(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113490511 B
(45)授权公告日 2024.07.09

(21)申请号 202080016831.1
(22)申请日 2020.02.26
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113490511 A
(43)申请公布日 2021.10.08
(30)优先权数据
62/810,628 2019.02.26 US
62/933,294 2019.11.08 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.08.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/019990 2020.02.26
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/176682 EN 2020.09.03
(73)专利权人 伊奎利厄姆股份有限公司
地址 美国加利福尼亚
专利权人 休斯顿系统大学
(72)发明人 S·康纳利 K·波鲁 C·莫汉
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 陈晓娜
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
(56)对比文件
US 6372215 B1,2002.04.16
Usha Bughani.T cell activation and differentiation is modulated by a CD6 domain 1 antibody Itolizumab.Plos One.2017,第1-29页.
审查员 滕瑞芳
权利要求书2页 说明书39页
序列表4页 附图23页

(54)发明名称

用于治疗狼疮的抗CD6抗体组合物和方法

(57)摘要

本公开内容提供了使用CD6-ALCAM途径抑制剂例如EQ001治疗炎性或自身免疫性疾病(例如狼疮性肾炎)的方法,以及用于鉴定可能对此类抑制剂有反应的受试者的方法和诊断测试。特别地,本公开内容提供了与尿液和其他生物样品中可溶性ALCAM和/或CD6蛋白和蛋白片段的升高的水平(其指示对CD6-ALCAM途径的抑制剂(例如,EQ001)的敏感性)相关的诊断和治疗用途。

CN 113490511 B

1.CD6-ALCAM途径抑制剂在制备用于治疗患有狼疮性肾炎的受试者的药物中的用途,其中所述治疗包括以下步骤:

a.确定受试者是否存在浓度为50000至200000pg/ml的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白;和

b.如果受试者存在浓度为50000至200000pg/ml的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂,

其中所述CD6-ALCAM途径抑制剂是Itolizumab。

2.抗CD6抗体在制备用于鉴定受试者是否患有对CD6-ALCAM途径抑制敏感的狼疮性肾炎的试剂中的用途,其中所述鉴定包括:

a.从受试者获得尿液样品,和

b.对尿液样品进行测定以确定样品中是否存在浓度为50000至200000pg/ml的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白,

其中如果样品中存在浓度为50000至200000pg/ml的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白,则受试者患有对CD6-ALCAM途径抑制敏感的狼疮性肾炎,

其中所述抗CD6抗体是Itolizumab。

3.根据权利要求2所述的用途,其中在来自所述受试者的第一样品和一个或多个第二样品中确定可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的浓度。

4.根据权利要求3所述的用途,其中相对于所述第一样品,所述第二样品中可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的更高浓度指示所述受试者中的活动性疾病。

5.根据权利要求3所述的用途,其中相对于所述第一样品,所述第二样品中可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的较低浓度指示所述受试者中从活动性疾病到消极性疾病的转变。

6.根据权利要求3所述的用途,其中与所述第一样品相比,所述第二样品中可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的更高浓度指示所述受试者中从消极性疾病到活动性疾病的转变。

7.抗CD6抗体在制备用于预测患有狼疮性肾炎的受试者的预后的试剂中的用途,其中所述预测包括以下步骤:

i.在数天、数周、数月或数年的时间过程中从受试者获得多个尿液样品;和

ii.对每个尿液样品进行或已经进行测定以确定样品中存在的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的水平是否随时间变化;其中

a.如果样品中可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白随时间以大于50000pg/ml的浓度存在,则确定预后为不良;

b.如果样品表现出可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的水平没有随时间变化,则确定预后为中性;和

c.如果样品中可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白随时间以小于50000pg/ml的浓度存在,则确定预后为良好,

其中所述抗CD6抗体是Itolizumab。

8.抗CD6抗体在制造用于确定受试者是否患有活动性狼疮性肾炎的试剂中的用途,所述确定包括:

a.确定存在于来自受试者的第一样品中的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的第一浓度,其中所述第一样品是在受试者患有非活动性狼疮肾炎时从所述受试者获得的;

b.确定来自受试者的一个或多个第二样品中的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的第二浓度,其中每个第二样品是在获得第一样品之后从所述受试者获得的;和

c.如果可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的第二浓度大于第一浓度,则确定所述受试者患有活动性狼疮性肾炎或正在转变为活动性狼疮性肾炎,

其中所述抗CD6抗体是Itolizumab。

9.抗CD6抗体在制备用于确定受试者是否已经从非活动性狼疮性肾炎转变为活动性狼疮性肾炎的试剂中的用途,其中所述确定包括:

a.确定存在于来自受试者的第一样品中的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的第一浓度;其中所述第一样品是在受试者患有非活动性狼疮性肾炎时从所述受试者获得的;

b.确定存在于来自受试者的一个或多个第二样品中的可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的第二浓度;其中每个第二样品是在获得第一样品之后从所述受试者获得的;和

c.如果可溶性尿CD6和/或可溶性尿ALCAM蛋白的第二浓度大于第一浓度,则确定受试者患有活动性狼疮性肾炎或正在转变为活动性狼疮性肾炎,

其中所述抗CD6抗体是Itolizumab。

10.根据权利要求8-9中任一项所述的用途,其进一步包括如果所述受试者患有活动性狼疮性肾炎或正在转变为活动性狼疮性肾炎,则向所述受试者施用Itolizumab抗体。

用于治疗狼疮的抗CD6抗体组合物和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年2月26日提交的美国临时申请第62/810,628号和2019年11月8日提交的美国临时申请第62/933,294号的优先权,这些申请均通过引用整体并入本文中。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关联的序列表以文本格式代替纸质副本提供,并且据此通过引用并入说明书中。包含序列表的文本文件的名称为EQIL_009_02WO_ST25.txt。文本文件为6KB,创建于2020年2月26日,并将通过EFS-Web电子提交。

发明领域

[0005] 本公开内容尤其涉及使用CD6-ALCAM途径抑制剂例如抗CD6抗体治疗炎性或自身免疫性疾病(例如狼疮性肾炎)的方法。具体地,在一些实施方案中,本公开内容涉及在被鉴定为用抗CD6抗体(例如,EQ001)进行治疗的候选者的受试者中治疗炎性或自身免疫性疾病(例如,狼疮性肾炎)的方法。

[0006] 发明背景

[0007] 炎症和自身免疫性疾病是涉及免疫系统对正常器官系统的异常反应的疾病或病况。异常免疫反应可涉及先天性和适应性免疫细胞反应,并可涉及多种细胞类型,如T细胞、B细胞、树突细胞、单核细胞和中性粒细胞。这些疾病可以全身性影响多个器官系统或局限于单个器官。这些疾病的原因通常是未知的;它们可以在家族中发生或与环境触发或感染有关。这些疾病的治疗因疾病而异,并且涉及广泛抑制免疫系统或可以靶向免疫系统的武器(包括T细胞、B细胞、细胞因子和补体)的疗法。虽然许多不同的免疫细胞参与了这些炎症和自身免疫性疾病的发病机制,但认识到T细胞在免疫反应的启动中和在随后的炎症级联中发挥着核心作用。此外,T细胞也可是致病的,进入组织,分泌炎性细胞因子,并招募其他炎性细胞,从而导致组织破坏和损伤。有超过80种自身免疫性疾病,其中许多疾病没有获得FDA批准的疗法。鉴于对于抑制或调节免疫系统的药物的毒性的挑战,可以帮助鉴定最可能对给定靶向治疗有反应的患者的生物标志物将在最大化患有特定疾病的患者群体对给定治疗的获益风险方面具有临床效用。

[0008] 狼疮是人类全身性自身免疫性疾病的原型,其特征在于多种多器官损伤。它是一种牵涉攻击结缔组织的抗体的自身免疫性疾病。据估计,这种疾病影响了近100万美国人,主要是20-40岁的女性。狼疮的主要形式是系统性狼疮(系统性红斑狼疮;SLE),并且与抗核抗体的产生、循环免疫复合物和补体系统的激活有关。虽然SLE的发病机制尚不完全清楚,但已知B细胞、T细胞和单核细胞在疾病进展中起关键作用。

[0009] 具体而言,存在多克隆B细胞和T细胞活性的显著增加,并且这种增加的特征在于T细胞的发展和针对多种自身抗原的抗体反应。从理论上讲,T细胞的激活刺激针对特定表位的自身反应性B细胞的产生,然后可以扩展到其他表位。如上所述,此类抗体反应可包括如上所述针对自身抗原的自身抗体例如抗核抗体(ANA)和抗双链DNA抗体的产生。

[0010] SLE可以影响任何器官系统并且可以导致严重的组织损伤。未经治疗的狼疮可能

是致命的,因为它会从皮肤和关节的攻击发展到内脏器官,包括肺、心脏和肾脏,被称为狼疮性肾炎(LN)的肾脏疾病是主要问题。狼疮主要表现为一系列突然发作(“活动性疾病”),其之间是很少或没有疾病表现的时期(“非活动性疾病”)。

[0011] LN是SLE中与致病性相关的损伤的最严重领域之一,并且占该疾病的死亡率和发病率的至少50%。LN是一种异质性疾病,涉及驱动免疫发病机制的多种不同免疫细胞类型。图1。目前,对于诊断患有SLE或LN的患者尚无完全治愈的治疗方法。从实践的角度来看,医生通常使用多种强效免疫抑制药物,例如高剂量皮质类固醇,例如泼尼松或硫唑嘌呤或环磷酰胺,其在突然发作期间给予,但对于经历了频繁的突然发作的那些患者也可以持续给予。即使使用有效的治疗(其减轻症状并延长寿命),这些药物中的许多具有需要谨慎管理的严重的有害副作用。此外,一些患者对类固醇治疗具有耐药性或难治性。

[0012] 该疾病的上述动态特性进一步增加了LN疾病管理的复杂性。例如,LN免疫发病机制在患者中通过T细胞然后B细胞驱动的疾病的不同阶段动态进展,并且了解疾病发病机制何时例如更多地被T细胞驱动可能在时间上提示治疗干预何时最有可能成功,因为当T细胞启动免疫反应时,疾病进展可能在早期是可以预防的。此外,了解病状的潜在机制可以提示最有可能有效的治疗类型,从而实现治疗潜在疾病的靶向治疗,而不仅仅是使用一般免疫抑制剂或化疗非特异性地关闭或下调整个免疫系统。

[0013] 单独地靶向B细胞的药物在治疗LN中未能显示出显著或一致的功效,尽管T细胞靶向疗法已显示出益处,但它们的使用受限于可能由于疾病的异质性而引起的毒性,并且由于缺乏关于疾病是活动性还是非活动性的可靠信息而使用较不最佳的治疗方案而受到限制。

[0014] 肝脏活组织检查可在一定程度上提示LN疾病状态和进展,但它们限于不经常的使用,并且因为疾病可能不均匀地分布在采样的器官上,所以它们容易受到可变结果的影响。血液标志物可能适用于某些适应症,但并不总是指示组织中局部发生的生物学。

[0015] 因此,仍然需要具有更少的有害副作用的针对LN的更有效的治疗。此外,仍然需要监测SLE和LN疾病进展的途径,以有效地提示患者何时处于活动性疾病状态或正在从非活动状态转变为活动性疾病状态。此外,本领域非常需要精确的治疗方法来鉴定可能可以用特定疗法治疗SLE或LN的患者,使得可以减少或消除使用强力免疫抑制剂和化学治疗剂进行治疗的鸟枪法的需要。本公开内容解决了这些缺陷。

[0016] 发明概述

[0017] 本公开内容涉及在被确定为特定治疗的候选者的某些受试者子集中治疗炎性或自身免疫性疾病或病症(例如SLE或LN)的方法。具体实施方案涉及在被确定为用CD6-ALCAM途径抑制剂进行治疗的候选者的某些受试者子集中治疗炎性或自身免疫性疾病或病症(例如SLE或LN)的方法。

[0018] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于鉴定受试者是否患有对CD6-ALCAM途径抑制敏感的狼疮性肾炎形式的方法,该方法包括确定受试者是否表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白。

[0019] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗狼疮性肾炎的方法,该方法包括:

[0020] (a)确定从患有或怀疑患有狼疮性肾炎的受试者获得的生物样品是否含有升高水

平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;和

[0021] (b)如果生物样品含有升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0022] 在一些实施方案中,本发明提供了一种使用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗患有狼疮性肾炎的受试者的方法,该方法包括以下步骤:

[0023] (a)确定受试者是否表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;和

[0024] (b)如果受试者表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0025] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗受试者的方法,其中受试者患有狼疮性肾炎,该方法包括以下步骤:

[0026] (a)通过以下方式确定受试者是否患有CD6-ALCAM途径抑制剂敏感的疾病:

[0027] (b)从受试者获得或已经从受试者获得生物样品;和

[0028] (c)对生物样品进行或已经进行测定以确定样品是否表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;和

[0029] (d)如果受试者具有升高的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于鉴定受试者是否患有对CD6-ALCAM途径抑制敏感的炎性或自身免疫性疾病的方法,该方法包括确定受试者是否表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗炎性或自身免疫性疾病的方法,该方法包括:

[0032] (a)确定从患有或怀疑患有炎性或自身免疫性疾病的受试者获得的生物样品是否含有升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;和

[0033] (b)如果生物样品含有升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0034] 在一些实施方案中,本发明提供了一种使用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗患有炎性或自身免疫性疾病的受试者的方法,该方法包括以下步骤:

[0035] (a)确定受试者是否表现出升高的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;和

[0036] (b)如果受试者表现出升高的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0037] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗受试者的方法,其中受试者患有炎性或自身免疫性疾病,该方法包括以下步骤:

[0038] (a)通过以下方式确定受试者是否患有CD6-ALCAM途径抑制剂敏感的疾病:

[0039] (b)从受试者获得或已经从受试者获得生物样品;

[0040] (c)对生物样品进行或已经进行检测以确定样品是否表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;和

[0041] (d)如果受试者具有升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0042] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于鉴定受试者是否患有对CD6-ALCAM途径

抑制敏感的狼疮性肾炎形式的方法,该方法包括确定受试者是否表现出升高水平的CD6和/或ALCAM多核苷酸。在某些实施方案中,该方法包括确定编码ALCAM或CD6多肽的多核苷酸的信使RNA(mRNA)表达的水平。

[0043] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗狼疮性肾炎的方法,该方法包括:

[0044] (a)确定从患有或怀疑患有狼疮性肾炎的受试者获得的生物样品是否含有升高水平的方法包括确定受试者是否表现出升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA和

[0045] (b)如果生物样品含有升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0046] 在各种实施方案中,术语“CD6 mRNA”和“ALCAM mRNA”在本文中分别用于指编码CD6或ALCAM多肽的mRNA多肽。

[0047] 在一些实施方案中,本发明提供了一种使用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗患有狼疮性肾炎的受试者的方法,该方法包括以下步骤:

[0048] (a)确定受试者是否表现出升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA;和

[0049] (b)如果受试者表现出升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0050] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗受试者的方法,其中受试者患有狼疮性肾炎,该方法包括以下步骤:

[0051] (a)通过以下方式确定受试者是否患有CD6-ALCAM途径抑制剂敏感的疾病:

[0052] (b)从受试者获得或已经从受试者获得生物样品;和

[0053] (c)对生物样品进行或已经进行测定以确定样品是否表现出升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA;和

[0054] (d)如果受试者具有升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0055] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于鉴定受试者是否患有对CD6-ALCAM途径抑制敏感的炎性或自身免疫性疾病的方法,该方法包括确定受试者是否表现出升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA。

[0056] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗炎性或自身免疫性疾病的方法,该方法包括:

[0057] (a)确定从患有或怀疑患有炎性或自身免疫性疾病的受试者获得的生物样品是否含有升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA;和

[0058] (b)如果生物样品含有升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0059] 在一些实施方案中,本发明提供了一种使用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗患有炎性或自身免疫性疾病的受试者的方法,该方法包括以下步骤:

[0060] (a)确定受试者是否表现出升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA;和

[0061] (b)如果受试者表现出升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0062] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗受试者的方

法,其中受试者患有炎性或自身免疫性疾病,该方法包括以下步骤:

[0063] (a)通过以下方式确定受试者是否患有CD6-ALCAM途径抑制剂敏感的疾病:

[0064] (b)从受试者获得或已经从受试者获得生物样品;和

[0065] (c)对生物样品进行或已经进行测定以确定该样品是否表现出升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA;和

[0066] (d)如果受试者具有升高水平的CD6和/或ALCAM mRNA,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0067] 在一些实施方案中,本文公开的任何一种方法可包括CD6-ALCAM途径抑制剂,其为EQ001。

[0068] 在一些实施方案中,本文公开的任何一种方法可包括CD6-ALCAM途径抑制剂,其为抗CD6抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段是人源化抗体。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段结合CD6上的结构域1或3。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段结合CD6上的结构域3。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段选自:EQ001、ALZUMAb、UMCD6 mAb、Itolizumab、T1h、表1中描述的抗CD6抗体和本文公开的抗CD6抗体。在一些实施方案中,抗CD6单克隆抗体是通过分泌性杂交瘤IOR-T1A产生的抗体,该杂交瘤IOR-T1A保藏于ECACC,保藏号为ECACC 96112640;与由所述分泌性杂交瘤产生的所述抗体具有相同序列的抗体;或具有由所述分泌性杂交瘤产生的所述抗体的相同CDR序列的抗体。在一些实施方案中,抗原结合片段选自Fv、Fab、CDR1、CDR2、CDR3、CDR的组合、可变区、重链和轻链。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段包含选自SEQ ID NO:5-10的一个或多个CDR序列。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段包含重链和轻链可变区,所述重链和轻链可变区包含如SEQ ID NO:1和2所示的氨基酸序列。在一些这样的实施方案中,SEQ ID NO:1和2分别由SEQ ID NO:3和4的核苷酸序列编码。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段包含与如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的VH序列。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段包含与如在SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列至少80%、85%、90%或95%相同的VK序列。在一些实施方案中,抗CD6抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列至少80%相同的VH序列和与SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列至少80%相同的VK序列。

[0069] 在一些实施方案中,根据所公开的方法分析选自血液、血清、尿液、痰、CSF、BALF和粪便的样品的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平。在一些实施方案中,此类样品表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白(例如,与来自患者的先前样品相比或与正常未患病患者或通常在未患病患者中看到的蛋白的参考水平相比升高的水平)。在一些实施方案中,尿样表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白(例如,与来自患者的先前样品相比或与正常未患病患者或通常在未患病患者中看到的蛋白的参考水平相比升高的水平)。

[0070] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,受试者可能患有狼疮性肾炎。在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,与没有患有狼疮性肾炎的个体相比,患有狼疮性肾炎的受试者具有升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白。

[0071] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,与没有患有炎性或自身免疫性疾病的个体相比,患有炎性或自身免疫性疾病的受试者具有升高水平的可溶性CD6和/或

ALCAM蛋白。

[0072] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,在来自受试者的第一样品和一个或多个第二样品中测定可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平。在某些实施方案中,与第一样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平相比,第二样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平升高。在某些实施方案中,第二样品中可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的这种升高的水平指示受试者的活动性疾病。在某些实施方案中,第二样品中可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平的降低指示受试者中从活动性疾病到消极性疾病(passive disease)的转变。

[0073] 在一些实施方案中,与第一样品相比,第二样品中可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平的阈值增加指示受试者中从消极性疾病到活动性疾病的转变。在一些实施方案中,与第一样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平相比,第二样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平没有升高。在一些实施方案中,第二样品中可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平指示受试者没有狼疮性肾炎或任何炎性或自身免疫性疾病。在一些实施方案中,在数天、数周、数月或数年的时间过程中从受试者获得的多个第二样品中测量CD6和/或ALCAM的水平。

[0074] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,使用选自单重ELISA;多重ELISA,使用基于FAC的检测的基于珠子的免疫捕获;使用基于ELISA的检测的基于珠子的免疫捕获;使用基于化学发光的检测的基于珠子的免疫捕获;中尺度诊断(MSD);定量蛋白质印迹;高效液相色谱(HPLC);及其组合的方法检测CD6和/或ALCAM蛋白的水平。

[0075] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,被检测的CD6和/或ALCAM蛋白是全长蛋白。在一些实施方案中,被检测的CD6和/或ALCAM蛋白是全长蛋白的片段。在一些实施方案中,被检测的全长CD6蛋白的片段包含CD6的整个胞外结构域,或CD6的胞外结构域的一部分。

[0076] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,该方法可以包括向受试者施用EQ001。在特定实施方案中,如果根据本文公开的方法确定受试者患有活动性疾病,和/或如果根据本文公开的方法确定受试者患有对CD6-ALCAM途径抑制敏感的狼疮性肾炎或炎性或自身免疫性疾病的形式,则本文公开的方法可以包括向受试者施用EQ001。在一些实施方案中,该方法进一步包括施用另外的治疗剂。在一些实施方案中,另外的治疗剂是类固醇或免疫抑制剂。在一些实施方案中,类固醇是皮质类固醇。在一些实施方案中,皮质类固醇是泼尼松。在一些实施方案中,药剂选自霉酚酸酯和环磷酰胺。

[0077] 在一些实施方案中,本发明提供了一种预测患有狼疮性肾炎的受试者的预后的方法,该方法包括以下步骤:

[0078] (a)在数天、数周、数月或数年的时间过程中从受试者获得或已经从受试者获得多个生物样品;和

[0079] (b)对每个生物样品进行或已经进行测定以确定样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平是否随时间变化;其中

[0080] (i)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平随时间增加,则确定预后为不良;

[0081] (ii)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平没有随时间变化,则确定预后为中性;和

[0082] (iii)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平随时间降低,则确定预后为良好。

[0083] 在一些实施方案中,本发明提供了一种预测患有炎性或自身免疫性疾病的受试者的预后的方法,该方法包括以下步骤:

[0084] (a)在数天、数周、数月或数年的时间过程中从受试者获得或已经从受试者获得多个生物样品;和

[0085] (b)对每个生物样品进行或已经进行测定以确定样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平是否随时间变化;其中

[0086] (i)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平随时间增加,则确定预后为不良;

[0087] (ii)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平没有随时间变化,则确定预后为中性;和

[0088] (iii)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平随时间降低,则确定预后为良好。

[0089] 在一些实施方案中,本发明提供了一种确定受试者是否患有活动性狼疮性肾炎的方法,包括

[0090] (a)确定存在于受试者的样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第一浓度;

[0091] (b)确定分别来自没有活动性狼疮性肾炎的对照人或对照人群体的相似样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度或平均浓度;和

[0092] (c)如果第一浓度大于第二浓度,则确定受试者患有活动性肾炎。

[0093] 在一些实施方案中,本发明提供了一种确定受试者是否患有活动性炎性或自身免疫性疾病的方法,包括

[0094] (a)确定存在于受试者的样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第一浓度;

[0095] (b)确定分别来自没有活动性狼疮性肾炎的对照人或对照人群体的相似样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度或平均浓度;和

[0096] (c)如果第一浓度大于第二浓度,则确定受试者患有活动性肾炎。

[0097] 在一些实施方案中,本发明提供了一种确定受试者是否已经从非活动性狼疮性肾炎转变为活动性狼疮性肾炎的方法,包括

[0098] (a)确定存在于来自受试者的第一样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第一浓度;其中第一样品是在受试者患有非活动性狼疮性肾炎时从受试者获得的;

[0099] (b)确定存在于来自受试者的一个或多个第二样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度;其中每个第二样品是在获得第一样品之后从受试者获得的;和

[0100] (c)如果可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度大于第一浓度,则确定受试者患有活动性狼疮性肾炎或正在转变为活动性肾炎。

[0101] 在一些实施方案中,本发明提供了一种确定受试者是否已经从非活动性炎性或自身免疫性疾病转变为活动性炎性或自身免疫性疾病的方法,包括

[0102] (a)确定存在于受试者的第一样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第一浓度;其中第一样品是在受试者患有非活动性狼疮性肾炎时从受试者获得的;

[0103] (b)确定存在于来自受试者的一个或多个第二样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋

白的第二浓度;其中每个第二样品是在获得第一样品之后从受试者获得的;和

[0104] (c)如果可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度大于第一浓度,则确定受试者患有活动性狼疮性肾炎或正在转变为活动性肾炎。

[0105] 在一些实施方案中,本文公开的任何一种方法可以进一步包括如果受试者患有活动性LN或正在转变为活动性LN,则向受试者施用EQ001。在一些实施方案中,该方法进一步包括施用另外的治疗剂。在一些实施方案中,另外的治疗剂是类固醇或免疫抑制剂。在一些实施方案中,类固醇是皮质类固醇。在一些实施方案中,皮质类固醇是泼尼松。在一些实施方案中,药剂选自霉酚酸酯和环磷酰胺。

[0106] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,CD6-ALCAM途径抑制剂是通过肠胃外递送施用的抗CD6单克隆抗体。

[0107] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,CD6-ALCAM途径抑制剂是与药学上可接受的载体一起施用的抗CD6单克隆抗体。

[0108] 在一些实施方案中,在本文公开的任何一种方法中,抗CD6抗体是人源化抗体。

[0109] 应当理解,这里描述的各种实施方案的特性中的一个、一些或全部可以组合以形成本发明的其他实施方案。本发明的这些和其他方面对于本领域技术人员来说将变得明显。

[0110] 序列简述

[0111] SEQ ID NO:1:EQ001 VH序列的氨基酸序列;

[0112] SEQ ID NO:2:EQ001 VK序列的氨基酸序列;

[0113] SEQ ID NO:3:EQ001 VH序列的核苷酸(DNA)序列;

[0114] SEQ ID NO:4:EQ001 VK序列的核苷酸(DNA)序列;

[0115] SEQ ID NO:5:EQ001 VH CDR1的氨基酸序列;

[0116] SEQ ID NO:6:EQ001 VH CDR2的氨基酸序列;

[0117] SEQ ID NO:7:EQ001 VH CDR3的氨基酸序列;

[0118] SEQ ID NO:8:EQ001 VK CDR1的氨基酸序列;

[0119] SEQ ID NO:9:EQ001 VK CDR2的氨基酸序列;

[0120] SEQ ID NO:10:EQ001 VK CDR3的氨基酸序列。

[0121] 附图的简要说明

[0122] 图1:狼疮性肾炎的异质性。LN肾活检的分析突出了患者的浸润免疫细胞群的差异。

[0123] 图2:对CD6靶向疗法有反应的LN患者的鉴定。基于LN的内在异质性,鉴定了对CD6靶向治疗的反应比其他患者更有效的某些患者子集。

[0124] 图3:肾组织内CD6和ALCAM的表达。图3A-3D显示了从冷冻肾组织样品或获自LN和对照受试者的尿样的细胞获得的公开可用(Arazi 2019)单细胞RNA Seq数据的从头分析。图3A显示跨肾细胞类型的CD6和ALCAM表达。图3B显示从获自LN和对照受试者的肾活检分离的上皮细胞和浸润性白细胞中的CD6和ALCAM表达,以及从LN患者收集的尿白细胞中的CD6和ALCAM表达。图3C显示与来自健康患者的对照样品中的CD6表达相比,在疾病的不同阶段从LN患者获得的样品中的肾CD6表达。图3D显示了来自健康或LN患者的样品中CD6阳性T细胞、ALCAM阳性肾小管和ALCAM阳性巨噬细胞的数量。

