(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107810012 A
(43)申请公布日 2018.03.16

(21)申请号 201680032206.X

(22)申请日 2016.06.01

(30)优先权数据
62/170,069 2015.06.02 US
62/335,028 2016.05.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/035342 2016.06.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/196679 EN 2016.12.08

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 考特尼·伊斯利-尼尔
罗比·魏玛 阿里·扎林

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021
代理人 张国梁 程金山

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)
A61P 25/14(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书52页
序列表24页 附图39页

(54)发明名称

使用抗IL-34抗体治疗神经疾病的组合物和方法

(57)摘要

本发明提供了使用抗IL-34抗体治疗神经疾病和降低小胶质细胞密度的方法。

CN 107810012 A

1.一种治疗个体中神经疾病的方法，所述方法包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体。

2.一种治疗展现神经疾病的一个或多个症状的个体的方法，所述方法包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体。

3.一种降低个体的脑中小胶质细胞的密度的方法，所述方法包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法，其中所述抗IL-34抗体是与人IL-34结合的分离抗体，所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106、Asn150、Leu127、Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44、Glu121、Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Trp116和Asn61中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置，并且其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

5.根据权利要求1-3中任一项所述的方法，其中所述抗IL-34抗体是与人IL-34结合的分离抗体，所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的从Glu103至Asn150的氨基酸残基中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1，并且其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

6.根据权利要求4或权利要求5所述的方法，其中所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106和Asn150中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

7.根据权利要求6所述的方法，其中所述表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Ser100、Glu123、Trp116、Thr124、Leu127、Asn128、Gln131和Thr134中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

8.根据权利要求6或权利要求7所述的方法，其中所述抗体与人IL-34的位置100-108、116-134、109和150内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

9.根据权利要求4所述的方法，其中所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44和Glu121中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

10.根据权利要求9所述的方法，其中所述表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Phe40、Asp43、Leu125、Gln189、Thr36和Val185中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

11.根据权利要求9或权利要求10所述的方法，其中所述抗体与人IL-34的位置36-44、121-128和184-187内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

12.根据权利要求4或权利要求6所述的方法，其中所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的从Glu103-Leu127氨基酸残基中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

13.根据权利要求4所述的方法，其中所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Glu103、Leu109、Trp116和Asn61中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

14.根据权利要求13所述的方法，其中所述表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Pro152、Val108、Leu110、Gln106、Glu123、Leu127、Lys117、Ile60和Lys55中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

15.根据权利要求13或权利要求14所述的方法，其中所述抗体与人IL-34的位置55-61、100-108、109、111-127和152内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

16.根据权利要求13至15中任一项所述的方法，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。

17.根据权利要求13至15中任一项所述的方法，其中所述抗体包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区序列。

18.根据权利要求13至15中任一项所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2。

19.根据权利要求13至15中任一项所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

20.根据权利要求13至15和19中任一项所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

21.根据权利要求3-20中任一项所述的方法，其中所述抗体与IL-34的二聚体结合。

22.根据权利要求21所述的方法，其中所述抗体与跨越人IL-34二聚体的两个原体的表位结合。

23.根据权利要求1-6中任一项所述的方法，其中所述抗IL-34抗体是与人IL-34结合的分离抗体，其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合，并且其中所述抗体与IL-34的二聚体结合。

24.根据权利要求23所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDVPYT(SEQ ID NO:47)或QQSRTARPT(SEQ ID NO:41)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2。

25.根据权利要求23所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)的HVR-H3。

26.根据权利要求23或权利要求25所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或

QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDVPYT(SEQ ID NO:47)或QQSRTARPT(SEQ ID NO:41)或QQSFYFPN(SEQ ID NO:38)或QQSYTTPP(SEQ ID NO:42)或QQYTALPY(SEQ ID NO:48)或QQYSDLPY(SEQ ID NO:44)或QQYSDVPY(SEQ ID NO:46)或QQSRTARP(SEQ ID NO:40)的HVR-L3。

27.根据权利要求23所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2。

28.根据权利要求23所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

29.根据权利要求23或权利要求28中所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

30.根据权利要求23至26中任一项所述的方法，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。

31.根据权利要求23至26中任一项所述的方法，其中所述抗体包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区序列。

32.根据权利要求23至26中任一项所述的方法，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。

33.根据权利要求23至26中任一项所述的方法，其中所述抗体包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区序列。

34.根据权利要求23至26中任一项所述的方法，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。

35.根据权利要求23至26中任一项所述的方法，其中所述抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区序列。

36.根据权利要求23至29中任一项所述的方法，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。

37.根据权利要求23至29中任一项所述的方法，其中所述抗体包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变区序列。

38.根据权利要求23至26中任一项所述的方法，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。

39.根据权利要求23至26中任一项所述的方法，其中所述抗体包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链可变区序列。

40.根据权利要求23-39中任一项所述的方法，其中所述抗体与跨越人IL-34二聚体的

两个原体的表位结合。

41.根据权利要求23-40中任一项所述的方法，其中所述抗体中和IL-34活性。

42.根据权利要求1-3中任一项所述的方法，其中所述抗IL-34抗体是与人IL-34结合的分离抗体，其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合，并且其中所述抗体中和IL-34活性。

43.根据权利要求42所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列SRGAYRFAY(SEQ ID NO:56)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG(SEQ ID NO:54)的HVR-H2。

44.根据权利要求42所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列SNYIH(SEQ ID NO:55)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG(SEQ ID NO:54)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列SRGAYRFAY(SEQ ID NO:56)的HVR-H3。

45.根据权利要求42或权利要求44中所述的方法，其中所述抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3。

46.根据权利要求42至45中任一项所述的方法，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。

47.根据权利要求42至46中任一项所述的方法，其中所述抗体包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区序列。

48.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述抗体不抑制人CSF-1和人CSF-1R之间的结合。

49.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述抗体是单克隆抗体。

50.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。

51.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述抗体是双特异性抗体。

52.根据权利要求51所述的方法，其中所述双特异性抗体包含针对人CSF-1的第二结合特异性。

53.根据权利要求52所述的方法，其中所述双特异性抗体抑制人CSF-1与人CSF-1R的结合。

54.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述抗IL-34抗体是与人IL-34结合的抗体片段。

55.根据权利要求54所述的方法，其中所述片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2、Fv或scFv片段。

56.根据权利要求1-53中任一项所述的方法，其中所述抗体是单臂抗体。

57.根据权利要求1-53中任一项所述的方法，其中所述抗体是线性抗体。

58.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述抗IL-34抗体是全长IgG1或IgG4抗体。

59.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其进一步包括向所述个体施用有效量的CSF-1R抑制剂。

60.根据权利要求59所述的方法，其中所述CSF-1R抑制剂是小分子抑制剂。

61.根据权利要求60所述的方法，其中所述小分子抑制剂是GW2580。

62.根据权利要求59所述的方法，其中所述CSF-1R抑制剂是抗CSF-1R抗体。

63.根据权利要求62所述的方法，其中所述抗CSF-1R抗体是与人CSF-1R结合的分离抗体，所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置，并且其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

64.根据权利要求63所述的方法，其中所述抗体与包含CSF-1R的氨基酸残基Arg144的表位结合，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

65.根据权利要求64所述的方法，其中所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg142、Arg146和Arg150中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

66.根据权利要求64或65所述的方法，其中所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Ser172和Arg192中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

67.根据权利要求64至66中任一项所述的方法，其中所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg146、Met149、Arg150、Phe169、Ile170和Gln173中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

68.根据权利要求64至67中任一项所述的方法，其中所述抗体与位置142-150和169-173内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

69.根据权利要求63所述的方法，其中所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人CSF-1R的氨基酸残基Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

70.根据权利要求69所述的方法，其中所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Tyr257，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

71.根据权利要求69或70所述的方法，其中所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Pro247、Gln258和Lys259中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

72.根据权利要求69至71中任一项所述的方法，其中所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Val231、Asp251和Tyr257中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

73.根据权利要求69至72中任一项所述的方法，其中所述抗体与位置231、248-252和254内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

74.根据上述权利要求中任一项所述的方法，其进一步包括向所述个体施用有效量的抗CSF-1抗体。

75.根据权利要求74所述的方法，其中所述抗CSF-1抗体抑制人CSF-1与人CSF-1R的结合。

76.根据上述权利要求中任一项所述的方法，其中所述个体是人类。

77.根据权利要求1-2和4-76中任一项所述的方法，其中所述神经疾病选自由以下组成的组：阿尔茨海默病，帕金森病，亨廷顿病，肌萎缩性侧索硬化，神经性疼痛，朊病毒病，脊髓

小脑性共济失调，脊髓性肌萎缩，自闭症和自闭症谱系障碍。

78.根据权利要求77所述的方法，其中所述神经疾病是阿尔茨海默病。

79.根据权利要求1-2和4-76中任一项所述的方法，其中所述神经疾病的特征在于神经炎症和小胶质细胞增生。

80.根据权利要求2和4-76中任一项所述的方法，其中所述一个或多个症状选自由以下组成的组：记忆丧失，混乱，定向力障碍，情绪改变和行为改变。

81.根据权利要求2、4-76或80所述的方法，其中在施用有效量的抗IL-34抗体后所述一个或多个症状得到改善。

82.根据权利要求81所述的方法，其中使用简易精神状态检查来测量所述一个或多个症状。

83.根据权利要求3-76所述的方法，其中在脑中小胶质细胞的密度降低至少30％，至少40％，至少50％，至少60％，至少70％，或至少80％。

84.一种包含药物组合物的试剂盒，所述药物组合物包含抗IL-34抗体和药用载体。

85.根据权利要求84所述的试剂盒，其中所述药物组合物进一步包含CSF-1R抑制剂。

86.根据权利要求85所述的试剂盒，其中所述CSF-1R抑制剂是小分子抑制剂。

87.根据权利要求85所述的试剂盒，其中所述CSF-1R抑制剂是抗CSF-1R抗体。

88.根据权利要求84-87中任一项所述的试剂盒，其中所述试剂盒进一步包含向个体施用有效量的药物组合物以治疗神经疾病的说明书。

89.根据权利要求88所述的试剂盒，其中所述神经疾病选自由以下组成的组：阿尔茨海默病，帕金森病，亨廷顿病，肌萎缩性侧索硬化，神经性疼痛，朊病毒病，脊髓小脑性共济失调，脊髓性肌萎缩，自闭症和自闭症谱系障碍。

90.根据权利要求89所述的试剂盒，其中所述神经疾病是阿尔茨海默病。

使用抗IL-34抗体治疗神经疾病的组合物和方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年6月2日提交的美国临时专利申请号62/170,069和2016年5月11日提交的美国临时专利申请号62/335,028的利益,所述各申请通过引用整体并入本文。

[0003] ASCII文本文件中的序列表的提交

[0004] ASCII文本文件中的以下提交的内容通过引用整体并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:146392031740SeqList.txt,记录日期:2016年5月31日,大小:42KB)。

发明领域

[0005] 本发明涉及使用抗IL-34抗体治疗神经疾病的组合物和方法。

[0006] 背景

[0007] 神经疾病,包括神经退行性疾病,影响了全世界数亿人。神经疾病是中枢和外周神经系统的病症,并且涉及脑、脊髓、颅神经、外周神经、神经根、自主神经系统、神经肌肉接头和肌肉(WHO,2014年2月)。神经退行性疾病(诸如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease)、帕金森病(Parkinson's disease)和亨廷顿病(Huntington's disease))的特征在于神经系统细胞死亡或功能障碍,导致诸如认知和运动缺陷等症状。

[0008] 阿尔茨海默病是痴呆的主要原因,在美国被列为第六大死亡主要原因(National Center for Health Statistics(国家卫生统计中心),CDC,2013)。目前超过540万美国人被诊断患有阿尔茨海默病,并且每年超过500,000人死于该疾病。阿尔茨海默病伴随着显著的社会和医疗成本。在2013年,据估计1550万护理人员为阿尔茨海默病患者提供了2200亿美元的无偿护理。在2014年,阿尔茨海默病的医疗相关成本估计为2140亿美元。预计阿尔茨海默病的患病率将显著增加,到2050年达到预测的1600万。(阿尔茨海默病基金会,2015年3月)。

[0009] 阿尔茨海默病的特征在于脑中细胞外斑块(由β-淀粉状肽组成)和神经原纤维缠结(由tau蛋白组成)的积累。大脑皮层和皮层下区域的神经元的随后死亡导致神经退行性变。阿尔茨海默病的症状包括记忆丧失,混乱,说话困难,运动缺陷和情绪或性格改变。帕金森病是以痴呆和进行性运动功能障碍为特征的慢性进行性神经退行性疾病。帕金森病是由中枢神经系统中产生多巴胺的神经元的死亡引起的。在大多数人中,帕金森病是特发性的(idiopathic)(没有已知原因)。但是,一小部分病例有遗传联系。亨廷顿病是神经退行性遗传病症,由位于染色体4上的基因(称为亨廷顿(huntingtin)(htt))的两个拷贝中任一个上的常染色体显性突变引起。亨廷顿基因内的CAG(胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤)三联重复段的扩增导致了亨廷顿蛋白的修饰形式的产生,其进行性地损害脑中的细胞。随着疾病进展,症状包括严重的运动、认知和精神障碍。

[0010] 据信神经炎症和小胶质细胞增生在神经退行性疾病中起作用。神经炎症的特征在于中枢神经系统细胞的激活和炎症介质的产生。小胶质细胞增生涉及响应于炎症信号的小胶质细胞(定居中枢神经系统巨噬细胞)的异常增殖或过度生长。神经炎症和小胶质细胞增生可以促进神经退行性疾病的潜在机制,诸如阿尔茨海默病中的斑块积累以及帕金森病和

亨廷顿病中的神经元死亡和功能障碍(Block等人,(2005)Progress in Neurobiology 76(2):77-98;Moller(2010)J Neural Transm 117(8):1001-1008)。慢性神经炎症和小胶质细胞增生也发生于其它神经退行性疾病和神经发育疾病,诸如肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)、朊病毒病、脊髓小脑性共济失调(spinocerebellar ataxia)、脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy)、自闭症(autism)和自闭症谱系障碍(autism spectrum disorder)(Amor等人,(2014)Immunology 142(2):151-166;El-Ansary等人(2012)J of Neuroinflammation 9:265)。

[0011] 目前没有治愈阿尔茨海默病或其它神经疾病的方法。例如,目前用于阿尔茨海默病的药物集中于调节神经递质以治疗疾病的症状,诸如运动和认知缺陷。然而,这些药物显示有限的效力并且没有停止疾病进展。

[0012] 因此,对于神经疾病的新治疗方法、特别是对于靶向潜在的疾病病理学的方法存在未满足的需要。

[0013] 本文中引用的全部参考文献,包括专利申请和出版物,通过引用整体并入本文。

[0014] 概述

[0015] 本文中描述的是治疗神经疾病的方法,所述方法满足了对于新治疗方法的需要。

[0016] 因此,一个方面包括治疗个体中神经疾病的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体。在一些实施方案中,所述个体具有神经疾病或者已经被诊断患有神经疾病。在一些实施方案中,在所述个体的脑中小胶质细胞的密度是降低的。在一些实施方案中,在所述个体的脑中靠近淀粉状蛋白斑块的树突棘的密度是增加的。

[0017] 另一个方面包括治疗展现神经疾病的一个或多个症状的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体。在一些实施方案中,所述一个或多个症状选自由以下组成的组:记忆丧失,混乱,定向力障碍,情绪改变和行为改变。在一些实施方案中,在施用有效量的抗IL-34抗体后所述一个或多个症状得到改善。在一些实施方案中,使用简易精神状态检查(Mini-Mental State Examination)测量所述一个或多个症状。

[0018] 另一个方面还包括降低个体的脑中小胶质细胞的密度的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体。在一些实施方案中,在脑中小胶质细胞的密度降低至少30%,至少40%,至少50%,至少60%,至少70%,或至少80%。

[0019] 在一些实施方案中,抗IL-34抗体是与人IL-34结合的分离抗体,所述抗体与这样的表位结合:所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106、Asn150、Leu127、Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44、Glu121、Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Trp116和Asn61中的至少一个,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置,并且其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

[0020] 在一些实施方案中,抗IL-34抗体是与人IL-34结合的分离抗体,所述抗体与这样的表位结合:所述表位包含人IL-34的从Glu103至Asn150的氨基酸残基中的至少一个,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1,并且其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

[0021] 在一些实施方案中,抗体与这样的表位结合:所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106和Asn150中的至少一个,其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中,表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Ser100、Glu123、

Trp116、Thr124、Leu127、Asn128、Gln131和Thr134中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与人IL-34的位置100-108、116-134、109和150内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

[0022] 在一些实施方案中，抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44和Glu121中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Phe40、Asp43、Leu125、Gln189、Thr36和Val185中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与人IL-34的位置36-44、121-128和184-187内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

[0023] 在一些实施方案中，抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的从Glu103-Leu127氨基酸残基中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与这样的表位结合：所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Glu103、Leu109、Trp116和Asn61中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Pro152、Val108、Leu110、Gln106、Glu123、Leu127、Lys117、Ile60和Lys55中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。在一些实施方案中，抗体与人IL-34的位置55-61、100-108、109、111-127和152内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:1中的位置。

[0024] 在一些实施方案中，抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:4的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中，抗体包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2。在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0025] 在一些实施方案中，抗体与IL-34的二聚体结合。在一些实施方案中，抗体与跨越人IL-34二聚体的两个原体的表位结合。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是与人IL-34结合的分离抗体，其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合，并且其中所述抗体与IL-34的二聚体结合。

[0026] 在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDVPYT(SEQ ID NO:47)或QQSRTARPT(SEQ ID NO:41)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2。在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含

氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)的HVR-H3。在一些实施方案中,抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDVPYT(SEQ ID NO:47)或QQSRTARPT(SEQ ID NO:41)或QQSFYFPN(SEQ ID NO:38)或QQSYTTPP(SEQ ID NO:42)或QQYTALPY(SEQ ID NO:48)或QQYSDLPY(SEQ ID NO:44)或QQYSDVPY(SEQ ID NO:46)或QQSRTARP(SEQ ID NO:40)的HVR-L3。

[0027] 在一些实施方案中,抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3;(b)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3;和(c)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2。在一些实施方案中,抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中,抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

[0028] 在一些实施方案中,抗体包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:6的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:6的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:8的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEO ID NO:10的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中,抗体包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:14的氨基酸序列的轻链可变区序列。

[0029] 在一些实施方案中,抗体与跨越人IL-34二聚体的两个原体的表位结合。在一些实施方案中,抗体中和IL-34活性。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是与人IL-34结合的分离抗体,其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合,并且其中所述抗体中和IL-34活性。

[0030] 在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列SRGAYRFAY(SEQID NO:56)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG(SEQ ID NO:54)的HVR-H2。在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列SNYIH(SEQ ID NO:55)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG(SEQ ID NO:54)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列SRGAYRFAY(SEQ ID NO:56)的HVR-H3。在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3。在一些实施方案中，抗体包含与SEQ ID NO:15的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的重链可变区序列和/或与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少90％序列同一性的轻链可变区序列。在一些实施方案中，抗体包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区序列和/或SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区序列。在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，抗体不抑制人CSF-1和人CSF-1R之间的结合。

[0031] 在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，抗体是单克隆抗体。在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中，双特异性抗体包含针对人CSF-1的第二结合特异性。在一些实施方案中，双特异性抗体抑制人CSF-1与人CSF-1R的结合。

[0032] 在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，抗IL-34抗体是结合人IL-34的抗体片段。在一些实施方案中，片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2、Fv或scFv片段。

[0033] 在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，抗体是单臂抗体。在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，抗体是线性抗体。在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，抗IL-34抗体是全长IgG1或IgG4抗体。

[0034] 在可以与任何前述实施方案组合的一些实施方案中，所述方法进一步包含向个体施用有效量的CSF-1R抑制剂。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是小分子抑制剂。在一些实施方案中，所述小分子抑制剂是GW2580。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是抗CSF-1R抗体。

[0035] 在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体是与人CSF-1R结合的分离抗体，所述抗体与这样的表位结合：所述表位包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置，并且其中所述抗体抑制人IL-34和人CSF-1R之间的结合。

[0036] 在一些实施方案中，抗体与包含CSF-1R的氨基酸残基Arg144的表位结合，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中，表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg142、Arg146和Arg150中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中，表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Ser172和Arg192中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中，表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg146、Met149、Arg150、Phe169、Ile170和Gln173中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中，抗体与位置142-150和169-173内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

[0037] 在一些实施方案中，抗体与这样的表位结合：所述表位包含人CSF-1R的氨基酸残基Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254中的至少一个，其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中，表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Tyr257，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中，表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Pro247、Gln258和Lys259中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中，表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Val231、Asp251和Tyr257中的至少一个，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。在一些实施方案中，抗体与位置231、248-252和254内的氨基酸结合，并且其中氨基酸残基的位置基于SEQ ID NO:2中的位置。

[0038] 在可以与前述实施方案组合的一些实施方案中，所述方法进一步包含向个体施用有效量的抗CSF-1抗体。在一些实施方案中，抗CSF-1抗体抑制人CSF-1与人CSF-1R的结合。

[0039] 在可以与前述实施方案组合的一些实施方案中，个体是人。

[0040] 在可与前述实施方式组合的一些实施方式中，神经疾病选自由以下组成的组：阿尔茨海默病，帕金森病，亨廷顿病，肌萎缩性侧索硬化，神经性疼痛，朊病毒病，脊髓小脑性共济失调，脊髓性肌萎缩，自闭症和自闭症谱系障碍。在一些实施方案中，神经疾病是阿尔茨海默病。在可以与前述实施方案组合的一些实施方案中，神经疾病的特征在于神经炎症和小胶质细胞增生。

[0041] 另一个方面包括包含药物组合物的试剂盒，所述药物组合物包含抗IL-34抗体和药用载体。在一些实施方案中，药物组合物进一步包含CSF-1R抑制剂。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是小分子抑制剂。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中，试剂盒进一步包含向个体施用有效量的药物组合物以治疗神经疾病的说明书。在一些实施方式中，神经疾病选自由以下组成的组：阿尔茨海默病，帕金森病，亨廷顿病，肌萎缩性侧索硬化，神经性疼痛，朊病毒病，脊髓小脑性共济失调，脊髓性肌萎缩，自闭症和自闭症谱系障碍。在一些实施方案中，神经疾病是阿尔茨海默病。在一些实施方案中，神经疾病是神经性疼痛。在一些实施方案中，神经疾病是肌萎缩性侧索硬化。

[0042] 应该理解，本文所述的各种实施方案中的一个、一些或全部特征可以组合以形成本发明的其它实施方案。本发明的这些方面和其他方面将对于本领域技术人员变得显而易见。

[0043] 附图简述

[0044] 图1显示抗IL-34Abs YW404.1、YW404.6、YW405.3、YW404.33、YW404.33.10、YW404.33.12、YW404.33.11、YW404.33.56和YW404.33.93的可变重链序列(图1A)和可变轻链序列(图1B)。对于这些抗体的亲和力成熟所靶向的氨基酸残基由框包围。图1A显示404.1(SEQ ID NO:15)，404.6(SEQ ID NO:68)，405.3(SEQ ID NO:25)，404.33(SEQ ID NO:5)，404.33.10(SEQ ID NO:7)，404.33.12(SEQ ID NO:11)，404.33.11(SEQ IDNO:9)，404.33.56(SEQ ID NO:3)和404.33.93(SEQ ID NO:13)的VH氨基酸序列。CDR-H1(SEQ ID NO:55)，CDR-H2(SEQ ID NO:54)和CDR-H3(SEQID NO:56)适用于404.1，根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:70)，CDR-H2(SEQ ID NO:71)和CDR-H3(SEQ ID NO:72)适用于404.6，根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:73)，CDR-H2(SEQ ID NO:74)和CDR-H3(SEQ ID NO:75)适用于405.3，根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:59)，CDR-H2(SEQ ID NO:51)和CDR-H3(SEQ

ID NO:33)适用于404.33,根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:59),CDR-H2(SEQ ID NO:51)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33.10,根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:59),CDR-H2(SEQ ID NO:51)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33.12,根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:59),CDR-H2(SEQ ID NO:51)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33.11,根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:59),CDR-H2(SEQ ID NO:52)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33.56,根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:59),CDR-H2(SEQ ID NO:51)和CDR-H3(SEQ ID NO:32)适用于404.33.93,根据Kabat编号。CDR-H1(SEQ ID NO:31),CDR-H2(SEQ ID NO:35)和CDR-H3(SEQ ID NO:56)适用于404.1,根据Chothia编号。CDR-H3(SEQ ID NO:81)适用于404.6,根据Chothia编号。CDR-H3(SEQ ID NO:84)适用于405.3,根据Chothia编号。CDR-H1(SEQ ID NO:30),CDR-H2(SEQ ID NO:36)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33,根据Chothia编号。CDR-H1(SEQ ID NO:30),CDR-H2(SEQ ID NO:36)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33.10,根据Chothia编号。CDR-H1(SEQ ID NO:30),CDR-H2(SEQ ID NO:36)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33.12,根据Chothia编号。CDR-H1(SEQ ID NO:30),CDR-H2(SEQ ID NO:36)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33.11,根据Chothia编号。CDR-H1(SEQ ID NO:30),CDR-H2(SEQ ID NO:37)和CDR-H3(SEQ ID NO:33)适用于404.33.56,根据Chothia编号。CDR-H1(SEQ ID NO:30),CDR-H2(SEQ ID NO:36)和CDR-H3(SEQ ID NO:32)适用于404.33.93,根据Chothia编号。CDR-H1(SEQ ID NO:60),CDR-H2(SEQ ID NO:63)和CDR-H3(SEQ ID NO:29)适用于404.1,根据Contact编号。CDR-H1(SEQ ID NO:57),CDR-H2(SEQ ID NO:61)和CDR-H3(SEQ ID NO:28)适用于404.33,根据Contact编号。CDR-H1(SEQ ID NO:57),CDR-H2(SEQ ID NO:61)和CDR-H3(SEQ ID NO:28)适用于404.33.10,根据Contact编号。CDR-H1(SEQ ID NO:57),CDR-H2(SEQ ID NO:61)和CDR-H3(SEQ ID NO:28)适用于404.33.12,根据Contact编号。CDR-H1(SEQ ID NO:57),CDR-H2(SEQ ID NO:61)和CDR-H3(SEQ ID NO:28)适用于404.33.11,根据Contact编号。CDR-H1(SEQ ID NO:57),CDR-H2(SEQ ID NO:62)和CDR-H3(SEQ ID NO:28)适用于404.33.56,根据Contact编号。CDR-H1(SEQ ID NO:57),CDR-H2(SEQ ID NO:61)和CDR-H3(SEQ ID NO:27)适用于404.33.93,根据Contact编号。图1B显示404.1(SEQ ID NO:16),404.6(SEQ ID NO:69),405.3(SEQ ID NO:26),404.33(SEQ ID NO:6),404.33.10(SEQ ID NO:8),404.33.12(SEQ ID NO:12),404.33.11(SEQ ID NO:10),404.33.56(SEQ ID NO:4)和404.33.93(SEQ ID NO:14)的VL氨基酸序列。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:43)适用于404.1,根据Kabat编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:43)适用于404.6,根据Kabat编号。CDR-L1(SEQ ID NO:76),CDR-L2(SEQ ID NO:77)和CDR-L3(SEQ ID NO:78)适用于405.3,根据Kabat编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:43)适用于404.33,根据Kabat编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:49)适用于404.33.10,根据Kabat编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:45)适用于404.33.12,根据Kabat编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:47)适用于404.33.11,根据Kabat编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:39)适用于404.33.56,根据Kabat编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:41)适用于404.33.93,根据Kabat编

号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:43)适用于404,1,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:43)适用于404.6,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:85),CDR-L2(SEQ ID NO:86)和CDR-L3(SEQ ID NO:87)适用于405.3,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:43)适用于404.33,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:49)适用于404.33.10,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:45)适用于404.33.12,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQID NO:47)适用于404.33.11,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:39)适用于404.33.56,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:50),CDR-L2(SEQ ID NO:53)和CDR-L3(SEQ ID NO:41)适用于404.33.93,根据Chothia编号。CDR-L1(SEQ ID NO:58),CDR-L2(SEQ ID NO:34)和CDR-L3(SEQ ID NO:42)适用于404.1,根据Contact编号。CDR-L1(SEQ ID NO:58),CDR-L2(SEQ ID NO:34)和CDR-L3(SEQ ID NO:42)适用于404.6,根据Contact编号。CDR-L1(SEQ ID NO:58),CDR-L2(SEQ ID NO:34)和CDR-L3(SEQ ID NO:42)适用于404.33,根据Contact编号。CDR-L1(SEQ ID NO:58),CDR-L2(SEQ ID NO:34)和CDR-L3(SEQ ID NO:48)适用于404.33.10,根据Contact编号。CDR-L1(SEQ ID NO:58),CDR-L2(SEQ ID NO:34)和CDR-L3(SEQ ID NO:44)适用于404.33.12,根据Contact编号。CDR-L1(SEQ ID NO:58),CDR-L2(SEQ ID NO:34)和CDR-L3(SEQ ID NO:46)适用于404.33.11,根据Contact编号。CDR-L1(SEQ ID NO:58),CDR-L2(SEQ ID NO:34)和CDR-L3(SEQ ID NO:38)适用于404.33.56,根据Contact编号。CDR-L1(SEQ ID NO:58),CDR-L2(SEQ ID NO:34)和CDR-L3(SEQ ID NO:40)适用于404.33.93,根据Contact编号。Kabat HVRs之间的重链框架区序列是图1A中显示的FR1序列(SEQ ID NO:17)、FR2序列(SEQ ID NO:18)、FR3(SEQ ID NO:19)和FR4(SEQ ID NO:20)。Kabat HVRs之间的轻链框架区序列是图1B中显示的FR1序列(SEQ ID NO:21)、FR2序列(SEQ ID NO:22)、FR3序列(SEQ ID NO:23)和FR4序列(SEQ ID NO:24)。图1中描述的抗IL-34Abs YW404.1、YW404.6、YW405.3、YW404.33、YW404.33.10、YW404.33.12、YW404.33.11、YW404.33.56和YW404.33.93在PCT/US13/24998(公开号WO/2013/119716)中描述。

[0045] 图2显示在用抗IL-34抗体、抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者抗-gp120对照抗体治疗后,CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞的代表性图像。

[0046] 图3显示在用抗IL-34抗体、抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者抗-gp120对照抗体治疗后,CX3CR1-GFP小鼠中的小胶质细胞密度(图3A)、平均体细胞大小(图3B)、细胞周长(图3C)和平均小胶质细胞大小(图3D)。

[0047] 图4显示在用抗IL-34抗体(腹膜内)加小分子抑制剂GW2580(口服)或者抗-gp120对照抗体(腹膜内)加赋形剂(甲基纤维素吐温-80(MCT))(口服)治疗后,CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞的代表性图像。

[0048] 图5显示在用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者抗-gp120对照抗体(腹膜内)加MCT(口服)治疗后,CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞密度。

[0049] 图6显示在用抗IL-34抗体、抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者抗-gp120对照抗体治疗后,CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞中的Iba1免疫组织化学(图6A)和Iba1阳性细

胞计数(图6B)。Iba1阳性细胞计数证实了抗IL-34抗体以及抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580有效地消除了小胶质细胞并且不会简单地引起CX3CR1-GFP表达的丧失。

[0050] 图7显示在抗IL-34抗体或者抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580治疗后没有观察到Iba1表达的改变,这表明小胶质细胞消除不导致剩余小胶质细胞的活化。

[0051] 图8显示在用抗IL-34抗体、抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者抗-gp120对照抗体治疗后,CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞中的GFAP免疫组织化学(图8A)和GFAP阳性细胞计数(图8B)。尽管在抗IL-34抗体或者抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580治疗后小胶质细胞的显著数量减少,但是GFAP的免疫组织化学显示星形胶质细胞细胞没有变化,这表明小胶质细胞消除不引起星形胶质细胞应答。

[0052] 图9显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者抗-gp120对照抗体治疗后,CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞的代表性图像。

[0053] 图10显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者抗-gp120对照抗体治疗后,CX3CR1-GFP小鼠中的小胶质细胞密度(图10A)、平均体细胞大小(图10B)、细胞周长(图10C)和平均小胶质细胞大小(图10D)。

[0054] 图11显示在用磨碎成食物的化合物X或者对照食物治疗后,来自CX3CR1-GFP小鼠的皮层灰质中的小胶质细胞的代表性图像。

[0055] 图12显示在用磨碎成食物的化合物X或者对照食物治疗后,来自CX3CR1-GFP小鼠的皮层灰质中的小胶质细胞密度。

[0056] 图13显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体或者抗-gp120对照抗体治疗后,来自CX3CR1-GFP小鼠的皮层灰质中的小胶质细胞的代表性图像。

[0057] 图14显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体或者抗-gp120对照抗体治疗后,来自CX3CR1-GFP小鼠的皮层灰质中的小胶质细胞密度。

[0058] 图15显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体或者抗-gp120对照抗体治疗后,来自CX3CR1-GFP小鼠的胼胝体的白质中的小胶质细胞的代表性图像。*$p<0.05$。

[0059] 图16显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体或者抗-gp120对照抗体治疗后,来自CX3CR1-GFP小鼠的胼胝体的白质中的小胶质细胞密度。*$p<0.05$,**$p<0.00005$。

[0060] 图17显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体或者抗-gp120对照抗体治疗后,来自CX3CR1-GFP小鼠的海马伞的白质中的小胶质细胞的代表性图像。

[0061] 图18显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体或者抗-gp120对照抗体治疗后,来自CX3CR1-GFP小鼠的海马伞的白质中的小胶质细胞密度。*$p<0.05$。

[0062] 图19显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体或者抗-gp120对照抗体治疗后,CX3CR1-GFP小鼠的海马中的小胶质细胞的代表性图像。

[0063] 图20显示在用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体或者抗-

gp120对照抗体治疗后，CX3CR1-GFP小鼠的海马中的小胶质细胞标记区域的百分比。*p＜0.05。

[0064] 图21显示在PS2APP阿尔茨海默病小鼠模型中斑块和小胶质细胞的相关性。图21A显示13-32周龄的PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中致密核心淀粉状蛋白斑块、血管和小胶质细胞的代表性图像。图21B显示18-52周龄的PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中斑块相关小胶质细胞的小胶质细胞密度。图21C显示12-52周龄的PS2APP$^{+/+}$和PS2APP$^{-/-}$小鼠中的总小胶质细胞。图21D显示12-52周龄的PS2APP$^{+/+}$和PS2APP$^{-/-}$小鼠中的小胶质细胞增生。

[0065] 图22显示在PS2APP阿尔茨海默病小鼠模型中斑块和神经元/突触的相关性。图22A显示13-32周龄的PS2APP$^{+/+}$GFP-M小鼠中致密核心淀粉状蛋白斑块、血管和神经元/突触的代表性图像。图22B显示在13-100周龄的PS2APP$^{+/+}$和PS2APP-$^{/-}$小鼠中靠近斑块的树突棘密度(在具有斑块的视野内树突片段上的棘密度)和远离斑块的树突棘密度(在距离最近斑块至少100微米的树突片段上的棘密度)。图22C显示12-100周龄的PS2APP$^{+/+}$小鼠中的斑块密度和预测的相对突触密度。

[0066] 图23显示在PS2APP阿尔茨海默病小鼠模型中消除小胶质细胞的治疗方案和结果。图23A显示用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗的PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠的治疗方案的时间表。图23B显示用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗四周的PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞的代表性图像。图23C显示使用指定治疗方案用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗的PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞密度。图23D显示在用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗后，PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中小胶质细胞、斑块和神经元的代表性图像。用甲氧-X04标记斑块，并且通过E16处表达ds-red的质粒的子宫内电穿孔标记神经元以标记驱体感觉皮层2/3层锥体神经元。图23E显示在使用指定治疗方案用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580(消除)或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗后，PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中棘密度比率。*p＜0.05，**p＜0.001。

