设计用于结合蛋白质的表面接触。多肽可以是部分或完全纯化的(例如部分或完全不含其他多肽)或部分细胞裂解物。此外,多肽可以是包含CSF-1, IL-34或CSF1-R多肽或其生物活性部分和结构域如谷胱甘肽-S-转移酶或IgG1的Fc区的融合蛋白。或者,可以使用本领域技术人员熟知的技术(例如生物素化试剂盒,Pierce Chemicals;Rockford, IL)将多肽生物素化。候选试剂与多肽相互作用的能力可通过本领域技术人员已知的方法例如ELIS A, BIAcore™, 流式细胞术或荧光微容量测定技术(FMAT)来确定。在使用基于细胞的测定的另一个实例中,使表达CSF-1, IL-34或CSF-1R的细胞群体与候选试剂接触,并确定候选试剂与多肽相互作用的能力。优选地,将候选试剂与CSF-1, IL-34或CSF-1R相互作用的能力与参考范围或对照进行比较。细胞例如可以是真核生物来源的(例如酵母或哺乳动物),并且可以内源地表达CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽,或者可以被基因工程化以表达多肽。在一些情况下,例如用放射性标记(例如P, S或I)或荧光

标记(例如异硫氰酸荧光素,罗丹明(rhodamine),藻红蛋白,藻蓝蛋白,别藻蓝蛋白,邻苯二甲醛或荧光胺)标记CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或候选试剂,以能够检测多肽与候选试剂之间的相互作用。也可以使用其他方法如ELISA,流式细胞术和FMAT。可以通过任何合适的方法鉴定抑制CSF-1R活性的试剂,例如通过以下步骤:(i)比较存在候选试剂时CSF-1R的活性与不存在候选试剂时所述多肽的活性或在对照试剂存在时所述多肽的活性;和(ii)确定候选试剂是否抑制CSF-1R的活性。这样的测定可以用于在临床监测或药物开发中筛选候选试剂。如上所述,在筛选结合抑制CSF-1R活性的能力的试剂之前,在适当时可以预先筛选试剂(例如抗体)以鉴定与CSF-1, IL-34或CSF-1R相互作用的试剂。在一个实例中,使用基于细胞的测定系统来鉴定能够抑制CSF-1R活性的试剂。在一个具体实例中,用于鉴定CSF-1活性或CSF-1R活性的抑制剂的测定是Metcalf, 1970, J. Cell. Physiol. 76-89的标准体外集落刺激测定,其中CSF-1能够刺激巨噬细胞集落的形成。将潜在的抑制剂加入测定中,并通过任何合适的方法如³H胸苷掺入或甲臍染料转化来测量巨噬细胞的增殖。因此,与对照相比,抑制被测量为增殖的减少。

[0151] 在另一个实例中,CSF-1R的抑制剂可以下调CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽的表达,例如反义抑制剂。这种抑制剂可以通过本领域已知的任何方法来鉴定。在一个实例中,这样的抑制剂在基于细胞的测定系统中被鉴定。因此,使表达CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或核酸的细胞群体与候选试剂接触,并且候选试剂改变CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或核酸的表达的能力通过与参照范围或对照进行比较来确定。在一个实例中,使表达CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽的细胞群体与候选试剂或对照试剂接触,并且候选试剂改变CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或核酸的能力通过比较经处理的细胞群和对照细胞群之间的CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或核酸的表达水平的差异来确定。如果需要,该测定可以用于筛选多个候选试剂(例如文库)。例如,细胞可以是真核起源的(例如酵母或哺乳动物),并且可以内源地表达CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或者可以被基因工程化以表达CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽。候选试剂改变所述多肽或核酸的表达的能力可通过本领域技术人员已知的方法确定,例如但不限于通过流式细胞术,放射性标记,闪烁测定,免疫沉淀,Western印迹分析,Northern印迹分析或RT-PCR。

[0152] 可以鉴定或进一步测试抑制CSF-1R活性的试剂,例如以确定一种或多种动物模型中的治疗有效量。合适的动物的实例包括但不限于小鼠,大鼠,兔,猴,豚鼠,狗和猫。在其中试剂抑制CSF-1, IL-34或CSF-1R表达的一个实例中,对第一和第二组哺乳动物施用候选试剂或对照试剂,且候选试剂抑制CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或核酸表达的能力通过比较第一组和第二组哺乳动物之间表达水平的差异来确定。如果需要,可以将第一和第二组哺乳动物中的CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或核酸的表达水平与对照组哺乳动物中的CSF-1, IL-34或CSF-1R多肽或核酸的水平相比较。候选试剂或对照试剂可以通过本领域已知的方式(例如口服,直肠或肠胃外例如腹膜内或静脉内或全身性)施用。多肽或核酸的表达变化可以通过上面概述的方法来评估。

[0153] 阿尔茨海默氏病或帕金森氏病的啮齿动物模型的实例已经被例如Wirths等人, 2010所证实。已经证实了阿尔茨海默氏病APP/PS1KI转基因小鼠模型中小胶质细胞的活化和Iba1表达的增加。类似地,在Depboylu等人, 2012已经显示在MPTP诱导的帕金森氏病模型中与Iba1表达相关的强烈的小胶质细胞活化。重要的是,在诱发 α -突触核蛋白过度表达的

帕金森氏病的啮齿动物和非人灵长类动物模型中均观察到稳健的小胶质细胞活化表型和增加的Iba1信号(Barkholt等,2012,Luk等,2012)。

[0154] 在另一个实例中,CSF-1R活性的抑制可以通过监测疾病症状的缓解或改善、和/或疾病的延迟发作或减缓进展来确定。例如但不限于,对于神经系统疾病、例如尤其是、癫痫、阿尔茨海默氏病或帕金森氏病,这可能表现为脑或组织培养物中小胶质细胞活化标记或小胶质细胞的减少。在神经系统疾病患者中CSF-1R活性的抑制也可以通过监测临床事件来确定,如在不存在其他原因的情况下,减少的恶化(定义为疾病活性的快速恶化)。因此,在一个使用CSF-1R抑制剂的实施方案中,可以提供以下中的一种或多种的减少:阿尔茨海默氏病,肌萎缩侧索硬化(ALS),Angelman综合征,注意力缺陷多动障碍,自闭症谱,双相情感障碍,脑损害,脑损伤,脑肿瘤,中枢性疼痛综合征,脑萎缩,慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP),慢性疼痛,复合性区域疼痛综合征,克雅氏病,老年痴呆症,唐氏综合征,Dravet综合征,脑炎,特发性震颤,弗里德赖希共济失调(Friedreich's ataxia),脆性X综合征(Fragile X syndrome),脆性X-相关震颤/共济失调综合征(FXTAS),头部损伤,头痛,带状疱疹,亨廷顿氏病,缺氧,免疫介导性脑脊髓炎,婴儿痉挛症,颅内高压,拉福拉病,Landau-Kleffner综合征,Lennox-Gastaut综合征,脑白质营养不良,具有消损白质的脑白质病,Lewy体痴呆,无脑回畸形,莱姆病-神经系统后遗症,巨脑,脑脊膜炎(Meningitis),小头畸形,偏头痛,小中风(Mini-stroke)(短暂性脑缺血发作),运动神经元病-见肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis),多发性梗死性痴呆,多发性硬化,婴儿肌阵挛性脑病,肌阵挛,艾滋病的神经系统表现(Neurological manifestations of AIDS),狼疮的神经系统后遗症,神经元蜡样质脂褐质沉积病,神经病,尼曼-匹克病,大田原综合征,帕金森氏病,副肿瘤性疾病,原发性侧索硬化,朊病毒病,进行性多灶性脑白质病,进行性核上性麻痹,拉斯穆森脑炎,不宁腿综合征,Rett综合征,僵人综合征,中风,短暂性脑缺血发作,外伤性脑损伤,震颤,结节性硬化症,翁-伦病(Unverricht-Lundborg disease),钩突癫痫(Uncinate epilepsy),West综合征,威尔逊氏病(Wilson's disease)。

[0155] 在本发明的优选实例中,抑制剂可用于治疗和/或预防癫痫,癫痫发生,癫痫发作和惊厥。在本发明进一步优选的实施方案中,所述抑制剂可用于治疗和/或预防特定类型的癫痫,所述特定类型的癫痫选自全身性癫痫发作,局灶性癫痫发作和未知来源的癫痫发作。在本发明更优选的实施方案中,抑制剂可用于治疗和/或预防颞叶癫痫(TLE)。

[0156] 熟悉神经系统疾病的医师已知的技术可以用于确定候选试剂是否已经改变了与该疾病相关的一种或多种症状。本领域已知许多不同的神经系统疾病模型。例如,与小胶质细胞活化相关的神经炎症模型基于全身性注射脂多糖(LPS)细菌内毒素,据报道其诱导小胶质细胞活化以模拟在神经系统疾病中观察到的小胶质细胞表型。该模型可用于啮齿动物物种,但最近的研究表明,LPS模型可用于非人灵长类动物,其中它也与小胶质细胞活化的强烈活化有关(Hannestad等,2012)。

[0157] 用于神经系统疾病或小胶质细胞活化状态的成像技术可以是利用与易位蛋白(TSP0)结合的放射性示踪物的正电子发射断层扫描(PET),其在活化的小胶质细胞中显示强的诱导(Hannestad等人,2012)。TSP0被认为是小胶质细胞活化的翻译标记,因为其在几种神经系统疾病如癫痫,阿尔茨海默氏病帕金森氏病中已有报道(Amhaoul等人,2014;Hommet等人,2014;Edison等人,2013)。本发明的一个实施方案提供了用于治疗 and/或预防

神经系统疾病的抑制剂,其为核酸。

[0158] 在另一个实施方案中,本发明提供了抑制剂,其是编码抑制CSF-1R活性的抗体的重链和/或轻链的分离的DNA序列。在一个优选的实施方案中,编码抗体或其片段或衍生物的重链和/或轻链的分离的DNA序列包含重链和轻链,其中重链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有SEQ ID NO:4中给出的序列的CDR-H1,具有SEQ ID NO:5中给出的序列的CDR-H2和具有SEQ ID NO:6中给出的序列的CDR-H3,以及其中所述轻链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有SEQ ID NO:1中给出的序列的CDR-L1,具有SEQ ID NO:2中给出的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:3中给出的序列的CDR-L3。

[0159] 在另一个实例中,当抑制剂是核酸时,其可以通过基因治疗施用(参见例如Hoshida, T. 等人, 2002, *Pancreas*, 25:111-121; Ikuno, Y. 2002, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002 43:2406-2411; Bollard, C, 2002, *Blood* 99:3179-3187; Lee E., 2001, *Mol. Med.* 7:773-782)。基因治疗是指向受试者施用经表达的或可表达的核酸,在一个实例中,其是CSF-1, IL-34或CSF-1R核酸或其部分。根据本发明,可以使用本领域可用的任何基因治疗方法。将治疗性核酸递送至患者可以是直接体内基因疗法(即患者直接暴露于核酸或含核酸的载体)或间接体外基因疗法(即,细胞首先用核酸在体外转化,然后移植入患者)。