[0125] 图4:LN患者中尿液ALCAM水平的升高。图4A显示了从患有活动性LN、活动性非肾SLE、非活动性SLE的患者和健康对照获得的尿样中的ALCAM水平(pg/ml)。图4B显示尿液ALCAM蛋白检测作为LN的生物标志物的性能。

[0126] 图5:来自多个种族和不同疾病活动性的SLE患者的尿液ALCAM蛋白的水平。图5A-5D:在多种族的活动性LN患者和具有不同疾病活动性的经辨别的患者中,Cr标准化的尿液ALCAM显著升高。5E-5G:尿液ALCAM与几个临床参数(包括SLEDAI、SLEDAI的肾脏结构域和PGA)相关性很好。HC,健康对照,ANR,活动性非肾狼疮;AR,活动性肾狼疮。

[0127] 图6:ALCAM(CD166)和CD6的肾表达在SLE患病小鼠中增加。从患有肾炎的6月龄的MRL/lpr小鼠和没有肾炎的对照C57BL/6小鼠收获的肾脏针对ALCAM(CD166,红色,图6A和图6B)和CD6(红色,图6C)连同所指示的其他标记(包括骨髓标志物CD11b或T细胞标志物CD6和CD3)进行染色。浸润MRL/lpr小鼠的肾小球的巨噬细胞是ALCAM+,在图6A中用白色箭头指示。CD6+ T细胞浸润在图6C中用白色箭头指示。显示了代表性每组3只小鼠的图像。

[0128] 图7:使用MRL/lpr模型的实验的研究设计。

[0129] 图8:CD6阻断减少了SLE模型中的疾病和活化的肾浸润T细胞的数量。图8A显示了通过uristix测量的纵向蛋白尿。图8B显示了通过尿白蛋白:肌酐比率测量的蛋白尿。图8C显示如通过终末血清中的血尿素氮(BUN)水平测量的肾功能。图8D显示了描绘治疗组存活率的Kaplan-meier曲线。图8E-8F显示淋巴结病。图8E显示了通过在终止时左右腹股沟淋巴结的体积测量值的平均值对淋巴结病的评估。图8F显示了通过对淋巴结肿胀评分来评估淋巴结病。图8G显示在终止时肾浸润免疫细胞和T细胞的频率被抗mCD6治疗降低。图8H显示了终止时肾脏中的总的效应/记忆(CD44+)和活化(CD25+CD69+)CD4 T细胞的数量。图8I显示了终止时肾脏中总的和效应/记忆(CD44+)CD8 T细胞的数量。对于图8中的所有图,****$p<0.0001$;***$p<0.001$;**$p<0.01$;*$p<0.05$。

[0130] 图9:CD6阻断减少肾脏中的病状。肾小球(图9A)和肾小管(图9B)的组织学评分由不知情的病理学家进行,显示肾小球病状的显著改善。***$p<0.001$;**$p<0.01$;*$p<0.05$。

[0131] 图10:CD6阻断改善了SLE的皮肤表现。图10A显示了皮肤组织的组织学检查。图10B显示了终止时皮肤病变的宏观评分。

[0132] 图11:CD6阻断减少了皮肤中的浸润性淋巴细胞。来自MRL/lpr小鼠的皮肤组织切片针对巨噬细胞(绿色)、C3(红色)和IgG(橙色)进行染色。图11A显示来自用同种型对照处理的MRL/lpr小鼠的样品的染色。图11B显示来自用抗mCD6抗体处理的MRL/lpr小鼠的样品的染色。图11C显示了来自MPJ健康对照小鼠的样品的染色。

[0133] 图12:在肾毒性血清肾炎(NTN)的加速小鼠模型中用CD6阻断治疗SLE/狼疮性肾炎(LN)。图12A显示了实验治疗方案。图12B显示了来自媒介物和抗mCD6抗体治疗的动物的肾组织的组织切片。图12C显示了肾小球切片的针对毛细血管内增殖、新月体和沉积物的盲评分,如由有经验的肾病理学家以0-4的等级评估的。图12D显示肾小管切片的针对肾小管管型和间质炎症的盲评分,如由有经验的肾病理学家以0-4的等级评估的。图12E显示了通过uristix测量的纵向蛋白尿。图12F显示尿白蛋白:肌酐比率。图12G显示了终止时(第11天)的血清血尿素氮水平(右图)。图12E-12G中的数据代表两个独立实验。

[0134] 图13:CD6阻断降低肾炎中的肾细胞因子水平。图13A显示肾组织中VCAM的mRNA表达水平。图13B显示肾组织中CCL5/Rantes的mRNA表达。图13C显示如通过多重的基于流式细

胞术的检测评估的肾脏中炎性细胞因子的蛋白质水平。

[0135] 图14:CD6阻断减少了肾组织中的免疫浸润。对肾脏进行流式细胞术以评估抗mCD6治疗对免疫细胞浸润的影响。图14A显示了抗CD6治疗的小鼠相对同种型和媒介物对照小鼠两者的免疫细胞积累(CD45+)的相对数量。图14B-14D显示炎性骨髓细胞。图14B显示了单核细胞(CD11b+)的相对数量。图14C显示炎性巨噬细胞的相对数量。图14D显示了嗜中性粒细胞的相对数量。图14E-14F显示了T细胞群的相对数量。图14E显示CD3+ T细胞的相对数量。图14F显示了活化的CD4(CD25+CD69+)T细胞的相对数量。

[0136] 图15:CD6-ALCAM途径在SLE的NZB/W F1和B6.Sle1yaa模型中是活化的。图15A显示在NZB/W F1小鼠中在疾病发展后(12个月)相对疾病前(≤6个月)的ALCAM(标准化至尿肌酐水平)增加。图15B显示B6.Sley1aa小鼠中在疾病发展后(6个月)相对疾病前(≤3个月)的ALCAM(标准化至尿肌酐水平)增加。图15C显示在26周(~6个月)开始用抗mCD6治疗NZB/W F1雌性小鼠降低蛋白尿(肾功能的重要量度)。

[0137] 发明详述

[0138] 一般方法

[0139] 除非有特别的相反指示,否则本发明的实施将采用本领域技术范围内的常规分子生物学方法和重组DNA技术,为举例说明目的在下文中描述了其中的许多方法。文献中对这种技术进行了充分的解释。例如参见Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(3rd Edition,2000);DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II(D.Glover,ed.);Oligonucleotide Synthesis(N.Gait,ed.,1984);Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications(P.Herdewijn,ed.,2004);Nucleic Acid Hybridization(B.Hames&S.Higgins,eds.,1985);Nucleic Acid Hybridization:Modern Applications(Buzdin and Lukyanov,eds.,2009);Transcription and Translation(B.Hames&S.Higgins,eds.,1984);Animal Cell Culture(R.Freshney,ed.,1986);Freshney,R.I.(2005)Culture of Animal Cells,a Manual of Basic Technique,5th Ed.Hoboken NJ,John Wiley&Sons;B.Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(3rd Edition 2010);Farrell,R.,RNA Methodologies:A Laboratory Guide for Isolation and Characterization(3rd Edition 2005).Poly(ethylene glycol),Chemistry and Biological Applications,ACS,Washington,1997;Veronese,F.,and J.M.Harris,Eds.,Peptide and protein PEGylation,Advanced Drug Delivery Reviews,54(4)453-609(2002);Zalipsky,S.等人,"Use of functionalized Poly(Ethylene Glycols)for modification of polypeptides"在Polyethylene Glycol Chemistry:Biotechnical and Biomedical Applications。以上讨论的出版物仅提供其先于本申请申请日前的公开内容。本文中的任何内容均不应解释为承认本发明由于在先发明而无权早于这样的公开内容。

[0140] 定义

[0141] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有的含义均与本发明所属的领域中的普通技术人员通常所理解的相同。尽管与本文描述的那些方法或材料相似或等同的任何方法和材料都可以用于本发明的实践或测试中,但本文描述了优选的方法和材料。为了本发明的目的,以下术语如下定义。

[0142] 本文使用的冠词"一种"和"一个"是指一种或多于一种/一个或多于一个(即至少

一种/至少一个)该冠词的语法对象。举例而言,“一个元素”意指一个元素或多于一个元素。

[0143] 除非另外指出,否则术语“和/或”在本发明中用于表示“和”或“或”。

[0144] 本文所使用的术语“例如”意指“诸如”,并且将被理解为暗示包括所述的步骤或元素、或步骤或元素组,而不排除任何其他步骤或元素、或步骤或元素组。

[0145] “约”意指量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量或长度相对于参考量、水平、值、数、频率、百分比、尺寸、大小、数量、重量或长度相差至多30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。

[0146] 如本文所用,术语“施用”是指以任何模式向受试者转移、递送、引入或运输物质,例如化合物(例如药物化合物)或其他试剂(如抗原)。施用模式包括口服施用、局部接触、静脉内、腹膜内、肌内、鼻内或皮下施用。与诸如一种或多种治疗剂的另一种物质“组合”施用包括同时(并行的)和连续施用(以任何顺序)。

[0147] 如本文所用,术语“结合伴侣”是指可以通过足以使试剂与核酸分子、肽、蛋白质或糖、多糖或脂质形成复合物的相互作用(通常通过非共价键合)而与核酸分子(例如DNA或RNA,包括mRNA分子)、以及肽、蛋白质、糖、多糖或脂质结合的物质(例如分子,特别是聚合物分子)。在一些实施方案中,结合伴侣是PNA分子。在一些实施方案中,结合伴侣是免疫球蛋白或具有如下定义的免疫球蛋白样功能的似蛋白质结合分子。在一些实施方案中,结合伴侣是适体。在一些实施方案中,结合伴侣对特定靶标具有特异性。在一些实施方案中,结合伴侣包括多个结合位点,每个结合位点对于特定靶标是具有特异性的。作为说明性示例,结合伴侣可以是具有两个结合位点的具有免疫球蛋白样功能的蛋白质性试剂。例如,结合伴侣可以是抗体的抗原结合片段。例如,结合伴侣可以是双特异性双抗体,例如双特异性单链双抗体。

[0148] 如本公开内容中所使用的,术语“载体”涵盖载体、赋形剂和稀释剂,并且意指材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或封装材料,其参与将药物制剂从受试者的身体的一个器官或一部分运载或运输到受试者的身体的另一器官或另一部分。

[0149] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指包含来自多于一个物种的序列的免疫球蛋白多肽或结构域抗体。在嵌合抗体中,重链或轻链可包含来自一种物种(例如人)的可变区序列和来自另一物种(例如小鼠)的恒定区序列。例如,“嵌合抗体”可以是与另一分子(例如,衍生自人抗体的恒定结构域)融合的、具有衍生自动物抗体(例如大鼠或小鼠抗体)的可变区的免疫球蛋白。术语“嵌合抗体”旨在涵盖以下抗体,其中:(i)重链是嵌合的,但轻链包含来自仅一个物种的V区和C区;(ii)轻链是嵌合的,但重链包含来自仅一个物种的V区和C区;以及(iii)重链和轻链都是嵌合的。

[0150] 当与化合物结合使用时,“有效量”是引起期望反应所需的化合物(例如抗CD6抗体(例如,EQ001))的量。在一些实施方案中,期望反应是例如在受试者中的生物反应。在一些实施方案中,可以将化合物(例如抗CD6抗体)以有效量施用于受试者,以在受试者中产生生物反应。在一些实施方案中,有效量是“治疗有效量”。

[0151] 术语“治疗有效量”和“治疗剂量”在本文中互换使用,是指化合物、例如抗CD6抗体(例如,EQ001)的量,其在施用于受试者后有效用于治疗如本文所述的受试者的疾病或病症。

[0152] 术语“预防有效量”在本文中用于指化合物、例如抗CD6抗体(例如,EQ001)的量,该化合物在施用于受试者后有效用于预防或延迟如本文所述的受试者的疾病或病症的发病。

[0153] 在这方面,如本文所用的“人源化抗体”是含有人抗体的结构元件和非人抗体的抗原结合位点的免疫球蛋白多肽或结构域抗体。“人源化抗体”含有来自非人抗体的最少数量的残基,人源化抗体衍生自该非人抗体。例如,人源化抗体可以仅包含非人抗体的CDR区,或仅包含构成非人抗体的高变区的那些残基。人源化抗体还可含有来自非人多肽的可变区之外的某些残基,例如模拟非人抗体的结构或使空间干扰最小化所必需的残基。通常,人源化抗体包含人框架、至少一个来自非人抗体的CDR,存在的任何恒定区与人免疫球蛋白恒定区基本相同,即至少约85%-90%相同,例如至少95%相同。因此,在某些情况下,人源化免疫球蛋白的所有部分(可能不包括CDR)与一种或多种天然人免疫球蛋白序列的相应部分基本相同。另外,人源化抗体可包含不对应于人抗体或非人抗体的残基。

[0154] 如本文所用,术语“抗体片段”是指除全长形式以外的任何形式的抗体。本文的抗体片段包括存在于全长抗体中的较小成分的抗体和已被工程化的抗体。抗体片段包括但不限于:Fv、Fc、Fab、和(Fab')2、单链Fv(scFv)、双抗体、三抗体、四抗体、双功能杂交抗体、CDR1、CDR2、CDR3、CDR组合、可变区、框架区、恒定区、重链、轻链、替代支架非抗体分子、以及双特异性抗体。除非另有特别说明,否则使用术语一个或多个“抗体”的记载和权利要求可以具体包括一个或多个“抗体片段”。

[0155] 术语“VH”在本文中用于表示抗体的可变重链。

[0156] 术语“VK”在本文中用于表示抗体的可变轻链。

[0157] 关于抗体的术语“抗原结合片段”是指对亲本全长抗体所结合的抗原保持结合亲和力的任何抗体片段,并且抗原结合片段包括但不限于:Fv、Fab、(Fab')2、scFv、双抗体、三抗体、四抗体、双功能杂交抗体、CDR1、CDR2、CDR3、CDR组合、可变区、重链、轻链和双特异性抗体。

[0158] 在整个说明书中,除非上下文另外要求,否则词语“包括”、“包含”和“含有”将被理解为暗示包括所述的步骤或元素、或步骤或元素组,而不排除任何其他步骤或元素、或步骤或元素组。“由……组成”意指包括且限于跟随在短语“由……组成”之后的任何内容。因此,短语“由……组成”表示所列元素是必需的或强制性的,并且不可以存在其它元素。“基本上由……组成”意指包括在该短语之后列出的任何元素,并且限于不干扰或不促成本公开内容中对于所列元素所指定的活性或功能的其他元素。因此,短语“基本上由……组成”表示所列出的元素是必需的或强制性的,但是其他元素是可选的并且可以存在或可以不存在,这取决于其是否实质性地影响所列出的元素的活性或功能。

[0159] 术语“调节”包括与对照相比通常以统计上显著或生理上显著的量“增加”、“增强”或“刺激”以及“减少”或“降低”。“增加的”、“刺激的”或“增强的”的量通常是“统计上显著”的量,并且可以包括由无组合物(例如,在不存在本发明的任何抗CD6抗体的情况下)或对照组合物、样品或测试受试者产生的量的1.1、1.2、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30倍或更多倍(例如500倍、1000倍)(包括介于其之间并且大于1的所有整数和小数点,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的增加。“减少的”或“降低的”的量通常是“统计上显著”的量,并且可以包括由无组合物(不存在试剂或化合物)或对照组合物产生的量的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、

35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或100％(包括其之间的所有整数)的减少。

[0160] 术语“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物以及其变体和合成类似物。因此,这些术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是合成的非天然存在的氨基酸(例如相应的天然存在的氨基酸的化学类似物)的氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物。

[0161] 如本文所用,“受试者”或“患者”包括表现出症状或有表现出症状风险的任何动物,该症状可以用抗CD6抗体或其抗原结合片段治疗或诊断。合适的受试者(患者)优选包括人患者。合适的受试者还包括实验动物(例如小鼠、大鼠、兔或豚鼠)、耕畜(例如猪、马、牛)、以及家畜或宠物(例如猫或狗)。还包括非人灵长类动物(例如猴子、黑猩猩、狒狒或恒河猴)。在各种实施方案中,术语“受试者”和“患者”可以互换使用。

[0162] “实质上”或“基本上”意指几乎完全地或完全地,例如,一些给定数量的95％或更高。

[0163] 如本文所用,“治疗”或“对.....进行治疗”包括对疾病或病症的症状或病理的任何期望的效果,并且可以包括对所治疗的疾病或病症的一种或多种可测量标记物的甚至极小的改变或改善。“治疗”或“对.....进行治疗”不一定表示完全根除或治愈了该疾病或病症或其相关症状。接受该治疗的受试者是需要该治疗的任何受试者。临床改善的示例性标记物对本领域技术人员将是明显的。

[0164] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有的含义均与本发明所属的领域中的普通技术人员通常所理解的相同。尽管与本文描述的那些方法、组合物、试剂、细胞相似或等同的任何方法、组合物、试剂、细胞都可以用于本发明的实践或测试中,但本文描述了优选的方法和材料。本说明书中引用的所有出版物和参考文献,包括但不限于专利和专利申请,其全部内容通过引用并入本文,就像每个单独的出版物或参考文献均被明确地和单独地表示为通过引用其全部内容并入本文一样。本申请要求优先权的任何专利申请也以上述针对出版物和参考文献的方式通过引用整体并入本文。

[0165] 概述

[0166] 本公开内容涉及在被确定为特定治疗(例如,用EQ001和/或CD6-ALCAM途径的另一种抑制剂治疗)的候选者的某些受试者子集中治疗炎性或自身免疫性疾病或病症(例如SLE或LN)的方法。在一些实施方案中,本公开内容提供可溶性CD6蛋白、可溶性ALCAM蛋白或两者作为指示活动性SLE、LN或其他炎性或自身免疫性疾病或病症(本文公开的或本领域已知的)和/或指示患者的对治疗干预有利地反应的可能性的生物标志物的用途。本发明部分基于高可溶性CD6蛋白、高可溶性ALCAM蛋白或两者与活动性T细胞驱动的炎性或自身免疫性疾病或病症(SLE或LN)的相关性。在患有或怀疑患有炎性或自身免疫性疾病或病症(例如SLE或LN)的患者的样品(例如尿液样品)中,这些标志物中的一种或两种的高表达可指示增加的通过CD6-ALCAM途径的信号传导,这进而指示异常的T细胞反应可能是活动性疾病病状的基础。

[0167] CD6是一种重要的细胞表面蛋白,主要由人T细胞和B细胞子集以及一些B细胞慢性淋巴细胞白血病和神经元表达。CD6是一个大的蛋白质家族的成员,其特征在于具有与I型巨噬细胞的清道夫受体富含半胱氨酸结构域(SRCR)同源的至少一个结构域。使用抗CD6单

克隆抗体(mAb)的阻断研究表明,CD6通过调节与胸腺上皮(TE)细胞的T细胞粘附相互作用在T细胞发育中发挥重要作用。

[0168] 另外的研究表明,CD6可以在T细胞活化中用作重要的辅助分子。例如,某些抗CD6 mAb直接促进T细胞有丝分裂[1,2],而其他的能够与抗CD3、抗CD2或佛波醇12肉豆蔻酸13醋酸盐(PMA)结合共同刺激T细胞增殖[1,3,4]。CD6在T细胞活化中的作用的其他证据来自显示CD6在Ser和Thr残基上过度磷酸化[5,6,7]并在T细胞活化后在Tyr残基上磷酸化[8]的研究。这些和其他研究表明CD6在体内是未成熟和成熟T细胞功能的重要调节剂,影响T细胞活化和信号转导。

[0169] 成熟CD6蛋白的胞外结构域由三个SRCR结构域(以下称为D1、D2和D3)组成。D3对应于膜近端SRCR结构域,后接一个短的33个氨基酸的茎区。这些胞外结构域通过一个短跨膜结构域后接一个可变长度的细胞质结构域锚定至细胞膜[13]。

[0170] 据报道,一种来源不明的可溶形式CD6(sCD6)在健康个体的血清中以非常低的水平(皮摩尔/纳摩尔范围)循环[14]。此外,在患有全身炎症反应综合征[15]和原发性干燥综合征[16]的个体中观察到升高水平的sCD6,但这些事件之间缺乏直接的机制和功能关系。报告表明sCD6是通过金属蛋白酶的ADAM家族成员的蛋白水解作用使膜结合受体脱落而形成的。此外,尽管sCD6在T细胞生理学中的功能作用尚不清楚,但体外结果表明sCD6抑制T细胞活化和免疫突触的成熟,促使一些研究人员假定sCD6作为诱饵受体使靠近炎症部位的旁观者T细胞失活。

[0171] 使用包含选定的融合到人IgG1恒定结构域的CD6胞外结构域(CD6-Rgs)的CD6-免疫球蛋白融合蛋白的研究导致CD6配体的鉴定和克隆,其被称为“活化的白细胞细胞粘附分子”(ALCAM),也称为CD166[9,10]。

[0172] ALCAM是一种100-105kD的I型跨膜糖蛋白(它是免疫球蛋白超家族的成员)并包含五个细胞外免疫球蛋白结构域(2个NH2-末端、膜-远端可变-(V)-型(V1、V2或D1、D2)和3个膜-近端恒定-(C2)-型Ig折叠)[C1、C2、C3]、跨膜区和短的胞质尾。N端结构域(D1)仅参与配体结合,而近膜结构域(C2、C3或D4、D5)是同源相互作用所必需的。

[0173] ALCAM结合对应于膜近端SRCR结构域的CD6的结构域3[11]。

[0174] CD6/ALCAM相互作用在T细胞调节中的作用的研究表明,该受体-配体对能够介导表达CD6的细胞与胸腺上皮细胞的粘附[10]。这一证据和其他证据表明,CD6/ALCAM相互作用对于调节T细胞发育和激活很重要。

[0175] 此外,还报道了ALCAM脱落,并且与sCD6一样,该过程似乎是ADAM家族金属蛋白酶介导的切割的产物。[17]此外,在膀胱癌患者的尿液中报告了升高水平的脱落的ALCAM,它可以作为存活的预后生物标志物。[18]此外,在一份报告中,与健康患者相比,在SLE患者中观察到升高的尿液ALCAM和VCAM,但与健康样品相比,活动性肾脏样品中的ALCAM没有被很高地升高,导致研究人员得出VCAM是一种更好的标志物的结论。[19]

[0176] 尽管CD6的功能表征仍然不完整,但抗CD6 mAb已成功应用于临床环境中以清除骨髓中的T细胞和T细胞前体。这些发现进一步支持CD6在调节体内T细胞功能中起重要作用的假设。据报道,CD6也是免疫突触的一部分,介导早期和晚期T细胞-抗原呈递细胞(APC)相互作用。[12]

[0177] 美国专利第6,372,215号公开了与人CD6(hCD6)的SRCR结构域3(D3)或人CD6茎结

构域(CD6S)特异性结合并抑制与CD6结合的活化白细胞细胞粘附分子(ALCAM)的抗体和其他结合剂。

[0178] 较早的出版物和专利公开了鼠抗CD6(IOR-T1)单克隆抗体的序列以及为了将IOR-T1人源化为T1h(人源化IOR-T1)而进行的氨基酸修饰。美国专利第5,712,120号及其同族EP 0699755公开了使鼠单克隆抗体人源化的具体方法以及IOR-T1和T1h的序列。美国专利第6,572,857号及其同族EP 0807125公开了IOR-T1和T1h(人源化IOR-T1)的序列。标题为“A Monoclonal Antibody and a Method Thereof”的PCT/IN2008/00562公开了在NS0细胞中产生抗CD6抗体,该抗CD6抗体具有该文以SEQ ID NO:1和2提供的重链和轻链序列。该抗体的INN名称是itolizumab。Itolizumab在小鼠来源的NS0细胞系和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中产生,并且当在CHO细胞中产生时,本文引用其商品名称EQ001;当在NS0细胞中产生时,本文引用其商品名称ALZUMAb。EQ001(即在CHO细胞中产生的itolizumab)在本领域中也称为“Bmab-600”。在本文的各种实施方案中,无论其产生方法如何,我们以其INN名称itolizumab来指代抗体本身。因此,如本文所用,术语itolizumab包括ALZUMAb和EQ001,其中的每个都具有与itolizumab相同的序列。Itolizumab(和EQ001/ALZUMAb)的可变重链(Variable heavy,VH)和可变轻链(Variable light,VK)的氨基酸序列在本文中分别提供为SEQ ID NO:1和2。Itolizumab(和EQ001/ALZUMAb)的VH和VK的核苷酸(DNA)序列在本文中分别提供为SEQ ID NO:3和4。Itolizumab(和EQ001/ALZUMAb)的VH CDR1-3的氨基酸序列分别提供为SEQ ID NO:5-7。Itolizumab(和EQ001/ALZUMAb)的VK CDR1-3的氨基酸序列分别提供为SEQ ID NO:8-10。

[0179] 靶向CD6的抗体已显示出作为用于至少部分由异常T细胞活性引起的多种疾病和病症的疗法的前景。例如,PCT/IN2008/000562公开了itolizumab用于抑制幼稚T细胞增殖和治疗各种炎性疾病包括多发性硬化症、移植物排斥、类风湿性关节炎和银屑病的用途。事实上,ALZUMAb目前在印度上市用于治疗银屑病。此外,在PCT/IB2017/056428中公开了itolizumab治疗狼疮的用途。然而,由于这些疾病的异质性以及它们在由T细胞、B细胞、树突细胞、单核细胞和中性粒细胞介导的不同疾病形式之间循环的趋势,需要更有针对性的治疗疗法来更充分地挖掘这些抗体的潜力。

[0180] 迄今为止,临床上还没有使用生物标志物策略来确定患者何时最有可能有利地响应使用抗CD6抗体(例如,EQ001)或更一般地CD6-ALCAM途径抑制剂的治疗。

[0181] 因此,本公开内容的一些方面提供了一种用于鉴定受试者(或“患者”,其在全文中可互换使用)是否患有对CD6-ALCAM途径抑制敏感的炎性或自身免疫性疾病的方法,该方法包括确定受试者是否表现出升高水平的可溶性CD6蛋白、可溶性ALCAM蛋白或两者(例如,从受试者获得的生物样品例如尿样中的升高的水平)。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病和全身性炎性疾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病。在一些实施方案中,炎性肾病选自LN、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病。在特定的实施方案中,本公开内容提供这样的方法,其中该方法基于从受试者获得的样品(例如,从受试者的尿液)中可溶性CD6蛋白、可溶性ALCAM蛋白或两者的水平来鉴定受试者是否具有对CD6-ALCAM途径抑制敏感的LN形式。发现具有升高水平(例如,在其尿液中)的可溶性CD6蛋白、可溶性ALCAM蛋白或两者的LN受试者(或更

普遍地,SLE或炎性或自身免疫性疾病受试者)可能更可能患有活动性T细胞驱动的疾病。此外,通过分析来自已知患有非活动性LN(或更普遍地,非活动性SLE或炎性或自身免疫性疾病的受试者)的样品(例如,尿液)中这些标志物的基础浓度,然后随后分析这些标志物的水平是否随时间(例如,在数天、数月、数年的过程中)变化,这些标志物中增加的早期检测可能标志着疾病从非活动形式到活动形式的初始过渡阶段。这将使临床医生能够实施T细胞阻断疗法(和/或其他疗法,例如免疫抑制),其可在其重新激活的早期阶段阻止疾病进展;从而,防止全面过渡到活动性疾病状态。如下文进一步讨论的,CD6-ALCAM途径抑制剂可以是能够阻断或减少通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何药剂。此类抑制剂包括但不限于抗CD6抗体和抗ALCAM抗体,以及它们的抗原结合片段。在特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是itolizumab。在某些特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是EQ001。