[0067] 图24显示用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580(消除)或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗的PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中斑块密度的图像和定量。

[0068] 图25显示用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580(消除)或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗的小鼠中斑块密度的图像和定量。

[0069] 图26显示用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580(消除的)或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗的小鼠中，GFAP(星形胶质细胞的标志物)的免疫组织化学。

[0070] 图27显示对于用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580(消除)或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗的小鼠，在测量一般运动行为的旷场任务中的水平活动。

[0071] 图28显示了Iba1的免疫组织化学并且证实了在用抗IL-34抗体加小分子抑制剂GW2580(消除的)或者赋形剂对照(抗-gp120对照抗体加MCT赋形剂)治疗的小鼠中通过GFP阳性细胞计数(*p＝0.005)观察到的小胶质细胞消除。

[0072] 发明实施方案的具体描述

[0073] I.定义

[0074] 术语“抗IL-34抗体”和“与IL-34结合的抗体”是指这样的抗体:所述抗体能够以足够的亲和力结合IL-34从而该抗体可用作靶向IL-34的诊断剂和/或治疗剂。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与不相关的非IL-34蛋白质结合的程度小于该抗体与IL-34结合的约10%,如例如通过BIACORE测定或BLI测定所测量。在一些实施方案中,与IL-34结合的抗体具有≤1μM、≤500nM、≤250nM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更小,例如从10^{-8}M至10^{-13}M,例如从10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与来自不同物种的IL-34之间保守的IL-34表位结合。

[0075] 除非另外说明,如本文所用,术语“IL-34”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然IL-34,所述脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。所述术语涵盖“全长”、未加工的IL-34以及由细胞中加工而产生的任何形式的IL-34。所述术语还涵盖IL-34的天然存在变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性人IL-34的氨基酸序列在SEQ ID NO:1中显示。在一些实施方案中,人IL-34包含SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列,其中第81位置处的氨基酸Q缺失。

[0076]

1 MPRGFTWLRY LGIFLGVALG NEPLEMWPLT QNEECTVTGF LRDKLQYRSR LQYMKHYFPI

61 NYKISVPYEG VFRIANVTRL QRAQVSEREL RYLWVLVSLS ATESVQDVLL EGHPSWKYLQ

121 EVETLLLNVQ QGLTDVEVSP KVESVLSLLN APGPNLKLVR PKALLDNCFR VMELLYCSCC

181 KQSSVLNWQD CEVPSPQSCS PEPSLQYAAT QLYPPPPWSP SSPPHSTGSV RPVRAQGEGL

241 LP (SEQ ID NO:1)。

[0077] 术语“抗CSF-1抗体”和“与CSF-1结合的抗体”是指这样的抗体:所述抗体能够以足够的亲和力结合CSF-1从而该抗体可用作靶向CSF-1的诊断剂和/或治疗剂。在一些实施方案中,抗CSF-1抗体与不相关的非CSF-1蛋白质结合的程度小于该抗体与CSF-1结合的约10%,如例如通过BIACORE测定或BLI测定所测量。在一些实施方案中,与CSF-1结合的抗体具有≤1μM、≤500nM、≤250nM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更小,例如从10^{-8}M至10^{-13}M,例如从10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。在一些实施方案中,抗CSF-1抗体与来自不同物种的CSF-1之间保守的CSF-1表位结合。

[0078] 除非另外说明,如本文所用,术语“CSF-1”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然CSF-1,所述脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类(例如,人类)和啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。所述术语涵盖“全长”、未加工的CSF-1以及由细胞中加工而产生的任何形式的CSF-1。所述术语还涵盖CSF-1的天然存在变体,例如剪接变体或等位基因变体。示例性人CSF-1在Takahashi等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.161(2),892-901(1989)中描述。

[0079] 术语“抗CSF-1R抗体”和“与CSF-1R结合的抗体”是指这样的抗体:所述抗体能够以足够的亲和力结合CSF-1R从而该抗体可用作靶向CSF-1R的诊断剂和/或治疗剂。在一些实施方案中,抗CSF-1R抗体与不相关的非CSF-1R蛋白质结合的程度小于该抗体与CSF-1R结合的约10%,如例如通过BIACORE测定或BLI测定所测量。在一些实施方案中,与CSF-1R结合的抗体具有≤1μM、≤500nM、≤250nM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更小,例如从10^{-8}M至10^{-13}M,例如从10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。在

一些实施方案中，抗CSF-1R抗体与来自不同物种的IL-34之间保守的CSF-1R表位结合。

[0080] 除非另外说明，如本文所用，术语“CSF-1R”或“CSF1R”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然CSF-1R，所述脊椎动物来源包括哺乳动物诸如灵长类(例如，人类)和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。所述术语涵盖“全长”、未加工的CSF-1R以及由细胞中加工而产生的任何形式的CSF-1R。所述术语还涵盖CSF-1R的天然存在变体，例如剪接变体或等位基因变体。示例性人CSF-1R的氨基酸序列在SEQ ID NO:2中显示。

[0081]

mgpgvlllll vatawhgqgi pviepsvpel vvkpgatvtl rcvgngsvew dgppsphwtl ysdgsssils tnnatfqntg

tyrctepgdp lggsaaihly vkdparpwnv laqevvvfed qdallpcllt dpvleagvsl vrvrgrplmr htnysfspwh

gftihrakfi qsqdyqcsal mggrkvmsis irlkvqkvip gppaltlvpa elvrirgeaa qivcsassvd vnfdvflqhn

ntklaipqqs dfhnnryqkv ltlnldqvdf qhagnyscva snvqgkhsts mffrvvesay

lnlsseqnli qevtvgegln lkvmveaypg lqgfnwtylg pfsdhqpepk lanattkdty rhtftlslpr lkpseagrys

flarnpggwr altfeltlry ppevsviwtf ingsgtllca asgypqpnvt wlqcsghtdr cdeaqvlqvw ddpypevlsq

epfhkvtvqs lltvetlehn qtyecrahns vgsgswafip isagahthpp deflftpvvv acmsimalll lllllllyky

kqkpkyqvrw kiiesyegns ytfidptqlp ynekwefprn nlqfgktlga gafgkvveat

afglgkedav lkvavkmlks tahadekeal mselkimshl gqhenivnll gacthggpvl viteyccygd llnflrrkae

amlgpslspg qdpeggvdyk nihlekkyvr rdsgfssqgv dtyvemrpvs tssndsfseq dldkedgrpl elrdllhfss

qvaqgmafla skncihrdva arnvlltngh vakigdfgla rdimndsnyi vkgnarlpvk wmapesifdc vytvqsdvws

ygillweifs lglnpypgil vnskfyklvk dgyqmaqpaf apkniysimq acwalepthr

ptfqqicsfl qeqaqedrre rdytnlpsss rsggsgssss eleeessseh ltcceqgdia

QPLLQPNNYQ FC (SEQ ID NO:2)。

[0082] 根据本发明的治疗剂包括可以与上文中鉴定的靶标结合的药剂，诸如可以与蛋白质或核酸分子结合的多肽(例如，抗体、免疫粘附素(immunoadhesin)或肽体(peptibody))、适配体或小分子，其中所述蛋白质或核酸分子可以与编码本文中鉴定的靶标的核酸分子(即，siRNA)结合。

[0083] 术语“CSF1-R途径抑制剂”是指抑制CSF1-R信号传导的治疗剂。在一个实施方案中，CSF1-R途径抑制剂与CSF-1、IL-34、CSF1-R或CSF-1和IL-34结合。在一个实施方案中，结合CSF-1、IL-34或CSF-1和IL-34的药剂抑制这种蛋白质与CSF1-R的结合。在另一个实施方案中，与CSF1-R结合的药剂抑制CSF1-R与IL-34和CSF-1的结合。在一个实施方案中，CSF1-R的激酶活性降低表示CSF-1R信号传导减少。在一个实施方案中，CSF1-R途径抑制剂是本发明的抗体。在另一个实施方案中，CSF-1R途径抑制剂是CSF1-R的小分子抑制剂。在另一个实施方案中，CSF1-R途径抑制剂是与Fc融合的CSF1-R胞外结构域。

[0084] 术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖各种抗体结构，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和抗体片段，只要它们显示所需的抗原结合活性即可。

[0085] 术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体结合至抗原的抗体重链或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别是VH和VL)通常具有相似的结构,各结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如Kindt等人,Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman and Co.,page 91(2007))。单个VH结构域或VL结构域可以足以赋予抗原结合特异性。另外,结合特定抗原的抗体可以使用来自结合该抗原的抗体的VH或VL结构域进行分离以分别筛选互补VL结构域或VH结构域的文库。参见,例如Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0086] 如本文所用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域中序列上高度可变和/或形成结构确定的环(“高变环”)的各区域。通常,天然的4-链抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3)和三个在VL中(L1、L2、L3)。HVR通常包含来自高变环和/或来自“互补决定区”(CDR)的氨基酸残基,后者具有最高序列可变性和/或参与抗原识别。如本文所用的HVR可以包含位于位置24-36(对于L1)、46-56(对于L2)、89-97(对于L3)、26-35B(对于H1)、47-65(对于H2)和93-102(对于H3)内的残基。例如,HVR可以包含在先前描述的位置中的残基:

[0087] A)24-34(L1),50-56(L2),89-97(L3),26-32(H1),52-56(H2),和95-102(H3)(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987);

[0088] B)L1的24-34,L2的50-56,L3的89-97,H1的31-35B,H2的50-65,H3的95-102(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991);和

[0089] C)30-36(L1),46-55(L2),89-96(L3),30-35(H1),47-58(H2),93-101(H3)(MacCallum等人J.Mol.Biol.262:732-745(1996)。

[0090] 除非另外说明,否则HVR残基和可变结构域中的其它残基(例如,FR残基)在本文中根据上文Kabat等人编号。

[0091] 除非另外说明,否则HVR残基和可变结构域中的其它残基(例如,FR残基)在本文中根据上文Kabat等人编号。

[0092] 除了VH中的CDR1以外,CDR通常包含形成高变环的氨基酸残基。CDR还包含“特异性决定残基”或“SDR”,其是接触抗原的残基。SDR被包含在CDR的被称为简短CDR(abbreviated-CDR)或a-CDR的区域内。示例性a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2和a-CDR-H3)出现于L1的氨基酸残基31-34处、L2的氨基酸残基50-55处、L3的氨基酸残基89-96处、H1的氨基酸残基31-35B处、H2的氨基酸残基50-58处和H3的氨基酸残基95-102处。(参见Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008))。除非另外说明,否则HVR残基和可变结构域中的其它残基(例如,FR残基)在本文中根据上文Kabat等人编号。

[0093] “框架”或“FR”是指不同于高变区(HVR)残基的可变结构域残基。可变结构域的FR通常由以下4个FR结构域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR序列和FR序列通常按照以下序列出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0094] “人共有框架”是这样的框架,其代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常出现的氨基酸残基。通常,人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选项来自可变结构域序列的亚组。通常,序列亚组是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological

Interest,Fifth Edition,NIH Publication 91-3242,Bethesda MD(1991),vols.1-3中的亚组。在一些实施方案中,对于VL,所述亚组是如上文Kabat等人中的亚组κI。在一些实施方案中,对于VH,所述亚组是如上文Kabat等人中的亚组III。

[0095] 出于本文目的,“受体人框架”是这样的框架,其包含如下文定义的来源于人免疫球蛋白框架或人共有序列框架的轻链可变结构域(VL)框架或重链可变结构域(VH)框架的氨基酸序列。“来源于”人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或它可以含有氨基酸序列改变。在一些实施方案中,氨基酸改变的数目是10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小、或者2或更小。在一些实施方案中,VL受体人框架在序列上与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列相同。

[0096] 抗体的“类别”是指由其重链拥有的恒定结构域或恒定区的类型。存在抗体的5种主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些类别中的几种可以进一步划分成亚类(同种型),例如IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4、IgA_1和IgA_2。对应不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称作α、δ、ε、γ和μ。

[0097] 术语“Fc区”在本文中用来限定含有至少一部分恒定区的免疫球蛋白重链的C端区域。所述术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一些实施方案中,人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可以存在或可以不存在。除非本文中另外说明,否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述的EU编号体系,也称作EU索引(index)。

[0098] “天然抗体”是指具有变化的结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白,由二硫键结合的两条相同轻链和两条相同重链组成。从N端至C端,每条重链具有可变区(VH),也称作可变重链结构域或重链可变结构域,随后是三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3)。类似地,从N端至C端,每条轻链具有可变区(VL),也称作可变轻链结构域或轻链可变结构域,随后是恒定轻链(CL)结构域。抗体的轻链可以基于其恒定结构域的氨基酸序列而分配为两种类型(称作κ和λ)之一。

[0099] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体的群体中获得的抗体,即,构成该群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位,除了例如含有天然存在突变的或在产生单克隆抗体制备物期间出现的可能变体抗体,这类变体通常以微量存在。与典型地包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,修饰语“单克隆”表示如从基本上同质的抗体群体获得的抗体的特征,并且不解释为需要通过任何特殊方法产生该抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术产生,包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,用于制造单克隆抗体的这类方法和其它示例性方法在本文中描述。

[0100] 术语“嵌合”抗体是指这样的抗体,其中重链和/或轻链的一部分来源于特定的来源或物种,而重链和/或轻链的剩余部分来源于不同的来源或物种。

[0101] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在一些实施方案中,人源化抗体将基本包含至少1个、并且典型2个可变结构域的全

部，其中全部或基本上全部的HVR(例如CDR)与非人抗体的那些HVR对应，并且全部或基本上全部的FR与人抗体的那些FR对应。人源化抗体任选地可以包含来源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如，非人抗体)的“人源化形式”是指已经历人源化的抗体。

[0102] “人抗体”是这样的一种抗体，其拥有对应于人或人细胞产生的抗体的氨基酸序列或者拥有对应于来源于利用人抗体库或其它编码人抗体的序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。人抗体的这种定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0103] “抗体片段”是指不同于完整抗体的包含完整抗体的一部分的分子，所述部分结合与完整抗体结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、F(ab’)$_2$；双抗体(diabody)；线性抗体；单链抗体分子(例如scFv)；和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0104] 术语“全长抗体”、“完整抗体(intact antibody)”和“全抗体(whole antibody)”在本文中可互换地用来指这样的抗体，所述抗体具有基本上与天然抗体结构相似的结构或具有含有如本文定义的Fc区的重链。

[0105] “分离的”抗体是已经与其自然环境的组分分离的一种抗体。在一些实施方案中，将抗体纯化至大于95％或99％纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如，离子交换或反相HPLC)所确定的。关于评价抗体纯度的方法的综述，参见例如，Flatman等人，J.Chromatogr.B 848:79-87(2007)。

[0106] “亲和力成熟的”抗体是指与不拥有这类改变的亲本抗体相比，在一个或多个高变区(HVR)中具有一个或多个改变的抗体，这类改变导致抗体对抗原的亲和力改善。

[0107] “亲和力”是指分子(例如，抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如，抗原)之间总计非共价相互作用的强度。除非另外指出，否则如本文所用，“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如，抗体和抗原)之间1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力可以通常由解离常数(Kd)代表。亲和力可以通过本领域已知的常见方法测量，包括本文所述的那些方法。在下文中描述用于测量结合亲和力的具体示意性和示例性实施方案。

[0108] “与参比抗体结合相同表位的抗体”是指在竞争测定中阻断参比抗体与其抗原的结合达50％或更多的抗体，并且反过来，参比抗体在竞争测定中阻断该抗体与其抗原的结合达50％或更多。示例性竞争测定在本文中提供。

[0109] “效应子功能”是指随抗体同种型变化的归因于抗体Fc区的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括：Clq结合和补体依赖性细胞毒性(CDC)；Fc受体结合作用；抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)；吞噬作用；细胞表面受体(例如，B细胞受体)的下调；和B细胞活化。

[0110] “裸抗体”是指不与异源部分(例如，细胞毒部分)或放射性标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物制剂中。

[0111] “分离的”核酸是指已经与其自然环境的组分分离的核酸分子。分离的核酸包括包含于细胞中的核酸分子，所述细胞通常含有该核酸分子，但是该核酸分子存在于染色体外或与存在于与其天然染色体位置不同的染色体位置处。

[0112] “编码抗IL-34抗体的分离核酸”是指编码抗体重链和轻链(或其片段)的一个或多个核酸分子，包括在单一载体或单独载体中的这类核酸分子和存在于宿主细胞中一个或多个位置处的这类核酸分子。

[0113] 相对于参比多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为在对序列进行比对并且在需要的情况下引入空位以实现最大百分比的序列同一性并且不考虑作为序列同一性的部分的任何保守性置换之后，候选序列中与参比多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。为了确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域能力范围内的多种方式实现，例如，使用可公开获得的计算机软件诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数，包括实现正在比较的全长序列范围内最大比对所需要的任何算法。然而，出于本文目的，使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸序列同一性%值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech，Inc.创作，并且源代码已经随用户文档提交至U.S.Copyright Office，Washington D.C.，20559(美国版权办公室华盛顿特区20559)，其中它以美国版权登记号TXU510087登记。ALIGN-2程序从Genentech，Inc.，South San Francisco(南旧金山)，California(加利福尼亚州)可公开获得或可以从源代码汇编。应当将ALIGN-2程序汇编用以在UNIX操作系统(包括数字式UNIX V4.0D)上使用。全部序列比较参数通过ALIGN-2程序设定并且不变动。

[0114] 在使用ALIGN-2进行氨基酸序列比较的情况下，如下计算给定的氨基酸序列A与、同或针对给定的氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(这可以备选地描述为给定的氨基酸序列A具有或包含与、同或针对给定的氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性)：100乘以分数X/Y，其中X是通过序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评定为相同匹配的氨基酸残基的数目，并且其中Y是B中氨基酸残基的总数。将可以理解的是，在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时，A相对于B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另外特别声明，否则本文所用的全部%氨基酸序列同一性值如紧接前段中所述的使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0115] 如本文所用，术语“载体”是指能够传播与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及并入宿主细胞(已经向所述宿主细胞中引入该载体)的基因组中的载体。某些载体能够指导与它们有效连接的核酸的表达。这种载体在本文中称作“表达载体”。

[0116] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”互换地使用并且是指已经向其中引入外源核酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，其包括原代转化的细胞和从中衍生的子代，而无论传代次数是多少。子代可以在核酸内容物方面不完全与亲本细胞相同，但是可以含有突变。本文中包括突变子代，所述突变子代具有与针对最初转化的细胞所筛选或选择的功能或生物活性相同的功能或生物活性。

[0117] 如本文所用，“治疗(treatment)”(和其语法变型诸如“治疗(treat/treating)”)是指意欲改变正在治疗的个体的天然过程的临床干预，并且可以为了预防进行或在临床病理学过程期间进行。所需的治疗效果包括，但不限于，防止疾病出现或复发，减轻症状，减小疾病的任何直接或间接病理学后果，防止转移，降低病情进展速率，改善或缓和疾病状态，以及缓解或预后改善。在一些实施方案中，本发明的抗体是用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

[0118] “个体”或“受试者”是哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物(例如，牛、羊、猫、狗和马)、灵长类(例如，人类和非人类灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。在一些实施方案中，个体或受试者是人。

[0119] 术语“药物制剂”或“药物组合物”是指这样的制备物，其处于这类形式从而允许包含于其中的活性成分的生物活性有效，并且其不含有对于将施用该制剂的受试者不可接受地有毒的额外组分。

[0120] “药用载体”是指除活性成分之外，药物制剂中对受试者无毒的成分。药用载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0121] 药剂(例如，药物制剂)的“有效量”是指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗性或预防性结果的量。

[0122] 如临床环境下理解的，治疗剂(例如，本文提供的抗体)、药物、化合物或药物组合物的有效量可以与另一种药物、化合物或药物组合物联合而实现，或者可以不与另一种药物、化合物或药物组合物联合而实现。因而，“有效量”可以在施用一种或多种治疗剂的情况下考虑，并且如果与一种或多种其它药剂联合可以实现或实现了所需结果，则单一药剂可以视为以有效量给予。

[0123] 如本文所用，“与...联合”是指施用除另一种治疗模式之外的一个治疗模式。就这一点而论，“与...联合”是指在向个体施用其它治疗模式之前、其期间或之后施用一个治疗模式。

[0124] 术语“包装插页”用来指通常包含在治疗产品的商品包装中的使用说明，其含有关于涉及此类治疗产品的使用的适应症、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0125] 如本文中所用，除非上下文另有明确指明，否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数指代。例如，对“抗体”的提及是指从一个至许多个抗体，诸如摩尔量，并且包括本领域技术人员已知的其等同物等。

[0126] 本文中对“约”某个值或参数的提及包括(并且描述)涉及该值或参数本身的实施方案。例如，提及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0127] 可以理解的是，本文所述的发明的方面和变体包括“由.....组成”和/或“基本上由.....组成”的方面和变体。

[0128] II.组合物和方法

[0129] 在一个方面，本发明提供了通过施用抗IL-34抗体来治疗个体中的神经疾病、治疗展现神经疾病的一个或多个症状的个体、或降低个体的脑中小胶质细胞的密度的方法。

[0130] A.示例性抗体和抑制剂

[0131] 抗IL-34抗体

[0132] 在一个方面，本发明提供了治疗个体中的神经疾病、治疗展现神经疾病的一个或多个症状的个体、或降低个体的脑中小胶质细胞的密度的方法，所述方法包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是与IL-34(例如，人IL-34)结合的分离抗体。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是克隆YW404.33.1。在一些实施方案中，抗IL-34抗体同种型是小鼠IgG2A。

[0133] 本文中所述的抗IL-34抗体可以具有以下特征中的一个或多个：(i)抑制IL-34(例如，人IL-34)与CSF-1R(例如，人CSF-1R)的结合；(ii)中和IL-34活性(例如，人IL-34活性)；(iii)抑制IL-34诱导的外周血单核细胞增殖；(vi)与IL-34(例如，人IL-34)的二聚体结合；(v)与跨越IL-34(例如，人IL-34)的两个原体的表位结合；(vi)不抑制CSF-1(例如，人CSF-

1)与CSF-1R(例如如,人CSF-1R)的结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与不相关的非IL-34蛋白质结合的程度小于该抗体与IL-34结合的约10%,如例如通过BIACORE测定或生物膜干涉(BLI)测定所测量。在一些实施方案中,与IL-34结合的抗体具有≤1μM、≤500nM、≤250nM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更小,例如从10^{-8}M至10^{-13}M,例如从10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有小于约500nM的Kd值。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有小于约100nM或10nM的Kd值。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有小于约1nM的Kd值。在一些实施方案中,IL-34抗体具有小于约100pM的Kd值。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有约100-200pM、约100-500pM、约100pM-1nM或约1nM-50nM的Kd。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有约17nM的Kd。在一些实施方案中,抗IL-34抗体具有约120nM的Kd。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与来自不同物种的IL-34之间保守的IL-34表位结合。

[0134] 在一个方面,本文提供与这样的表位结合的抗IL-34抗体,所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106、Asn150、Leu127、Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44、Glu121、Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Trp116和Asn61的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或十六个或十七个中的至少任一个。在一个方面,本文提供与这样的表位结合的抗IL-34抗体,所述表位包含人IL-34的从Glu103至Asn150的氨基酸残基中的至少一个。在一个方面,本文提供与这样的表位结合的抗IL-34抗体,所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106和Asn150的一个、两个或三个或四个中的至少任一个。在上述任一个方面,抗IL-34抗体可以与这样的表位结合,所述表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Ser100、Glu123、Trp116、Thr124、Leu127、Asn128、Gln131和Thr134的一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个或八个中的至少任一个。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34的位置100-108、116-134、109和150内的氨基酸结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体抑制人IL-34与人CSF-1R之间的结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体中和人IL-34活性。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34的二聚体结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与跨越人IL-34的两个原体的表位结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中,抗IL-34抗体是与人IL-34结合的抗体片段。如本文所用,本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:1中的残基位置。

[0135] 在一个方面,本文提供与这样的表位结合的抗IL-34抗体,所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Glu103、Leu109、Gln106、Asn150、Leu127、Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44、Glu121、Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Trp116和Asn61的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十一个、十二个、十三个、十四个、十五个或十六个或十七个中的至少任一个。在一个方面,本文提供与这样的表位结合的抗IL-34抗体,所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Asn128、Ser184、Leu186、Asn187、Lys44和Glu121的一个、两个、三个、四个或五个或六个中的至少任一个。在上述任一个方面,抗IL-34抗体可以与这样的表位结合,所述表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Phe40、Asp43、Leu125、Gln189、Thr36和Val185的一个、两个、三个、四个或五个或六个中的至少任一个。在一些实施方案中,抗IL-34抗体与人IL-34的位置36-44、121-128和184-187内的氨基酸结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体抑制人IL-34与人CSF-1R之间的结合。在一些实施方案中,抗IL-34抗体中

和人IL-34活性。在一些实施方案中，抗IL-34抗体与人IL-34的二聚体结合。在一些实施方案中，抗IL-34抗体与跨越人IL-34的两个原体的表位结合。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是与人IL-34结合的抗体片段。如本文所用，本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:1中的残基位置。

[0136] 在一个方面，本文提供与这样的表位结合的抗IL-34抗体，所述表位包含人IL-34的从Glu103-Leu127的氨基酸残基中的至少一个。在一个方面，本文提供与这样的表位结合的抗IL-34抗体，所述表位包含人IL-34的氨基酸残基Asp107、Glu111、Ser104、Gln120、Glu103、Leu109、Trp116和Asn61的一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个或八个中的至少任一个。在上述提供的任一个方面，抗体可以与这样的表位结合，所述表位进一步包含人IL-34的氨基酸残基Pro152、Val108、Leu110、Gln106、Glu123、Leu127、Lys117、Ile60和Lys55的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个或九个中的至少任一个。在一些实施方案中，抗体与人IL-34的位置55-61、100-108、109、111-127和152内的氨基酸结合。在一些实施方案中，抗IL-34抗体抑制人IL-34与人CSF-1R之间的结合。在一些实施方案中，抗IL-34抗体中和人IL-34活性。在一些实施方案中，抗IL-34抗体与人IL-34的二聚体结合。在一些实施方案中，抗IL-34抗体与跨越人IL-34的两个原体的表位结合。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是人抗体、人源化抗体或嵌合抗体。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是与人IL-34结合的抗体片段。如本文所用，本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:1中的残基位置。

[0137] 在一个方面，本发明提供抗IL-34抗体，所述抗IL-34抗体包含如图1A和图1B中所示的任何组合的一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个。在一些实施方案中，抗IL-34抗体包含一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个，所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2；(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(f)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。在一些实施方案中，抗IL-34抗体包含一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个，所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)或GFTFSST(SEQ ID NO:30)或SSTWIH(SEQ ID NO:57)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或PYYYY(SEQ ID NO:37)或WVARISPYYYYSD(SEQ ID NO:62)的HVR-H2；(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或ARGLGKGSKRGAMD(SEQ ID NO:28)的HVR-H3；(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)或STAVAWY(SEQ ID NO:58)的HVR-L1；(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)或LLIYSASFLY(SEQ ID NO:34)的HVR-L2；和(f)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSFYFPN(SEQ ID NO:38)的HVR-L3。

[0138] 在一些实施方案中，抗IL-34抗体包含一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个，所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2；(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:

50)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)或GFTFSST(SEQ ID NO:30)或SSTWIH(SEQ ID NO:57)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)或PYSGY(SEQ ID NO:36)或WVARISPYSGYTN(SEQ ID NO:61)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或ARGLGKGSKRGAMD(SEQ ID NO:28)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)或STAVAWAWY(SEQ ID NO:58)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)或LLIYSASFLY(SEQ ID NO:34)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDLPY(SEQ ID NO:44)的HVR-L3。

[0139] 在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR中的至少任一个,所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDVPYT(SEQ ID NO:47)或QQSRTARPT(SEQ ID NO:41)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)的HVR-H3;(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDVPYT(SEQ ID NO:47)或QQSRTARPT(SEQ ID NO:41)的HVR-L3;和(c)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,所述HVR选自(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)或GFTFSST(SEQ ID NO:30)或SSTWIH(SEQ ID NO:57)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)或RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)或PYYYY(SEQ ID NO:37)或PYSGY(SEQ ID NO:36)或WVARISPYYYYSD(SEQ ID NO:62)或WVARISPYSGYTN(SEQ ID NO:61)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)或GINQGSKRGAMDY(SEQ ID NO:32)或ARGLGKGSKRGAMD(SEQ ID NO:28)或ARGINQGSKRGAMD(SEQ ID NO:27)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)或STAVAWY(SEQ ID NO:58)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)或LLIYSASFLY(SEQ ID NO:34)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)或QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQYTALPYT(SEQ ID NO:49)或QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)或QQYSDVPYT(SEQ ID NO:47)或QQSRTARPT(SEQ ID NO:41)或QQSFYFPN(SEQ ID NO:38)或QQSYTTPP(SEQ ID NO:42)或QQYTALPY(SEQ ID NO:48)或QQYSDLPY(SEQ ID NO:44)或QQYSDVPY(SEQ ID NO:46)或QQSRTARP(SEQ ID NO:40)的HVR-L3。

[0140] 在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,所述HVR选自(a)包含氨基酸序列SNYIH(SEQ ID NO:55)的HVR-H1;(b)包含

氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG(SEQ ID NO:54)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SRGAYRFAY(SEQ ID NO:56)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列SRGAYRFAY(SEQ ID NO:56)的HVR-H3;(b)包含氨基酸序列QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3;和(c)包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG(SEQ ID NO:54)的HVR-H2。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个,所述HVR选自(a)包含氨基酸序列SNYIH(SEQ ID NO:55)或GFTFTSN(SEQ ID NO:31)或TSNYIH(SEQ ID NO:60)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列SITPASGDTDYADSVKG(SEQ ID NO:54)或PASGD(SEQ ID NO:35)或WVASITPASGDTD(SEQ ID NO:63)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列SRGAYRFAY(SEQ ID NO:56)或ARSRGAYRFA(SEQ ID NO:29)的HVR-H3;(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)或STAVAWY(SEQ ID NO:58)的HVR-L1;(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)或LLIYSASFLY(SEQ ID NO:34)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)或QQSYTTPP(SEQ ID NO:42)的HVR-L3。

[0141] 在一个方面,本发明提供包含至少一个、至少两个或全部三个VHHVR序列的抗IL-34抗体,所述VH HVR序列选自(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2;(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3,和(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3;(b)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3;和(c)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2。在一些实施方案中,抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

[0142] 在另一个方面,本发明提供包含至少一个、至少两个或全部三个VLHVR序列的抗IL-34抗体,所述VL HVR序列选自(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1;(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2;和(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0143] 在另一个方面,本发明的抗IL-34抗体包含(a)VH结构域,所述VH结构域包含至少一个、至少两个或全部三个VH HVR序列,所述VH HVR序列选自(i)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59),(ii)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2,和(iii)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3;以及(b)VL结构域,所述VL结构域包含至少一个、至少两个或全部三个VL HVR序列,所述VL HVR序列选自(i)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1,(ii)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2,和(iii)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0144] 在另一个方面，本发明提供这样的抗IL-34抗体，所述抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2；(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(f)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0145] 在一个方面，本发明提供包含至少一个、至少两个或全部三个VHHVR序列的抗IL-34抗体，所述VH HVR序列选自(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2；(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中，抗IL-34抗体包含包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。在一些实施方案中，抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3，和(b)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。在一些实施方案中，抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(b)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3；和(c)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2。在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

[0146] 在另一个方面，本发明提供包含至少一个、至少两个或全部三个VLHVR序列的抗IL-34抗体，所述VL HVR序列选自(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；(c)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。在一些实施方案中，抗体包含(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

[0147] 在另一个方面，本发明的抗IL-34抗体包含(a)VH结构域，所述VH结构域包含至少一个、至少两个或全部三个VH HVR序列，所述VH HVR序列选自(i)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)，(ii)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)，的HVR-H2，和(iii)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；以及(b)VL结构域，所述VL结构域包含至少一个、至少两个或全部三个VL HVR序列，所述VL HVR序列选自(i)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(ii)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(iii)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

[0148] 在另一个方面，本发明提供这样的抗IL-34抗体，所述抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2；(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3；(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(f)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

[0149] 在另一个方面，本发明提供这样的抗IL-34抗体，所述抗IL-34抗体包含(a)包含氨基酸序列SNWIH(SEQ ID NO:70)的HVR-H1，(b)包含氨基酸序列RISPNSGYTDYADSVKG(SEQ ID NO:71)的HVR-H2；(c)包含氨基酸序列SMRARRGFDY(SEQ ID NO:72)的HVR-H3；(d)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(e)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:

53)的HVR-L2;和(f)包含氨基酸序列QQSYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3。

[0150] 在另一个方面,本发明提供来源于本文中例举的抗IL-34抗体的抗IL-34抗体。

[0151] 在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含两种、三种、四种、五种或六种以下HVR中的任一个或任何组合:

[0152] HVR-H1:SX_1X_2IH,其中X_1是N或T,并且X_2是Y或W(SEQ ID NO:64);

[0153] HVR-H2:$X_1IX_2PX_3X_4X_5X_6X_7X_8YADSVKG$,其中$X_1$是S或R;并且$X_2$是T或S;$X_3$是A或Y;$X_4$是S或Y;$X_5$是G或Y;$X_6$是D或Y;$X_7$是T或S;并且$X_8$是D或N(SEQ ID NO:65);

[0154] HVR-H3:SRGAYRFAY(SEQ ID NO:56),或$GX_1X_2X_3GSKRGAMDY$,其中X_1是L或I;X_2是G或N;X_3是K或Q(SEQ ID NO:66);

[0155] HVR-L1:RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50);

[0156] HVR-L2:SASFLYS(SEQ ID NO:53);

[0157] HVR-L3:QQ $X_1IX_2PX_3X_4X_5X_6T$,其中X_1是S或Y;并且X_2是Y、T、S、F或R;X_3是T、A、D或Y;X_4是T、L、V、F或A;X_5是P或R;X_6是P、Y或N(SEQ ID NO:67)。

[0158] 在一些实施方案中,可以置换HVR中的一个或多个氨基酸残基。在一些实施方案中,置换是如本文中提供的保守性置换。

[0159] 在以上实施方案的任一个中,抗IL-34抗体是人源化的。在一些实施方案中,抗IL-34抗体包含如以上实施方案的任一个中的HVR,并且进一步包含受体人框架,例如,人免疫球蛋白框架或人共有框架。在另一个实施方案中,抗IL-34抗体包含如以上实施方案的任一个中的HVR,并且进一步包含VH和/或VL,所述VH包含SEQ ID NO:17的FR1序列、SEQ ID NO:18的FR2序列、SEQ ID NO:19的FR3序列、SEQ ID NO:20的FR4序列,所述VL包含SEQ ID NO:21的FR1序列、SEQ ID NO:22的FR2序列、SEQ ID NO:23的FR3序列、SEQ ID NO:24的FR4序列。

[0160] 在另一个方面,抗IL-34抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列(如图1A中所示的抗体404.33.56的VH氨基酸序列)具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或100%序列同一性中的至少任一个的重链可变结构域(VH)序列。在一些实施方案中,相对于参比序列,具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%或99%同一性中的至少任一个的VH序列含有置换(例如,保守性置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗IL-34抗体保留与IL-34结合的能力。在一些实施方案中,总计1至10个氨基酸已经在SEQ ID NO:3中置换、插入和/或缺失。在一些实施方案中,置换、插入或缺失出现在HVR外部的区域中(即,在FR中)。任选地,抗IL-34抗体包含SEQ ID NO:3中的VH序列,包括该序列的翻译后修饰。在特别的实施方案中,VH包含一个、两个或三个HVR,所述HVR选自:(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1;(b)包含氨基酸序列RISPYYYYSDYADSVKG(SEQ ID NO:52)的HVR-H2;和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