[0160] 例如,对于体内基因治疗,含有CSF-1, IL-34或CSF-1R核酸的表达载体可以以其变成细胞内的方式施用,即通过使用缺陷或减毒的逆转录病毒或其他病毒载体的感染,例如在US 4,980,286或Robbins等人, 1998, *Pharmacol. Ther.* 80:35-47中所述。本领域已知的各种逆转录病毒载体如Miller等人(1993, *Meth. Enzymol.* 217:581-599)中所述,它们已被修饰以删除病毒基因组包装所不需要的逆转录病毒序列,随后整合到宿主细胞DNA中。也可以使用由于其感染非分裂细胞的能力而有利的腺病毒载体,并且在Kochanek (1999, *Human Gene Therapy*, 10:2451-2459)中描述了这种高容量的腺病毒载体。可以使用的嵌合病毒载体是由Reynolds等(1999, *Molecular Medicine Today*, 1:25-31)所述的那些。杂交载体也可以使用,并由Jacoby等人描述(1997, *Gene Therapy*, 4:1282-1283)。裸DNA的直接注射或通过使用微粒轰击(例如Gene Gun (R); Biolistic, Dupont)或通过用脂质将其包被也可用于基因治疗。细胞表面受体/转染化合物或通过封装在脂质体、微粒或微胶囊中或通过施用与已知进入细胞核的肽连接的核酸或通过施用与易受受体介导的胞吞作用影响的配体连接的核酸(参见Wu和Wu, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432)可用于靶向特异性表达感兴趣受体的细胞类型。在体外基因治疗中,使用组织培养将基因体外转移到细胞中,并通过各种方法将细胞递送给患者,例如皮下注射,将细胞施用到皮肤移植物中,并静脉内注射重组血细胞例如造血干细胞或祖细胞。为了基因治疗的目的可以导入CSF-1, IL-34或CSF-1R核酸的细胞包括例如上皮细胞,内皮细胞,角质形成细胞,成纤维细胞,肌细胞,肝细胞和血细胞。可以使用的血细胞包括例如T-淋巴细胞, B-淋巴细胞,单核细胞,巨噬细胞,嗜中性粒细胞,嗜酸性粒细胞,巨核细胞,粒细胞,造血细胞或祖细胞,小胶质细胞等。

[0161] 本发明的一个方面是CSF-1R活性抑制剂在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的应用。本发明的CSF-1R活性抑制剂的这种用途和以下更具体的用途包括但不限于上述抑制剂,并且涉及说明书提供的所有定义。

[0162] 在本发明的一个实施方案中,抑制剂在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的

药物中的用途包括核酸。

[0163] 在本发明的另一个实施方案中,抑制剂用于制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途涉及抗体或其功能活性片段或衍生物。因此,本发明的抗体或其功能活性片段或衍生物的用途包含单克隆或多克隆抗体。此外,本发明中抗体或其功能活性片段或衍生物的用途涉及嵌合抗体,人源化抗体或人抗体。在本发明的一个实施方案中,抗体或其片段或衍生物用于制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物的用途包括双特异性或多特异性抗体。因此,本发明的抗体或其功能活性片段或衍生物的用途涉及选自以下的抗体:具有全长重链和轻链的完整抗体分子或其片段,所述片段选自由以下组成的组:Fab,改性Fab,Fab',改性Fab',F(ab')₂,Fv,单结构域抗体(例如,VH或VL或VHH)、scFv、双价、三价或四价抗体、Bis-scFv、双体、三体,四体和上述任意项的表位结合片段。

[0164] 本发明的另一个实施方案提供了抑制剂在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,所述药物包含缀合于一种或多种效应分子的抑制剂。

[0165] 在本发明的另一个实施方案中,提供了抗体在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,其是结合CSF-1R的抗体。

[0166] 本发明还提供了CSF-1R活性抑制剂的用途,其是抗体,其中抗体或其片段或衍生物以治疗有效量穿过血脑屏障(BBB)到达脑中,所述治疗有效量足够用于治疗 and/或预防患有神经系统疾病的患者。

[0167] 在本发明的另一个实施方案中,抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途包括具有重链和轻链的抗体,其中所述重链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有SEQ ID NO:4中给出的序列的CDR-H1,具有SEQ ID NO:5中给出的序列的CDR-H2和具有SEQ ID NO:6中给出的序列的CDR-H3。

[0168] 此外,本发明提供了抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,其中所述抗体或其片段或衍生物包含重链和轻链,其中所述轻链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有SEQ ID NO:1中给出的序列的CDR-L1,具有SEQ ID NO:2中给出的序列的CDR-L2和具有SEQ ID NO:3中给出的序列的CDR-L3。

[0169] 在本发明的另一个实施方案中,抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途包括具有重链和轻链的抗体,其中重链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有SEQ ID NO:4中给出的CDR-H1序列的CDR,具有SEQ ID NO:5中给出的CDR-H2序列的CDR和具有SEQ ID NO:6中给出的CDR-H3序列的CDR,并且其中轻链的可变结构域包含以下中的至少一个:具有SEQ ID NO:1中给出的CDR-L1序列的CDR,具有SEQ ID NO:2中给出的CDR-L2序列的CDR和具有SEQ ID NO:3中给出的CDR-L3序列的CDR。

[0170] 在本发明的另一个实施方案中,抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途包括具有包含SEQ ID NO:9中给出的序列的重链的抗体。

[0171] 在本发明的另一个实施方案中,抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途包括具有包含SEQ ID NO:7中给出的序列的轻链的抗体。

[0172] 本发明进一步提供了抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,其具有包含SEQ ID NO:9中给出的序列的重链和包含SEQ ID NO:7中给出的序列的轻链。

[0173] 本发明还提供了抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病

的药物中的用途,其中所述抗体或其片段或衍生物对人CSF-1R具有10pM或小于10pM的结合亲和力 $[K_D]$ 。

[0174] 本发明还提供了抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,其中所述抗体或其片段或衍生物以100pM或更低的亲和力 $[K_D]$ 交叉阻断根据权利要求13的抗体的结合。

[0175] 本发明的另一个实施方案是抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,其中所述抗体或其片段或衍生物通过与其阻断的抗体结合相同的表位来阻断所述结合。

[0176] 本发明的另一个实施方案是抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,其中抗体或其片段或衍生物与抗体或其片段或衍生物竞争结合图2 (SEQ ID NO:15) 的人CSF-1R (c-fms) 的胞外结构域。

[0177] 本发明的一个实施方案提供抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防的神经系统疾病的药物中的用途,其与人CSF-1R的表位结合。

[0178] 本发明的另一个实施方案提供了抗体或其片段或衍生物在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,其是编码适合于本发明的抗体的重链和/或轻链的分离的DNA序列。

[0179] 如本文所述,CSF-1R活性的抑制剂可用于治疗 and/或预防神经系统疾病。对于这种用途,试剂通常将以药物组合物的形式施用。还提供了一种药物组合物,其包含CSF-1R活性抑制剂以及药学上可接受的稀释剂,赋形剂和/或载体。本发明的药物组合物还可以另外包含其它活性成分。

[0180] 术语“治疗”包括治疗性和/或预防性治疗。当在本文中提及使用特定抑制剂或抑制剂组合来治疗 and/或预防神经系统疾病或病症的方法时,应当理解,这样的提及旨在包括所述抑制剂或抑制剂的组合在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途。

[0181] 组合物通常作为通常包含药学上可接受的载体的无菌药物组合物的一部分提供。该组合物可以是任何合适的形式(取决于将其施用至患者的所需方法)。本发明中使用的抑制剂优选口服或直肠内施用至受试者,但也可以通过多种其他途径(例如透皮,皮下,鼻内,静脉内和肌内)进行施用。在任何给定的情况下,最合适的施用途径将取决于特定的抑制剂,受试者,疾病的性质和严重程度以及受试者的身体状况。

[0182] 本发明中使用的抑制剂可以组合施用,例如,同时,依次或分别与一种或多种其他治疗活性化合物(其可以是例如抗神经学疗法)进行施用。

[0183] 药物组合物可以方便地以单元剂型存在,所述剂型每剂含有预定量的本发明活性剂。这样的单元可以包含例如但不限于1000mg/kg至0.01mg/kg,例如750mg/kg至0.1mg/kg,例如100mg/kg至1mg/kg,这取决于所治疗的状况,施用途径和受试者的年龄,体重和状况。

[0184] 用于本发明的药学上可接受的载体可以采取多种形式,这取决于例如,施用途径。

[0185] 口服施用的组合物可以是液体或固体。口服液体制剂可以是例如水性或油性混悬剂、溶液剂、乳剂、糖浆剂或酏剂的形式,或者可以作为干燥产品提供,所述干燥产品用于在使用前用水或其它合适的媒介物重新配制。口服液体制剂可以含有本领域已知的悬浮剂。在口服固体制剂例如粉剂,胶囊剂和片剂的情况下,可以包括载体如淀粉,糖,微晶纤维素,造粒剂 (granulating agent), 润滑剂,粘合剂,崩解剂等。由于其易于施用,片剂和胶囊剂

代表了最有利的口服单位剂型,在这种情况下通常使用固体药物载体。

[0186] 除了上面列出的常用剂型之外,本发明的活性剂也可以通过控释装置和/或输送装置进行施用。片剂和胶囊剂可以包含常规载体或赋形剂,例如粘合剂,例如糖浆,阿拉伯胶,明胶,山梨糖醇,黄蓍胶或聚乙烯吡咯烷酮;填充剂,例如乳糖,糖,玉米淀粉,磷酸钙,山梨糖醇或甘氨酸;压片润滑剂,例如硬脂酸镁,滑石,聚乙二醇或二氧化硅;崩解剂,例如马铃薯淀粉;或可接受的润湿剂如月桂基硫酸钠。根据常规药学实践中众所周知的方法,片剂可以通过标准的水性或非水性技术进行包衣。

[0187] 适用于口服施用的本发明的药物组合物可以以离散的单元形式存在,例如胶囊,扁囊剂或片剂,各自含有预定量的活性剂,作为粉末或颗粒,或者作为在含水液体、非水液体中的水溶液或悬浮液,水包油乳液或油包水液体乳液。这样的组合物可以通过任何制药方法来制备,但是所有方法都包括使活性剂与构成一种或多种必需成分的载体结合的步骤。通常,通过以下来制备组合物:均匀且紧密地混合活性剂与液体载体或细碎的固体载体或两者,然后如果需要,将产品成型为所需的外观。例如,片剂可以通过压制或模制,任选地采用一种或多种辅助成分来制备。

