(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111801118 B
(45)授权公告日 2024.10.15

(21)申请号 201880089565.8
(22)申请日 2018.12.14
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111801118 A
(43)申请公布日 2020.10.20
(30)优先权数据
17306783.6 2017.12.15 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.08.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/085016 2018.12.14
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/115791 EN 2019.06.20
(73)专利权人 法国国家健康和医学研究院
地址 法国巴黎
专利权人 南特大学医疗中心 南特大学
(72)发明人 C·吉永瑙 I·阿内贡
(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
专利代理师 付文川 吴小瑛
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
A61P 21/00(2006.01)
A61P 37/00(2006.01)
(56)对比文件
US 2017226209 A1,2017.08.10
审查员 陈皓

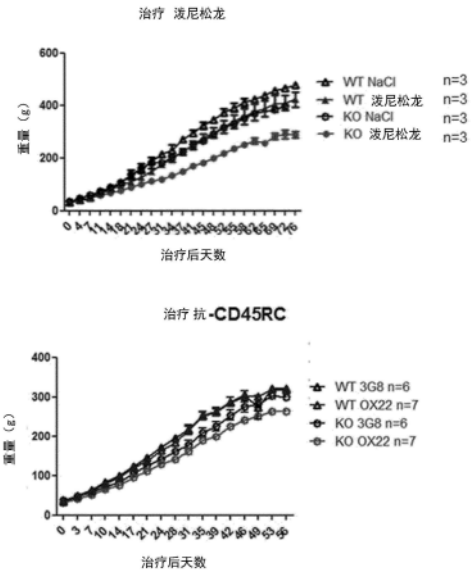
权利要求书1页 说明书39页
序列表6页 附图16页

(54)发明名称

利用抗-CD45RC抗体治疗单基因病

(57)摘要

本发明涉及抗CD45RC抗体,用于治疗由与免疫功能不相关但其缺陷与炎症和/或免疫反应相关的基因(例如杜氏肌营养不良(DMD)、囊性纤维化、溶酶体病和α1-抗胰蛋白酶缺陷的基因);或由参与免疫系统且其缺陷引起炎症和/或自身免疫反应的基因(例如T细胞原发性免疫缺陷症中,例如IPEX(免疫失调-多发性内分泌腺病-肠病-X连锁综合征)、APECED(自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良)、B细胞原发性免疫缺陷、穆-韦二氏综合征、混合性自身炎症和自身免疫综合征、NLRP12相关的遗传性周期性发热综合征和肿瘤坏死因子受体1相关的周期性综合征中缺陷的基因)引起的单基因病。



CN 111801118 B

1.一种抗CD45RC抗体在制备用于预防和/或治疗由参与免疫系统且其缺陷引起炎症和/或自身免疫反应的基因引起的单基因病的药物中的用途,其实所述单基因病是自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良(APECED)。

2.根据权利要求1所述的用途,其中所述抗CD45RC抗体是单克隆抗体。

3.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗CD45RC抗体是抗人CD45RC单克隆抗体。

4.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗CD45RC抗体是嵌合抗体、双特异性抗体、人源化抗体或完全人抗体。

5.根据权利要求1或2所述的用途,其中预防和/或治疗所述单基因病包括降低、减少、减轻和/或抑制与所述单基因病相关的症状或体征。

6.根据权利要求5所述的用途,其中与所述单基因病相关的症状或体征是自身免疫和/或炎性症状或体征。

7.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗CD45RC抗体消减了TCD45RC^{高}细胞。

8.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗CD45RC抗体是多特异性抗体,其包含针对CD45RC的第一抗原结合位点和针对效应细胞的至少一个第二抗原结合位点,所述效应细胞能够通过直接结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性吞噬作用介导T CD45RC^{高}细胞的消减。

9.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗CD45RC抗体结合有细胞毒性部分。

10.根据权利要求1或2所述的用途,其为药物组合物的形式,所述药物组合物包含所述抗CD45RC抗体和药学上可接受的载体或赋形剂或媒介物。

11.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗CD45RC抗体与免疫抑制药物和/或抗炎药物组合施用。

12.根据权利要求1或2所述的用途,其中所述抗CD45RC抗体与基因治疗或细胞治疗组合施用。

13.根据权利要求12所述的用途,其中所述基因治疗或细胞治疗在施用所述抗CD45RC抗体之前或之后施用。

14.根据权利要求13所述的用途,其中所述基因治疗或细胞治疗在施用所述抗CD45RC抗体之前施用。

利用抗-CD45RC抗体治疗单基因病

技术领域

[0001] 本发明涉及抗CD45RC抗体用于预防和/或治疗单基因病和相关症状的用途,所述单基因病例如杜氏肌营养不良(Duchenne muscular dystrophy,DMD)或自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良(autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy,APECED)。

[0002] 发明背景

[0003] 单基因病是由单基因缺陷引起的。超过4000种人类疾病是由与一个特定基因相关联的这些缺陷引起的。迄今为止,大多数治疗选择围绕治疗病症的症状,以试图改善患者的生活质量。基因治疗,即将健康基因导入患者体内的治疗形式,是这类疾病持久治疗的主要希望。然而,在将基因递送到受所述病症影响的适当细胞的技术开发期间遇到了主要障碍。

[0004] 在单基因病中,一些与免疫系统中涉及的基因有关,并且其缺陷产生炎症和/或自身免疫反应。这类疾病的一个实例是自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良(APECED)。其它单基因病与不与免疫功能相关但其缺陷与炎症和/或免疫反应相关的基因有关。这类疾病的一个例子是杜氏肌营养不良(DMD)。

[0005] DMD是一种单基因病,其中编码蛋白抗肌萎缩蛋白(dystrophin)的DMD基因的突变导致严重的X连锁肌营养不良,其影响所有随意肌并且在后期影响心脏和呼吸肌。

[0006] 免疫应答涉及DMD患者和mdx小鼠疾病的病理生理学,所述小鼠具有与人患者相同的抗肌萎缩蛋白突变(综述参见Rosenberg等,2015.Sci Transl Med.7(299):299rv4)。标准的DMD患者管理使用肾上腺皮质激素,如泼尼松龙。在mdx小鼠中,还使用了降低效应子免疫应答或炎症的治疗,例如静脉内免疫球蛋白、曲尼司特、血红素加氧酶-1诱导剂、IL-1受体拮抗剂和IL-2来扩增调节性T细胞(T_{reg})(Rosenberg等,2015.Sci Transl Med.7(299):299rv4;Villalta等,2014.Sci Transl Med.6(258):258ra142)。

[0007] 然而,尽管最近出现了有前景的新治疗,DMD患者的平均预期寿命仍然严重降低。因此,仍然需要能够降低或抑制DMD和相关疾病中的免疫应答的治疗。

[0008] 自身免疫疾病是由自身耐受性的破坏引起的,其导致免疫系统的功能障碍,并且引起严重的、致残的且甚至致命的后果。对涉及耐受性的免疫学机制的更深理解代表了改善对自身免疫性疾病的理解和治疗的主要挑战。

[0009] 这种平衡中的关键参与者是AIRE,其是允许在髓质上皮胸腺细胞(mTEC)中表达组织限制性抗原(TRA)和缺失自身反应性T细胞的转录调节物。

[0010] 自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良(APECED),也称为自身免疫性多腺体综合征I型(auto-immune polyglandular syndrome type I,APS 1),是由AIRE基因突变引起的罕见的多器官常染色体隐性自身免疫疾病。

[0011] 在人类中,该基因位于基因座21q22.3上,并且已经描述了超过100个突变导致APECED,流行率为1-9:1000000(Orphanet,http://www.orpha.net),该流行率在某些群体中增加,例如芬兰人、挪威、萨丁尼亚人和伊朗犹太人。例如,在萨丁尼亚人中,90%的APECED患者中存在过度表现的R139X突变。

[0012] APECED的临床表型通常由存在3种主要症状中的2种来定义:甲状旁腺功能减退、肾上腺功能不全(阿狄森病)和慢性粘膜皮肤念珠菌病(chronical muco-cutaneous candidiasis,CMC)。该疾病还与多种自身免疫和外胚层特征相关,例如1型糖尿病、釉质发育不全、白癜风、卵巢早衰、角膜炎、恶性贫血、脱发、外分泌胰腺炎、间质性肺病、肾炎和其它病症。

[0013] 发明概述

[0014] 在本文中,本发明人已经证明,用抗CD45RC抗体对Dmd^{mdx}大鼠的治疗可通过特异性作用于表达CD45RC的细胞(本文称为$CD45RC^{+}$细胞),特别是通过作用于表达高水平CD45RC的细胞(本文称为$CD45RC^{高}$细胞或$CD45RC+^{高}$细胞),用于治疗DMD。

[0015] 此外,本发明人还表明,施用给$Aire^{-/-}$(KO)大鼠抗CD45RC单克隆抗体导致$CD45RC^{高}$ T淋巴细胞的强烈减少,并抑制APECED的症状特征。

[0016] 本发明涉及抗CD45RC抗体,其用于预防和/或治疗选自包含以下的组的单基因病:

[0017] -由与免疫功能不相关但其缺陷与炎症和/或免疫反应相关的基因引起的单基因病,并且选自杜氏肌营养不良(DMD)、囊性纤维化、溶酶体病和α1-抗胰蛋白酶缺陷;和/或

[0018] -由参与免疫系统且其缺陷引起炎症和/或自身免疫反应的基因引起的单基因病,并且选自免疫失调-多发性内分泌腺病-肠病-X连锁综合征(immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome,IPEX)、自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良(APECED)、B细胞原发性免疫缺陷、穆-韦二氏综合征(Muckle-Wells syndrome)、混合性自身炎症和自身免疫综合征、NLRP12相关的遗传性周期性发热综合征和肿瘤坏死因子受体1相关的周期性综合征。

[0019] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体是单克隆抗体。

[0020] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体是抗人CD45RC单克隆抗体。

[0021] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体是嵌合抗体、双特异性抗体、人源化抗体或完全人抗体。

[0022] 在一些实施方案中,单基因病的预防和/或治疗包括降低(reduction)、减少(alleviation)、减轻(lessening)和/或抑制与所述单基因病相关的症状或体征,优选自身免疫和/或炎性症状或体征。

[0023] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体消减了T $CD45RC^{高}$细胞。

[0024] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体是多特异性抗体,其包含针对CDR45RC的第一抗原结合位点和针对效应细胞的至少一个第二抗原结合位点,所述效应细胞能够通过直接结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性吞噬作用介导$TCD45RC^{高}$细胞的消减。

[0025] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体偶联于细胞毒性部分。

[0026] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体为药物组合物的形式,所述药物组合物包含所述抗CD45RC抗体和药学上可接受的载体或赋形剂或媒介物。

[0027] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体与免疫抑制药物和/或抗炎药物联合施用。

[0028] 在一些实施方案中,所述抗CD45RC抗体与基因治疗或细胞治疗联合施用。

[0029] 在一些实施方案中,所述基因疗法或细胞疗法在施用所述抗CD45RC抗体之前或之后施用,优选在施用所述抗CD45RC抗体之前施用。

[0030] 在一些实施方案中,所述单基因病选自DMD、囊性纤维化、溶酶体贮积病和α1-抗胰蛋白酶缺陷,优选所述单基因病是DMD。

[0031] 在一些实施方案中,所述单基因病选自IPEX、APECED、B细胞原发性免疫缺陷、穆-韦二氏综合征、混合性自身炎症和自身免疫综合征、NLRP12相关的遗传性周期性发热综合征和肿瘤坏死因子受体1相关的周期性综合征,优选所述单基因病是APECED。

[0032] 定义

[0033] "抗体"或"免疫球蛋白"

[0034] 如本文所用,术语"抗体"和"免疫球蛋白"是指具有两条重链和两条轻链的组合的蛋白质,而无论其是否具有任何相关的特异性免疫反应性。"抗体"指对目标抗原(例如SEQ ID NO:1)具有显著已知的特异性免疫反应活性的组装体。本文所用术语"抗CD45RC抗体"是指对人CD45RC蛋白显示免疫特异性的抗体。如本文别处所述,对CD45RC的"特异性"不排除与CD45RC的物种同源物的交叉反应。

[0035] 如本文所用,术语"抗体"和"免疫球蛋白"还意指涵盖抗体结合片段。

[0036] 还应理解,本文所用的术语"抗体"和"免疫球蛋白"包括使用已知方法修饰的抗体或抗体结合片段。例如,为了减慢体内清除并获得更理想的药代动力学特性,可以用聚乙二醇(PEG)修饰抗体或其结合片段。将PEG偶联和位点特异性地缀合至抗体或其结合片段的方法描述于例如Leong等,2001.Cytokine.16(3):106-19;Delgado等,1996.Br J Cancer.73(2):175-82。

[0037] 抗体和免疫球蛋白包含轻链和重链,它们之间具有或不具有链间共价连接。对脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构具有相对深入的理解。上位术语"免疫球蛋白"包括五种不同的抗体类别,它们在生化上并不相同。尽管以下讨论将整体针对IgG类免疫球蛋白分子,但是所有五类抗体都在本发明的范围内。对于IgG,免疫球蛋白包含两条相同的分子量为约23kDa的多肽轻链,和两条相同的分子量为约53-70kDa的重链。这四条链以"Y"构型通过二硫键连接,其中轻链从"Y"的开口处开始并继续通过可变区与重链归在一起。抗体的轻链分为κ(kappa)或λ(lambda)。每个重链类别可以与κ或λ轻链结合。通常,轻链和重链彼此共价结合,并且当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或基因工程宿主细胞产生时,两条重链的"尾"区通过共价二硫键或非共价键彼此结合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的叉头末端的N-端延伸至每条链末端的C-端。本领域技术人员将理解,重链被分类为γ(gamma)、μ(mu)、α(alpha)、δ(delta)或ε(epsilon),其中有一些亚类(例如γ1-γ4)。该链的性质决定了抗体的"类别",分别为IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。免疫球蛋白亚类或"同种型"(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等)已被充分表征,并已知赋予功能特化。鉴于本公开的内容,这些类别和同种型中每一种的修饰形式对于本领域技术人员是容易辨别的,并且因此在本发明的范围内。如上所述,抗体的可变区允许抗体选择性地识别并特异性地结合抗原上的表位。即,抗体的轻链可变区(V_L结构域)和重链可变区(V_H结构域)组合形成了限定三维抗原结合位点的可变区。这种四级抗体结构形成了存在于"Y"的每个臂的末端的抗原结合位点。更具体地说,抗原结合位点由V_H和V_L链中的每一个上的三个互补决定区(CDR)限定。

[0038] "抗体结合片段"

[0039] 如本文所用,术语"抗体结合片段"是指抗体的一个部分或区域,其包含的氨基酸残基比整个抗体少。"结合片段"结合抗原(例如SEQ ID NO:1)和/或与其所来源的完整抗体

竞争抗原结合。抗体结合片段包括但不限于单链抗体、二聚体单链抗体、单结构域抗体、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)'2、Fd、脱岩藻糖基化抗体、双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体,仅作为几个举例。

[0040] "单链抗体"指任何抗体或其片段,是一级结构为包含连续氨基酸残基的一个不间断序列或由其组成的蛋白质,包括但不限于(1)单链Fv分子(scFv);(2)仅含有一个轻链可变结构域的单链蛋白,或其含有轻链可变结构域的三个CDR而没有相关重链部分的片段;和(3)仅含有一个重链可变区的单链蛋白,或其含有重链可变区的三个CDR而没有相关的轻链部分的片段。

[0041] "单链Fv",也缩写为"sFv"或"scFv",是指包含连接成单个氨基酸链的V_H和V_L抗体结构域的抗体片段。优选地,scFv氨基酸序列还包含V_H和V_L结构域之间的肽接头,其使得scFv能够形成用于抗原结合所需的结构(Plückthun,1994.Antibodies from Escherichia coli.In Rosenberg&Moore(Eds.),The pharmacology of monoclonal antibodies.Handbook of Experimental Pharmacology,113:269-315.Springer:Berlin,Heidelberg)。

[0042] "Fv"是指含有完整抗原识别和结合位点的最小抗体片段。该片段由紧密的非共价结合的一个HCVR和一个LCVR的二聚体组成。从这两个结构域的折叠发出六个高变环(来自重链和轻链各三个环),其有助于抗原结合并赋予抗体抗原结合特异性。然而,即使是单个可变域(或只包含抗原特异性的三个CDR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,只是亲和力低于整个结合位点。

[0043] "双抗体"指通过以下而制备的小抗体片段,即在HCVR和LCVR之间用短接头(约5-10个残基)构建scFv片段,从而实现可变结构域的链间配对而不是链内配对,产生二价片段,即具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个交叉scFv片段的异二聚体,其中两个抗体的HCVR和LCVR存在于不同的多肽链上。双抗体更充分地描述于专利EP0404097,专利申请WO1993011161;以及Holliger等,1993.Proc Natl Acad Sci USA.90(14):6444-8。

[0044] 抗体结合片段可以使用标准方法获得。例如,Fab或F(ab')2片段可根据常规技术通过蛋白酶消化分离的抗体来产生。

[0045] "抗体依赖性细胞介导的细胞毒性"或"ADCC"

[0046] 如本文所用,术语"抗体依赖性细胞介导的细胞毒性"或"ADCC"是指细胞毒性的一种形式,其中结合到存在于某些细胞毒性细胞(例如NK细胞、嗜中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)上的分泌抗体使这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞,并随后杀死靶细胞。为了评估目的分子的ADCC活性,可进行体外ADCC测定,如美国专利5,500,362或美国专利5,821,337所述。

[0047] "抗体依赖性吞噬作用"或"调理作用"

[0048] 如本文所用,术语"抗体依赖性吞噬作用"或"调理作用"是指细胞介导的反应,其中表达Fc γ R的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体,随后引起靶细胞的吞噬作用。

[0049] "CD45"

[0050] 如本文所用,术语"CD45"(也称为CD45R或PTPRC)指以不同同种型存在的跨膜糖蛋

白。CD45的这些独特同种型的胞外域结构并不相同,所述胞外域结构来自分别编码CD45胞外区的A、B和C决定簇的3个可变外显子(外显子4、5和6)的选择性剪接。CD45的各种同种型具有不同的胞外结构域,但在膜的近端具有相同的胞外序列,跨膜结构域和大的胞质尾区段(含有两个串联的同源且高度保守的约300个残基的磷酸酶结构域)。CD45及其同种型与T和B淋巴细胞上的淋巴细胞磷酸酶相关磷蛋白(LPAP)非共价结合。据报道,CD45与几种其它细胞表面抗原,包括CD1、CD2、CD3和CD4相关。CD45参与信号转导淋巴细胞活化。

[0051] "CD45RC"

[0052] 如本文所用,术语"CD45RC"是指本领域技术人员熟知的200-220kDa单链I型膜糖蛋白。CD45RC是CD45的选择性剪接同种型,包含编码C决定簇的外显子6(因此称为术语CD45RC,即CD45限于C决定簇),但缺少分别编码A和B决定簇的外显子4和5。该CD45RC同种型在B细胞、$CD8^+$T细胞和$CD4^+$T细胞的亚组上表达,但不在$CD8^+$或$CD4^+$Treg、$CD14^+$单核细胞或PMN上表达(Picarda等,2017.JCI Insight.2(3):e90088)。尽管一些单克隆抗体可识别所有不同同种型所共有的CD45的部分中的表位(这些称为抗CD45抗体),但其它单克隆抗体对给定同种型具有受限的特异性,这取决于它们识别哪个决定簇(A、B或C)。

[0053] "$CD45RC^+$细胞抗原"或"$CD45RC^+$细胞表面标记"

[0054] 如本文所用,术语"$CD45RC^+$细胞抗原"或"$CD45RC^+$细胞表面标记"是指具有序列SEQ ID NO:1的抗原(或表位),其在$CD45RC^+$细胞(包括T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞)的表面表达或展示,这些细胞可被与其结合的抗CD45RC剂(例如抗体或适体)靶向。示例性的$CD45RC^+$T细胞表面标记包括但不限于如前所述的CD45RC或表征所述T细胞群的其它抗原。与哺乳动物的其它非$CD45RC^+$T细胞相比,特别感兴趣的$CD45RC^+$T细胞表面标记优先在$CD45RC^+$T细胞上表达。

[0055] 然后,在产生针对CD45RC细胞表面标记物的如上所述的抗体后,本领域技术人员可容易地选择作用于$CD45RC^+$细胞,且可用于在抗体直接结合后通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)或$CD45RC^{高}$而不是$CD45RC^{低/-}$细胞死亡(例如通过凋亡)的诱导来消减$CD45RC^{高}$细胞的那些抗体(Picarda等,2017.JCI Insight.2(3):e90088)。

[0056] "CDR"或"互补决定区"

[0057] 如本文所用,术语"CDR"或"互补决定区"是指在重链和轻链多肽的可变区内发现的非邻接抗原结合位点。根据表1的规则鉴定CDR,其从Kabat等,1991.Sequences of proteins of immunological interest(5^{th} ed.).Bethesda,MD:U.S.Dep.of Health and Human Services;和Chothia和Lesk,1987.J Mol Biol.196(4):901-17推断出:

[0058]

		重链可变区 (HCVR 或 V_H)		
		V_H-CDR1	V_H-CDR2	V_H-CDR3
开始		根据 Chothia/AbM 的定义，大约在残基 26，(通常是在 Cys 之后的 4) Kabat's 的定义开始在随后的 5 个残基	根据 Kabat/AbM 的定义，通常是 V_H-CDR1 末端之后的 15 个残基	通常是 V_H-CDR2 末端之后的 33 个残基 通常是 Cys 之后的 2 个残基
残基之前		根据 Chothia/AbM 的定义，通常是 Cys-Xaa-Xaa-Xaa, 其中 Xaa 为任何氨基酸	典型的是 Leu-Glu-Trp-Ile-Gly, 但有一些变体	通常是 Cys-Xaa-Xaa，其中 Xaa 为任何氨基酸 典型的是 Cys-Ala-Arg
残基之后		通常是 Trp 典型的是 Trp-Val, 但也可以是 Trp-Ile 或 Trp-Ala	Lys/Arg-Leu/Ile/Val/Phe/Thr/Ala-Thr/Ser/Ile/Ala	通常是 Trp-Gly-Xaa-Gly，Xaa 为任何氨基酸

[0059]

长度	根据 AbM 的定义，是 10-12 个残基 Chothia 的定义排除了最后的 4 个残基 根据 Kabat 的定义，是 5-7 个残基	根据 Kabat 的定义是 16-19 个残基 AbM 的定义，提前 7 个残基结束	3-25 个残基

[0060]

	轻链可变区(LCVR 或 V_L)		
	V_L-CDR1	V_L-CDR2	V_L-CDR3
开始	大约在残基 24	通常是 V_L-CDR1 结束后 16 个残基	通常是 V_L-CDR2 末端之后 33 个残基(除了 NEW (PDB ID: 7FAB)其在 CDR-L2*的末端具有删除)
残基之前	通常是 Cys	通常是 Ile-Tyr，但也可以是 Val-Tyr,Ile-Lys 或 Ile-Phe	通常是 Cys
残基之后	通常是 Trp 典型是 Trp-Tyr-Gln，但也可以是 Trp-Leu-Gln, Trp-Phe-Gln 或 Trp-Tyr-Leu		通常是 Phe-Gly-Xaa-Gly，其中 Xaa 是任何氨基酸

[0061]

半度	10-17个残基	通常是7个残基(除了NEW (PDB ID: 7FAB)其在该区域均有删除*)	7-11个残基

[0062] *Saul&Poljak,1992.Proteins.14(3):363-71

[0063] 表1

[0064] "嵌合抗体"

[0065] "嵌合"抗体是指这样的抗体,其含有源自给定物种的抗体的天然可变区(轻链和重链),并连接有与所述给定物种异源的物种的抗体的轻链和重链恒定区。有利地,如果本发明的单克隆抗体是嵌合单克隆抗体,则后者包含人恒定区。嵌合抗体可以通过使用本领域技术人员熟知的遗传重组技术,从非人抗体开始来制备。例如,嵌合抗体可以通过克隆针对重链和轻链的含有启动子和编码非人抗体的可变区的序列以及编码人抗体的恒定区的序列的重组DNA来制备。关于制备嵌合抗体的方法,可参考例如Verhoeyn等(1988.Science.239(4847):1534-6)。

[0066] "补体依赖性细胞毒性"或"CDC"

[0067] 术语"补体依赖性细胞毒性"或"CDC"指在补体存在下裂解靶细胞。经典补体途径的激活是通过补体系统的第一组分与结合其同源抗原的抗体结合来起始。为了评估补体激活,使用CDC测定,例如可以实施如Gazzano-Santoro等,1997.J Immunol Methods.202(2):163-71中描述的一种。

[0068] "缺陷基因"

[0069] 如本文所用,术语"缺陷基因"涉及突变的、缺失的或无功能的基因。因此,由所述缺陷基因编码的蛋白缺失,或以微小的非有效量存在,或处于突变的无活性形式。

[0070] "表位"

[0071] 如本文所用,术语"表位"是指在与抗体或其结合片段结合的一种或多种蛋白上的氨基酸的特定排列。表位通常由分子的化学活性表面基团如氨基酸或糖侧链组成,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以是线性的(或连续的)或具有构象的,即,涉及抗原的不同区域中的两个或更多个氨基酸序列,所述区域可以不必是连续的。

[0072] "片段可结晶区"或"Fc"

[0073] 如本文所用,术语"片段可结晶区"或"Fc"或"Fc区"包括含有抗体恒定区且不包括第一恒定区免疫球蛋白结构域的多肽。因此,Fc是指IgA、IgD和IgG的最后两个恒定区免疫球蛋白结构域,和IgE和IgM的最后三个恒定区免疫球蛋白结构域以及这些结构域的N-末端柔性铰链。

[0074] 对于IgA和IgM,Fc可以包括J链。对于IgG,Fc包含免疫球蛋白结构域Cγ2和Cγ3以及Cγ1和Cγ2之间的铰链。

[0075] 尽管Fc区的边界可以变化,但人IgG重链Fc区通常被定义为在其羧基端包含残基C226或P230,其中编号是根据Kabat等,1991(Sequences of proteins of immunological interest(5th ed.).Bethesda,MD:U.S.Dep.of Health and Human Services)中所述的EU

索引进行的。Kabat所列的EU索引是指Kabat等人,1991(同上)所述的人IgG1 EU抗体的残基编号。Fc可以指分离的该区域,或者在抗体、抗体片段或Fc融合蛋白中的该区域。

[0076] Fc片段天然地由重链恒定区(不包括结构域C_H1)组成,即由下部边界区和恒定区C_H2和C_H3或C_H2至C_H4组成(取决于同种型)。

[0077] 在本发明的意义上,抗体的Fc片段可以是天然的或可以已经以各种方式修饰,条件是它包含用于结合FcR受体(IgG的Fc γ R受体)的功能结构域,并且优选结合受体FcRn的功能结构域。修饰可包括缺失Fc片段的某些部分,条件是后者含有结合受体FcR(IgG的受体Fc γ R)的功能结构域,并且优选结合受体FcRn的功能结构域。抗体或抗体Fc片段的修饰也可包括能够影响抗体生物学特性的氨基酸的各种取代,条件是后者含有用于结合受体FcR的功能结构域,优选结合受体FcRn的功能结构域。

[0078] 特别地,当抗体是IgG时,其可以包含旨在增强与受体Fc γ RIII(CD16)的结合的突变,如WO2000042072、WO2004029207、WO2004063351或WO2004074455中所述。允许增强与受体FcRn的结合并因此增强抗体的体内半衰期的突变也可以存在,如例如在WO2000042072、WO2002060919、WO2010045193或WO2010106180中所述。可以存在或不存在其它突变,例如那些允许减少或增加与补体的蛋白的结合的突变,并其因此补体依赖性细胞毒性(CDC)应答可存在或不存在,例如在WO1999051642或WO2004074455中所述。

[0079] "框架区"或"FR"

[0080] 本文所用的术语"构架区"或"FR"包括作为可变区的一部分但不是CDR的一部分的氨基酸残基(例如,使用Kabat/Chothia的CDR定义)。因此,可变区框架的长度在约100-120个氨基酸之间,但仅包括CDR以外的那些氨基酸。

[0081] 对于HCVR和Kabat/Chothia定义的CDR的具体实例:

[0082] -根据Chothia/AbM的定义,FR1可对应于包括氨基酸1-25的可变区的结构域,或根据Kabat的定义,其包括之后的5个残基;

[0083] -FR2可对应于可变区的包含氨基酸36-49的结构域;

[0084] -FR3可对应于可变区的包含氨基酸67-98的结构域;以及

[0085] -FR4可对应于从氨基酸104-110到可变区末端的可变区结构域。

[0086] 轻链的框架区同样被各LCVR的CDR分开。在天然存在的抗体中,每个单体抗体上存在的六个CDR是短的非连续的氨基酸序列,当抗体在水性环境中呈现三维构型时,所述氨基酸序列特异性定位以形成抗原结合位点。重和轻链可变结构域的其余部分显示氨基酸序列中较小的分子间变异性,并且被称为框架区。构架区大部分采用β-折叠构象,并且CDR形成环,该环连接β-折叠结构,并且在某些情况下形成β-折叠结构的一部分。因此,这些框架区形成支架,该支架通过链间非共价相互作用将六个CDR定位在正确的方向。由定位的CDR形成的抗原结合位点限定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体与免疫反应性抗原表位的非共价结合。CDR的位置可由本领域普通技术人员容易地确定。

[0087] "重链区"

[0088] 如本文所用,术语"重链区"包括来源于免疫球蛋白重链的恒定结构域的氨基酸序列。包含重链区的蛋白包含C_H1结构域、铰链(例如上、中和/或下铰链区)结构域、C_H2结构域、C_H3结构域或其变体或片段中的至少一个。在一个实施方案中,本发明的抗体或其结合片段可以包含免疫球蛋白重链的Fc区(例如,铰链部分、C_H2结构域和C_H3结构域)。在另一个实施

方案中,根据本发明的抗体或其结合片段缺少恒定结构域的至少一个区域(例如,C_H2结构域的全部或部分)。在某些实施方案中,至少一个,优选所有的恒定区都衍生自人免疫球蛋白重链。例如,在一个优选的实施方案中,重链区包含完全人的铰链结构域。在其它优选的实施方案中,重链区包含完全人的Fc区(例如,来自人免疫球蛋白的铰链、C_H2和C_H3结构域序列)。在某些实施方案中,重链区的组成性恒定结构域来自不同的免疫球蛋白分子。例如,蛋白的重链区可包含来源于IgG1分子的C_H2结构域和来源于IgG3或IgG4分子的铰链区。在其它实施方案中,恒定结构域是包含不同免疫球蛋白分子的区域的嵌合结构域。例如,铰链可包含来自IgG1分子的第一区域和来自IgG3或IgG4分子的第二区域。如上所述,本领域普通技术人员将理解,可以修饰重链区的恒定结构域,使得它们在氨基酸序列上与天然存在的(野生型)免疫球蛋白分子不同。即,本发明的抗体或其结合片段可以包含对一个或多个重链恒定结构域(C_H1、铰链、C_H2或C_H3)和/或对轻链恒定结构域(CL)的改变或修饰。示例性修饰包括在一个或多个结构域中添加、缺失或取代一个或多个氨基酸。

[0089] "铰链区"

[0090] 如本文所用,术语"铰链区"包括连接C_H1结构域与C_H2结构域的重链分子区域。该铰链区包含约25个残基并且是柔性的,因此允许两个N-末端抗原结合区独立移动。铰链区可细分为三个不同的结构域:上、中和下铰链结构域(Roux等,1998.J Immunol.161(8):4083-90)。

[0091] "人源化抗体或其结合片段"

[0092] 如本文所用的"人源化抗体或其结合片段"是指含有来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体或其结合片段。它包括由具有可变区和恒定区的非人细胞制备的抗体,所述可变区和恒定区已经被改变以更接近地类似于由人细胞制备的抗体,例如通过改变非人抗体氨基酸序列以引入在人种系免疫球蛋白序列中发现的氨基酸。本发明的人源化抗体或其结合片段可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中。术语"人源化抗体或其结合片段"还包括其中来源于另一哺乳动物物种(例如小鼠)种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体及其结合片段。换句话说,术语"人源化抗体或其结合片段"是指其中受体人抗体的CDR被来自非人抗体供体例如小鼠抗体的CDR所取代的抗体或其结合片段。人源化抗体或其结合片段也可在框架序列中包含供体来源的残基。人源化抗体或其结合片段还可以包含人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。人源化抗体及其结合片段也可包含既不存在于受体抗体中也不存在于输入的CDR或FR序列中的残基。人源化可以使用本领域已知的方法进行(例如,Jones等,1986.Nature.321(6069):522-5;Riechmann等,1988.Nature.332(6162):323-7;Verhoeyen等,1988.Science.239(4847):1534-6;Presta,1992.Curr Opin Biotechnol.3(4):394-8;专利US4,816,567),包括技术例如"超级人源化"抗体(例如,Tan等,2002.JImmunol.169(2):1119-25)和"再表面化"(例如,Staelens等,2006.MolImmunol.43(8):1243-57;Roguska等,1994.Proc Natl Acad Sci USA.91(3):969-73)。

[0093] 用于人源化本发明的抗体或其结合片段的方法是本领域公知的,并且将在以下实施例部分中进一步详述。用于制备人源化抗体或其结合片段的人轻链和重链可变结构域的选择对于降低抗原性是非常重要的。根据所谓的"最佳拟合"方法,针对已知人可变结构域

序列的整个文库筛选本发明的抗体或其结合片段的可变结构域序列。然后将最接近小鼠序列的人序列接受为人源化抗体的人框架(FR)(Sims等,1993.J Immunol.151(4):2296-308;Chothia&Lesk,1987.J Mol Biol.196(4):901-17)。

[0094] 另一种人源化本发明的抗体或其结合片段的方法使用来自特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定FR。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter等,1992.Proc Natl Acad Sci USA.89(10):4285-9;Presta等,1993.J Immunol.151(5):2623-32)。更重要的是,抗体被人源化,同时保留对hCD45RC的高亲和性和其它有利的生物学特性。为了实现这个目标,根据优选的方法,通过使用亲本和人源化序列的三维模型分析亲本序列和各种概念上的人源化产物的方法,来制备人源化抗体及其结合片段。三维免疫球蛋白模型是本领域技术人员通常可获得的和熟悉的。可以获得说明和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维结构的计算机程序。对这些展示的检查允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即分析影响候选免疫球蛋白结合其表位的能力的残基。这样,可从共有的输入序列中选择和组合CDR残基,以便获得所需的抗体特征,例如对hCD45RC亲和力的增加。通常,CDR残基直接且最实质地参与影响抗原结合。

[0095] 另一种人源化本发明的抗体或其结合片段的方法是,使用携带部分人免疫系统的转基因或转染色体动物进行免疫。作为宿主,这些动物的免疫球蛋白基因已被功能性人免疫球蛋白基因所取代。因此,由这些动物或由这些动物的B细胞制备的杂交瘤产生的抗体已经被人源化。这种转基因或转染色体动物的实例包括但不限于:

[0096] -XenoMouse(Abgenix,Fremont,CA),描述于专利US5,939,598、US6,075,181、US6,114,598、US6,150,584和US6,162,963;

[0097] -HuMAb Mouse® (Medarex,Inc.),描述于Lonberg等,1994.Nature.368(6474):856-859;Lonberg&Huszar,1995.Int Rev Immunol.13(1):65-93;Harding&Lonberg,1995.Ann N Y Acad Sci.764:536-46;Taylor等,1992.Nucleic Acids Res.20(23):6287-95;Chen等,1993.Int Immunol.5(6):647-56;Tuaillon等,1993.Proc Natl Acad Sci USA.90(8):3720-4;Choi等,1993.NatGenet.4(2):117-23;Chen等,1993.EMBO J.12(3):821-30;Tuaillon等,1994.JImmunol.152(6):2912-20;Taylor等,1994.Int Immunol.6(4):579-91;Fishwild等,1996.Nat Biotechnol.14(7):845-51;

[0098] -KM Mouse®,描述于专利申请WO2002043478;

[0099] -TC小鼠,描述于Tomizuka等,2000.Proc Natl Acad Sci USA.97(2):722-7;以及

[0100] -OmniRat™(OMT,Inc.),描述于专利申请WO2008151081;Geurts等,2009.Science.325(5939):433;Menoret等,2010.Eur J Immunol.40(10):2932-41;Osborn等,2013.J Immunol.190(4):1481-90。

[0101] 人源化抗体及其结合片段也可根据各种其它技术来生产,例如通过使用其它已工程化以表达人抗体库的转基因动物(Jakobovitz等,1993.Nature.362(6417):255-8)进行免疫,或通过使用噬菌体展示方法选择抗体库。这些技术是本领域技术人员已知的,并且可以从本申请中公开的单克隆抗体或其结合片段开始实施。

[0102] 在一些实施方式中,根据本发明包含HCVR和LCVR(或其CDR)的抗体或其结合片段可包含第一恒定结构域(C_H1和/或C_L),其氨基酸序列完全或基本上是人的。

[0103] 在一些实施方案中,尤其当根据本发明的抗体或其结合片段旨在用于人类治疗用途时,典型地是整个恒定区或其至少一部分具有完全的或基本上人类的氨基酸序列。因此,C_H1结构域、铰链区、C_H2结构域、C_H3结构域和C_L结构域(和C_H4结构域,如果存在)中的一个或多个或其任何组合,就其氨基酸序列而言,可以是完全或基本上人的。有利地,C_H1结构域、铰链区、C_H2结构域、C_H3结构域和C_L结构域(和C_H4结构域,如果存在)可全部具有完全或基本上人的氨基酸序列。

[0104] 在人源化或嵌合抗体或其结合片段的恒定区的上下文中,术语"基本上人的"是指与人恒定区具有至少70%,优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的氨基酸序列同一性。

[0105] 术语"人氨基酸序列"在本文中是指由人免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列,所述人免疫球蛋白基因包括种系的、重排的和体细胞突变的基因。本发明还涉及包含具有"人"序列的恒定区的蛋白,所述恒定区已通过相对于人序列的一个或多个氨基酸添加、缺失或取代而被改变,除了明确需要存在"完全人铰链区"的那些实施方案外。

[0106] 根据本发明的抗体或其结合片段中"完全人铰链区"的存在对于最小化免疫原性和优化抗体的稳定性可能是有益的。认为在重链和/或轻链的恒定区内,特别是在Fc区内,可以进行一个或多个氨基酸取代、插入或缺失。氨基酸取代可以导致用天然存在的不同氨基酸,或者用非天然的或修饰的氨基酸取代氨基酸。也允许其它结构修饰,例如糖基化模式的改变(例如,通过添加或缺失N-或O-连接的糖基化位点)。根据抗体或其结合片段的预期用途,可能需要修饰根据本发明的抗体或其结合片段与Fc受体的结合特性,例如调节效应子功能。例如,可以在Fc区中引入半胱氨酸残基,从而允许在该区域中形成链间二硫键。如此产生的同二聚体抗体可具有改善的效应子功能(Caron等,1992.J Exp Med.176(4):1191-5;Shopes,1992.J Immunol.148(9):2918-22)。

[0107] "高变环"

[0108] 术语"高变环"与互补决定区(CDR)不是严格意义上的同义词,因为高变环(HV)是基于结构定义的,而CDR是基于序列变异性定义的(Kabat等,1991.Sequences of proteins of immunological interest(5th ed.).Bethesda,MD:U.S.Dep.of Health and Human Services),并且在一些V_H和V_L结构域中,HV和CDR的限制可能不同。V_L和V_H结构域的CDR通常可由上文已经解释的Kabat/Chothia定义来定义。

[0109] "同一性"或"同一的"

[0110] 如本文所用,术语"同一性"或"同一的"当用于两个或更多个氨基酸序列的序列之间、或两个或更多个核酸序列的序列之间的关系时,是指氨基酸序列或核酸序列之间的序列相关性程度,如通过两个或更多个氨基酸残基或核酸残基的链之间的匹配数目所确定的。"同一性"测量由特定数学模型或计算机程序(即"算法")处理的具有缺口比对(如果有的话)的两个或更多个序列中较小的序列之间的相同匹配的百分比。

[0111] 相关氨基酸序列或核酸序列的同一性可以通过已知方法容易地计算。这些方法包括但不限于以下描述的那些:Lesk A.M.(1988).Computational molecular biology:Sources and methods for sequence analysis.New York,NY:Oxford University Press;Smith D.W.(1993).Biocomputing:Informatics and genome projects.San Diego,CA:Academic Press;Griffin A.M.&Griffin H.G.(1994).Computer analysis of

sequence data,Part 1.Totowa,NJ:Humana Press;von Heijne G.(1987).Sequence analysis in molecular biology:treasure trove or trivial pursuit.San Diego,CA:Academic press;Gribskov M.R.&Devereux J.(1991).Sequence analysis primer.New York,NY:Stockton Press;Carillo等,1988.SIAM J Appl Math.48(5):1073-82。

[0112] 设计用于确定同一性的优选方法以在测试的序列之间给出最大匹配。确定同一性的方法描述在公众可获得的计算机程序中。用于测定两个序列之间同一性的优选的计算机程序方法包括GCG程序包,包括GAP(Genetics Computer Group,University of Wisconsin,Madison,WI;Devereux等,1984.Nucleic Acids Res.12(1Pt 1):387-95)、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul等,1990.J Mol Biol.215(3):403-10)。BLASTX程序可从美国国家生物技术信息中心(NCBI)和其它来源(BLAST Manual,Altschul等NCB/NLM/NIH Bethesda,Md.20894)公开获得。也可使用熟知的Smith Waterman算法来确定同一性。

[0113] "免疫耐受性"

[0114] 本文所用的术语"免疫耐受性"涉及免疫系统对特定物质或组织无应答的状态,所述物质或组织具有引发免疫应答的能力,同时保持针对其它物质或组织的免疫应答。

[0115] "免疫应答"