[0161] 在另一个方面,提供抗IL-34抗体,其中所述抗体包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列(如图1B中所示的抗体404.33.56的VL氨基酸序列)具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或100%序列同一性中的至少任一个的轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中,相对于参比序列,具有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%或99%同一性中的至少任一个的VL序列含有置换(例如,保守性置换)、插入或缺失,但是包含该序列的抗IL-34抗体保留与IL-34结合的能力。在一些实施方案中,总计1至10个氨

基酸已经在SEQ ID NO:4中置换、插入和/或缺失。在一些实施方案中，置换、插入或缺失出现在HVR外部的区域中(即，在FR中)。任选地，抗IL-34抗体包含SEQ ID NO:4中的VL序列，包括该序列的翻译后修饰。在特别的实施方案中，VL包含一个、两个或三个HVR，所述HVR选自：(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQSFYFPNT(SEQ ID NO:39)的HVR-L3。

[0162] 在另一个方面，抗IL-34抗体包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列(如图1A中所示的抗体404.33.12的VH氨基酸序列)具有90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或100％序列同一性中的至少任一个的重链可变结构域(VH)序列。在一些实施方案中，相对于参比序列，具有90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％或99％同一性中的至少任一个的VH序列含有置换(例如，保守性置换)、插入或缺失，但是包含该序列的抗IL-34抗体保留与IL-34结合的能力。在一些实施方案中，总计1至10个氨基酸已经在SEQ ID NO:11中置换、插入和/或缺失。在一些实施方案中，置换、插入或缺失出现在HVR外部的区域中(即，在FR中)。任选地，抗IL-34抗体包含SEQ ID NO:11中的VH序列，包括该序列的翻译后修饰。在特别的实施方案中，VH包含一个、两个或三个HVR，所述HVR选自：(a)包含氨基酸序列STWIH(SEQ ID NO:59)的HVR-H1；(b)包含氨基酸序列RISPYSGYTNYADSVKG(SEQ ID NO:51)的HVR-H2；和(c)包含氨基酸序列GLGKGSKRGAMDY(SEQ ID NO:33)的HVR-H3。

[0163] 在另一个方面，提供抗IL-34抗体，其中所述抗体包含与SEQ ID NO:12的氨基酸序列(如图1B中所示的抗体404.33.12的VL氨基酸序列)具有90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％或99％或100％序列同一性中的至少任一个的轻链可变结构域(VL)。在一些实施方案中，相对于参比序列，具有90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％或98％或99％同一性中的至少任一个的VL序列含有置换(例如，保守性置换)、插入或缺失，但是包含该序列的抗IL-34抗体保留与IL-34结合的能力。在一些实施方案中，总计1至10个氨基酸已经在SEQ ID NO:12中置换、插入和/或缺失。在一些实施方案中，置换、插入或缺失出现在HVR外部的区域中(即，在FR中)。任选地，抗IL-34抗体包含SEQ ID NO:12中的VL序列，包括该序列的翻译后修饰。在特别的实施方案中，VL包含一个、两个或三个HVR，所述HVR选自：(a)包含氨基酸序列RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:50)的HVR-L1；(b)包含氨基酸序列SASFLYS(SEQ ID NO:53)的HVR-L2；和(c)包含氨基酸序列QQYSDLPYT(SEQ ID NO:45)的HVR-L3。

[0164] 在另一个方面，本发明提供抗IL-34抗体，其中所述抗体包含如上文提供的任一个实施方案中的VH，和如上文提供的任一个实施方案中的VL。在一些实施方案中，抗体包含分别在SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中的VH和VL序列，包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中，抗体包含分别在SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中的VH和VL序列，包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中，抗体包含分别在SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中的VH和VL序列，包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中，抗体包含分别在SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中的VH和VL序列，包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中，抗体包含分别在SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中的VH和VL序列，包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中，抗体包含分别在SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14中的VH和VL序列，包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中，抗体包含分别在SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16中的VH和VL序列，包括这些序列的翻译后修饰。在一些实施方案中，抗体包含分别在SEQ ID NO:

68和SEQ ID NO:69中的VH和VL序列，包括这些序列的翻译后修饰。

[0165] 在另一个方面，本发明提供一种抗体，所述抗体与本文提供的抗IL-34抗体结合相同的表位。例如，在一些实施方案中，提供这样的抗体，所述抗体与选自以下的抗IL-34抗体结合相同的表位：包含SEQ ID NO:3的VH序列和SEQ ID NO:4的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:11的VH序列和SEQ ID NO:12的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:6的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:9的VH序列和SEQ ID NO:10的VL序列的抗IL-34抗体、包含SEQ ID NO:13的VH序列和SEQ ID NO:14的VL序列的抗IL-34抗体、或包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列的抗IL-34抗体。在一些实施方案中，抗IL-34抗体与包含SEQ ID NO:3的VH序列和SEQ ID NO:4的VL序列的抗IL-34抗体结合相同的表位。在一些实施方案中，抗IL-34抗体与包含SEQ ID NO:11的VH序列和SEQ ID NO:12的VL序列的抗IL-34抗体结合相同的表位。在一些实施方案中，该表位是构象表位。在一些实施方案中，抗IL-34抗体与包含SEQ ID NO:68的VH序列和SEQ ID NO:69的VL序列的抗IL-34抗体结合相同的表位。在一些实施方案中，该表位是构象表位。在一些实施方案中，该表位是线性表位。

[0166] 在本发明的其它方面，根据任一个以上实施方案的抗IL-34抗体是单克隆抗体，包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一些实施方案中，抗IL-34抗体是抗体片段，例如，Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或$F(ab')_2$片段。在另一个实施方案中，该抗体是全长抗体，例如，完整的IgG1或IgG4抗体或如本文定义的其它抗体类别或同种型。

[0167] 在其它方面，根据任一个以上实施方案的抗IL-34抗体可以单独地或组合地合并如下文1-7部分中所述的任一特征：

[0168] 抗CSF-1R抑制剂

[0169] 在另一个方面，本发明提供了通过向个体施用有效量的抗IL-34抗体和有效量的CSF-1R抑制剂来治疗个体中的神经疾病、治疗展现神经疾病的一个或多个症状的个体、或降低个体的脑中小胶质细胞的密度的方法。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是小分子抑制剂，包括但不限于，GW2580。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是与CSF-1R(例如，人CSF-1R)结合的分离抗体。在一些实施方案中，本文提供与这样的表位结合的抗CSF-1R抗体，所述表位包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254的一个、两个、三个、四个或五个或六个中的至少任一个。在一个方面，本文提供与包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144的表位结合的抗CSF-1R抗体。在一个方面，本文提供与这样的表位结合的抗CSF-1R抗体，所述表位包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg144、Arg142、Arg146和Arg250的一个、两个或三个或四个中的至少任一个。任一个以上方面的抗CSF-1R抗体可以与这样的表位结合，所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Ser172和Arg192中至少一个或两个。任一个以上方面的抗CSF-1R抗体可以与这样的表位结合，所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Arg146、Met149、Arg150、Phe169、Ile170和Gln173的一个、两个、三个、四个或五个或六个中的至少任一个。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体与人CSF-1R的位置142-150和169-172内的氨基酸结合。如本文所用，本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:2中的残基位置。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体抑制人IL-34和/或人CSF-1与人CSF-1R之间的结合。

[0170] 在一些实施方案中，本文提供与这样的表位结合的抗CSF-1R抗体，所述表位包含

人CSF-1R的氨基酸残基Arg144、Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn 254的一个、两个、三个、四个或五个或六个中的至少任一个。在一个方面，本文提供与这样的表位结合的抗CSF-1R抗体，所述表位包含人CSF-1R的氨基酸残基Gln248、Gln249、Ser250、Phe252和Asn254的一个、两个、三个或四个或五个中的至少任一个。在一个方面，本文提供与这样的表位结合的抗CSF-1R抗体，所述表位包含人CSF-1R的氨基酸残基Gln248、Gln249、Ser250、Phe252、Asn254和Tyr257的一个、两个、三个、四个或五个或六个中的至少任一个。任一个以上方面的抗CSF-1R抗体可以与这样的表位结合，所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Pro247、Gln258和Lys259中至少一个、至少两个或三个。任一个以上方面的抗CSF-1R抗体可以与这样的表位结合，所述表位进一步包含人CSF-1R的氨基酸残基Val231、Asp251和Tyr257中至少一个、至少两个或三个。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体与人CSF-1R的位置231、248-252和254内的氨基酸结合。如本文所用，本文中的残基位置对应于SEQ ID NO:2中的残基位置。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体抑制人IL-34和/或人CSF-1与人CSF-1R之间的结合。

[0171] 在本发明的其它方面，根据任一个以上实施方案的抗CSF-1R抗体是单克隆抗体，包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。在一些实施方案中，抗CSF-1R抗体是抗体片段，例如，Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或$F(ab')_2$片段。在另一个实施方案中，该抗体是全长抗体，例如，完整的IgG1或IgG4抗体或如本文定义的其它抗体类别或同种型。

[0172] 在其它方面，根据任一个以上实施方案的抗IL-34抗体或抗CSF-1R抗体可以单独地或组合地合并如下文1-7部分中所述的任一特征：

[0173] 1.抗体亲和力

[0174] 在一些实施方案中，本文中提供的抗体具有≤1μM、≤100nM、≤10nM、≤1nM、≤0.1nM、≤0.01nM或≤0.001nM(例如10^{-8}M或更小，例如从10^{-8}M至10^{-13}M，例如从10^{-9}M至10^{-13}M)的解离常数(Kd)。

[0175] 在一些实施方案中，通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)测量Kd，如以下测定所述的用目的抗体的Fab形式及其抗原进行所述抗原结合测定(RIA)。通过以下方式测量Fab对抗原的溶液结合亲和力：在未标记抗原的滴定系列的存在下用最低浓度的(^{125}I)-标记的抗原平衡Fab，随后用抗-Fab抗体包被的平板捕获结合的抗原(参见，例如，Chen等人，J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了建立用于测定的条件，将MICROTITER®多孔板(Thermo Scientific)用50mM碳酸钠(pH 9.6)中的5μg/ml抗-Fab捕获抗体(Cappel Labs)包被过夜，并随后用PBS中的2%(w/v)牛血清白蛋白在室温(大约23℃)封闭2至5小时。在不吸附性平板(Nunc#269620)中，将100pM或26pM[^{125}I]-抗原与目的Fab的系列稀释物(例如，与Presta等人.，Cancer Res.57:4593-4599(1997)中抗-VEGF抗体Fab-12的评价一致)混合。然后，将目的Fab温育过夜；然而，温育可以持续较长时间(例如，约65小时)以确保达到平衡。此后，将混合物转移至捕获平板以便在室温孵育(例如，1小时)。然后，移除溶液并将平板用PBS中的0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20®)洗涤8次。当平板已经干燥时，添加150μl/孔的闪烁体(MICROSCINT-20™;Packard)，并且将平板在TOPCOUNT™γ计数器(Packard)上计数10分钟。选择产生小于或等于20%最大结合的每种Fab的浓度用于竞争性结合测定中。

[0176] 根据另一个实施方案，使用表面等离子共振测定，如使用BIACORE®-2000或BIACORE ®-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ)在25℃采用固定的抗原CM5芯片以约

10个响应单位(RU)，测量Kd。简言之，根据供应商的说明书，用N-乙基-N'-(3-二甲氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片(CM5，BIACORE，Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠(pH4.8)稀释至5μg/ml(约0.2μM)，随后以5μl/分钟的流速上样以实现偶联蛋白的大约10个响应单位(RU)。在抗原上样后，注入1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量，将Fab在具有0.05％聚山梨醇酯20(TWEEN-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中的两倍系列稀释物(0.78nM至500nM)在25℃以大约25μl/分钟的流速注射。使用简单的一对一Langmuir结合模型(BIACORE®评价软件3.2版)通过同时拟合缔合和解离传感图(sensorgram)来计算缔合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。将平衡解离常数(Kd)计算为比率k_{off}/k_{on}。参见，例如，Chen等人，J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离子共振测定的缔合速率超过10^6 M^{-1} s^{-1}，那么可以通过使用荧光猝灭技术确定缔合速率，所述荧光猝灭技术在如分光计中测量的增加浓度的抗原存在下在25℃测量在PBS(pH7.2)中的20nM抗-抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发＝295nm；发射＝340nm，16nm带通)的增加或减少，所述光谱仪诸如配备断流(stop-flow)的分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌型比色皿的8000-系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)。

[0177] 根据另一个实施方案，使用BLI测定(例如，如本文中所述的)测量Kd。

[0178] 2.抗体片段

[0179] 在一些实施方案中，本文提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$、Fv和scFv片段，以及下文描述的其它片段。关于某些抗体片段的综述，参见Hudson等人Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述，参见例如Plückthün，在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，vol.113，Rosenburg和Moore eds.，(Springer-Verlag，New York)，pp.269-315(1994)；还参见WO 93/16185；以及美国专利号5,571,894和5,587,458。关于包含救援受体(salvage receptor)结合表位残基和具有增加的体内半衰期的Fab和$F(ab')_2$片段的讨论，参见美国专利号5,869,046。

[0180] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段，所述两个抗原结合位点可以是双价或双特异性的。参见，例如，EP 404,097；WO 1993/01161；Hudson等人，Nat.Med.9:129-134(2003)；和Hollinger等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)。三链抗体和四链抗体还在Hudson等人，Nat.Med.9:129-134(2003)中描述。

[0181] 单一结构域抗体是包含抗体的全部或一部分重链可变结构域或者全部或一部分轻链可变结构域的抗体片段。在一些实施方案中，单一结构域抗体是人单一结构域抗体(Domantis，Inc.，Waltham，MA；参见例如美国专利号6,248,516 B1)。

[0182] 在一些实施方案中，抗体片段是具有基本上与完整抗体相似的体内半衰期的单价抗体。例如，这种抗体片段可以包含与能够对该片段赋予体内稳定性的Fc序列连接的一条抗原结合臂。在一个实施方案中，本发明的抗体是如WO2005/063816中描述的单臂抗体。在一个实施方案中，该单臂抗体包含构成“凸起(knob)”和“孔洞(hole)”的Fc突变，如WO2005/063816中描述的。

[0183] 抗体片段也可以是“线性抗体”，例如如美国专利号5,641,870中描述的。这种线性抗体片段可以是单特异性或双特异性的。

[0184] 抗体片段可以通过多种技术产生，包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及由

重组宿主细胞(例如,大肠杆菌或噬菌体)产生,如本文中描述的。

[0185] 3.嵌合和人源化抗体

[0186] 在一些实施方案中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体例如在美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))中描述。在一个实例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在其它实例中,嵌合抗体是其中类别或亚类已经从亲本抗体的类别或亚类被改变的"类别转换"抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0187] 在一些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。典型地,将非人抗体人源化以减少针对人类的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR(例如,CDR)(或其部分)来源于非人抗体,并且FR(或其部分)来源于人抗体序列。人源化抗体任选地也将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,从中衍生HVR残基的抗体)的相应残基置换,例如,以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0188] 人源化抗体和制造它们的方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并且进一步在例如Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述"表面重塑");Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述"FR改组(shuffling)");和Osbourn等人,Methods 36:61-68(2005)and Klimka et al.,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述针对FR改组的"导向选择"方案)中描述。

[0189] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用"最佳-配合"方法选择的框架区(参见,例如,Sims等人,J.Immunol.151:2296(1993));来源于特定亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的框架区(参见,例如,Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);和Presta等人,J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和来源于筛选FR文库的框架区(参见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0190] 4.人抗体

[0191] 在一些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的多种技术产生人抗体。人抗体总体上在van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)以及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中描述。

[0192] 人抗体可以通过施用免疫原至转基因动物制备,其中所述转基因动物已经被修饰以应答于抗原攻击产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这种动物典型地含有替换内源性免疫球蛋白基因座或在染色体外存在或随机整合入动物染色体的全部或部分人免疫球蛋白基因座。在所述转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已经失活。关于从转基因动物获得人抗体的方法的综述,参见Lonberg,Nat.Biotech.23:1117-1125(2005)。还参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HuMab®技术的美国专利号5,770,429;描述K-MMOUSE®技术的美国专利号7,041,870,以及描述

VELOCIMOUSE®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900)。可以进一步修饰来自这种动物产生的完整抗体的人可变区,例如,通过与不同的人恒定区组合。

[0193] 也可以通过基于杂交瘤的方法产生人抗体。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂合骨髓瘤细胞系。(参见,例如,Kozbor J.,Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等人,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,pp.51-63(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等人,J.Immunol.,147:86(1991))。经由人B-细胞杂交瘤技术产生的人抗体还在Li等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)中描述。额外的方法包括例如在美国专利号7,189,826(描述从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体)和Ni,Xiandai Mianyixue,26(4):265-268(2006)(描述人-人杂交瘤)中描述的那些。人杂交瘤技术(三体瘤(trioma)技术)还在Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20(3):927-937(2005)以及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27(3):185-91(2005)中描述。

[0194] 也可以通过分离选自人衍生的噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生人抗体。这种可变结构域序列随后可以与所需的人恒定结构域组合。下文描述用于从抗体文库选出人抗体的技术。

[0195] 5.来源于文库的抗体

[0196] 可以通过对组合文库筛选具有所需活性或多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,本领域已知多种方法,用于产生噬菌体展示文库并对所述文库筛选拥有所需结合特征的抗体。所述方法综述于例如Hoogenboom等人在Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人编著,Human Press,Totowa,NJ,2001)中,并且进一步在例如McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628(1991);Marks 等人,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Marks和Bradbury,在Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo编著,Human Press,Totowa,NJ,2003);Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);和Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004)中描述。

[0197] 在某些噬菌体展示方法中,VH基因和VL基因库分别地由聚合酶链反应(PCR)克隆并且在噬菌体文库中随机重组,随后可以对所述噬菌体文库筛选结合抗原的噬菌体,如在Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455(1994)中描述的。噬菌体典型地将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或展示为Fab片段。来自免疫的来源的文库提供了针对免疫原的高亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。备选地,可以克隆天然库(例如,从人)以在不进行任何免疫的情况下提供针对广泛范围的非自体抗原以及自体抗原的抗体的单一来源,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734(1993)所描述的。最后,也可以通过从干细胞克隆未重排的V-基因区段并使用含有随机序列的PCR引物以编码高度可变的CDR3区并实现体外重排,合成地产生天然文库,如Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388(1992)所描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公开本包括,例如:美国专利号5,750,373和美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0198] 从人抗体文库分离的抗体或抗体片段被视为本文中的人抗体或人抗体片段。

[0199] 6.多特异性抗体

[0200] 双特异性抗体

[0201] 双特异性抗体是对两种不同抗原具有结合特异性的单克隆抗体。在一些实施方案中，双特异性抗体是人抗体或人源化抗体。在一些实施方案中，结合特异性中的一者针对IL-34(例如，人IL-34)并且另一者针对任何其它抗原。在一些实施方案中，双特异性抗体可以与IL-34(例如，人IL-34)的两个不同表位结合。在一些实施方案中，双特异性抗体包含针对IL-34(例如如，人IL-34)的第一结合特异性和针对CSF-1(例如，人CSF-1)的第二结合特异性。在一些实施方案中，双特异性抗体结合IL-34上与本文所述的任何抗IL-34抗体结合的相同表位。在一些实施方案中，双特异性抗体包含本文所述的任一种抗IL-34抗体的一个、两个、三个、四个或五个或六个HVR中的至少任一个。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段(例如，$F(ab')_2$双特异性抗体)。

[0202] 用于产生双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上，双特异性抗体的重组产生基于共表达两条免疫球蛋白重链-轻链对，其中两条重链具有不同的特异性(Milstein和Cuello，Nature 305:537(1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配，这些杂交瘤(四体瘤(quadroma))产生10种不同抗体分子的可能混合物，其中仅一种分子具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤进行)是相当繁琐的，并且产物产率低。类似的方法在1993年5月13日公布的WO 93/08829中以及在Traunecker等人，EMBOJ.，10:3655(1991)中公开。

[0203] 根据不同的方案，具有所需结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。例如，融合物具有免疫球蛋白重链恒定结构域，包括至少部分的铰链区、CH2区和CH3区。在一些实施方案中，含有轻链结合必需的位点的第一重链恒定区(CH1)在至少一种融合物中存在。将编码免疫球蛋白重链融合物和(如有需要)免疫球蛋白轻链的DNA插入单独的表达载体中，并且共转染至合适的宿主生物中。在构建中所用的比率不等的3种多肽链提供最佳产率时的实施方案中，这在调节3种多肽片段的相互比例方面提供了良好的灵活性。然而，当至少两条多肽链以相等比率的表达导致高产率时或当该比率没有特定意义时，可能将2条或全部3条多肽链的编码序列在一个表达载体中插入。

[0204] 在这种方案的一些实施方案中，双特异性抗体由一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。发现这种非对称结构促进了所需双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合的分离，因为免疫球蛋白轻链在仅一半的所述双特异性分子中的存在提供了便利的分离方式。这种方案在WO 94/04690中公开。关于产生双特异性抗体的进一步细节，参见，例如Suresh等人，Methods in Enzymology，121:210(1986))。

[0205] 根据另一个方案，可以将一对抗体分子之间的界面进行工程改造以最大化从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比。该界面包含抗体恒定结构域的CH3结构域的至少一部分。在这种方法中，来自第一抗体分子界面的一个或多个小氨基酸侧链由较大侧链(例如，酪氨酸或色氨酸)替换。通过将大氨基酸侧链替换为较小侧链(例如，丙氨酸或苏氨酸)，在第二抗体分子的界面上产生针对大体积侧链的相同或相似尺寸的补偿“腔”。这提供了相对于其它不需要的产物(诸如同型二聚体)增加异二聚体产率的机制。

[0206] 双特异性抗体包括交联抗体或“异质缀合(heteroconjugate)”抗体。例如,异质缀合中抗体的一种可以偶联于抗生物素蛋白(avidin),另一种偶联于生物素。例如,已经提出这种抗体将免疫系统细胞靶向至不需要的细胞(美国专利号4,676,980),并用于治疗HIV感染(WO 91/00360、WO 92/00373和EP 03089)。可以使用任何便利的交联方法产生异质缀合抗体。合适的交联剂是本领域中熟知的并且连同许多交联技术一起在美国专利号4,676,980中公开。

[0207] 也已经在文献中描述从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如,可以利用化学键制备双特异性抗体。Brennan等人,Science 229:81(1985)描述了其中完整抗体以蛋白酶解方式被切割以产生F(ab')2'片段的方法。这些片段在二硫酚(dithiol)络合剂亚砷酸钠存在下被还原以稳定邻位二硫酚并防止分子间二硫化物形成。产生的Fab'片段随后转化成硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。随后将Fab'-TNB衍生物中的一者通过用巯基乙胺还原来转化成Fab'-巯基并且与等摩尔量的其它Fab'-TNB衍生物混合以形成双特异性抗体。产生的双特异性抗体可以用作用于酶的选择性固定的药剂。

[0208] 最近的进展已经促进从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段,所述片段可以化学地偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等人,J.Exp.Med.,175:217-225(1992)描述了全长人源化双特异性抗体$F(ab')_2$分子的产生。每种Fab片段分别地从大肠杆菌分泌并经历体外定向化学偶联以形成双特异性抗体。由此形成的双特异性抗体能够与过表达HER2受体的细胞和正常人T细胞结合,并且触发人细胞毒淋巴细胞针对人乳腺肿瘤靶标的溶解活性。

[0209] 还已经描述了从重组细胞培养物直接产生并分离双特异性抗体片段的多种技术。例如,已经使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体。Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992)。来自Fos和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽通过基因融合与两个不同抗体的Fab'部分连接。抗体同型二聚体在铰链区被还原以形成单体,随后被再氧化以形成抗体异二聚体。也可以将这种方法用于产生抗体同型二聚体。Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:6444-6448(1993)描述的“双抗体”技术已经为产生双特异性抗体片段提供了替代的机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH),其中所述接头太短以至于不允许相同链上的这两个结构域之间配对。因此,迫使一个片段的VH和VL结构域与另一个片段的互补VL和VH结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还已经报道了通过利用单链Fv(sFv)二聚体产生双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等人,J.Immunol.,152:5368(1994)。

[0210] 根据一个实施方案,包含本发明抗原结合结构域的一种多肽包含异二聚化结构域。如本文所用,“异源多聚化结构域”是指对生物分子的改变或添加以便促进异源多聚体形成并阻碍同型多聚体形成。具有形成异二聚体超越形成同型二聚体的强烈倾向的任何异二聚化结构域在本发明的范围内。说明性实例包括但不限于,例如,美国专利申请20030078385(Arathoon等人;描述凸起-进入-孔洞法(knob-into-hole));WO2007147901(Kjaergaard等人;描述离子相互作用);WO 2009089004(Kannan等人;描述静电转向效应);WO2011/034605(Christensen等人;描述卷曲螺旋)。还参见,例如,描述亮氨酸拉链的Pack,P.&Plueckthun,A.,Biochemistry 31,1579-1584(1992)或者描述螺旋-转角-螺旋基序的Pack等人,Bio/Technology 11,1271-1277(1993)。短语“异源多聚化结构域”和“异二聚化结构域”在本文中互换地使用。

[0211] 如本文中提及的术语“凸起-进入-孔洞法”或“KnH”技术是指通过在两个多肽相互作用的界面处将隆起(凸起)引入到一个多肽并将腔体(孔洞)引入到另一个多肽以在体外或在体内指导这两种多肽配对的技术。例如,已经在抗体的Fc:Fc结合界面、CL:CH1界面或VH/VL界面中引入KnH(例如,US2007/0178552、WO 96/027011、WO 98/050431和Zhu等人(1997)Protein Science 6:781-788)。

[0212] 用于产生多特异性(例如,双特异性)抗体的其它技术包括但不限于“凸起-处于-孔洞(knob-in-hole)”工程改造(参见,例如,美国专利号5,731,168),使用静电转向效应进行工程改造以产生抗体Fc-异二聚体分子(WO 2009/089004A1)。

[0213] 构思了大于二价的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tutt等人,J.Immunol.147:60(1991)。

[0214] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程改造抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibody)”(参见,例如US 2006/0025576A)。

[0215] 本文中抗体或片段也包括“双重作用FAb(Dual Acting FAb)”或“DAF”,其包含与IL-34以及另一种不同抗原(例如,CSF-1)结合的抗原结合位点(例如如参见US2008/0069820)。

[0216] 7.抗体变体

[0217] 在一些实施方案中,构思了本文中提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,改善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性可能是所需的。可以通过将适合的修饰引入到编码抗体的核苷酸序列或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。所述修饰包括,例如,从抗体的氨基酸序列内的残基缺失,和/或向抗体的氨基酸序列内的残基插入,和/或抗体的氨基酸序列内的残基置换。可以产生缺失、插入和置换的任意组合以实现最终构建体,条件是所述最终构建体拥有所需特征,例如抗原结合作用。

[0218] a)置换变体、插入变体和缺失变体

[0219] 在一些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换诱变的目的位点包括HVR和FR。表1中在“保守性置换”的标题下显示了保守性置换。表1中在“示例性置换”的标题下提供了更明显的变化,并且基于氨基酸侧链类别如下文进一步描述。可以将氨基酸置换引入到目的抗体中并且对产物筛选所需活性,例如,保留/改善的抗原结合作用、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

[0220] 表1

[0221]

原始残基	示例性置换	优选置换
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala

His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸	Leu
Leu(L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸	Leu

[0222] 氨基酸可以根据常见的侧链特性分组：

[0223] (1)疏水：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0224] (2)中性亲水：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0225] (3)酸性：Asp、Glu；

[0226] (4)碱性：His、Lys、Arg；

[0227] (5)影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0228] (6)芳香性：Trp、Tyr、Phe。

[0229] 非保守性置换将需要将这些类别之一的成员交换为另一个类别的成员。

[0230] 置换变体的一种类型涉及置换亲本抗体(例如，人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常，为进一步研究选择的所得变体将相对于亲本抗体在某些生物学特性方面(例如，增加的亲和力，降低的免疫原性)具有改变(例如，改善)和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体，所述抗体可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文所描述的那些)便利地产生。简言之，将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体在噬菌体上展示并筛选特定生物活性(例如，结合亲和力)。

[0231] 可以在HVR中做出改变(例如，置换)，例如以改善抗体亲和力。这种改变可以在HVR“热点”(即，在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子所编码的残基)(参见，例如，Chowdhury，Methods Mol.Biol.207:179-196(2008))和/或SDR(a-CDR)中做出，同时对所得变体VH或VL测试结合亲和力。已经在例如Hoogenboom等人在Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brien等人，ed.，Human Press，Totowa，NJ，(2001))中描述了通过构建次级文库并从中重新选择的亲和力成熟。在亲和力成熟的一些实施方案中，通过多种方法(例如，易错PCR、链改组或寡核苷酸定向诱变)中的任一种，将多样性引入到所选择用于成熟的可变基因中。随后产生次级文库。随后筛选该文库以鉴定具有所需亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法涉及HVR指导的方案，其中将几种HVR残基(例如，一次4-6个残基)随机分组。可以特别地鉴定参与抗原结合的HVR残基，例如，使用丙氨酸扫描诱变或建模。特别地，经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0232] 在一些实施方案中，置换、插入或缺失可以在一个或多个HVR中出现，只要这种改

变不实质上降低抗体结合抗原的能力。例如，可以在HVR中做出不实质上降低结合亲和力的保守性改变(例如，如本文中提供的保守性置换)。这种改变可以在HVR“热点”或SDR外部。在上文提供的变体VH和VL序列的一些实施方案中，每个HVR不被改变，或者含有不多于一个、两个或三个氨基酸置换。

[0233] 一种用于鉴定可以被靶向以便诱变的抗体残基或区域的有用方法称作“丙氨酸扫描诱变”，如Cunningham和Wells(1989)Science，244:1081-1085所描述的。在该方法中，将残基或一组靶残基(例如，带电荷残基诸如arg、asp、his、lys和glu)鉴定并且用中性或带负电荷的氨基酸(例如，丙氨酸或聚丙氨酸)替换以确定该抗体与抗原的相互作用是否受影响。可以在对于初始置换显示功能敏感性的氨基酸位置处引入其它置换。备选地或额外地，测定抗原-抗体复合物的晶体结构以鉴定抗体和抗原之间的接触点。可以将所述接触残基和邻近残基作为置换候选物靶向或消除。可以筛选变体以确定它们是否含有所需的特性。

[0234] 氨基酸序列插入包括长度范围从1个残基至含有成百个或更多个残基的多肽的氨基端和/或羧基端融合，以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N-末端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入性变体包括抗体的N末端或C末端与酶(例如，针对ADEPT的酶)或增加该抗体血清半衰期的多肽的融合。

[0235] b)糖基化变体

[0236] 在一些实施方案中，改变本文提供的抗体以增加或减少抗体发生糖基化的程度。可以通过改变氨基酸序列从而产生或移除一个或多个糖基化位点来便利地实现对抗体添加或删除糖基化位点。

[0237] 在抗体包含Fc区的情况下，可以改变与之连接的糖。哺乳动物细胞产生的天然抗体典型地包含分枝的双分支寡糖，所述寡糖通常通过N-连接附于Fc区的CH2结构域的Asn297。例如参见，Wright等人，TIBTECH15:26-32(1997)。寡糖可以包括各种糖，例如，甘露糖、N-乙酰基氨基葡萄糖(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸，以及与双分支寡糖结构的“茎”中的GlcNAc连接的岩藻糖。在一些实施方案中，可以修饰本发明抗体中的寡糖以产生具有某些改善特性的抗体变体。

[0238] 在一些实施方案中，提供具有糖结构的抗体变体，所述糖结构缺少与Fc区(直接或间接)连接的岩藻糖。例如，这种抗体中岩藻糖的量可以是1％至80％、1％至65％、5％至65％或20％至40％。通过以下方式确定岩藻糖的量：例如，如在WO 2008/077546中所描述的，相对于如通过MALDI-TOF质谱法测量的与Asn297连接的全部糖结构(例如，复杂结构、杂合结构和高甘露糖结构)的总和，计算Asn297处糖链内岩藻糖的平均量。Asn297是指位于Fc区中约第297位置处的天冬酰胺残基(Fc区残基的EU编号)；然而，Asn297也可以位于第297位置上游或下游约±3个氨基酸，即，在第294和300位置之间，原因在于抗体中的微小序列变异。这种岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见，例如，美国专利申请公开号US 2003/0157108(Presta,L.)；U.S.2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co.,Ltd)。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体相关的出版物的实例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO2005/053742；WO2002/031140；Okazaki等人，J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004)；Yamane-Ohnuki等人，

Biotech.Bioeng.87:614(2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的实例包括在蛋白质岩藻糖基化方面缺陷的Lec13 CHO细胞(Ripka等人,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1,Presta,L;和WO 2004/056312 A1,Adams等人,Acta crystallographica Section D,Biological crystallography 66:213-221(2010),特别是在实施例11),和敲除细胞系,诸如α-1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8敲除CHO细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人,Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等人,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);和WO2003/085107)。

[0239] 进一步提供具有等分寡糖的抗体变体,例如,其中与抗体Fc区连接的双分支寡糖由GlcNAc等分。这种抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。这种抗体变体的实例在例如WO 2003/011878(Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684(Umana等人);和US 2005/0123546(Umana等人)中描述。也提供具有与Fc区连接的寡糖中的至少一个半乳糖残基的抗体变体。这种抗体变体可以具有改善的CDC功能。这种抗体变体在例如WO 1997/30087(Patel等人);WO 1998/58964(Raju,S.);和WO 1999/22764(Raju,S.)中描述。

[0240] c)Fc区变体

[0241] 在一些实施方案中,可以将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的抗体Fc区中,因而产生Fc区变体。该Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如,置换)的人Fc区序列(例如,人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区)。

[0242] 在一些实施方案中,本发明构思了拥有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使所述抗体变体成为其中抗体体内半衰期重要而某些效应子功能(诸如补体和ADCC)不必要或有害的应用的所需候选物。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定以证实CDC和/或ADCC活性的降低/消除。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺少FcγR结合(因此可能缺少ADCC活性),但是保留了FcRn结合能力。介导ADCC的原代细胞,即NK细胞,仅表达FcγRIII,而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。造血细胞上的FcR表达汇总于Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页上的表3中。评价目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例在美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等人,Proc.Nat'lAcad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I等人,Proc.Nat'lAcad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann,M.等人,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中描述。备选地,可以使用非放射性测定方法(参见,例如,用于流式细胞术的ACTI™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA;和CytoTox96®非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI)。用于这种测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或额外地,可以在体内,例如,在动物模型(诸如在Clynes等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中公开的)中评价目的分子的ADCC活性。也可以进行C1q结合测定以证实抗体不能结合C1q并因此缺少CDC活性。参见,例如,WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评价补体激活,可以进行CDC测定(参见,例如,Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg,M.S.等人,Blood 101:1045-1052(2003);和Cragg,M.S.和M.J.Glennie,Blood 103:2738-2743(2004))。也可以使用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除率/半衰期的确定(参见,例如,Petkova,S.B.等人,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0243] 效应子功能减少的抗体包括置换了一个或多个Fc区残基238、265、269、270、297、327和329(美国专利号6,737,056)的那些。这种Fc突变体包括在两个或更多个氨基酸位置265、269、270、297和327处具有置换的Fc突变体,包括具有将残基265和297置换成丙氨酸的所谓"DANA"Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0244] 描述了具有改善或削弱的FcR结合的某些抗体变体。(参见,例如,美国专利号6,737,056;WO 2004/056312,和Shields等人,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0245] 在一些实施方案中,在Fc区内做出改变,所述改变导致改变的(即,改善的或削弱的)C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC),例如,如美国专利号6,194,551,WO 99/51642,和Idusogie等人,J.Immunol.164:4178-4184(2000)中描述的。