[0188] 适合肠胃外施用的药物组合物可以制备为本发明的活性剂在水中适合地与表面活性剂如羟丙基纤维素混合而成的溶液或悬浮液。也可以在甘油,液体聚乙二醇及其在油中的混合物中制备分散体。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。适于注射使用的药物剂型包括,含有抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和使组合物与预期接受者的血液等渗的溶质的含水和不含水的无菌注射液,以及可以包括悬浮剂和增稠剂的含水和不含水的无菌混悬剂。临时注射溶液,分散液和悬浮液可由无菌粉末,颗粒和片剂制备。药物组合物可以采用本领域已知的医疗装置进行施用。例如,在优选的实施方案中,本发明的药物组合物可以采用无针皮下注射装置进行施用,所述装置例如US 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; 或者4,596,556中所述的装置。用于本发明的公知植入物和模块的实例包括:US 4,487,603,其公开了用于以受控速率分配药物的可植入式微输注泵;US 4,486,194,其公开了用于通过皮肤施用药物的治疗装置;US 4,447,233其公开了一种用于以精确输注速率输送药物的药物输注泵;US 4,447,224,其公开了用于连续药物递送的可变流量可植入输注装置;US 4,439,196,其公开了具有多室隔室的渗透药物递送系统;和US 4,475,196,其公开了渗透药物递送系统。本领域技术人员已知许多其他这样的植入物,输送系统和模块。

[0189] 适于局部施用的药物组合物可以配制成软膏剂,乳膏剂,混悬剂,洗剂,粉剂,溶液剂,糊剂,凝胶剂,浸渍敷料剂,喷雾剂,气雾剂或油剂,透皮装置,扑粉(喷粉剂)(dusting powder)等。这些组合物可以通过含有活性剂的常规方法来制备。因此,它们也可以包含相容的常规载体和添加剂,例如防腐剂,帮助药物渗透的溶剂,乳膏或软膏中的润滑剂以及洗剂的乙醇或油醇。这样的载体可以占组合物的约1%至约98%。更多的时候,它们会组成组合物的约80%。仅作为说明,通过将足量的含有约5-10重量%化合物的亲水性物质和水混合来制备乳膏或软膏,所述足量足够制备具有所需稠度的乳膏或软膏。适于透皮施用的药物组合物可以以离散的贴剂的形式提供,所述贴剂旨在与接受者的表皮长时间保持紧密接触。例如,活性剂可以通过离子电渗从贴剂递送。为了应用于外部组织,例如口腔和皮肤,组合物优选作为局部软膏或乳膏施用。当配制成软膏时,活性剂可以与石蜡或水混溶性软膏

基质一起使用。或者,活性剂可以用水包油乳膏基质或油包水基质配制成乳膏。适用于口中局部施用的药物组合物包括锭剂,软锭剂和漱口水。适用于眼部局部施用的药物组合物包括滴眼剂,其中活性剂溶解或悬浮于合适的载体,特别是含水溶剂中。它们还包括如上所述的局部软膏或乳膏。其中载体为固体的适于直肠施用的药物组合物最优选以单位剂量栓剂形式存在。合适的载体包括可可脂或其他甘油酯或本领域通常使用的物质,栓剂可以通过以下方便地形成:将组合物与软化或熔化的碎料混合,接着通过冷却和成型模具。它们也可以作为灌肠剂而施用。

[0190] CSF-1R活性抑制剂的施用剂量根据以下而变化:具体的抑制剂,神经系统疾病的类型,受试者,疾病的性质和严重程度以及受试者的身体状况和选择的施用途径;本领域技术人员可以容易地确定合适的剂量。为了治疗和/或预防人类和动物中的神经系统疾病,可将包含抗体的药物组合物以治疗或预防有效剂量(例如导致抑制神经系统疾病和/或减轻神经系统疾病症状的剂量)施用至患者(例如人类受试者),使用任何合适的施用途径,例如本领域已知的用于临床产品(例如基于抗体的临床产品)的注射和其它施用途径。组合物可以含有至少0.05重量%,例如0.5至50重量%,例如1至10重量%或更多的本发明抑制剂,这取决于施用方法。本领域技术人员将认识到,本发明抑制剂的个体剂量的最佳量和间隔将由以下来确定:所治疗状况的性质和程度,施用的形式、途径和部位,以及所治疗的特定受试者的年龄和状况,以及医生将最终确定使用的适当剂量。如果合适,该剂量可以经常重复。如果发生副作用,按照正常的临床实践可以改变或减少剂量的量和/或频率。

[0191] 在一个方面,本发明的药物组合物包含CSF-1, IL-34或CSF-1R核酸,所述核酸是表达CSF1, IL-34或CSF-1R多肽的表达载体的一部分或其嵌合蛋白,其在合适的宿主中。特别地,这样的核酸具有可操作地连接至多肽编码区的启动子,所述启动子是可诱导的或组成型的(并且任选地是组织特异性的)。

[0192] 本发明的一个方面提供了用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物组合物。

[0193] 本发明进一步提供了治疗和/或预防患有神经系统疾病或处于发生神经系统疾病风险中的人类受试者的方法,其包括向受试者施用治疗有效量的CSF-1R活性抑制剂。在本发明的一个实施方案中,用于治疗 and/或预防患有神经系统疾病或处于发生神经系统疾病风险中的人类受试者的方法涉及向受试者施用治疗有效量的根据本发明的抑制剂或根据本发明的药物组合物。

[0194] 本发明进一步提供用于治疗 and/或预防患有神经系统疾病或处于发生神经系统疾病风险中的人受试者的方法,其中CSF-1R活性抑制剂与一种或多种其它治疗活性化合物组合施用。本发明的另一个方面提供了其中另一种治疗活性化合物是另一种抗癫痫治疗剂的方法。

[0195] 本发明提供用于治疗 and/或预防神经系统疾病的CSF-1R活性抑制剂,CSF-1R活性抑制剂在制备用于治疗 and/或预防神经系统疾病的药物中的用途,包含用于治疗 and/或预防神经系统疾病的CSF-1R活性抑制剂的药物组合物,或用于治疗 and/或预防患有神经系统疾病或处于发生神经系统疾病风险中的人类受试者的方法,其中神经系统疾病选自自由以下组成的组:阿尔茨海默氏病,肌萎缩侧索硬化(ALS),Angelman综合征,注意力缺陷多动障碍,自闭症谱,双相情感障碍,脑损害,脑损伤,脑肿瘤,中枢性疼痛综合征,脑萎缩,慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(CIDP),慢性疼痛,复合性区域疼痛综合征,克雅氏病,老年痴呆症,

唐氏综合征, Dravet综合征, 脑炎, 特发性震颤, 弗里德赖希共济失调 (Friedreich's ataxia), 脆性X综合征 (Fragile X syndrome), 脆性X-相关震颤/共济失调综合征 (FXTAS), 头部损伤, 头痛, 带状疱疹, 亨廷顿氏病, 缺氧, 免疫介导性脑脊髓炎, 婴儿痉挛症, 颅内高压, 拉福拉病, Landau-Kleffner综合征, Lennox-Gastaut综合征, 脑白质营养不良, 具有消损白质的脑白质病, Lewy体痴呆, 无脑回畸形, 莱姆病-神经系统后遗症, 巨脑, 脑脊膜炎 (Meningitis), 小头畸形, 偏头痛, 小中风 (Mini-stroke) (短暂性脑缺血发作), 运动神经元病-见肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis), 多发性梗死性痴呆, 多发性硬化, 婴儿肌阵挛性脑病, 肌阵挛, 艾滋病的神经系统表现 (Neurological manifestations of AIDS), 狼疮的神经系统后遗症, 神经元蜡样质脂褐质沉积病, 神经病, 尼曼-匹克病, 大田原综合征, 帕金森氏病, 副肿瘤性疾病, 原发性侧索硬化, 朊病毒病, 进行性多灶性脑白质病, 进行性核上性麻痹, 拉斯穆森脑炎, 不宁腿综合征, Rett综合征, 僵人综合征, 中风, 短暂性脑缺血发作, 外伤性脑损伤, 震颤, 结节性硬化症, 翁-伦病 (Unverricht-Lundborg disease), 钩突癫痫 (Uncinate epilepsy), West综合征, 威尔逊氏病 (Wilson's disease)。

[0196] 在本发明的实施方案中, 神经系统疾病优选选自包含以下的组: Angelman综合征, 注意力缺陷多动障碍, 自闭症谱系, 脑损伤, 脑肿瘤, 克雅氏病, 唐氏综合征, Dravet综合征, 脑炎, 脆性X综合征, 脆性X关联震颤/共济失调综合征 (FXTAS), 头部损伤, 带状疱疹, 缺氧, 免疫介导性脑脊髓炎, 婴儿痉挛症, 拉福拉病, Landau-Kleffner综合征, Lennox-Gastaut综合征, 脑白质营养不良, 具有消损白质的脑白质病, 无脑回畸形, 莱姆病-神经系统后遗症, 脑脊膜炎, 多发性硬化, 婴儿肌阵挛性脑病, 肌阵挛, 狼疮的神经系统后遗症, 大田原综合征, 朊病毒疾病, 拉斯穆森脑炎, Rett综合征, 外伤性脑损伤, 结节性硬化症, Unverricht-Lundborg病, 钩突癫痫或West综合征。

[0197] 在本发明的另一个实施方案中, 神经系统疾病选自包含以下的组: 癫痫, 癫痫发生, 癫痫发作和惊厥。在本发明的另一个实施方案中, 癫痫类型选自全身性癫痫发作, 局灶性癫痫发作和未知来源的癫痫发作。在本发明的另一个实施方案中, 神经系统疾病是颞叶癫痫 (TLE)。

[0198] 作为最优选的实施方案, 抗CSF-1R抗体是如W015/028455中公开的, 其通过引用并入本文。

[0199] 现在将参考以下实施例来描述本发明, 这些实施例仅仅是说明性的而不应以任何方式被解释为限制本发明的范围。

[0200] 附图

[0201] 图1显示了某些氨基酸和多核苷酸序列 (SEQ ID No:1至SEQ ID NO:14)。

[0202] 图2显示了由适于在细胞表面上表达的多核苷酸编码的人CSF-1R细胞外结构域的序列 (SEQ ID NO:15)

[0203] 图3显示流式细胞术数据, 其证实通过该方法可检测到M-NFS-60细胞上受体结合的CSF-1

[0204] 图4显示了固定在组织培养孔表面上或游离在溶液中的Ab535在不存在CSF-1时以所用浓度不支持M-NFS-60细胞的增殖

[0205] 图5显示用抗CSF-1R抗体治疗 (s.c.) 后小鼠中的CSF-1R转录靶标参与。CSF-1R的四个转录靶基因 (例如Aif1 (图板A,B), Ctse (图板C,D), Emr1 (图板E,F) 和Irf8 (图板G,H))