[0182] 本公开内容的一些方面提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗炎性或自身免疫性疾病的方法,该方法包括:确定从患有或怀疑患有炎性或自身免疫性疾病的受试者获得的生物样品是否含有升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;如果生物样品含有升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病和全身性炎性疾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自狼疮性肾炎、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病。在特定的实施方案中,本公开内容提供这样的方法,其中该方法用于用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗LN,该方法包括:确定从患有或怀疑患有LN的受试者获得的生物样品是否含有升高的水平可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;如果生物样品含有升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。如下文进一步讨论的,CD6-ALCAM途径抑制剂可以是能够阻断或减少通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何药剂。此类抑制剂包括但不限于抗CD6抗体和抗ALCAM抗体,以及它们的抗原结合片段。在特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是itolizumab。在某些特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是EQ001。

[0183] 本公开内容的一些方面提供了使用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗患有炎性或自身免疫性疾病的受试者的方法,该方法包括以下步骤:确定受试者是否表现出升高的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;如果受试者表现出升高的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病和全身性炎性疾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自狼疮性肾炎、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病。在特定的实施方案中,本公开内容提供了这样的使用CD6-ALCAM途径治疗患有狼疮性肾炎的受试者的方法,该方法包括以下步骤:确定受试者是否表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白;如果受试者表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白,则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。如下文进一步讨论的,CD6-ALCAM途径抑制剂可以是能够阻断或减少通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何药剂。此类抑制剂包括但不限于抗CD6抗体和抗ALCAM抗体,以及它们的抗原结合片段。在特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是itolizumab。在某些特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是

EQ001。

[0184] 本公开内容的一些方面提供了一种用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗受试者的方法，其中受试者患有炎性或自身免疫性疾病，该方法包括以下步骤：(A)通过以下方式确定受试者是否患有CD6-ALCAM途径抑制剂敏感的疾病：(i)从受试者获得或已经从受试者获得生物样品；(ii)对生物样品进行或已经进行测定以确定样品是否表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白；和(B)如果受试者具有升高的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白，则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。在一些实施方案中，炎性或自身免疫性疾病选自神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病和全身性炎性疾病。在一些实施方案中，炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病。在一些实施方案中，炎性或自身免疫性疾病选自狼疮性肾炎、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病。在具体实施方案中，本公开内容提供了这样的用CD6-ALCAM途径抑制剂治疗受试者的方法，其中受试者患有狼疮性肾炎，该方法包括以下步骤：(A)通过以下方式确定受试者是否患有CD6-ALCAM途径抑制剂敏感的疾病：(i)从受试者获得或已经从受试者获得的生物样品；(ii)对生物样品进行或已经进行测定以确定样品是否表现出升高水平的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白；和(B)如果受试者具有升高的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白，则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。如下文进一步讨论的，CD6-ALCAM途径抑制剂可以是能够阻断或减少通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何药剂。此类抑制剂包括但不限于抗CD6抗体和抗ALCAM抗体，以及它们的抗原结合片段。在特定实施方案中，CD6-ALCAM途径抑制剂是itolizumab。在某些特定实施方案中，CD6-ALCAM途径抑制剂是EQ001。

[0185] 本公开内容的一些方面提供了一种预测患有炎性或自身免疫性疾病的受试者的预后的方法，该方法包括以下步骤：(i)在一定时间过程中从受试者获得或已经从受试者获得多个生物样品；和(ii)对每个生物样品进行或已经进行测定以确定样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平是否随时间变化；其中(a)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平随时间增加，则确定预后为不良；(b)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平没有随时间变化，则确定预后为中性；和(c)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平随时间降低，则确定预后为良好。时间过程可以是任何合适的时间过程。在一些实施方案中，时间过程在数天、数周、数月或数年的过程中进行。在一些实施方案中，炎性或自身免疫性疾病选自神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病和全身性炎性疾病。在一些实施方案中，炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病。在一些实施方案中，炎性或自身免疫性疾病选自狼疮性肾炎、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病。在特定实施方案中，本公开内容提供了这样的用于预测患有LN的受试者的预后的方法，该方法包括以下步骤：在一定时间过程中从受试者获得或已经从受试者获得多个生物样品；和(ii)对每个生物样品进行或已经进行测定以确定样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平是否随时间变化；其中(a)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平随时间增加，则确定预后为不良；(b)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平没有随时间变化，则确定预后为中性；和(c)如果样品表现出可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的水平随时间降低，则确定预后为良好。时间过程可以是任何合适的时间过程。在一些实施方案中，时间过程在数天、数周、数月或数年的过程中进行。此类预后方法还可包括向受试者施用CD6-

ALCAM途径抑制剂。如下文进一步讨论的,CD6-ALCAM途径抑制剂可以是能够阻断或减少通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何药剂。此类抑制剂包括但不限于抗CD6抗体和抗ALCAM抗体,以及它们的抗原结合片段。在特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是itolizumab。在某些特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是EQ001。

[0186] 本公开内容的一些方面提供了确定受试者是否患有活动性炎性或自身免疫性疾病的方法,包括(a)确定存在于来自受试者的样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第一浓度;(b)确定分别来自没有活动性炎性或自身免疫性疾病的对照人或对照人群体的相似样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度或平均浓度;和(c)如果第一浓度大于第二浓度,则确定受试者患有活动性炎性或自身免疫性疾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病和全身性炎性疾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自狼疮性肾炎、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病。在特定实施方案中,本公开内容提供了这样的用于确定受试者是否患有活动性狼疮性肾炎的方法,包括(a)确定存在于来自受试者的样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第一浓度;(b)确定分别来自没有活动性狼疮性肾炎的对照人或对照人群体的相似样品中存在的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度或平均浓度;和(c)如果第一浓度大于第二浓度,则确定受试者患有活动性肾炎。在一些情况下,分析的样品是尿样。在一些情况下,当疾病是炎性肾病(例如,LN)时,分析的样品是尿样。确定受试者是否患有活动性炎性或自身免疫性疾病(例如,活动性LN)的此类方法可以进一步包括如果通过该方法确定患者患有活动性炎性或自身免疫性疾病(例如,活动性LN),则向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。如下文进一步讨论的,CD6-ALCAM途径抑制剂可以是能够阻断或减少通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何药剂。此类抑制剂包括但不限于抗CD6抗体和抗ALCAM抗体,以及它们的抗原结合片段。在特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是itolizumab。在某些特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是EQ001。

[0187] 本公开内容的一些方面提供了确定受试者是否已经从非活动性炎性或自身免疫性疾病转变为活动性炎性或自身免疫性疾病的方法,包括(a)确定存在于来自受试者的第一样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第一浓度;其中第一样品是在受试者患有非活动性狼疮性肾炎时从受试者获得的;(b)确定存在于来自受试者的一个或多个第二样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度;其中每个第二样品是在获得第一样品之后从受试者获得的;和(c)如果可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度大于第一浓度,则确定受试者患有活动性狼疮性肾炎或正在转变为活动性肾炎。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病和全身性炎性疾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自狼疮性肾炎、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病。在特定实施方案中,本公开内容提供了这样的用于确定受试者是否已从非活动性狼疮性肾炎转变为活动性狼疮性肾炎的方法,包括(a)确定存在于来自受试者的第一样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第一浓度;其中第一样品是在受试者患有非活动性狼疮性肾炎时从受试者获得的;(b)确定存在于来自受试者的一个或多个第二样品中的可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度;其中每个

第二样品是在获得第一样品之后从受试者获得的;和(c)如果可溶性CD6和/或ALCAM蛋白的第二浓度大于第一浓度,则确定受试者患有活动性狼疮性肾炎或正在转变为活动性肾炎。确定受试者是否已从非活动性炎性或自身免疫性疾病转变为活动性炎性或自身免疫性疾病(例如,从非活动性LN转变为活动性LN)的此类方法可进一步包括向受试者施用CD6-ALCAM途径抑制剂。如下文进一步讨论的,CD6-ALCAM途径抑制剂可以是能够阻断或减少通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何药剂。此类抑制剂包括但不限于抗CD6抗体和抗ALCAM抗体,以及它们的抗原结合片段。在特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是itolizumab。在某些特定实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂是EQ001。

[0188] 炎性或自身免疫性疾病

[0189] 对于本领域技术人员将明显的是,本文公开的所有方法在一些实施方案中可以结合任何炎性或自身免疫性疾病使用。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病和全身性炎性疾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病。在一些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病选自狼疮性肾炎、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病。

[0190] 样品

[0191] 在一些实施方案中,本文公开的任何一种方法可以对从患有或怀疑患有炎性或自身免疫性疾病的受试者获得的样品进行或利用从患有或怀疑患有炎性或自身免疫性疾病的受试者获得的样品。例如,在一些实施方案中,样品可以从患有或怀疑患有神经炎性疾病、炎性肠病、炎性肺病、炎性肾病或全身性炎性疾病的受试者获得。样品可以从患有或怀疑患有狼疮的受试者获得。样品可以从患有或怀疑患有SLE的受试者获得。样品可以从患有或怀疑患有炎性肾病的受试者获得。样品可以从患有或怀疑患有选自IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病的炎性肾病的受试者获得。样品可以从患有或怀疑患有LN的受试者获得。

[0192] 本文公开的方法中使用的样品可以来自任何合适的来源。例如,样品可以是活检样品(例如,肝脏活检样品)。在一些优选的情况下,样品可以通过非侵入性或微创程序获得。例如,在一些情况下,样品可以选自任何体液。在一些情况下,样品可以选自血液、血清、尿液、痰、脑脊液(CSF)、支气管肺泡灌洗液(BALF)和粪便中的任一种。在某些优选的实施方案中,样品是尿液(例如来自患有或怀疑患有LN的受试者的尿液)。

[0193] 在某些实施方案中,最佳样品来源由受试者患有或怀疑患有的炎性或自身免疫性疾病的类型确定。例如,在某些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肾病并且样品是尿液。在某些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是神经炎性疾病并且样品是CSF。在某些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肠病并且样品是粪便。在某些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是炎性肺病并且样品是痰或BALF。在某些实施方案中,炎性或自身免疫性疾病是全身性炎性疾病并且样品是血液或血清。

[0194] 在一些情况下,从单个受试者收集多个样品可能是有用的,例如,以在时间过程中监测受试者的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的水平。在这种情况下,样品收集间隔的时间没有严格定义,并且最佳过程可以由临床医生根据众所周知的程序确定。例如,可以在数天、

数周、数月或数年的时间过程中收集样品。在样品中观察到的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的水平随时间的降低或增加可以指示疾病(例如炎性或自身免疫性疾病,例如LN)从活动状态到非活动状态,或从非活动状态到活动状态的进展。在样品中观察到的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的水平随时间的变化可指示患者疾病的预后。此外,可以在施用治疗剂例如本文公开的CD6-ALCAM途径抑制剂或类固醇或免疫抑制剂之前和之后监测在样品中观察到的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的水平随时间的变化,以确定是否观察到治疗剂对炎性或自身免疫性疾病(例如,LN)的活动性的任何影响。例如,可以在施用能够阻断或减少通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何药剂之前和之后监测在样品中观察到的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的水平随时间的变化。在一些情况下,可以在施用选自抗CD6抗体和抗ALCAM抗体以及此类抗体的抗原结合片段或其组合的CD6-ALCAM途径抑制剂之前和之后监测样品中观察到的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM水平随时间的变化。在特定实施方案中,可以在施用itolizumab之前和之后监测样品中观察到的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM水平随时间的变化。在某些特定实施方案中,可以在施用EQ001之前和之后监测样品中观察到的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM水平随时间的变化。在一些实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂和/或类固醇或免疫抑制剂的施用导致受试者样品中可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的检测水平随时间的降低。在一些实施方案中,这种降低表明治疗有效并且活动性疾病(例如活动性炎性或自身免疫性疾病,例如活动性LN)正在转变为非活动状态或已经转变为非活动状态。

[0195] 检测方法

[0196] 在本文公开的方法中检测的可溶性CD6蛋白可以是全长CD6蛋白或CD6蛋白的片段。CD6蛋白的片段可以是CD6蛋白的胞外部分或其片段。可溶性CD6的任何可检测部分可被靶向用于根据本公开内容的方法的检测。

[0197] 在本文公开的方法中检测的可溶性ALCAM蛋白可以是全长ALCAM蛋白或ALCAM蛋白的片段。全长ALCAM蛋白的片段可以是ALCAM蛋白的胞外部分或其片段。可溶性ALCAM的任何可检测部分可被靶向用于根据本公开内容的方法的检测。

[0198] 在本文公开的方法中检测的可溶性CD6蛋白或可溶性ALCAM蛋白可以通过本领域已知的或本文公开的任何方式检测。许多蛋白质检测方法是本领域已知的并且适用于本方法。例如但不限于,可溶性CD6蛋白或可溶性ALCAM蛋白通过以下方法检测:单重ELISA;多重ELISA,使用基于FAC的检测的基于珠子的免疫捕获;使用基于ELISA的检测的基于珠子的免疫捕获;使用基于化学发光的检测的基于珠子的免疫捕获;中尺度诊断(MSD);蛋白质印迹,定量蛋白质印迹;高效液相色谱(HPLC);质谱;及其组合。这样的方法是本领域已知的。

[0199] 可溶性CD6蛋白或可溶性ALCAM蛋白的检测可以是定性的。

[0200] 可溶性CD6蛋白或可溶性ALCAM蛋白的检测可以是定量的。定量检测可包括将检测到的可溶性CD6蛋白或可溶性ALCAM蛋白的水平分别与已知量的可溶性CD6蛋白或可溶性ALCAM蛋白进行比较。这种比较可以利用标准曲线。标准曲线的创建和使用此类曲线来定量未知样品中蛋白质的量在本领域是常规的并且此类方法对于技术人员来说是明显的并且可以包括但不限于样品中未知浓度的可溶性CD6蛋白或可溶性ALCAM蛋白的检测水平与已知浓度的可溶性CD6蛋白或可溶性ALCAM蛋白(或其片段)的标准对照样品的连续稀释液的检测水平的比较。

[0201] 在一些实施方案中,可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的检测进一步包括确定样品中

可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的测量的浓度值并将测量值与阈值进行比较,其中鉴定可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的“活动性”或“非活动性”水平。在一些实施方案中,该方法分配感兴趣的事件在从受试者获得体液样品的时间的180天内或多或少可能发生的可能性、风险或概率。在一些实施方案中,分配的可能性、风险或概率涉及在包括但不限于18个月、120天、90天、60天、45天、30天、21天、14天、7天、5天、96小时、72小时、48小时、36小时、24小时、12小时或更短的时间段内发生的感兴趣的事件。或者,在从受试者获得体液样品的时间的0小时处分配风险等同于当前病况(例如,活动性或非活动性炎性或自身免疫性疾病)的诊断。

[0202] 选择诊断阈值在其他以外还包括考虑疾病的概率、不同测试阈值下真假诊断的分布以及基于诊断的治疗(或治疗失败)后果的估计。例如,当考虑施用高效且具有低风险的特定CD6-ALCAM途径抑制剂(例如EQ001)时,需要很少的测试,因为临床医生可以接受可观的诊断不确定性。另一方面,在治疗方案较少有效且更具风险的情况下,临床医生通常需要更高程度的诊断确定性。因此,在选择诊断阈值时涉及成本/收益分析。

[0203] 在一些实施方案中,本发明提供了生物样品(例如尿液)中CD6和/或ALCAM多核苷酸的检测。例如,在一些实施方案中,该方法可以涉及CD6和/或ALCAM的mRNA表达的检测。

[0204] 样品中多核苷酸水平的检测可以通过本领域已知的任何方法进行。例如,检测方法可涉及通过在探针与其互补靶标可通过互补碱基配对形成稳定杂交双链体的条件下探针与靶标CD6或ALCAM核酸之间的接触进行核酸的杂交。核酸杂交方法是本领域公知的。探针可以用荧光分子标记。通过检测样品核酸和探针的一种或多种标记来检测杂交的核酸。可以通过本领域技术人员已知的任何方法掺入标记。常用的标记标签包括但不限于生物素、荧光分子、放射性分子、显色底物、化学发光标记物、酶等。生物素化核酸的方法是本领域众所周知的,将荧光分子和放射性分子引入寡核苷酸和核苷酸的方法也是如此。

[0205] ALCAM和CD6 mRNA水平可以通过逆转录(RT)PCR和定量RT-PCR(QRT-PCR)或实时PCR方法确定。RT-PCR和QRT-PCR的方法是本领域公知的。

[0206] 在一些实施方案中,CD6或ALCAM mRNA的水平可以通过定量测序技术(例如定量性的下一代测序技术)测量。对核酸序列进行测序的方法是本领域众所周知的。简而言之,可以使从受试者获得的样品与一种或多种与靶基因序列侧翼的单链核酸序列特异性杂交的引物接触并合成互补链。在一些下一代技术中,将衔接子(双链或单链)连接到样品中的核酸分子,并且从衔接子或衔接子相容的引物开始合成。在一些相关技术中,可以例如通过确定探针杂交的位置和模式或测量单个分子通过传感器时的一个或多个特征(例如,当核酸分子通过纳米孔时电场的调整)确定序列。示例性的测序方法包括但不限于Sanger测序、双脱氧链终止、454测序、SOLiD测序、polony测序、Illumina测序、Ion Torrent测序、杂交测序、纳米孔测序、Helioscope测序、单分子实时测序、RNAP测序等。用于执行这些测序方法的方法和方案是本领域已知的,参见例如"Next Generation Genome Sequencing"Ed.Michal Janitz,Wiley-VCH;"High-Throughput Next Generation Sequencing"Eds.Kwon and Ricke,Humanna Press,2011;和Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual (4ed.),Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,USA(2012);其全部内容通过引用并入本文。

[0207] 在特定实施方案中,CD6或ALCAM mRNA(例如,存在于从已知或怀疑患有LN的人的

尿样中分离的细胞中的mRNA)可以通过RNA测序(RNA-Seq)来检测。RNA测序。RNA-seq(RNA测序),也称为全转录组鸟枪测序(WTSS),是本领域众所周知的技术。它利用下一代测序(NGS)的功能来及时揭示在给定时刻来自基因组的RNA存在和数量的快照。细胞的转录组是动态的;与静态基因组相反,它持续变化。新一代测序的最近发展允许增加的DNA序列的碱基覆盖率,以及更高的样品通量。这有助于对细胞中的RNA转录物进行测序,提供查看替代基因剪接转录物、转录后变化、基因融合、突变/SNP和基因表达变化的能力。除了mRNA转录物,RNA-Seq还可以查看RNA的不同群体,以包括总RNA、小RNA例如miRNA、tRNA和核糖体谱。RNA-Seq还可用于确定外显子/内含子边界并验证或修改先前注释的5'和3'基因边界。在NGS之前,转录组学和基因表达研究以前是使用表达微阵列进行的,该表达微阵列包含数千个DNA序列,其探测靶序列中的匹配,从而提供正在表达的所有转录物的谱。此类微阵列还可用于检测CD6或ALCAM mRNA表达,基因表达的系列分析(SAGE)也可如此,所述技术中的每一种都是本领域公知的。

[0208] 多核苷酸和核糖核酸(RNA)分子可以使用本领域公知的多种方法中的任一种从特定生物样品(例如,肾活检或从尿样获得的细胞)中分离,所选择的特定分离程序是适合特定生物样品的。例如,冻融和碱裂解程序可用于从固体材料获得核酸分子;加热和碱裂解程序可用于从尿液获得核酸分子;以及蛋白酶K提取可用于从血液获得核酸(Roiff,A等人,PCR:Clinical Diagnostics and Research,Springer(1994))。

[0209] 阈值

[0210] 合适的阈值可以以多种方式确定。例如,用于诊断活动性LN的一个推荐诊断阈值可以将诊断阈值设置为在正常群体中测量的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM浓度的第97.5个百分位。确定诊断阈值的另一种方法可以包括测量来自同一患者的系列样品,其中使用先前的"基线"结果来监测生物标志物水平的时间变化。群体研究也可用于选择阈值。例如,接收者操作特征("ROC")分析通常用于选择阈值以区分"患病"子群体和"非患病"子群体。预测能力平衡假阳性(即,例如,当该人检测为阳性,但实际上并未患病)和假阴性(即,例如,当该人检测为阴性,提示他们是健康的,而此时他们实际上确实患病)的发生。为了绘制ROC曲线,随着判定阈值不断变化,确定真阳性率(TPR)和假阳性率(FPR)。由于TPR与灵敏度等效,并且FPR等于(1-特异性),因此ROC图有时被称为灵敏度相对(1-特异性)的图。完美测试将具有1.0的ROC曲线下面积;随机测试将具有0.5的面积。选择阈值以提供特异性和敏感性的可接受水平,其通常通过将特异性值与敏感性值相加来确定。因此,计算的阈值越大,所分析的特定测定测量的预测能力就越大。

[0211] 在此上下文中,"患病"是指具有一种特征(例如,活动性炎性或自身免疫性疾病或病况的存在或某结果的出现)的群体并且"非患病"群体缺乏该同一特征(例如,非活动性炎性或自身免疫性疾病或病况的存在)。

[0212] 虽然单个判定阈值是这种方法的最简单的应用,但可以使用多个判定阈值。例如,在第一阈值以下,疾病的不存在可以以相对高的置信度指定,并且在第二阈值以上,疾病的存在也可以以相对高的置信度指定。在这两个阈值之间可以被认为是不确定的。这在本质上仅是示例性的。

[0213] 除了阈值比较之外,用于将测定测量与患者分类(例如,疾病的发生或不发生、结果的可能性等)相关联的其他方法包括但不限于决策树、规则集、贝叶斯方法和神经网络方

法。这些方法可以产生代表受试者或患者属于多个分类中的一个分类的程度的概率值。

[0214] CD6-ALCAM途径抑制剂

[0215] 在一些实施方案中,任何能够抑制CD6-ALCAM途径的药剂都适合用作本文公开的方法中使用的CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0216] 在某些方面,CD6-ALCAM途径抑制剂是抗CD6抗体。抗CD6抗体是本领域已知的,并在本文中公开。本文公开的任何一种或多种抗CD6抗体可用于本文公开的任何一种方法中。例如,在某些优选的情况下,抗CD6抗体是EQ001。

[0217] 在某些方面,抗CD6抗体可以是结合CD6并阻断T细胞中CD6介导的下游信号传导的任何抗体。例如,使用抗CD6单克隆抗体(mAb)的阻断研究表明,CD6通过调节与胸腺上皮(TE)细胞的T细胞粘附相互作用在T细胞发育中发挥重要作用(Patel等人,J.Exp.Med.(1995)181:1563-1568)。其他研究表明,CD6可以用作T细胞活化的重要辅助分子。例如,某些抗CD6 mAb直接促进T细胞的有丝分裂(Gangemi等人,J.Immunol.(1989)143:2439;Bott等人,Int.Immunol.(1993)7:783),而其他的能够与抗CD3、抗CD2或PMA结合共同刺激T细胞增殖(Gangemi等人,J.Immunol.(1989)143:2439;Morimoto等人,J.Immunol.(1988)140:2165-2170;Osorio等人,Cell.Immunol.(1994)154:23)。CD6在T细胞活化中的作用的另外证据来自显示CD6在T细胞激活之后在Ser和Thr残基上过度磷酸化(Swack等人,Mol.Immunol.(1989)26:1037-1049;Swack等人,J.Biol.Chem.(1991)266:7137;Cardenas等人,J.Immunol.,145:1450-1455(1990))并在Tyr残基上磷酸化(Wee等人,J.Exp.Med.(1993)177:219-223)的研究。这些和其他研究表明CD6是体内未成熟和成熟T细胞功能的重要调节子,影响T细胞活化和信号转导(De Wit,J.等人,Blood(2011)118:6107-6114),并且任何能够防止这些影响的抗体都适用于本发明。

[0218] 因此,抗CD6抗体可以是包含重链和轻链可变区的抗CD6单克隆抗体,该重链和轻链可变区包含SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列。

[0219] 抗CD6抗体可以是包含重链和轻链可变区的抗CD6单克隆抗体,该重链和轻链可变区包含:SEQ ID NO:3所示的核苷酸序列或其互补序列;和(b)核酸分子,该核酸分子包含SEQ ID NO:4所示的核苷酸序列或其互补序列。

[0220] 抗CD6抗体可以是包含重链和轻链可变区的抗CD6单克隆抗体,该重链和轻链可变区包含与SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列。

[0221] 抗CD6抗体可以是特异性结合CD6的抗CD6单克隆抗体,并且在对应于由SEQ IDNO:1和2代表的氨基酸残基的部分中包含至少约65%的氨基酸序列同一性或同源性、至少约70%的氨基酸序列同一性或同源性、至少约75%的氨基酸序列同一性或同源性、至少约80%氨基酸序列同一性或同源性、至少约80%氨基酸序列同一性或同源性、至少约85%氨基酸序列同一性或同源性、至少约90%氨基酸序列同一性或同源性、至少约95%的氨基酸序列同一性或同源性、至少约98%的氨基酸序列同一性或同源性、或至少约99%的氨基酸序列同一性或同源性。

[0222] 抗CD6抗体可以包含一个或多个选自以下的CDR:Itolizumab重链CDR1:GFKFSRYAMS(SEQ ID NO:5);Itolizumab重链CDR2:TISSGGSYIYYPDSVKG(SEQ ID NO:6);Itolizumab重链CDR3:RDYDLDYFDS(SEQ ID NO:7);Itolizumab轻链CDR1:KASRDIRSYLT(SEQ ID NO:8);Itolizumab轻链CDR2:YATSLAD(SEQ ID NO:9);Itolizumab轻链CDR3:LQHGESP

(SEQ ID NO:10);及其组合。

[0223] 在特定的实施方案中,抗CD6抗体包含以SEQ ID NO:5-10提供的Itolizumab CDR中的每个。在特定的实施方案中,抗CD6抗体是人源化抗体,该人源化抗体包含以SEQ ID NO:5-10提供的Itolizumab CDR中的每个。在特定的实施方案中,抗CD6抗体是人源化IgG抗体,该人源化IgG抗体包含以SEQ ID NO:5-10提供的Itolizumab CDR中的每个。在特定的实施方案中,抗CD6抗体是人源化IgG1抗体,该人源化IgG1抗体包含以SEQ ID NO:5-10提供的Itolizumab CDR中的每个。在特定的实施方案中,抗CD6抗体是在CHO细胞中产生的人源化抗体,其中该人源化抗体包含以SEQ ID NO:5-10提供的Itolizumab CDR中的每个。

[0224] 抗CD6抗体可以选自UMCD6 mAb(Li等人,PNAS March 7,2017,vol.114,no.10,2687-2692,其通过引用整体并入本文)和表1上列出的抗体中的任何一种抗体:

[0225] 表1:抗CD6抗体

[0226]