[0246] 在US2005/0014934A1(Hinton等人)中描述了具有增加的半衰期和改善的新生Fc受体(FcRn)结合的抗体,所述新生Fc受体负责转移母源IgG至胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))。这些抗体包含其中具有一个或多个置换的Fc区,其中所述置换改善了Fc区与FcRn的结合。这种Fc变体包括在一个或多个Fc区残基:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434处具有置换(例如,Fc区残基434的置换)的那些(美国专利号7,371,826)。

[0247] 也参见涉及Fc区变体其它实例的Duncan等人,Nature 322:738-40(1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;和WO 94/29351。

[0248] d)半胱氨酸工程改造的抗体变体

[0249] 在一些实施方案中,所需要的是产生半胱氨酸工程改造的抗体,例如,"硫代MAb",其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基置换。在特别的实施方案中,置换的残基出现在抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基,因而将反应性巯基安置在抗体的可及位点处并且可以用来将抗体缀合至其它部分(诸如药物部分或接头-药物部分)以产生免疫缀合物,如本文中进一步描述的。在一些实施方案中,可以用半胱氨酸置换以下残基中的任何一个或多个:轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。半胱氨酸工程改造的抗体可以如例如美国专利号7,521,541中所描述的产生。

[0250] e)抗体衍生物

[0251] 在一些实施方案中,可以进一步修饰本文提供的抗体以含有本领域已知并轻易可获得的额外的非蛋白质部分。适于抗体衍生的部分包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、亚乙基/马来酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)以及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如如,丙三醇)、聚乙烯醇和它们的混合物。聚乙二醇丙醛可以具有制造方面的优点,原因在于其在水中的稳定性。聚合物可以具有任何分子量,并可以是分枝或不分枝的。与抗体连接的聚合物的数量可以变化,并且如果连接多于一种聚合物,它们可以是相同或不同的分子。通常,用于衍生的聚合物的数量和/或类型可以基于以下考虑事项确定,包括但不限于待改善的抗体特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于限定情况下的疗法中等等。

[0252] 在另一个实施方案中,提供了抗体和非蛋白质部分的缀合物,其中所述非蛋白质

部分可以通过暴露于辐射而选择性加热。在一些实施方案中，非蛋白质部分是碳纳米管(Kam等人，Proc.Natl.Acad..Sci.USA 102:11600-11605(2005))。辐射可以具有任何波长，并包括但不限于这样的波长，所述波长不伤害普通细胞，但是使非蛋白质部分加热至杀伤邻近于抗体-非蛋白质部分的细胞的温度。

[0253] B.重组方法和组合物

[0254] 可以使用重组方法和组合物产生抗体，例如，如美国专利号4,816,567中描述的。在一些实施方案中，提供了分离的核酸，所述核酸编码本文描述的抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体。这种核酸可以编码构成抗体VL的氨基酸序列和/或构成抗体VH的氨基酸序列(例如，抗体的轻链和/或重链)。在一些实施方案中，提供了包含这种核酸的一种或多种载体(例如，表达载体)。在一些实施方案中，提供了包含这种核酸的宿主细胞。在一些实施方案中，宿主细胞包含(例如，已经用以下载体转化)：(1)包含核酸的载体，所述核酸编码构成抗体VL的氨基酸序列和构成抗体VH的氨基酸序列，或(2)包含核酸的第一载体，所述核酸编码构成抗体VL的氨基酸序列，和包含核酸的第二载体，所述核酸编码构成抗体VH的氨基酸序列。在一些实施方案中，宿主细胞是真核的，例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如，Y0、NS0、Sp20细胞)。在一些实施方案中，提供产生抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体的方法，其中所述方法包括在适于表达抗体的条件下培养如上文提供的包含编码抗体的核酸的宿主细胞，并且任选地从宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收该抗体。

[0255] 为了抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1R抗体的重组产生，将编码抗体的核酸(例如，如上文描述的)分离并插入一种或多种载体中，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可以使用常规方法(例如如，通过使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)，轻易地分离这种核酸并将其测序。

[0256] 克隆或表达编码抗体的载体的合适宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如，可以在细菌中产生抗体，特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于在细菌中表达抗体片段和多肽，参见，例如，美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。(还参见Charlton,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,编著,Humana Press,Totowa,NJ,2003),pp.245-254,描述在大肠杆菌中表达抗体片段)。在表达后，抗体可以从细菌细胞糊状物中以可溶性级分分离并且可以进一步纯化。

[0257] 除原核生物之外，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是编码抗体的载体的合适克隆宿主或表达宿主，包括其糖基化途径已经“人源化”的真菌和酵母菌株，导致产生具有部分或完全人类糖基化模式的抗体。参见Gerngross,Nat.Biotech.22:1409-1414(2004)，和Li等人，Nat.Biotech.24:210-215(2006)。

[0258] 表达糖基化抗体的合适宿主细胞还来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定了可以与昆虫细胞一起使用、特别是用于转染草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞的众多杆状病毒毒株。

[0259] 也可以利用植物细胞培养物作为宿主。参见，例如，美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0260] 也可以使用脊椎动物细胞作为宿主。例如，适应于悬浮培养的哺乳动物细胞系可

以是有用的。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例是由SV40(COS-7)转化的猴肾CV1系;人胚肾系(如在例如Graham等人,J.Gen Virol.36:59(1977)中描述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠支持细胞(如在例如Mather,Biol.Reprod.23:243-251(1980)中描述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;布法罗大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺瘤细胞(MMT 060562);TRI细胞,如在例如Mather等人,Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68(1982)中描述的;MRC 5细胞;和FS4细胞。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,包括DHFR-CHO细胞(Urlaub等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216(1980));和骨髓瘤细胞系,诸如YO、NSO和Sp2/0。关于适于抗体产生的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如,Yazaki和Wu,Methods in Molecular Biology,Vol.248(B.K.C.Lo,编著,Humana Press,Totowa,NJ),pp.255-268(2003)。

[0261] C.测定

[0262] 对于本文提供的抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体和抗CSF-1R抗体可以通过本领域已知的多种测定来鉴定、筛选或表征它们的物理/化学特性和/或生物活性。

[0263] 1.结合测定和其它测定

[0264] 在一个方面,例如通过已知方法诸如ELISA、蛋白质印迹法等,对本发明的抗体测试其抗原结合活性。

[0265] 在另一个方面,竞争测定可以用来鉴定与例如本文所述的抗IL-34抗体竞争的抗IL-34抗体或双特异性抗IL-34/CSF-1抗体。例如,抗体与包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:6的VL序列的抗IL-34抗体竞争与IL-34的结合。在一些实施方案中,这种竞争性抗体例如与包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:6的VL序列的抗IL-34抗体结合相同的表位(例如,线性或构象表位)。用于定位与抗体结合的表位的详细示例性方法在Morris(1996)"Epitope Mapping Protocols(表位定位法),"在Methods in Molecular Biology vol.66(Humana Press,Totowa,NJ)中提供。

[0266] 在示例性竞争测定中,将固定的IL-34在溶液中温育,所述溶液包含与IL-34结合的第一标记抗体(例如,包含SEQ ID NO:5的VH序列和SEQ ID NO:6的VL序列的抗IL-34抗体)和正在对其与第一抗体竞争结合至IL-34的能力进行测试的第二未标记抗体。第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照,将固定的IL-34在包含第一标记抗体但是不包含第二未标记抗体的溶液中温育。在允许第一抗体与IL-34结合的条件下温育后,移除过多的未结合的抗体,并且测量与固定的IL-34结合的标记物的量。如果与固定的IL-34结合的标记物的量在测试样品中相对于对照样品实质降低,那么这表明第二抗体正在与第一抗体竞争结合至IL-34。参见Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory Manual ch.14(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY)。

[0267] 在一个方面,提供了用于鉴定具有生物活性的抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗-CSF1R抗体的测定。生物活性可以包括例如抑制人外周血单核细胞(PBMC)的增殖、抑制IL-34与CSF-1R的结合或抑制CSF-1与CSF-1R的结合。还提供在体内和/或在体外具有这种生物活性的抗体。

[0268] 在一些实施方案中,对本发明的抗体测试这种生物活性。例如,可以使用通过CellTiter-Glo的细胞增殖测定来测量抗IL-34抗体、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗

CSF-1R抗体的中和活性。在添加到细胞(诸如外周血单核细胞(PBMC))之前,将hIL-34或mIL-34与抗IL-34mAb、双特异性抗IL-34/CSF-1抗体或抗-CSF1抗体的系列稀释物组合。在37℃温育平板72小时后,通过测量RLU获得抗体抑制活性。可以用KaleidaGraph计算半数最大抑制浓度(IC50),其定义为当IL-34以引发70-80%增殖应答的浓度存在时,在细胞上产生IL-34活性的半数最大抑制所需要的抗体浓度。

[0269] 可以在抗体(例如,抗IL-34抗体、双特异性IL-34/CSF-1抗体或抗CSF-1抗体)的系列稀释物的存在下,使用固定的IL-34或CSF-1和可溶性CSF-1R在ELISA测定中测试本文提供的抗体对IL-34或CSF-1与CSF-1R结合的抑制。

[0270] D.药物组合物

[0271] 本发明的药物组合物可以含有抗IL-34抗体并且可以进一步含有额外的药剂,诸如如本文中描述的双特异性抗IL-34/CSF-1抗体、CSF-1R抑制剂和/或抗CSF-1抗体。通过将具有所需纯度的抗体与一种或多种任选的药用载体混合,以冻干制剂或水溶液的形式制备药物组合物(Remmgton's Pharmaceutical Sciences 16th edition,Osol,A.编著(1980))。通常,药用载体在采用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵(octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride);氯化六甲双胺(hexamethonium chloride);苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苄索氯铵(benzethonium chloride);苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;儿茶酚;间苯二酚(resorcinol);环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖类、二糖类和其它糖类包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖类,诸如蔗糖、甘露糖、海藻糖或山梨醇;形成盐的反离子,诸如钠;金属复合物(例如,Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文中的示例性药用载体进一步包括间质的(insterstitial)药物分散剂,诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如,人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rHuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。在美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中描述了某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20。在一个方面,sHASEGP与一种或多种额外的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0272] 示例性冻干抗体组合物在美国专利号6,267,958中描述。水性抗体组合物包括在美国专利号6,171,586和WO2006/044908中描述的那些,后一类组合物包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0273] 本文中的药物组合物也可以根据所治疗的特定适应症的需要而含有多于一种活性成分,优选地是具有彼此不产生不利影响的互补活性的那些活性成分。例如,可以需要是的除抗IL-34抗体之外,进一步提供CSF-1R抑制剂。这种活性成分以对预期目的有效的量适当地存在于组合中。

[0274] 活性成分可以包埋于例如分别通过凝聚技术或界面聚合制备的微胶囊(例如,羟甲基纤维素微胶囊或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)、胶质药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)或巨乳液(macroemulsion)中。这

种技术在Pharmaceutical Sciences 16th edition,Osol,A.编著(1980)中公开。

[0275] 可以制备持续释放制备物。持续释放制备物的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述基质处于成形制品(例如,薄膜或微胶囊)形式。

[0276] 待用于体内施用的组合物通常是无菌的。可以例如通过借助无菌滤膜的过滤轻易地实现无菌性。

[0277] E.治疗方法和组合物

[0278] 本发明的其它方面提供了用于治疗个体中神经疾病的方法,包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体;治疗展现神经疾病的一个或多个症状的个体的方法,包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体;和降低个体的脑中小胶质细胞的密度的方法,包括向所述个体施用有效量的抗IL-34抗体。在一些实施方案中,所述方法进一步包含向个体施用有效量的CSF-1R抑制剂。在一些实施方案中,所述方法进一步包含向个体施用有效量的抗CSF-1抗体。在一些实施方案中,抗CSF-1抗体抑制人CSF-1与人CSF-1R的结合。在某些实施方案中,个体是哺乳动物。在某些实施方案中,个体是人类。治疗方法包括但不限于,预防疾病或其症状、减少疾病的出现或复发、减慢疾病的进展、减轻疾病的症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、增加患有疾病的个体的期望寿命、改善或缓和疾病状态、改善预后或治愈疾病。在用于治疗个体中神经疾病的一些实施方案中,在所述个体的脑中小胶质细胞的密度是降低的。在用于治疗个体中神经疾病的一些实施方案中,在所述个体的脑中靠近淀粉状蛋白斑块的树突棘的密度是增加的。

[0279] 神经疾病包括影响和损害整个大脑和/或神经系统的正常电脉冲的病理状态。在神经疾病过程期间可能出现的一般症状包括运动系统和感觉网络的功能障碍,以及正常的自主和非自主运动、认知功能、记忆和抽象思维的损伤。神经疾病的实例包括阿尔茨海默病,亨廷顿病,帕金森综合征,肌萎缩性侧索硬化,朊病毒病,脊髓小脑性共济失调,脊髓性肌萎缩,自闭症,自闭症谱系障碍,中风,低血糖症,脑缺血,心脏骤停,脊髓创伤,头部创伤,围产期缺氧,心脏骤停,低血糖神经元损伤,癫痫,疼痛,慢性疼痛,神经性疼痛,纤维肌痛,精神分裂症,抑郁,双相性精神障碍,焦虑,ADHD,痴呆,情绪障碍,精神障碍,PTSD,失眠,愤怒管理(anger management),躁狂症,精神病,癫痫和偏头痛。在某些优选的实施方案中,神经疾病是阿尔茨海默病,亨廷顿病,帕金森综合征,神经性疼痛,肌萎缩性侧索硬化,朊病毒病,脊髓小脑性共济失调,脊髓性肌萎缩,自闭症或自闭症谱系障碍。在一些实施方案中,神经疾病是阿尔茨海默病。

[0280] 在一些实施方案中,神经疾病的特征在于神经炎症和小胶质细胞增生。神经炎症或神经系统炎症涉及小胶质细胞和星形胶质细胞活化,炎性细胞因子和活性氧类产生,内皮细胞活化和组织水肿。神经炎症响应于包括但不限于损伤、衰老、感染、毒素或自身免疫应答的因素而发生。神经炎症可能通过导致小胶质细胞活化、淀粉样蛋白斑块的积累和突触丢失而导致神经退行性疾病诸如阿尔茨海默病。小胶质细胞增生涉及响应于损伤或活化信号的小胶质细胞异常增殖或过度生长。

[0281] 在本发明的一个方面,提供了治疗展现神经疾病的一个或多个症状的个体的方法。在一些实施方案中,所述一个或多个症状包括但不限于记忆丧失,混乱,定向力障碍,情绪改变,行为改变,肌无力,运动功能障碍,共济失调,言语改变,痴呆,僵硬,肌肉萎缩,震颤,麻痹,重复性行为,交流困难和社会技能困难。在一些实施方案中,在施用有效量的抗

IL-34抗体后所述一个或多个症状得到改善。在一些实施方案中，使用简易精神状态检查来测量所述一个或多个症状。简易精神状态检查(MMSE)或Folstein测试是简短的30-分问卷测试，其用于评价认知。在约10分钟的时间范围中，它采样各种功能，包括记忆和定向力。MMSE测试包括以下几个方面的简单问题和问题：测试的时间和地点，重复的单词列表，语言使用和理解，以及基本的运动技能。任何27分或更高(30分)的分数是实际上正常的；20-26分表示轻度痴呆；10-19分表示中度痴呆，并且10分以下表示重度痴呆。MMSE是标准化测试。

[0282] 在本发明的一些方面，提供了用于治疗个体中神经疾病的方法或用于治疗展现神经疾病的一个或多个症状的个体的方法。在一些实施方案中，神经疾病是阿尔茨海默病(AD)。AD是以慢性进行性痴呆和总脑皮层萎缩为特征的病症。AD发病率平均在美国人口的4％到5％之间。这意味着大约130万例重度AD和另外280万例轻度至中度损伤的患者。β-淀粉状蛋白神经炎斑块、神经元内神经原纤维缠结和淀粉状蛋白血管病的存在是AD的标志，并且在死后检查中观察到。AD可以在家族性表现上是可遗传的，或者可以是散发性的。AD包括家族性、散发性以及基于表型表现的中间体和及其亚组。家族性AD典型地具有早发性(65岁之前)，而散发性AD典型地是迟发性的(65岁及以后)。通过展现与AD相关的表型，可以将个体诊断为患有AD或处于发展AD的风险中。与AD相关的表型可以是认知表型或精神病表型。认知表型的实例包括但不限于失忆症，失语症，失用症和失认症。精神病症状的实例包括但不限于性格改变，抑郁，幻觉和妄想。AD的表型表现也可以是物理的，诸如通过直接(成像)或间接(生物化学)检测淀粉状蛋白-β斑块。

[0283] 已经在线性离子阱中使用与串联质谱联用的高效液相色谱证明了外周血中淀粉状蛋白-β(1-40)的定量(Du等人，J Biomol Tech.16(4)：356-63(2005))。也已经描述了通过荧光相关光谱检测阿尔茨海默病患者的脑脊液中的单个β-淀粉状蛋白聚集物(Pitschke等人，Nature Medicine 4:832-834(1998)。美国专利5,593,846描述了用于检测可溶性淀粉状蛋白-β的方法。还已经描述了使用抗体对淀粉状蛋白-β肽和晚期糖基化终产物受体(RAGE)进行间接检测。最后，使用显色底物对脑脊液中增加的BACE-1活性进行生化检测也被视为AD的诊断性指标或预后指标(Verheijen等人，Clin Chem.Apr 13[Epub.](2006))。

[0284] 使用放射性碘化的黄酮衍生物作为成像剂(Ono等人，J Med Chem.48(23)：7253-60(2005))可以实现β-淀粉状蛋白的体内成像，并且在淀粉状蛋白结合染料(诸如与40个残基的放射性碘化的A肽缀合的腐胺(putrescein))(产生^{125}I-PUT-A 1-40)存在下，其显示穿过血脑屏障并与αβ斑块结合。Wengenack等人，Nature Biotechnology.18(8)：868-72(2000)。还使用二苯乙烯SB-13和苯并噻唑6-OH-BTA-1(也称为PIB)显示了β-淀粉状蛋白的成像。Nicholaas等人，Am J Geriatr Psychiatry,12:584-595(2004)。

[0285] 在一些实施方案中，神经疾病是帕金森病。帕金森病是慢性进行性中枢神经系统病况，其通常出现在生命的后几十年。这种疾病在有目的的运动中产生缓慢增加的残疾。其特征在于震颤、运动迟缓、僵硬、姿势紊乱四大临床特点。患者常常伴有痴呆。在特发性帕金森综合征中，通常缺失黑质、蓝斑和脑的其它色素神经元细胞，并且从黑质突起的细胞的神经轴突终端中的多巴胺含量下降。数年后，残疾、运动迟缓、虚弱和僵硬进展到完全病残的程度。

[0286] 在一些实施方案中，神经疾病是亨廷顿病。亨廷顿病(HD)，也称为亨廷顿舞蹈病(Huntington's Chorea)，是运动、认知和精神障碍的进行性病况。这种疾病的平均发病年

龄是35-44岁，尽管在约10％的病例中，发病发生在21岁之前，并且该疾病诊断后的平均寿命是15-18年。西欧血统每100,000人中患病率约为3至7人。所述疾病是由4p16.3处位于染色体4的短臂上的基因(称为亨廷顿(htt))的两个拷贝中任一个上的常染色体显性突变引起的。

[0287] HD是涉及三核苷酸重复的几种疾病之一，这导致htt基因中存在重复片段。所述重复是三个DNA碱基序列，即胞嘧啶-腺嘌呤-鸟嘌呤(CAG)(即...CAGCAGCAG...)的重复，CAG是编码氨基酸谷氨酰胺的三联体。因此，CAG系列导致产生称为聚谷氨酰胺段(polyglutamine tract)(或polyQ段)的谷氨酰胺链，并且所述基因的重复部分被鉴定为polyQ区域。这导致纹状体和皮层退化。

[0288] 在一些实施方案中，神经疾病是神经性疼痛。神经性疼痛是一种慢性病，其中神经痛途径中的NMDA受体具有异常高水平的敏感性，使得即使没有遭受疼痛的刺激，它们也自发地传递患者感觉为疼痛的神经信息。神经性疼痛包括与由神经损伤或主要刺激(包括退化性、毒性、代谢性、缺血性和机械性形式的损伤)引起的神经性疾病或病症有关的任何形式的疼痛。神经性病症包括所有形式的神经炎和多发性神经炎。神经性病症可以是遗传性的，诸如遗传性感觉运动神经病和遗传性感觉和自主神经病。神经病也可以是非神经病性病症诸如糖尿病(糖尿病性神经病)、风湿病、病毒感染、多发性硬化症、一些中风、营养缺乏、代谢病症、免疫介导的病症和癌症的结果。肌筋膜痛是神经性疼痛的一种形式。神经性疼痛的一个显著特点是对控制其它类型的疼痛有效的吗啡和相关止痛药对控制神经性疼痛通常是无效的(Backonja 1994)。

[0289] 在一些实施方案中，神经疾病是肌萎缩性侧索硬化(ALS)。ALS(也称为运动神经元病(MND)、Lou Gehrig病或Maladie de Charcot)是进行性致命性神经肌肉病症，其特征在于虚弱、肌肉萎缩和肌束颤动(反射亢进)。除ALS与痴呆有关的情形外，保留了认知功能。该疾病主要影响运动神经元，并且特征在于大脑皮层、脑干核和脊髓前角中的运动神经元的进行性退化。患有该疾病的个体表现出四肢无力以及言语和吞咽困难。所述无力发展到呼吸功能损害，并且这种疾病通常是致命的。所有患者中有一半在症状出现后约3年内死亡。约5-10％的ALS患者表现出家族性状。约20-30％的家族性ALS患者表现出在其铜/锌超氧化物歧化酶(SOD1)基因中的突变。然而，在超过90％的ALS患者中，该疾病是散发性的，并且患者不表现出家族性状。目前对ALS的治疗只是姑息治疗。

[0290] 在一些实施方案中，神经疾病是朊病毒病。朊病毒病是一组快速进展的、致命的、无法治愈的神经退行性综合征。人朊病毒病包括经典的克雅氏病(Creutzfeldt-Jakob disease,CJD)，其具有散发性、医源性和家族性形式。最近，英国、法国、爱尔兰共和国、香港、意大利和美国已经认识到一种变体CJD(vCJD)，可能来源于被牛海绵状脑病(BSE)病原体污染的牛组织的消费。朊病毒病是一种神经退行性综合征，其特征在于海绵状改变(例如脑的微空洞，通常主要在灰质中)，神经元细胞消亡，与神经元消亡不成比例的星形胶质细胞增殖，以及异常的致淀粉状蛋白的积累，有时在脑中的不连续斑块中。朊病毒，即传播这些疾病的传染物，与病毒和类病毒明显不同，因为在传染性物质中没有可重复地检测到核酸组分的化学或物理证据。

[0291] 在一些实施方案中，神经疾病是脊髓小脑性共济失调(SCA)。SCA是一组复杂的异相常染色体显性神经退行性病症，其特征在于单独的或与其它神经异常组合的小脑功能障

碍。在脊髓小脑性共济失调中，编码聚谷氨酰胺(polyQ)段的CAG三核苷酸重复的扩增已显示引起显性遗传的SCA1、SCA2、SCA3、SCA6、SCAT、SCA17和齿状核红核苍白球路易体萎缩(dentatorubropallidoluy-sianatrophy，DRPLA)。在SCA中这些polyQ-介导的遗传性障碍已经显示出小脑、脑干和脊髓束的选择性进行性退变，伴有核内的突出病理标志和变性的神经元内聚集的polyQ蛋白的细胞质积聚，从而引起特定神经元的功能障碍和退变。临床症状包括共济失调，构音障碍，眼肌瘫痪，以及不同程度的运动无力。症状通常在生命的第三十或第四十年开始，然而，青少年发作已被确定。典型地，该疾病逐渐恶化，常常在症状发作后10-20年导致全残和死亡。然而，患有青少年发作的脊髓小脑性共济失调的个体典型地具有比晚发性病例更快的表型进展。

[0292] 在一些实施方式中，神经疾病是脊髓性肌萎缩(SMA)。SMA是由脊髓中前角细胞的功能丧失引起的常染色体隐性神经病症，表现为进行性运动无力、肌肉萎缩和瘫痪。SMA是由活运动神经元(SMN)蛋白水平不足引起的。染色体5q13上的SMN基因座含有SMN的两个反向拷贝，称为SMN1和SMN2。大多数SMA病例包含SMN1基因的纯合缺失并保留SMN2的至少一个拷贝。SMA表现为疾病发作的严重度和年龄的连续谱，已分为四组：I型(重度婴儿急性SMA或Werdnig-Hoffmann病)；II型(婴儿慢性SMA)；III型(青少年SMA或Wohlfart-Kugelberg-Welander病)；和IV型(成人发病的SMA)。

[0293] 在一些实施方案中，神经疾病是自闭症或自闭症谱系障碍。自闭症谱系障碍(ASD)是当习得的技能丢失或习得新技能变得延迟时在儿童早期诊断的普遍神经发育障碍。ASD在儿童早期发病，并且除了重复行为和刻板行为之外，还与不同程度的功能障碍性的交流和社交技能有关。在许多情况下(25%-50%)，由于习得的技能丢失或者习得新技能变得延迟，看似正常发展的时期大大改变了方向。近年来，患有ASD的人数大幅增加至大约150名儿童中有1人患病。虽然自闭症的神经生物学基础仍然知之甚少，但是现在有几条研究支持这样的观点：遗传因素、环境因素、神经因素和免疫因素促成了其发展。

[0294] 在其它方面，本发明提供了用于降低脑中小胶质细胞的密度的方法。在一些实施方案中，小胶质细胞密度降低至少30%，至少40%，至少50%，至少60%，至少70%，或至少80%。小胶质细胞是参与中枢神经系统发育和内环境稳态的定居脑和脊髓巨噬细胞。他们构成了10-15%的脑细胞，位于整个中枢神经系统(包括大脑、脊髓和视网膜)中。小胶质细胞使用吞噬细胞和细胞毒素机制来破坏中枢神经系统中存在的死细胞和传染物。小胶质细胞还通过作为抗原呈递细胞以及分泌细胞因子和信号传递分子来增强免疫应答。

[0295] 本发明的抗体可以在治疗方法中单独使用或与其它药剂组合使用。例如，本发明的抗体可以与至少一种额外的治疗剂共施用。在一些实施方案中，额外的治疗剂是CSF-1R抑制剂。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是小分子抑制剂。在一些实施方案中，所述小分子抑制剂是GW2580。GW2580是从FISHER SCIENTIFIC，INC.商购的。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是抗CSF-1R抗体。在一些实施方案中，额外的治疗剂是抗-CSF1抗体。

[0296] 上文所示的这种组合疗法涵盖组合施用(其中在相同或单独的制剂中包含两种或更多种治疗剂)，和单独施用，在这种情况下，本发明的抗体的施用可以在施用额外的治疗剂和/或佐剂之前、同时和/或之后进行。

[0297] 本发明的抗体(和任何额外的治疗剂)可以通过任何合适的手段施用，包括肠胃外施用、肺内施用和鼻内施用以及如有需要用于局部治疗、病灶内施用。肠胃外输注包括肌肉

内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。给药可以通过任何合适的途径进行，例如通过注射，诸如静脉内或皮下注射，这部分地取决于施用是否是短暂的或长期的。本文中构思了各种给药方案，包括但不限于单次施用或在各种时间点多次施用，大剂量(bolus)和脉冲输注(pulse infusion)。

[0298] 本发明的抗体以与良好医学实践相一致的方式来配制、给药和施用。在这种情况下考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的病因、药剂的递送位点、施用方法、施用时间表以及医学从业者已知的其它因素。所述抗体不需要但是任选地与目前用于预防或治疗所讨论病症的一种或多种药剂进行配制。所述其它药剂的有效量取决于制剂中存在的抗体的量、病症或治疗的类型以及以上讨论的其它因素。这些通常以相同的剂量并且以与本文所述的施用途径使用，或以本文所述剂量的约1％至99％使用，或以经验地/临床上确定的合适的任何剂量和任何途径使用。

[0299] 为了预防或治疗疾病，本发明的抗体的合适剂量(当单独使用或与一种或多种其它额外的治疗剂组合使用时)将取决于所治疗的疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重度和过程，抗体是否出于预防目的或治疗目的而施用、先前的疗法、患者的临床史以及对抗体的反应和主治医师的判断。将抗体以一次或经过一系列治疗来适当地施用至患者。取决于疾病的类型和严重度，约1μg/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)的抗体可以是向患者施用的初始候选剂量，无论是否例如通过一次或多次单独施用或者通过连续输注施用。一个典型的日剂量可以在约1μg/kg至100mg/kg以上的范围内，这取决于以上提及的因素。对于数天或更长时间的重复施用，取决于病况，治疗通常将持续直至所需的疾病症状的抑制出现。抗体的一个示例性剂量将处于约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围内。因此，可以向患者施用约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg(或其任意组合)的一个或多个剂量。所述剂量可以间歇地施用，例如每周或每3周(例如，从而患者接受约2个至约20个或例如约6个剂量的抗体)。可以施用较高的初始负荷剂量，随后是一个或多个较低剂量。示例性给药方案包括施用。然而，其它剂量方案可以是有用的。该疗法的过程可以容易地通过常规技术和测定监测。

[0300] F.制造品或试剂盒

[0301] 在本发明的另一个方面，提供了制造品或试剂盒，所述制造品或试剂盒包含含有抗IL-34抗体和药用载体的药物组合物。在一些实施方案中，药物组合物进一步含有CSF-1R抑制剂。在一些实施方案中，CSF-1R抑制剂是小分子抑制剂。在一些实施方案中，所述小分子抑制剂是GW2580。在另一个实施方案中，CSF-1R抑制剂是抗CSF-1R抗体。

[0302] 在一些实施方案中，试剂盒含有向个体施用有效量的药物组合物以治疗神经疾病的说明书。在一些实施方式中，神经疾病选自但不限于阿尔茨海默病，帕金森病，亨廷顿病，肌萎缩性侧索硬化，神经性疼痛，朊病毒病，脊髓小脑性共济失调，脊髓性肌萎缩，自闭症和自闭症谱系障碍。在一些实施方案中，神经疾病是阿尔茨海默病。

[0303] 所述制造品或试剂盒典型地包含容器和在所述容器上或与所述容器相结合的标签或包装插页。合适的容器包括，例如，瓶、小药瓶、注射器、静脉内溶液袋等。容器可以从多种材料诸如玻璃或塑料中形成。所述容器容纳了本身或与另一种组合物组合时可有效用于治疗、预防和/或诊断病症的组合物并且可以具有无菌接入口(例如所述容器可以是静脉内输液袋或是具有可由皮下注射针头刺透的瓶塞的小药瓶)。组合物中的至少一种活性剂是

本发明的抗体。标签或包装插页说明所述组合物用于治疗选择的疾病。此外，制造品或试剂盒可以包含(a)其中含有组合物的第一容器，其中所述组合物包含本发明的抗体；和(b)其中含有组合物的第二容器，其中所述组合物包含额外的治疗剂。在本发明的该实施方案中的制造品可以进一步包含包装插页，所述包装插页指明所述组合物可以用于治疗特定疾病。备选地或额外地，制造品或试剂盒可以进一步包含第二(或第三)容器，其包含药用缓冲液，诸如注射用抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、Ringer溶液和葡萄糖溶液。它可以进一步包括从商业和用户观点来看所需的其它材料，包括其它缓冲液、稀释剂、滤器、针和注射器。

实施例

[0304] 以下是本发明方法和组合物的实例。应当理解，鉴于上文提供的一般表述，可以实施多种其它实施方案。

[0305] 实施例1：抗IL-34抗体降低了小胶质细胞密度

[0306] 已经显示CSF1R信号传导途径对于小胶质细胞增殖和存活是必需的(Gomez-Nicola等人，2013，Elmore等人，2014)。对抑制CSF1R信号传导途径对小胶质细胞密度和形状的影响进行评价。通过用小分子抑制剂靶向受体和/或用针对其一个配体(IL-34)的中和抗体来抑制CSF1R途径。

[0307] 方法

[0308] IL-34消除

[0309] 用抗IL-34抗体(30或60mg/kg)或抗-gp120(对照mIgG2a抗体，60mg/kg)对2月龄雄性CX3CR1-GFP小鼠(其在小胶质细胞中表达GFP)进行腹膜内(IP)给药，每周两次，持续3周。另外一组小鼠接受如上所述给药的抗IL-34抗体(60mg/kg)和每天一次(图4)或两次(图2)口服(PO)给药的CSF1R小分子抑制剂GW2580(150mg/kg)的组合，持续3周。每组处理5只小鼠。

[0310] 小胶质细胞成像

[0311] 将小鼠麻醉，灌注盐水，并且收集脑并在4％多聚甲醛+10％蔗糖中在4摄氏度下固定过夜。固定后，将脑包埋在琼脂糖中并浸入PBS中，然后使用具有20X浸没物镜(Olympus)的双光子显微镜(Prairie Technologies Ultima IV显微镜，由Spectra Physics MaiTai DeepSee激光器驱动)整体成像。在使用910nm激光波长的躯体感觉皮层中，通过100μm的深度，以1024×1024像素的视野和1.5μm的z轴步长进行成像。使用定制图像分析程序在MATLAB(Mathworks)中对小胶质细胞密度和形态测定进行定量。

[0312] 结果

[0313] 与抗-gp120对照抗体相比，单独的以及与GW2580组合的抗IL-34抗体治疗均降低了小胶质细胞密度(图2和图4)。观察到剂量依赖性效应；30和60mg/kg剂量分别使小胶质细胞密度降低约27％和40％。组合的抗IL-34和GW2580治疗在每天给药一次时使小胶质细胞密度降低约60％，并且在每天给药两次时降低约80％(图3A和图5)。如增加的平均体细胞大小(图3B)、增加的细胞周长增加(图3C)和增加的平均小胶质细胞大小(图3D)所示，单独的和与GW2580组合的抗IL-34抗体治疗改变了小胶质细胞形状。没有观察到响应于小胶质细胞消除的小胶质细胞活化或星形胶质细胞增生的证据(图6A和6B、图7、图8A和8B)。在脊髓中还观察到小胶质细胞的消除。

[0314] 实施例2:抗IL-34抗体降低了小胶质细胞密度,而抗-CSF1抗体对小胶质细胞密度没有影响

[0315] 对抗IL-34抗体或抗-CSF1抗体对小胶质细胞密度和形状的影响进行评价。

[0316] 方法:

[0317] IL-34和CSF消除

[0318] 用抗IL-34抗体(10或100mg/kg)、抗-CSF1抗体(10或100mg/kg)、抗IL-34抗体(10mg/kg)加抗-CSF1抗体(10mg/kg)、或抗-gp120(对照mIgG2a抗体,100mg/kg)对2月龄雄性CX3CR1-GFP小鼠(其在小胶质细胞中表达GFP)进行腹膜内(IP)给药,每周两次,持续3周。另外一组小鼠接受如上所述给药的抗IL-34抗体(60mg/kg)和每天一次口服(PO)给药的CSF1R小分子抑制剂GW2580(150mg/kg)的组合,持续21天。每组处理5只小鼠。如实施例1所描述的在躯体感觉皮层中进行小胶质细胞成像,从皮层表面向下直至100微米,步长为1.5微米。