[0116] 本文所用的术语"免疫应答"包括T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答。示例性的免疫应答包括但不限于T细胞应答(例如,细胞因子产生和细胞毒性),以及由T细胞活化间接影响的免疫应答(例如,巨噬细胞)。参与免疫应答的免疫细胞包括淋巴细胞(例如B细胞和T细胞,包括$CD4^+$、$CD8^+$、T_h1和T_h2细胞)、抗原呈递细胞(例如专职抗原呈递细胞,例如树突细胞)、自然杀伤细胞、骨髓细胞(例如巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞)。

[0117] "免疫特异性"、"特异于"或"特异性结合"

[0118] 如本文所用,如果抗体或其结合片段以可检测水平与抗原(例如SEQ ID NO:1)反应,优选以大于或等于约10^6M^{-1},优选大于或等于约10^7M^{-1}、10^8M^{-1}、$5\times10^8M^{-1}$、10^9M^{-1}、$5\times10^9M^{-1}$或更高的亲和常数(K_A),则称其为对所述抗原是"免疫特异性的"、"特异于"所述抗原或"特异性结合"所述抗原。

[0119] 抗体或其结合片段对其同源抗原的亲和力通常也表示为平衡解离常数(K_D)。如果抗体或其结合片段与抗原(例如SEQ ID NO:1)以可检测水平反应,优选以小于或等于$10^{-6}M$,优选小于或等于$10^{-7}M$、$5x10^{-8}M$、$10^{-8}M$、$5x10^{-9}M$、$10^{-9}M$或更小的K_D反应,则其被称为对所述抗原是"免疫特异性的"、"特异于"所述抗原或"特异性结合"所述抗原。

[0120] 抗体或其结合片段的亲和力可以使用常规技术容易地确定,例如Scatchard,1949.Ann NY Acad Sci.51:660-672所述的。抗体或其结合片段与抗原、细胞或组织的结合性质通常可以使用免疫检测方法来测定和评估,所述免疫检测方法包括例如ELISA、基于免疫荧光的测定,例如免疫组织化学(IHC)和/或荧光激活细胞分选(FACS)或通过表面等离子体共振(SPR,例如使用BIAcore®)。

[0121] "单克隆抗体"

[0122] 如本文所用,术语"单克隆抗体"指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即,群体中包含的各个抗体是相同的,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变。例如,单个抗体可以在其翻译后修饰方面变化,特别是在其糖基化结构或其等电点方面变化,但是都由

相同的重链和轻链序列编码,并且因此在任何翻译后修饰之前具有相同的蛋白质序列。然而,单克隆抗体组合物中存在的各个抗体之间可能存在与翻译后修饰(例如切割重链C-末端赖氨酸、天冬酰胺残基的脱酰胺作用和/或天冬氨酸残基的异构化)相关的蛋白质序列中的某些差异。

[0123] 单克隆抗体是高度特异性的、针对单一抗原位点。此外,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除了它们的特异性之外,单克隆抗体的优点在于它们可以在不被其它抗体污染的情况下合成。修饰语"单克隆"不应被解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明的单克隆抗体或其结合片段可以通过首先由Kohler等,1975.Nature.256(5517):495-7描述的杂交瘤方法制备,或者可以使用重组DNA方法在细菌、真核动物或植物细胞中制备(专利US4,816,567)。"单克隆抗体"也可以使用Clackson等,1991.Nature.352(6336):624-8和Marks等,1991.J Mol Biol.222(3):581-97中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离。

[0124] "单基因病"

[0125] 术语"单基因病",也称为"单基因病症",是指其中单个基因的修饰与受试者中的病症、疾病或病状相关的遗传病。尽管相对罕见,但单基因病影响全世界数百万人。科学家目前估计已知超过10,000种人类疾病是单基因病。纯遗传疾病是由人类DNA中的单个基因的单个错误引起的。疾病的性质取决于修饰基因所执行的功能。根据突变基因本身及其在一个或两个等位基因上的出现,单基因或单基因病可以分为六类:常染色体显性、常染色体隐性、X连锁显性、X连锁隐性、Y连锁和线粒体性。

[0126] 单基因病的一些实例包括但不限于,11-羟化酶缺陷;17,20-碳链酶缺陷;17-羟化酶缺陷;3-羟基异丁酸尿症(3-hydroxyisobutyrate aciduria);3-羟基类固醇脱氢酶缺陷;46,XY性腺发育不全(46,XY gonadal dysgenesis);AAA综合征;ABCA3缺陷;ABCC8相关高胰岛素血症(ABCC8-associated hyperinsulinism);无铜蓝蛋白血症(aceruloplasminemia);2型软骨发生不全(achondrogenesis type 2);肢端皮肤剥脱综合症(acral peeling skin syndrome);肠病性肢端皮炎;肾上腺皮质小节结增生(adrenocortical micronodular hyperplasia);肾上腺脑白质营养不良;肾上腺脊髓神经病(adrenomyeloneuropathies);Aicardi-Goutieres综合征;阿拉吉尔病(Alagille disease);阿尔佩斯综合征(Alpers syndrome);α-甘露糖苷贮积症;阿尔斯特雷姆综合征(Alstrom syndrome);阿尔茨海默病;釉质形成不全(amelogenesis imperfecta);阿米什型小头畸形(amish type microcephaly);肌萎缩性侧索硬化;anauxetic发育不良(anauxetic dysplasia);雄激素不敏感综合征(androgen insentivity syndrome);Antley-Bixler综合征(Antley-Bixler syndrome);APECED;阿佩尔综合征(Apert syndrome);泪腺和唾液腺不发育(aplasia of lacrimal and salivary glands);精氨酸血症;致心律失常性右心室发育不良(arrhythmogenic right ventricular dysplasia, ARVD2);Arts综合征(Arts syndrome);芳基硫酸酯酶缺陷型异染性脑白质营养不良(arylsulfatase deficiency type metachromatic leukodystrophy);运动失调性毛细血管扩张症(ataxia telangiectasia);自身免疫性淋巴增生综合征(autoimmune lymphoproliferative syndrome);1型自身免疫性多腺体综合征(autoimmune polyglandular syndrome type 1);常染色体显性缺汗性外胚层发育异常(autosomal

dominant anhidrotic ectodermal dysplasia);常染色体显性多囊肾病(autosomal dominant polycystic kidney disease);常染色体隐性小耳畸形(autosomal recessive microtia);常染色体隐性肾糖尿病(autosomal recessive renal glucosuria);常染色体内脏异位症(autosomal visceral heterotaxy);巴-比二氏综合征(Bardet-Biedl syndrome);巴特综合征(Bartter syndrome);基底细胞痣综合征;巴腾病(Batten disease);良性复发性肝内胆汁淤积症;β-甘露糖苷贮积症;Bethlem肌病(Bethlem myopathy);布-戴二氏贫血综合征(Blackfan-Diamond anemia);睑裂狭小症;拜勒疾病(Byler disease);C综合征;CADASIL综合征;氨甲酰磷酸合成酶缺陷症;心面皮肤综合征(cardiofaciocutaneous syndrome);卡尼三联症(Carney triad);肉碱棕榈酰转移酶缺陷症(carnitine palmitoyltransferase deficiencies);软骨-毛发发育不全(cartilage-hair hypoplasia);cblC型合并甲基丙二酸尿症(cblC type of combined methylmalonic aciduria);CD18缺陷症;CD3Z相关原发性T细胞免疫缺陷;CD40L缺陷症;CDAGS综合征;CDG1a;CDG1b;CDG1m;CDG2c;CEDNIK综合征;中央轴突病(central core disease);中央核性肌病(centronuclear myopathy);脑毛细血管畸形(cerebral capillary malformation);4型脑-眼-面-骨骼综合征(cerebrooculofacioskeletal syndrome type 4);脑-眼-gacio-骨骼综合征(cerebrooculogacioskeletal syndrome);脑腱性黄瘤病(cerebrotendinous xanthomatosis);CHARGE联合征(CHARGE association);巨颌症(cherubism);CHILD综合征(CHILD syndrome);慢性肉芽肿疾病;慢性复发性多灶性骨髓炎(chronic recurrent multifocal osteomyelitis);西特林蛋白缺乏症(citrin deficiency);经典血色沉着症(classic hemochromatosis);CNPPB综合征;钴胺素C病;科凯恩综合征(Cockayne syndrome);辅酶Q10缺陷症;科-勒二氏综合征(Coffin-Lowry syndrome);科恩综合征(Cohen syndrome);凝血因子V联合缺陷症(combined deficiency of coagulation factors V);常见可变免疫缺陷(common variable immune deficiency);完全雄激素不敏感(complete androgen insentivity);锥杆营养不良(cone rod dystrophies);构象性疾病(conformational diseases);1型先天性胆汁酸合成缺陷(congenital bile acid synthesis defect type 1);2型先天性胆汁酸合成缺陷;先天性红细胞生成性卟啉症;先天性全身性骨硬化症(congenital generalized osteosclerosis);Cornelia de Lange综合征(Cornelia de Lange syndrome);考森综合征(Cousin syndrome);考登病;环氧化酶缺乏症(COX deficiency);克-纳二氏病(Crigler-Najjar disease);1型克-纳二氏综合征(Crigler-Najjar syndrome type 1);Crisponi综合征(Crisponi syndrome);Currarino综合征(Currarino syndrome);Curth-Macklin型高起性鱼鳞病(Curth-Macklin type ichthyosis hystrix);皮肤松弛症;胱氨酸贮积症(cystinosis);d-2-羟基戊二酸尿症(d-2-hydroxyglutaric aciduria);DDP综合征;代-索二氏病(Dejerine-Sottas disease);Denys-Drash综合征(Denys-Drash syndrome);结蛋白心肌病;结蛋白肌病;DGUOK相关线粒体DNA消减(DGUOK-associated mitochondrial DNA depletion);谷氨酸代谢障碍(disorders of glutamate metabolism);5型远端脊髓性肌萎缩症(distal spinal muscular atrophy type 5);DNA修复疾病;显性视神经萎缩;Doyne蜂巢状视网膜营养不良(Doyne honeycomb retinal dystrophy);杜氏肌营养不良;先天性角化不良;4型Ehlers-Danlos综合征(Ehlers-Danlos

syndrome type 4);Ehlers-Danlos综合征;埃列贾德病(Elejalde disease);艾范二氏病(Ellis-van Creveld disease);Emery-Dreifus肌营养不良(Emery-Dreifuss muscular dystrophies);脑肌病mtDNA缺失综合征(encephalomyopathic mtDNA depletion syndrome);酶疾病;EPCAM相关先天性丛生性肠病(EPCAM-associated congenital tufting enteropathy);大疱性表皮松解症伴幽门闭锁症(epidermolysis bullosa with pyloric atresia);运动性低血糖(exercise-induced hypoglycemia);面肩肱型肌营养不良;费萨拉巴德组织细胞病(Faisalabad histiocytosis);家族性非典型分支杆菌病;家族性毛细血管畸形-动静脉畸形(familial capillary malformation-arteriovenous);家族性食管贲门失弛缓症;家族性舌静脉畸形(familial glomuvenous malformation);家族性噬血细胞性淋巴组织细胞增多症(familial hemophagocytic lymphohistiocytosis);家族性地中海热;家族性巨肾盏(familial megacalyces);家族性神经鞘瘤病(familial schwannomatosis);家族性脊柱裂;家族性脾脏无脾/发育不良(familial splenic asplenia/hypoplasia);家族性血栓性血小板减少性紫癜;范可尼病(Fanconi disease);费戈尔德综合征(Feingold syndrome);FENIB;进行性骨化性纤维发育不良;FKTN;Francois-Neetes斑点角膜营养不良(Francois-Neetens fleck corneal dystrophy);弗雷西尔综合征(Frasier syndrome);弗里德赖希共济失调;FTDP-17;岩藻糖苷贮积症;G6PD缺陷症;半乳糖唾液酸苷贮积症(galactosialidosis);加洛韦综合征(Galloway syndrome);加德纳综合征(Gardner syndrome);戈谢病;吉特曼综合征(Gitelman syndrome);GLUT-1缺陷症;1b型糖原贮积病;2型糖原贮积病;3型糖原贮积病;4型糖原贮积病;9a型糖原贮积病;糖原贮积病;GM1-神经节苷脂贮积症(GM1-gangliosidosis);格林伯格综合征(Greenberg syndrome);格雷格头多趾综合征(Greig cephalopolysyndactyly syndrome);毛发遗传病;HANAC综合征;斑色型先天性鱼鳞病(harlequin type ichtyosis congenita);HDR综合征;3型血色沉着病;4型血色沉着病;血友病A;3型遗传性血管性水肿;遗传性血管性水肿;遗传性出血性毛细血管扩张症;遗传性低纤维蛋白原血症;遗传性骨内血管畸形(hereditary intraosseous vascular malformation);遗传性平滑肌瘤和肾细胞癌(hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer);遗传性神经痛性肌萎缩(hereditary neuralgic amyotrophy);遗传性感觉和自主神经病型(hereditary sensory and autonomic neuropathy type);赫日曼斯基-普德兰克病(Hermansky-Pudlak disease);HHH综合征;HHT2;1型有汗性外胚层发育不良(hidrotic ectodermal dysplasia);有汗性外胚层发育不良;HNF4A-相关高胰岛素血症;HNPCC;人类免疫缺陷伴小头畸形(human immunodeficiency with microcephaly);亨廷顿病;高IgD综合征;高胰岛素血症-高氨血症综合征;视网膜色素上皮肥大(hypertrophy of the retinal pigment epithelium);软骨形成不足(hypochondrogenesis);少汗型外胚层发育不良;ICF综合征;特发性先天性假性肠梗阻(idiopathic congenital intestinal pseudo-obstruction);1型高IgM型免疫缺陷(immunodeficiency with hyper-IgM type 1);3型高IgM型免疫缺陷;4型高IgM型免疫缺陷;5型高IgM型免疫缺陷;先天性甲状腺激素生物合成错误(inborn errors of thyroid hormone biosynthesis);婴儿内脏肌病(infantile visceral myopathy);婴儿X连锁脊髓性肌萎缩;妊娠肝内胆汁淤积症;IPEX综合征;IRAK4缺陷症;孤立性先天性无脾症(isolated congenital asplenia);杰内综合征(Jeune syndrome);约-

布二氏综合征(Johanson-Blizzard syndrome);乔伯特综合征(Joubert syndrome);JP-HHT综合征;青少年血色病(juvenile hemochromatosis);青少年透明蛋白纤维瘤病(juvenile hyalin fibromatosis);青少年肾耗竭病(juvenile nephronophthisis);歌舞伎面具综合征(Kabuki mask syndrome);卡尔曼综合征(Kallmann syndromes);卡特金纳综合征(Kartagener syndrome);KCNJ11-相关高胰岛素血症;基-塞二氏综合征(Kearns-Sayre syndrome);科斯特曼病(Kostmann disease);科兹洛夫斯基型脊椎干骺端结构不良(Kozlowski type of spondylometaphyseal dysplasia);克拉伯病(Krabbe disease);LADD综合征;婴儿晚作性神经元蜡样脂褐质沉积(late infantile-onset neuronal ceroid lipofuscinosis);LCK缺陷症;LDHCP综合征;Legius综合征;Leigh综合征;致死性先天性挛缩综合征2型(lethal congenital contracture syndrome 2);致死性先天性挛缩综合征;3型致死性挛缩综合征;2型致死性新生儿CPT缺陷;致命性骨硬化性骨发育不良(lethal osteosclerotic bone dysplasia);LIG4综合征;1型无脑回畸形(lissencephaly);3型无脑回畸形;洛依斯-迪茨综合征(Loeys-Dietz syndrome);低磷脂相关胆石症;赖氨酸尿性蛋白耐受不良(lysinuric protein intolerance);马富奇综合征(Maffucci syndrome);马吉德综合征(Majeed syndrome);甘露糖结合蛋白缺陷症;马方病(Marfan disease);马歇尔综合征(Marshall syndrome);MASA综合征;MCAD缺陷症;麦-奥二氏综合征(McCune-Albright syndrome);MCKD2;美克尔综合征(Meckel syndrome);米斯曼角膜营养不良(Meesmann corneal dystrophy);巨膀胱-小结肠-肠蠕动不足(megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis);1型巨幼细胞性贫血;MEHMO;MELAS;梅-尼二氏综合征(Melnick-Needles syndrome);MEN2s;门克斯病(Menkes disease);异染性脑白质营养不良(metachromatic leukodystrophies);甲基丙二酸尿症(methylmalonic acidurias);甲基缬氨酸尿症(methylvalonic aciduria);小瞳孔-先天性肾病综合征(microcoria-congenital nephrosis syndrome);微绒毛萎缩(microvillous atrophy);线粒体性神经胃肠脑肌病(mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy);念珠状发(monilethrix);单体性X(monosomy X);镶嵌三体性9综合征(mosaic trisomy 9syndrome);Mowat-Wilson综合征(Mowat-Wilson syndrome);2型粘脂质累积症(mucolipidosis type 2);Ma型粘脂质累积症;IV型粘脂质累积症;粘多糖累积病(mucopolysaccharidoses);3A型粘多糖累积病;3C型粘多糖累积病;4B型粘多糖累积病;多微核病(multiminicore disease);多酰基辅酶A脱氢酶缺陷症(multiple acyl-CoA dehydrogenation deficiency);多发性皮肤和粘膜静脉畸形(multiple cutaneous and mucosal venous malformations);1型多发性内分泌瘤;多发性硫酸酯酶缺陷症;NAIC;指甲-髌骨综合征(nail-patella syndrome);线状体肌病(nemaline myopathies);新生儿糖尿病;新生儿表面活性剂缺陷(neonatal surfactant deficiency);肾消耗病(nephronophtisis);内瑟顿病(Netherton disease);神经纤维瘤病;1型神经纤维瘤病;尼曼-皮克病A型;尼曼-皮克病B型;尼曼-皮克病C型;NKX2E;努南综合征(Noonan syndrome);北美印第安儿童肝硬化(North American Indian childhood cirrhosis);NROB1复制关联DSD(NROB1 duplication-associated DSD);眼遗传疾病;眼耳综合征;OLEDAID;寡巨肾单位症(oligomeganephronia);寡巨肾单位症肾发育不全;奥利埃病(Ollier disease);奥-卡二氏综合征(Opitz-Kaveggia syndrome);口面指综合征1型

(orofaciodigital syndrome type 1);口面指综合征2型;骨佩吉特病(osseous Paget disease);耳腭指综合征2型;OXPHOS疾病;掌跖角化过度;全叶性肾母细胞瘤(panlobar nephroblastomatosis);帕-韦二氏综合征(Parkes-Weber syndrome);帕金森病;21q22.2-q22.3部分缺失;皮尔逊综合征;佩-梅二氏病(Pelizaeus-Merzbacher disease);潘德雷德综合征(Pendred syndrome);坎特雷尔五联症(pentalogy of Cantrell);过氧化物酶体酰基-CoA-氧化酶缺陷(peroxisomal acyl-CoA-oxidase deficiency);普-杰二氏综合征(Peutz-Jeghers syndrome);斐弗综合征(Pfeiffer syndrome);皮尔逊综合征(Pierson syndrome);色素结节性肾上腺皮质疾病(pigmented nodular adrenocortical disease);哌可酸血症(pipecolic acidemia);皮特-霍普金斯综合征(Pitt-Hopkins syndrome);缩醛磷脂缺陷(plasmalogens deficiency);胸膜肺母细胞瘤和囊性肾瘤(pleuropulmonary blastoma and cystic nephroma);多囊性脂膜骨发育不良(polycystic lipomembranous osteodysplasia);卟啉病;卵巢早衰;原发性红斑性肢痛病(primary erythermalgia);原发性血色素沉着症;原发性高草酸尿;进行性家族性肝内胆汁淤积;丙酸血症;丙酮酸脱羧酶缺乏症;RAPADILINO综合征;肾胱氨酸病(renal cystinosis);杆状瘤易感综合征(rhabdoid tumor predisposition syndrome);里格尔综合征(Rieger syndrome);4号环状染色体(ring chromosome 4);罗伯茨综合症(Roberts syndrome);Robinow-Sorauf综合征(Robinow-Sorauf syndrome);罗-汤二氏综合征(Rothmund-Thomson syndrome);SCID;塞-科二氏综合征(Saethre-Chotzen syndrome);Sandhoff病(Sandhoff disease);SC-短肢综合征(SC phocomelia syndrome);SCAS;申策尔短肢综合征(Schinzel phocomelia syndrome);短肋-多指畸形综合征1型;短肋-多指畸形综合征4型;短肋多指畸形综合征2型;短肋多指畸形综合征3型;施瓦赫曼病(Shwachman disease);施-戴二氏病(Shwachman-Diamond disease);镰状细胞贫血;塞尔沃-鲁塞尔综合征(Silver-Russell syndrome);辛普森-戈拉比-贝梅尔综合征(Simpson-Golabi-Behmel syndrome);史-伦-奥三氏综合征(Smith-Lemli-Opitz syndrome);SPG7相关遗传性痉挛性截瘫(SPG7-associated hereditary spastic paraplegia);球形细胞增多症(spherocytosis);手/脚裂畸形伴长骨缺损()split-hand/foot malformation with long bone deficiencies;脊椎肋骨发育不全(spondylocostal dysostosis);散发性内脏肌病伴包涵体(sporadic visceral myopathy with inclusion bodies);贮积病;STRA6相关综合征;泰-萨克斯病(Tay-Sachs disease);致死性发育不全(thanatophoric dysplasia);甲状腺代谢疾病;Tourette综合征(Tourette syndrome);转甲状腺素相关淀粉样变(transthyretin-associated amyloidosis);13三体;22三体;2p三体综合征;结节性硬化;丛生性肠病(tufting enteropathy);尿素循环疾病;范登恩德-古普塔综合征(Van Den Ende-Gupta syndrome);范德沃德综合征(Van der Woude syndrome);杂色嵌合非整倍性综合征(variegated mosaic aneuploidy syndrome);VLCAD缺陷;希林二氏病(von Hippel-Lindau disease);瓦登伯格综合征(Waardenburg syndrome);WAGR综合症;Walker-Warburg综合征(Walker-Warburg syndrome);维尔纳综合征(Werner syndrome);Wilson病(Wilson disease);沃尔科特-拉里森综合征(Wolcott-Rallison syndrome);Wolfram综合征(Wolfram syndrome);X连锁无丙种球蛋白血症;X连锁慢性特发性假性肠梗阻;X连锁腭裂伴结舌(X-linked cleft palate with ankyloglossia);X连锁显性点状软骨发育不良(X-linked dominant

chondrodysplasia punctata);X连锁外胚层发育异常;X-连锁Emery-Dreifuss肌营养不良(X-linked Emery-Dreifuss muscular dystrophy);X-连锁无脑回;X-连锁淋巴组织增生疾病;X-连锁内脏异位症;黄嘌呤尿1型;黄嘌呤尿2型;着色性干皮病;XPV;和泽韦格病(Zellweger disease)。