的表达通过qPCR在癫痫小鼠(左图)和首次用于实验的动物(右图)的海马中在s.c.注射抗CSF-1R抗体或对照IgG作为阴性对照之后来测量。

[0206] 图6显示了用抗CSF-1R抗体处理(s.c.)后在小鼠脑切片(海马齿状回)上进行的免疫组织化学实验的结果。活化的小胶质细胞的标记物Iba1蛋白质被标记为红色,而细胞核被DAPI染成蓝色(图板A-C)。在图板D中量化每平方毫米表达Iba1的小胶质细胞的密度。

[0207] 图7显示了抗CSF1R抗体对毛果芸香碱小鼠模型中癫痫发作频率的保护作用。

[0208] 实施例1分离抗小鼠CSF-1R抗体

[0209] 2只兔子接受采用瞬时表达小鼠CSF-1R的残基1-512(Uniprot Entry p09581)的细胞的5次免疫。在使用包被有2 μ g/ml小鼠CSF-1R-兔Fc的Nunc Maxisorp板的ELISA中监测抗体应答。用两只兔观察到滴定至1:100,000稀释度的血清。血清与M-NFS-60细胞的结合(Metcalf等,1970)也由FACS确定。针对抗体稀释绘制中位值FL1。观察到至1:10,000稀释的结合。

[0210] 使用依赖于CSF-1的M-NFS-60细胞系(Metcalf等,1970),显示来自两个兔的血清可以阻断CSF-1依赖性细胞存活至1:100的稀释度(数据未示出)。

[0211] 将100个96孔板每孔接种1000-5000个兔PBMC,并在EL4-B5小鼠胸腺瘤细胞和兔T细胞条件化培养基(TSN)存在下于37 $^{\circ}$ C生长1周。然后使用M-NFS-60细胞和抗兔Fc特异性Cy5缀合物在FMAT测定中筛选含有抗体的上清液。鉴定了678个CSF-1R结合物(binder)。从这些中,约3%在细胞测定中阻断了CSF-1依赖性M-NFS-60增殖。还使用包被有2 μ g/ml CSF-1R-兔Fc的平板在ELISA中筛选结合物,并用抗兔F(ab')₂-HRP缀合物揭示结合。还在基于ELISA的固相阻断测定中筛选结合物。对于该测定,用0.5 μ g/ml CSF-1R-兔Fc包被Nunc Maxisorp 384孔板,随后将其在PBS/0.1%吐温-20/1%PEG20000中封闭。洗涤平板,然后将培养上清液加入板中,室温孵育1小时以上。然后将CSF-1以10ng/ml的终浓度加入到上清液中,并在室温再孵育1小时。洗涤平板,然后与0.5 μ g/ml生物素化的山羊抗小鼠CSF-1抗体(R&D systems)一起孵育。使用链霉抗生物素蛋白(streptavidin)-HRP显示CSF-1与受体的结合。选择了八个孔来进行。所有都显示在M-NFS-60测定和ELISA中与细胞和蛋白质结合并被阻断。

[0212] 使用基于荧光的方法来鉴定来自阳性孔的抗原特异性B细胞。将来自阳性孔的免疫球蛋白分泌性B细胞与包被有生物素化小鼠CSF-1R-兔Fc和山羊F(ab')₂抗-兔F(ab')₂片段特异性FITC缀合物(Jackson ImmunoResearch)的链霉抗生物素蛋白珠混合。在37 $^{\circ}$ C培养1小时后,从B细胞附近的珠上捕获抗原特异性B细胞分泌的抗体。FITC缀合物的存在导致抗体包被的珠子的标记和抗原特异性B细胞周围的荧光灶的形成。然后用显微操作器挑取使用荧光显微镜鉴定的这些单个B细胞,并将其置于PCR管中。通过逆转录(RT)-PCR从单个细胞回收抗体可变区基因。然后在CHO瞬时表达系统中将兔V区表达为人IgG4嵌合抗体或Fab。8个孔中有4个产生重组抗CSF-1R抗体。然后在M-NFS-60测定中证实重组抗体的中和活性。还使用Fab分子进行BIAcore以确定对CSF-1R兔Fc的亲和力(表1)。基于中和活性和亲和力,选择Ab535作为抗小鼠CSF-1R试剂。随后将该抗体鼠源化(murinised),在哺乳动物系统中表达为全长鼠IgG1并纯化。

[0213] BIAcore方法

[0214] 通过测量与纯化的重组CSF-1R/Fc融合蛋白的结合动力学,测试抗体在BIAcore测

定中结合CSF-1R的能力。

[0215] 测定形式是通过固定的抗人IgG,F(ab')₂捕获抗CSF-1R抗体,然后在捕获的表面上滴定hCSF-1R/Fc。使用BIAcore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) 进行BIA (Bimolecular Interaction Analysis)。所有实验在25℃进行,Affinipure F(ab')₂片段山羊抗人IgG,F(ab')₂片段特异性 (Jackson ImmunoResearch) 通过胺偶联化学固定在CM5传感器芯片 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) 上、至约6000个响应单位 (RU) 的水平。使用HBS-EP缓冲液 (10mM HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 表面活性剂P20, GE Healthcare Bio-Sciences AB) 作为运行缓冲液,流速为10μl/min。进行抗CSF-1R抗体的注射以在固定的抗人类IgG,F(ab')₂上获得大约100RU的捕获水平。

[0216] 对重组人CSF-1R/Fc (R&D Systems) 进行滴定,通过加倍稀释,从2.5nM至78pM在捕获的抗CSF-1R抗体上以30μl/min的流速3分钟,随后是8min解离阶段。这些传感图 (sensorgram) 被用来产生结合率。通过两次连续的10μl注射40mM HCl然后注射5μl的10mM NaOH以10μl/min的流速再生表面。按照标准程序,使用BIAevaluation软件 (版本4.1) 分析双重参考背景扣除的结合曲线。动力学参数由拟合算法确定。

[0217] Ab553的结果显示在表1中。

[0218] 表1

[0219]	抗体	启动速率 (On Rate)	关闭速率 (Off Rate)	亲和力常数
	REF:	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	K _D
	Ab 535	8.05 ± 0.01 e 6	1.21 ± 0.15 e -5	1.50 pM

[0220] 实施例2Ab535的体外分析

[0221] Ab535阻断鼠CSF-1与CSF-1受体阳性细胞系的体外结合

[0222] 研究了受体结合的Ab535阻止CSF-1与CSF-1R结合的能力。在测定中使用鼠CSF-1R阳性细胞系M-NFS-60,其中在暴露于CSF-1之前将细胞与Ab535或对照抗体一起预孵育。然后使用荧光标记的抗体和流式细胞术检测受体结合的CSF-1。细胞荧光强度的Ab535-依赖性降低被解释为表明受体结合的Ab535阻止CSF-1与CSF-1R结合的能力。

[0223] 将M-NFS-60细胞 (LGC Promochem, Teddington, UK) 维持在补充有以下的基础RPMI培养基 (Invitrogen) 中的悬浮液中: 10% 胎牛血清 (PAA), Hepes (Invitrogen, 10mM 终浓度), 丙酮酸钠 (Invitrogen, 1mM 终浓度), 葡萄糖 (Sigma-Aldrich, 4.5g/l 终浓度), 碳酸氢钠 (Sigma-Aldrich, 终浓度1.5%), β-巯基乙醇 (Sigma-Aldrich, 0.05mM 终浓度), 重组鼠CSF-1 (Preprotech, 3.3ng/ml 终浓度)。

[0224] 在流动缓冲液 (补充有0.2% BSA (Sigma-Aldrich)、0.09% 叠氮钠 (Sigma-Aldrich)) 的 (PBS (Invitrogen)) 中以1x10⁶细胞/ml的浓度制备M-NFS-60细胞。在流动缓冲液中制备Ab535或鼠IgG1同种型 (isotype) 对照抗体的连续稀释液,并将其加入到100μl等份的细胞中以达到200μl体积中的终浓度为20、5、1.25、0.32、0.08μg/ml,并在冰上孵育1小时。此后,将细胞在流动缓冲液中洗涤两次,在冰上用0.5μg/ml重组鼠CSF-1孵育30分钟,并在流动缓冲液中洗涤两次。为了检测受体结合的CSF-1,将细胞与生物素化的抗鼠CSF-1抗体 (R&D Systems, 5μg/ml) 在冰上孵育30分钟,在流动缓冲液中洗涤两次,并通过与Alexafluor 488-缀合的链霉抗生物素蛋白 (Invitrogen, 1:200 稀释) 在冰上孵育15分钟来

标记被结合的抗体,然后是最终洗涤步骤和在500 μ l流动缓冲液中重新悬浮细胞。使用FACSCaliber流式细胞仪(Becton Dickinson)通过流式细胞术评估细胞的荧光,并使用WinMDI软件分析数据。

[0225] 流式细胞术数据分析证实了,通过该方法可检测到M-NFS-60细胞上受体结合的CSF-1(图3a)。在添加CSF-1之前,以任何使用浓度的Ab535孵育细胞,阻止了CSF-1与CSF-1R的结合,如(图3b)所示。使用任何浓度的同种型(isotype)对照抗体孵育细胞对CSF-1结合和检测没有影响(图3c)。

[0226] Ab535与CSF-1R的结合在体外CSF-1依赖性细胞系的增殖和存活中不能代替CSF-1

[0227] 使用M-NFS-60细胞在细胞增殖测定中研究Ab535替代CSF-1在支持CSF-1依赖性细胞的存活和增殖的能力,所述细胞增殖测定包括将细胞暴露于不含Ab535的溶液并且固定在塑料上。

[0228] 为了评估固定的Ab535支持CSF-1-依赖性细胞的能力,将96孔圆底组织培养板的孔用Ab535或不相关的同种型(isotype)对照抗体预包被24小时,之后,通过每孔加入50 μ l含有10 μ g/ml或1 μ g/ml抗体的PBS溶液,启动细胞增殖测定,并在4 $^{\circ}$ C孵育。对孔进行抽吸并通过用100 μ l PBS洗两次,除去未结合的抗体。

[0229] 将如上所述维持的增殖的M-NFS-60细胞以每孔10,000个细胞的密度接种在96孔圆底组织培养板中,在50 μ l不含CSF-1的生长培养基中。补充有重组鼠CSF-1、Ab535或不含补充物的另外的50 μ l生长培养基被加入适当的孔中。对于测试的每个条件,将平板孵育72小时,根据生产商的说明书(Promega)使用CellTiter Glo试剂盒测定细胞数目,以产生与ATP水平成比例的、并因此与细胞数量成比例的可测量的发光读数。所有条件一式三份地进行。

[0230] 数据分析证实M-NFS-60依赖CSF-1进行增殖,正如在补充有CSF-1的孔中与没有CSF-1的生长培养基中维持的那些相比显著更高的细胞数所反映的。此外,所用浓度的固定在组织培养孔表面上的、或在溶液中游离的Ab535,在CSF-1不存在时不支持M-NFS-60细胞的增殖(图4)。