[0319] 结果

[0320] 与抗-gp120对照抗体相比,抗IL-34抗体治疗(100mg/kg剂量)以及抗IL-34加GW2580治疗均降低了小胶质细胞密度(图9和图10A)。单独的或与抗IL-34抗体组合的抗-CSF1抗体治疗对小胶质细胞密度没有影响(图9和图10A)。如增加的细胞周长(图10C)和增加的平均小胶质细胞大小(图10D)所示,单独的抗IL-34抗体治疗(100mg/kg剂量)和抗IL-34加GW2580治疗改变了小胶质细胞形状。抗IL-34加GW2580治疗也增加了平均体细胞大小(图10B)。在抗IL-34100mg/kg组中观察到体细胞大小增加的趋势,但是没有达到统计学显著性(图10B)。单独的或与抗IL-34抗体组合的抗-CSF1抗体治疗对小胶质细胞形状没有影响(图10B-10D)。不希望受到理论束缚,本文关于抗-CSF1抗体治疗所描述的结果可能受到错误折叠或错误纯化的抗-CSF1抗体蛋白的影响。小胶质细胞扩散、偏心度、圆度和平均小胶质细胞强度测量指示健康的细胞表型。

[0321] 实施例3:抗IL-34抗体和抗-CSF1抗体降低了脑的不同区域中的小胶质细胞密度

[0322] 对抗IL-34抗体或抗-CSF1抗体对脑的不同区域中的小胶质细胞密度和形状的影响进行评价。

[0323] 方法:

[0324] IL-34和CSF-1消除

[0325] 用抗IL-34抗体(60mg/kg)、抗-CSF1抗体(100mg/kg)、抗IL-34抗体(60mg/kg)加抗-CSF1抗体(100mg/kg)、或抗-gp120(对照mIgG2a抗体,60mg/kg)对2月龄雄性CX3CR1-GFP小鼠(其在小胶质细胞中表达GFP)进行腹膜内(IP)给药,每周两次,持续3周。另一组小鼠用对照小鼠食物或含有磨碎成食物的(290mg/kg食物)化合物X(对CSF-1R和对c-kit具有特异性的受体酪氨酸激酶抑制剂)的食物喂养21天。每组处理5只小鼠。

[0326] 结果

[0327] 与对照食物喂养的小鼠相比,用含有化合物X(290mg/kg食物)的小鼠食物喂养21天的CX3CR1-GFP小鼠显示出皮层灰质中小胶质细胞密度的显著降低,其降低小胶质细胞密度>90%(图11和图12)。为了测试消除皮层灰质中两种已知CSF1R配体的抗体的作用,用抗IL-34抗体、抗-CSF1抗体、抗IL-34抗体加抗-CSF1抗体、或对照抗体治疗CX3CR1-GFP小鼠。当与抗-gp120抗体治疗(60mg/kg)相比时,单独的或与抗-CSF1抗体(100mg/kg)组合的抗

IL-34抗体治疗(60mg/kg)降低了皮层灰质中的小胶质细胞密度,而单独的抗-CSF1抗体治疗(100mg/kg)对该组织中的小胶质细胞密度没有影响(图13和图14)。与在皮层灰质中观察到的结果相反,抗-CSF1抗体治疗降低了胼胝体的白质束中的小胶质细胞密度,导致比单独使用抗IL-34抗体治疗所观察到的更大的小胶质细胞密度降低(图15和图16)。当与抗-gp120对照抗体治疗相比时,用抗IL-34和抗-CSF1抗体二者治疗小鼠导致了胼胝体的白质束中的小胶质细胞密度降低大约10倍。与这些结果一致,与抗IL-34抗体相比,在用抗-CSF1抗体治疗的小鼠的海马伞的白质中观察到更大的小胶质细胞密度的降低,并且观察到用两种抗体治疗的加性效应(图17和图18)。与抗-gp120抗体治疗相比,单独的或组合的抗IL-34抗体和抗-CSF1抗体的治减少了海马中小胶质细胞占据的面积(图19和图20)。

[0328] 总之,这些数据表明消除CSF1R、CSF1和IL-34的两种已知配体的抗体的外周施用导致了小胶质细胞的区域特异性消除。用抗IL-34抗体治疗使皮层灰质中的小胶质细胞减少大约40%,但是在白质束中观察到最小消除。相反地,用抗-CSF1抗体治疗对皮层灰质小胶质细胞密度影响最小,但是在白质束中降低小胶质细胞密度达45%。不希望受到理论束缚,该数据表明CSF1R配体的药理学靶向将使小胶质细胞的脑区域特异性消除成为可能。

[0329] 实施例4:小鼠模型中阿尔茨海默病病理学中小胶质细胞、斑块和树突棘损失的关联。

[0330] 小胶质细胞构成脑中总细胞的10%,并且在组织内稳态和对损伤的应答中均起到许多作用。来自患者的证据已经长期暗示在阿尔茨海默病(AD)中小胶质细胞的作用。

[0331] 方法:

[0332] 小胶质细胞、斑块和神经元/突触成像

[0333] 对PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠(其中GFP在小胶质细胞中表达的AD模型)和PS2APP$^{+/+}$GFP-M小鼠(其中GFP在神经元/突触中表达的AD模型)注射甲氧-X04以麻醉前1天标记淀粉状蛋白斑块。将小鼠麻醉,灌注盐水,随后灌注4%PFA。然后灌注明胶和1%BSA-AlexaFluor680的混合物以标记血管。将尸体置于冰上以凝固血管铸型,并且收集脑并在4%多聚甲醛+10%蔗糖中在4摄氏度下固定过夜。固定后,将脑包埋在琼脂糖中并浸入PBS中,然后使用具有20X浸没物镜(Olympus)的双光子显微镜(Prairie Technologies Ultima IV显微镜,由Spectra Physics MaiTai DeepSee激光器驱动)整体成像。使用840nm和1020nm激光波长,通过100μm的深度,以1024×1024像素的视野和1.5μm的z轴步长进行成像。使用定制图像分析程序在MATLAB(Mathworks)中对小胶质细胞密度和形态测定进行定量。

[0334] 小胶质细胞的EdU标记

[0335] 对小鼠注射5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)以标记分裂细胞。小鼠每天注射EdU一次,持续3天,IP(50mg/kg)。最后一次注射三周后,将小鼠麻醉并灌注盐水,然后灌注4%PFA,并且收集脑并在4%多聚甲醛+10%蔗糖中在4摄氏度下固定过夜。进行Iba1的免疫组织化学(Wako Chemical,产品#019-19741)和检测EdU的Click-it反应(Thermo Fischer Scientific,产品#C10338)。使用63X物镜在Zeiss LSM710共焦上拍摄图像。

[0336] 结果

[0337] 在13至32周龄的PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中对小胶质细胞、血管和致密核心淀粉状蛋白斑块进行成像(图21A)。在更老的小鼠中观察到致密核心淀粉状蛋白斑块形成的增

加，伴随着小胶质细胞数目的增加。为了进一步表征更老的小鼠中小胶质细胞和淀粉状蛋白斑块的关联，测量小胶质细胞密度作为与18至52周龄的PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠中的淀粉状蛋白斑块的距离的函数(图21B)。有趣的是，在40μm的淀粉状蛋白斑块内观察到小胶质细胞密度的显著增加，这表明这些斑块周围的小胶质细胞的显著积聚。从大约32周龄开始，相对于它们的野生型对应物，在PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP的脑中观察到总小胶质细胞数目的显著增加(图21C)，在PS2APP$^{+/+}$小鼠中从约24周龄开始观察到小胶质细胞增殖的急剧上升(图21D)。

[0338] 为了测试斑块对树突棘损失和突触密度的影响，在PS2APP$^{+/+}$GFP-M小鼠中对神经元/突触、血管和致密核心淀粉状蛋白斑块进行成像(图22A)。随着这些小鼠变老，在致密核心淀粉状蛋白斑块附近树突棘密度降低，但是远离斑块的树突棘密度与PS2APP$^{-/-}$小鼠相似(图22B)。随着PS2APP$^{+/+}$GFP-M小鼠变老，在斑块数目/密度与突触密度之间观察到强相关性(图22C和图22D)。对于40μm的淀粉状蛋白斑块内的突触，观察到突触密度降低大约33％。总之，该数据表明树突损失对致密核心淀粉状蛋白斑块是局灶性的，并且致密核心淀粉样蛋白斑附近观察到的增加的小胶质细胞增殖/积聚与树突棘损失一致。

[0339] 实施例5：在小鼠模型中抗IL-34抗体对阿尔茨海默病病理学的影响

[0340] 小胶质细胞构成脑中总细胞的10％，并且在组织内稳态和对损伤的应答中均起到许多作用。来自患者的证据已经长期暗示在阿尔茨海默病(AD)中小胶质细胞的作用。对AD的小鼠模型中消除小胶质细胞的效应进行评价。

[0341] 方法：

[0342] IL-34消除

[0343] 使用GW2580和抗IL-34治疗PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠(其中GFP在小胶质细胞中表达的AD模型)以消除小胶质细胞。采用5个治疗组，每组10只PS2APP小鼠。表2显示了各治疗组的抗体剂量。

[0344] 表2：PS2APP$^{+/+}$CX3CR1-GFP小鼠治疗组

[0345]

组	治疗
1	赋形剂+60mg/kg抗-gp120
2	150mg/kg GW2580+60mg/kg抗-IL-34
3	赋形剂+60mg/kg抗-gp120
4	150mg/kg GW2580+60mg/kg抗-IL-34
5	150mg/kg GW2580+60mg/kg抗-IL-34

[0346] 用CSF1R小分子抑制剂GW2580(悬浮于MCT中)(150mg/kg(＜0.25mL)，每天一次，PO)以及抗IL-34抗体(60mg/kg，每周两次，IP)治疗小鼠。按照相同的给药时间表，用赋形剂(PO)和抗-gp120治疗对照小鼠。

[0347] 第1组和第2组给药4周，并在施用最后剂量的GW2580或赋形剂用于组织收集之后3-8小时被安乐死。第3组和第4组给药8周，并在施用最后剂量的GW2580或赋形剂用于组织收集之后3-8小时被安乐死。第5组给药4周，允许最后剂量后恢复4周，并被安乐死。

[0348] 活动的旷场评价

[0349] 通过在旷场中测试小鼠来评价治疗对一般活性的影响。在旷场评价自发运动活动

揭示了神经传递、运动功能和/或学习和记忆的变化。将小鼠置于由灰色塑料制成的新型开放室(40cm×40cm)中,并允许自由地探测15分钟。通过来自头顶上安装的摄像机的视频跟踪来记录活动。

[0350] 在治疗的最后一周,在给药之前和给药后1-2小时进行该测试,以评价对适应环境的时间过程。每只小鼠最多进行一次试验/天。由于在试验期间动物可以在室内自由移动,所以预期对动物没有不利影响或显著不适。

[0351] AD疾病病理学

[0352] 评价小胶质细胞消耗对PS2APP小鼠模型中AD病理的影响,包括树突棘密度、树突分枝和淀粉状蛋白斑块密度/大小。

[0353] 结果

[0354] 按照图23A中描述的给药时间表,用CSF1R小分子抑制剂GW2580加抗IL-34抗体(消耗,GW2580/抗IL-34)的组合或者赋形剂加抗-gp120(对照,MCT/抗-gp120)的组合治疗5组(如上表2中所描述的)$PS2APP^{+/+}CX3CR1$-GFP小鼠。与用赋形剂加抗-gp120抗体对照治疗的小鼠相比,用CSF1R小分子抑制剂GW2580加抗IL-34抗体治疗4周的小鼠显示出小胶质细胞密度降低(图23B)。相对于对照治疗4周和8周的小鼠,用CSF1R小分子抑制剂GW2580加抗IL-34抗体治疗4周或8周的小鼠的小胶质细胞密度降低大约两倍(图23C)。小鼠用CSF1R小分子抑制剂GW2580加抗IL-34抗体治疗4周,然后使其在没有药物治疗的情况下反弹4周,发现虽然这些小鼠中小胶质细胞密度没有恢复到对照组中所观察到的水平,但是相对于4周和8周消耗组,小胶质细胞密度显著增加(图23C)。

[0355] 为了测试在这些小鼠中小胶质细胞消耗对AD病理的影响,测量了对照组和消耗组的树突棘密度(图23D)。在每组小鼠中测量接近(小于20微米)和远离(大于50微米)斑块的树突棘密度的比率。相对于在相关对照小鼠中的树突棘密度,在4周和8周消耗小鼠中斑块附近的树突棘密度显著增加(图23E)。小胶质细胞消耗对斑块密度没有影响(图24),对斑块大小没有影响(图25),对星形胶质细胞没有影响(图26),并且对旷场任务中的活动没有影响(图27)。通过Iba1免疫组织化学证实了小胶质细胞的消耗(图28)。不希望受到理论束缚,该数据表明斑块附近的树突棘明显更不稳定,并且在小胶质细胞的存在下更快地翻转。

[0356] 实施例6:在神经性疼痛的小鼠模型中的小胶质细胞消除

[0357] 脊髓小胶质细胞被认为促进了神经性疼痛。小鼠模型用以通过确定1)在完整(未损伤)动物中抑制剂治疗是否类似于皮层小胶质细胞对脊髓小胶质细胞产生影响、2)抑制剂治疗对由外周神经损伤引起的脊髓小胶质细胞的局灶性增殖的影响以及3)小胶质细胞消耗如何影响神经性疼痛的小鼠模型中的超敏反应的发展,来确定小胶质细胞的消耗是否可以预防或改善神经性疼痛。

[0358] 方法

[0359] 神经性疼痛的保留性神经损伤(SNI)模型

[0360] 本文讨论的技术基于Shields等人(2003,J Pain 4(8):465-470)。外科医生使用无菌技术并遵守IACUC的“啮齿动物生存手术指南(Rodent Survival Surgery Guidelines.)”。将计划切开的部位(在膝盖背部的腘窝处的三叉分枝平面上在坐骨神经之上)剃光,并用聚维酮碘(betadine)进行预备,然后用酒精擦拭。切开前施用局部利多卡因。在手术期间和手术后,将动物保温(例如使用循环加热垫)。如下进行该方法:在一侧将腘区

域切出皮肤切口，分开覆盖坐骨神经的肌肉，并分离坐骨神经。在该平面上，坐骨神经分叉为腓肠神经、腓总神经和胫神经。将腓肠神经和腓总神经单独地通过细丝缝线扎紧并在缝线的远端切断。小心不要接触或损伤保留的胫神经。在假手术的情况下，坐骨神经如所述那样暴露，但未被操纵。随后，将肌肉带回原来的解剖位置，并使用吻合器将覆盖的皮肤关闭。这是一个单侧方法；对侧保持完好。在循环加热垫上回收动物。观察他们直到他们从麻醉中恢复，然后回到笼子中的动物房。

[0361] 给药

[0362] 对于所有的研究，抑制剂治疗组接受抗IL-34抗体(60mg/kg，i.p.，2次/周)+GW2580(150mg/kg，p.o.，每天)，并且赋形剂治疗组接受相同的剂量方案，但仅使用赋形剂。抗IL-34抗体的赋形剂是无菌磷酸盐缓冲盐水(PBS)。Gw2580的赋形剂是MCT。腹膜内(i.p.)和口服(p.o.)给药以不大于10ml/kg的体积进行。

[0363] 行为测试

[0364] 机械阈值的冯弗雷(von Frey)测试

[0365] 在高架金属丝网表面上的独立有机玻璃(plexiglas)测试室中使小鼠习惯45-60分钟。这些室的大小足以使动物可以自由移动而不受限制。按照上下法(up-down method)(Chaplan等人，1994，J Neurosci Methods 53:55-63)，将已校准以提供精确力的尼龙长丝一次一个地施加到每只动物的跖面上。简言之，如果小鼠响应于长丝刺激而撤回其后爪，那么稍后用系列中下一个较弱的长丝进行刺激；如果小鼠对给定的长丝没有反应，那么用系列中下一个更强的长丝再次进行刺激。继续刺激直到围绕撤回阈值记录了六次响应。呈现给小鼠的刺激的范围从0.008g到2.0g。

[0366] 丙酮蒸发冷却测试

[0367] 如上所述使小鼠习惯。向无针的1ml注射器注入丙酮并保持尖端向上，并且按下柱塞直到少量的丙酮从尖端溢出，由表面张力保持。将该丙酮泡一次一个地与各动物的一只后爪的跖面接触，并且记录小鼠对该刺激作出反应的时间量。丙酮在与皮肤接触后立即开始蒸发，产生清凉的感觉，对于这样的感觉，动物典型地通过摇动受影响的后爪、高举所述后爪或者舔所述后爪或踝而作出反应。不具有神经病的正常小鼠花费1秒或更少的时间对丙酮刺激作出反应，而神经病的小鼠可能花费长达20秒来作出反应。

[0368] 研究组

[0369] 第1-6组：在SNI之前消除小胶质细胞

[0370] 使用第1-6组(表3)的实验用于确定小胶质细胞消耗对神经性疼痛的最大作用。第1-6组中的小鼠在第-7天(SNI前七天)开始赋形剂或抑制剂治疗。为了建立基线前SNI小胶质细胞状态和评价抑制剂治疗对脊髓小胶质细胞的作用，在赋形剂或抑制剂治疗(不进行SNI手术)7天后，在麻醉下对第1-2组的小鼠进行灌注。第3-6组中的小鼠在第0天接受SNI手术。在SNI后第7天(即未治疗动物在脊髓中展现最大小胶质细胞活化的时间)，在麻醉下对第3-4组中的小鼠进行灌注；这用于不仅确定抑制剂治疗对在基线处消耗小胶质细胞是如何有效的，而且还确定抑制剂治疗对抑制由外周神经损伤引起的小胶质细胞增殖是如何有效的。第5-6组中的小鼠在相对于SNI的第-1、1、3、7、10和14天进行行为评价。行为评价由机械阈值的冯弗雷测试和丙酮蒸发冷却测试(如前所述)组成。在SNI后第14天进行行为测试之后，将第5-6组中的小鼠通过吸入CO2进行安乐死。

[0371] 表3:治疗组1-6:SNI之前的小胶质细胞的消除

[0372]

组	参数
1	组织学-赋形剂治疗,在SNI之前收集组织(n=5)
2	组织学-抑制剂治疗,在SNI之前收集组织(n=5)
3	组织学-在SNI之前开始的赋形剂治疗,SNI后7天收集组织(n=5)
4	组织学-在SNI之前开始的抑制剂治疗,SNI后7天收集组织(n=5)
5	行为-在SNI之前开始的赋形剂治疗(n=10)
6	行为-在SNI之前开始的抑制剂治疗(n=10)

[0373] 第7-10组:SNI之后的小胶质细胞的消除

[0374] 评价在神经损伤后不久开始抑制剂治疗以避免神经性疼痛发展的能力。使用第7-10组(表4)的实验用于确定在临床相关背景(即在神经损伤之后而不是之前)中抑制小胶质细胞应答是否可以避免神经性疼痛。

[0375] 第7-10组中的小鼠在第0天进行SNI手术,然后在SNI后第3天开始赋形剂或抑制剂治疗。在SNI后第7天(即未治疗动物在脊髓中展现最大小胶质细胞活化的时间),在麻醉下对第7-8组中的小鼠进行灌注,以评价在神经损伤后不久施用抑制剂治疗对小胶质细胞活化的作用。第9-10组中的小鼠在相对于SNI的第-1、1、3、7、10和14天进行行为评价。行为评价由机械阈值的冯弗雷测试和丙酮蒸发冷却测试组成。在SNI后第14天进行行为测试之后,将第9-10组中的小鼠通过吸入CO2进行安乐死。

[0376] 表4:治疗组7-10:SNI之后的小胶质细胞的消除

[0377]

组	参数
7	组织学-在SNI之后3天开始的赋形剂治疗,SNI后7天收集组织(n=5)
8	组织学-在SNI之后3天开始的抑制剂治疗,SNI后7天收集组织(n=5)
9	行为-在SNI之后3天开始的赋形剂治疗(n=10)
10	行为-在SNI之后3天开始的抑制剂治疗(n=10)

[0378] 第11-13组:抑制剂治疗对神经性疼痛的小胶质细胞依赖性效应的对照

[0379] 使用第11-13组(表5)的实验用于确定抑制剂治疗是否通过小胶质细胞起作用。当神经性疼痛仍然存在但小胶质细胞参与最小时施用治疗使得能够确定是否抑制剂起作用以与其对小胶质细胞作用分开的方式使疼痛阈值正常化。

[0380] 第11-13组中的小鼠在第0天接受SNI手术。在SNI后第28天(即神经损伤介导的小胶质细胞活化回到基线的时间),在麻醉下对第11组中的小鼠进行灌注。第12-13组中的小鼠在相对于SNI的第-1、1、3、7、10、14、21、28、35和42天进行行为评价,并且在SNI后第28天开始赋形剂或抑制剂治疗。在SNI后第42天进行行为测试之后,将第12-13组中的小鼠通过吸入CO2进行安乐死。

[0381] 表5:治疗组11-13:抑制剂对神经性疼痛的小胶质细胞依赖性效应的对照

[0382]

组	参数
11	组织学-在SNI之后28天收集组织(n=5)

12	行为-在SNI之后28天开始的赋形剂治疗(n＝10)
13	行为-在SNI之后28天开始的抑制剂治疗(n＝10)

[0383] 实施例7:在SOD1小鼠模型中小胶质细胞消耗对ALS病理的影响

[0384] 小胶质细胞在组织内稳态和对损伤的应答中起到许多作用。神经炎症(包括小胶质细胞活化)是家族性和散发性ALS患者以及该疾病的小鼠模型的标志。

[0385] 通过经由免疫组织化学评价小胶质细胞消耗后的小胶质细胞活化、星形胶质细胞增生和运动神经元存活以及通过经由EM的坐骨神经中的轴突退行性变对SOD1小鼠模型中小胶质细胞消耗对ALS病理的影响进行评价。

[0386] 方法

[0387] 从8-14周龄开始,向小鼠IP给药IL-34的中和抗体或对照抗-gp120抗体(＜0.25mL),每周两次,持续6周。将第2和3组中的小鼠另外用赋形剂(MCT,第2组)或CSF1R小分子抑制剂GW2580(第3组)以150mg/kg(＜0.25mL)进行PO治疗,每天一次,持续6周。实验设计和治疗组的细节在表6中示出。治疗后,通过评价小胶质细胞活化、星形胶质细胞增生和运动神经元存活以及通过经由EM的坐骨神经中的轴突退行性变对ALS病理进行评价。

[0388] 表6:实验设计

[0389]

组	参数
1	10只SOD1雌性小鼠;抗IL-34 60mg/kg
2	10只SOD1雌性小鼠;抗gp120 60mg/kg+MCT
3	10只SOD1雌性小鼠;抗IL-34 60mg/kg+GW280 150mg/kg
4	5只CX3CR1-GFP雌性小鼠;抗IL-34 60mg/kg
5	5只CX3CR1-GFP雌性小鼠;未经治疗

序列表

<110> 健泰科生物技术公司
EASLEY-NEAL, Courtney
WEIMER, Robby
ZARRIN, Ali

<120> 用于使用抗IL-34抗体以治疗神经疾病的组合物和方法

<130> 146392031740

<140> 未指定
<141> 同时与此一起

<150> 62/170,069
<151> 2016-06-02

<160> 78

<170> 用于Windows4.0版的FastSEQ

<210> 1
<211> 242
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

[0001]

<400> 1
Met Pro Arg Gly Phe Thr Trp Leu Arg Tyr Leu Gly Ile Phe Leu Gly
1 5 10 15
Val Ala Leu Gly Asn Glu Pro Leu Glu Met Trp Pro Leu Thr Gln Asn
20 25 30
Glu Glu Cys Thr Val Thr Gly Phe Leu Arg Asp Lys Leu Gln Tyr Arg
35 40 45
Ser Arg Leu Gln Tyr Met Lys His Tyr Phe Pro Ile Asn Tyr Lys Ile
50 55 60
Ser Val Pro Tyr Glu Gly Val Phe Arg Ile Ala Asn Val Thr Arg Leu
65 70 75 80
Gln Arg Ala Gln Val Ser Glu Arg Glu Leu Arg Tyr Leu Trp Val Leu
85 90 95
Val Ser Leu Ser Ala Thr Glu Ser Val Gln Asp Val Leu Leu Glu Gly
100 105 110
His Pro Ser Trp Lys Tyr Leu Glu Glu Val Glu Thr Leu Leu Leu Asn
115 120 125
Val Gln Glu Gly Leu Thr Asp Val Glu Val Ser Pro Lys Val Glu Ser
130 135 140
Val Leu Ser Leu Leu Asn Ala Pro Gly Pro Asn Leu Lys Leu Val Arg
145 150 155 160
Pro Lys Ala Leu Leu Asp Asn Cys Phe Arg Val Met Glu Leu Leu Tyr
165 170 175
Cys Ser Cys Cys Lys Gln Ser Ser Val Leu Asn Trp Gln Asp Cys Glu
180 185 190
Val Pro Ser Pro Gln Ser Cys Ser Pro Glu Pro Ser Leu Gln Tyr Ala
195 200 205
Ala Thr Gln Leu Tyr Pro Pro Pro Pro Trp Ser Pro Ser Ser Pro Pro
210 215 220
His Ser Thr Gly Ser Val Arg Pro Val Arg Ala Gln Gly Glu Gly Leu
225 230 235 240
Leu Pro

<210> 2
<211> 972
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

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
225 230 235 240
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
305 310 315 320
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

[0002]

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
545 550 555 560
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
625 630 635 640
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 Glu 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
705 710 715 720
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
[0003] 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
785 790 795 800
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 Glu 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
865 870 875 880
Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu
885 890 895
Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu
900 905 910
Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser
915 920 925
Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
930 935 940
Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
945 950 955 960
Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
965 970

<210> 3
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 4
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
[0004] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Phe Tyr Phe Pro Asn
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 5
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 6
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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

[0005]

<210> 7
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 8
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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Thr Ala Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 9
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
[0006] Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 10
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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Val Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 11
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0007]