[0127] "受试者"

[0128] 如本文所用,术语"受试者"是指哺乳动物,优选人。在一个实施方案中,受试者可以是"患者",即温血动物,更优选人,其正在等待接受或正在接受医疗护理或曾经/正/将成为医疗程序的对象,或被监测疾病的发展。术语"哺乳动物"在这里指任何哺乳动物,包括人、家畜和农场动物,以及动物园动物、运动型动物或宠物动物,例如狗、猫、牛、马、绵羊、猪、山羊、兔等。优选地,哺乳动物是灵长类,更优选是人。

[0129] "治疗有效量"

[0130] 如本文所用,表述"治疗有效量"是指试剂(例如抗CD45RC抗体)的水平、量或浓度,其旨在(1)延迟或预防单基因病发作;(2)减缓或停止单基因病的一种或多种症状的进展、恶化或变坏;(3)改善单基因病的症状;(4)降低单基因病的严重性或发病率;或(5)治疗单基因病,而不对受试者造成显著的负面或不利副作用。治疗有效量可在单基因病发作前施用,用于预防性或防治性的作用。可选的或另外,治疗有效量可在单基因病开始后施用,以用于治疗作用。

[0131] "治疗"或"改善"

[0132] 如本文所用,术语"治疗"或"改善"是指治疗性和预防性(或防止的)措施;其中目的是减慢(或减轻)目标病理状况或病症。需要治疗的患者包括已经患有单基因病的患者以及怀疑患有单基因病的患者。如果在接受治疗有效量的试剂(例如抗CD45RC抗体)后,受试者显示可观察和/或可测量的以下降低或不存在以下一种或多种,则认为受试者的目标单基因病得到成功"治疗":$CD45RC^+$细胞数量的减少;$CD45RC^+$的总细胞的百分比降低;在一定程度上缓解(例如减少、改善、减轻或抑制)与单基因病相关的一种或多种症状;降低的发病率和死亡率;和/或改善的生活质量问题。用于评估单基因病的成功治疗和改善的上述参数可通过医生熟悉的常规方法容易地测量。

[0133] "可变区"或"可变结构域"

[0134] 如本文所用,术语"可变"是指可变结构域V_H和V_L的某些区域的序列在抗体之间差异非常大,并且用于每个特定抗体对其靶抗原的结合和特异性的事实。然而,变异性并非均匀分布于抗体的整个可变区。它集中在V_L结构域和V_H结构域中各自称为"高变环"的三个区段中,所述区段形成抗原结合位点的部分。

[0135] Vλ轻链结构域的第一、第二和第三高变环在本文称为L1(λ)、L2(λ)和L3(λ),并且可定义为包含V_L结构域中的残基24-33(L1(λ),由9、10或11个氨基酸残基组成)、49-53L2(λ),由3个残基组成)和90-96(L3(λ),由6个残基组成)(Morea等,2000.Methods.20(3):267-79)。

[0136] Vκ轻链结构域的第一、第二和第三高变环在此称为L1(κ)、L2(κ)和L3(κ),并且可以定义为包含VL结构域中的残基25-33(L1(κ),由6、7、8、11、12或13个残基组成)、49-53(L2(κ),由3个残基组成)和90-97(L3(κ),由6个残基组成)(Morea等,2000.Methods.20(3):267-79)。

[0137] V_H结构域的第一、第二和第三高变环在本文称为H1、H2和H3,并可定义为包含V_H结构域中的残基25-33(H1,由7、8或9个残基组成)、52-56(H2,由3或4个残基组成)和91-105(H3,长度高度可变)(Morea等,2000.Methods.20(3):267-79)。

[0138] 除非另有说明,术语L1、L2和L3分别指V_L结构域的第一、第二和第三高变环,并包括从Vκ和Vλ同种型获得的高变环。术语H1、H2和H3分别指V_H结构域的第一、第二和第三高变环,并包括从任何已知重链同种型,包括γ(gamma)、μ(mu)、α(alpha)、δ(delta)或ε(epsilon)获得的高变环。高变环L1、L2、L3、H1、H2和H3可以各自包含如上文定义的"互补决定区"或"CDR"的一部分。

[0139] 发明详述

[0140] 本发明涉及抗CD45RC抗体或其结合片段,其用于预防和/或治疗单基因病。

[0141] 在一个实施方案中,分离根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段。如本文所用,针对抗体或其结合片段的术语"分离的"是指所述抗体或其结合片段基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体或结合片段(例如,特异性结合CD45RC的分离的抗体基本上不含特异性结合除CD45RC之外的抗原的抗体)。然而,特异性结合来自一个物种的CD45RC的分离的抗体可具有与其它抗原,如来自其它物种的CD45RC的交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其它细胞物质和/或化学物质,特别是那些将干扰抗体的诊断或治疗用途的物质,包括但不限于酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质组分。

[0142] 在一个实施方案中,纯化根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段。在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段纯化至:

[0143] (1)通过Lowry方法测定的大于80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%重量或更高的抗体或其结合片段,并且最优选大于96%、97%、98%或99%重量;

[0144] (2)足以通过使用转杯测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或

[0145] (3)如在还原或非还原条件下的SDS-PAGE并使用考马斯蓝或优选银染色所示的均一性。

[0146] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合CD45RC。在一个实施方案中,根据本发明使用的抗体或其结合片段结合人CD45RC(hCD45RC)。

[0147] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合由hCD45RC的外显子6编码的C决定簇。在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合由hCD45RC的外显子6编码的C决定簇上的至少一个表位。

[0148] 在一个实施方案中,由hCD45RC外显子6编码的C决定簇的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1或由其组成,在一个实施方案中,编码hCD45RC的C决定簇的外显子6的核酸序列包含SEQ ID NO:2或由其组成。

[0149]

SEQ ID NO: 1

DVPGERSTASTFPTDPVSPLTTTLSLAHHSSAALPARTSNTTITANTS

SEQ ID NO: 2

GATGTCCCAGGAGAGAGGAGTACAGCCAGCACCTTTCCTACAGACCC
AGTTTCCCCATTGACAACCACCCTCAGCCTTGCACACCACAGCTCTGCT
GCCTTACCTGCACGCACCTCCAACACCACCATCACAGCGAACACCTCA

[0150] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合至少一种包含SEQ ID NO:1或其片段或由其组成的表位。

[0151] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合至少一个表位,所述表位包含与SEQ ID NO:1或其片段共享至少约70%,优选至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列或由其组成。

[0152] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合至少一种由包含SEQ ID NO:2或其片段或由其组成的核酸序列编码的表位。

[0153] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合至少一种由核酸序列编码的表位,所述核酸序列包含与SEQ ID NO:2或其片段共享至少约70%,优选至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列或由其组成。

[0154] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合至少一种表位,所述表位包含SEQ ID NO:1或其片段的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46或47个氨基酸或由其组成;或与SEQ ID NO:1或其片段具有至少约70%,优选至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列。

[0155] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合至少一种表位,所述表位包含SEQ ID NO:1或其片段的至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46或47个连续氨基酸或由其组成;或与SEQ ID NO:1或其片段具有至少约70%,优选至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列。

[0156] 在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:1或由其组成的至少一个表位的片段包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46或47个氨基酸残基或由其组成。

[0157] 在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:1或由其组成的至少一个表位的片段包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46或47个氨基酸残基或由其组成,

所述氨基酸残基遍布包含SEQ ID NO:1或由SEQ ID NO:1组成的序列的10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、73、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900,910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000、1010、1020、1030、1040、1050、1060、1070、1080、1090、1100或更多个的连续氨基酸残基。

[0158] 在一个实施方案中,包含SEQ ID NO:1的序列是SEQ ID NO:3,对应于UniProt登录号P08575-3(版本3,2018年3月28日修改过-checksum:6E942E2BF6B17AC5),或与SEQ ID NO:3共享至少约70%,优选至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的序列。

[0159]

SEQ ID NO: 3

MTMYLWLKLLAFGFAFLDTEVFVTGQSPTPSPTGLTTAKMPSVPLSSDPL
PTHTTAFSPASTFERENDFSETTTSLSPDNTSTQVSPDSLDNASAFNTTGVS
SVQTPHLPTHADSQTPSAGTDTQTFSGSAANAKLNPTPGSNAISDVPGERS
TASTFPTDPVSPLTTTLSLAHHSSAALPARTSNTTITANTSDAYLNASETTT
LSPSGSAVISTTTIATTPSKPTCDEKYANITVDYLYNKETKLFTAKLNVNE
NVECGNNTCTNNEVHNLTECKNASVSISHNSCTAPDKTLILDVPPGVEKF
QLHDCTQVEKADTTICLKWKNIETFTCDTQNITYRFQCGNMIFDNKEIKLE
NLEPEHEYKCDSEILYNNHKFTNASKIIKTDFGSPGEPQIIFCRSEAAHQGVI
TWNPPQRSFHNFTLCYIKETEKDCLNLDKNLIKYDLQNLKPYTKYVLSLH
AYIIAKVQRNGSAAMCHFTTKSAPPSQVWNMTVSMTSDNSMHVKCRPPR
DRNGPHERYHLEVEAGNTLVRNESHKNCDFRVKDLQYSTDYTFKAYFHN
GDYPGEPFILHHSTSYNSKALIAFLAFLIIVTSIALLVVLYKIYDLHKKRSCN
LDEQQELVERDDEKQLMNVEPIHADILLETYKRKIADEGRLFLAEFQSIPR
VFSKFPIKEARKPFNQNKNRYVDILPYDYNRVELSEINGDAGSNYINASYI
DGFKEPRKYIAAQGPRDETVDDFWRMIWEQKATVIVMVTRCEEGNRNK
CAEYWPSMEEGTRAFGDVVVKINQHKRCPDYIIQKLNIVNKKEKATGRE
VTHIQFTSWPDHGVPEDPHLLLKLRRRVNAFSNFFSGPIVVHCSAGVGRT
GTYIGIDAMLEGLEAENKVDVYGYVVKLRRQRCLMVQVEAQYILIHQAL
VEYNQFGETEVNLSELHPYLHNMKKRDPPSEPSPLEAEFQRLPSYRSWRT
QHIGNQEENKSKNRNSNVIPYDYNRVPLKHELEMSKESEHDSDESSDDDS
DSEEPSKYINASFIMSYWKPEVMIAAQGPLKETIGDFWQMIFQRKVKVIV
MLTELKHGDQEICAQYWGEGKQTYGDIEVDLKDTDKSSTYTLRVFELRH
SKRKDSRTVYQYQYTNWSVEQLPAEPKELISMIQVVKQKLPQKNSSEGN
KHHKSTPLLIHCRDGSQQTGIFCALLNLLESAETEEVVDIFQVVKALRKAR
PGMVSTFEQYQFLYDVIASTYPAQNGQVKKNNHQEDKIEFDNEVDKVKQ
DANCVNPLGAPEKLPEAKEQAEGSEPTSGTEGPEHSVNGPASPALNQGS

[0160] 在一个实施方案中,所述至少一个表位是构象表位。在另一个实施方案中,所述至少一个表位是连续表位。

[0161] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段结合hCD45RC的平衡解离常数(K_d)为约$5x10^{-7}$M或更低,优选约$2.5x10^{-7}$M或更低,约$1x10^{-7}$M或更低,约$7.5x10^{-8}$M或更低,约$5x10^{-8}$M或更低,约$1x10^{-8}$M或更低。

[0162] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段与hCD45RC结合的结合速率(K_{on})为约$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$或更高,优选约$5\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$或更高,约$1\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$或更高,约$2.5\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$或更高,约$5\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$或更高。

[0163] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段与hCD45RC结合的解离速率(k_{off})为约$5x10^{-2}sec^{-1}$或更低,优选约$4x10^{-2}sec^{-1}$或更低,约$3x10^{-2}sec^{-1}$或更低,约$2x10^{-2}sec^{-1}$或更低,约$1.5x10^{-2}sec^{-1}$或更低。

[0164] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体或其结合片段以以下方式中的至少一种、优选以以下方式中的至少两种、更优选以以下方式中的三种与hCD45RC结合:

[0165] -平衡解离常数(K_d)为约$5\times10^{-7}M$或更低,优选约$2.5\times10^{-7}M$或更低,约$1\times10^{-7}M$或更低,约$7.5\times10^{-8}M$或更低,约$5\times10^{-8}M$或更低,约$1\times10^{-8}M$或更低;

[0166] -结合速率(K_{on})为约$1\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$或更高,优选约$5\times10^{4}M^{-1}sec^{-1}$或更高,约$1\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$或更高,约$2.5\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$或更高,约$5\times10^{5}M^{-1}sec^{-1}$或更高;以及

[0167] -解离速率(k_{off})为约$5\times10^{-2}sec^{-1}$或更低,优选约$4\times10^{-2}sec^{-1}$或更低、约$3\times10^{-2}sec^{-1}$或更低、约$2\times10^{-2}sec^{-1}$或更低、约$1.5\times10^{-2}sec^{-1}$或更低。

[0168] 用于测定抗体或其结合片段对其配体的亲和力(包括例如测定K_d、K_{off}和K_{on})的方法是本领域公知的,并且包括但不限于表面等离子体共振(SPR)、荧光激活细胞分选(FACS)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、AlphaLISA和KinExA。

[0169] 优选的方法是BIAcore®,其依赖于SPR,使用固定化的CD45RC来测定抗体或其结合片段的亲和力。实施该方法的方式将在实施例部分中进一步阐述。

[0170] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗体或其结合片段是多克隆抗体或其结合片段。

[0171] 在一个优选的实施方案中,根据本发明使用的抗体或其结合片段是单克隆抗体或其结合片段。

[0172] 可根据已知方法,通过施用给宿主动物合适的抗原或表位(如SEQ IDNO:1的肽)获得抗CD45RC的抗体,所述宿主动物选自例如大鼠、猪、牛、马、兔、山羊、绵羊、骆驼科(骆驼、单峰骆驼、美洲驼)和小鼠等。本领域已知的各种佐剂可用于增强抗体产生。生产和分离的技术包括但不限于杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术和EBV杂交瘤技术。或者,可以采用产生单链抗体的技术(例如,美国专利4,946,778中公开的)来产生针对CD45RC的单链抗体。

[0173] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗体是嵌合抗体或双特异性抗体或人源化抗体或完全人抗体或抗体片段或其衍生物。实际上,这提供了避免患者对所施用抗体的免疫反应的可能性。

[0174] 抗体的"衍生物"是指由支持肽和原始抗体的至少一个CDR形成的结合蛋白,保留了其特异性识别抗原如CD45RC,特别是SEQ ID NO:1的能力。

[0175] 可变结构域参与抗原识别,而恒定结构域参与抗体的生物学、药代动力学和效应子性质。与序列从一种抗体到另一种抗体强烈变化的可变结构域不同,恒定结构域的特征在于氨基酸序列从一种抗体到另一种抗体非常接近,其在物种和同种型中是典型的,任选地具有一些体细胞突变。

[0176] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗体是多特异性抗体,其包含针对CDR45RC的第一抗原结合位点和针对效应细胞的至少一个第二抗原结合位点,所述效应细胞能够通过直接结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性吞噬作用介导$TCD45RC^{高}$细胞的消减。

[0177] 在所述实施方案中,第二抗原结合位点用于募集杀伤机制,例如通过结合人效应

细胞上的抗原。在一些实施方案中,效应细胞能够诱导ADCC,例如天然杀伤细胞。例如,表达FcR的单核细胞、巨噬细胞参与特异性杀伤靶细胞并将抗原呈递给免疫系统的其它组分。在一些实施方案中,效应细胞可吞噬靶抗原或靶细胞。效应细胞上特定FcR的表达可由体液因子如细胞因子调节。效应细胞可吞噬靶抗原或吞噬或裂解靶细胞。合适的细胞毒性剂和第二治疗剂在下文示例,并且包括毒素(例如放射性标记的肽)、化疗剂和前药。在一些实施方案中,第二结合位点结合如上定义的Fc受体。在一些实施方案中,第二结合位点结合NK细胞的表面分子,使得所述细胞可以被活化。在一些实施方案中,第二结合位点结合NKp46。

[0178] 本发明的多特异性抗体分子的示例性形式包括但不限于

[0179] (i)通过化学杂缀合交联的两种抗体,一种对ILC的特异性表面分子具有特异性,另一种对第二抗原具有特异性;

[0180] (ii)包含两个不同抗原结合区的单一抗体;

[0181] (iii)包含两个不同的抗原结合区的单链抗体,例如通过额外的肽接头串联连接的两个scFv;

[0182] (iv)双可变域抗体(DVD-Ig),其中每条轻链和重链含有通过短肽连接而串联的两个可变结构域;

[0183] (v)化学连接的双特异性(Fab')2片段;

[0184] (vi)Tandab,其是两个单链双抗体的融合物,产生针对每种靶抗原具有两个结合位点的四价双特异性抗体;

[0185] (vii)柔性体(flexibody),其是scFv与双抗体的组合,产生多价分子;

[0186] (viii)所谓的"停靠锁定"(dock and lock)分子,其基于蛋白激酶A中的"二聚化和停靠结构域",当应用于Fab时,其可产生由两个相同Fab片段与不同Fab片段连接组成的三价双特异性结合蛋白;

[0187] (ix)所谓的Scorpion分子,其包含例如与人Fab臂的两个末端融合的两个scFv;以及

[0188] (x)双抗体。

[0189] 双特异性抗体的另一种示例性形式是具有互补C_H3结构域以迫使异二聚化的IgG样分子。这些分子可以使用已知技术制备,例如已知为Triomab/Quadoma(Trion Pharma/Fresenius Biotech)、顶球入孔(Knob-into-Hole,Genentech)、CrossMAb(Roche)和静电匹配的(Amgen)、LUZ-Y(Genentech)、链交换工程化结构域体(SEEDbody)(EMD Serono)、Biclonic(Merus)和DuoBody(Genemab A/S)技术的那些。

[0190] 在一些实施方案中,双特异性抗体通过受控的Fab臂交换获得或可获得,通常使用DuoBody®技术。通过受控Fab臂交换产生双特异性抗体的体外方法已描述于WO2008119353和WO2011131746(均为Genmab A/S)。

[0191] 在WO2008119353中描述的一个示例性方法中,通过在还原条件下孵育,两个单特异性抗体之间的"Fab臂"或"半分子"交换(重链和连接的轻链的交换)形成双特异性抗体,所述两个单特异性抗体均包含IgG4样C_H3区。所得产物是具有两个Fab臂的双特异性抗体,所述Fab臂可包含不同序列。

[0192] 在WO2011131746中所述的另一个示例性方法中,通过包括以下步骤的方法制备双特异性抗体,其中第一和第二抗体中的至少一种是本发明的人单克隆抗体:

[0193] a)提供包含免疫球蛋白的Fc区的第一抗体,所述Fc区包含第一C_H3区;

[0194] b)提供包含免疫球蛋白的Fc区的第二抗体,所述Fc区包含第二C_H3区;

[0195] 其中所述第一和第二C_H3区的序列不同,且使得所述第一和第二C_H3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一和第二C_H3区的各自的同二聚体相互作用;