[0231] 实施例3:颞叶癫痫的毛果芸香碱小鼠模型

[0232] 按照Mazzuferi等,2012所述,进行颞叶癫痫和癫痫发生的毛果芸香碱模型。首次用于实验的小鼠和毛果芸香碱诱导颞叶癫痫后19周的癫痫小鼠(n=8-10)在实验的第1天和第4天施用100mg/kg(s.c.)抗CSF-1R(Ab535)或媒介物。在第8天,将动物处死,并将其脑从颅骨中取出。

[0233] 毛果芸香碱诱导的颞叶癫痫与两个脑半球的对称改变相关(Mazzuferi等,2012)。快速从右侧半球切取海马并在-80 $^{\circ}$ C冷冻以进行RNA提取和qRT-PCR。通过浸入4%PFA中将左侧半球固定以进行组织学研究(免疫组织化学)。

[0234] 为了显示抗体阻断受体的分子结果,使用Thomson-Reuters元数据库(Metabase)(<http://lsresearch.thomsonreuters.com/pages/solutions/10/metabase>)、生物途径和基因调控的手工辅助数据库,鉴定CSF-1R的下游转录靶基因。在靶CSF-1R基因中选择了Aif1,Irf8,Ctse1和Emr1基因,因为已知它们在海马中表达。通过qRT-PCR测量并比较它们的表达。

[0235] CSF-1R的上述靶基因之一Aif1编码Iba1蛋白,其是广泛建立的小胶质细胞激活的

标记。在人癫痫和在癫痫小鼠模型如毛果芸香碱模型中发现的小胶质细胞中,Iba1的表达一致地增加(Vezzani等,2013)。因此,我们对用抗CSF-1R抗体处理的毛果芸香碱癫痫小鼠的海马中的Iba1表达进行免疫组织化学评估。使用识别Iba1(小胶质细胞标记)和DAPI(核标记)的特异性抗体,用40倍透镜(NanoZoomer)进行图像采集后,在海马的齿状回中定量Iba1阳性细胞的数目(细胞/ mm^2)。

[0236] 结果

[0237] CSF-1R的四个转录靶基因的表达(例如Aif1(图5的图板A,B),Ctse(图5的图板C,D),Emr1(图5的图板E,F)和Irf8(图5的图板G,H))通过qPCR在癫痫小鼠(左边的图)和首次用于实验的动物(右边的图)的海马中,在s.c.注射抗CSF-1R抗体或对照IgG作为阴性对照之后,进行测量。

[0238] 在毛果芸香碱小鼠中,与对照(图5-图板A,C,E和G)相比,抗CSF-1R抗体处理(s.c.)显著降低所有4个选择的靶基因(Aif1,Ctse,Emr1和Irf8)的表达。这证明在用抗CSF-1R抗体处理的癫痫小鼠的海马中CSF-1R被有效地抑制。

[0239] 首次用于实验的动物中Aif1,Ctse和Irf8基因的表达不受抗CSF-1R抗体的影响(图5-图板B,D和H)。这表明疾病状态(癫痫)是抗CSF-1R在脑中起作用所必需的。然而,首次用于实验的小鼠Emr1的表达也受到影响(图1-图板F),表明CSF-1R的一些靶基因可能依赖于疾病背景,而另一些则不依赖于疾病背景。

[0240] 在癫痫小鼠中,抗CSF-1R至少部分地将这4种基因的表达水平恢复至首次用于实验的动物中观察到的表达水平(图板A,C,E和G),表明癫痫小鼠脑中的靶标参与。在首次用于实验的动物中,这种效应只能针对在Irf8靶基因(图板F)而被观察到,而不能针对其他3种靶基因而被观察到(图板B,D和H),表明抗CSF-1R暴露在首次用于实验的动物中靶标参与不同于毛果芸香碱诱导的癫痫动物。

[0241] 实施例4:对小鼠脑切片进行的免疫组织化学实验

[0242] 实施例3中描述的基于基因表达数据的观察结果被脑组织学证实。图6显示用抗CSF-1R抗体处理(s.c.)后对小鼠脑切片(海马齿状回)进行的免疫组织化学结果,其中Iba1标记(红色),其是活化的小胶质细胞的标记物;细胞核被DAPI染成蓝色。在图板D中量化每平方毫米表达Iba1的小胶质细胞的密度。

[0243] Iba1蛋白由实施例3中提到的Aif1基因(即CSF-1R的直接下游靶基因)编码。如清楚地显示的(图6-图板B和图板D中的定量),与首次用于实验的小鼠(图6-图板A和图D中的定量)相比,癫痫性毛果芸香碱小鼠中小胶质细胞活化和Iba1阳性细胞染色强烈增加。用抗CSF-1R抗体注射(s.c.)在癫痫动物中产生Iba1阳性细胞的强烈降低(图6的图板C),这与小胶质细胞活性的降低一致。因此,用抗CSF-1R抗体的处理诱导了Iba1染色的正常化(图6-图板C和图板D中的定量)至对照水平。

[0244] 实施例5:帕金森氏病的MPTP小鼠模型

[0245] 多巴胺能细胞的选择性急性变是帕金森氏病的一个标志,可以被诱导,例如,在小鼠中,通过毒素如1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)被诱导。注射MPTP后,多巴胺能细胞在几天内退化,这伴随着小胶质细胞的激活(Depboylu等,2012)。

[0246] 在实验的第1天和第4天,给两组首次用于实验的小鼠($n=8-10$)施用100mg/kg(s.c.)抗CSF-1R(Ab535)或媒介物。在第8天给两组小鼠注射MPTP(12.5mg/kg;s.c.)。MPTP的

全身注射迅速诱导两个脑半球的对称改变,因此在毒素注射后10-12小时处死小鼠。纹状体迅速从右侧半球切取并在-80℃冷冻以进行RNA提取和qRT-PCR。通过浸入4%PFA中将左侧半球固定,以进行组织学研究(免疫组织化学)。

[0247] 为了显示抗CSF-1R抗体阻断受体的分子结果,通过qRT-PCR测量和比较下游转录靶基因Aif1,Irf8,Ctse1和Emr1的表达。活化的小胶质细胞和细胞核(DAPI)的标记物Iba1以选择性抗体染色。在纹状体中定量每平方毫米表达Iba1的小胶质细胞的密度。

[0248] 实施例6:在帕金森氏病中的 α -突触核蛋白预成形原纤维(PFF)小鼠模型中对化合物测试

[0249] 将纯化的重组小鼠野生型 α -突触核蛋白PFF高速离心并收集上清液。将PFF组装在微型离心管中并摇动5天(1,000RPM)。将等分试样在干冰上冷冻并储存在-80℃。将PFF在室温下解冻并超声处理。使用前悬浮液的浓度是PBS中的2.5 μ g/ μ l蛋白质。随后,用氯胺酮/美托咪定麻醉10周龄雄性和/或雌性小鼠C57B1/6J,并将PFF注射到右侧纹状体,采用以下坐标:AP+0.2mm,ML-2.0mm,DV-3.0mm(总体积2 μ L,采用0.1 μ L/min)。在PFF注射后一天开始,每周一次施用抗CSF-1R抗体(Ab535;100mg/kg;s.c.)持续一个月。在此之后,对动物在一系列行为测试例如旋转杆,梁试验,吊线测试和步态分析中进行评估。在行为测试之后,动物被处死,并且他们的大脑被移除。通过浸入4%PFA中固定右半球以进行组织学研究(免疫组织化学)。

[0250] 为了显示抗CSF-1R抗体阻断受体的分子结果,通过定量免疫组织化学(如实施例4)测量Iba1小胶质细胞蛋白的表达。最后,也进行了跨大脑的pS129 α -突触核蛋白的分布,总的 α -突触核蛋白的度量,纹状体和黑质中多巴胺能神经元的计数。

[0251] 实施例7:抗CSF1R抗体对毛果芸香碱小鼠模型中癫痫发作频率的保护作用

[0252] 一组毛果芸香碱癫痫小鼠(如方法中所述制备)进行连续监测,以确认它们在进入功效研究之前显示自发复发性癫痫发作。癫痫发作监测使用专有系统(UCB Pharma)进行,使用3D加速度计和电视摄像机同时记录运动活动。该系统允许通过分析加速度计信号来自动检测行为癫痫发作。所有由检测算法识别的行为性癫痫发作都由经验丰富的技术人员在对相应视频剪辑进行仔细审查的过程中进行评分。在确认存在自发复发性癫痫发作后,在开始治疗之前,对小鼠(n=64)用同一系统进行14天连续监测以建立其基线癫痫发作频率,之后开始处理。随后,在另外14天的持续癫痫发作监测期间,每周两次(总共4次注射),用对照IgG或抗Csf1R抗体(100mg/kg)处理小鼠(n=32每组)。然后根据以下公式计算癫痫发作频率的百分比变化:

[0253] $\% \text{癫痫发作频率变化} = (\text{处理期间癫痫发作频率} / \text{基线癫痫发作频率}) \times 100$

[0254] 用对照IgG抗体注射导致癫痫发作频率相对于基线增加,而在用抗Csf1R抗体处理后没有观察到这种增加。因此,当比较对照组和活性抗体组时,在处理期间癫痫发作频率存在统计学显著差异(图7)。

序列表

<110> UCB生物制药私人有限公司

<120> 用于治疗神经系统疾病的方法

<130> PF0024-EP-EPA

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA019_969抗体序列CDR-L1

<220>

<221> CDR-L1

<222> (1) .. (11)

<400> 1

Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA019_969抗体序列CDRL2

<220>

<221> CDR-L2

<222> (1) .. (7)

<400> 2

Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA019_969抗体序列CDR-L3

<220>

<221> CDR-L3

<222> (1) .. (9)

<400> 3

Leu Gln Asp Ser Glu Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA019_969抗体序列CDR-H1

<220>

<221> CDR-H1

<222> (1) .. (12)

<400> 4

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA019_969抗体序列CDR-H2

<220>

<221> CDR-H2

<222> (1) .. (16)

<400> 5

Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn

1 5 10 15

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CA019_969抗体序列CDR-H3

<220>

<221> CDR-H3

<222> (1) .. (16)

<400> 6

Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe

1 5 10 15
 <210> 7
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 969 gL7 V区
 <220>
 <221> 969 gL7 V区
 <222> (1) .. (107)
 <400> 7

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

<210> 8
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 969 gL7 V区
 <220>
 <221> 969 gL7 V区
 <222> (1) .. (321)
 <400> 8