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 12
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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 13
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

```
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
            20                  25                  30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Gly Ile Asn Glu Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr Trp
            100                 105                 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 14

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

[0008]

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 15

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

115

<210> 16
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 16
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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

[0009]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 17
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 18
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 18
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 19
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15
Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 20
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 21
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 21
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
20

[0010]

<210> 22
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 22
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 23
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 23
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 24
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser His Ile Asp Trp Tyr Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Gly Pro Asp Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

[0011]

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 26
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 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Ser Glu Pro Val
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 27
Ala Arg Gly Ile Asn Gln Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp
1 5 10

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 28
Ala Arg Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 29
Ala Arg Ser Arg Gly Ala Tyr Arg Phe Ala
1 5 10

[0012]

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 30
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Thr
1 5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 31
Gly Phe Thr Phe Thr Ser Asn
1 5

<210> 32
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 32
Gly Ile Asn Gln Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 33
Gly Leu Gly Lys Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 34
Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr
1 5 10

[0013]

<210> 35
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 35
Pro Ala Ser Gly Asp
1 5

<210> 36
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 36
Pro Tyr Ser Gly Tyr
1 5

<210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 37
Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
1 5

<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 38
Gln Gln Ser Phe Tyr Phe Pro Asn
1 5

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 39
Gln Gln Ser Phe Tyr Phe Pro Asn Thr
1 5

[0014]

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 40
Gln Gln Ser Arg Thr Ala Arg Pro
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 41
Gln Gln Ser Arg Thr Ala Arg Pro Thr
1 5

<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 42

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
1 5

<210> 43
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 43
Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 44
Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr
1 5

[0015]

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 45
Gln Gln Tyr Ser Asp Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 46
Gln Gln Tyr Ser Asp Val Pro Tyr
1 5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 47
Gln Gln Tyr Ser Asp Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 48
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 48
Gln Gln Tyr Thr Ala Leu Pro Tyr
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 49
Gln Gln Tyr Thr Ala Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

[0016]

<220>
<223> 合成构建体

<400> 50
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 51
Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 52

Arg Ile Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 53
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 54
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 54
Ser Ile Thr Pro Ala Ser Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

[0017]

<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 55
Ser Asn Tyr Ile His
1 5

<210> 56
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 56
Ser Arg Gly Ala Tyr Arg Phe Ala Tyr
1 5

<210> 57
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 57
Ser Ser Thr Trp Ile His
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 58
Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr
1 5

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 59
Ser Thr Trp Ile His
1 5

[0018]

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 60