[0196] c)在还原条件下将所述第一抗体与所述第二抗体一起孵育;以及

[0197] d)获得所述双特异性抗体,其中第一抗体是本发明的人单克隆抗体,并且第二抗体具有不同的结合特异性,或反之亦然。

[0198] 还原条件可以例如通过加入还原剂来提供,所述还原剂例如选自2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦。步骤d)可以进一步包括恢复条件以变成非还原或较少还原,例如通过除去还原剂,例如通过脱盐。优选地,第一和第二C_H3区的序列是不同的,仅包含几个相当保守的不对称突变,使得所述第一和第二C_H3区之间的异二聚体相互作用强于所述第一和第二C_H3区的各自的同二聚体相互作用。关于这些相互作用以及它们如何实现的更多细节在WO2011131746中提供,其通过引用整体并入本文。

[0199] 以下是此类不对称突变的组合的示例性实施方案,任选地,其中一个或两个Fc区是IgG1同种型。在一些实施方案中,第一Fc区具有在选自下组的位置处的氨基酸取代:366、368、370、399、405、407和409,并且所述第二Fc区具有在选自下组的位置处的氨基酸取代:366、368、370、399、405、407和409,并且其中所述第一和第二Fc区不在相同位置取代。在一些实施方案中,第一Fc区具有在405位的氨基酸取代,并且所述第二Fc区具有在选自下组的位置的氨基酸取代:366、368、370、399、407和409,任选409。在一些实施方案中,第一Fc区具有在409位的氨基酸取代,并且所述第二Fc区具有在选自下组的位置的氨基酸取代:366、368、370、399、405和407,任选405或368。在一些实施方案中,第一和第二Fc区都是IgG1同种型,其中第一Fc区在405位具有Leu,并且第二Fc区在409位具有Arg。这些根据Kabat编号表示的点突变是本领域技术人员熟知的,因为它们公开于几个专利申请中,例如WO2016091891。

[0200] 抗体可以是几种同种型,取决于它们的恒定区的性质:恒定区γ、α、μ、ε和δ分别对应于IgG、IgA、IgM、IgE和IgD免疫球蛋白。

[0201] 在一个实施方案中,根据本发明使用的单克隆抗体是IgG。特别地,IgG同种型在最大数量的个体(人)中显示产生ADCC和/或CDC活性的能力。γ恒定区包括几种亚型:γ1、γ2、γ3(这三种类型的恒定区具有结合人补体的特性)和γ4,从而产生亚同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。在一个实施方案中,根据本发明的单克隆抗体是同种型IgG1或IgG3,优选IgG1。单克隆抗体可以通过本领域技术人员熟知的技术由细胞克隆、非人转基因动物或转基因植物产生。

[0202] 在备选的实施方案中,根据本发明使用的单克隆抗体不包含Fc片段。特别地,缺少或丧失Fc片段的抗体不产生ADCC或CDC活性。当其使用不依赖于ADCC和/或CDC时,这种抗体特别适合。

[0203] 抗CD45RC抗体的合适实例已描述于WO2016016442中,其内容通过引用全部具体地并入本文。

[0204] 抗CD45RC单克隆抗体的其它合适的实例是本领域技术人员公知的,并且包括商业化的抗体。这些抗体的实例包括但不限于小鼠单克隆抗体OX-22(抗-大鼠CD45RC)、OX-32

(抗-大鼠CD45RC)、3H1437(抗-小鼠/大鼠/人CD45RC)、MT2(抗-人CD45RC)和RP1/12(抗-人CD45RC)或其衍生物,以及大鼠单克隆抗体DNL1.9(抗-小鼠CD45RC)和C455.1F(抗-小鼠CD45RC)。这些单克隆抗体是本领域技术人员公知的,并且由几个公司出售(Spickett等,1983.J Exp Med.158(3):795-810)。

[0205] 在一个具体实施方案中,根据本发明使用的抗CDR45RC抗体是单克隆抗体OX-22、OX-32、3H1437、MT2、RP1/12、DNL1.9、C455.1F或其衍生物。这些单克隆抗体是本领域技术人员公知的,并且由几个公司出售。

[0206] 针对单克隆抗体的表述"其衍生物"是指抗CD45RC抗体,其特异性结合CD45RC,优选结合人CD45RC,且其包含所述单克隆抗体的6个CDR。在一个实施方案中,"其衍生物"是包含所述单克隆抗体的VL链和VH链的抗体。在另一个实施方案中,"其衍生物"是嵌合抗体或人源化抗体,其包含所述单克隆抗体的可变结构域。

[0207] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体可以被修饰以增强抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性吞噬作用。这类修饰在本领域中是公知的。

[0208] 例如,已知包含低岩藻糖含量的抗体通过Fcγ RIII受体增强ADCC应答(国际专利公开WO2014140322)。因此,根据本发明的抗体可以包含低岩藻糖含量。

[0209] 本文所用的术语"岩藻糖含量"是指与各抗体的各重链的Fc片段的N297残基连接的N-聚糖中岩藻糖基化形式的百分比。

[0210] 如本文所用,术语"低岩藻糖含量"是指岩藻糖含量小于或等于65%。有利地,岩藻糖含量小于或等于65%,优选小于或等于60%、55%或50%,或甚至小于或等于45%、40%、35%、30%、25%或20%。然而,岩藻糖含量不必为零,并且其可以例如大于或等于5%、3510%、15%或20%。

[0211] 在一个实施方案中,根据本发明的抗体可进一步包含不同类型的糖基化(低聚甘露糖或双触角复合型的N-聚糖,在双触角复合型的N-聚糖的情况下具有可变比例的二等分N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)残基或半乳糖残基),条件是它们具有低岩藻糖含量(国际专利公开WO2007048077)。例如,具有轻微岩藻糖基化的N-聚糖的抗体可以如欧洲专利公开1176195或国际专利公开WO2001077181或WO2012041768中所述获得。

[0212] 与双触角复合型N-聚糖相比,低聚甘露糖型N-聚糖在体内具有降低的半衰期。因此,有利地,根据本发明的抗体在Fc片段的N-糖基化位点上具有上述定义的具有低岩藻糖含量的双触角复合型聚糖结构。

[0213] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体与治疗部分即药物缀合。在一个实施方案中,治疗部分选自细胞毒素、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽和放射性同位素。这类缀合物在本文中称为"抗体药物缀合物"或"ADC"。

[0214] 在一些实施方案中,本发明的抗体与细胞毒性部分缀合。在一个实施方案中,细胞毒性部分选自紫杉醇;细胞松弛素B;短杆菌肽D;溴化乙锭;吐根碱;丝裂霉素;依托泊苷;替诺泊苷;长春新碱;长春碱;秋水仙素;多柔比星;柔红霉素;二羟蒽醌二酮;微管蛋白抑制剂(例如美坦辛或其类似物或衍生物);抗有丝分裂剂(例如,单甲基奥利斯他汀(auristatin)E或F或其类似物或衍生物);多拉司他汀或其类似物;伊立替康或其类似物;米托蒽醌;光神霉素;放线菌素D;1-去氢睾酮;糖皮质激素;普鲁卡因;丁卡因;利多卡因;普萘洛尔;嘌呤霉

素;卡奇霉素(calicheamicin)或其类似物或衍生物;抗代谢物(例如甲氨蝶呤、巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、去卡巴嗪、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨);烷化剂(例如,二氯甲基二乙胺、thioepa、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀、洛莫司汀、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、达卡巴嗪、丙卡巴肼或丝裂霉素C);铂衍生物(例如顺铂或卡铂);多卡霉素(duocarmycin)A、多卡霉素SA、拉奇霉素(rachelmycin)或其类似物或衍生物;抗生素(例如更生霉素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素或氨茴霉素);吡咯并[2,1-c][1,4]-苯二氮卓类;白喉毒素及相关分子(例如白喉A链及其活性片段和杂合分子,蓖麻毒素如蓖麻毒素A或去糖基化蓖麻毒素A链毒素,霍乱毒素,志贺样毒素如SLT I、SLT II、SLT IIV、LT毒素、C3毒素、志贺毒素,百日咳毒素,破伤风毒素,大豆Bowman-Birk蛋白酶抑制剂,假单胞菌外毒素,芦荟素,皂草素,蒴莲根毒素(modeccin),格拉宁素(gelanin),相思豆毒蛋白A链,蒴莲根毒素A链,alphasarconis,油桐蛋白,石竹素(dianthin)蛋白,美洲商陆蛋白如PAPI、PAPII和PAP-S,苦瓜抑制剂,麻疯树毒蛋白,巴豆毒蛋白,肥皂草(sapanaria officinalis)抑制剂,白树毒素(gelonin),迈托毒素(mitogellin),局限曲霉素(restrictocin),酚霉素和依诺霉素毒素);核糖核酸酶;DNase I;葡萄球菌肠毒素A;美洲商陆抗病毒蛋白;白喉毒素;和假单胞菌内毒素。

[0215] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体与奥利斯他汀或其肽类似物、衍生物或前药缀合。已显示,奥利斯他汀干扰微管动力学、GTP水解以及核与细胞分裂(Woyke等,2001.Antimicrob Agents Chemother.46(12):3802-8),并具有抗癌(美国专利号5,663,149)和抗真菌活性(Pettit等,1998.AntimicrobAgents Chemother.42(11):2961-5)。例如,奥利斯他汀E可与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰戊酸反应,分别产生AEB和AEVB。其它典型的奥利斯他汀衍生物包括AFP、MMAF(单甲基奥利斯他汀F)和MMAE(单甲基奥利斯他汀E)。合适的奥利斯他汀和奥利斯他汀类似物、衍生物和前药,以及用于将奥利斯他汀与抗体缀合的合适接头描述于例如美国专利号5,635,483、5,780,588和6,214,345,以及国际专利公开WO2002088172、WO2004010957、WO2005081711、WO2005084390、WO2006132670、WO2003026577、WO200700860、WO2007011968和WO2005082023中。

[0216] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮卓(PDB)或其类似物、衍生物或前药缀合。合适的PDB和PDB衍生物以及相关技术在本领域中已经描述。

[0217] 在一些实施方案中,根据本发明的抗体与细胞毒性部分缀合,所述细胞毒性部分选自蒽环类抗生素、美坦辛(maytansine)、卡奇霉素、多卡霉素、雷奇霉素(CC-1065)、多拉司他汀10、多拉司他汀15、伊立替康、单甲基多拉司他汀E、单甲基多拉司他汀F、PDB或其类似物、衍生物或前药。

[0218] 在一些实施方案中,本发明的抗体与蒽环类抗生素或其类似物、衍生物或前药缀合。

[0219] 在一些实施方案中,本发明的抗体与美坦辛或其类似物、衍生物或前药缀合。

[0220] 在一些实施方案中,本发明的抗体与卡奇霉素或其类似物、衍生物或前药缀合。

[0221] 在一些实施方案中,本发明的抗体与多卡霉素或其类似物、衍生物或前药缀合。

[0222] 在一些实施方案中,本发明的抗体与雷奇霉素(CC-1065)或其类似物、衍生物或前

药缀合。

[0223] 在一些实施方案中,本发明的抗体与多拉司他汀或其类似物、衍生物或前药缀合。

[0224] 在一些实施方案中,本发明的抗体与单甲基奥利斯他汀E或其类似物、衍生物或前药缀合。

[0225] 在一些实施方案中,本发明的抗体与单甲基奥利斯他汀F或其类似物、衍生物或前药缀合。

[0226] 在一些实施方案中,本发明的抗体与伊立替康或其类似物、衍生物或前药缀合。

[0227] 用于将分子与抗体缀合的技术是本领域公知的(参见,例如,Arnon,1985.In Reisfeld&Sell,Monoclonal antibodies and cancer therapy(Vol.27,UCLA symposia on molecular and cellular biology,pp.243-256).New York,NY:Alan R.Liss;和PCT公布WO1989012624)。通常,核酸分子分别通过N-羟基琥珀酰亚胺酯或马来酰亚胺官能团与抗体上的赖氨酸或半胱氨酸共价连接。已报道使用工程化半胱氨酸缀合或引入非天然氨基酸的方法来改善缀合物的同质性。Junutula等(2008.J Immunol Methods.332(1-2):41-52)开发了称为"THIOMABs"(TDC)的基于半胱氨酸的位点特异性缀合,据称与常规缀合方法相比,其显示改善的治疗指数。还正在探究与已引入抗体中的非天然氨基酸的缀合,用于ADC;然而,还没有建立该方法的通用性。特别地,本领域技术人员也可以设想用含有酰基供体谷氨酰胺的标签(例如,含有Gin的肽标签或Q标签)或内源谷氨酰胺工程改造的含有Fc的多肽,其通过多肽工程改造(例如,通过多肽上的氨基酸缺失、插入、取代或突变)而具有反应性。然后,转谷氨酰胺酶与胺供体剂(例如包含反应性胺或与反应性胺连接的小分子)共价交联以形成工程化的含Fc多肽缀合物的稳定且均质群,其中胺供体剂通过含酰基供体谷氨酰胺的标签或易接近/暴露/反应性内源谷氨酰胺位点特异性地缀合至含Fc多肽(参见例如WO2012059882)。

[0228] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体用于预防和/或治疗单基因病。

[0229] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体用于预防和/或治疗单基因病,所述单基因病涉及与免疫功能无关但其缺陷与炎症和/或免疫反应相关的基因。

[0230] 涉及与免疫功能无关但其缺陷与炎症和/或免疫反应相关的基因的这种单基因病的实例包括但不限于杜氏肌营养不良(DMD)、囊性纤维化、溶酶体贮积病和α1-抗胰蛋白酶缺陷。

[0231] 在一个实施方案中,涉及与免疫功能无关但其缺陷与炎症和/或免疫反应相关的基因的单基因病是DMD。

[0232] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体用于预防和/或治疗单基因病,所述单基因病涉及参与免疫系统且其缺陷产生炎症和/或自身免疫反应的基因。

[0233] 这类涉及参与免疫系统且其缺陷产生炎症和/或自身免疫反应的基因的单基因病的实例包括但不限于,T细胞原发性免疫缺陷(例如免疫失调-多发性内分泌腺病-肠病-X连锁综合征[IPEX]和自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良[APECED])、B细胞原发性免疫缺陷、穆-韦二氏综合征、混合性自身炎症和自身免疫综合征、NLRP12相关的遗传性周期性发热综合征和肿瘤坏死因子受体1相关的周期性综合征。

[0234] 在一个实施方案中,涉及参与免疫系统且其缺陷产生炎症和/或自身免疫反应的

基因的单基因病是APECED。

[0235] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体用于预防和/或治疗单基因病,所述单基因病选自涉及以下的疾病:

[0236] -与免疫功能无关但其缺陷与炎症和/或免疫反应相关的基因,例如在以下疾病中有缺陷的基因:杜氏肌营养不良(DMD)、囊性纤维化、溶酶体病和α1-抗胰蛋白酶缺陷;和/或

[0237] -参与免疫系统并且其缺陷产生炎症和/或自身免疫反应的基因,例如以下疾病中有缺陷的基因:免疫失调-多发性内分泌腺病-肠病-X连锁综合征[IPEX]和自身免疫性多发性内分泌病-念珠菌病-外胚层营养不良[APECED])、B细胞原发性免疫缺陷、穆-韦二氏综合征、混合性自身炎症和自身免疫综合征、NLRP12相关的遗传性周期性发热综合征和肿瘤坏死因子受体1相关的周期性综合征。

[0238] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体用于预防和/或治疗DMD和/或APECED。

[0239] 在另一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体用于减少、改善、减轻或抑制与单基因病相关的症状和/或体征。

[0240] 与自身免疫应答和/或炎症所涉及的单基因病相关的症状和体征包括但不限于体重减轻、虚弱、疲劳、低烧、肌肉疼痛、关节疼痛、腹泻、糖尿病、激素改变、脱发、皮肤脱色素和具有淋巴细胞浸润的不同组织的组织结构恶化。

[0241] 特别地,已经显示单基因症状与几种分子失调有关,包括但不限于$CD45RC^{+}$细胞(特别是T $CD45RC^{+}$细胞)的频率增加,$CD45RC^{-}$细胞(特别是T、B和NK $CD45RC^{-}$细胞)的频率降低,T $CD4^{+}$和$CD8^{+}$效应细胞的频率增加,和$FoxP3^{+}T_{reg}$的降低。

[0242] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗体在受试者中诱导免疫耐受。在一些实施方案中,根据本发明使用的抗体在受试者中诱导免疫耐受。

[0243] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗体介导以高或中等水平表达CD45RC的T细胞的消减。

[0244] CD45RC的相对表达水平可使用技术人员已知的技术测量,包括但不限于细胞荧光术。可以区分三种类型的细胞:CD45RC表达表现出高水平($CD45RC^{高}$)、中间水平($CD45RC^{int}$)和阴性水平($CD45RC^{neg}$)的细胞,如图9所示。如本文所用,命名为"$CD45RC^{+}$"的细胞包括$CD45RC^{高}$和$CD45RC^{int}$细胞。

[0245] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体为消减T$CD45RC^{高}$细胞的抗CD45RC抗体。T $CD45RC^{高}$细胞是如上定义的大量表达CD45RC标记($CD45RC^{+}$)的T淋巴细胞。应当理解,所述消减T $CD45RC^{+高}$细胞的抗体可能能够消减其他类型的$CD45RC^{+}$细胞,例如NK或B$CD45RC^{+}$细胞。

[0246] 如本文所用,对于表达CD45RC的细胞,术语"消减"或"消耗"是指受试者中细胞数量的可测量的减少。该减少可以是至少约10%,例如至少约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多。在一些实施方式中,该术语指受试者或样品中的$CD45RC^{+}$细胞数量减少至低于可检测极限的量。根据本发明,根据本发明使用的抗CD45RC抗体特异性介导强烈表达CD45RC的效应细胞,特别是设计为$CD45RC^{高}T_{eff}$的那些细胞的消减。

[0247] 特别地,根据本发明使用的所述抗CD45RC抗体通过结合hCD45RC和转导促凋亡信

号和/或通过激活抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)和/或抗体依赖性吞噬作用来消减$CD45RC^{高}$T细胞。

[0248] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。

[0249] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体介导补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0250] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体介导抗体依赖性吞噬作用。

[0251] 在一个具体实施方案中,根据本发明的分离的抗体或其结合片段可以缀合至细胞毒性剂或生长抑制剂。

[0252] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗体能够扩增和/或加强受试者中的调节性T细胞。

[0253] 如本文所用,术语"扩增"是指转化和/或扩增给定细胞群(例如免疫细胞如T_{reg})的过程。如本文所用,术语"增强"是指增加给定细胞群体的功能(例如,增加T_{reg}细胞的抑制能力)的过程。

[0254] "调节性T细胞"或"T_{reg}"是抑制异常或过度免疫应答并在免疫耐受中起作用的T细胞。T_{reg}通常是"叉头盒P3($Foxp3^+$)调节性T细胞"和/或"$CD45RC^{低/-}$细胞"。如本文所用,术语"叉头盒P3($Foxp3^+$)调节T细胞"和"$CD45RC^{低/-}$细胞"是指在人和啮齿动物中特征性标志为转录因子Foxp3的0.1-10%的$CD4^+$和$CD8^+$T细胞。

[0255] 在一些实施方案中,根据本发明使用的抗体能够扩展和/或增强$Foxp3^+$和/或$CD45RC^{低}T_{reg}$。

[0256] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体以药物组合物的形式施用,所述药物组合物包含所述抗CD45RC抗体和药学上可接受的载体或赋形剂或媒介物。

[0257] 术语"药学上"或"药学上可接受的"是指当适当地施用于哺乳动物,特别是人时不产生不利的、过敏的或其他不良反应的分子实体和组合物。药学上可接受的载体或赋形剂或媒介物是指任何类型的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或制剂助剂。药物组合物的形式、施用途径、剂量和方案自然取决于待治疗的病症、疾病的严重程度、患者的年龄、体重和性别等。本发明的药物组合物可以配制用于局部、经口、肠胃外、鼻内、静脉内、肌内、皮下施用等。

[0258] 在一个实施方案中,药物组合物包含抗CD45RC单克隆抗体,其选自OX-22、OX-32、3H1437、MT2、RP1/12、DNL 1.9、C455.1F和其衍生物;和药学上可接受的载体或赋形剂或媒介物。

[0259] 因此,本发明的抗体可以与药学上可接受的赋形剂、载体或媒介物,以及任选地持续释放基质,例如生物可降解的聚合物组合,以形成治疗组合物。

[0260] 优选地,药物组合物含有对于能够注射的制剂而言药学上可接受的载体。这些具体可以是等渗的、无菌的盐水溶液(磷酸二氢钠或磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或这些盐的混合物),或干燥的,特别是冷冻干燥的组合物,根据情况,在加入无菌水或生理盐水后,其允许组成可注射溶液。用于施用的剂量可以作为各种参数的函数,特别是作为所用的施用方式、相关的病理学或所需的治疗持续时间的函数来调整。为了制备药物组合物,可将有效量的抗体溶解或分散在药学上可接受的载体或水性介质中。适于注射使

用的药物形式包括无菌水溶液或分散体;包括芝麻油、花生油或含水丙二醇的制剂;以及用于临时制备无菌注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,形式必须是无菌的,并且必须是达到容易注射程度的流体。它在生产和储存条件下必须是稳定的,并且防腐必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。