名称	特异性	同种型	注释	参考资料
OX126	人 CD6 结构域 3	小鼠 IgG1	针对重组 CD6 结构域 3 产生并与大鼠 CD6 交叉反应。阻断可溶性 CD 166 与 CD6 的结合。阻断细胞之间的相互作用。	[5]
T12	人 CD6 结构域 1	小鼠 IgM	阻断细胞间的相互作用。临床上用于清除 T 细胞。	[12] 以及综述于[51]
UMCD6	人 CD6 结构域 1	小鼠 IgG1	对 CD6 的亲和力高于 MT605。与 IOR-T1 竞争。阻断细胞之间的相互作用。	[57]
MT605	人 CD6 结构域 1	小鼠 IgG1	对重组 CD6 的亲和力低于 UMCD6。部分地与 I0R-T1 竞争。阻断细胞之间的相互作用。	[57]
IOR-T1/T1h	人 CD6 结构域 1	小鼠 IgG2a/人 IgG1	与 UMCD6 竞争并部分与 MT605 竞争。阻断细胞之间的相互作用。临床上用作免疫抑制剂。	[57]
J4-81	人 CD166V2 结合 VV 但不结合 V1 或 VCCC	小鼠 IgG1	部分抑制可溶性 CD6 与细胞的结合。可以促进和抑制 CD 166 亲同种抗原相互作用,推测取决于化合价。	[13,29,39]
AZN-L50	人 CD166 C2C3	小鼠 IgG2a	抑制 CD 166 亲同种抗原反式相互作用,推测是通过抑制 CD 166 亲同种抗原顺式缔合来实现的。	[29]
MAB656	人 CD166 VCCC	小鼠 IgG1	在人和小鼠中报告的抑制作用,但不与重组小鼠 CD166 结合。	[59], Lee I. Garner, 未公开的数据
I/F8	人 CD166 结构域 1	人单链抗体片段	阻断 CD6/CD166 和 CD166/CD166 相互作用并结合猴和鼠 CD166。	[60]

[0227] 抗CD6抗体可以是如美国专利第8,524,233号(通过引用整体并入本文)中公开的T1h。抗CD6抗体可以是itolizumab。抗CD6抗体可以是ALZUMAb。

[0228] 抗CD6抗体可以是通过保藏于ECACC保藏号为ECACC 96112640的分泌性杂交瘤IOR-T1A产生的抗体或其人源化形式。

[0229] 抗CD6抗体可以与T细胞表面上的CD6结合。抗CD6抗体可以与T细胞表面上CD6的结

构域1、结构域2或结构域3结合。在某些方面,抗CD6抗体与CD6上的结构域1或结构域3结合。在特定的实施方案中,抗CD6抗体与CD6上的结构域3结合。抗CD6抗体与T细胞表面上的CD6的结合可以调节T细胞的活性。在某些方面,抗CD6抗体与T细胞表面上的CD6的结合调节T细胞的活性和/或迁移。在特定方面,抗CD6抗体与T细胞表面上的CD6的结合调节T细胞迁移进入和穿过受炎性或自身免疫性疾病影响的组织。这种组织可以是例如皮肤、关节、内部器官,包括肺、心脏和肾脏。

[0230] 抗CD6抗体(例如,EQ001)可以作为抗CD6药物组合物递送至受试者。

[0231] 适合于递送CD6-ALCAM途径抑制剂(例如抗CD6抗体,如EQ001)的药物组合物及其制备方法对于本领域技术人员将是明显的。这种组合物及其制备方法可以在例如Remington's Pharmaceutical Sciences,19th Edition(Mack Publishing Company,1995)中找到,其内容通过引用整体并入本文。含有抗CD6抗体的药物组合物也是本领域已知的。例如,抗CD6抗体可以是美国专利申请第12/525,449号(US20100047242)(通过引用整体并入本文)中公开的药物组合物。

[0232] 本发明的药物组合物可包含活性药物制剂例如CD6-ALCAM途径抑制剂(例如抗CD6抗体,例如EQ001)和一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、表面活性剂和/或媒介物。

[0233] 药物组合物可以包含CD6-ALCAM途径抑制剂和一种或多种选自以下的试剂:载体、赋形剂、稀释剂、抗氧化剂、防腐剂、着色剂、调味和稀释剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、填充剂、膨胀剂、缓冲液、递送媒介物、张力剂、助溶剂、润湿剂、络合剂、缓冲剂、抗微生物剂和/或表面活性剂。此类试剂是本领域已知的(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,18th edition,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1990),通过引用整体并入本文。

[0234] 药物组合物可以包含EQ001和一种或多种选自以下的试剂:载体、赋形剂、稀释剂、抗氧化剂、防腐剂、着色剂、调味和稀释剂、乳化剂、悬浮剂、溶剂、填充剂、膨胀剂、缓冲液、递送媒介物、张力剂、助溶剂、润湿剂、络合剂、缓冲剂、抗微生物剂和/或表面活性剂。此类试剂是本领域已知的(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,18th edition,Mack Publishing Co.,Easton,PA(1990),通过引用整体并入本文。

[0235] 本发明还包括组合疗法,该组合疗法包括向患者施用与能够治疗、预防或减轻一种或多种哮喘相关症状的第二活性剂或装置或程序组合的CD6-ALCAM途径抑制剂例如抗CD6抗体(例如,或EQ001)或其抗原结合部分。在这种情况下,"组合施用"意指:(1)相同的单位剂型的一部分;(2)分开施用,但作为同一治疗程序或方案的一部分,通常但不一定在同一天施用。

[0236] 在这些组合疗法的一些方面,第二活性剂是一种或多种能够调节免疫系统的试剂。在这些组合疗法的一些方面,第二活性剂是一种或多种免疫抑制剂。

[0237] 在某些方面,CD6-ALCAM途径抑制剂是抗ALCAM抗体或抗原结合部分。在一些这样的情况下,抗ALCAM抗体阻断ALCAM与CD6的结合。在一些实施方案中,抑制剂是CD6-ALCAM途径的小分子抑制剂,例如竞争性或变构抑制剂。

[0238] 如前所述,CD6-ALCAM途径抑制剂在一些方面可以作为单一疗法单独施用,或者在一些方面作为组合疗法施用。在一些方面,用于根据本文公开的方法向患者施用的本文所

述的任何一种CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001)可以与一种或多种其他治疗剂组合施用作为组合疗法。例如,CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001或抗ALCAM抗体)可以与另一种药剂一起作为组合疗法施用至患者,用于治疗炎性或自身免疫性疾病。组合疗法可以包括施用CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001或抗ALCAM抗体)和任何其他抗炎或自身免疫性疾病治疗剂(本领域已知的或本文公开的)。例如,CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001或抗-ALCAM抗体)可以与选自例如但不限于类固醇或免疫抑制剂的药剂组合施用至受试者。类固醇可以是皮质类固醇。皮质类固醇可以是泼尼松。CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001或抗-ALCAM抗体)可以与选自例如但不限于霉酚酸酯和环磷酰胺的药剂组合施用至受试者。

[0239] 在特定实施方案中,将EQ001与选自例如但不限于类固醇或免疫抑制剂、皮质类固醇、泼尼松、霉酚酸酯和环磷酰胺的药剂组合施用至受试者。EQ001也可以与抗ALCAM抗体组合施用至受试者。

[0240] CD6-ALCAM途径抑制剂(包括,例如,EQ001)可以在一种或多种这样的抗炎或自身免疫性疾病药剂之前、之后或同时施用。在一些实施方案中,此类组合可提供显著优势,包括治疗中的累加或协同活性。

[0241] 在各种实施方案中,本文公开的组合物和方法,例如用于治疗本文讨论的此类炎性或自身免疫性疾病(例如,SLE和LN)的方法,涉及向受试者施用有效量的CD6-ALCAM途径抑制剂例如EQ001或包含CD6-ALCAM途径抑制剂例如EQ001的组合物(例如,药物组合物)。术语“CD6-ALCAM途径抑制剂”和“CD6-ALCAM途径的抑制剂”在本文中可互换使用以指能够抑制通过CD6-ALCAM途径的信号传导的任何化合物或物质。这些术语包括但不限于本文所述的抗CD6抗体,以及能够减少或阻止通过CD6的信号传导的其他抑制剂,例如抗ALCAM抗体。抗CD6抗体的非限制性实例是本领域已知的并且在本文中公开。例如,但不以任何方式限制,在一些实施方案中,本文所述的组合物和方法可以利用EQ001作为CD6-ALCAM途径抑制剂。

[0242] CD6-ALCAM途径抑制剂可以作为药物组合物施用。CD6-ALCAM途径抑制剂可以在一种或多种其他治疗剂之前、之后和/或同时施用。如果与一种或多种其他治疗剂同时施用,则这种施用可以是同时的(例如,在单一组合物中)或可以通过两种或更多种单独的组合物,任选地通过相同或不同的施用模式(例如,局部、全身、口服、静脉注射等)进行。

[0243] 所公开的CD6-ALCAM途径抑制剂和/或其他治疗剂的施用可以通过治疗剂的任何施用模式来完成。这些模式包括全身或局部施用,例如口服、鼻腔、肠胃外、经皮、皮下、阴道、口腔、直肠或局部施用模式。

[0244] 对于在本文所述的使用方法中的施用,CD6-ALCAM途径抑制剂,例如EQ001,可以在施用前与无毒的、药学上可接受的载体物质(例如生理盐水或磷酸缓冲盐水)混合,并且将使用任何医学上合适的程序施用,例如肠胃外施用(例如注射),例如通过静脉内或动脉内注射。

[0245] 根据本发明使用的CD6-ALCAM途径抑制剂例如EQ001的制剂可以通过将具有所需纯度的抗体与任选的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂以冻干制剂或水溶液形式混合来制备。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下对接受者是无毒的,并且包括缓冲剂,例如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂,例如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲铵;氯化苯甲烃铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或

苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;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,例如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,例如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖、二糖、和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、或糊精;螯合剂,例如EDTA;糖,例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,例如钠;金属配合物(例如锌蛋白配合物);和/或非离子表面活性剂,例如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0246] CD6-ALCAM途径抑制剂,例如EQ001,也可以包埋在分别通过例如凝聚技术或通过界面聚合(例如羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊))制备的微胶囊中,在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)中或在粗乳液中。这类技术在本领域中是众所周知的。

[0247] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的合适实例包括含有CD6-ALCAM途径抑制剂例如EQ001的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品的形式,例如薄膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶、L-谷氨酸的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、以及可降解的乳酸-乙醇酸共聚物。

[0248] CD6-ALCAM途径抑制剂,例如EQ001,可以根据已知方法施用至受试者,例如作为丸剂(bolus)静脉内施用或通过在一段时间内连续输注,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内或口服途径施用。CD6-ALCAM途径抑制剂例如EQ001的静脉内或皮下施用是优选的。

[0249] 取决于预期的施用模式,所公开的化合物或药物组合物可以是固体、半固体或液体剂型,例如,注射剂、片剂、栓剂、丸剂、延时释放胶囊(time-release capsules)、酏剂、酊剂、乳剂、糖浆、粉剂、液体、混悬剂等,有时为单位剂量,并且与常规制药实践一致。同样,所公开的化合物或药物组合物也可以以静脉内(推注和输注)、腹膜内、皮下或肌内的形式施用,并且全部使用药学领域技术人员熟知的形式。适合递送CD6-ALCAM途径抑制剂(单独或例如,根据本发明与另一种治疗剂组合)的药物组合物及其制备方法对本领域技术人员而言是明显的。这种组合物及其制备方法可以在例如Remington's Pharmaceutical Sciences,19th Edition(Mack Publishing Company,1995)中找到,其内容全部并入本文。

[0250] 使用CD6-ALCAM途径抑制剂的剂量方案根据多种因素来选择,包括患者的类型、物种、年龄、体重、性别和身体状况;待治疗疾病的严重程度;施用途径;患者的肾功能或肝功能;以及所使用的具体公开的化合物。本领域普通技术人员的医师或兽医可以容易地确定并开出预防、对抗或阻止病情进展所需的药物的有效量。

[0251] 在本发明中使用的CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001)的治疗有效量的示例性非限制性范围是根据受试者体重的约0.01mg/kg-100mg/kg,例如约0.01mg/kg-50mg/kg,例如约0.01mg/kg-25mg/kg。具有本领域普通技术的医疗技术人员可以容易地确定和开出所需药物组合物的有效量。例如,医师可以以低于获得所需治疗效果所需的水平开始CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001)的剂量,并逐渐增加剂量直至达到预期的效果。

[0252] 在一个实施方案中,CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001)通过以每kg受试者体重1mg至500mg(例如20mg/kg至200mg/kg)的周剂量进行输注施用。这种施用可以重复例如1-8次,例如3-5次。在替代方式中,可以通过在2小时至24小时、例如2小时至12小时的时间内连

续输注来进行施用。

[0253] 在一个实施方案中,以0mg至200mg的周剂量施用CD6-ALCAM途径抑制剂(例如,EQ001)至多7次,例如4-6次。可以通过在2小时至24小时、例如2至12小时的时间内连续输注来进行施用。这种方案可以根据需要重复一次或多次,例如在6个月或2个月后。

[0254] 在一些实施方案中,本公开内容还提供用于执行本文所述方法的试剂盒。合适的试剂盒可以包含足以进行用于检测和/或定量样品中可溶性CD6和可溶性ALCAM之一或两者的量的测定的试剂,以及用于进行检测测定和任选的阈值比较的说明。此类试剂盒还可包含足以进行用于检测其他标志物例如其他蛋白质的测定的试剂。例如,试剂盒可包含用于通过进行单重ELISA;多重ELISA,使用基于FAC的检测的基于珠子的免疫捕获;使用基于ELISA的检测的基于珠子的免疫捕获;使用基于化学发光的检测的基于珠子的免疫捕获;中尺度诊断(MSD);定量蛋白质印迹;高效液相色谱(HPLC);或其组合来检测和/或定量可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的试剂。这可以包括但不限于针对可溶性CD6和/或可溶性ALCAM或可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的部分的抗体或其抗原结合部分。此类试剂盒还可包括但不限于结合可溶性CD6和/或可溶性ALCAM或可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的部分的适体。试剂盒还可包含用于进行样品制备的试剂,例如缓冲液、试剂、试管等,用于获得样品、纯化样品、储存样品(例如冷藏或冷冻样品)等。试剂盒还可包含对照样品(例如已知浓度的标准对照CD6和/或ALCAM蛋白样品)用于生成标准曲线以定量在受试者样品中检测的可溶性CD6和/或可溶性ALCAM的水平。试剂盒可以提供用于进行夹心测定的一个或多个抗体对,或用于进行竞争性测定的标记物质(对于分析物)。抗体对可以包含与固相缀合的第一抗体和与可检测标记缀合的第二抗体,其中第一和第二抗体中的每一个都结合可溶性CD6或可溶性ALCAM。抗体对中的抗体可以是单克隆的。

[0255] 所有在本说明书中引用的或在任何申请数据表所列的美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、PCT专利申请、PCT专利申请出版物、外国申请、外国专利申请以及非专利出版物,均通过引用整体并入本文。从前述内容可以理解,尽管本文已经出于说明的目的描述了本发明的特定实施方案,但是在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以进行各种修改。

实施例

[0256] 通过以下实施例和合成实施例进一步举例说明本公开内容,不应将其解释为将本公开内容在范围或精神上限制于本文所述的具体程序。应当理解,提供这些实施例是为了举例说明某些实施方案,并且无意由此限制本公开内容的范围。还应当理解,还可包括本领域技术人员在不脱离本公开内容的精神和/或所附权利要求的范围的情况下可以想到的各种其他实施方案、修改及其等同物。

[0257] 实施例1

[0258] 患有狼疮性肾炎的受试者的尿液中可溶性CD6和可溶性ALCAM蛋白的基于ELISA的检测。

[0259] 除非另有说明,本文公开的实施例使用以下材料和方法。

[0260] 从患者(或对照个体)收集30ml尿液,并根据制造商的说明在冰上用蛋白酶抑制剂混合物片剂(MiliporeSigma,Burlington,MA,USA)处理。样品以10,000xg离心1分钟或以5,

000xg离心2分钟,并将尿液从任何沉淀物移出,等分,并在干冰/甲醇浴中快速冷冻,并储存在-80℃直至使用。

[0261] 几种合适的ELISA试剂盒是可商购的并且适用于检测可溶性ALCAM和可溶性CD6。例如,根据制造商的说明使用人ALCAM DuoSet ELISA(R&D Systems,Minneapolis,MN)来测量尿样中的可溶性ALCAM,并通过生成标准曲线进行定量。根据制造商的说明使用人CD6 ELISA试剂盒(夹心ELISA)(LifeSpan BioSciences,Inc,Seattle,WA)来测量尿样中的可溶性CD6,并通过生成标准曲线进行定量。

[0262] 从以下队列收集样品:

[0263] (a)队列1:12名没有任何已知或预期的炎性或自身免疫性疾病的正常受试者

[0264] (b)队列2:6名患有已知的非活动性狼疮性肾炎的受试者

[0265] (c)队列3:6名患有活动性狼疮性肾炎的受试者

[0266] 在一年的时间过程中每两周从受试者收集尿液样品。收集后立即按照上文所述的方法处理、等分和冷冻样品。在研究过程中监测几种疾病活动性和损伤指数以评估狼疮性肾炎的临床表现(参见,例如Balow JE,Lupus.2005;14(1):25-30,通过引用整体并入本文)。

[0267] 最初,在队列之间比较可溶性CD6和可溶性ALCAM的浓度,发现在队列3中最高,并且在队列1中最低。中间浓度存在于来自队列2的样品中。

[0268] 在研究过程中,在来自队列2中某些受试者的样品中发现可溶性CD6和可溶性ALCAM的增加,并且这些增加与这些受试者从非活动性到活动性疾病的转变相关。相反,在队列3中的某些受试者中,可溶性CD6和可溶性ALCAM水平降低,随着他们从活动性疾病转变为非活动性疾病。

[0269] 发现这样的结果支持使用可溶性CD6和可溶性ALCAM作为活动性狼疮性肾炎的生物标志物。

[0270] 基于这些结果,利用扩大的队列组进行后续研究以研究可溶性CD6和可溶性ALCAM的尿水平作为其他炎性肾病中疾病进展的生物标志物的用途。

[0271] 从以下队列收集样品:

[0272] (a)队列1:12名没有任何已知或预期的炎性或自身免疫性疾病的正常受试者

[0273] (b)队列2:6名患有已知的非活动性炎性肾病的受试者/组,

[0274] (i)队列2a:患有已知的非活动性IgA肾病的受试者

[0275] (ii)队列2b:患有已知的非活动性抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎的受试者

[0276] (iii)队列2c:患有已知的非活动性自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病的受试者

[0277] (iv)队列2d:患有已知的非活动性抗肾小球基底膜肾小球肾炎的受试者

[0278] (v)队列2e:患有已知的非活动性C3肾病的受试者

[0279] (vi)队列2f:患有已知的非活动性狼疮性肾炎的受试者

[0280] (c)队列3:6名患有活动性炎性肾病的受试者/组

[0281] (i)队列2a:患有已知的活动性IgA肾病的受试者

[0282] (ii)队列2b:患有已知的活动性抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎的受试

者

[0283] (iii)队列2c:患有已知的活动性自身免疫性(以前称为特发性)膜性肾病的受试者

[0284] (iv)队列2d:患有已知的活动性抗肾小球基底膜肾小球肾炎的受试者

[0285] (v)队列2e:患有已知的活动性C3肾病的受试者

[0286] (vi)队列2f:患有已知的活动性狼疮性肾炎的受试者

[0287] 在一年的时间过程中每两周从受试者收集尿液样品并且如上文所述跟踪疾病状态。收集后立即按照上文所述的方法处理、等分和冷冻样品。

[0288] 如在第一项研究中那样进行队列之间的比较并且重复针对狼疮性肾炎的结果并且在其他炎性肾队列的背景下观察到类似的结果。

[0289] 发现这些结果支持使用可溶性CD6和可溶性ALCAM作为炎性肾病,特别是活动性狼疮性肾炎、IgA肾病、抗中性粒细胞胞质抗体相关性肾小球肾炎、自身免疫性(以前称为特发性的)膜性肾病、抗肾小球基底膜肾小球肾炎和C3肾病的生物标志物。

[0290] 实施例2

[0291] CD6和ALCAM表达在人肾组织活检中显著升高并可在狼疮性肾炎(LN)患者的尿液细胞中被检测到

[0292] 背景/目的:狼疮性肾炎(LN)是系统性红斑狼疮(SLE)患者中发病率和死亡率的主要原因。然而,狼疮患者中肾脏疾病的发病机制尚未完全了解。本研究的目的是研究LN患者的肾脏中CD6/ALCAM的表达,并评估尿液ALCAM和CD6作为LN疾病中生物标志物的潜力。

[0293] 结果总结:公开可用的RNASeq数据集的从头分析证实狼疮性肾炎患者与非患病个体相比表达显著更高的肾脏水平的CD6和ALCAM,并且这些标志物的高表达可在从LN患者收集的尿液细胞中被检测到。

[0294] 方法和结果:作为AMP狼疮网络项目(SDY997)的一部分,从狼疮性肾炎患者或健康对照患者(活检)分离的[从尿样获得的冷冻肾组织样品或细胞]获得单细胞RNA Seq数据,并且在公共数据库中提供了由映射到每个样品的所有个体基因的转录读数计数组成的数据集(Arazi A.等人,Nat Immunol.2019 Jul;20(7):(902-914))。使用R的Seurat软件包对这些数据集进行了scRNA-seq分析。

[0295] 我们使用生物信息学挖掘这些公共数据集以创建对照样品(11名健康患者)相对LN患者样品(19名LN患者)中CD6和ALCAM表达的比较。CD6仅在T细胞中表达(图3A,左图);而ALCAM在两种专职APC(例如巨噬细胞、树突细胞和管状细胞)中表达(图3A,右图)。来自该实验的数据总结在下表2中。

[0296] 表2.CD6和ALCAM在肾细胞群中的表达谱。

[0297]

肾细胞群	CD6	ALCAM
免疫细胞		
T 细胞	++	+/-
APC	-	+
B 细胞	+/-	+/-
浆母细胞	-	+/-
结构细胞		
亨利氏套	-	++
近端小管	-	++
远端小管	-	+/-
闰细胞	-	+/-
收集管	-	+
系膜细胞	-	+/-
内皮细胞	-	+
足细胞	-	++

[0298] 我们的分析证明了在LN患者中与对照相比存在更高水平的CD6和ALCAM(图3B)。与对照组相比,在LN患者的肾脏中发现更多数量的CD6+和ALCAM+白细胞(图3B,左侧和右侧图上的“肾脏白细胞”条形图),并且仅在LN患者中可检测到ALCAM+上皮细胞(图3B,左侧和右侧图上的“肾上皮”条形图)。此外,LN患者的尿液中存在CD6+和ALCAM+白细胞两者(与已知在其尿液中不存在白细胞的无病患者形成对比)。(图3B,左侧和右侧图上的“尿液白细胞”条形图)。

[0299] 具有III类(增殖性)或IV类(膜性)LN的患者倾向于具有比对照更多的表达CD6的细胞(图3C),表明CD6表达可能在LN阶段之后。此外,与健康对照相比,LN中表达ALCAM的肾小管细胞和巨噬细胞的数量也增加(图3D)。因此,这些数据表明,由于增加的T细胞浸润,LN患者在肾脏中具有增加的$CD6^+$ T细胞,并且鉴于上皮细胞和浸润性肾白细胞上增加的ALCAM表达,这些T细胞可能被激活。

[0300] 与对照个体相比,在活动性LN患者中尿液ALCAM蛋白水平显著升高(图4A),并且>1100种尿蛋白的无偏倚筛选将尿液ALCAM鉴定为LN患者中LN疾病活动性的强预测因子(图4B)。

[0301] 从多个种族和不同疾病活动性的SLE患者收集尿液样品。ALCAM浓度通过ELISA测定,然后针对尿肌酐标准化。与多个种族的对照相比,活动性LN患者尿液中的ALCAM显著升高(图5)。在亚洲(图5A)、非裔美国人(图5B)、西班牙裔(图5C)和白种人患者(图5D)中,尿液ALCAM进一步将活动性LN与非活动性SLE或没有LN的活动性SLE患者区分开来。对于图5A-5D,HC=健康对照;ANR=活动性非肾狼疮;AR=活动性肾狼疮。

[0302] 在亚洲SLE患者中,尿液ALCAM与系统性红斑狼疮疾病活动性指数(SLEDAI)(图5F)、SLEDAI的肾结构域(rSLEDAI)(图5E)和PGA(图5F)显著相关(所有$p<0.0001$)(图5)。

[0303] 结论:在此,我们证明了LN患者的肾组织内CD6/ALCAM途径的活性增加。更具体地说,浸润性T细胞确实表达CD6,并且在LN患者相对健康对照以及患有增殖性相对膜性LN的

患者的肾活检中,表达CD6的T细胞的数量更多。LN患者中表达ALCAM的巨噬细胞数量也增加,表明LN中CD6/ALCAM信号传导途径的增加的激活。LN患者还具有升高水平的表达ALCAM的肾小管细胞,表明这些常驻肾细胞可促成LN背景下T细胞的信号传导和迁移。最后,在多个种族的活动性LN患者中尿液ALCAM显著升高,并且与临床疾病状态很好相关,因此代表了LN中疾病评估的有希望的生物标志物,并且在从LN患者获得的尿液样品收集的白细胞中可检测到CD6+和ALCAM+mRNA。这些数据强烈支持可以通过分析尿液中ALCAM或CD6蛋白的存在和丰度和/或尿液淋巴细胞中的mRNA表达来诊断LN和/或监测LN活动性状态和疾病进展,并进一步表明靶向CD6-ALCAM疗法例如itolizumab可能是用于LN的有前景的治疗方法。

[0304] 实施例3

[0305] 尿液中高水平的可溶性CD6和可溶性ALCAM蛋白作为对EQ001治疗的敏感性的生物标志物

[0306] 为了确定可溶性CD6和可溶性ALCAM的高尿液水平是否可以用作对EQ001治疗的敏感性的生物标志物,进行了一项临床试验,其中分析了这些标志物在用EQ001治疗前后在患有活动性狼疮性肾炎的受试者的尿液中的浓度。

[0307] 从以下队列收集样品:

[0308] (a)队列1:12名没有任何已知或预期的炎性或自身免疫性疾病的正常受试者,用媒介物治疗

[0309] (b)队列2:6名患有已知的非活动性狼疮性肾炎的受试者,用媒介物治疗

[0310] (c)队列3:6名患有活动性狼疮性肾炎的受试者,用媒介物治疗

[0311] (d)队列4:6名患有活动性狼疮性肾炎的受试者,用在媒介物中递送的EQ001治疗。

[0312] 每两周从受试者收集尿液样品,持续2-3个月,以建立个体基线尿可溶性CD6和可溶性ALCAM浓度。在获得至少五个基线测量值后开始治疗。受试者每两周接受静脉内施用的EQ001或媒介物,共5个剂量,并在初始给药后3天收集尿样,此后在研究过程中每周两次收集尿样,这在初始治疗后持续20周。