Thr Ser Asn Tyr Ile His
1 5

<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 61
Trp Val Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Thr Asn
1 5 10

<210> 62
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 62
Trp Val Ala Arg Ile Ser Pro Tyr Tyr Tyr Tyr Ser Asp
1 5 10

<210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 63
Trp Val Ala Ser Ile Thr Pro Ala Ser Gly Asp Thr Asp
1 5 10

<210> 64
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 2
<223> Xaa = Asn或Thr

<220>
[0019] <221> 变体(VARIANT)
<222> 3
<223> Xaa = Tyr或Trp

<400> 64
Ser Xaa Xaa Ile His
1 5

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 1
<223> Xaa = Ser或Arg

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 3
<223> Xaa = Thr或Ser

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 5
<223> Xaa = Ala或Tyr

<220>

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 6
<223> Xaa = Ser或Tyr

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 7
<223> Xaa = Gly或Tyr

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 8
<223> Xaa = Asp或Tyr

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 9
<223> Xaa = Thr或Ser

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 10
<223> Xaa = Asp或Asn

<400> 65
Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

[0020]

<210> 66
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 2
<223> Xaa = Leu或Ile

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 3
<223> Xaa = Gly或Asn

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 4
<223> Xaa = Lys或Gln

<400> 66
Gly Xaa Xaa Xaa Gly Ser Lys Arg Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 67
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 3
<223> Xaa = Ser或Tyr

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 5
<223> Xaa = Tyr, Thr, Ser, Phe,或Arg

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 7
<223> Xaa = Thr, Ala, Asp,或Tyr

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 8
<223> Xaa = Thr, Leu, Val, Phe,或Ala

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 9
<223> Xaa = Pro或Arg

<220>
<221> 变体(VARIANT)
<222> 10
<223> Xaa = Pro, Tyr,或Asn

<400> 67
[0021]
```
Gln Gln Xaa Ile Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Thr
 1               5                  10
```

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 68
```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
            20                  25                  30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Arg Ile Ser Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Ser Met Arg Ala Arg Arg Gly Phe Asp Tyr
            100                 105
```

<210> 69
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 69
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 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 70
Ser Asn Trp Ile His
1 5

[0022]

<210> 71
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 71
Arg Ile Ser Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 72
Ser Met Arg Ala Arg Arg Gly Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 73
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 73
Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5

<210> 74
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 74
His Ile Asp Trp Tyr Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 75
[0023] Gly Gly Pro Asp Tyr Ala Met Asp Val
1 5

<210> 76
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 76
Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

<400> 77
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ser
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建体

[0024]

<400> 78
Gln Gln Tyr Trp Ser Glu Pro Val Thr
1 5

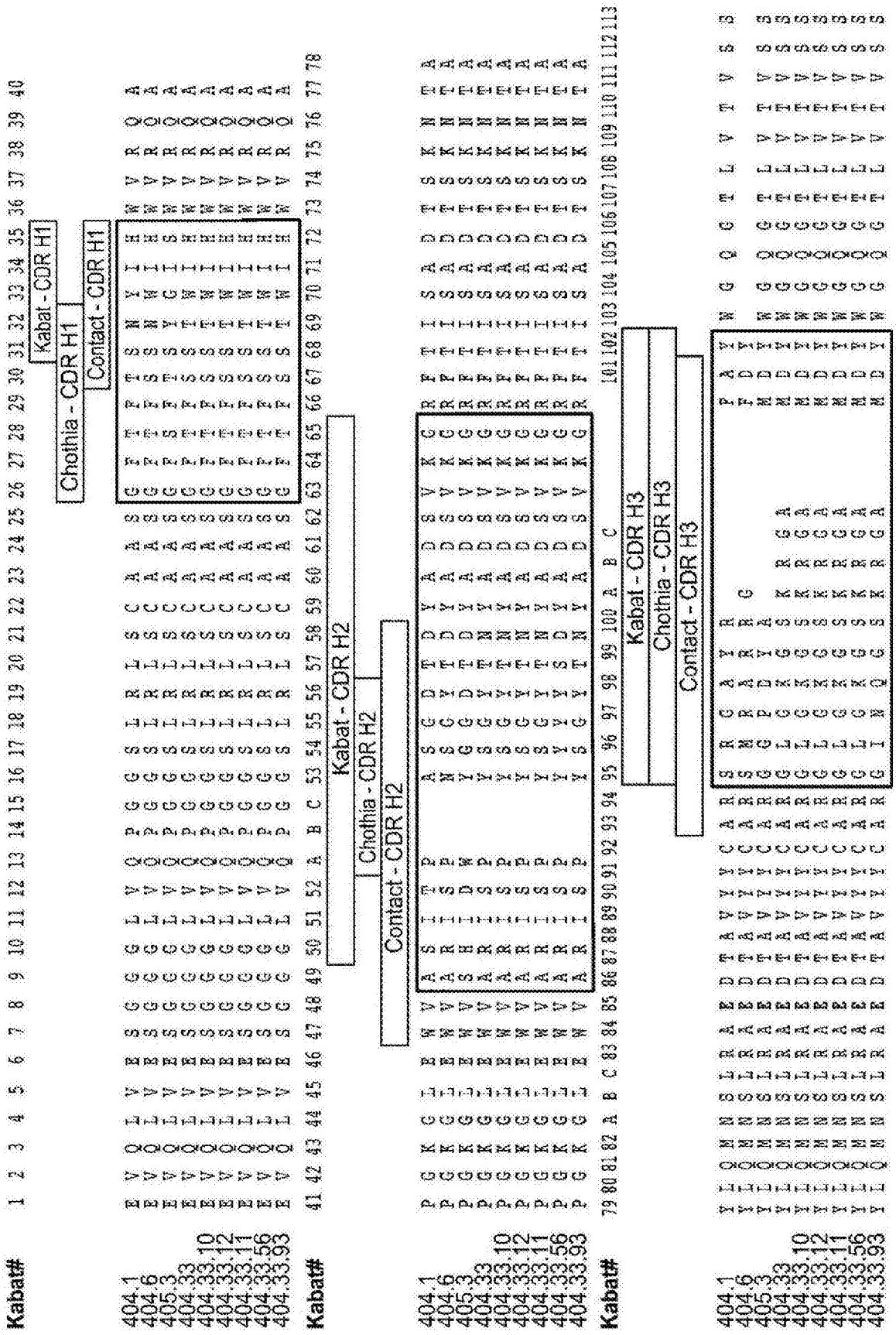

Kabat - CDR H1
Chothia - CDR H1
Contact - CDR H1
Kabat - CDR H2
Chothia - CDR H2
Contact - CDR H2
Kabat - CDR H3
Chothia - CDR H3
Contact - CDR H3
Kabat#

图1A

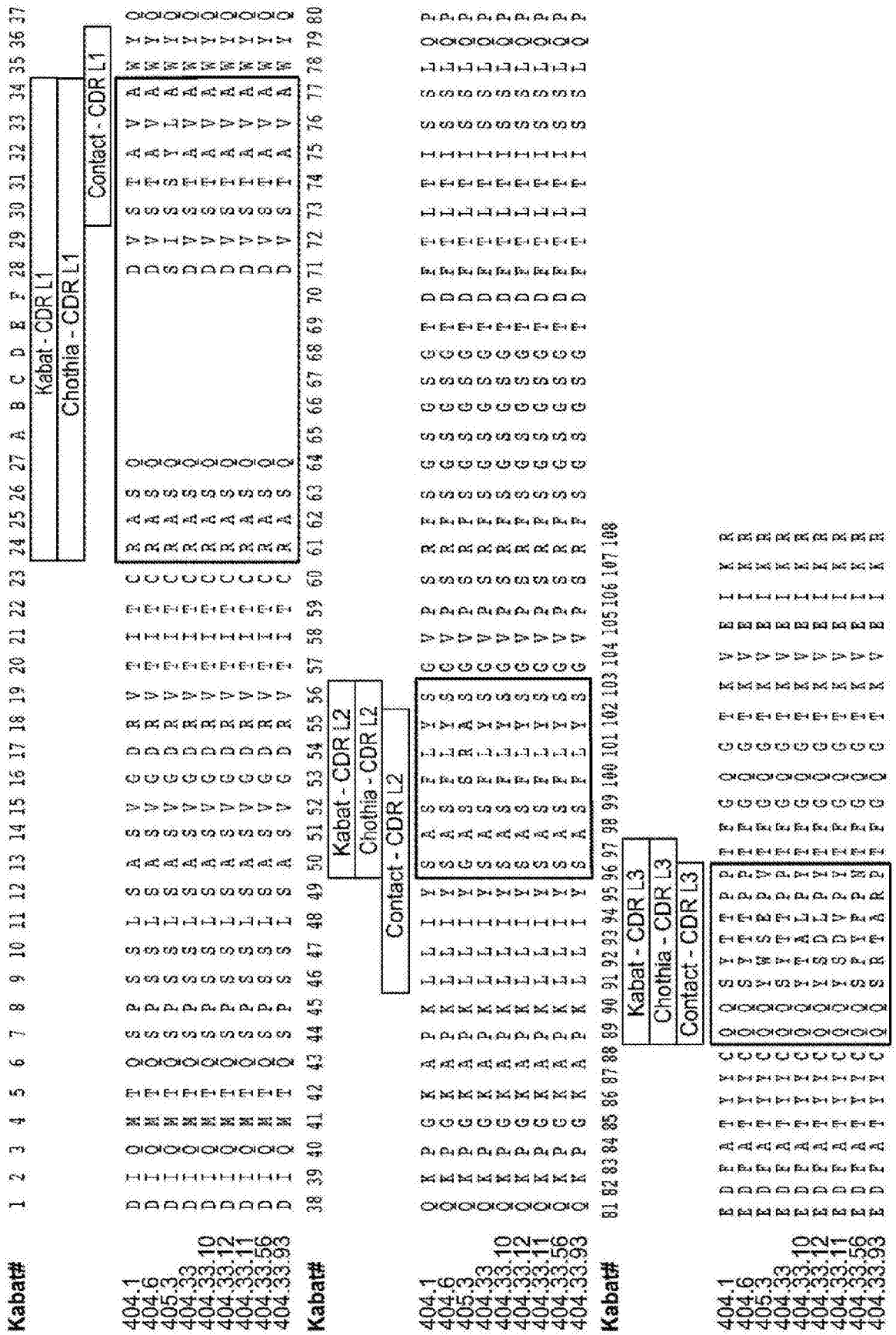

Kabat - CDR L1
Chothia - CDR L1
Contact - CDR L1
Kabat - CDR L2
Chothia - CDR L2
Contact - CDR L2
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contact - CDR L3
Kabat#

图1B

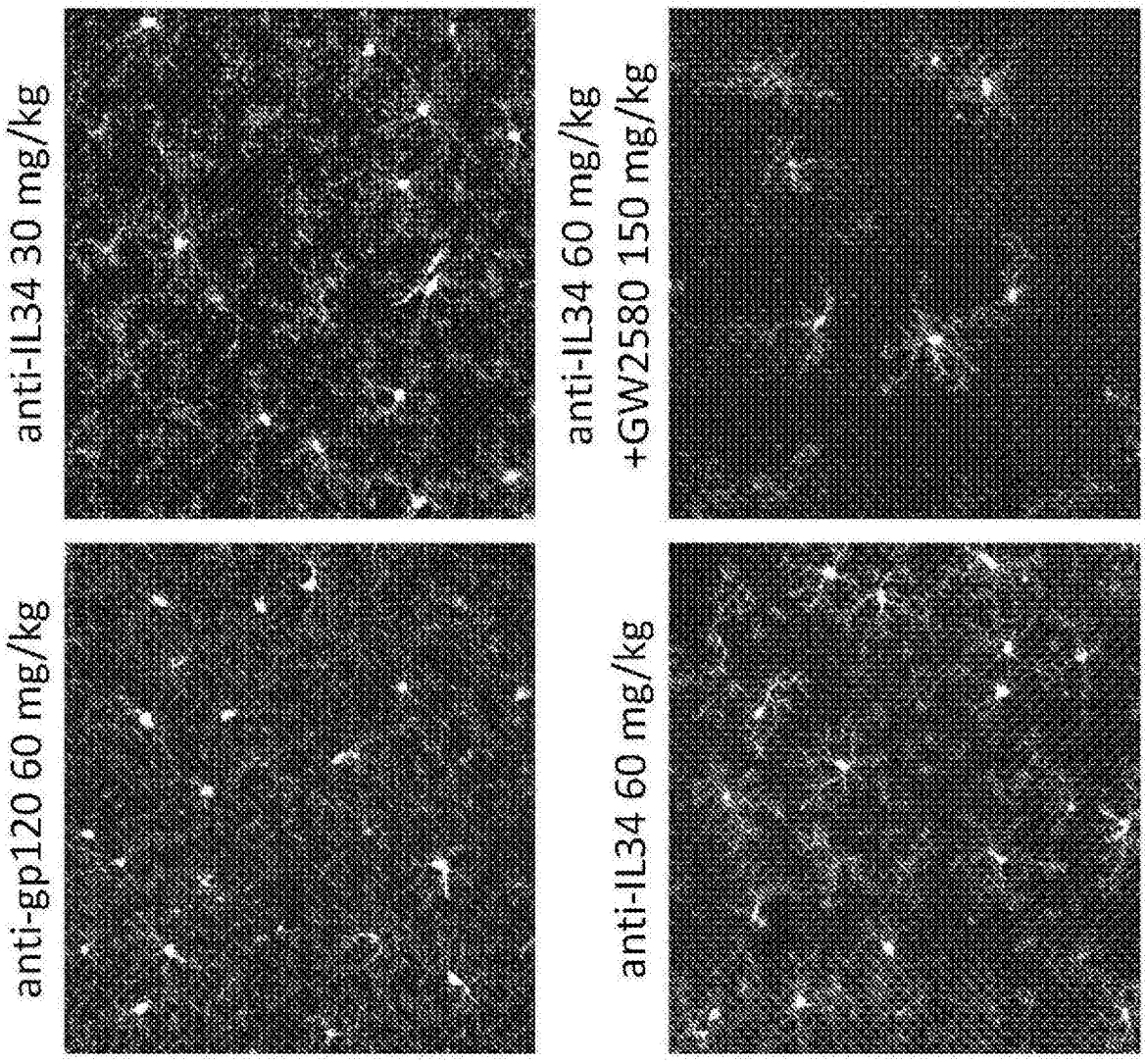

anti-IL34 30 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg
+GW2580 150 mg/kg
anti-gp120 60 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg

图2

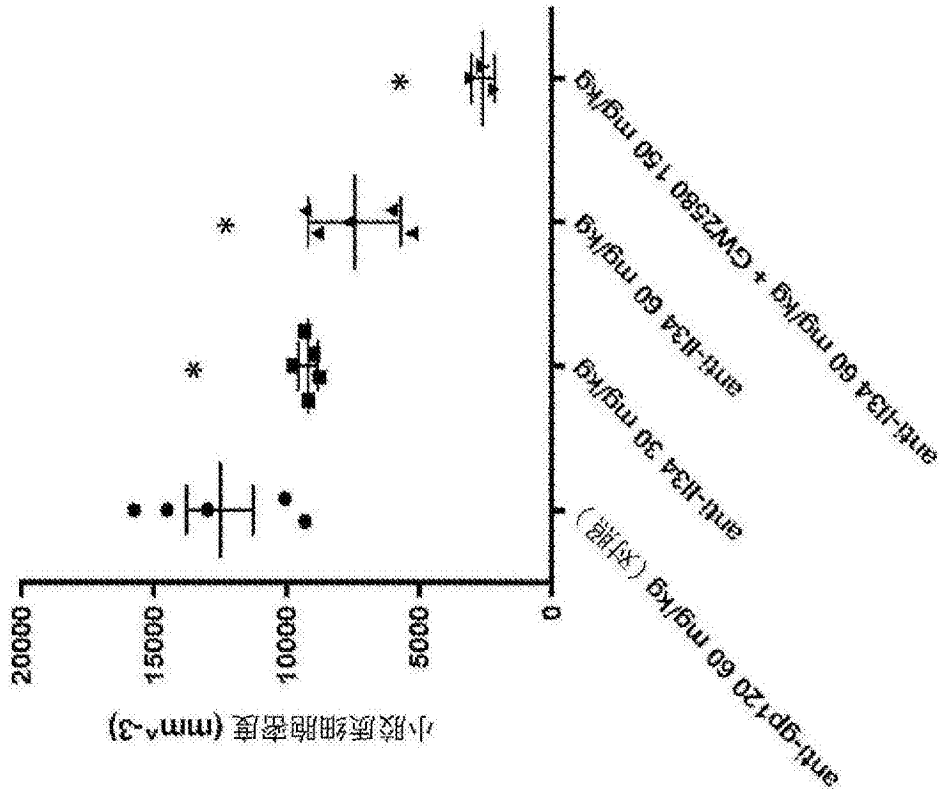

小胶质细胞密度 (mm^-3)
20000
15000
10000
5000
0
anti-gp120 60 mg/kg (对照)
anti-IL34 30 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg + GW2580 150 mg/kg

图3A

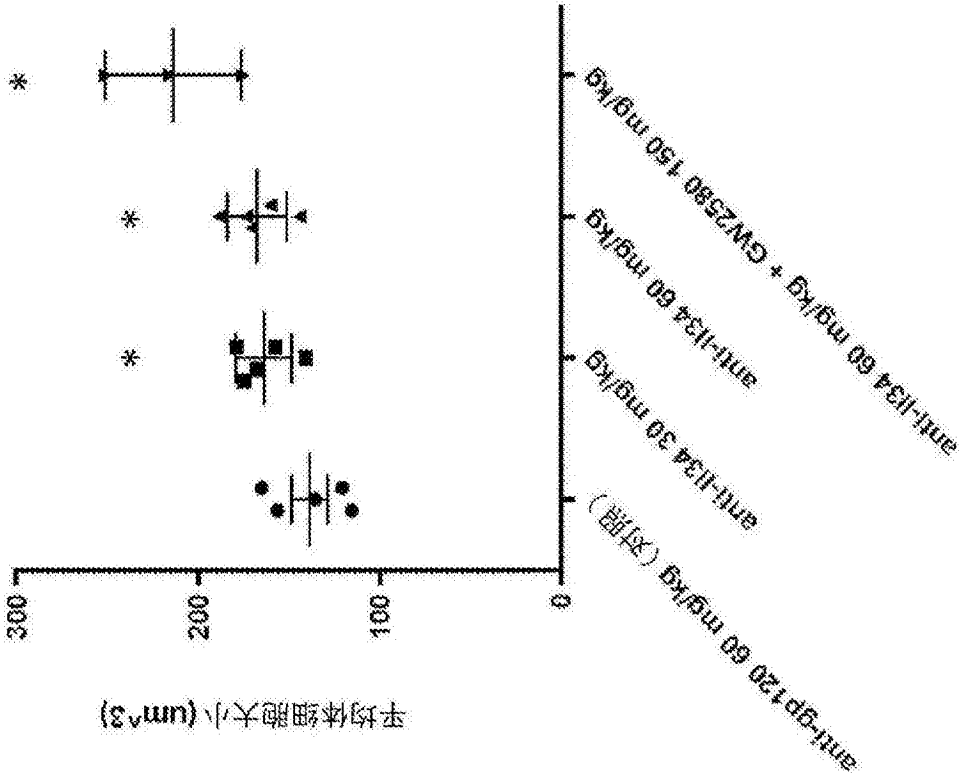

平均体细胞大小 (um^3)
300
200
100
0
anti-gp120 60 mg/kg (对照)
anti-IL34 30 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg + GW2580 150 mg/kg

图3B

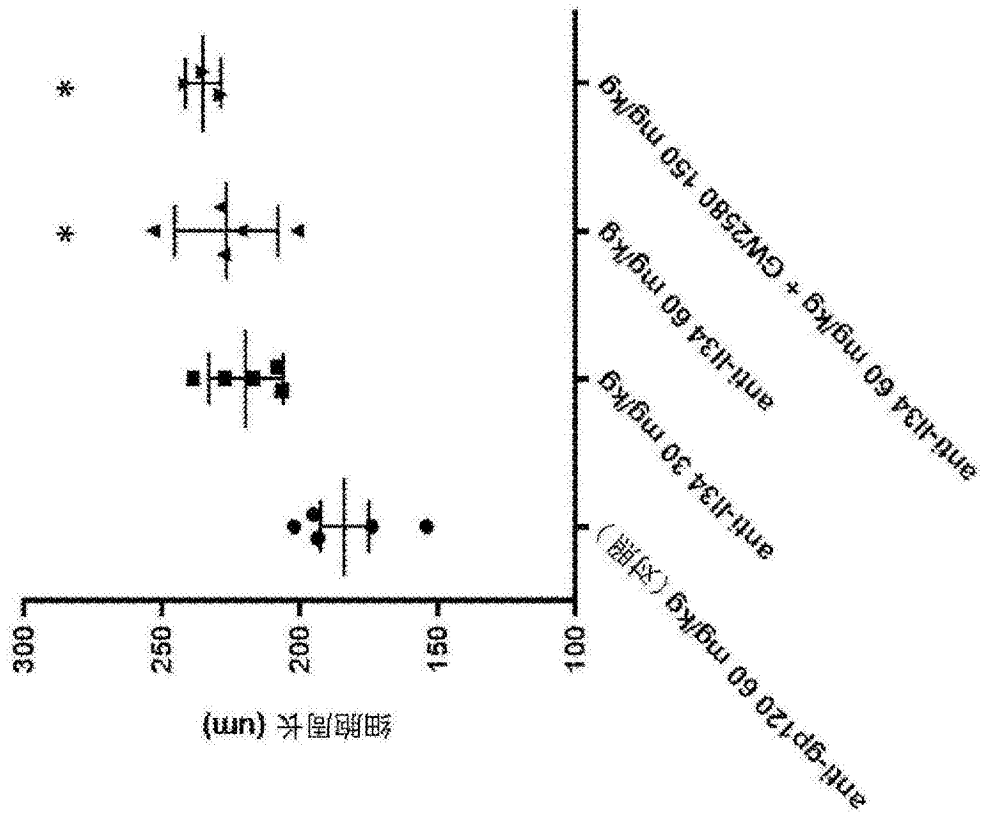

细胞周长 (um)
300
250
200
150
100
anti-gp120 60 mg/kg (对照)
anti-il3a 30 mg/kg
anti-il3a 60 mg/kg
anti-il3a 60 mg/kg + GW2580 150 mg/kg

图3C

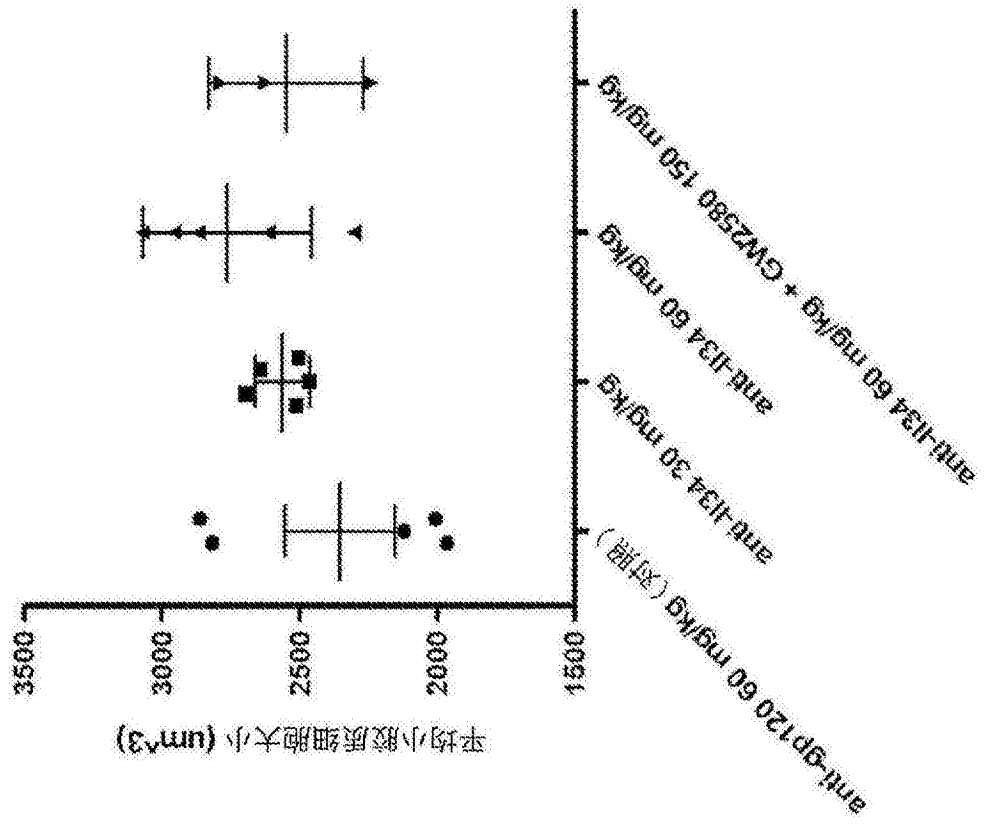

anti-GP120 60 mg/kg (对照)
anti-IL3A 30 mg/kg
anti-IL3A 60 mg/kg
anti-IL3A 60 mg/kg + GW2580 150 mg/kg
1500
2000
2500
3000
3500
平均小胶质细胞大小 (um^3)

图3D

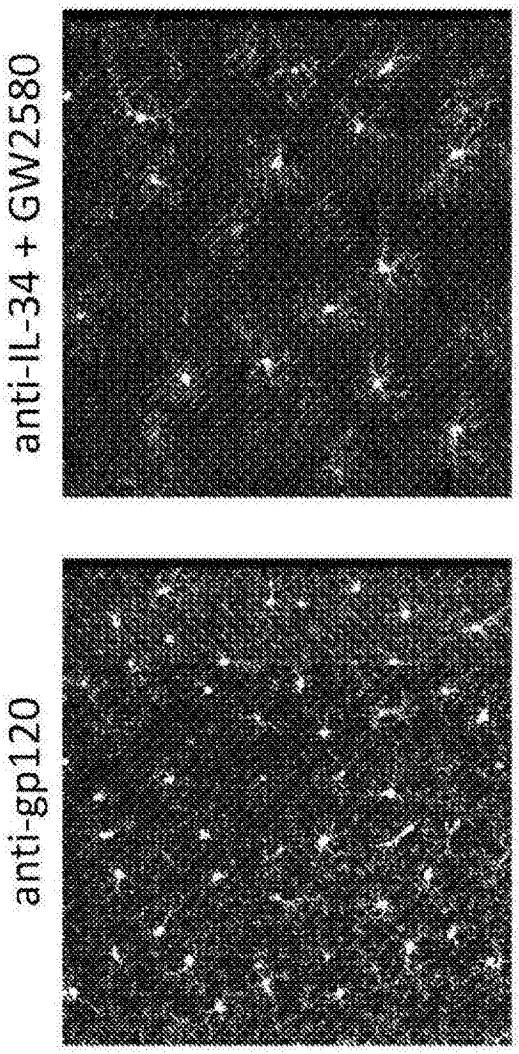

anti-IL-34 + GW2580
anti-gp120

图4

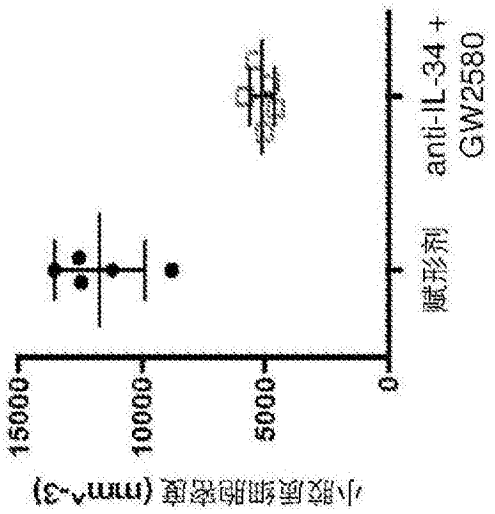

小胶质细胞密度 (mm^-3)
15000
10000
5000
0
赋形剂
anti-IL-34 + GW2580

图5

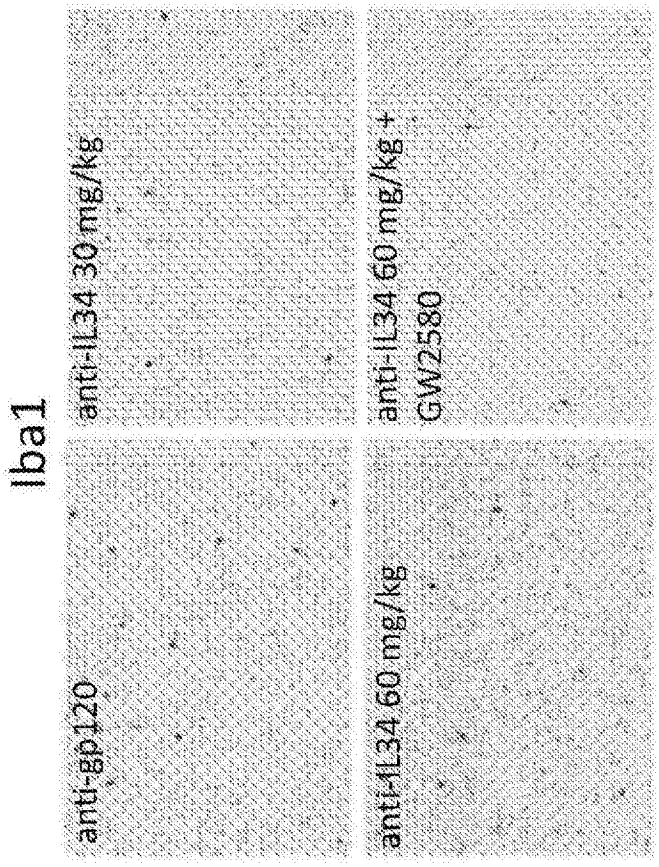

Iba1
anti-IL34 30 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg + GW2580