[0261] 在一个实施方案中,配制根据本发明使用的抗CD45RC抗体,以施用给受试者。

[0262] 在一个实施方案中,全身或局部施用本发明使用的抗CD45RC抗体。

[0263] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体通过注射、经口、局部、经鼻、经颊、经直肠、经阴道、经气管内、通过内窥镜检查、经粘膜或通过经皮施用而施用。

[0264] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体是要注射的,优选全身注射。

[0265] 适于注射的制剂的实例包括但不限于溶液,例如无菌水溶液、凝胶、分散体、乳液、悬浮液、适于在使用前加入液体后用于制备溶液或悬浮液的固体形式,例如粉末、脂质体形式等。

[0266] 全身注射的实例包括但不限于静脉内(iv)、皮下、肌内(im)、皮内(id)、腹膜内(ip)注射和输注。

[0267] 在一个实施方案中,当注射时,根据本发明使用的抗CD45RC抗体是无菌的。获得无菌组合物的方法包括但不限于GMP合成(其中GMP代表"良好的生产实践")。

[0268] 组合物的无菌注射形式可以是水性或油性悬浮液。这些悬浮液可以根据本领域已知的技术使用合适的分散剂或润湿剂和悬浮剂配制。无菌注射制剂也可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌注射溶液或悬浮液。在可接受的媒介物和溶剂中,可以使用的是水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。此外,无菌的不挥发性油通常用作溶剂或悬浮介质。为此目的,可以使用任何温和的不挥发性油,包括合成的甘油单酯或甘油二酯。脂肪酸,如油酸及其甘油酯衍生物,可用于注射剂的制备,天然的药学上可接受的油,如橄榄油或蓖麻油,尤其是它们的聚氧乙烯化形式也是如此。这些油溶液或悬浮液也可含有长链醇稀释剂或分散剂,如羧甲基纤维素或类似的分散剂,其通常用于药学上可接受的剂型的配制,包括乳剂和悬浮液。其它常用的表面活性剂,如吐温类、司盘和其它常用于制备药学上可接受的固体、液体或其它剂型的乳化剂或生物利用度增强剂也可用于配制目的。

[0269] 应当理解,本发明还考虑了其它合适的施用途径,并且施用模式最终将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。除了通过注射施用(iv、ip、im等)外,其它途径也是可用的,例如雾化(Respaud等,2014.MAbs.6(5):1347-55;Guilleminault等,2014.J Control Release.196:344-54;Respaud等,2015.Expert Opin Drug Deliv.12(6):1027-39)或皮下施用(Jackisch等,2014.Geburtshilfe Frauenheilkd.74(4):343-349;Solal-Celigny,2015.Expert RevHematol.8(2):147-53)。

[0270] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体以治疗有效量施用给有需要的受试者。

[0271] 然而,应当理解,根据本发明使用的抗CD45RC抗体的总的每日剂量将由主治医师在合理医学判断范围内决定。对于任何特定患者的具体治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的疾病和疾病的严重程度;所用抗CD45RC抗体的活性;受试者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所用特异性抗CD45RC抗体的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗的持续时间;与所用的特异性抗CD45RC抗体组合或同时使用的药物;以及医学领域公

知的类似因素。例如,本领域技术人员熟知,化合物的起始剂量水平低于达到所需治疗效果所需的剂量水平,并逐渐增加剂量直至达到所需效果。每次治疗所需的总剂量可以通过多剂量或单剂量施用。然而,抗体的日剂量可以在0.01至1,000mg/成人/天的宽范围内变化。优选地,组合物含有0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250和500mg活性成分,用于待治疗受试者的剂量的症状调节。药物通常含有约0.01mg至约500mg活性成分,优选1mg至约100mg活性成分。药物的治疗有效量通常以每天0.0002mg/kg至约20mg/kg体重的剂量水平提供,尤其是每天约0.001mg/kg至10mg/kg体重。

[0272] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体的治疗有效量为约0.1mg/kg至约5mg/kg、约0.2mg/kg至约4mg/kg、约0.3mg/kg至约3mg/kg、约0.4mg/kg至约2.5mg/kg、约0.5mg/kg至约2mg/kg。

[0273] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体的治疗有效量为约10μg/kg至约400μg/kg、约20μg/kg至约300μg/kg、约30μg/kg至约250μg/kg、约35μg/kg至约200μg/kg、约40μg/kg至约160μg/kg。

[0274] 在一个实施方案中,根据本发明使用的治疗有效量的抗CD45RC抗体每天施用一次、每天施用两次、每天施用三次或更多次。

[0275] 在一个实施方案中,每天、每两天、每三天、每四天、每五天、每六天施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体。

[0276] 在一个实施方案中,每周、每两周、每三周施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体。

[0277] 在一个实施方案中,每月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体。

[0278] 在一个优选实施方案中,每12小时、每24小时、每36小时、每48小时、每60小时、每72小时、每84小时、每96小时施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体。

[0279] 在一个优选实施方案中,每60小时施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体。在一个优选实施方案中,每84小时施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体。

[0280] 在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体用于急性施用。在一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体用于慢性施用。

[0281] 在一个实施方案中,施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体约5天、7天、10天、14天、21天、28天、1个月、2个月、3个月、6个月、1年或更长时间。

[0282] 在一个实施方案中,施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体约一周至约八周、约两周至约七周、约两周至约六周、约两周至约五周的时间。

[0283] 在一个优选实施方案中,施用治疗有效量的根据本发明使用的抗CD45RC抗体约10天至约40天、约15天至约35天、约20天至约30天的时间。

[0284] 在一个实施方案中,单独施用根据本发明使用的抗CD45RC抗体。

[0285] 在另一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体与至少一种治疗药物联合施用,例如在治疗药物之前、同时或之后施用。

[0286] 在一些实施方案中,治疗药物可以是免疫抑制和/或抗炎药物。术语"免疫抑制和/或抗炎药物"涉及抑制、降低、减轻或缓解受试者中免疫应答强度的一类药物。这些药物特

别适用于治疗与免疫系统中涉及的基因有关的或与免疫功能无关但其缺陷与炎症和/或免疫反应有关的基因有关的单基因病。因此,使用根据本发明的免疫抑制药物以及根据本发明的抗CD45RC抗体有助于降低受单基因病影响的受试者中免疫应答的影响。

[0287] 免疫抑制药物的合适实例包括但不限于mTOR抑制剂,例如西罗莫司、依维莫司、雷达莫司(ridaforolimus)、西罗罗莫司酯化物(temsirolimus)、尤米莫司(umirolimus)和佐他莫司(zotarolimus);IL-1受体拮抗剂,例如阿那白滞素;抗代谢物,例如硫唑嘌呤、来氟米特、甲氨蝶呤、麦考酚酸和特立氟胺;IMiDs,例如阿普斯特(apremilast)、来那度胺(lenalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)和沙利度胺;和抗体,例如艾库珠单抗(eculizumab)、阿达木单抗(adalimumab)、阿非利木单抗(afelimomab)、培化赛托珠单抗(certolizumab pegol)、戈利木单抗(golimumab)、英夫利昔单抗(infliximab)、奈立莫单抗(nerelimomab)、美吡珠单抗(mepolizumab)、奥马珠单抗(omalizumab)、法拉莫单抗(faralimomab)、艾西莫单抗(elsilimomab)、利勃珠单抗(lebrikizumab)、奥斯克单抗(ustekinumab)、塞库单抗(secukinumab)、莫洛单抗-CD3(muromonab-CD3)、奥立昔单抗(otelixizumab)、替普珠单抗(teplizumab)、维西珠单抗(visilizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、克利昔单抗(keliximab)、扎那利木单抗(zanolimumab)、依法珠单抗(efalizumab)、埃立珠单抗(erlizumab)、奥奴珠单抗(obinutuzumab)、利妥昔单抗(rituximab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、帕卡珠单抗(pascolizumab)、戈米西单抗(gomiliximab)、鲁利西单抗(lumiliximab)、替利昔单抗(teneliximab)、托拉利珠单抗(toralizumab)、阿塞利珠单抗(aselizumab)、加利昔单抗(galiximab)、加维利莫单抗(gavilimomab)、卢利珠单抗(ruplizumab)、贝利珠单抗(belimumab)、布利莫德(blisibimod)、伊利木单抗(ipilimumab)、曲美木单抗(tremelimumab)、伯特利木单抗(bertilimumab)、来立木单抗(lerdelimumab)、美特木单抗(metelimumab)、那他珠单抗(natalizumab)、妥利珠单抗(tocilizumab,)、奥利木单抗(odulimomab)、巴利昔单抗(basiliximab)、达西珠单抗(daclizumab)、伊利莫单抗(inolimomab)、阿佐莫单抗(zolimomab aritox)、阿托利木单抗(atorolimumab)、赛地珠单抗(cedelizumab)、芬特妥珠单抗(fontolizumab)、马司莫单抗(maslimomab)、莫洛莫单抗(morolimumab)、培昔单抗(pexelizumab)、利昔单抗(reslizumab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、西普利单抗(siplizumab)、塔利单抗(talizumab)、telimomab aritox、伐昔单抗(vapaliximab)、维帕莫单抗(vepalimomab)、阿巴西普(abatacept)、贝拉西普(belatacept)、依那西普(etanercept)、培那西普(pegsunercept)、阿柏西普(aflibercept)、阿法西普(alefacept)和利洛那西普(rilonacept)。

[0288] 抗炎药的合适实例包括但不限于类皮质激素(例如糖皮质激素类,选自地塞米松、倍他米松、倍他米松-17-戊酸酯、曲安西龙、曲安奈德、氟轻松醋酸酯(fluocinolone acetonide)、醋酸氟轻松(fluocinonide)、可的松、氢化可的松、泼尼松、甲泼尼龙、地奈德、布地奈德和地夫可特。

[0289] 优选地,免疫抑制和/或抗炎药物是泼尼松龙或地夫可特。

[0290] 因此,本发明包括药物组合物,该组合物包含如前定义的抗CD45RC抗体、免疫抑制和/或抗炎药物和药学上可接受的载体或赋形剂或媒介物。在一些实施方案中,药物组合物包含如上定义的抗CD45RC抗体、泼尼松龙或地夫可特,和药学上可接受的载体或赋形剂或

媒介物。

[0291] 在另一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体与基因治疗或细胞治疗联合施用。有利地,所述基因治疗或细胞治疗在使用所述抗CD45RC抗体之前或之后使用,优选在使用所述抗CD45RC抗体之前使用。

[0292] 因此,本发明包括药物组合物,其包含如前定义的抗CD45RC抗体、含有至少一种小抗肌萎缩蛋白基因的腺相关病毒或慢病毒和药学上可接受的载体或赋形剂或媒介物。在一些实施方案中,药物组合物是用于同时、分开或顺序使用的组合制剂。术语"小抗肌萎缩蛋白基因"在本文中指6-kb至8-kb的合成的小抗肌萎缩蛋白基因,例如Odom等(2011.Mol Ther.19(1):36-45),Clemens等(1995.Hum Gene Ther.6(11):1477-85),Harper等(2002.NatMed.8(3):253-61)和Lai等(2009.J Clin Invest.119(3):624-35)所述的小抗肌萎缩蛋白基因。

[0293] 在另一个实施方案中,根据本发明使用的抗CD45RC抗体将与免疫抑制和/或抗炎药物两者组合施用,并与基因治疗或细胞治疗组合施用。

[0294] 因此,本发明包括药物组合物,其包含如前定义的抗CD45RC抗体、免疫抑制和/或抗炎药物、含有至少一种小抗肌萎缩蛋白基因的腺相关病毒或慢病毒和药学上可接受的载体或赋形剂或媒介物。在一些实施方案中,药物组合物是用于同时、分开或顺序使用的组合制剂。

附图说明

[0295] 图1是一组显示Dmd^{mdx}大鼠肌肉和脾脏中白细胞数量的图。在指定的年龄时间点从同窝出生的野生型(WT)或Dmd^{mdx}(KO)大鼠中收获后肢骨骼肌和脾脏。用胶原酶消化肌肉和脾脏,并使用密度梯度分离单核细胞。(A)用活力染料和泛抗白细胞CD45单克隆抗体(OX1)染色的8周龄动物的单核细胞肌肉(左图)和脾(右图)的代表性点图分析。(B)在不同时间点$CD45^+$细胞的数量/g肌肉组织或总脾脏。WT,在2、4、8、12和16周时分别n=4、5、7、9。KO,在2、4、8、12和16周时分别n=3、6、10、11、16。*P<0.05,***P<0.001,****P<0.0001。

[0296] 图2是一组显示同窝出生的WT和Dmd^{mdx}大鼠肌肉和脾脏中TCR^+细胞数的两张图。如图1说明中所解释的,从后肢(左图)和脾(右图)获得PBMC。TCR^+细胞的数量通过用抗TCRab单克隆抗体(克隆R7/3)染色PBMC并计算活$CD45R^+$细胞中TCR^+细胞的数量来确定。*P<0.05,**P<0.01。

[0297] 图3是一组显示了使用抗CD45RC单克隆抗体治疗后T $CD8^+CD45RC^{高}$和$CD45RC^{int/neg}$细胞的数目的四张图。对照同窝出生的野生型(WT)或Dmd^{mdx}(KO)大鼠从2周龄开始接受腹膜内注射小鼠抗-大鼠CD45RC单克隆抗体,直到第12周时处死动物。分离肌肉和脾单核细胞,并分析以高水平($CD45RC^{高}$)或中等/阴性水平($CD45RC^{int/neg}$)表达CD45RC的TCR^+CD8^+细胞的存在。每个点代表单个动物。*P<0.05,***P<0.001。

[0298] 图4是显示用抗CD45RC单克隆抗体治疗后Dmd^{mdx}大鼠中肌肉强度的图。野生型(WT)或Dmd^{mdx}(KO)大鼠从2周龄至第12周接受小鼠抗大鼠CD45RC或泼尼松龙的腹膜内注射,第12周时使用握力测试分析肌肉强度。每个点代表单个动物。*P<0.05。

[0299] 图5是一组显示了在使用泼尼松龙治疗后T $CD8^+CD45RC^{高}$和$CD45RC^{int/neg}$细胞的数目的四张图。对照同窝出生的野生型(WT)或Dmd^{mdx}(KO)大鼠从2周龄开始接受腹膜内注射泼

尼松龙,直至第12周时处死动物。分离肌肉和脾单核细胞,并分析以高水平(CD45RC^{高})或中等/阴性水平(CD45RC$^{int/neg}$)表达CD45RC的TCR^{+}CD8+细胞的存在。每个点代表单个动物。*P＜0.05。

[0300] 图6是一组显示在使用泼尼松龙或抗CD45RC单克隆抗体治疗期间野生型或Dmd^{mdx}大鼠的重量的两幅图。对照同窝出生的野生型(WT)或Dmd^{mdx}(KO)大鼠从2周龄到12周龄接受泼尼松龙或抗CD45RC单克隆抗体(OX22)的腹膜内注射,并在指定的时间点记录体重。

[0301] 图7是一组照片和图表,显示抗CD45RC mAb治疗的Aire$^{-/-}$大鼠中疾病的自身免疫体征减少。Aire$^{-/-}$大鼠从2周龄开始接受腹膜内注射小鼠抗大鼠CD45RC MAb(克隆OX22,1.5mg/kg,每周两次),直至第20周处死动物时。(A)照片显示用同种型对照(上排)或抗-CD45RC mAb治疗(下排)的20周龄Aire$^{-/-}$大鼠视觉方面。(B)照片显示了抗CD45RC mAb或同种型对照Aire$^{-/-}$治疗的大鼠的胸腺大小。(C)在出生后20周期间每周测定抗-CD45RCmAb或同种型对照Aire$^{-/-}$同窝SPD大鼠的重量。结果以出生第2周开始的初始体重(平均值为31.3g)±SEM(n＝3)的%表示。

[0302] 图8是显示抗CD45RC mAb施用后脾和肠系膜淋巴结(MLN)中CD45RC^{高}T细胞有效消减的一组图。来自用抗CD45RC或同种型对照mAb治疗的Aire$^{-/-}$或者WT未治疗的动物在20周龄且从第2周开始治疗的MLN和脾脏的单核细胞(CD4^{+}和CD8^{+}T细胞)的代表性点图分析,染色使用活力染料和泛抗白细胞CD45 MAb(OX1)、CD3、TCR、CD4和CD45RC MAb。

[0303] 图9是根据用抗CD45RC mab OX22标记的大鼠CD8+T细胞中CD45RC表达的不同水平(CD45RC^{高}、CD45RC^{int}和CD45RC^{neg}),定义3个CD8^{+}细胞群的图。

[0304] 图10是一组两个SDS-PAGE凝胶,显示抗CD45RC MAb治疗对Aire缺陷大鼠血清自身抗体的作用。用(A)同种型对照MAb或(B)抗CD45RCMAb(OX22)以1.5mg/kg治疗Aire缺陷大鼠,每周两次,从2周龄至20周龄。银染。β-肌动蛋白用作对照。

[0305] 图11是用苏木精-曙红-藏红染色的一组八张组织切片(胸腺、胰腺、皮肤、肾)照片,显示用同种型抗体(左图)或用抗CD45RC抗体(右图)治疗的大鼠中的组织结构和淋巴细胞浸润。白色箭头表示每个器官的主要区域在抗CD45RC或同种型治疗的接受者之间不同。

实施例

[0306] 与实施例1-4相关的材料和方法

[0307] 肌肉和脾脏单细胞悬液的制备

[0308] 切除WT或Dmd^{mdx}大鼠的两只后肢的肌肉并称重。将肌肉切碎,置于含有胶原酶D、存在FCS 2%、1mM EDTA的温和MACS C管中。在温和的MACS分离器中运行两次,每次30分钟,在每次运行之间加入新的胶原酶。将细胞悬浮在30mL PBS FCS 2%、1mM EDTA中,然后施加到15mLHystopaque中,1000g离心30分钟而不间断。从Hystopaque和PBS界面收集单核细胞,洗涤并悬浮在PBS FCS 2%、1mM EDTA中。

[0309] 收获脾脏,用PBS灌注并用胶原酶D在37℃消化15分钟。将细胞悬浮于PBS FCS 2%、1mM EDTA中,并如上所述回收单核细胞。

[0310] 流式细胞术分析

[0311] 用针对以下抗原的抗体对单核细胞进行染色:CD45(克隆OX-1)、T细胞受体(TCR;克隆R7/3)、CD45RC(克隆OX22)、CD8(克隆OX8)和CD4(W3/25),以及活力染料eFLUORE506或

eFLUO450,均来自于eBiosciences。分析在具有FACSite软件1.0.6版的BD FACS上进行。用FlowJo软件进行采集后分析。

[0312] 用抗CD45RC或泼尼松龙治疗

[0313] 野生型(WT)或Dmd^{mdx}(KO)大鼠从2周龄到12周龄接受腹膜内注射小鼠抗大鼠CD45RC单克隆抗体(克隆OX22,2mg/kg,每3.5天)。

[0314] 泼尼松龙通过腹膜内注射(0.5mg/kg,每周5天)从2周龄至12周龄进行施用。

[0315] 在12周龄,使用握力测试分析治疗的大鼠的肌肉强度。

[0316] 握力测试

[0317] 将大鼠的前爪置于网格上,并轻轻向后拉,直到它们松开它们的抓握。连接有力传感器的握力计(Bio-GT3,BIOSEB,法国)测量所产生的力的峰值。

[0318] 实施例1

[0319] Dmd^{mdx}大鼠中总白细胞和T细胞的分析

[0320] 通过流式细胞术分析Dmd^{mdx}大鼠肌肉和脾脏中的白细胞(图1)。

[0321] 同窝出生的WT和Dmd^{mdx}大鼠肌肉中的总白细胞在2周龄时相当,但在4周龄时,Dmd^{mdx}大鼠表现出急剧增加,直到第8周仍维持,然后在第12周和第14周减少,但仍显著高于同窝出生的WT大鼠。

[0322] 在分析的所有时间点,脾白细胞数在WT和Dmd^{mdx}大鼠之间是相当的。

[0323] 对同窝出生的WT和Dmd^{mdx}大鼠肌肉和脾脏中TCR^+细胞数目的分析表明,Dmd^{mdx}大鼠在4周和12周龄时肌肉有明显增加,在第8周和16周时有增加的趋势(图2)。

[0324] 在任何时间点,脾脏TCR^+细胞数目在WT和Dmd^{mdx}大鼠之间没有显示出差异。

[0325] 实施例2

[0326] 用抗CD45RC单克隆抗体治疗消减了$CD45RC^{高}$T细胞

[0327] 从2周龄开始施用小鼠抗大鼠CD45RC单克隆抗体,导致在12周龄分析时Dmd^{mdx}大鼠肌肉以及同窝出生的WT和Dmd^{mdx}大鼠脾脏中T $CD8^+CD45RC^{高}$细胞部分消减(图3)。

[0328] 在WT和Dmd^{mdx}大鼠的脾或肌肉中,T $CD8^+$或$CD4^+CD45RC^{int/neg}$,包括所有$CD8^+$和$CD4^+$ T_{reg},都未改变(图3)。