[0313] 如上文所述,在收集后立即按照上文所述的方法处理、等分和冷冻样品,并且在研究完成后,通过ELISA测试样品。

[0314] 最初,在队列之间比较可溶性CD6和可溶性ALCAM的浓度,发现在队列3和4中最高,在队列1中最低。中间浓度存在于队列2的样品中。

[0315] 在研究过程中,在来自队列2中某些受试者的一些样品中发现可溶性CD6和可溶性ALCAM的增加,并且这些增加与这些受试者从非活动性疾病向活动性疾病的转变相关。相反,在接受EQ001的队列4中的受试者中观察到可溶性CD6和可溶性ALCAM水平的显著降低。相比之下,在单独接受媒介物的队列3中没有观察到显著下降。具有最高基础水平的可溶性CD6和可溶性ALCAM的受试者对EQ009治疗的反应最显著。

[0316] 发现这样的结果支持使用可溶性CD6和可溶性ALCAM作为对CD6-ALCAM途径抑制剂例如抗CD6抗体EQ001治疗的敏感性的生物标志物。

[0317] 实施例4

[0318] 用CD6阻断剂治疗自发性SLE/狼疮性肾炎(LN)

[0319] 背景/目的:为了确定受试者是否可能对用根据本公开内容的抗CD6阻断抗体的治疗(例如,在LN诊断后)产生有益的反应,我们使用MRL/MpJ-Faslpr/2J小鼠品系(或MRL/

lpr)(一种广泛使用的SLE和LN模型)进行了各种体内研究。该品系产生与人类SLE和LN疾病有许多相似之处的自发性全身性自身免疫,并且常规用于SLE/LN研究(Richard 2018)。该品系在fas基因中含有导致细胞凋亡丧失和不受控制的淋巴增殖(其特征是全身性自身免疫、淋巴结病和过度活跃的T和B细胞)的突变。与SLE患者类似,小鼠产生针对核抗原的自身抗体(抗核抗体、抗dsDNA、抗Sm、抗Ro和抗La)、免疫复合物沉积、肾小球肾炎和其他SLE表现,包括关节炎、脑炎和皮疹。在这项研究中,我们评估了在该SLE的鼠模型背景中CD6和ALCAM的表达,然后靶向该信号传导轴以确定其在疾病发病机制中的作用。

[0320] 我们首先分析了MRL/MpJ-Faslpr/2J小鼠品系中的肾CD6和ALCAM表达,以确认在该模型中重现了在人类样品中观察到的过表达。在最初的实验中,6月龄的MRL/lpr小鼠和B6肾脏针对ALCAM和CD6的存在进行染色。

[0321] 从6月龄的MRL/lpr小鼠(患有肾炎)和C57BL/6小鼠(没有肾炎)收获肾脏,针对ALCAM(CD166,红色,图6A和图6B)和CD6(红色,图6C)进行染色。与B6健康对照小鼠相比,MRL/lpr小鼠在其肾小管(图6B)和肾小球(图6A)内均显示出增加水平的肾ALCAM表达(显示了代表性每组3只小鼠的图像)。此外,浸润到MRL/lpr小鼠肾小球中的巨噬细胞是ALCAM+(白色箭头,上图),并且伴随着CD6+ T细胞浸润的增加(白色箭头,下图)。

[0322] 因此,免疫荧光染色确实证实了CD6和ALCAM在患有肾炎的动物的肾脏中以比在非肾炎肾脏中看到的水平更高的水平存在。因此,这些小鼠重现了上述实施例中呈现的在人LN组织中观察到的表达模式,并且这些小鼠用于研究用能够阻断通过CD6/ALCAM途径的信号传导的单克隆抗CD6抗体治疗的效果。

[0323] 进行了几个独立的实验来测试重现性和广泛的终点。这些实验的设计与LN疗法的临床前测试的公认实践一致。

[0324] 图7A显示了使用MRL/lpr模型的实验的研究设计。简而言之,将雌性MRL/lpr小鼠老化至9-10周龄,然后用抗CD6抗体(10D12,60ug/剂,每周两次腹膜内注射)、无关的多克隆大鼠IgG同种型对照(60ug/剂,每周两次)或环磷酰胺(25mg/kg,每周一次)处理小鼠。我们还包括了无处理组和MRL/MpJ小鼠组(一种同类系健康对照品系)。在一生中监测蛋白尿、体重和淋巴结病,而最终终点包括尿白蛋白和肌酐水平、淋巴结和脾脏重量以及肾浸润免疫细胞。

[0325] MRL/lpr组中抗DNA抗体、体重和蛋白尿的基线水平是相似的(数据未显示)。每周监测小鼠的蛋白尿、淋巴结肿胀和宏观皮肤病变。

[0326] 如图8所示,抗CD6抗体的施用减少了肾损伤,导致改善的肾功能和降低的死亡率。具体而言,在19周龄时,与同种型对照小鼠相比,用抗CD6抗体处理的小鼠显示出改善的蛋白尿,如通过uristix测量(图8A,$p<0.05$)并通过测量终末尿中的白蛋白:肌酐比率证实的(图8B)。用抗CD6抗体处理还改善了MRL/lpr小鼠的肾功能,如通过终末血清中的血尿素氮(BUN)水平测量的(图8C),并且用抗CD6抗体处理的小鼠显示存活率的显著改善(图8D)。

[0327] MRL/lpr小鼠发展淋巴组织增生性疾病,其导致异常大的淋巴结。在19周龄时评估淋巴结病,我们注意到与对照组相比抗CD6处理的小鼠中的显著改善,如通过终止时左右腹股沟淋巴结的体积测量的平均值(图8E)和淋巴结肿胀的评分(图8F)所评估的。此外,在终止时肾脏浸润免疫细胞和T细胞的频率通过抗mCD6处理降低(图8G、图8H,和图8I);因此,证明了CD6阻断减少活化的肾浸润性T细胞的数量。

[0328] 此外,来自抗CD6抗体处理的小鼠和对照小鼠的样品中肾小球(图9A)和肾小管(图9B)的组织学评分由不知情的病理学家进行,并且数据证明肾小球病状中的显著改善。

[0329] 因此,这些数据证明抗CD6抗体的施用减少了肾损伤,从而导致肾功能和死亡率的改善。

[0330] MRL/lpr小鼠也发生严重的皮肤病变,其在病理学上与SLE患者中所见的皮肤狼疮相似,并且是自身炎性疾病的结果。图10A显示了来自对照小鼠和来自接受抗CD6抗体处理的小鼠的皮肤组织的组织学检查。同种型对照小鼠表现出患病的皮肤组织病状,包括角化过度(表皮增厚)、真皮-表皮接合处的损伤以及到真皮中的大量细胞浸润。抗CD6处理改善了许多这些病状,表明减少的表皮增厚和细胞浸润。与同种型对照小鼠相比,抗CD6组织学更类似于来自MPJ小鼠的健康对照切片。这些病变的宏观评分显示,与同种型对照组相比,抗CD6处理小鼠的皮肤病有显著改善(图10B,$p<0.05$)。

[0331] 为了评估抗CD6处理如何影响MRL/lpr小鼠中皮肤病的发展,对皮肤组织切片针对巨噬细胞(绿色)、C3(红色)和IgG(橙色)进行染色。与同种型对照小鼠(图11A)相比,经处理的小鼠(图11B)中积累的巨噬细胞的数量显著减少。然而,C3和IgG水平在两个处理组之间相似,并且似乎高于健康对照MPJ小鼠(图11C)。

[0332] 结论:在SLE的自发性模型中,抗CD6处理改善了多个终末器官病状,即在肾脏和皮肤中,同时还显著减少了该模型的淋巴组织增生表型。总体而言,这些结果表明,靶向CD6-ALCAM途径可能对SLE内的多个终末器官病状具有有前景的治疗潜力。

[0333] 实施例5

[0334] 在肾毒性血清肾炎(NTN)的加速小鼠模型中用CD6阻断治疗SLE/狼疮性肾炎(LN)。

[0335] 背景/目的:为了检查CD6阻断的作用和对肾脏的特定影响,我们使用了肾毒性血清肾炎(NTN)的加速模型。NTN是经过验证的LN的短期模型。NTN模型表现出在机械和组织学上与对于LN观察到的相似的肾小球肾炎,因此通常用作测试用于SLE的此特定复杂化的药剂的模型(Fu 2007)。动物表现出新月体性增殖性肾小球肾炎,其特征是免疫复合物沉积、补体激活和免疫细胞浸润(T细胞、中性粒细胞和巨噬细胞),伴有降低的肾小球滤过率、蛋白尿和蛋白尿,这些特征都与人类疾病相似。

[0336] NTN模型通过注射针对肾小球基底膜的抗体(抗GBM)在非自身免疫小鼠中引发快速发作的免疫复合物疾病。补体介导的损伤随后是T细胞浸润到肾脏中和T细胞介导的破坏。

[0337] 进行了两个独立的实验以测试再现性并以对于LN治疗的临床前评价标准的方式检查广泛的终点(n=6-12/组/实验)。在实验1中,用媒介物对照或60μg/剂的抗mCD6(10D12)处理小鼠。在实验2中,用媒介物或60μg/剂的抗mCD6或同种型对照处理小鼠。实验1和2中的每一个的处理方案描绘在图12A中。在注射兔血清前一天开始处理(第4天),每3天施用一次直至处死(实验1:第12天;实验2:第11天);在通过每日跟踪确定的蛋白尿峰值后的第二天进行处死。两个实验都包括健康(无疾病起始)小鼠作为对照。

[0338] 方法:在雌性129/svJ小鼠的两个独立队列(均为10周龄)中诱导肾毒性血清肾炎以模拟LN。在第0天用兔IgG和CFA免疫小鼠以产生小鼠抗兔抗体,其然后与第5天给予的肾毒性兔血清交叉反应,导致在病状上类似于LN的抗体介导的肾炎。为了评估CD6/ALCAM途径在LN发病机制中的重要性,在第4、7和10天用抗CD6单克隆抗体(mAb)(60ug/剂,n=12/实

验)或媒介物或同种型IgG(n＝12/实验)处理小鼠。健康小鼠(用兔IgG免疫,但未给予肾毒性血清)也被包括作为对照(n＝12)。我们通过蛋白尿(uristix)、尿白蛋白:肌酐比率和血清尿素氮(BUN)监测肾脏疾病的进展,以评估抗CD6处理对两个队列的影响。为了评估处理对免疫细胞浸润的影响,流式细胞术、RT-PCR和免疫荧光染色在终止时完成。

[0339] 结果:在肾毒性血清肾炎的NTN鼠模型中的CD6阻断抑制疾病并保护肾功能(图12B-图12G)。图12B显示了来自用媒介物对照(上图)或CD6抗体(下图)处理的小鼠的肾组织的组织学肾小球切片。肾小球切片由经验丰富的肾病学家对毛细血管内增殖、新月体和沉积物以0-4的等级进行盲法评分,结果绘制在图12C中。与媒介物对照小鼠相比,抗CD6处理显著减轻了肾小球病状。肾小管评分类似地通过对肾小管管型和间质炎症以0-4的等级进行评分来确定,结果绘制在图12D中。与肾小球评分类似,与媒介物对照相比,抗mCD6处理的小鼠表现出显著改善的肾小管评分。

[0340] 此外,与媒介物对照小鼠相比,用抗CD6 mAb处理NTN小鼠导致降低水平的蛋白尿($p<0.001$)(图12E)。该结果通过测量终末尿液中的白蛋白:肌酐比率得到证实(图12F,$p<0.0001$)。我们还发现当将经处理的小鼠与媒介物对照小鼠进行比较时,BUN($p<0.01$)(图12G)显著改善。为确保抗CD6处理不会干扰NTN模型的诱导,我们测量了小鼠抗兔IgG水平和兔抗小鼠肾小球基底膜(GBM)水平,并发现各组之间没有差异(数据未显示)。

[0341] 进行肾细胞因子水平的RT-PCR以确定CD6阻断对肾炎症的影响,并且这些实验揭示了与对照患病小鼠相比,经处理的小鼠的肾脏中细胞因子的较少的炎性环境,具有显著降低的表达水平的炎症标志物VCAM(图13A)和RANTES(图13B)和增加的水平的抗炎IL-10(图13C)。对肾脏进行流式细胞术以评估抗mCD6处理对免疫细胞浸润的影响。我们注意到与同种型和媒介物对照小鼠相比,抗CD6处理的小鼠中免疫细胞积累的总体减少(图14A,CD45+)。进一步分析显示炎性骨髓细胞(图14B至图14D)和T细胞群(图14E至图14F)的减少。T细胞显著减少(图14E),其中在活化的CD4(CD25+CD69+)细胞中观察到显著差异(图14F)。

[0342] CD6阻断通过减少的肾脏炎性细胞因子表达和骨髓和T细胞在肾脏中的免疫浸润来改善该小鼠模型中的肾功能。

[0343] 这些结果突出了CD6-ALCAM途径作为比目前提供的免疫抑制疗法更具选择性的有前景的治疗选择。

[0344] 因此,前述实验证明用抗CD6处理抑制CD6-ALCAM途径(例如,根据本文公开的方法诊断后)改善了与肾毒性抗体施用相关的肾炎(狼疮性肾炎的诱导模型)。

[0345] 综上所述,本文报道的研究提供了可以通过分析尿液中ALCAM或CD6蛋白的存在和丰度和/或尿淋巴细胞中的mRNA表达来诊断LN和/或监测LN活动性状态和疾病进展的强有力的支持,并且这些研究进一步表明靶向CD6-ALCAM疗法例如itolizumab可能是治疗LN的有前景的候选者。

[0346] 实施例6

[0347] CD6-ALCAM途径在SLE的NZB/W F1和B6.Sle1yaa模型中是活化的。

[0348] 背景/目的:为了促进对CD6阻断对ALCAM的血清水平的作用的进一步研究,我们首先试图确定重现了我们在人类患者中观察到的尿液ALCAM水平的增加的SLE的鼠模型。

[0349] 为此,我们首先检查了SLE的NZB/W F1和B6.Sle1yaa模型中的血清ALCAM水平。

[0350] NZB/W F1模型。NZB/W F1小鼠是New Zealand Black(NZB)和New Zealand White

(NZW)品系之间的F1杂种。NZBWF1/J小鼠发生类似于人类系统性红斑狼疮的自身免疫性疾病。与人类疾病类似,自身免疫主要发生在雌性动物中,并且其特征是高水平的抗核抗体、溶血性贫血、蛋白尿和进行性免疫复合物肾小球肾炎。NZB/W F1雌性中死亡的主要原因是具有5月龄前的大量系膜沉积、肾小管管型形成、肾小球细胞增殖、显著的新月体形成以及显著的肾小球周围和间质单核细胞浸润的慢性肾小球肾炎。IgG2a和C3的肾小球外肾沉积存在于肾小管周围组织和小动脉中,并且随着年龄的增长而频率增加。

[0351] B6.Sle1yaa模型。B6.Sle1yaa雄性是C57BL/6J同类系动物,其携带来自NZM2410/Aeg近交小鼠的系统性红斑狼疮易感性1数量性状基因座和来自BXSB/MpJ近交小鼠的突变的含Yaa的Y染色体。B6.Sle1yaa雄性发生自发性狼疮样自身免疫综合征,并伴有多种免疫异常。具体而言,B6.Sle1yaa雄性的死亡率从12-15周龄开始,到30-38周龄时为50%致死。此外,B6.Sle1yaa雄性在大多数肾小球中表现出以透明化终末期疾病为特征的严重肾脏病状。6-8周时可检测到显著水平的自身抗体,并且针对dsDNA和肾小球抗原的IgG自身抗体在4-6个月左右随着严重肾小球肾炎发作而显著增加。CD4+ T细胞谱系在B6.Sle1yaa雄性中失调:早期和渐进的CD4+ T细胞激活导致增加的IFNγ分泌细胞,并最终导致慢性激活诱导的复制衰老。

[0352] 基于人类疾病中尿液ALCAM和LN之间的关联,我们评估了SLE的这些小鼠模型背景下的尿液ALCAM水平,然后随后靶向该信号传导轴以确定其在疾病中的作用。

[0353] 我们首先分析了NZB/W F1雌性小鼠中的尿液ALCAM表达以确认在该模型中重现了在人类样品中观察到的过表达。在最初的实验中,从6月龄和12月龄的小鼠收集尿液,并通过ELISA评估ALCAM水平。

[0354] NZB/W F1模型中的数据如图15A所示,证实了与发病前(≤6个月)的血清ALCAM水平(标准化至尿肌酐水平)相比,发病后(12个月)血清ALCAM水平(标准化至尿肌酐水平)显著增加。

[0355] 我们接下来分析了B6.Sle1yaa模型中的尿液ALCAM表达。从3月龄和6月龄的小鼠收集尿液,并通过ELISA评估ALCAM水平。B6.Sle1yaa模型中的数据如图15B所示,其证实与发病前(3个月)血清ALCAM水平(标准化至尿肌酐水平)相比,发病后(6个月)血清ALCAM水平(标准化至尿肌酐水平)显著增加。

[0356] NZB/W F1和B6.Sle1yaa模型中的数据都模拟了在人类患者中观察到的与肾脏疾病相关的尿液ALCAM水平的增加。这些结果表明,这些鼠模型适用于进一步机理探索尿液ALCAM水平和CD6阻断对疾病进展和尿液中ALCAM/CD6水平的影响。

[0357] 为此,在后续实验中,我们测试了NZB/W F1雌性小鼠模型中的CD6阻断是否能够影响疾病进展。表3显示了使用NZB/W F1模型的实验的研究设计。

[0358] 表3.使用NZB/W F1鼠模型的CD6阻断实验的研究设计

[0359]

组	品系	小鼠数量	处理	给药浓度	给药途径	给药频率	给药持续时间
1	NZBWF1	10	媒介物	N/A	IP	每周两次	10周
2	NZBWF1	10	*环磷	25 mg/kg	IP	每周两次	10周
3	NZBWF1	10	10D12	60 μg	IP	每周两次	10周
4	NZBWF1	10	10D12	300 μg	IP	每周两次	10周

[0360] *环磷＝环磷酰胺

[0361] 简而言之,雌性NZB/W F1小鼠(年龄:26周龄)每周两次用抗CD6抗体(10D12,60或300ug/剂)、环磷酰胺(25mg/kg)或媒介物腹膜内处理。每周评估蛋白尿和体重。

[0362] 该实验的结果示于图15C。用抗mCD6抗体处理这些NZB/W F1雌性小鼠导致蛋白尿(其是肾功能的重要量度)的显著减少。因此,NZB/W F1和B6.Sle1yaa模型中尿液ALCAM的变化指示SLE疾病进展,并且可用作可用于确定抗mCD6抗体治疗何时有效的生物标志物。

[0363] 参考文献

[0364] 本文引用的所有参考文献的内容通过引用并入本文以用于所有目的。

[0365] 1.Gangemi等人,Anti-T12,An Anti-CD6 Monoclonal-Anti body,Can Activate Human Lymphocytes-t J.Immunol.1989,143:2439-2447.

[0366] 2.Bott等人,Activation of Human T-cells Through CD6-Functional-Effects of A Novel Anti-CD6 Monoclonal-Anti body and Definition of 4 Epitopes of The CD6 Glycoprotein,Int Immunol.1993,7:783-792.

[0367] 3.Morimoto等人,2h1-A Novel Antigen Involved in Lymphocyte-T Triggering,J.Immunol.1988,140:2165-2170.

[0368] 4.Osorio等人.The Anti-CD6 mAb,iOR-t1,Defined a New Epitope on The Human CDS Molecule That Induces Greater Responsiveness in T-cell Receptor/CD 3-Mediated T-cell Proliferation,Cell.Immunol.1994,154:123-133.

[0369] 5.Swack等人,Structural Characterization of CD6-Properties of 2 Distinct Epitopes Involved In T-cell Activation Structural Characterization of CD6-Properties of 2 Distinct Epitopes Involved In T-cell Activation, Mol.Immunol.1989 26:1037-1049.

[0370] 6.Swack等人,Biosynthesis And Posttranslational Modification of CD6,a T-cell Signal-Transducing Molecule,J.Biol.Chem 1991,266:7137-7143.

[0371] 7.Cardenas等人,Phosphoryiation-Dephosphorylation of The CD6 Glycoprotein Renders 2 Isoforms of 130 and 105 Kilodaltons-Effect of Serum and Protein-Kinase-C Activators,J.Immunol.1990,145:1450-1455.

[0372] 8.Wee等人,Tyrosine Phosphorylation of CD6 By Stimulation of CDS-Augmentation By The CD4 and CD2 Coreceptors,J.Exp.Med.1993,177:219-223.

[0373] 9.Patel等人,Identification And Characterization of A 100-Kd Ligand For CD6 On Human Thymic Epithelial-Cells,J.Exp.Med.1995.181:1563-1568.

[0374] 10.Bowen等人,Cloning,Mapping,And Characterization of Activated Leukocyte-Cell Adhesion molecule(ALCAM),a CD6 Ligand,J.Exp.Med 1995,181:2213-2220.

[0375] 11.Whitney,等人,The Membrane-Proximal Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain of CD6 Contains The Activated Leukocyte Cell-Adhesion Molecule-Binding Site,J.Biol.Chem 1995,270:18187-18190.

[0376] 12.Gimferrer I,Relevance of CD6-mediated interactions in T-cell activation and proliferation,J Immunol 2004.173:2262-2270.

[0377] 13.Liu,K.和E.K.Wakeland,Delineation of the pathogenesis of systemic lupus erythematosus by using murine models.Adv Exp Med Biol,2001.490:p.1-6.

[0378] 14.Arrias MR等人,CD6 binds to pathogen-associated molecular patterns and protects from LPS-induced septic shock.Proc Natl Acad Sci U S A(2007)104:11724-9.

[0379] 15.Aibar J等人Pattern of soluble CD5 and CD6 lymphocyte receptors in critically ill patients with septic syndromes.J Crit Care(2015)30:914-9.

[0380] 16.Ramos-Casals M等人High circulating levels of soluble scavenger receptors(sCD5 and sCD6)in patients with primary Sjogren's syndrome.Rheumatology(2001)40:1056-9.

[0381] 17.Kim等人,Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Stimulates the T-Cell Response in Allergic Asthma,Am J Respir Crit Care Med.2018 Apr 15;197(8):994-1008.

[0382] 18.Egloff等人,Shed urinary ALCAM is an independent prognostic biomarker of three-year overall survival after cystectomy in patients with bladder cancer,Oncotarget.2017 Jan 3;8(1):722-741.

[0383] 19.Habazi,D.等人,ALCAM and VCAM-1 as potential urinary biomarkers in Caucasian lupus patients,J Immunol May 1,2018,200(1Supplement)175.17.

[0384] 序列:

[0385] EQ001 VH氨基酸序列:(SEQ ID NO:1)

[0386] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFKFSRYAMSWVRQAPGKRLEWVATISSGGSYIYYPDSVKGRFTISRDNVKNTLYLQMSSLRSEDTAMYYCARRDYDLDYFDSWGQGTLVTVSS

[0387] EQ001 VK氨基酸序列:(SEQ ID NO:2)

[0388] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASRDIRSYLTWYQQKPGKAPKTLIYYATSLADGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLESDDTATYYCLQHGESPFTLGSGTKLEIK

[0389] EQ001 VH核苷酸(DNA)序列:(SEQ ID NO:3)

[0390] GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTTAGTAGATATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGGCTCCGGGGAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACATCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGTCAAGAACACCCTGTATCTGCAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACGAGATTACGACCTGGACTACTTTGACTCCTGGGGCCAAGGCACCCTTGTCACCGTCTCCTCA

[0391] EQ001 VK核苷酸(DNA)序列:(SEQ ID NO:4)

[0392] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCGGTGGGAGACAGAGTCACTATCACTTGCAAGGCGAGTCGGGACATTAGAAGCTATTTAACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGACCCTGATCTATTATGCAACAAGCTTGGCAGATGGGGTCCCGTCGAGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTCTGACGATACAGCAACTTACTACTGTCTACAACATGGTGAGAGTCCATTCACGCTCGGCTCGGGGACCAAGCTGGAAATCAAA

[0393] EQ001重链CDR1氨基酸序列:(SEQ ID NO:5)

[0394] GFKFSRYAMS;

[0395] EQ001重链CDR2氨基酸序列:(SEQ ID NO:6)

[0396] TISSGGSYIYYPDSVKG;

[0397] EQ001重链CDR3氨基酸序列:(SEQ ID NO:7)

[0398] RDYDLDYFDS

[0399] EQ001轻链CDR1氨基酸序列:(SEQ ID NO:8)

[0400] KASRDIRSYLT

[0401] EQ001轻链CDR2氨基酸序列:(SEQ ID NO:9)

[0402] YATSLAD

[0403] EQ001轻链CDR3氨基酸序列:(SEQ ID NO:10)

[0404] LQHGESP

[0405] 等效物

[0406] 虽然已经结合上面阐述的特定实施方案描述了本发明,但是对于本领域普通技术人员来说,其许多替代、修改和其他变化将是明显的。所有这些替代、修改和变化都旨在落入本发明的精神和范围内。在本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物均通过引用整体并入本文。如果需要采用各种专利、申请和出版物的概念,则可以修改实施方案的方面来提供另外的实施方案。根据以上详细描述,可以对实施方案进行这些和其他改变。一般而言,在以下权利要求中,所使用的术语不应被解释为将权利要求限于说明书和权利要求中公开的特定实施方案,而应被解释为包括所有可能的实施方案以及这样的权利要求所属的等效物的全部范围。因此,权利要求不受本公开内容的限制。

[0001] 序列表

[0002] <110> Equillium, Inc.