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtgggaga cagggtgaca 60
 atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg catggtatca gcagaaacct 120
 ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct 180
 cggttcagcg gaagcggctc cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg 240

gaggattttg ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcggtggt 300
ggcaccaaag tggaaatcaa g 321
<210> 9
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 969 gH2 V区
<220>
<221> 969 gH2 V区
<222> (1) .. (125)
<400> 9
Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15
Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45
Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60
Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80
Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95
Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
100 105 110
Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125
<210> 10
<211> 375
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 969 gH2 V区
<220>
<221> 969 gH2 V区
<222> (1) .. (375)
<400> 10
gaagtgcac tcaaggagtc tggacccgct ctggtgaaac caacccaaac actcactttg 60

acatgtactt ttagtggctt ctcatgtgact acctatggaa tgggcgtggg atggatcaga 120
 cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac 180
 tataacccgt ccctgaaaaa ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg 240
 gtgctgacca tgacaaatat ggatcccggt gacaccgcaa cctactactg cgccccgatt 300
 ggtcccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg ccaagggaca 360
 atggttactg tctcg 375

<210> 11

<211> 972

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CSF-1R的氨基酸序列

<400> 11

Met	Gly	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Trp	His
1				5						10				15	
Gly	Gln	Gly	Ile	Pro	Val	Ile	Glu	Pro	Ser	Val	Pro	Glu	Leu	Val	Val
			20					25						30	
Lys	Pro	Gly	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Val	Gly	Asn	Gly	Ser	Val
			35					40						45	
Glu	Trp	Asp	Gly	Pro	Pro	Ser	Pro	His	Trp	Thr	Leu	Tyr	Ser	Asp	Gly
			50					55						60	
Ser	Ser	Ser	Ile	Leu	Ser	Thr	Asn	Asn	Ala	Thr	Phe	Gln	Asn	Thr	Gly
65				70						75				80	
Thr	Tyr	Arg	Cys	Thr	Glu	Pro	Gly	Asp	Pro	Leu	Gly	Gly	Ser	Ala	Ala
				85						90				95	
Ile	His	Leu	Tyr	Val	Lys	Asp	Pro	Ala	Arg	Pro	Trp	Asn	Val	Leu	Ala
				100						105				110	
Gln	Glu	Val	Val	Val	Phe	Glu	Asp	Gln	Asp	Ala	Leu	Leu	Pro	Cys	Leu
				115						120				125	
Leu	Thr	Asp	Pro	Val	Leu	Glu	Ala	Gly	Val	Ser	Leu	Val	Arg	Val	Arg
				130						135				140	
Gly	Arg	Pro	Leu	Met	Arg	His	Thr	Asn	Tyr	Ser	Phe	Ser	Pro	Trp	His
145					150						155				160
Gly	Phe	Thr	Ile	His	Arg	Ala	Lys	Phe	Ile	Gln	Ser	Gln	Asp	Tyr	Gln
				165						170				175	
Cys	Ser	Ala	Leu	Met	Gly	Gly	Arg	Lys	Val	Met	Ser	Ile	Ser	Ile	Arg
				180						185				190	
Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Val	Ile	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Val
				195						200				205	

Pro	Ala	Glu	Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Gly	Glu	Ala	Ala	Gln	Ile	Val	Cys	210	215	220
Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Asp	Val	Asn	Phe	Asp	Val	Phe	Leu	Gln	His	Asn	225	230	235
Asn	Thr	Lys	Leu	Ala	Ile	Pro	Gln	Gln	Ser	Asp	Phe	His	Asn	Asn	Arg	245	250	255
Tyr	Gln	Lys	Val	Leu	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	His	260	265	270
Ala	Gly	Asn	Tyr	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Asn	Val	Gln	Gly	Lys	His	Ser	275	280	285
Thr	Ser	Met	Phe	Phe	Arg	Val	Val	Glu	Ser	Ala	Tyr	Leu	Asn	Leu	Ser	290	295	300
Ser	Glu	Gln	Asn	Leu	Ile	Gln	Glu	Val	Thr	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Asn	305	310	315
Leu	Lys	Val	Met	Val	Glu	Ala	Tyr	Pro	Gly	Leu	Gln	Gly	Phe	Asn	Trp	325	330	335
Thr	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	His	Gln	Pro	Glu	Pro	Lys	Leu	Ala	340	345	350
Asn	Ala	Thr	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Arg	His	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Leu	355	360	365
Pro	Arg	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg	370	375	380
Asn	Pro	Gly	Gly	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr	385	390	395
Pro	Pro	Glu	Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr	405	410	415
Leu	Leu	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Pro	Asn	Val	Thr	Trp	Leu	420	425	430
Gln	Cys	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Leu	Gln	435	440	445
Val	Trp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Gln	Glu	Pro	Phe	His	450	455	460
Lys	Val	Thr	Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	His	Asn	465	470	475
Gln	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Ala	His	Asn	Ser	Val	Gly	Ser	Gly	Ser	Trp	485	490	495
Ala	Phe	Ile	Pro	Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	His	Thr	His	Pro	Pro	Asp	Glu	500	505	510
Phe	Leu	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Val	Ala	Cys	Met	Ser	Ile	Met	Ala	Leu			

515	520	525
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro		
530	535	540
Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser		
545	550	555
Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu		
565	570	575
Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala		
580	585	590
Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp		
595	600	605
Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala		
610	615	620
Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu		
625	630	635
Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly		
645	650	655
Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu		
660	665	670
Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser		
675	680	685
Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu		
690	695	700
Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val		
705	710	715
Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser		
725	730	735
Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu		
740	745	750
Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe		
755	760	765
Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val		
770	775	780
Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala		
785	790	795
Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg		
805	810	815
Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr		
820	825	830

Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile		
835	840	845
Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys		
850	855	860
Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe		
865	870	875
Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu		
	885	890
Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu		
	900	905
Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser		
	915	920
Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu		
	930	935
Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala		
945	950	955
Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys		
	965	970

<210> 12

<211> 277

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CSF-1R的氨基酸序列

<400> 12

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

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
 115 120 125
 Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
 130 135 140
 Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
 145 150 155 160
 Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
 165 170 175
 Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
 180 185 190
 Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
 195 200 205
 Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
 210 215 220
 Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
 225 230 235 240
 Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
 245 250 255
 Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
 260 265 270
 Phe Phe Arg Val Val
 275

<210> 13

<211> 49

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CSF-1R的氨基酸序列

<400> 13

Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr Ile
 1 5 10 15
 His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala Leu
 20 25 30
 Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val Gln
 35 40 45

Lys

<210> 14

<211> 493

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CSF-1R的氨基酸序列 (SNP V32G, A245S, H247P, V279M位置加下划线)

<400> 14

```

Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val Lys Pro Gly
1           5           10           15
Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val Glu Trp Asp
          20           25           30
Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly Ser Ser Ser
          35           40           45
Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly Thr Tyr Arg
          50           55           60
Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
65           70           75           80
Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
          85           90           95
Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
          100          105          110
Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
          115          120          125
Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
          130          135          140
Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
145          150          155          160
Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
          165          170          175
Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
          180          185          190
Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
          195          200          205
Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
          210          215          220
Leu Ala Ile His Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg Tyr Gln Lys
225          230          235          240
Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
          245          250          255
Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met
          260          265          270
Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln

```

275	280	285
Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr	Val Gly Glu Gly Leu Asn Leu Lys Val	
290	295	300
Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly	Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu	
305	310	315
Gly Pro Phe Ser Asp His Gln	Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr	
325	330	335
Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His	Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu	
340	345	350
Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg	Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly	
355	360	365
Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe	Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu	
370	375	380
Val Ser Val Ile Trp Thr Phe	Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys	
385	390	395
Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln	Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser	
405	410	415
Gly His Thr Asp Arg Cys Asp	Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp	
420	425	430
Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu	Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr	
435	440	445
Val Gln Ser Leu Leu Thr Val	Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr	
450	455	460
Glu Cys Arg Ala His Asn Ser	Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile	
465	470	475
Pro Ile Ser Ala Gly Ala His	Thr His Pro Pro Asp Glu	
485	490	

<210> 15

<211> 512

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人CSF-1R细胞外结构域的序列

<400> 15

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His	
1	5
Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val	
20	25
Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val	

35	40	45
Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly		
50	55	60
Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly		
65	70	75
Thr Tyr Arg Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala		80
85	90	95
Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala		
100	105	110
Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu		
115	120	125
Leu Thr Asp Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg		
130	135	140
Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His		
145	150	155
Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln		
165	170	175
Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg		
180	185	190
Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val		
195	200	205
Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys		
210	215	220
Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn		
225	230	235
Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg		
245	250	255
Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His		
260	265	270
Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser		
275	280	285
Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser		
290	295	300
Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn		
305	310	315
Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp		
325	330	335
Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala		
340	345	350

Asn	Ala	Thr	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Arg	His	Thr	Phe	Thr	Leu	Ser	Leu
355				360				365							
Pro	Arg	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Ala	Gly	Arg	Tyr	Ser	Phe	Leu	Ala	Arg
370				375				380							
Asn	Pro	Gly	Gly	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Phe	Glu	Leu	Thr	Leu	Arg	Tyr
385				390				395				400			
Pro	Pro	Glu	Val	Ser	Val	Ile	Trp	Thr	Phe	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Thr
				405				410				415			
Leu	Leu	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Pro	Asn	Val	Thr	Trp	Leu
420				425				430							
Gln	Cys	Ser	Gly	His	Thr	Asp	Arg	Cys	Asp	Glu	Ala	Gln	Val	Leu	Gln
435				440				445							
Val	Trp	Asp	Asp	Pro	Tyr	Pro	Glu	Val	Leu	Ser	Gln	Glu	Pro	Phe	His
450				455				460							
Lys	Val	Thr	Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Glu	Thr	Leu	Glu	His	Asn
465				470				475				480			
Gln	Thr	Tyr	Glu	Cys	Arg	Ala	His	Asn	Ser	Val	Gly	Ser	Gly	Ser	Trp
				485				490				495			
Ala	Phe	Ile	Pro	Ile	Ser	Ala	Gly	Ala	His	Thr	His	Pro	Pro	Asp	Glu
500				505				510							

CA019_969 Ab 序列

CDR-L1

LASEDIYDNLA SEQ ID NO:1

CDRL2

YASSLQD SEQ ID NO:2

CDR-L3

LQDSEYPWT SEQ ID NO:3

CDR-H1

GFSLTTYGMGVG SEQ ID NO:4

CDR-H2

NIWWDDDKYYNPSLKN SEQ ID NO:5

CDR-H3

IGPIKYPTAPYRYFDF⁷ SEQ ID NO:6

图1

969 gL7 V-区 SEQ ID NO:7

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCLASEDIY DNLAWYQQKP GKAPKLLIYY
ASSLQDGVPS RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCLQ DSEYPWTFGG
GTKVEIK

969 gL7 V-区 SEQ ID NO:8

gacatacaga tgactcagtc accctcaagc ctgagtgccg gtgtggggaga
cagggtgaca atcacctgtc tggcctccga ggatatctac gataacctgg
catggtatca gcagaaacct ggaaaggctc ccaagctcct gatttattat
gcctcctctc tccaagacgg cgttccatct cggttcagcg gaagcggctc
cgggacggat tacacactga caattagctc tctgcaaccg gaggattttg
ctacttacta ctgcctgcaa gactccgaat acccatggac cttcgggtggt
ggcaccaaag tggaaatcaa g