[0329] 所有其它主要的白细胞群体(巨噬细胞、B细胞和NK细胞)都未改变(数据未显示)。

[0330] 实施例3

[0331] 用抗CD45RC单克隆抗体治疗改善了Dmd^{mdx}大鼠的肌肉强度

[0332] 为了检测抗CD45RC单克隆抗体治疗是否改善肌肉功能,在2周龄开始治疗后WT和Dmd^{mdx}大鼠在12周龄通过前肢握力测试分析肌肉力量。

[0333] 前肢握力的显著降低表明了全身肌肉性能的整体改变。如Larcher等(2014.PLoS One.9(10):e110371)先前所述,与WT同窝出生的大鼠相比,Dmd^{mdx}大鼠施加的力弱30%。

[0334] 在施用抗CD45RC单克隆抗体后,和未治疗的Dmd^{mdx}大鼠相比,Dmd^{mdx}大鼠肌肉强度显著增加,并且与WT同窝出生的对照不能区分(图4)。

[0335] 实施例4

[0336] 用泼尼松龙治疗改善了骨骼肌力量

[0337] 由于肾上腺皮质激素是DMD患者的标准治疗(Alman,2005.J PediatrOrthop.25(4):554-6),因此分析了泼尼松龙对Dmd^{mdx}大鼠肌肉力量的影响。

[0338] 从2周龄开始用泼尼松龙治疗Dmd^{mdx}大鼠,在12周肌肉强度增加,达到与WT或抗CD45RC治疗的大鼠相同的水平(图4)。

[0339] 有趣的是,泼尼松龙治疗的大鼠也显示了在Dmd^{mdx}大鼠的肌肉和脾脏中以及WT大鼠的脾脏中$CD8^{+}CD45RC^{高}$细胞的特异性减少,而$CD8^{+}$

[0340] $CD45RC^{int/neg}$细胞被维持(图5)。

[0341] 类似地,CD4+$CD45RC^{高}$细胞在Dmd^{mdx}大鼠的肌肉和脾脏中和WT大鼠的脾脏中都有数值减少,而$CD8^{+}CD45RC^{int/neg}$细胞被维持(数据未显示)。

[0342] 泼尼松龙治疗的Dmd^{mdx}大鼠显示动物生长严重降低,而抗CD45RC单克隆抗体治疗的大鼠没有(图6)。

[0343] 实施例5

[0344] APECED疾病的治疗

[0345] 材料和方法

[0346] 细胞分离

[0347] 脾和淋巴结用胶原酶D在37℃消化30分钟。加入0.01mM EDTA终止反应。

[0348] 还分离来自血液和骨髓的细胞,并使用裂解溶液(8.29g NH_4Cl、1g$KHCO_3$、37.2mg EDTA、qsp 1L去离子水,pH 7.2-7.4)裂解红细胞。

[0349] 抗体和流式细胞术

[0350] 使用来自BD Pharmigen的单克隆抗体分析细胞表型:抗TCRαβ(R73)、CD25(0x39)、CD4(0x35)和CD45(0x1)。

[0351] 使用我们实验室中产生的针对CD45RC(0x22)和CD8(0x8)的抗体。

[0352] 抗体用于染色细胞,荧光用FACScanto II流式细胞仪(BD Bioscience)测量,FlowJo软件用于分析数据。首先根据形态对细胞进行门控,然后通过用可固定的活力染料efluor506(Ebioscience)染色来排除死细胞。

[0353] 用抗CD45RC或同种型对照治疗

[0354] $Aire^{-/-}$(KO)大鼠接受腹膜内注射小鼠抗大鼠CD45RC单克隆抗体(克隆OX22,1.5mg/kg,每3.5天),从2周龄开始直至20周处死动物。同种型对照类似地施用。从治疗开始直到处死的那天,每周两次对大鼠称重。在20周龄时,处死经治疗的大鼠并分析。

[0355] 自身抗体检测

[0356] 将20周龄的用抗CD45RC治疗或用同种型对照治疗的Aire缺陷大鼠的血清与膜一起孵育,其中将来自I12rg缺陷大鼠(I12rg:白介素2受体亚基γ)的不同器官(脾、结肠、肾、眼、肺、睾丸、肠系膜淋巴结[MLN]和回肠)的裂解物(因此没有内源免疫球蛋白)预先进行电泳。使用抗大鼠免疫球蛋白抗体或偶联至过氧化物酶的抗β-肌动蛋白抗体显示大鼠自身抗体的结合。

[0357] 组织化学

[0358] 20周龄时收获用抗CD45RC治疗或用同种型对照治疗的Aire缺陷大鼠的器官。制备组织切片(胸腺、胰腺、皮肤、肾)并用苏木精-曙红-藏红染色。

[0359] 结果

[0360] 我们观察到,在同种型对照治疗的动物中100%的Aire缺陷大鼠自发地发生脱发和皮肤脱色素(图7A,上排),这些迹象与严重的自身免疫疾病相关,并且是在APECED患者中

经常发现的临床表现。

[0361] 相比之下,用抗CD45RC mAb治疗的Aire缺陷型大鼠没有发生脱发和皮肤色素脱色(图7A,底部),具有较大的胸腺尺寸(图7B)和正常体重(图7C),这表明生长正常、胸腺结构得到保留并且自身免疫疾病整体减少。

[0362] 与用同种型对照治疗的大鼠和未治疗的WT大鼠相比,在$Aire^{-/-}$大鼠中,从2周龄开始施用小鼠抗大鼠CD45RC单克隆抗体导致了脾和淋巴结中的$TCD8^{+}$和$CD4^{+}CD45RC^{高}$细胞大幅消减(图8)。

[0363] 其它主要白细胞群体(巨噬细胞、B细胞和NK细胞)的数目没有变化(数据未显示)。

[0364] 还通过western印迹法评价了组织匀浆和血清中针对组织抗原的自身抗体的分析。

[0365] 在没有抗大鼠CD45RC单克隆抗体治疗的情况下,在不同器官中检测到许多条带,表明存在自身抗体(图10A)。

[0366] 相比之下,用抗大鼠CD45RC单克隆抗体治疗减少了条带的数量,并因此减少了自身抗体的数量(图10B)。

[0367] 在治疗的第20周,在无治疗组中组织结构被破坏,并且许多器官中存在淋巴细胞浸润,而用抗大鼠CD45RC单克隆抗体治疗恢复了组织完整性并减少了淋巴细胞浸润(图11)。

[0368] 结论

[0369] 总之,上文实施例1-5中提供的数据清楚地证明,通过使用抗CD45RC抗体,减少了(如果不是抑制的话)通常与某些单基因病相关的炎症和自身免疫反应。T_{eff}和T_{reg}之间的失衡和T应答增加的最终结果,以及通过自身抗体产生的B细胞介导的应答,见于其它单基因病中,例如囊性纤维化、溶酶体病、α1-抗胰蛋白酶缺陷、IPEX、B细胞原发性免疫缺陷、穆-韦二氏综合征、混合性自身炎症和自身免疫综合征、NLRP12相关的遗传性周期性发热综合征和肿瘤坏死因子受体1相关的周期性综合征。

[0001] 序列表

[0002] <110> 法国国家健康和医学研究院(INSERM (Institut National de la Santé et

[0003] de la Recherche Médicale))

[0004] 南特大学医疗中心(CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE NANTES)

[0005] 南特大学(UNIVERSITé DE NANTES)

[0006] C·吉永瑙(GUILLONNEAU Carole)

[0007] I·阿内贡(ANEGON Ignacio)

[0008] <120> 利用抗-CD45RC抗体治疗单基因病

[0009] <130> CV - 1188/PCT

[0010] <150> EP17306783.6

[0011] <151> 2017-12-15

[0012] <160> 3

[0013] <170> BiSSAP 1.3.6

[0014] <210> 1

[0015] <211> 48

[0016] <212> PRT

[0017] <213> 智人(Homo sapiens)

[0018] <220>

[0019] <223> hCD45RC的C决定簇

[0020] <400> 1

[0021] Asp Val Pro Gly Glu Arg Ser Thr Ala Ser Thr Phe Pro Thr Asp Pro

[0022] 1 5 10 15

[0023] Val Ser Pro Leu Thr Thr Thr Leu Ser Leu Ala His His Ser Ser Ala

[0024] 20 25 30

[0025] Ala Leu Pro Ala Arg Thr Ser Asn Thr Thr Ile Thr Ala Asn Thr Ser

[0026] 35 40 45

[0027] <210> 2

[0028] <211> 144

[0029] <212> DNA

[0030] <213> 智人(Homo sapiens)

[0031] <220>

[0032] <223> hCD45RC的外显子6

[0033] <400> 2

[0034] gatgtcccag gagagaggag tacagccagc acctttccta cagacccagt ttccccattg 60

[0035] acaaccaccc tcagccttgc acaccacagc tctgctgcct tacctgcacg cacctccaac 120

[0036] accaccatca cagcgaacac ctca 144

[0037] <210> 3

[0038] <211> 1306

[0039] <212> PRT

[0040] <213> 智人(Homo sapiens)

[0041] <220>

[0042] <223> hCD45RC

[0043] <400> 3

[0044] Met Thr Met Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Leu Ala Phe Gly Phe Ala Phe

[0045] 1 5 10 15

[0046] Leu Asp Thr Glu Val Phe Val Thr Gly Gln Ser Pro Thr Pro Ser Pro

[0047] 20 25 30

[0048] Thr Gly Leu Thr Thr Ala Lys Met Pro Ser Val Pro Leu Ser Ser Asp

[0049] 35 40 45

[0050] Pro Leu Pro Thr His Thr Thr Ala Phe Ser Pro Ala Ser Thr Phe Glu

[0051] 50 55 60

[0052] Arg Glu Asn Asp Phe Ser Glu Thr Thr Thr Ser Leu Ser Pro Asp Asn

[0053] 65 70 75 80

[0054] Thr Ser Thr Gln Val Ser Pro Asp Ser Leu Asp Asn Ala Ser Ala Phe

[0055] 85 90 95

[0056] Asn Thr Thr Gly Val Ser Ser Val Gln Thr Pro His Leu Pro Thr His

[0057] 100 105 110

[0058] Ala Asp Ser Gln Thr Pro Ser Ala Gly Thr Asp Thr Gln Thr Phe Ser

[0059] 115 120 125

[0060] Gly Ser Ala Ala Asn Ala Lys Leu Asn Pro Thr Pro Gly Ser Asn Ala

[0061] 130 135 140

[0062] Ile Ser Asp Val Pro Gly Glu Arg Ser Thr Ala Ser Thr Phe Pro Thr

[0063] 145 150 155 160

[0064] Asp Pro Val Ser Pro Leu Thr Thr Thr Leu Ser Leu Ala His His Ser

[0065] 165 170 175

[0066] Ser Ala Ala Leu Pro Ala Arg Thr Ser Asn Thr Thr Ile Thr Ala Asn

[0067] 180 185 190

[0068] Thr Ser Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Ser Glu Thr Thr Thr Leu Ser Pro

[0069] 195 200 205

[0070] Ser Gly Ser Ala Val Ile Ser Thr Thr Thr Ile Ala Thr Thr Pro Ser

[0071] 210 215 220

[0072] Lys Pro Thr Cys Asp Glu Lys Tyr Ala Asn Ile Thr Val Asp Tyr Leu

[0073] 225 230 235 240

[0074] Tyr Asn Lys Glu Thr Lys Leu Phe Thr Ala Lys Leu Asn Val Asn Glu

[0075] 245 250 255

[0076] Asn Val Glu Cys Gly Asn Asn Thr Cys Thr Asn Asn Glu Val His Asn

[0077] 260 265 270

[0078] Leu Thr Glu Cys Lys Asn Ala Ser Val Ser Ile Ser His Asn Ser Cys

[0079] 275 280 285

[0080] Thr Ala Pro Asp Lys Thr Leu Ile Leu Asp Val Pro Pro Gly Val Glu

[0081] 290 295 300

[0082] Lys Phe Gln Leu His Asp Cys Thr Gln Val Glu Lys Ala Asp Thr Thr

[0083] 305 310 315 320

[0084] Ile Cys Leu Lys Trp Lys Asn Ile Glu Thr Phe Thr Cys Asp Thr Gln

[0085] 325 330 335

[0086] Asn Ile Thr Tyr Arg Phe Gln Cys Gly Asn Met Ile Phe Asp Asn Lys

[0087] 340 345 350

[0088] Glu Ile Lys Leu Glu Asn Leu Glu Pro Glu His Glu Tyr Lys Cys Asp

[0089] 355 360 365

[0090] Ser Glu Ile Leu Tyr Asn Asn His Lys Phe Thr Asn Ala Ser Lys Ile

[0091] 370 375 380

[0092] Ile Lys Thr Asp Phe Gly Ser Pro Gly Glu Pro Gln Ile Ile Phe Cys

[0093] 385 390 395 400

[0094] Arg Ser Glu Ala Ala His Gln Gly Val Ile Thr Trp Asn Pro Pro Gln

[0095] 405 410 415

[0096] Arg Ser Phe His Asn Phe Thr Leu Cys Tyr Ile Lys Glu Thr Glu Lys

[0097] 420 425 430

[0098] Asp Cys Leu Asn Leu Asp Lys Asn Leu Ile Lys Tyr Asp Leu Gln Asn

[0099] 435 440 445

[0100] Leu Lys Pro Tyr Thr Lys Tyr Val Leu Ser Leu His Ala Tyr Ile Ile

[0101] 450 455 460

[0102] Ala Lys Val Gln Arg Asn Gly Ser Ala Ala Met Cys His Phe Thr Thr

[0103] 465 470 475 480

[0104] Lys Ser Ala Pro Pro Ser Gln Val Trp Asn Met Thr Val Ser Met Thr

[0105] 485 490 495

[0106] Ser Asp Asn Ser Met His Val Lys Cys Arg Pro Pro Arg Asp Arg Asn

[0107] 500 505 510

[0108] Gly Pro His Glu Arg Tyr His Leu Glu Val Glu Ala Gly Asn Thr Leu

[0109] 515 520 525

[0110] Val Arg Asn Glu Ser His Lys Asn Cys Asp Phe Arg Val Lys Asp Leu

[0111] 530 535 540

[0112] Gln Tyr Ser Thr Asp Tyr Thr Phe Lys Ala Tyr Phe His Asn Gly Asp

[0113] 545 550 555 560

[0114] Tyr Pro Gly Glu Pro Phe Ile Leu His His Ser Thr Ser Tyr Asn Ser

[0115] 565 570 575

[0116] Lys Ala Leu Ile Ala Phe Leu Ala Phe Leu Ile Ile Val Thr Ser Ile
[0117] 580 585 590
[0118] Ala Leu Leu Val Val Leu Tyr Lys Ile Tyr Asp Leu His Lys Lys Arg
[0119] 595 600 605
[0120] Ser Cys Asn Leu Asp Glu Gln Gln Glu Leu Val Glu Arg Asp Asp Glu
[0121] 610 615 620
[0122] Lys Gln Leu Met Asn Val Glu Pro Ile His Ala Asp Ile Leu Leu Glu
[0123] 625 630 635 640
[0124] Thr Tyr Lys Arg Lys Ile Ala Asp Glu Gly Arg Leu Phe Leu Ala Glu
[0125] 645 650 655
[0126] Phe Gln Ser Ile Pro Arg Val Phe Ser Lys Phe Pro Ile Lys Glu Ala
[0127] 660 665 670
[0128] Arg Lys Pro Phe Asn Gln Asn Lys Asn Arg Tyr Val Asp Ile Leu Pro
[0129] 675 680 685
[0130] Tyr Asp Tyr Asn Arg Val Glu Leu Ser Glu Ile Asn Gly Asp Ala Gly
[0131] 690 695 700
[0132] Ser Asn Tyr Ile Asn Ala Ser Tyr Ile Asp Gly Phe Lys Glu Pro Arg
[0133] 705 710 715 720
[0134] Lys Tyr Ile Ala Ala Gln Gly Pro Arg Asp Glu Thr Val Asp Asp Phe
[0135] 725 730 735
[0136] Trp Arg Met Ile Trp Glu Gln Lys Ala Thr Val Ile Val Met Val Thr
[0137] 740 745 750
[0138] Arg Cys Glu Glu Gly Asn Arg Asn Lys Cys Ala Glu Tyr Trp Pro Ser
[0139] 755 760 765
[0140] Met Glu Glu Gly Thr Arg Ala Phe Gly Asp Val Val Val Lys Ile Asn
[0141] 770 775 780
[0142] Gln His Lys Arg Cys Pro Asp Tyr Ile Ile Gln Lys Leu Asn Ile Val
[0143] 785 790 795 800
[0144] Asn Lys Lys Glu Lys Ala Thr Gly Arg Glu Val Thr His Ile Gln Phe
[0145] 805 810 815
[0146] Thr Ser Trp Pro Asp His Gly Val Pro Glu Asp Pro His Leu Leu Leu
[0147] 820 825 830
[0148] Lys Leu Arg Arg Arg Val Asn Ala Phe Ser Asn Phe Phe Ser Gly Pro
[0149] 835 840 845
[0150] Ile Val Val His Cys Ser Ala Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Tyr Ile
[0151] 850 855 860
[0152] Gly Ile Asp Ala Met Leu Glu Gly Leu Glu Ala Glu Asn Lys Val Asp
[0153] 865 870 875 880
[0154] Val Tyr Gly Tyr Val Val Lys Leu Arg Arg Gln Arg Cys Leu Met Val