[0003] University of Houston System

[0004] Connelly, Stephen

[0005] Polu, Krishna

[0006] Mohan, Chandra

[0007] <120> 用于治疗狼疮的抗CD6抗体组合物和方法

[0008] <130> EQIL-009/02WO 330372-2034

[0009] <150> US 62/810,628

[0010] <151> 2019-02-26

[0011] <150> US 62/933,294

[0012] <151> 2019-11-08

[0013] <160> 10

[0014] <170> PatentIn版本 3.5

[0015] <210> 1

[0016] <211> 119

[0017] <212> PRT

[0018] <213> 人工序列

[0019] <220>

[0020] <223> 实验室中制成 - 合成的VH氨基酸序列

[0021] <400> 1

[0022] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

[0023] 1 5 10 15

[0024] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Lys Phe Ser Arg Tyr

[0025] 20 25 30

[0026] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val

[0027] 35 40 45

[0028] Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val

[0029] 50 55 60

[0030] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Leu Tyr

[0031] 65 70 75 80

[0032] Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

[0033] 85 90 95

[0034] Ala Arg Arg Asp Tyr Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly

[0035] 100 105 110

[0036] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0037] 115

[0038] <210> 2

[0039] <211> 107

[0040] <212> PRT

[0041] <213> 人工序列

[0042] <220>

[0043] <223> 实验室中制成 - 合成的VK氨基酸序列

[0044] <400> 2

[0045] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0046] 1 5 10 15

[0047] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Arg Asp Ile Arg Ser Tyr

[0048] 20 25 30

[0049] Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Thr Leu Ile

[0050] 35 40 45

[0051] Tyr Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

[0052] 50 55 60

[0053] Ser Gly Ser Gly Gln Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

[0054] 65 70 75 80

[0055] Asp Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Gly Glu Ser Pro Phe

[0056] 85 90 95

[0057] Thr Leu Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0058] 100 105

[0059] <210> 3

[0060] <211> 357

[0061] <212> DNA

[0062] <213> 人工序列

[0063] <220>

[0064] <223> 实验室中制成 - 合成的VH核苷酸序列

[0065] <400> 3

[0066] gaagtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60

[0067] tcctgtgcag cctctggatt caagtttagt agatatgcca tgtcttgggt tcgccaggct 120

[0068] ccggggaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta catctactat 180

[0069] ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgtcaagaa caccctgtat 240

[0070] ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc aagacgagat 300

[0071] tacgacctgg actactttga ctcctggggc caaggcaccc ttgtcaccgt ctcctca 357

[0072] <210> 4

[0073] <211> 321

[0074] <212> DNA

[0075] <213> 人工序列

[0076] <220>

[0077] <223> 实验室中制成 - 合成的VK核苷酸序列

[0078] <400> 4

[0079] gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat cggtgggaga cagagtcact 60

[0080] atcacttgca aggcgagtcg ggacattaga agctatttaa cctggtacca gcagaaacca 120

[0081] gggaaagctc ctaagaccct gatctattat gcaacaagct tggcagatgg ggtcccgtcg 180

[0082] agattcagtg gcagtggatc tgggcaagat tattctctca ccatcagcag cctggagtct 240

[0083] gacgatacag caacttacta ctgtctacaa catggtgaga gtccattcac gctcggctcg 300

[0084] gggaccaagc tggaaatcaa a 321

[0085] <210> 5

[0086] <211> 10

[0087] <212> PRT

[0088] <213> 人工序列

[0089] <220>

[0090] <223> 实验室中制成 - 合成的重链CDR1氨基酸序列

[0091] <400> 5

[0092] Gly Phe Lys Phe Ser Arg Tyr Ala Met Ser

[0093] 1 5 10

[0094] <210> 6

[0095] <211> 17

[0096] <212> PRT

[0097] <213> 人工序列

[0098] <220>

[0099] <223> 实验室中制成 - 合成的重链CDR2氨基酸序列

[0100] <400> 6

[0101] Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

[0102] 1 5 10 15

[0103] Gly

[0104] <210> 7

[0105] <211> 10

[0106] <212> PRT

[0107] <213> 人工序列

[0108] <220>

[0109] <223> 实验室中制成 - 合成的重链CDR3氨基酸序列

[0110] <400> 7

[0111] Arg Asp Tyr Asp Leu Asp Tyr Phe Asp Ser

[0112] 1 5 10

[0113] <210> 8

[0114] <211> 11

[0115] <212> PRT

[0116] <213> 人工序列

[0117] <220>

[0118] <223> 实验室中制成 - 合成的轻链CDR1氨基酸序列

[0119] <400> 8

[0120] Lys Ala Ser Arg Asp Ile Arg Ser Tyr Leu Thr

[0121] 1 5 10

[0122] <210> 9

[0123] <211> 7

[0124] <212> PRT

[0125] <213> 人工序列

[0126] <220>

[0127] <223> 实验室中制成 - 合成的轻链CDR2氨基酸序列

[0128] <400> 9

[0129] Tyr Ala Thr Ser Leu Ala Asp

[0130] 1 5

[0131] <210> 10

[0132] <211> 7

[0133] <212> PRT

[0134] <213> 人工序列

[0135] <220>

[0136] <223> 实验室中制成 - 合成的轻链CDR3氨基酸序列

[0137] <400> 10

[0138] Leu Gln His Gly Glu Ser Pro

[0139] 1 5

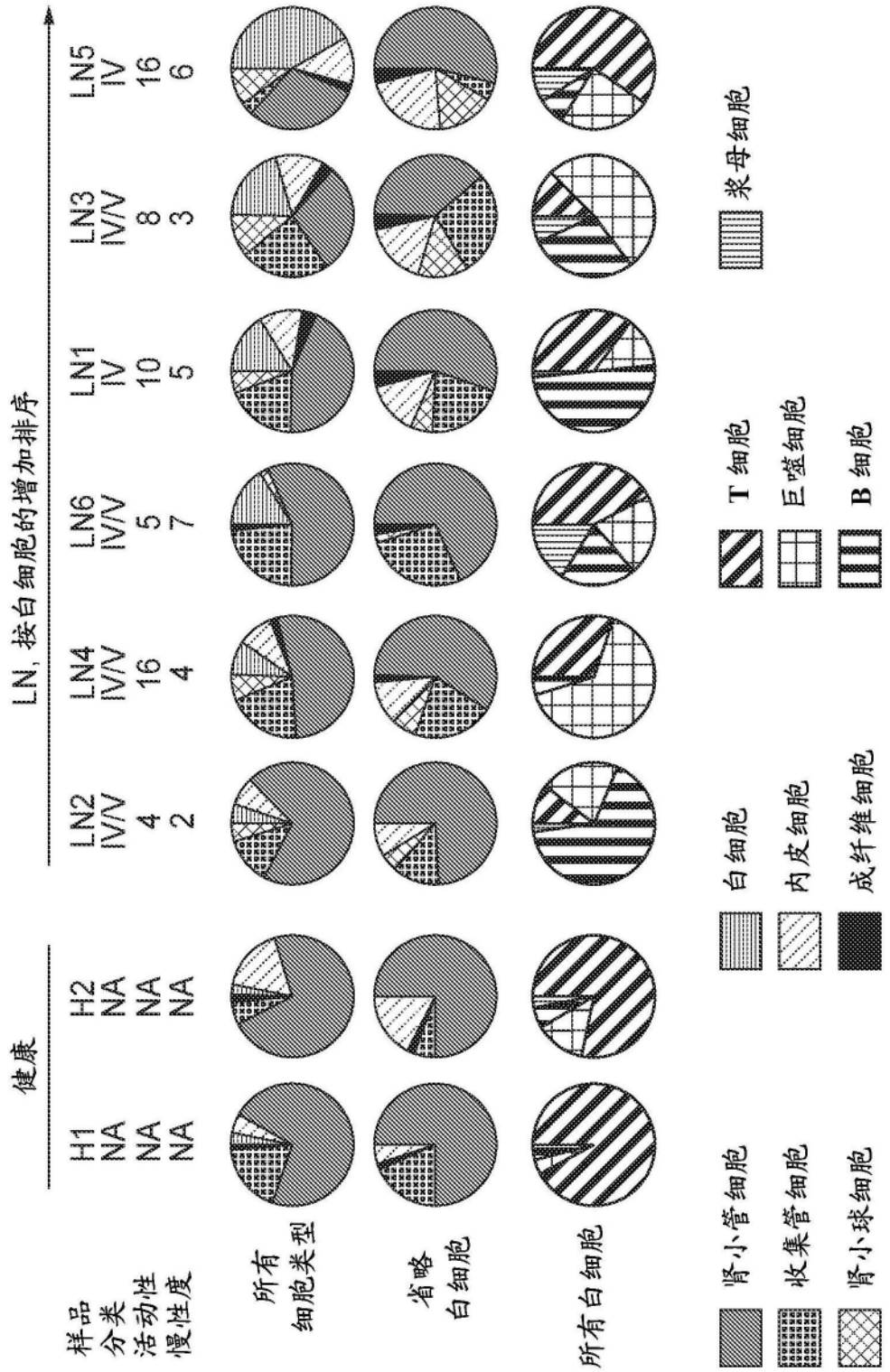

健康
LN，按白细胞的增加排序
样品 H1 H2 LN2 LN4 LN6 LN1 LN3 LN5
分类 NA NA IV/V IV/V IV/V IV IV/V IV
活动性 NA NA 4 16 5 10 8 16
慢性度 NA NA 2 4 7 5 3 6
所有细胞类型
省略白细胞
所有白细胞
肾小管细胞
收集管细胞
肾小球细胞
白细胞
内皮细胞
成纤维细胞
T 细胞
巨噬细胞
B 细胞
浆母细胞

图1

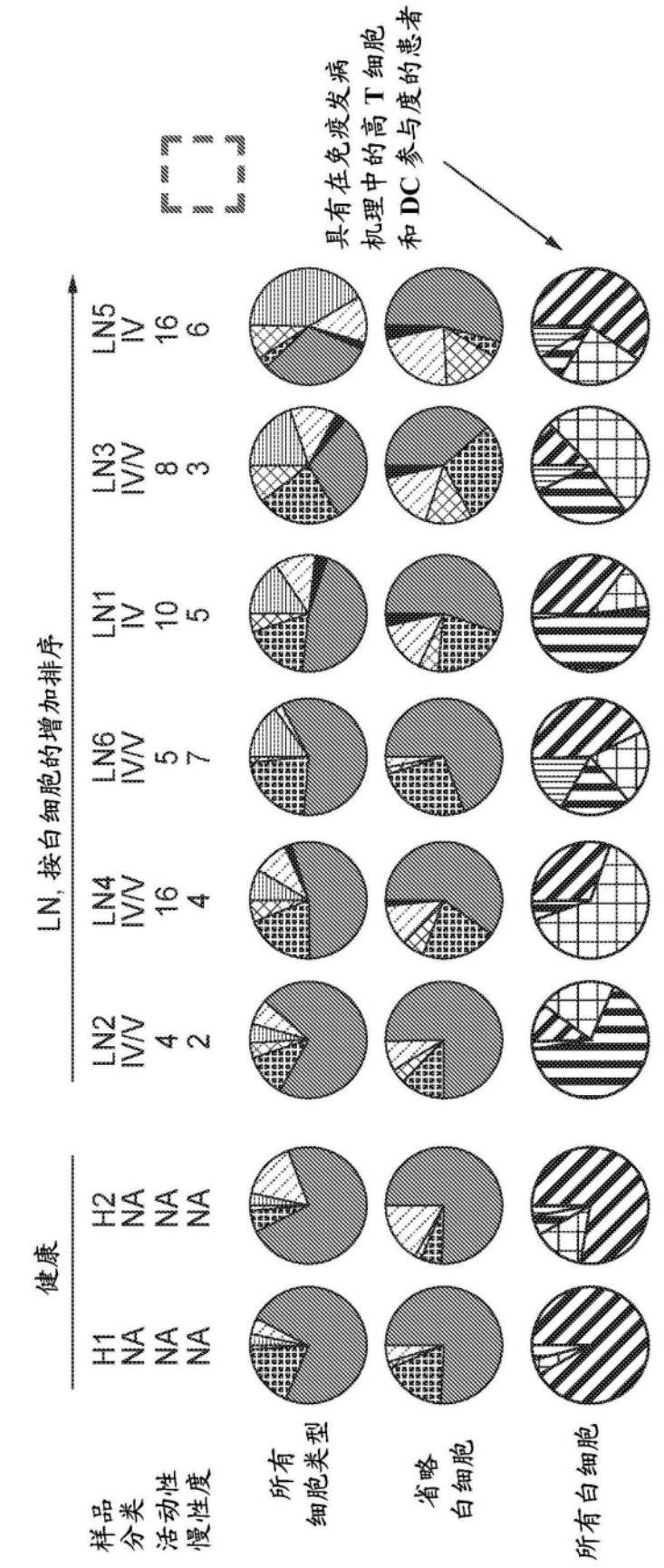

健康
LN, 按白细胞的增加排序
样品
分类
活动性
慢性度
H1 NA NA NA
H2 NA NA NA
LN2 IV/V 4 2
LN4 IV/V 16 4
LN6 IV/V 5 7
LN1 IV 10 5
LN3 IV/V 8 3
LN5 IV 16 6
具有在免疫发病机理中的高 T 细胞和 DC 参与度的患者
所有细胞类型
省略白细胞
所有白细胞
肾小管细胞
收集管细胞
肾小球细胞
白细胞
内皮细胞
成纤维细胞
T 细胞
巨噬细胞
B 细胞
浆母细胞

图2

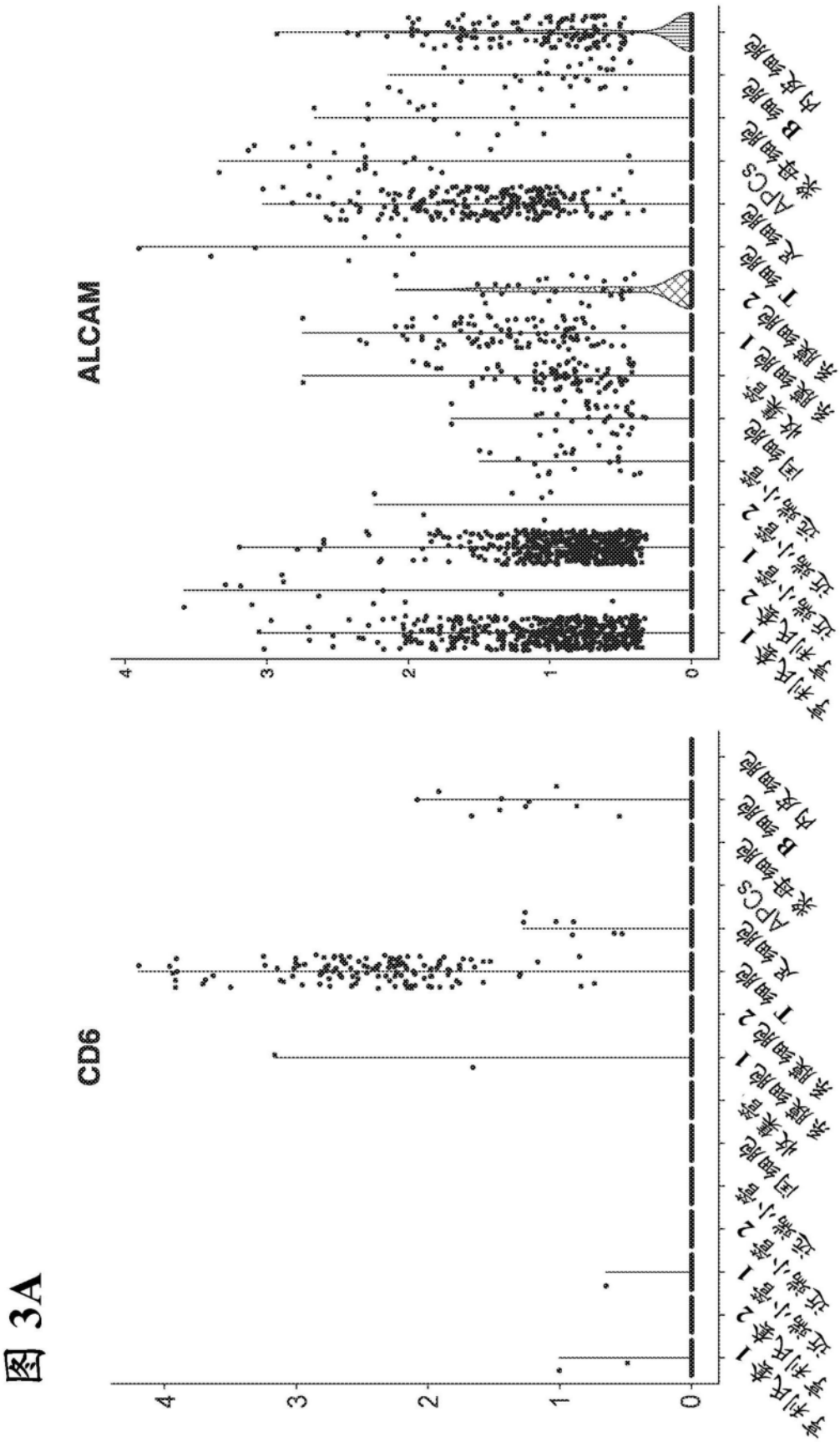

ALCAM
CD6
0
1
2
3
4
幼稚CD4+
记忆CD4+
记忆CD8+
幼稚CD8+
调节T细胞
效应记忆
中枢记忆
T细胞
NK细胞
APCs
单核细胞
B细胞
浆母细胞

图 3A

图3

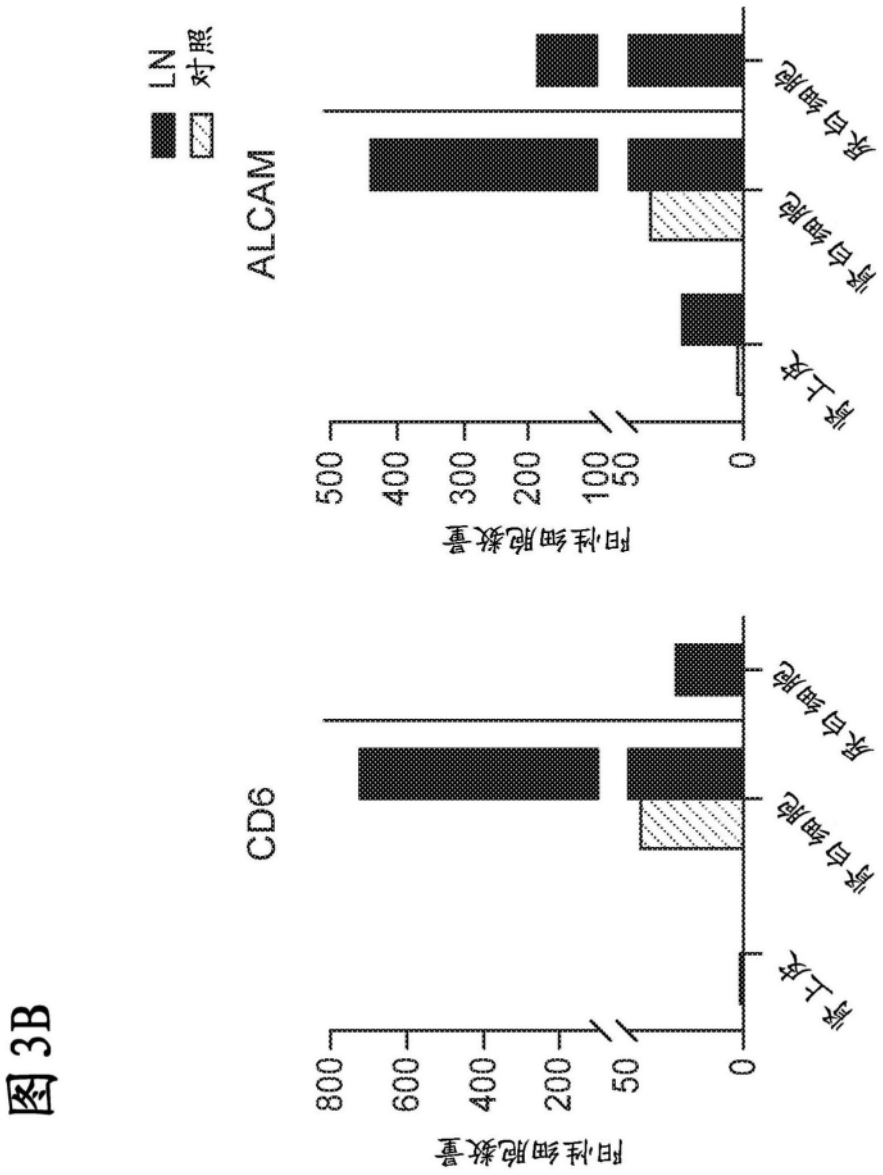

LN
对照
ALCAM
阳性细胞数量
500
400
300
200
100
50
0
肾上皮
肾白细胞
尿白细胞
CD6
阳性细胞数量
800
600
400
200
50
0
肾上皮
肾白细胞
尿白细胞

图3B

图3(续)

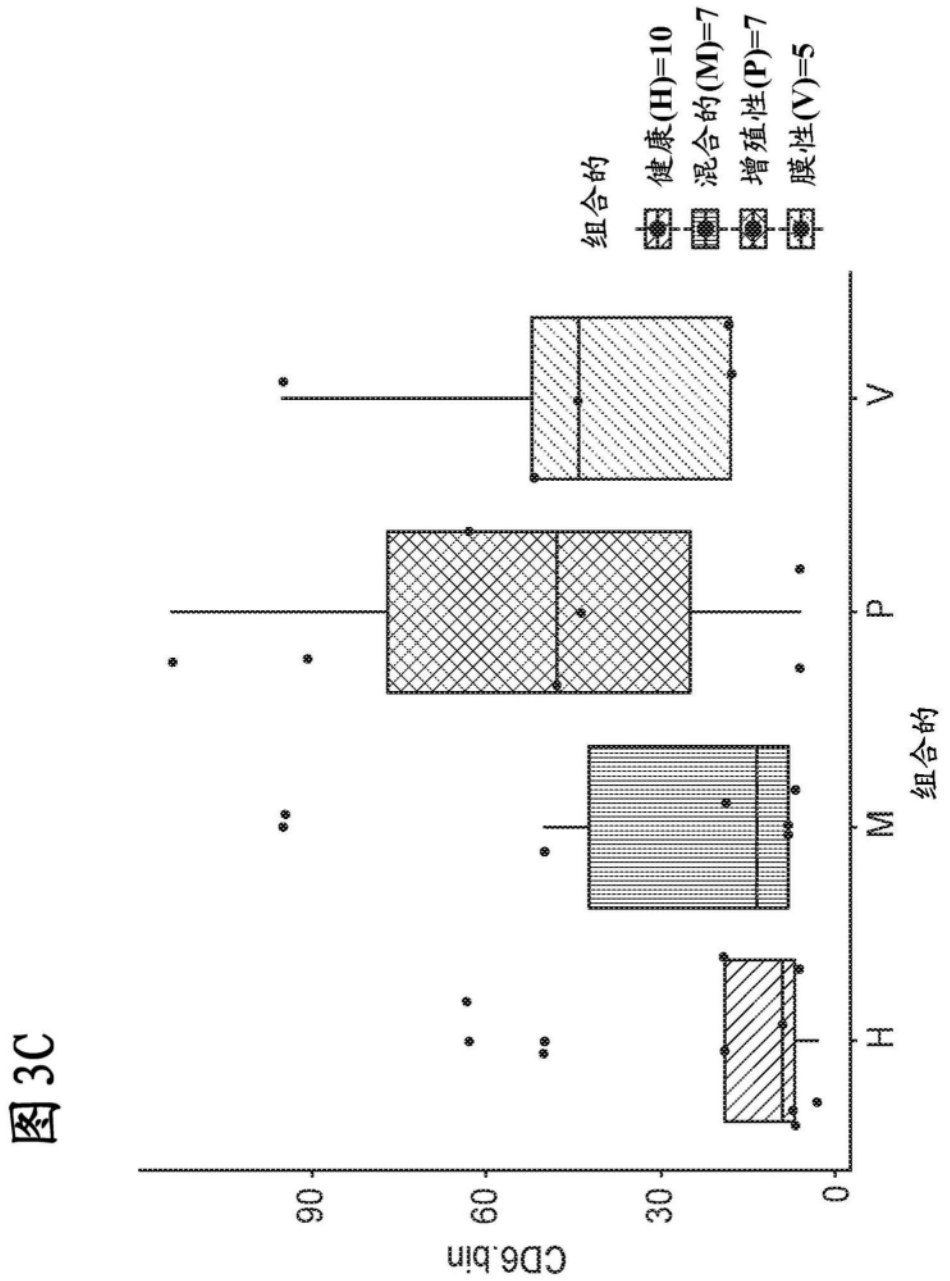


图3C

图3(续)

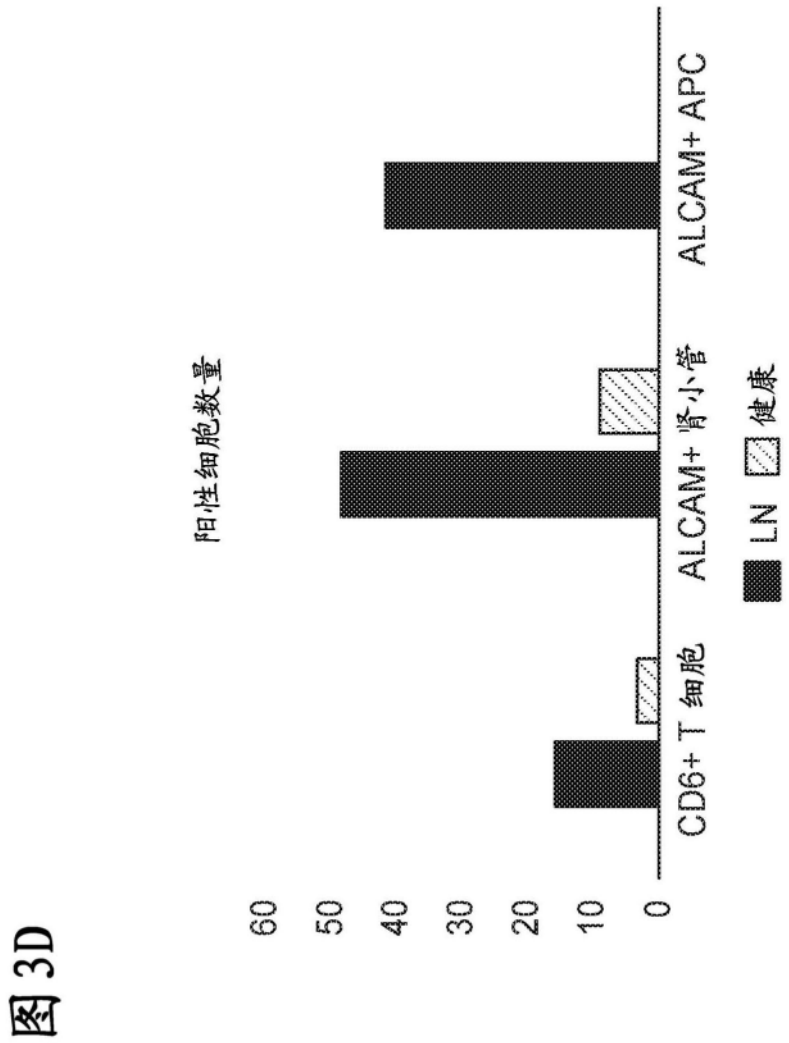


图3(续)

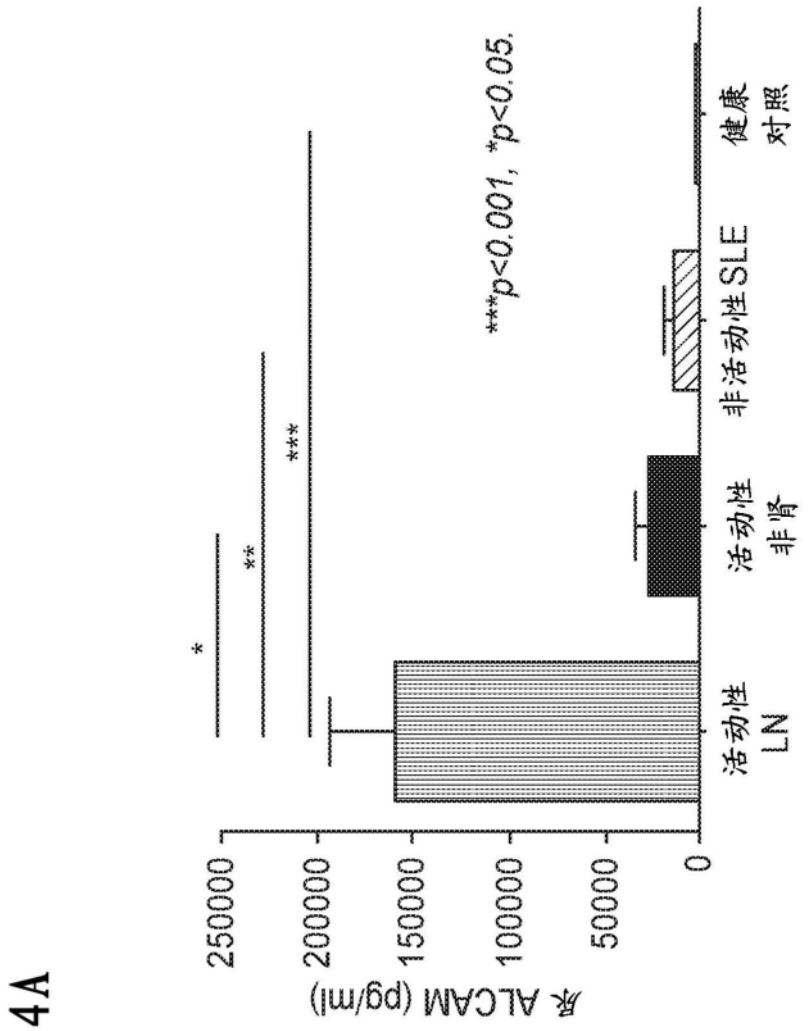

250000
200000
150000
100000
50000
0
血浆 ALCAM (pg/ml)
*
**
***
***p<0.001, *p<0.05.
活动性 LN
活动性 非肾
非活动性SLE
健康 对照