969 gH2 V-区 SEQ ID NO:9

EVILKESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLT TYGMGVGWIR QPPGKALEWL
ANIWWDDDKY YNPSLKNRLT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCARI
GPIKYPTAPY RYFDFWGQGT MVTVS

969 gH2 V-区 SEQ ID NO:10

gaagtgacac tcaaggagtc tggaccgct ctggtgaaac caacccaaac
actcactttg acatgtactt ttagtggtct ctcattgact acctatggaa
tgggcgtggg atggatcaga cagccacctg gcaaggctct ggaatggctg
gccaacatct ggtgggatga cgacaagtac tataaccctg ccctgaaaaa
ccggctgacc attagcaagg atacttctaa aaatcaagtg gtgctgacca
tgacaaatat ggatccggtt gacaccgcaa cctactactg cgcccgcatt
gggtcccataa agtaccctac ggcaccttac cgatatttcg acttttgggg
ccaagggaca atggttactg tctcg

图1续

CSF-1R SEQ ID NO: 11的氨基酸序列

MGPGLVLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW
 DGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY
 VKDPAWPWNV LAQEVVVFED QDALLPCLLT DVPLEAGVSL VRVRGRPLMR
 HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL MGGRKVMSSIS IRLKVQKVIP
 GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDFVFLQHN NTKLAIPQQS
 DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQGKHST MFFRVVESAY
 LNLSSSEQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK
 LANATTKDTY RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY
 PPEVSVIWF INGSGTLLCA ASGYQPQNV TLQCSGHTDR CDEAQVLQVW
 DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN QTYECRAHNS VSGSGSWAFIP
 ISAGAHTHP DEFLETPVVV ACMSIMALL LLLLLLLYKY KQKPKYQVRW
 KIIESYEGNS YTFIDPTQLP YNEKWEFPRN NLQFGKTLGA GAFGKVVEAT
 AFGLGKEDAV LKVAVKMLKS TAHADKEAL MSELKIMSHL QGHENIVNLL
 GACTHGGPVL VITEYCCYGD LLNFLRRKAE AMLGPSLSPG QDPEGGVDYK
 NIHLEKKYVR RDSGFSSQGV DTYVEMRPVS TSSNDSFSEQ DLDKEDGRPL
 ELRDLLHFSS QVAQGMFLA SKNCIHRDVA ARNVLLTNGH VAKIGDFGLA
 RDIMNDSNYI VKGNARLPVK WMAPESIFDC VYTVQSDVWS YGILLWEIFS
 LGLNPYPGIL VNSKFYKLVK DGYQMAQPAF APKNIYSIMQ ACWALEPTHR
 PTFQQICSFL QEQAQEDRRE RDTNLPSSS RSGSGSSSS ELEEESSSEH
 LTCCEQGDIA QPLLQPNNYQ FC

CSF-1R SEQ ID NO: 12的氨基酸序列

IPVIEPSVPELVVKPGATVTLRCVGNNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTG
 TYRCTEPGDP LGGSAAIHLYVKDPAWPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLV
 RVRGRPLMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVKVIPGP
 PALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVFLQHNNTKLAIPQQSDFHNNRYQKVLTLL
 NLDQVDFQHAGNYSCVASNVQGKHSTSMFFRVV

CSF-1R SEQ ID NO: 13的氨基酸序列

MRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVKQ

CSF-1R SEQ ID NO:14的氨基酸序列 (SNP V32G, A245S, H247P, V279M,

加下划线的位置)

IPVIEPSVPELV**V**KPGATVTLRCVGNNGSVEWDGPPSPHWTLYSDGSSSILSTNNATFQNTG
 TYRCTEPGDP LGGSAAIHLYVKDPAWPWNVLAQEVVVFEDQDALLPCLLTDPVLEAGVSLV
 RVRGRPLMRHTNYSFSPWHGFTIHRAKFIQSQDYQCSALMGGRKVMSSISIRLKVKVIPGP
 PALTLVPAELVRIRGEAAQIVCSASSVDVNFDFVFLQHNNTKL**A****H**QQSDFHNNRYQKVLTLL
 NLDQVDFQHAGNYSC**V**ASNQGKHSTSMFFRVVESAYLNLSSSEQNLIQEVTVGEGLNKVM
 VEAYPGLQGFNWTYLGPFSDHQPEPKLANATTKDTYRHTFTLSLPR LKPSEAGRYSFLARN
 PGGWRALTFELTLRYPPPEVSVIWF INGSGTLLCAASGYQPQNVTLQCSGHTDR CDEAQV
 LQVWDDDPYPEVLSQEPFHKVTVQSLTVETLEHNQTYECRAHNSVSGSGSWAFIPISAGAHT
 HPPDE

图1续

SEQ ID NO: 15

MGPGVLLLLL VATAWHGQGI PVIEPSVPPEL VVKPGATVTL RCVGNNGSVEW DGPPSPHWTL
YSDGSSSILS TNNATFQNTG TYRCTEPGDP LGGSAAIHLY VKDPAWPWNV LAQEVVVFED
QDALLPCLLT DPVLEAGVSL VRVRGRPLMR HTNYSFSPWH GFTIHRAKFI QSQDYQCSAL
MGGRKVMSSS IRLKVQKVIP GPPALTLVPA ELVRIRGEAA QIVCSASSVD VNFDVFLQHN
NTKLAIPQQS DFHNNRYQKV LTLNLDQVDF QHAGNYSCVA SNVQGHST S MFFRVVESAY
LNLSSQNLI QEVTVGEGLN LKVMVEAYPG LQGFNWTYLG PFSDHQPEPK LANATTKDTY
RHTFTLSLPR LKPSEAGRYS FLARNPGGWR ALTFELTLRY PPEVSVIWF INGSGTLLCA
ASGYPQPNVT WLQCSGHTDR CDEAQVLQVW DDPYPEVLSQ EPFHKVTVQS LLTVETLEHN
QTYECRAHNS VGSGSWAFIP ISAGATHPP DE