anti-gp120
anti-IL34 60 mg/kg

图6A

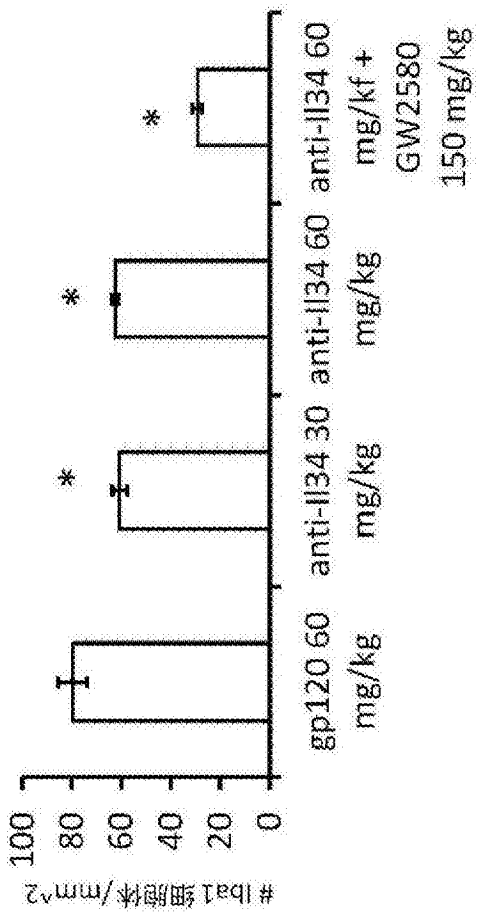

#Iba1 细胞/mm^2
100
80
60
40
20
0
gp120 60 mg/kg
anti-Il34 30 mg/kg
anti-Il34 60 mg/kg
anti-Il34 60 mg/kf + GW2580 150 mg/kg
*
*
*

图6B

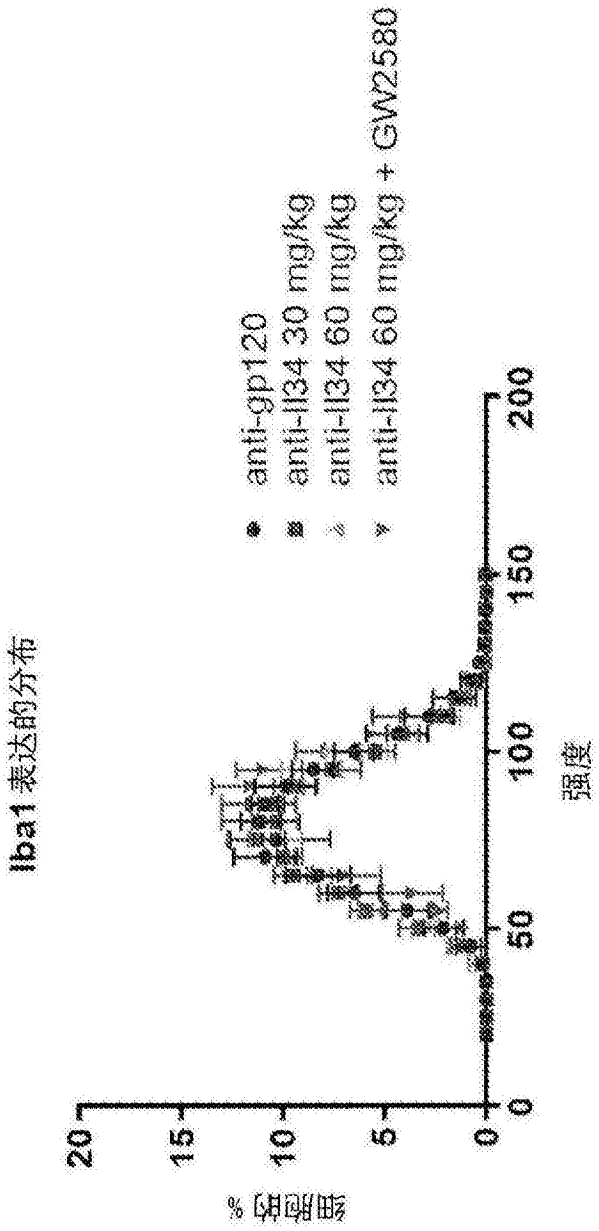

Iba1表达的分布
anti-gp120
anti-Il34 30 mg/kg
anti-Il34 60 mg/kg
anti-Il34 60 mg/kg + GW2580
细胞的 %
强度
0
5
10
15
20
0
50
100
150
200

图7

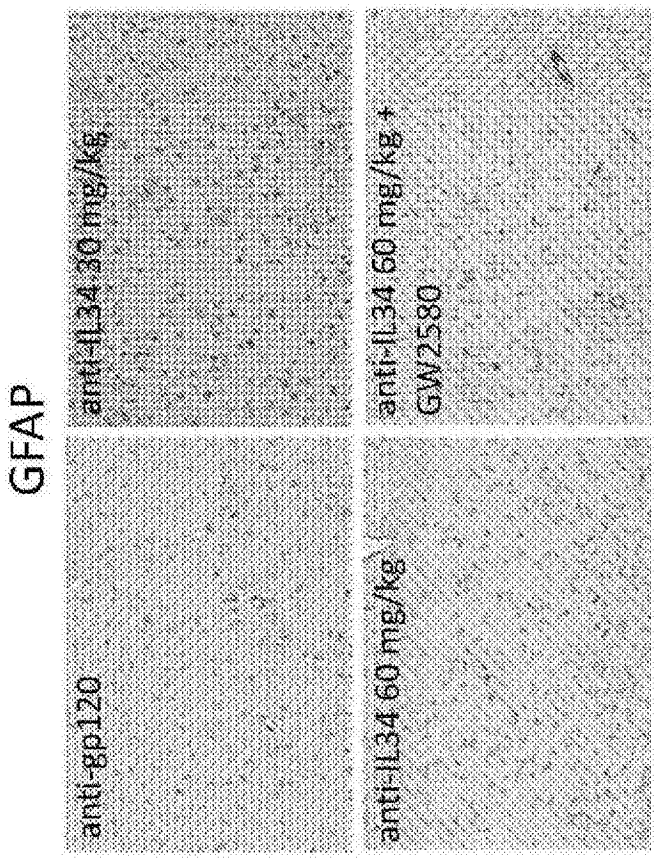

GFAP
anti-gp120
anti-IL34 30 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg + GW2580

图8A

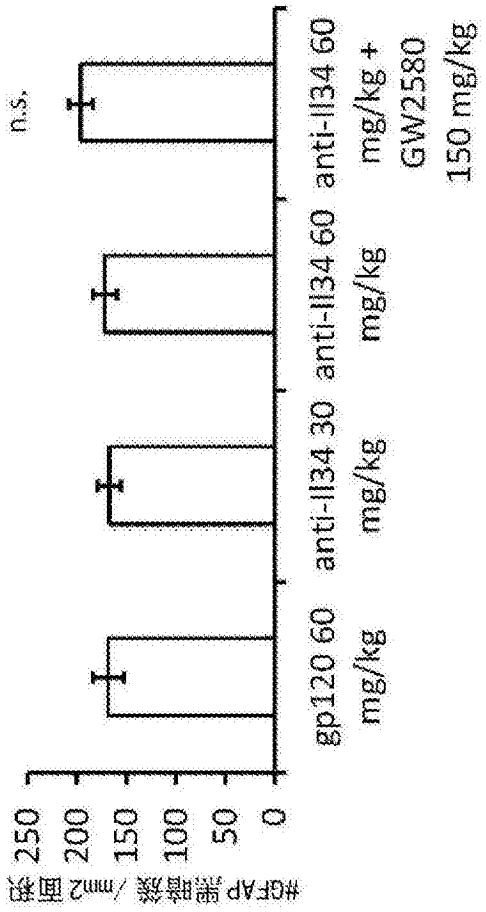

#GFAP 黑暗区 /mm2 面积
250
200
150
100
50
0
n.s.
gp120 60 mg/kg
anti-Il34 30 mg/kg
anti-Il34 60 mg/kg
anti-Il34 60 mg/kg + GW2580 150 mg/kg

图8B

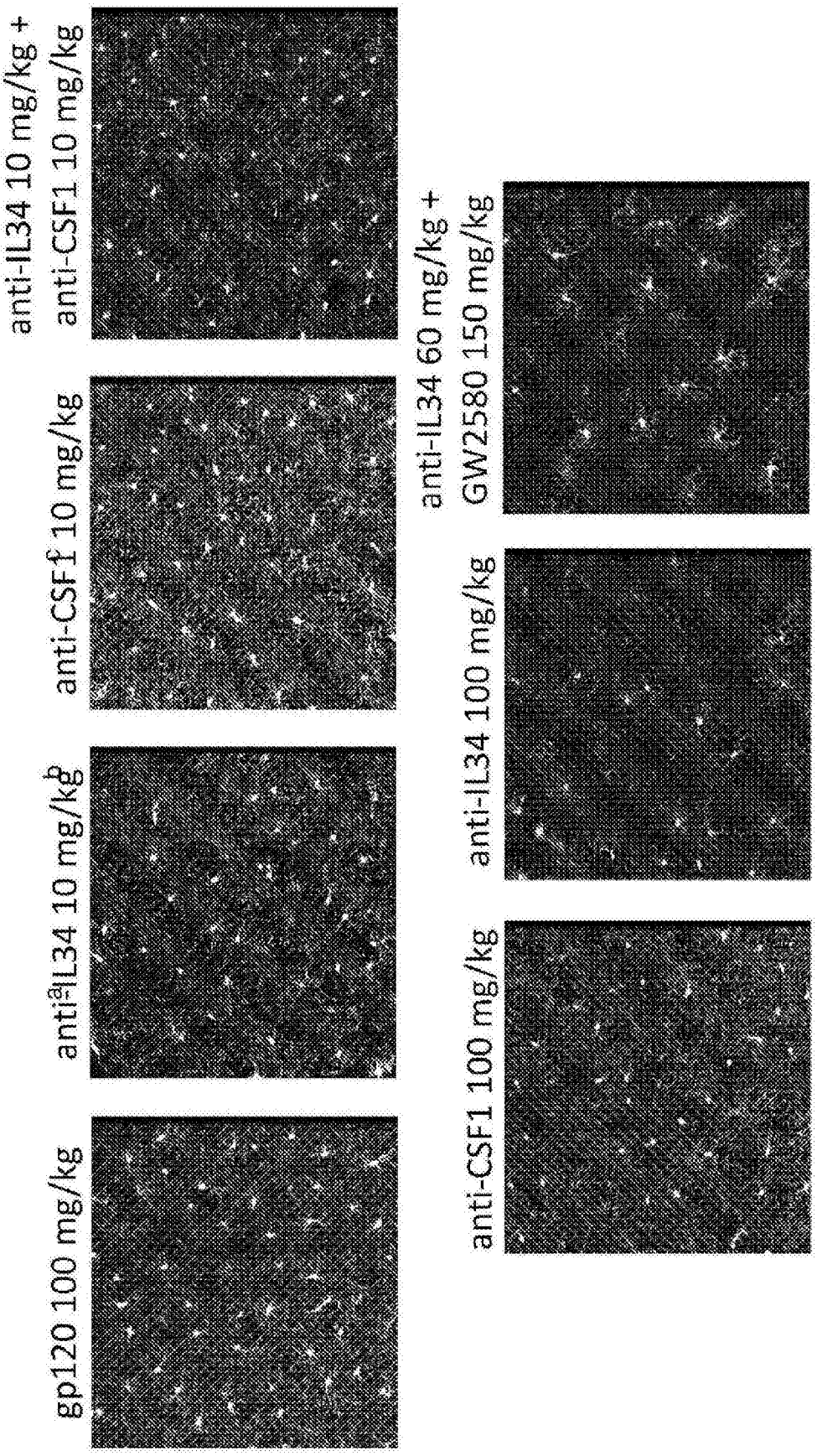

gp120 100 mg/kg
anti-IL34 10 mg/kg
anti-CSF1 10 mg/kg
anti-IL34 10 mg/kg + anti-CSF1 10 mg/kg
anti-CSF1 100 mg/kg
anti-IL34 100 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg + GW2580 150 mg/kg

图9

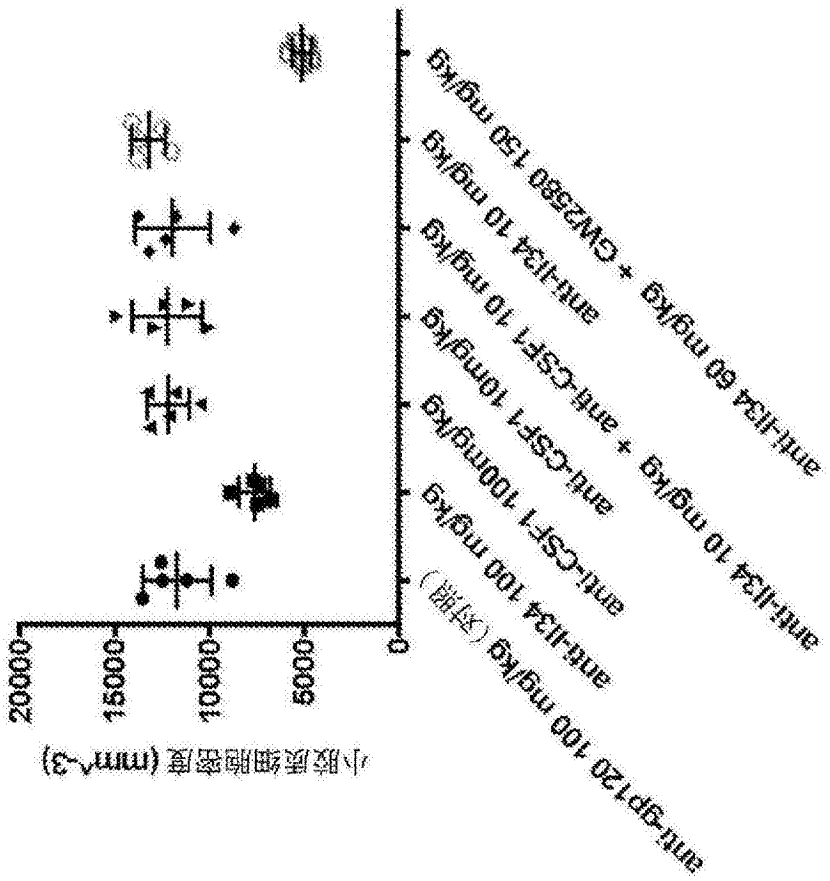

小肢质细胞密度 (mm^-3)
20000
15000
10000
5000
0
anti-GP120 100 mg/kg (对照)
anti-IL2 100 mg/kg
anti-CSF-1 100mg/kg
anti-CSF-1 10mg/kg + anti-IL2 10 mg/kg
anti-IL2 10 mg/kg
anti-IL2 60 mg/kg + CVX2580 150 mg/kg

图10A

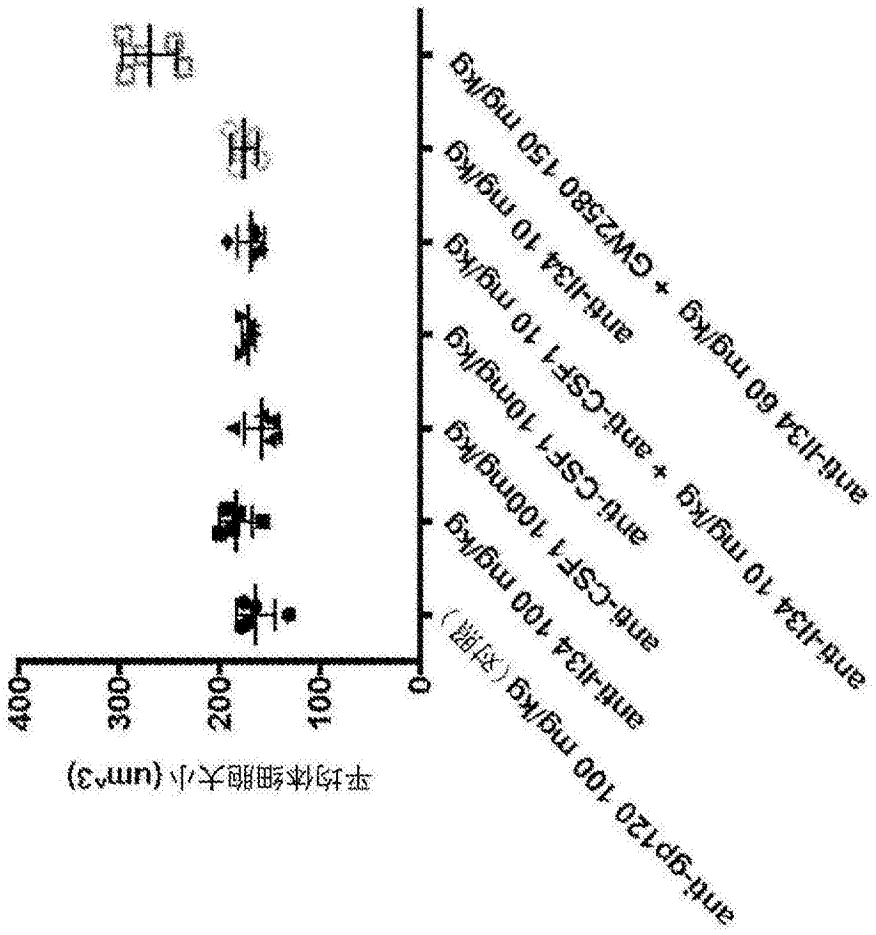

平均体细胞大小 (um^3)
400
300
200
100
0
anti-gp120 100 mg/kg (对照)
anti-IL4 100 mg/kg
anti-CSF-1 100mg/kg
anti-IL4 10 mg/kg + anti-CSF-1 10 mg/kg
anti-IL4 60 mg/kg + GW2580 150 mg/kg

图10B

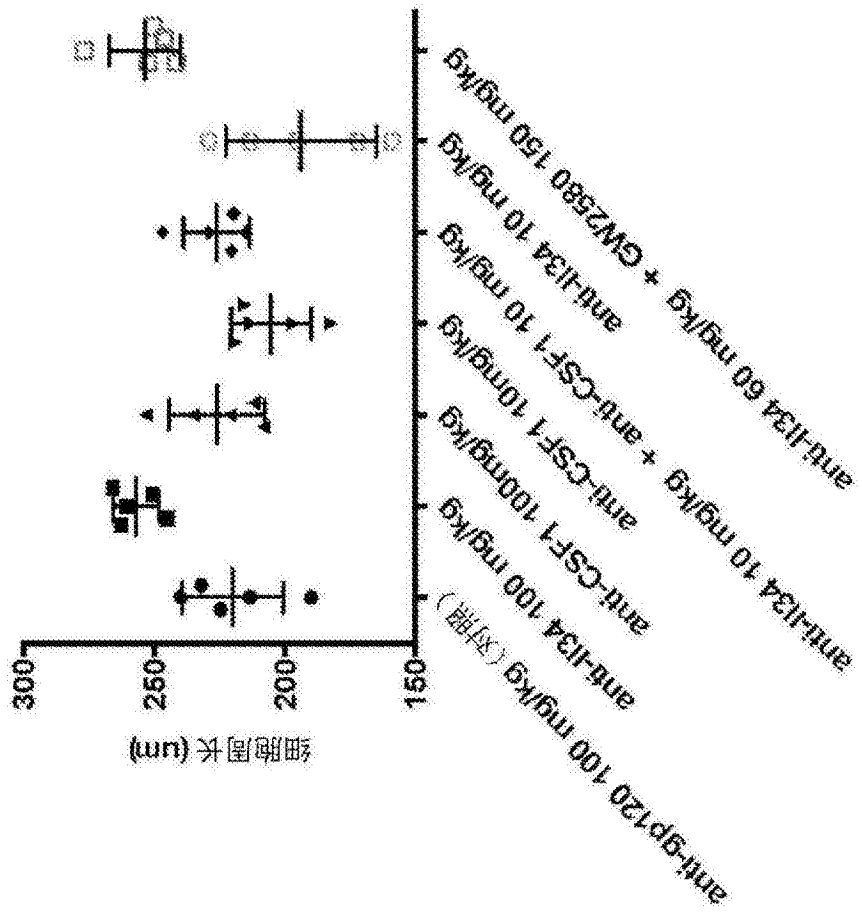

anti-GP120 100 mg/kg (对照)
anti-IL34 100 mg/kg
anti-CSF-1 100mg/kg
anti-IL34 10 mg/kg + anti-CSF-1 10 mg/kg
anti-IL34 10 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg + GW2580 150 mg/kg
细胞周长 (um)
300
250
200
150

图10C

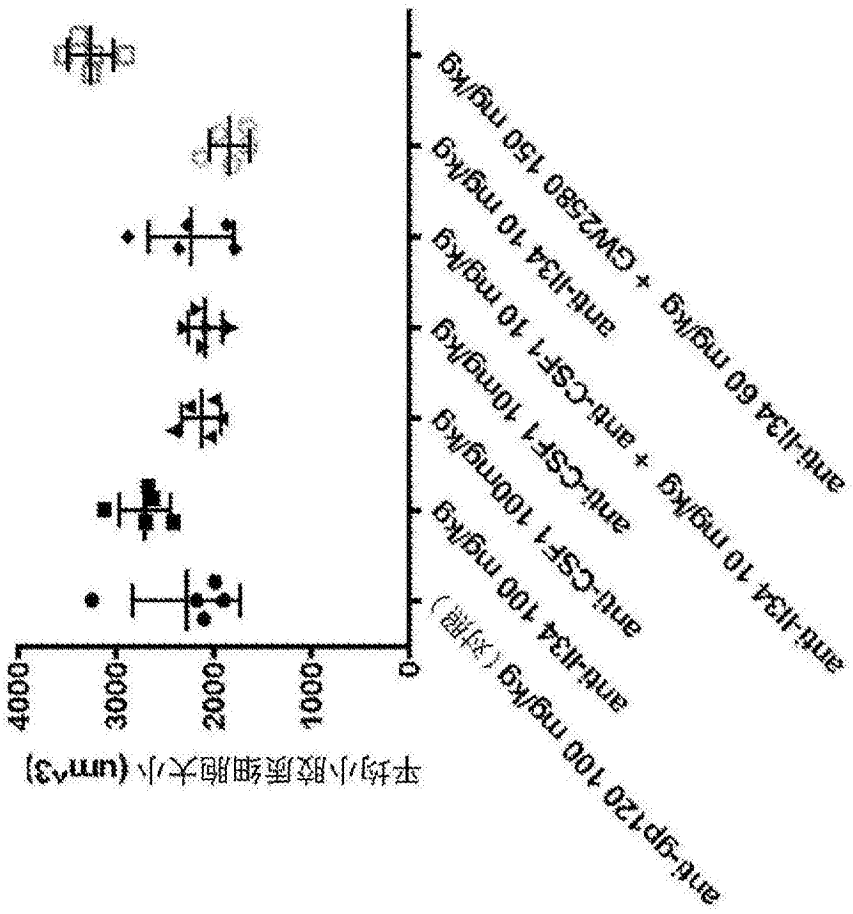

平均小胶质细胞大小 (um^3)
4000
3000
2000
1000
0
anti-gp120 100 mg/kg (对照)
anti-IL34 100 mg/kg
anti-CSF-1 100mg/kg
anti-CSF-1 10mg/kg
anti-IL34 10 mg/kg + anti-CSF-1 10 mg/kg
anti-IL34 10 mg/kg + GW2580 150 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg

图10D

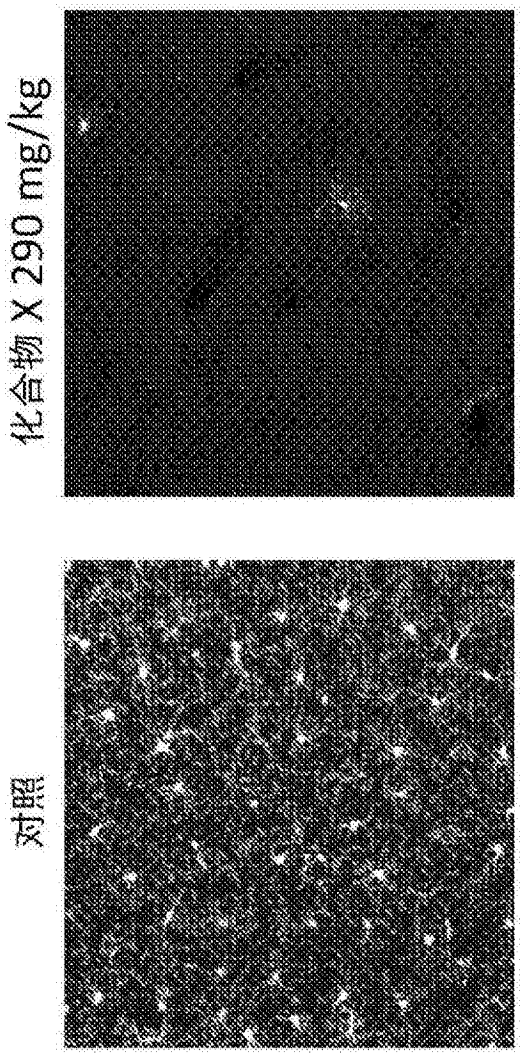

化合物 X 290 mg/kg
对照

图11

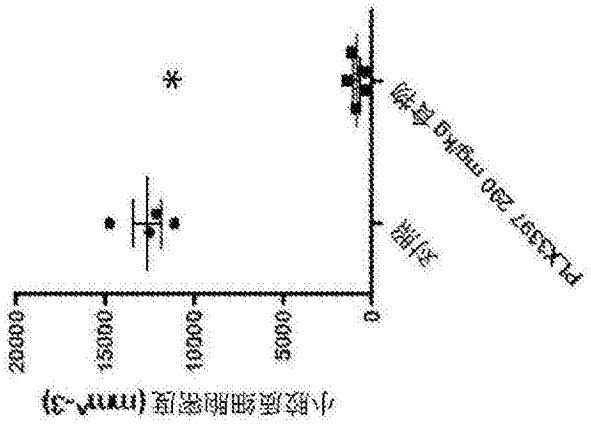

小胶质细胞密度 (mm^-3)
30000
20000
10000
0
*
对照
PLX3397 290 mg/kg 食物

图12

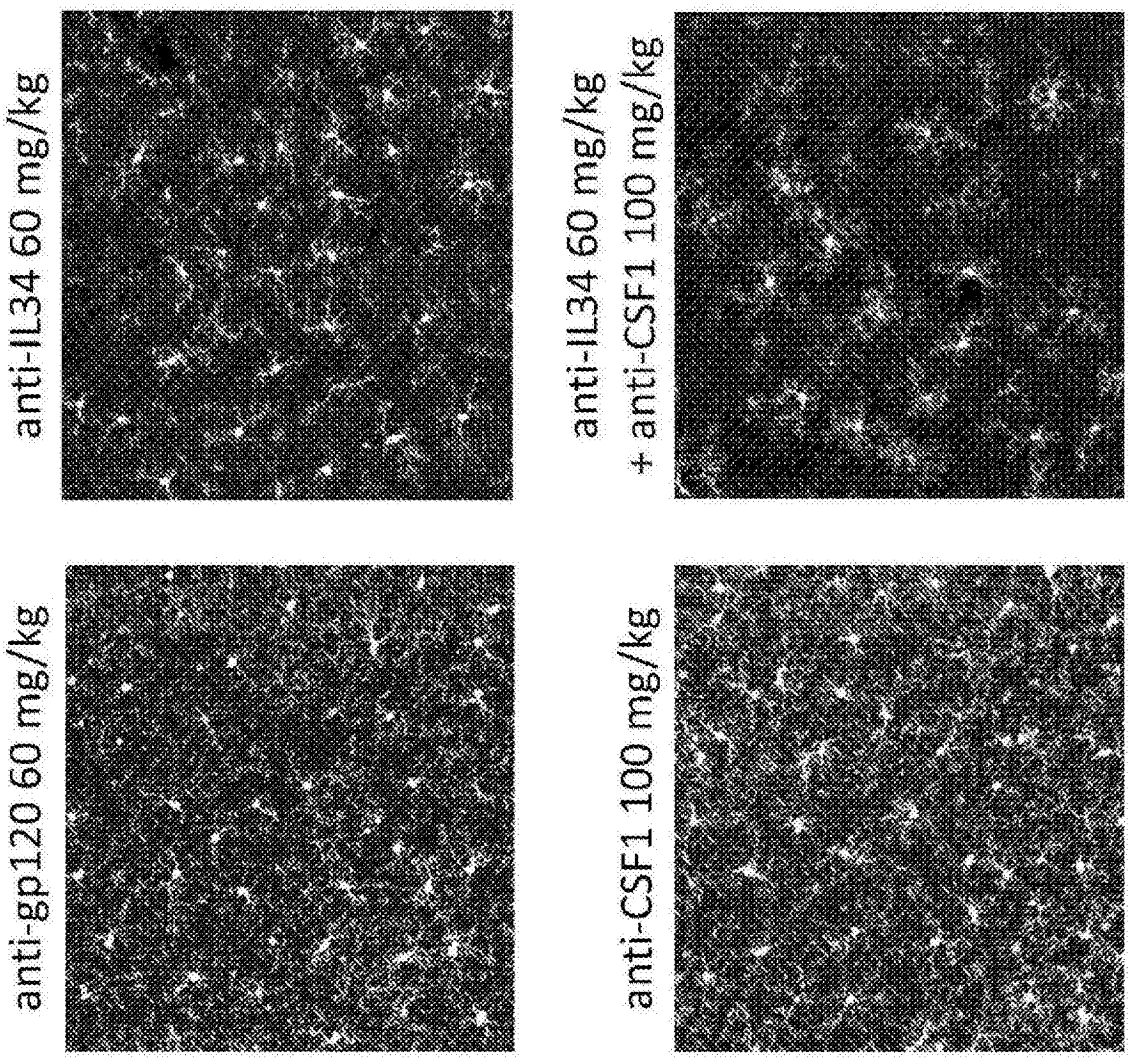

anti-IL34 60 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg
+ anti-CSF1 100 mg/kg
anti-gp120 60 mg/kg
anti-CSF1 100 mg/kg

图13

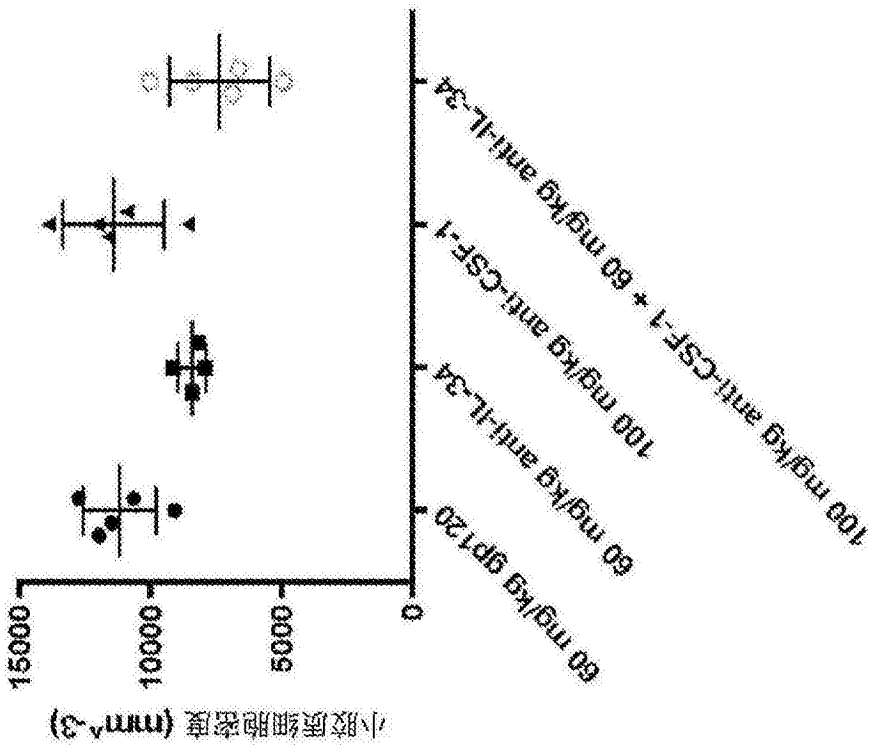

小胶质细胞密度 (mm^-3)
15000
10000
5000
0
60 mg/kg gp120
60 mg/kg anti-IL-3α
100 mg/kg anti-CSF-1
100 mg/kg anti-CSF-1 + 60 mg/kg anti-IL-3α

图14

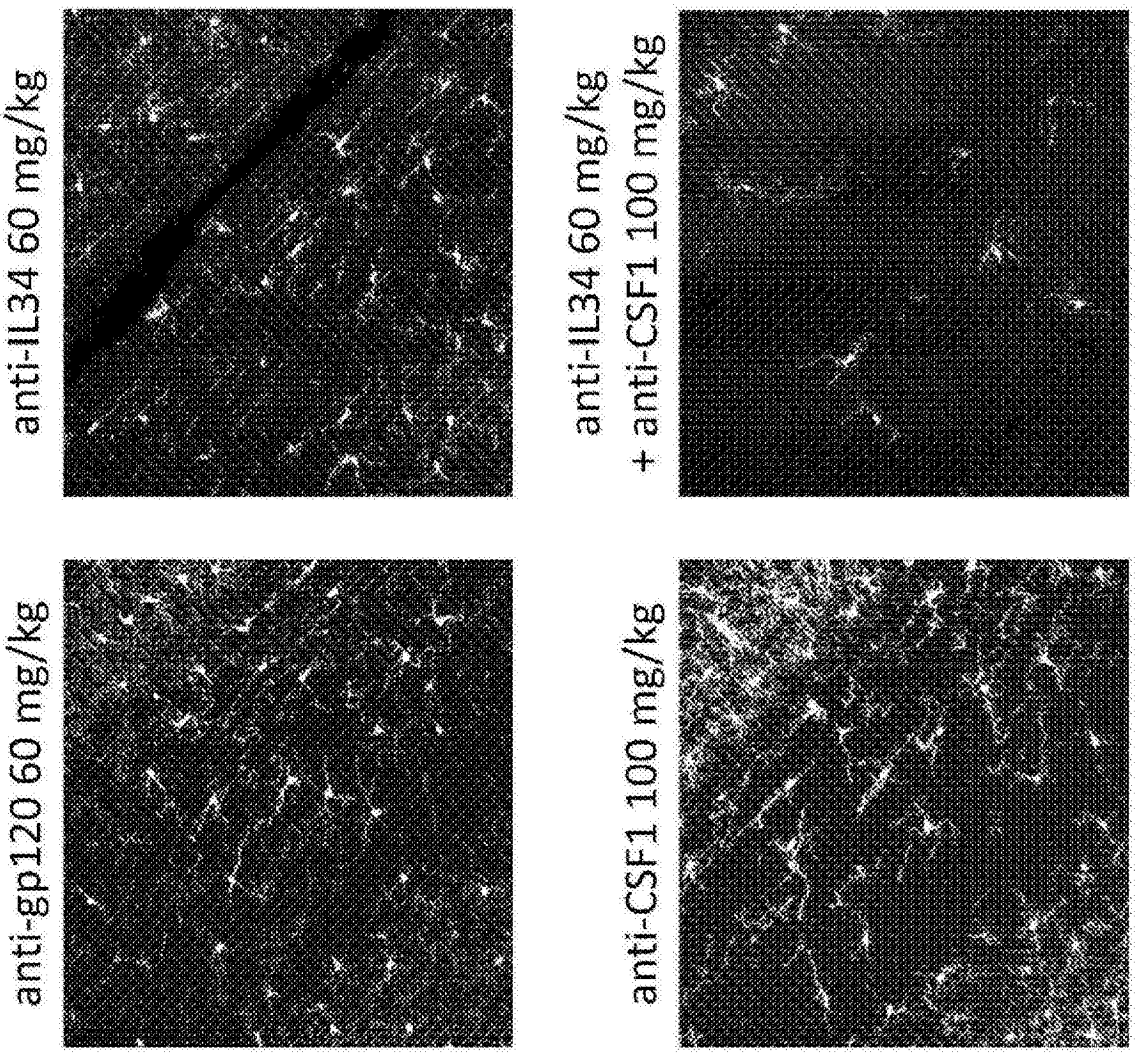

anti-IL34 60 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg
+ anti-CSF1 100 mg/kg
anti-gp120 60 mg/kg
anti-CSF1 100 mg/kg

图15

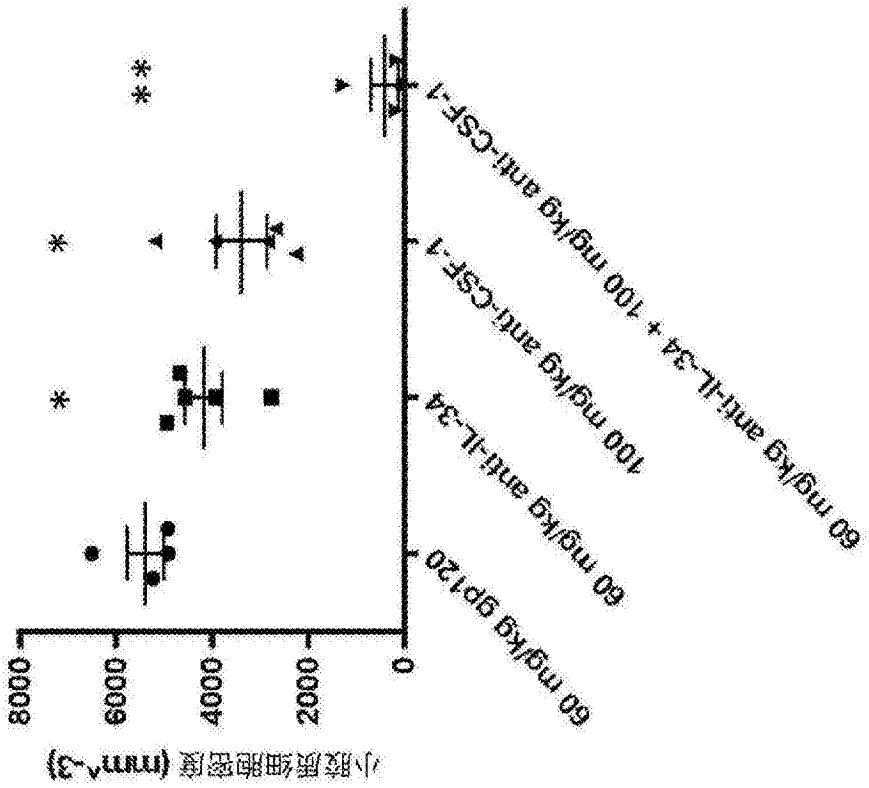

小胶质细胞密度 (mm^-3)
8000
6000
4000
2000
0
60 mg/kg GP120
60 mg/kg anti-IL-34
100 mg/kg anti-CSF-1
60 mg/kg anti-IL-34 + 100 mg/kg anti-CSF-1

图16

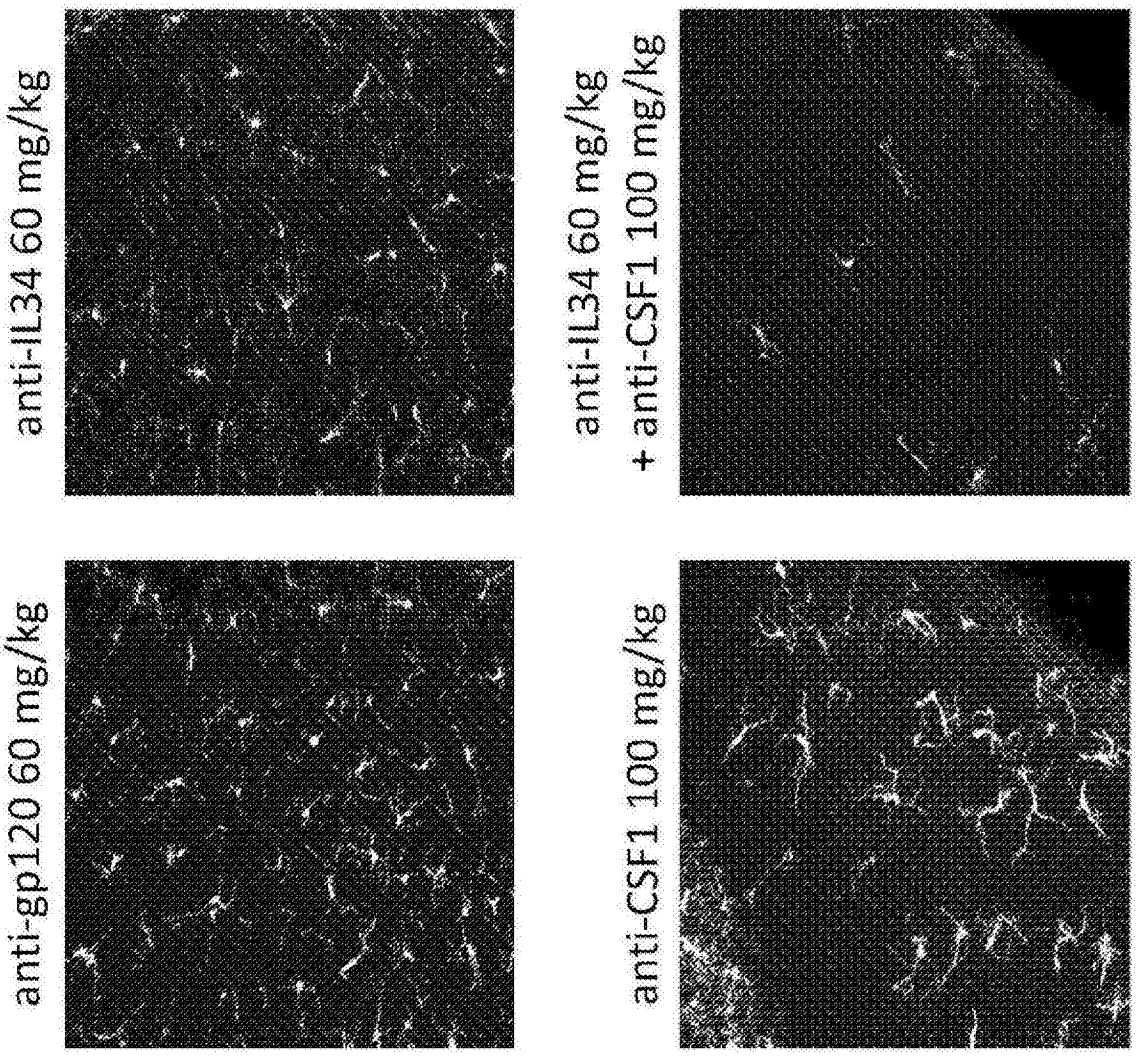

anti-IL34 60 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg
+ anti-CSF1 100 mg/kg
anti-gp120 60 mg/kg
anti-CSF1 100 mg/kg

图17

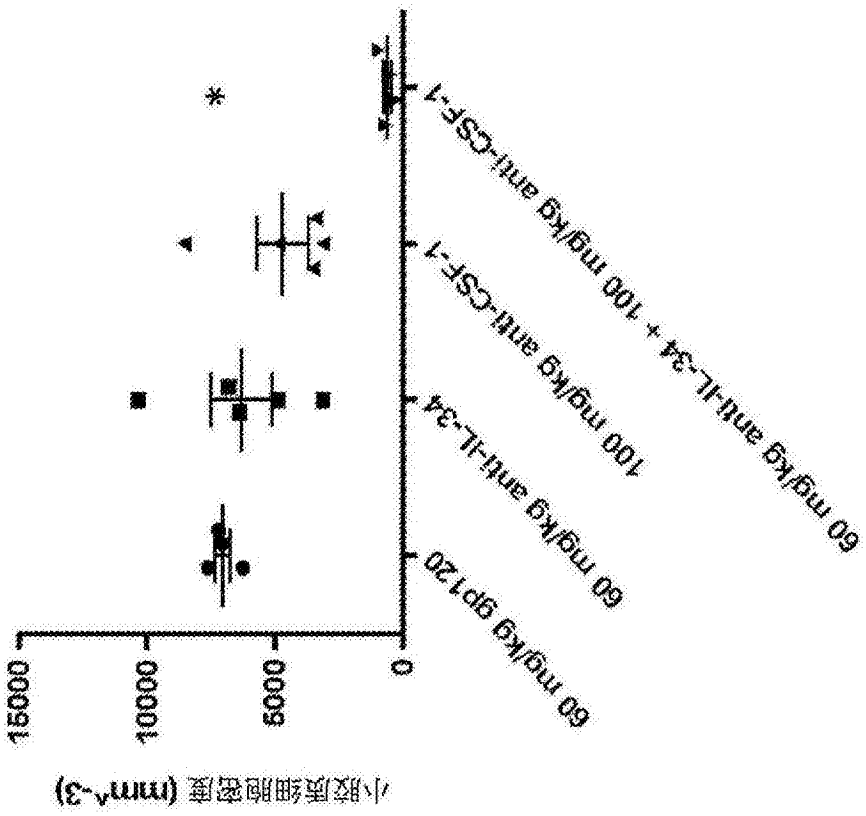

小胶质细胞密度 (mm^-3)
15000
10000
5000
0
60 mg/kg GP120
60 mg/kg anti-IL-34
100 mg/kg anti-CSF-1
60 mg/kg anti-IL-34 + 100 mg/kg anti-CSF-1

图18

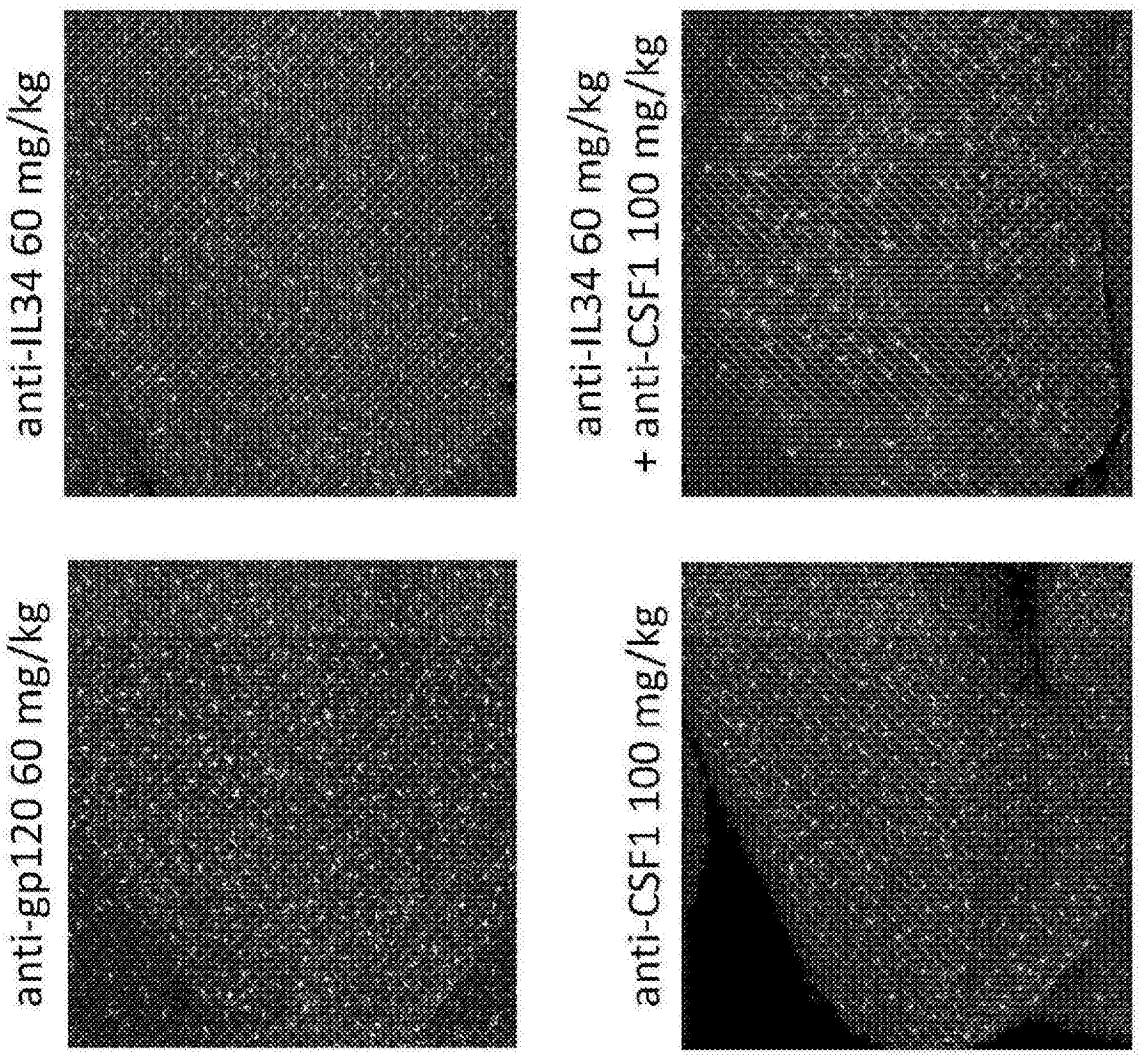

anti-IL34 60 mg/kg
anti-IL34 60 mg/kg
+ anti-CSF1 100 mg/kg
anti-gp120 60 mg/kg
anti-CSF1 100 mg/kg

图19

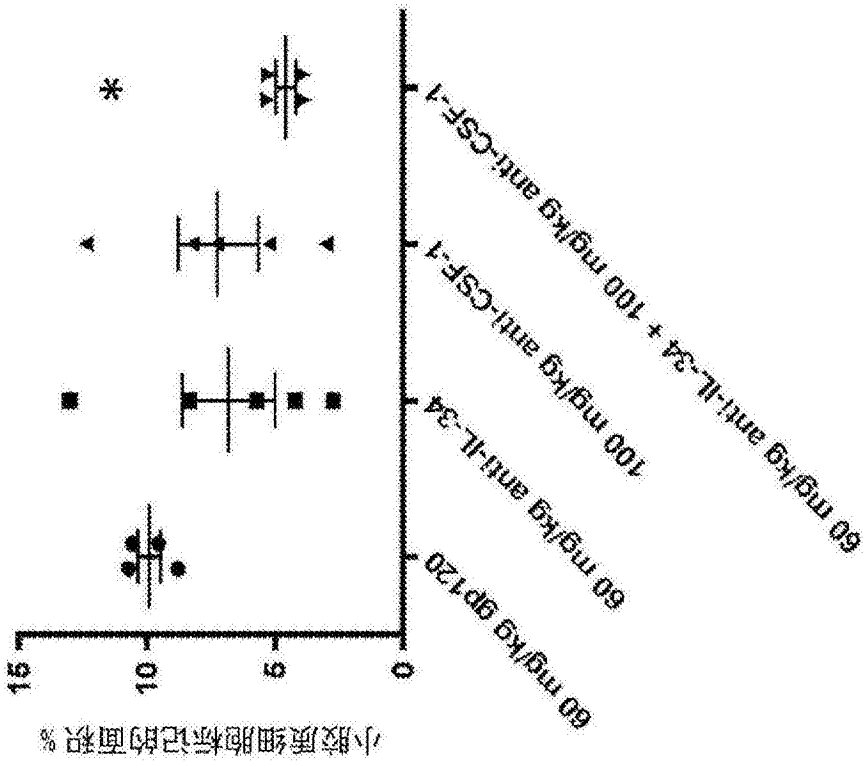

小胶质细胞标记的面积 %
15
10
5
0
60 mg/kg GP120
60 mg/kg anti-IL-34
100 mg/kg anti-CSF-1
60 mg/kg anti-IL-34 + 100 mg/kg anti-CSF-1
*

图20

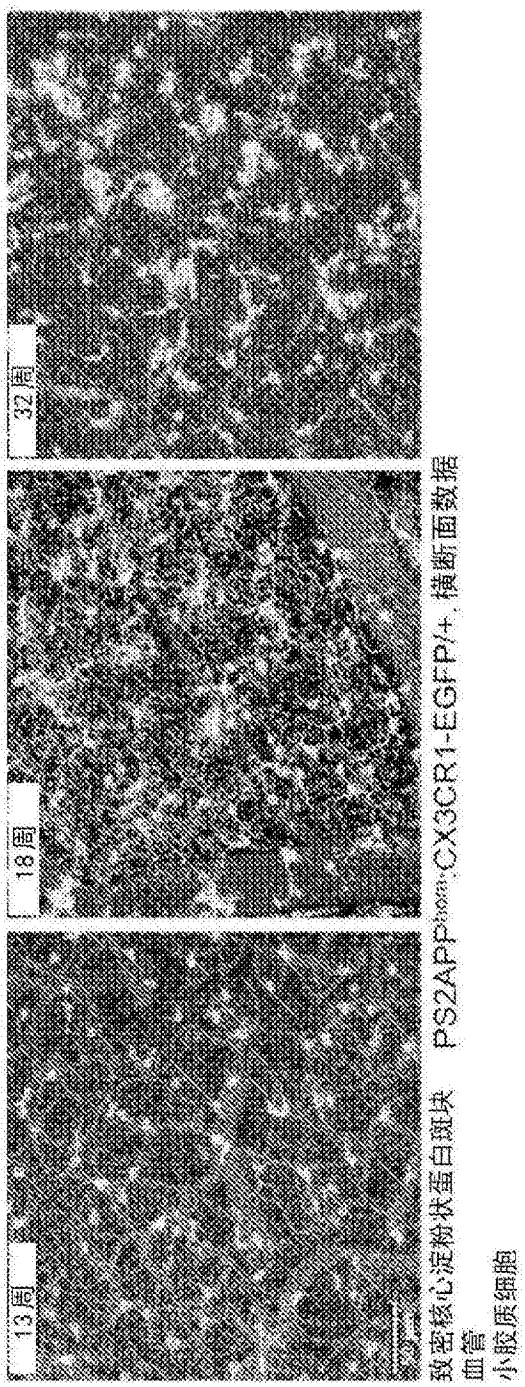

13周
18周
32周
致密核心淀粉状蛋白斑块 PS2APP^{Hom};CX3CR1-EGFP/+, 横断面数据
血管
小胶质细胞

图21A

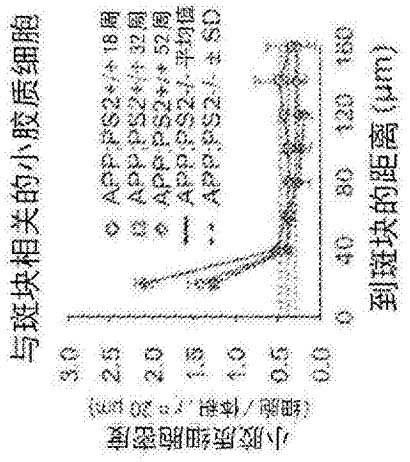


图21B

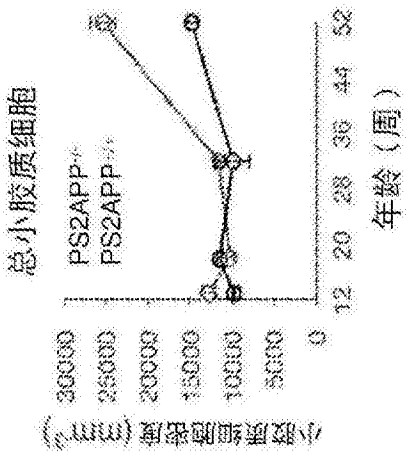


图21C

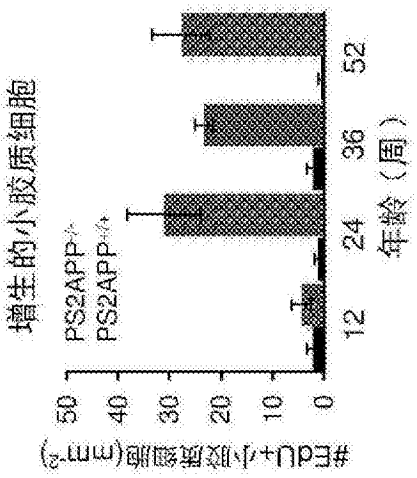


图21D

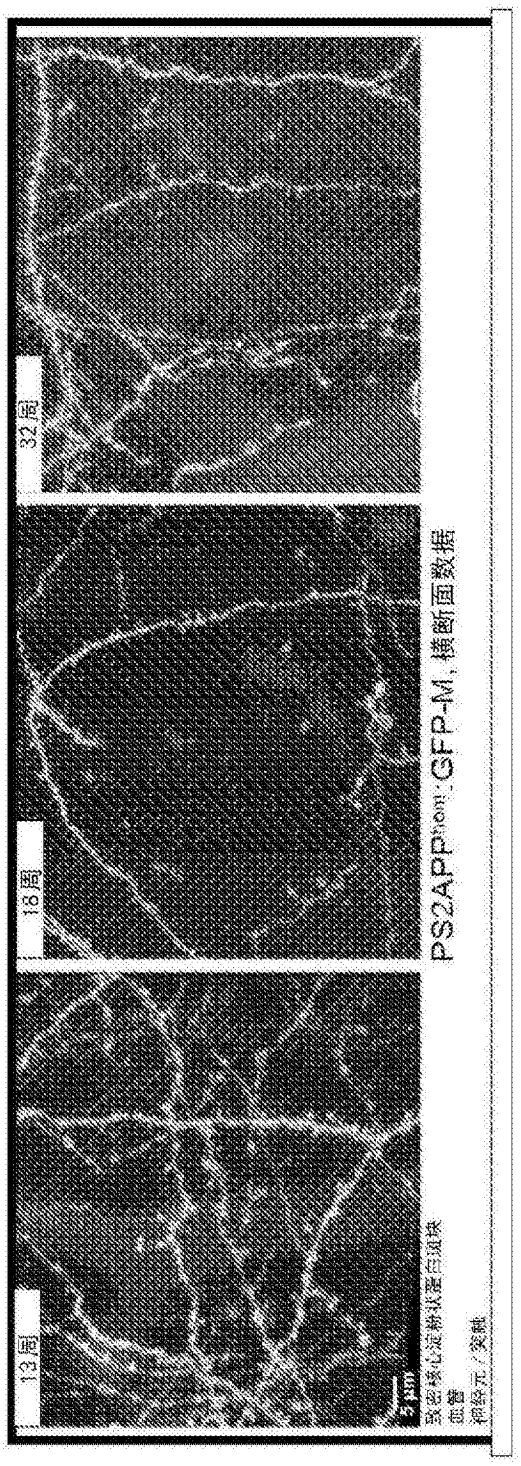


图22A

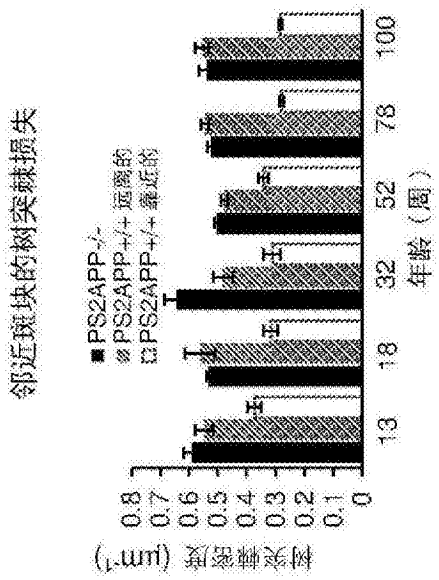

邻近斑块的树突棘损失
PS2APP-/-
PS2APP+/+ 远离的
PS2APP+/+ 靠近的
突触密度 (μm⁻¹)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
13
18
32
52
78
100
年龄（周）

图22B

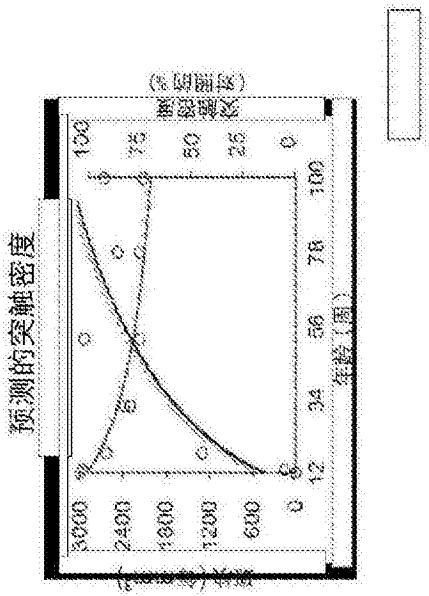

预测的突触密度
突触密度
(突触/μm)
3000
2400
1800
1200
600
0
12
34
56
78
100
年龄（周）
0
25
50
75
100
(突触的%)

图22C

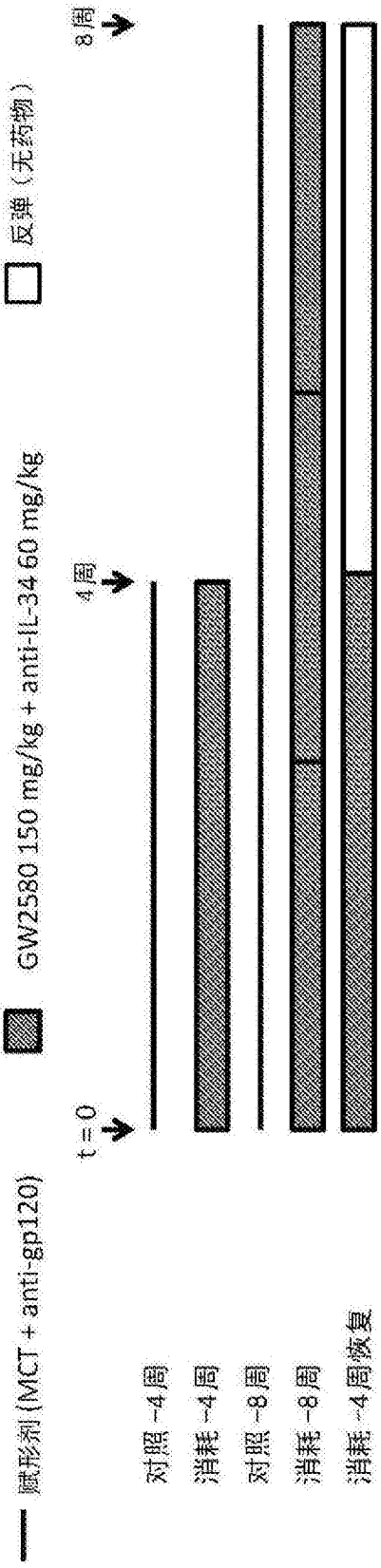

赋形剂 (MCT + anti-gp120)
GW2580 150 mg/kg + anti-IL-34 60 mg/kg
反弹（无药物）
t = 0
4 周
8 周
对照 -4 周
消耗 -4 周
对照 -8 周
消耗 -8 周
消耗 -4 周恢复

图23A

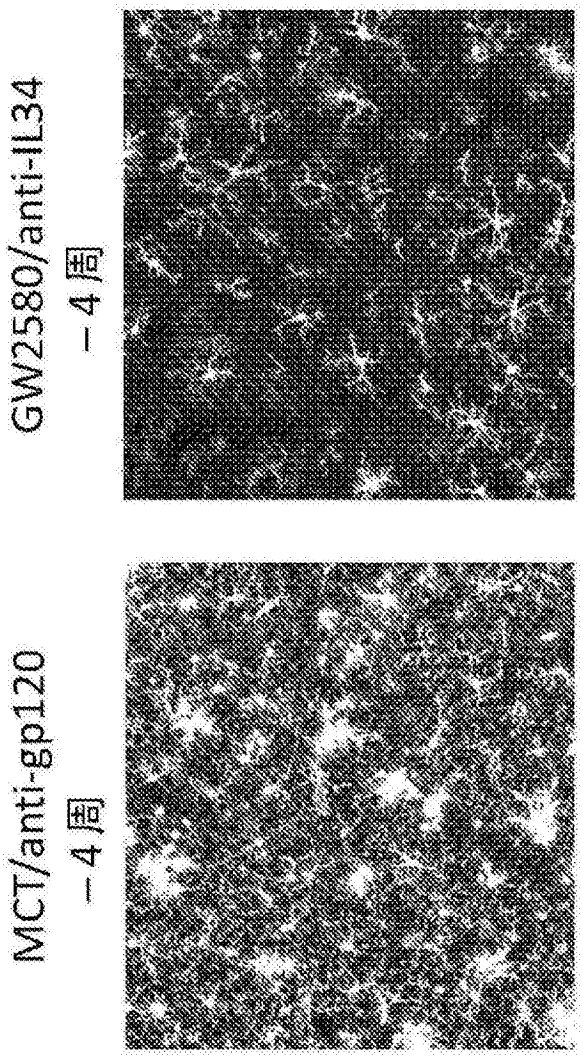


图23B

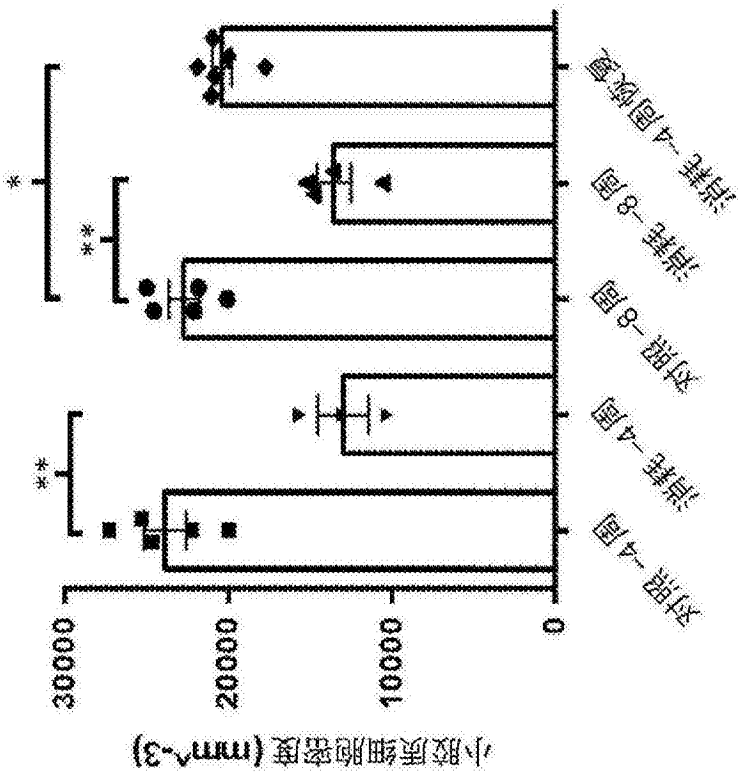


图23C

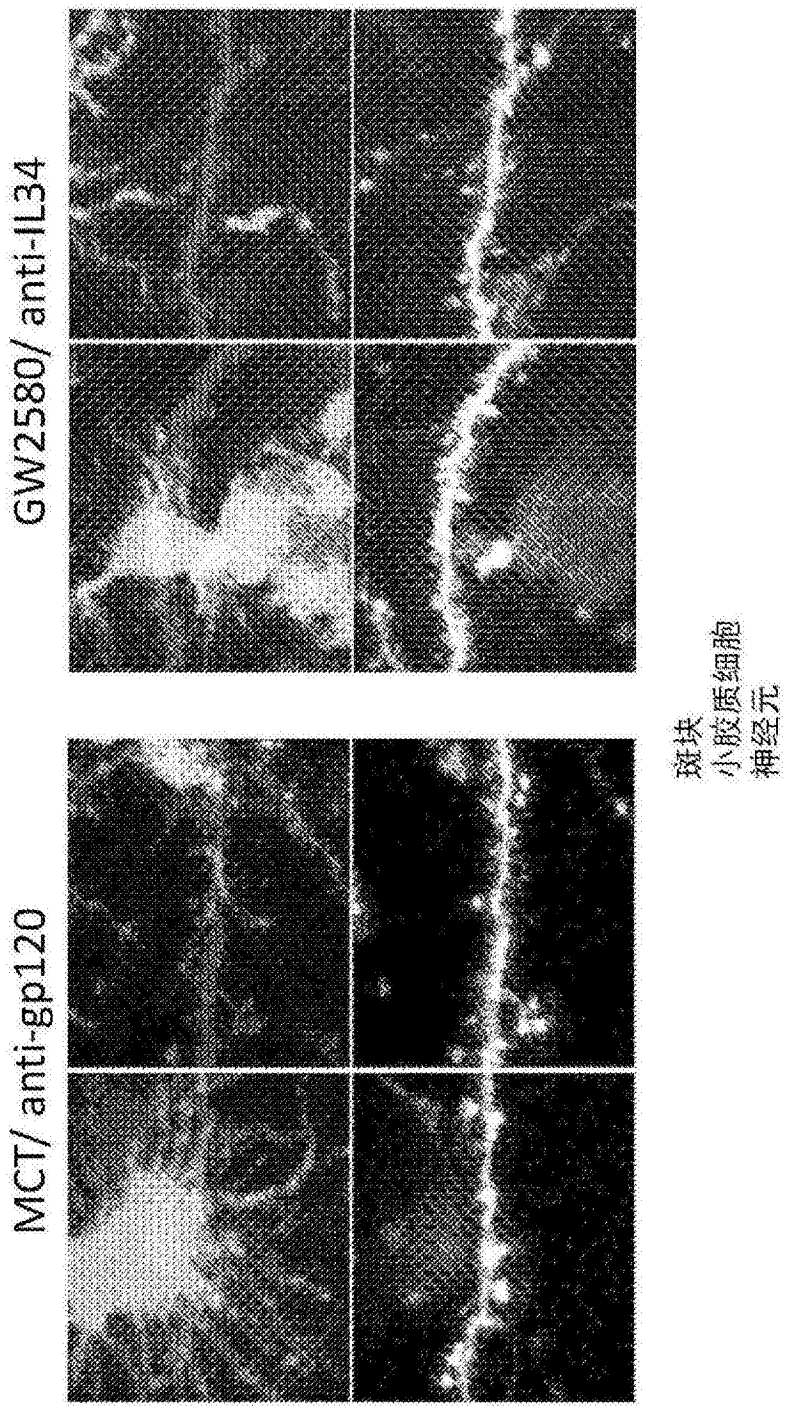


图23D

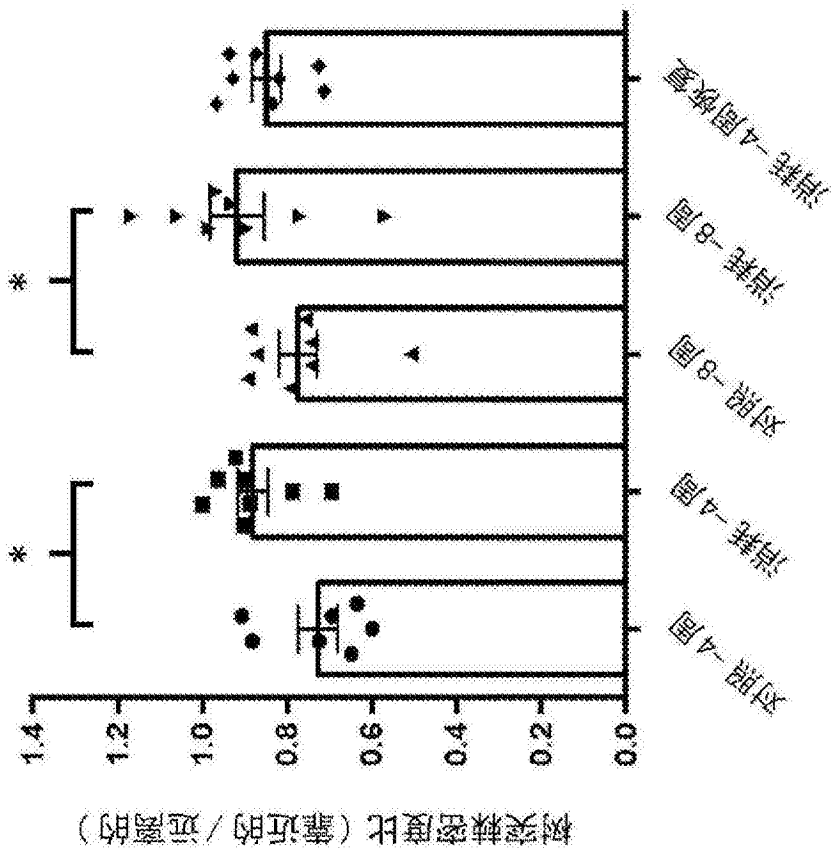
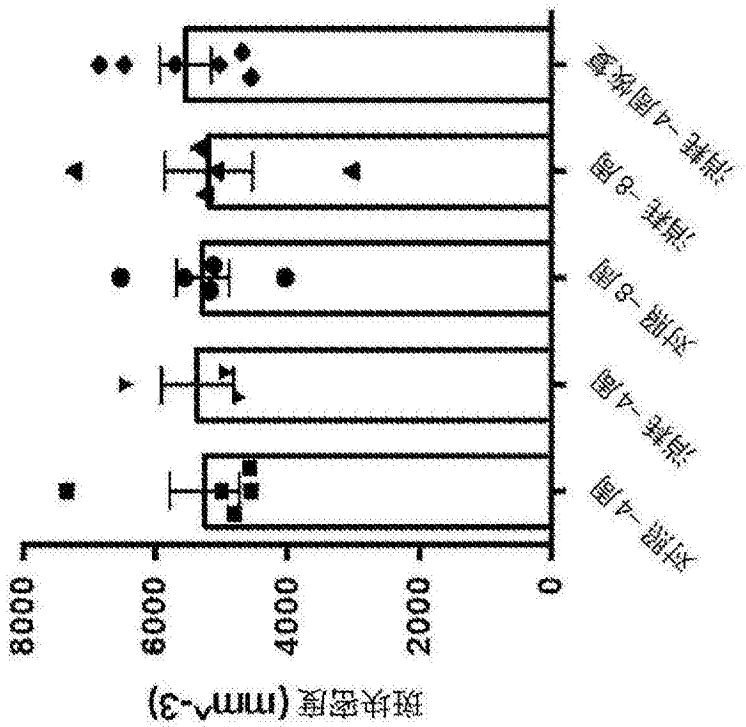

对照-4周
消耗-4周
对照-8周
消耗-8周
消耗-4周恢复
*
*
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
树突棘密度比（靠近的/远离的）

图23E


斑块密度 (mm^-3)
8000
6000
4000
2000
0
对照-4周
消耗-4周
对照-8周
消耗-8周
消耗-4周恢复

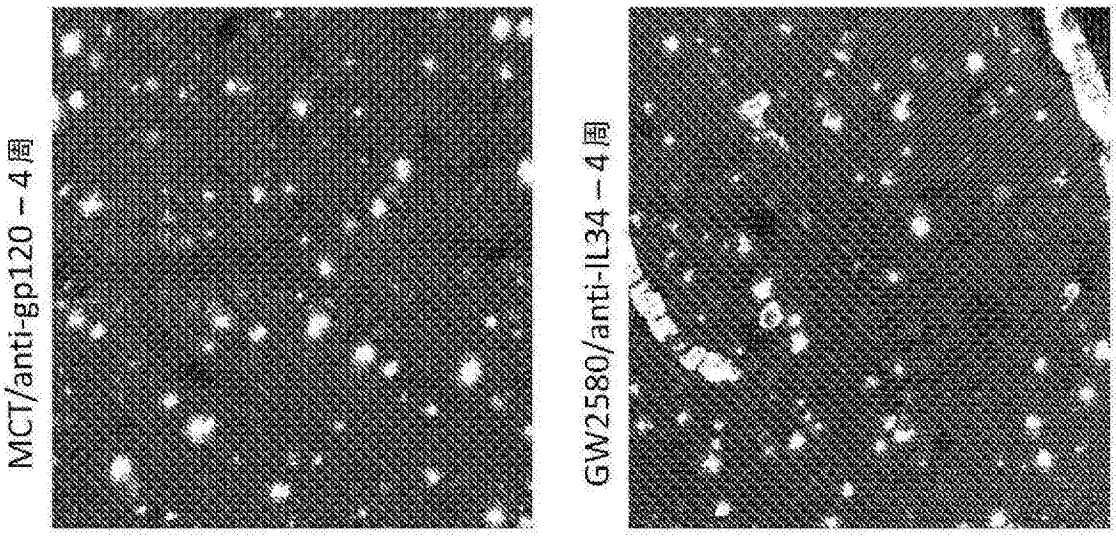

MCT/anti-gp120 – 4周
GW2580/anti-IL34 – 4周

图24

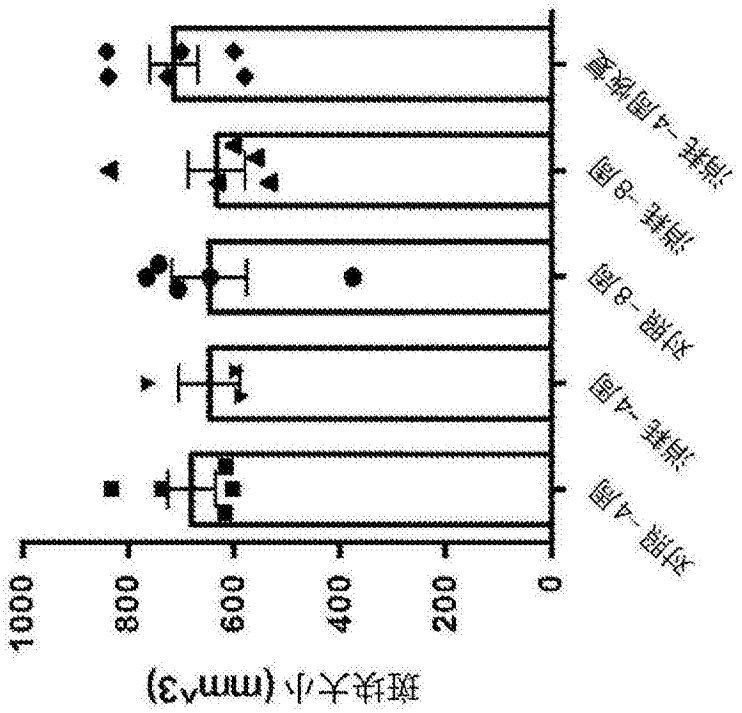

斑块大小 (mm^3)
1000
800
600
400
200
0
对照-4周
消耗-4周
对照-8周
消耗-8周
消耗-4周恢复

图25

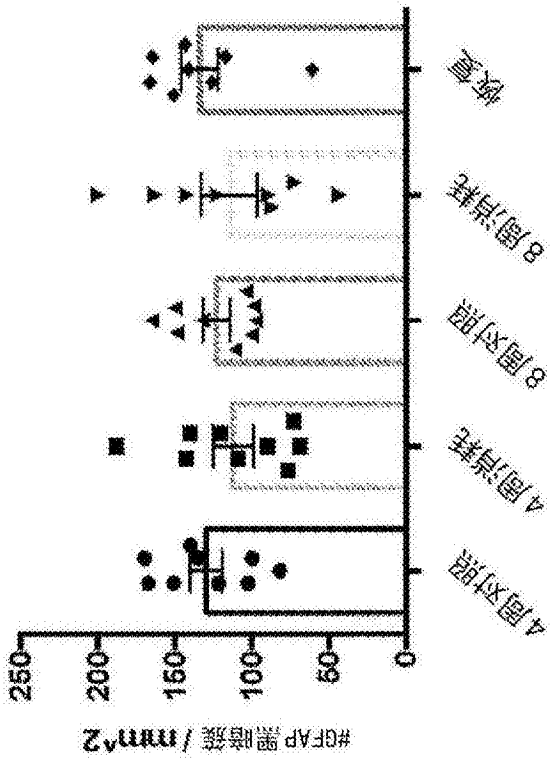

#GFAP 黑暗簇 / mm^2
250
200
150
100
50
0
4周对照
4周消耗
8周对照
8周消耗
恢复

图26

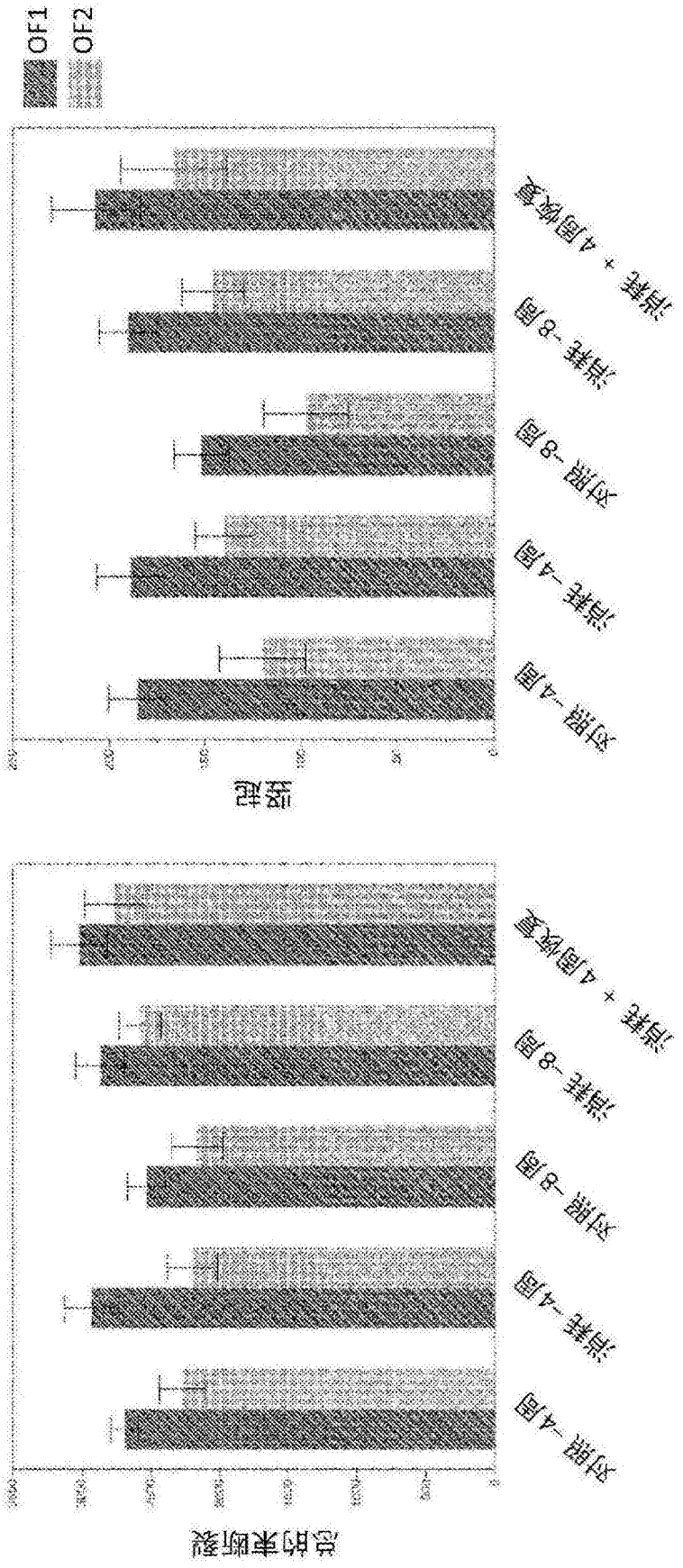

OF1
OF2
竖起
对照-4周
消耗-4周
对照-8周
消耗-8周
消耗+4周恢复
总的末断裂
对照-4周
消耗-4周
对照-8周
消耗-8周
消耗+4周恢复

图27

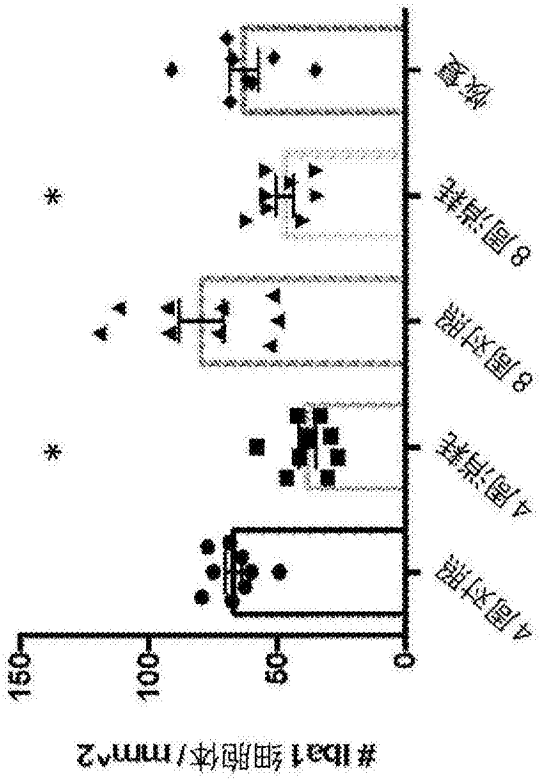


图28