图4A

图4(续)

图4B

尿液生物标志物胜过狼疮性肾炎中的标准疾病生物标志物*						
	AUC (95% CI)	P值	敏感性	特异性	PPV	NPV
尿液 ALCAM	**0.91 (0.86 - 0.96)**	**< 0.0001**	**0.91**	**0.82**	**0.88**	**0.86**
阳性抗 dsDNA	NA		0.38	0.57	0.57	0.38
低补体	NA		0.56	0.55	0.65	0.46

*尿液蛋白标志物在非裔美国人和西班牙裔系统性红斑狼疮患者中区分活动性狼疮性肾炎（N=89）与非活动性狼疮性肾炎（N=60）的表现-UT 西南医学中心，TX

图4(续)

图 5A

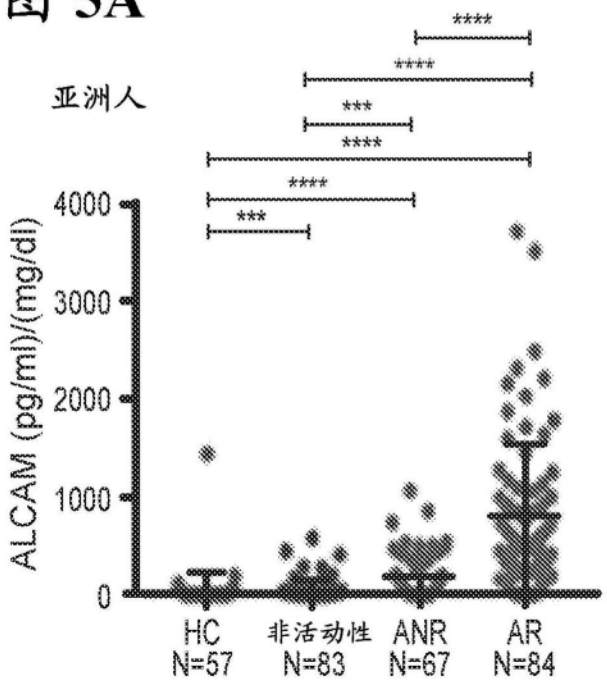


图 5B

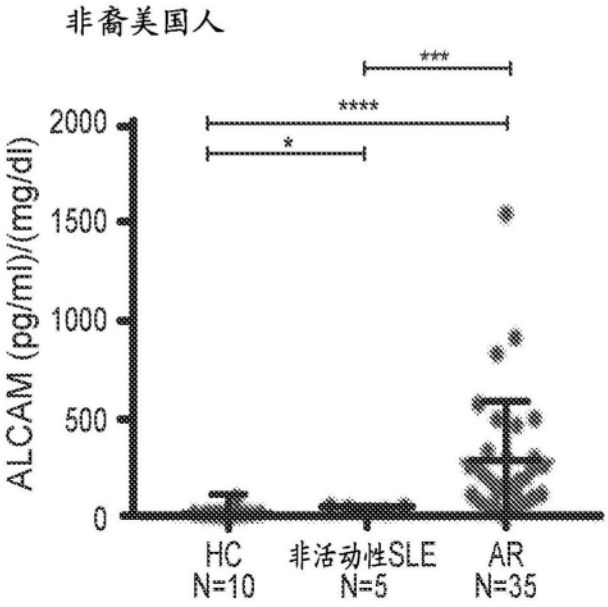


图 5C

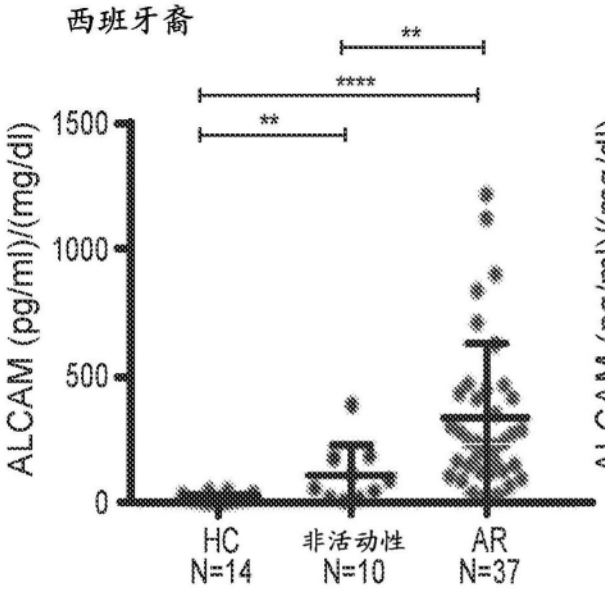


图 5D

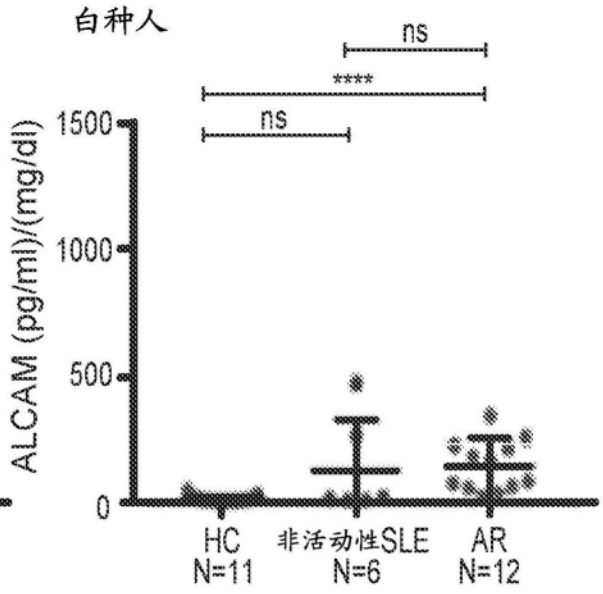


图5

图5E

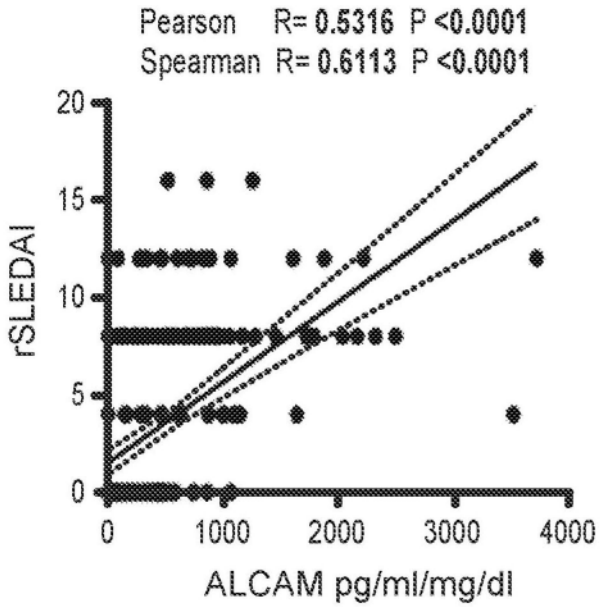


图5F

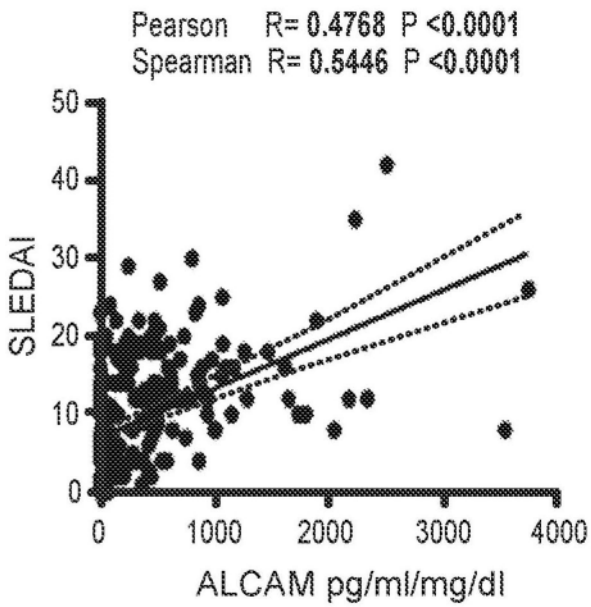


图5G

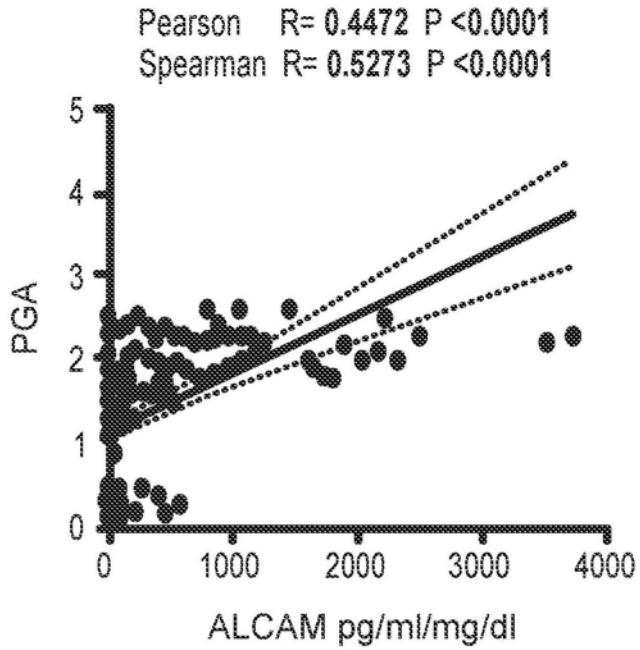


图5(续)

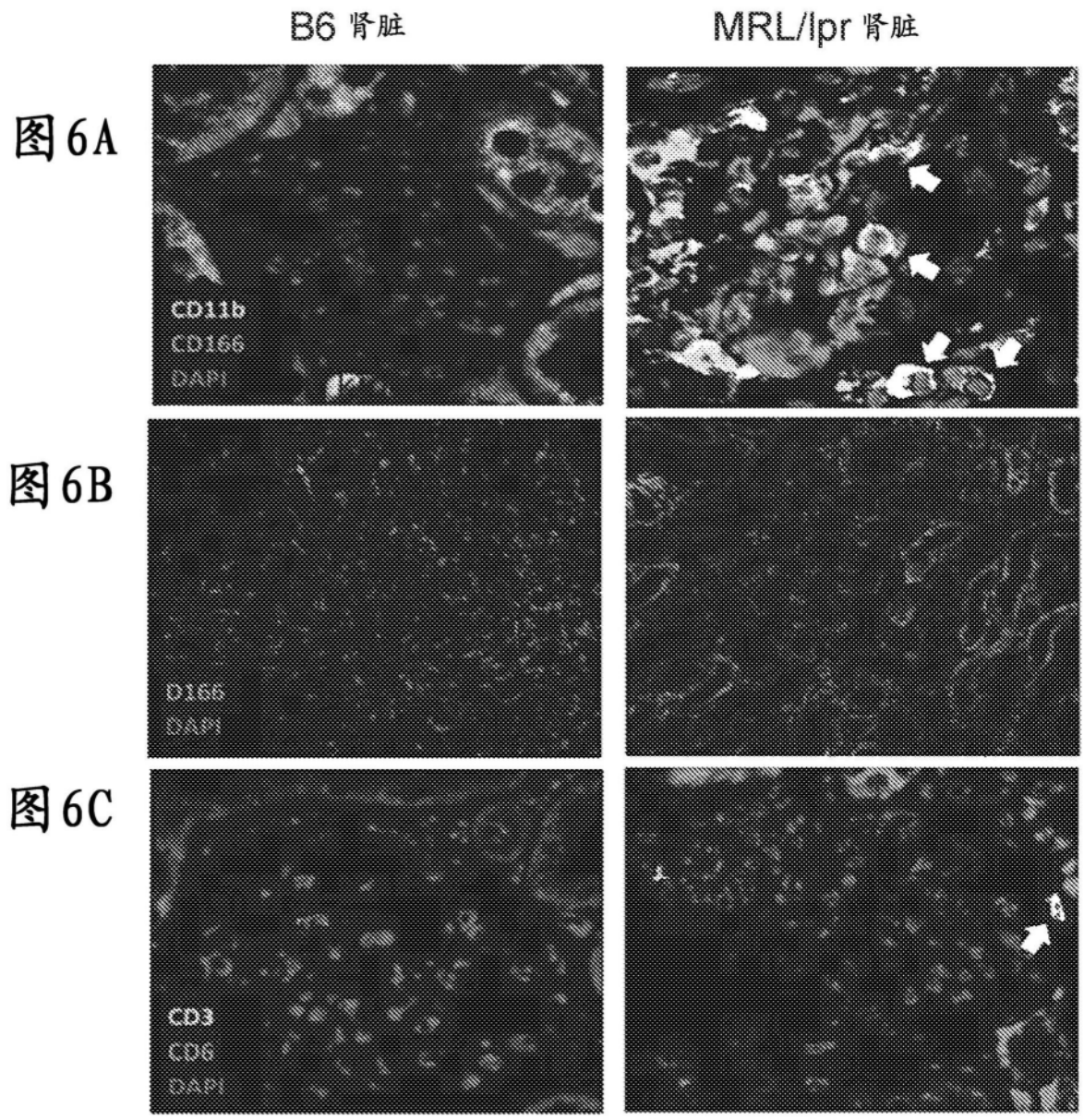

B6 肾脏
MRL/lpr 肾脏
图6A
CD11b
CD166
DAPI
图6B
D166
DAPI
图6C
CD3
CD6
DAPI

图6

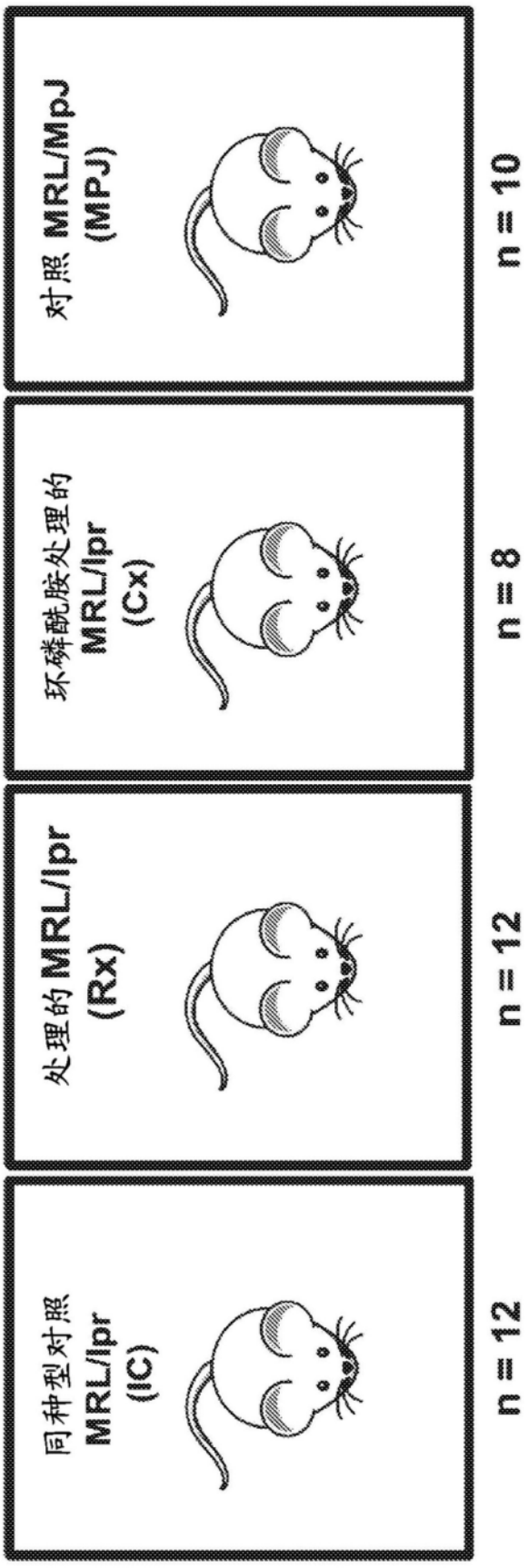

同种型对照
MRL/lpr
(IC)
n = 12
处理的 MRL/lpr
(Rx)
n = 12
环磷酰胺处理的
MRL/lpr
(Cx)
n = 8
对照 MRL/MpJ
(MPJ)
n = 10

图7

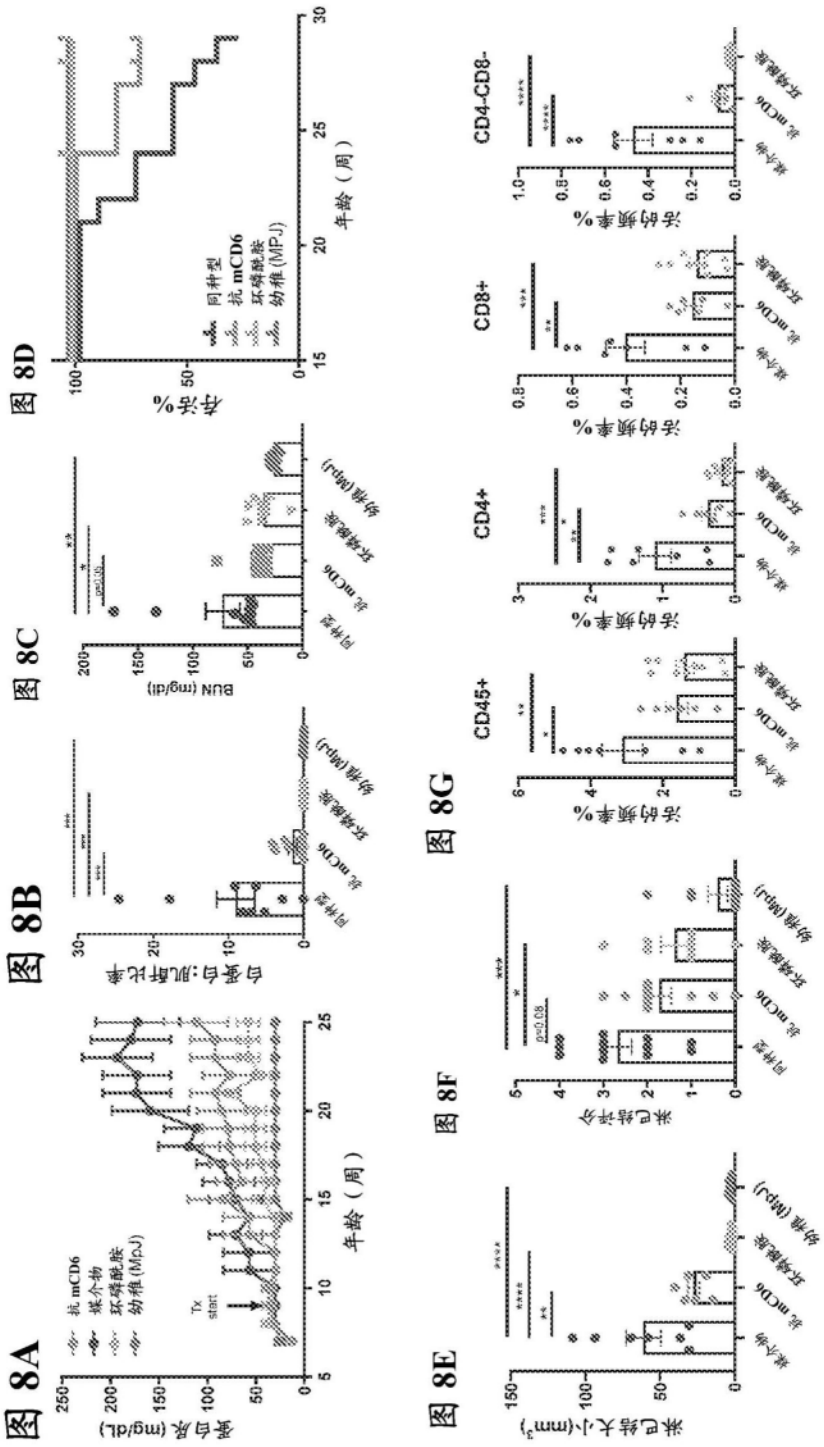

图 8A
图 8B
图 8C
图 8D
图 8E
图 8F
图 8G
年龄（周）
尿白蛋白 (mg/dL)
白蛋白:肌酐比率
BUN (mg/dl)
存活%
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚 (MPJ)
Tx start
肿瘤大小(mm³)
来自结节分
活的频率%
CD45+
CD4+
CD8+
CD4-CD8-
未处理
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚 (MPJ)

图8

图 8H

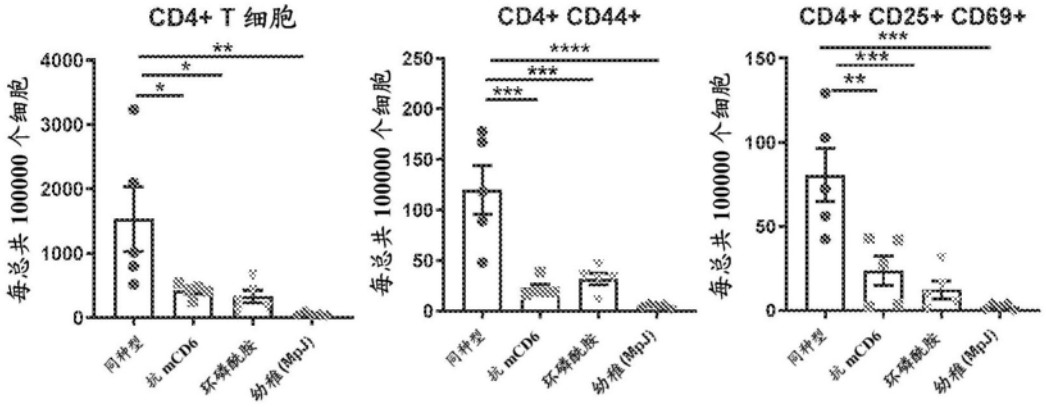

CD4+ T 细胞
每总共 100000 个细胞
4000
3000
2000
1000
0
**
*
*
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚(MpJ)
CD4+ CD44+
每总共 100000 个细胞
250
200
150
100
50
0
****
***
***
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚(MpJ)
CD4+ CD25+ CD69+
每总共 100000 个细胞
150
100
50
0
***
***
**
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚(MpJ)

图 8I

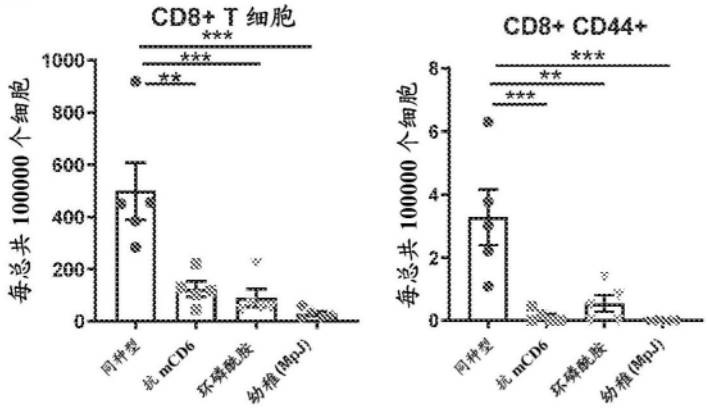

CD8+ T 细胞
每总共 100000 个细胞
1000
800
600
400
200
0
***
***
**
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚(MpJ)
CD8+ CD44+
每总共 100000 个细胞
8
6
4
2
0
***
**
***
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚(MpJ)

图8(续)

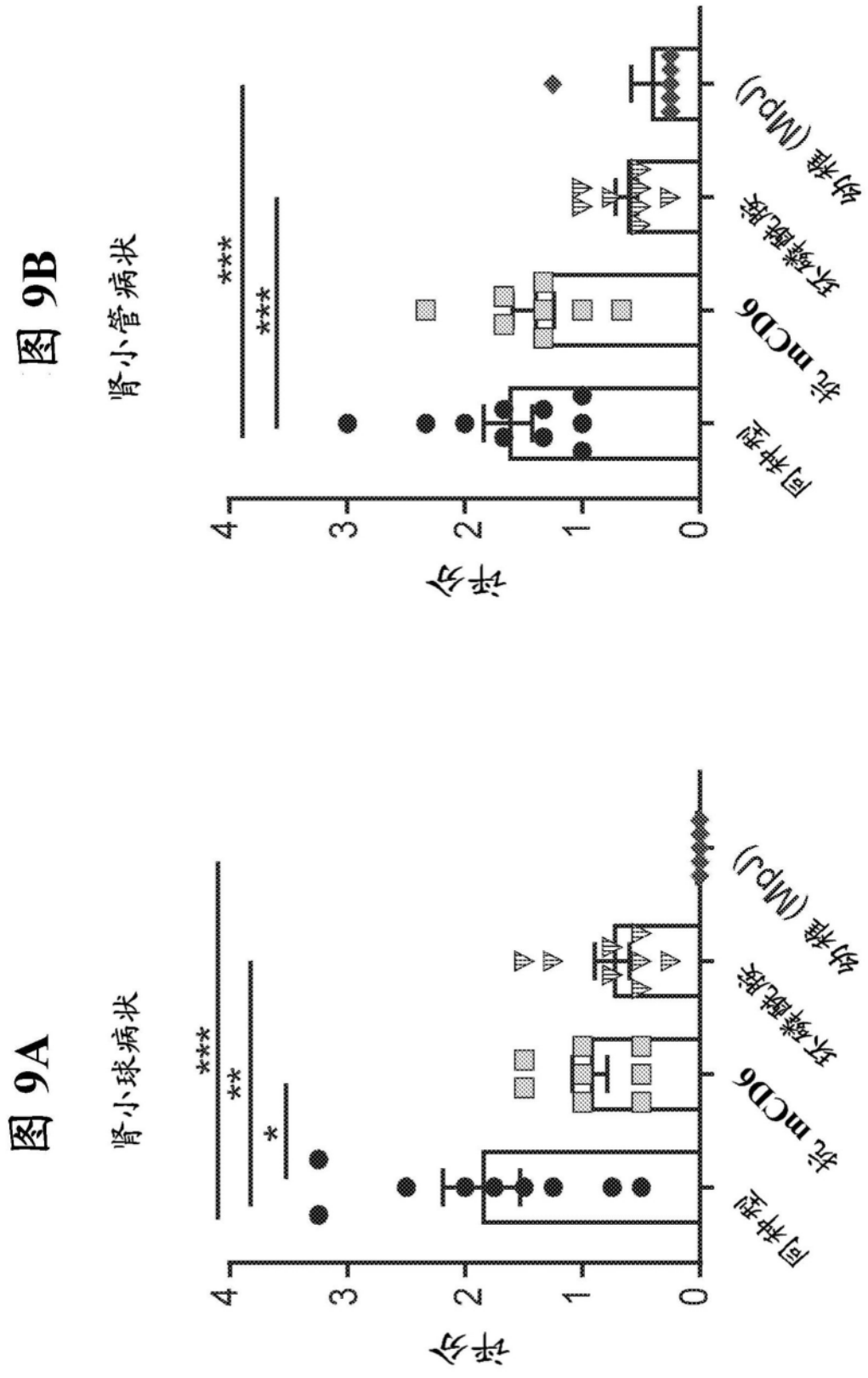

图 9A
肾小球病状
评分
0
1
2
3
4
*
**
***
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚 (Mpj)
图 9B
肾小管病状
评分
0
1
2
3
4
***
***
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼稚 (Mpj)