图2

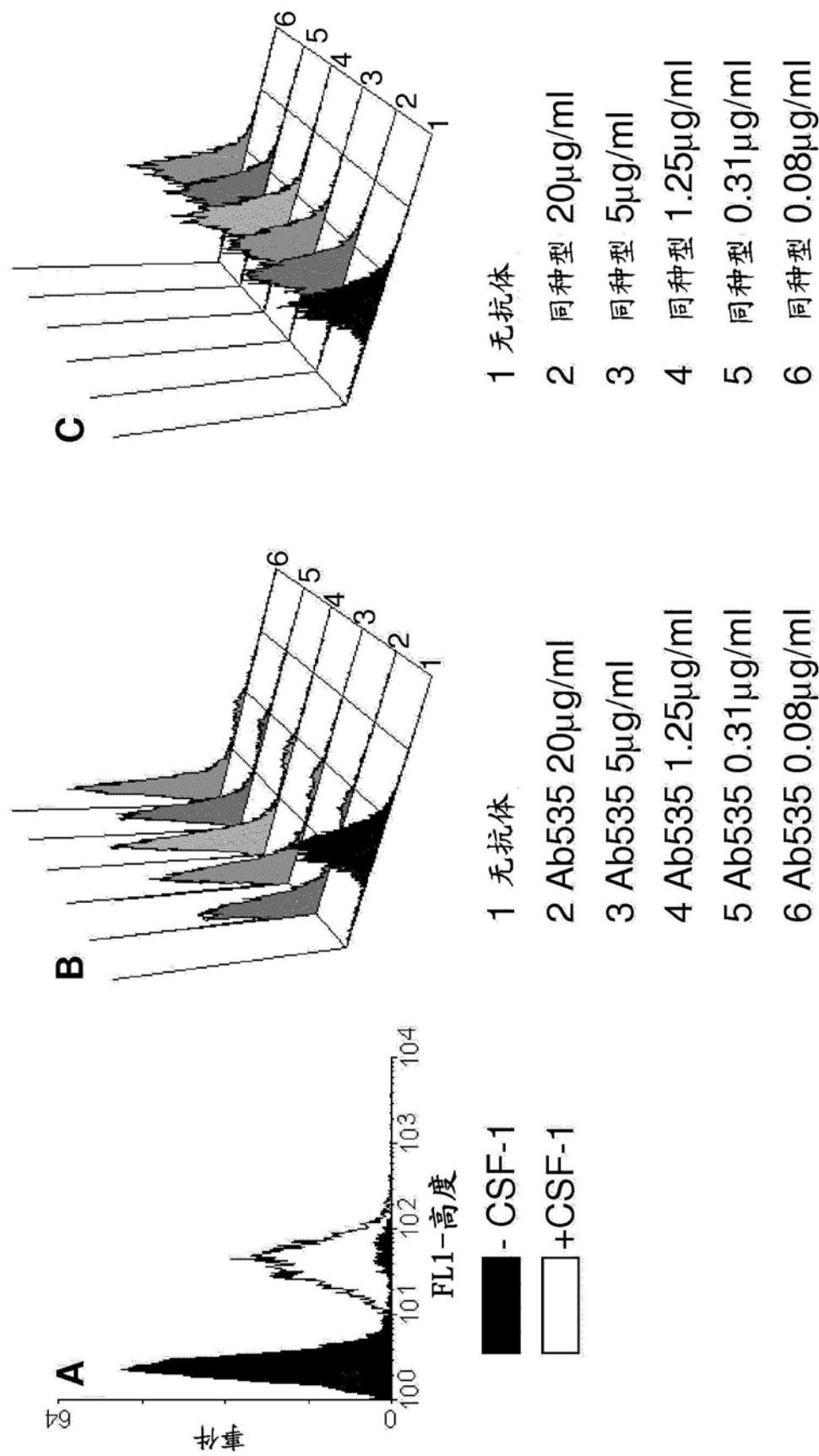


图3

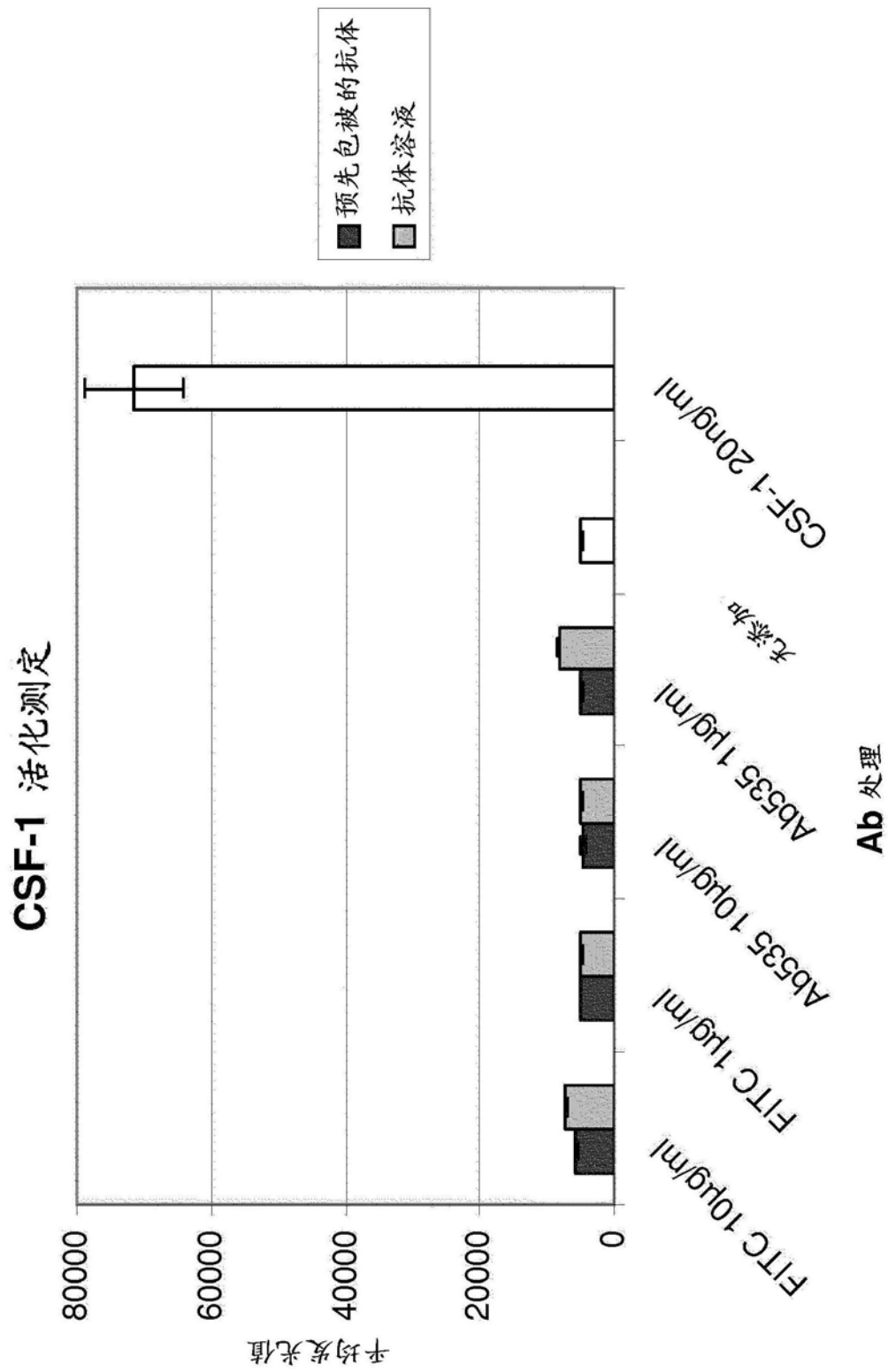


图4

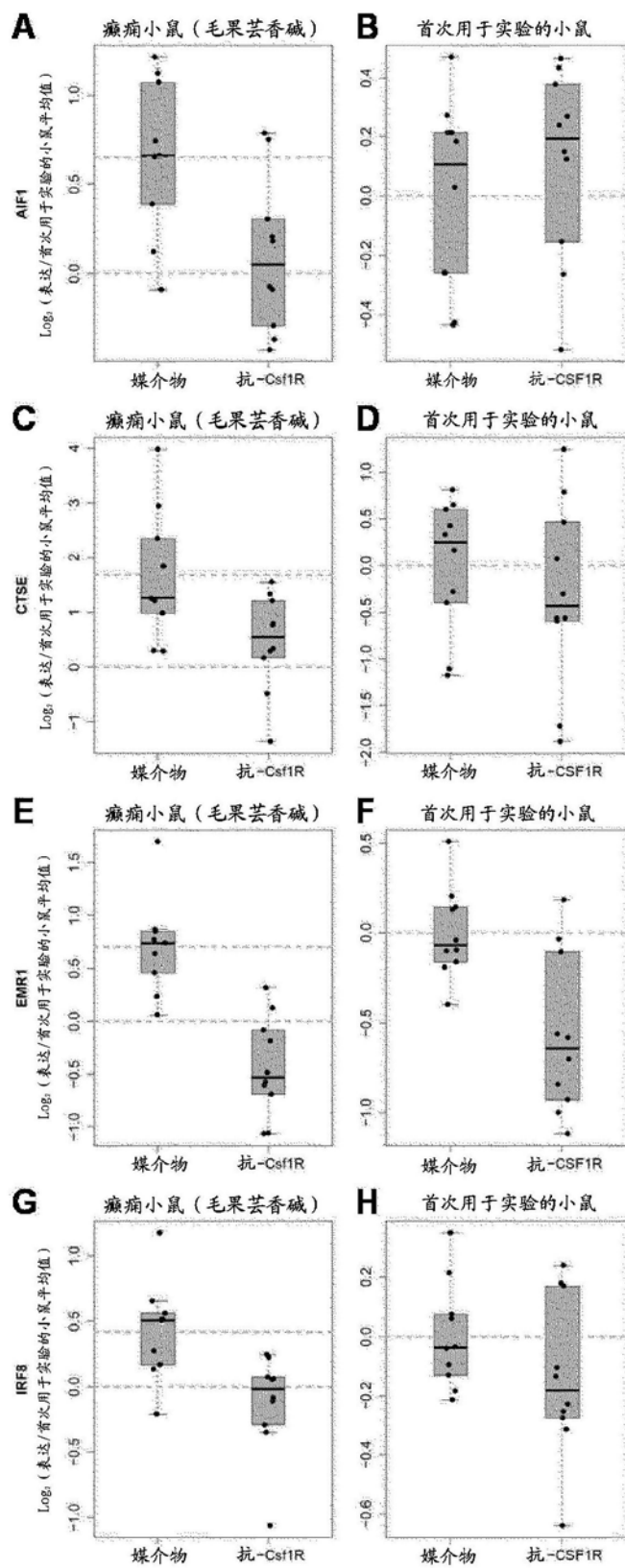


图5

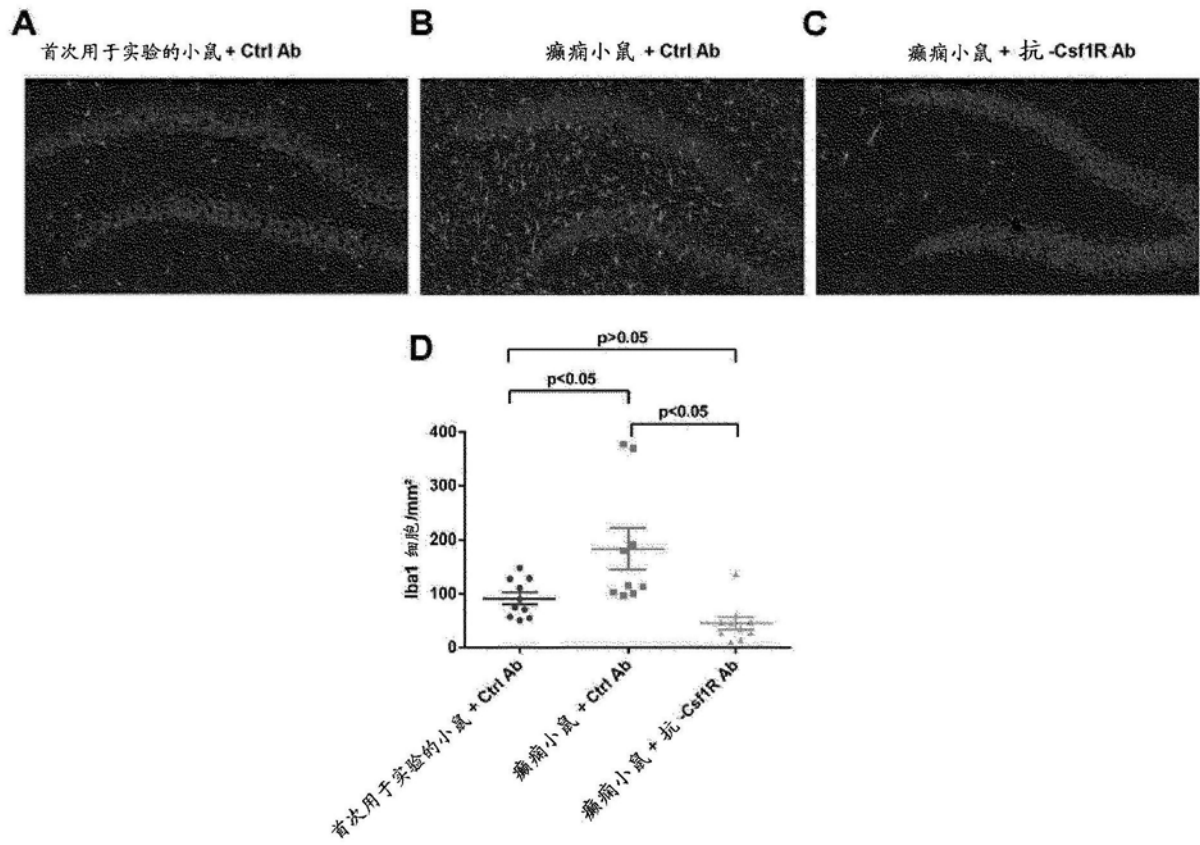


图6

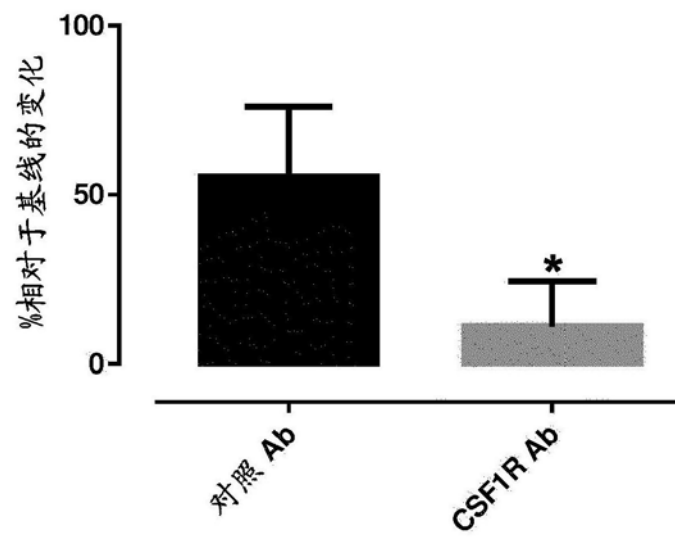


图7