图9

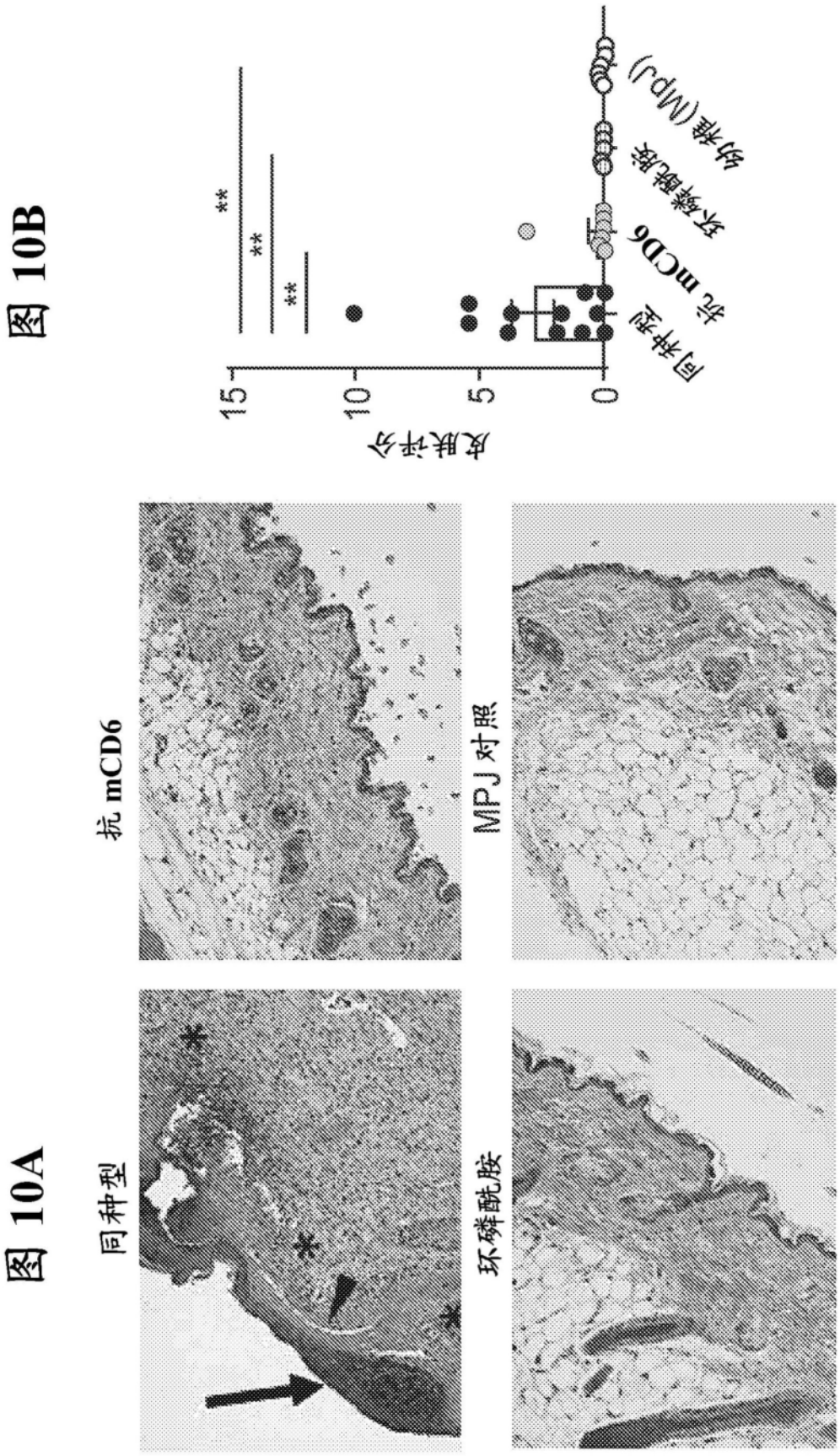

图 10A
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
MPJ 对照
图 10B
皮肤评分
15
10
5
0
**
**
**
同种型
抗 mCD6
环磷酰胺
幼龄 (MpJ)

图10

图 11A

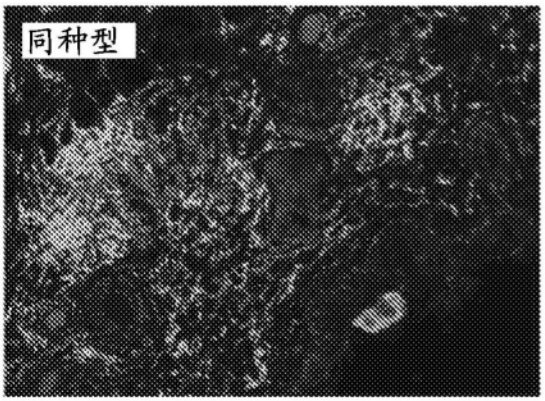


图 11B

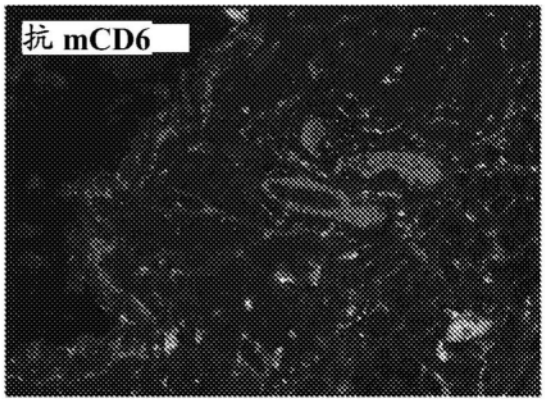


图11C

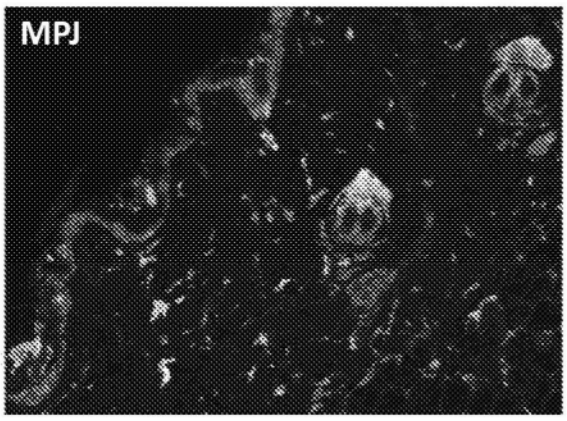
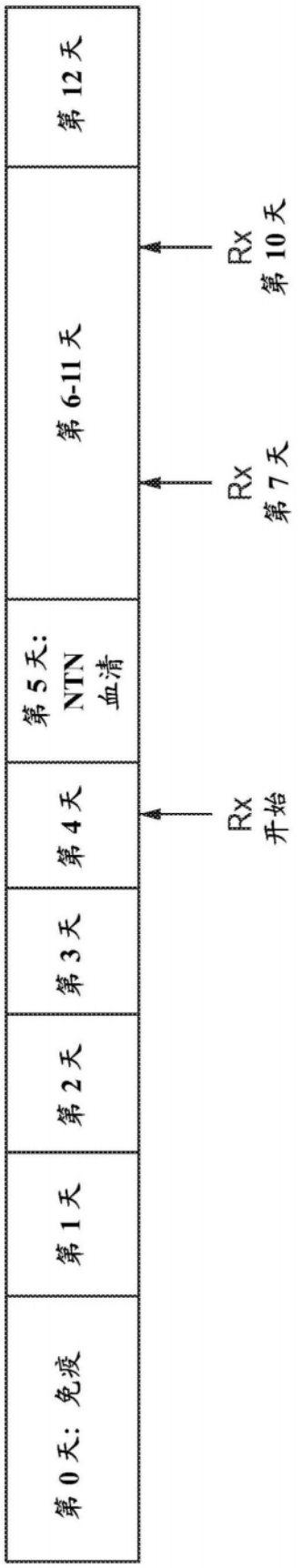


图11

图 12A



组	疾病诱导	处理
无疾病（幼稚）	经免疫但未给予肾毒性血清	N/A
同种型	标准 NTN 方案	大鼠 IgG (60μg/剂)
抗 mCD6	标准 NTN 方案	抗小鼠 CD6 (10D12; 60 μg/剂)
媒介物	标准 NTN 方案	PBS (等价体积)

图12

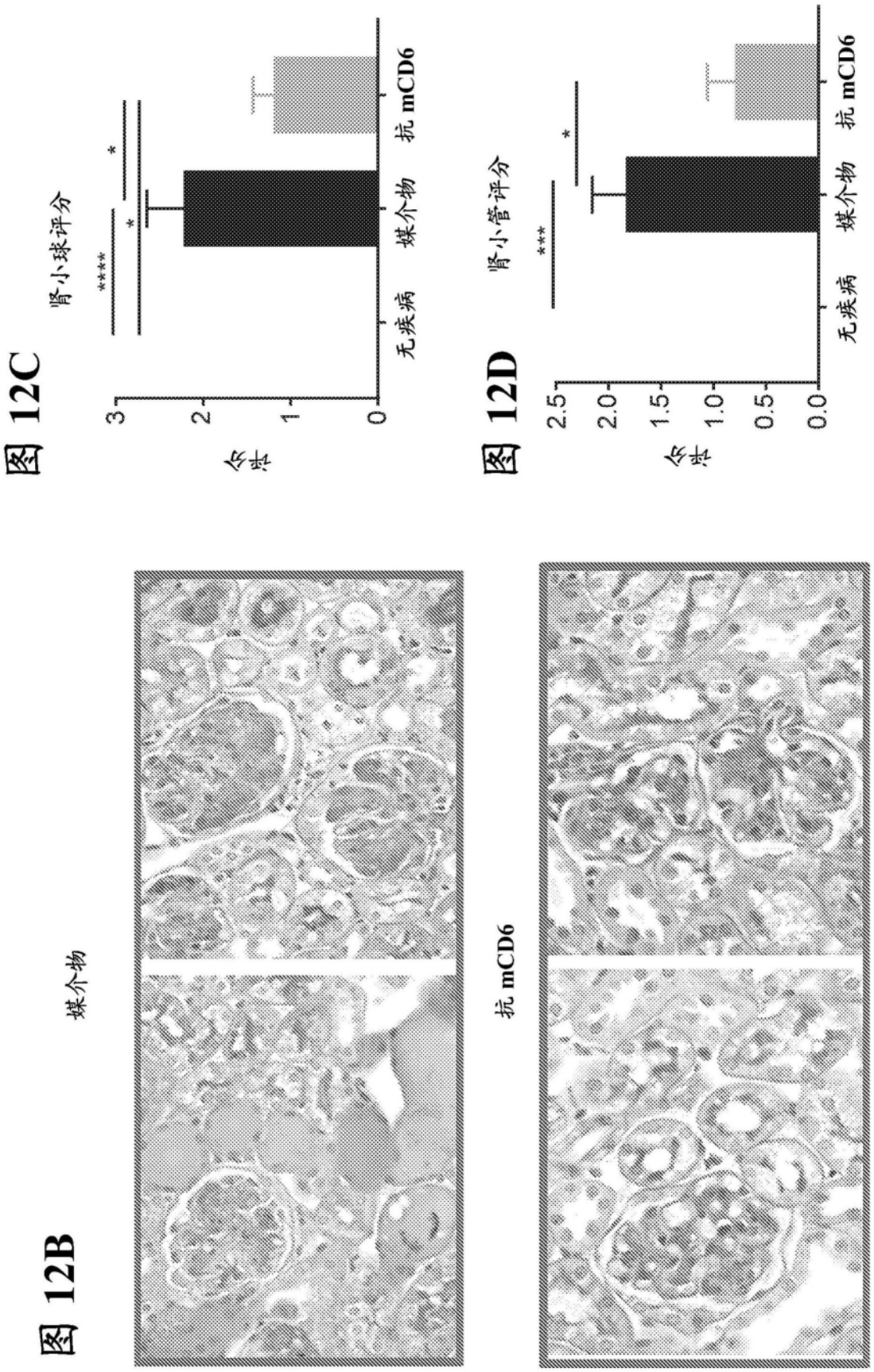

图 12B
媒介物
抗 mCD6
图 12C
肾小球评分
评分
3
2
1
0
****
*
*
*
无疾病
媒介物
抗 mCD6
图 12D
肾小管评分
评分
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
***
*
无疾病
媒介物
抗 mCD6

图12(续)

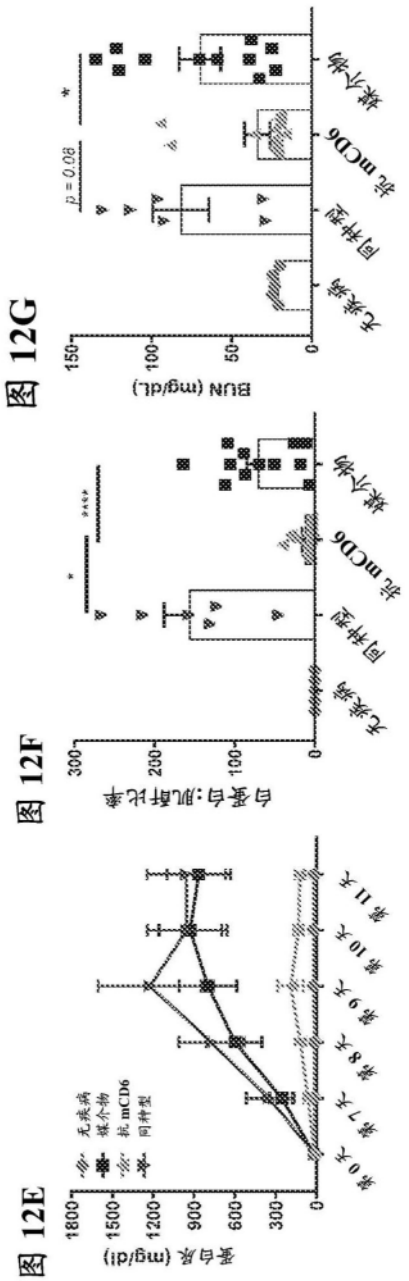

图 12E
蛋白尿 (mg/dl)
1800
1500
1200
900
600
300
0
无疾病
媒介物
抗 mCD6
同种型
第 0 天
第 7 天
第 8 天
第 9 天
第 10 天
第 11 天
图 12F
白蛋白:肌酐比率
300
200
100
0
无疾病
同种型
抗 mCD6
媒介物
图 12G
BUN (mg/dL)
150
100
50
0
p = 0.08
无疾病
同种型
抗 mCD6
媒介物

图12(续)

图 13A

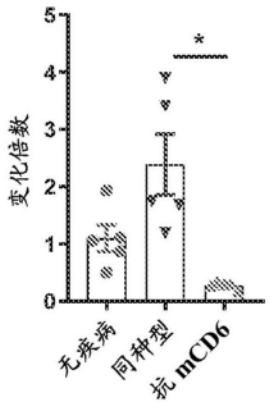


图 13B

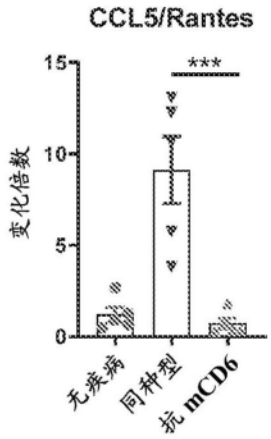


图 13C

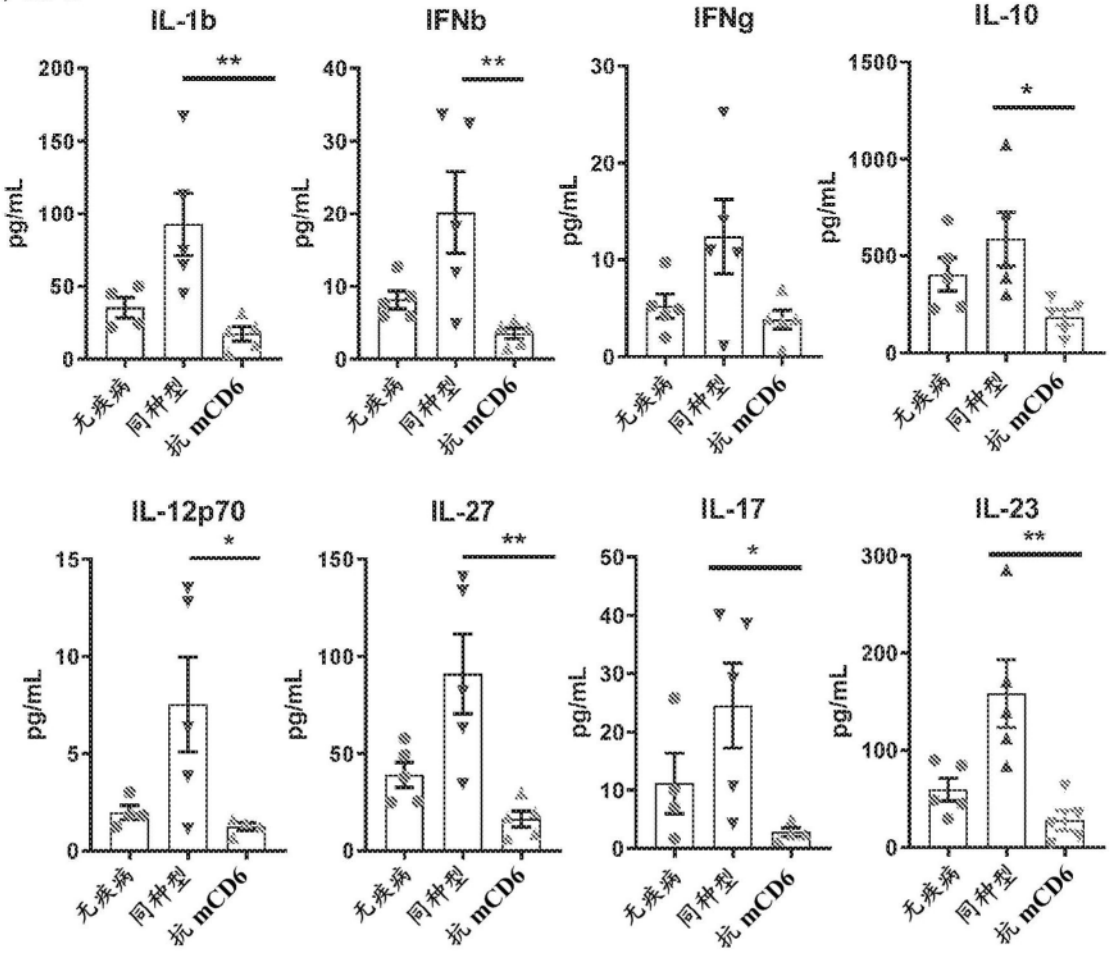


图13

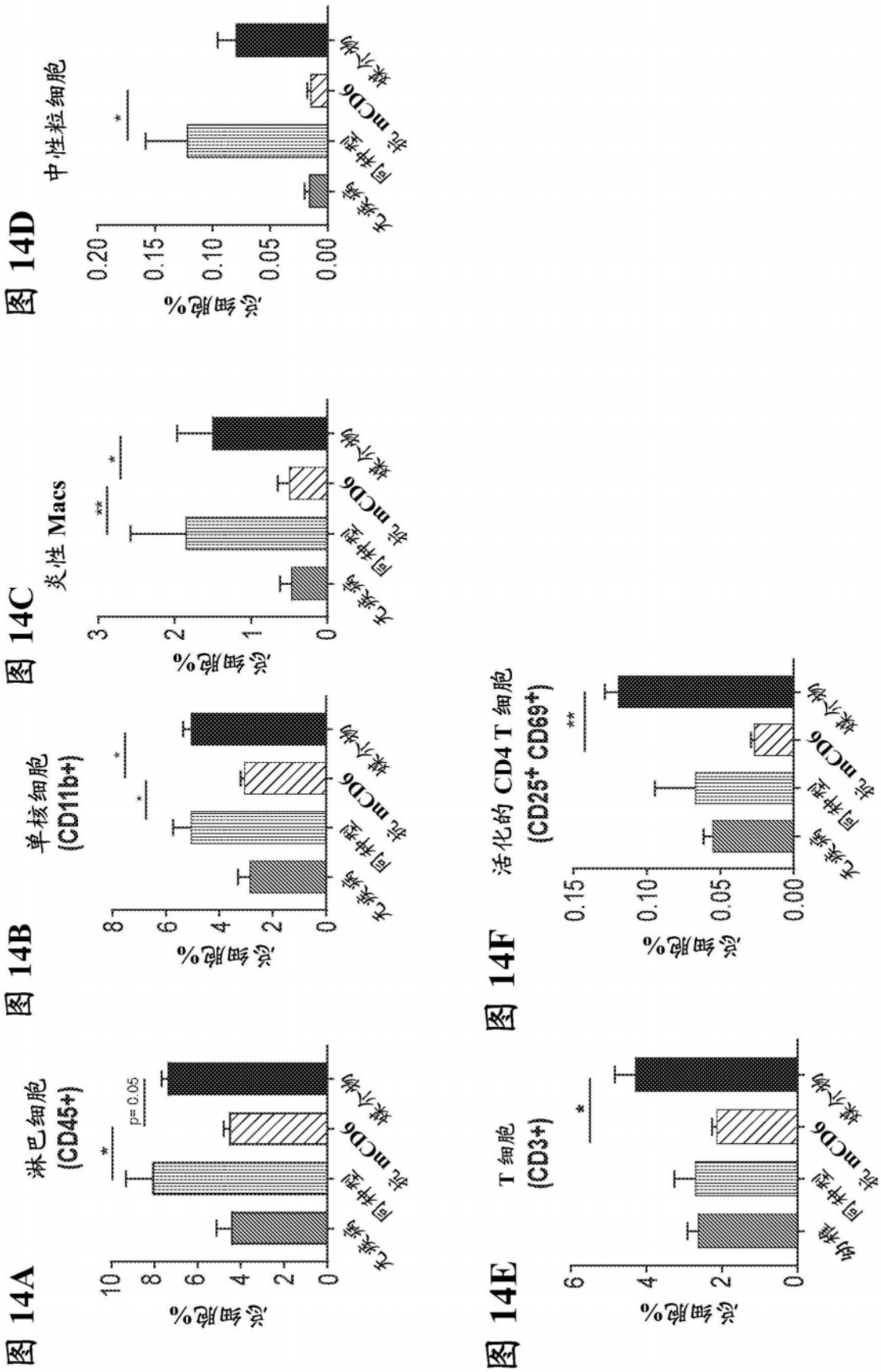

图 14A
淋巴细胞
(CD45+)
p= 0.05
图 14B
单核细胞
(CD11b+)
图 14C
炎性 Macs
图 14D
中性粒细胞
图 14E
T 细胞
(CD3+)
图 14F
活化的 CD4 T 细胞
(CD25+ CD69+)
% 总细胞
无菌鼠
同种异
抗 mCD6
移入物

图14

图 15A

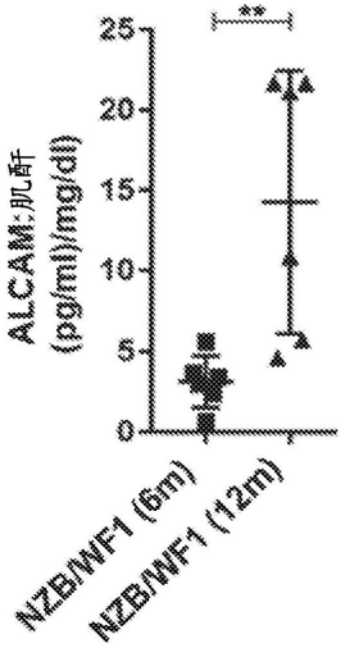


图 15B

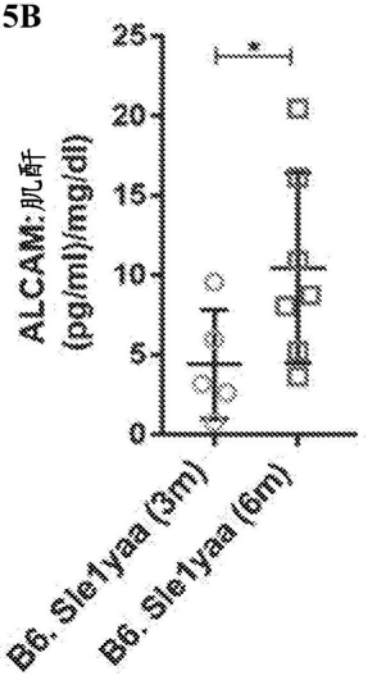


图 15C

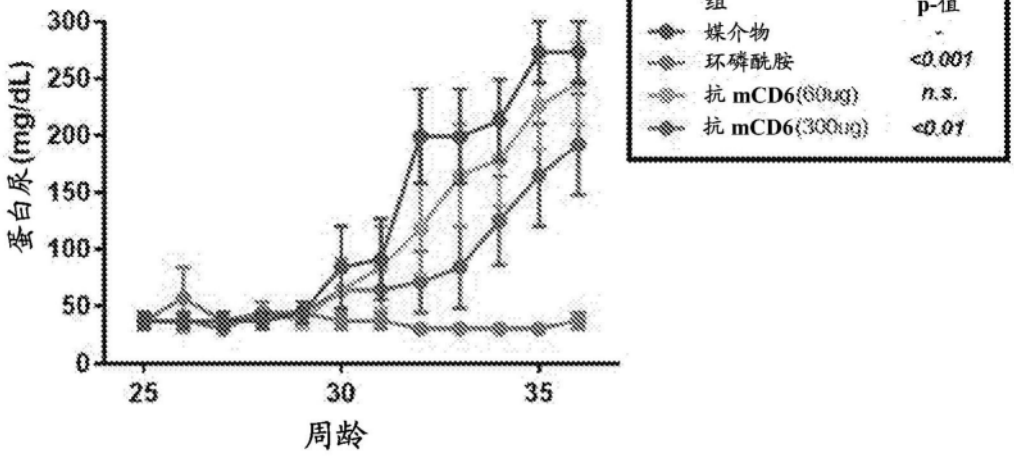


图15