[0155] 885 890 895

[0156] Gln Val Glu Ala Gln Tyr Ile Leu Ile His Gln Ala Leu Val Glu Tyr

[0157] 900 905 910

[0158] Asn Gln Phe Gly Glu Thr Glu Val Asn Leu Ser Glu Leu His Pro Tyr

[0159] 915 920 925

[0160] Leu His Asn Met Lys Lys Arg Asp Pro Pro Ser Glu Pro Ser Pro Leu

[0161] 930 935 940

[0162] Glu Ala Glu Phe Gln Arg Leu Pro Ser Tyr Arg Ser Trp Arg Thr Gln

[0163] 945 950 955 960

[0164] His Ile Gly Asn Gln Glu Glu Asn Lys Ser Lys Asn Arg Asn Ser Asn

[0165] 965 970 975

[0166] Val Ile Pro Tyr Asp Tyr Asn Arg Val Pro Leu Lys His Glu Leu Glu

[0167] 980 985 990

[0168] Met Ser Lys Glu Ser Glu His Asp Ser Asp Glu Ser Ser Asp Asp Asp

[0169] 995 1000 1005

[0170] Ser Asp Ser Glu Glu Pro Ser Lys Tyr Ile Asn Ala Ser Phe Ile Met

[0171] 1010 1015 1020

[0172] Ser Tyr Trp Lys Pro Glu Val Met Ile Ala Ala Gln Gly Pro Leu Lys

[0173] 1025 1030 1035 1040

[0174] Glu Thr Ile Gly Asp Phe Trp Gln Met Ile Phe Gln Arg Lys Val Lys

[0175] 1045 1050 1055

[0176] Val Ile Val Met Leu Thr Glu Leu Lys His Gly Asp Gln Glu Ile Cys

[0177] 1060 1065 1070

[0178] Ala Gln Tyr Trp Gly Glu Gly Lys Gln Thr Tyr Gly Asp Ile Glu Val

[0179] 1075 1080 1085

[0180] Asp Leu Lys Asp Thr Asp Lys Ser Ser Thr Tyr Thr Leu Arg Val Phe

[0181] 1090 1095 1100

[0182] Glu Leu Arg His Ser Lys Arg Lys Asp Ser Arg Thr Val Tyr Gln Tyr

[0183] 1105 1110 1115 1120

[0184] Gln Tyr Thr Asn Trp Ser Val Glu Gln Leu Pro Ala Glu Pro Lys Glu

[0185] 1125 1130 1135

[0186] Leu Ile Ser Met Ile Gln Val Val Lys Gln Lys Leu Pro Gln Lys Asn

[0187] 1140 1145 1150

[0188] Ser Ser Glu Gly Asn Lys His His Lys Ser Thr Pro Leu Leu Ile His

[0189] 1155 1160 1165

[0190] Cys Arg Asp Gly Ser Gln Gln Thr Gly Ile Phe Cys Ala Leu Leu Asn

[0191] 1170 1175 1180

[0192] Leu Leu Glu Ser Ala Glu Thr Glu Glu Val Val Asp Ile Phe Gln Val

[0193] 1185 1190 1195 1200

[0194] Val Lys Ala Leu Arg Lys Ala Arg Pro Gly Met Val Ser Thr Phe Glu

[0195] 1205 1210 1215

[0196] Gln Tyr Gln Phe Leu Tyr Asp Val Ile Ala Ser Thr Tyr Pro Ala Gln

[0197] 1220 1225 1230

[0198] Asn Gly Gln Val Lys Lys Asn Asn His Gln Glu Asp Lys Ile Glu Phe

[0199] 1235 1240 1245

[0200] Asp Asn Glu Val Asp Lys Val Lys Gln Asp Ala Asn Cys Val Asn Pro

[0201] 1250 1255 1260

[0202] Leu Gly Ala Pro Glu Lys Leu Pro Glu Ala Lys Glu Gln Ala Glu Gly

[0203] 1265 1270 1275 1280

[0204] Ser Glu Pro Thr Ser Gly Thr Glu Gly Pro Glu His Ser Val Asn Gly

[0205] 1285 1290 1295

[0206] Pro Ala Ser Pro Ala Leu Asn Gln Gly Ser

[0207] 1300 1305

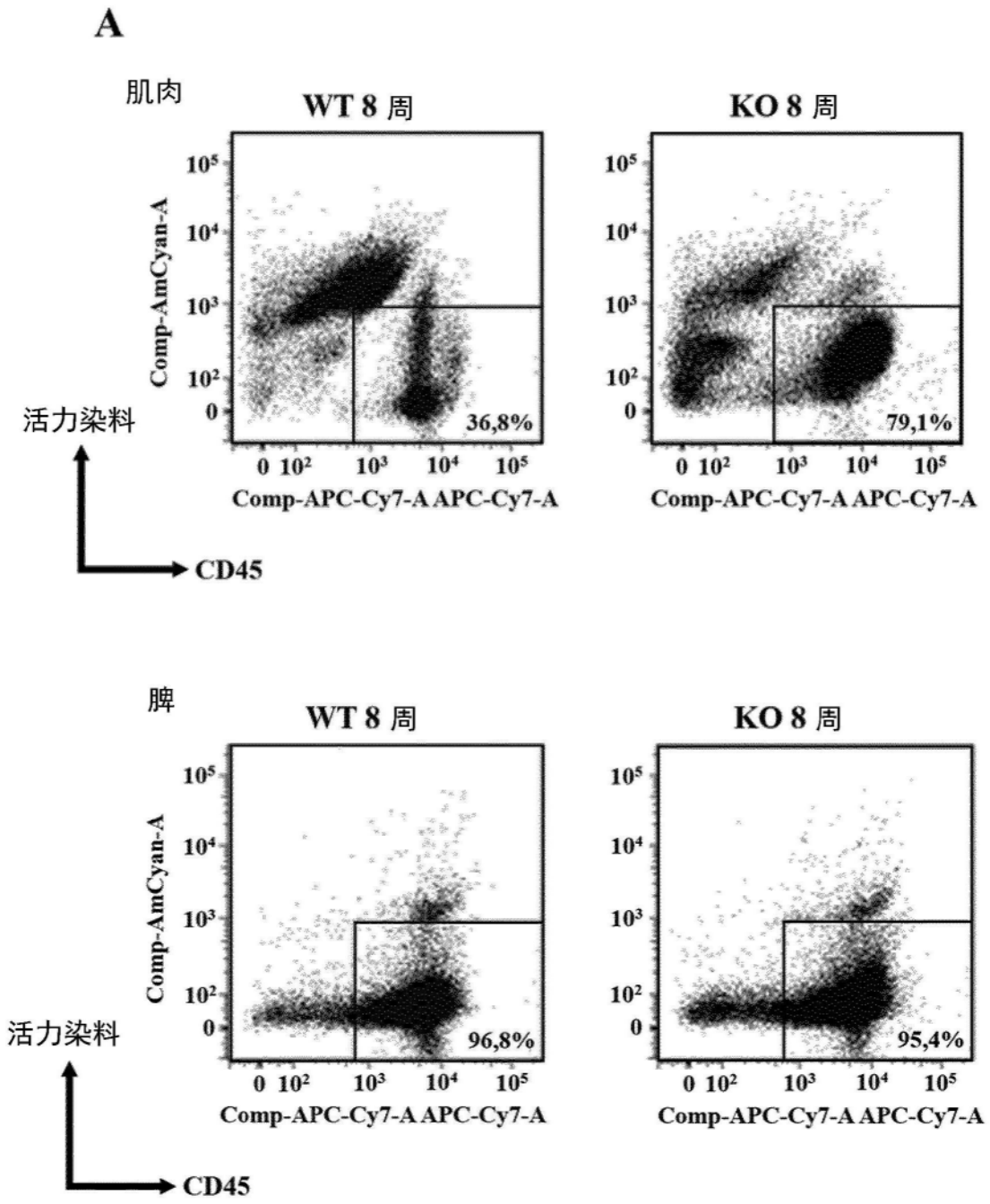

A
肌肉
WT 8 周
KO 8 周
Comp-AmCyan-A
活力染料
CD45
Comp-APC-Cy7-A APC-Cy7-A
36,8%
79,1%
脾
96,8%
95,4%

图1A

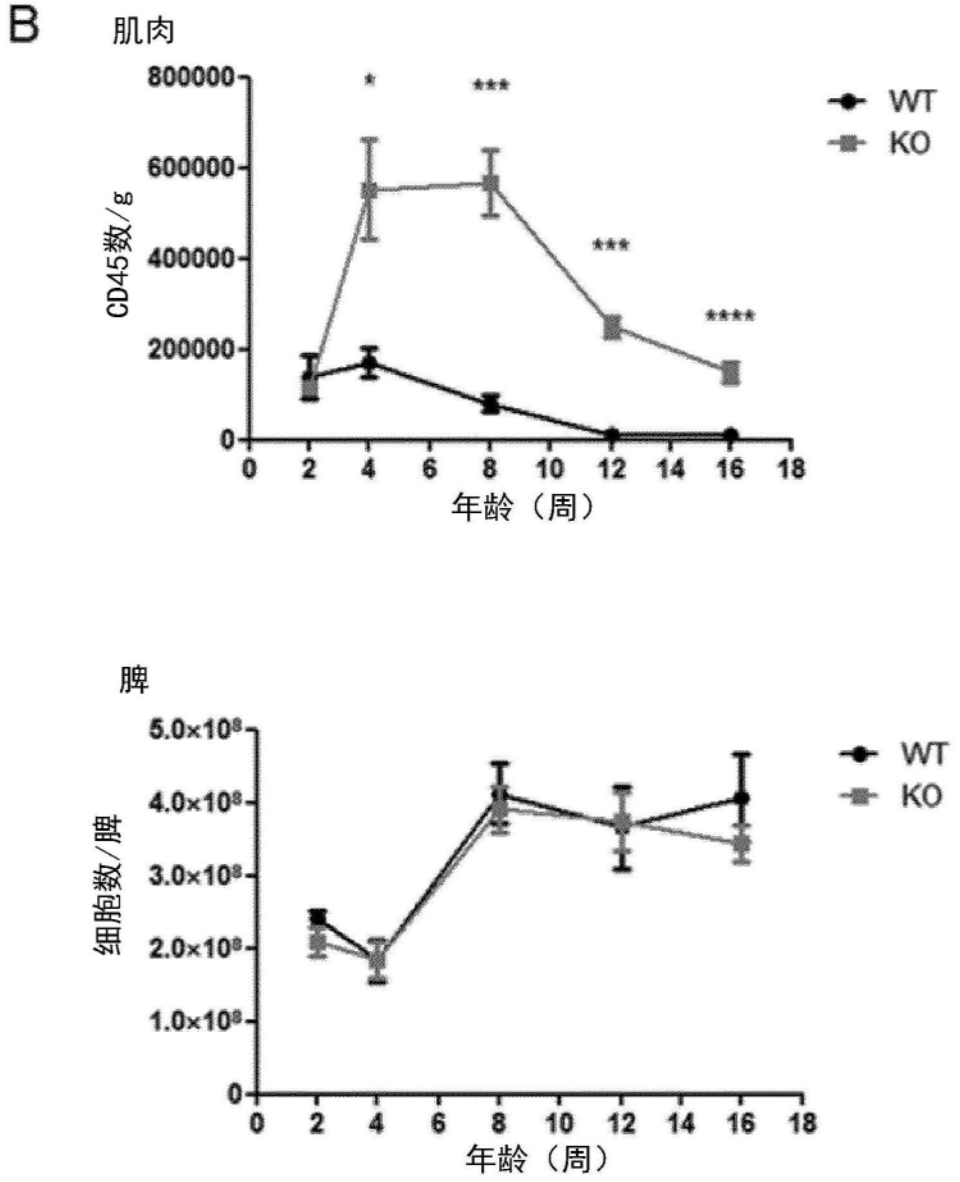

B
肌肉
CD45数/g
800000
600000
400000
200000
0
*
***
***
****
WT
KO
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
年龄（周）
脾
细胞数/脾
5.0×10⁸
4.0×10⁸
3.0×10⁸
2.0×10⁸
1.0×10⁸
0
WT
KO
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18
年龄（周）

图1B

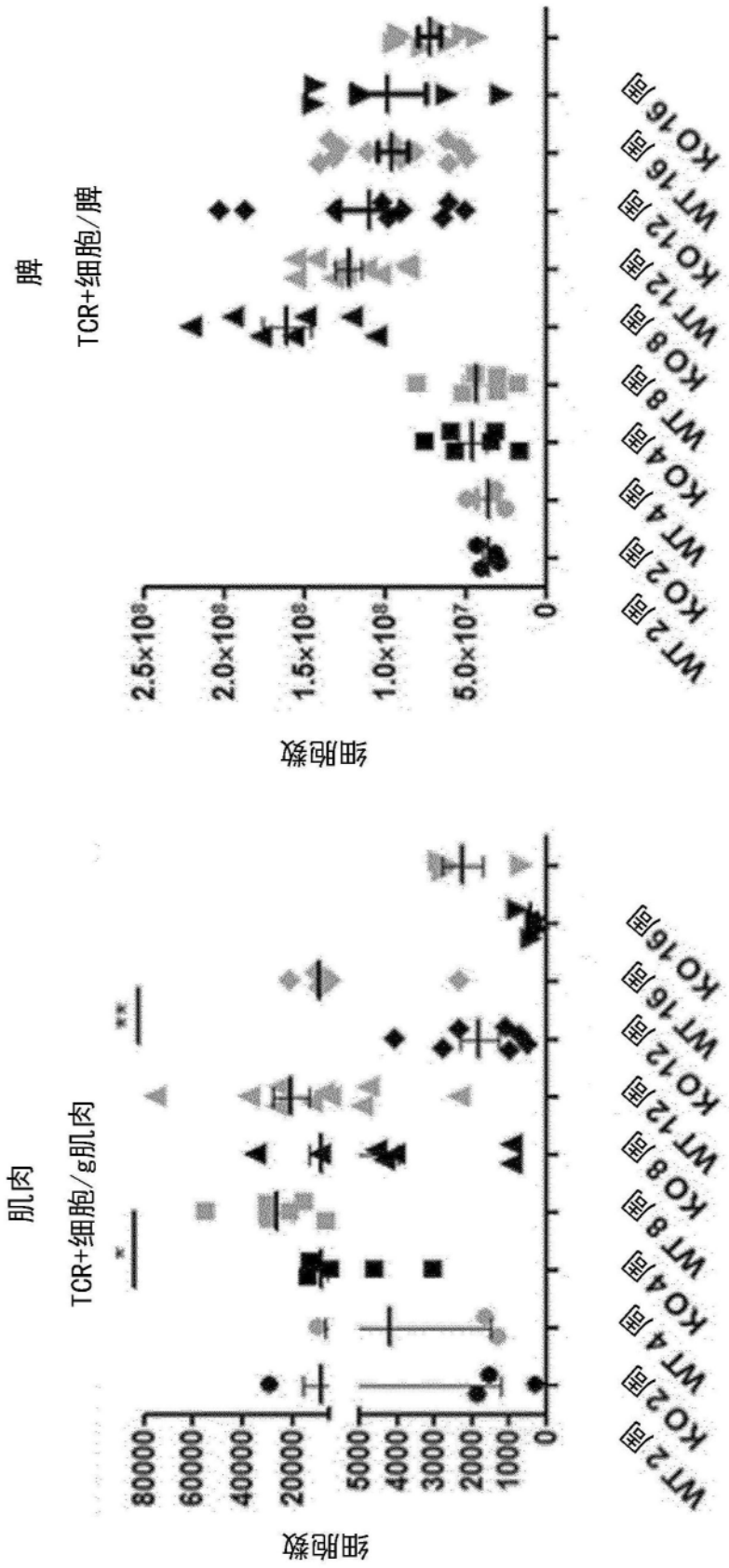

脾
TCR+细胞/脾
细胞数
2.5×10⁸
2.0×10⁸
1.5×10⁸
1.0×10⁸
5.0×10⁷
0
WT 2周
KO 2周
WT 4周
KO 4周
WT 8周
KO 8周
WT 12周
KO 12周
WT 16周
KO 16周
肌肉
TCR+细胞/g肌肉
细胞数
80000
60000
40000
20000
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
**
WT 2周
KO 2周
WT 4周
KO 4周
WT 8周
KO 8周
WT 12周
KO 12周
WT 16周
KO 16周

图2

脾

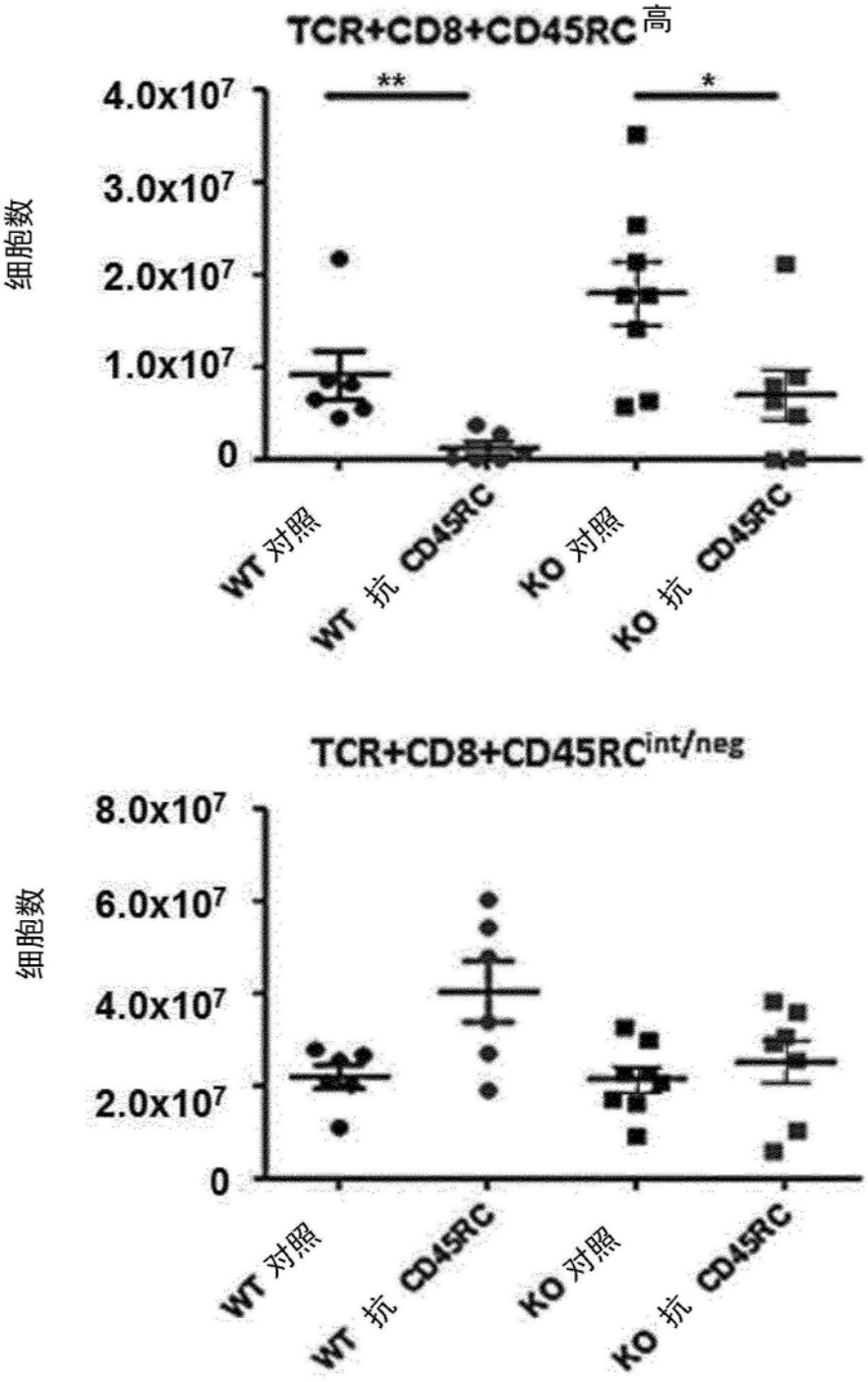

TCR+CD8+CD45RC高
细胞数
4.0x10^7
3.0x10^7
2.0x10^7
1.0x10^7
0
**
*
WT 对照
WT 抗 CD45RC
KO 对照
KO 抗 CD45RC
TCR+CD8+CD45RCint/neg
细胞数
8.0x10^7
6.0x10^7
4.0x10^7
2.0x10^7
0
WT 对照
WT 抗 CD45RC
KO 对照
KO 抗 CD45RC

图3

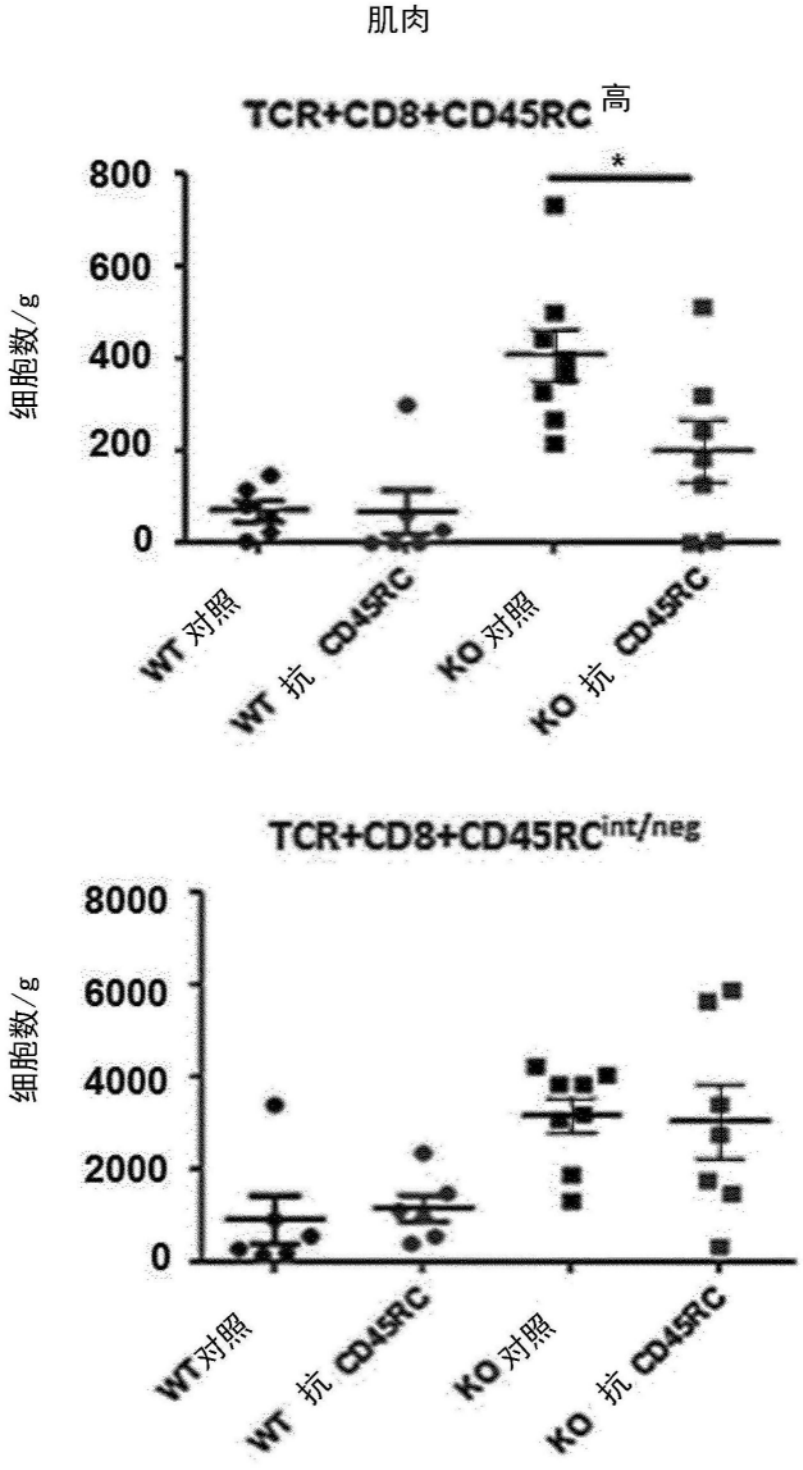

肌肉
TCR+CD8+CD45RC 高
细胞数/g
800
600
400
200
0
*
WT 对照
WT 抗 CD45RC
KO 对照
KO 抗 CD45RC
TCR+CD8+CD45RC int/neg
细胞数/g
8000
6000
4000
2000
0
WT对照
WT 抗 CD45RC
KO对照
KO 抗 CD45RC

图3 (续)

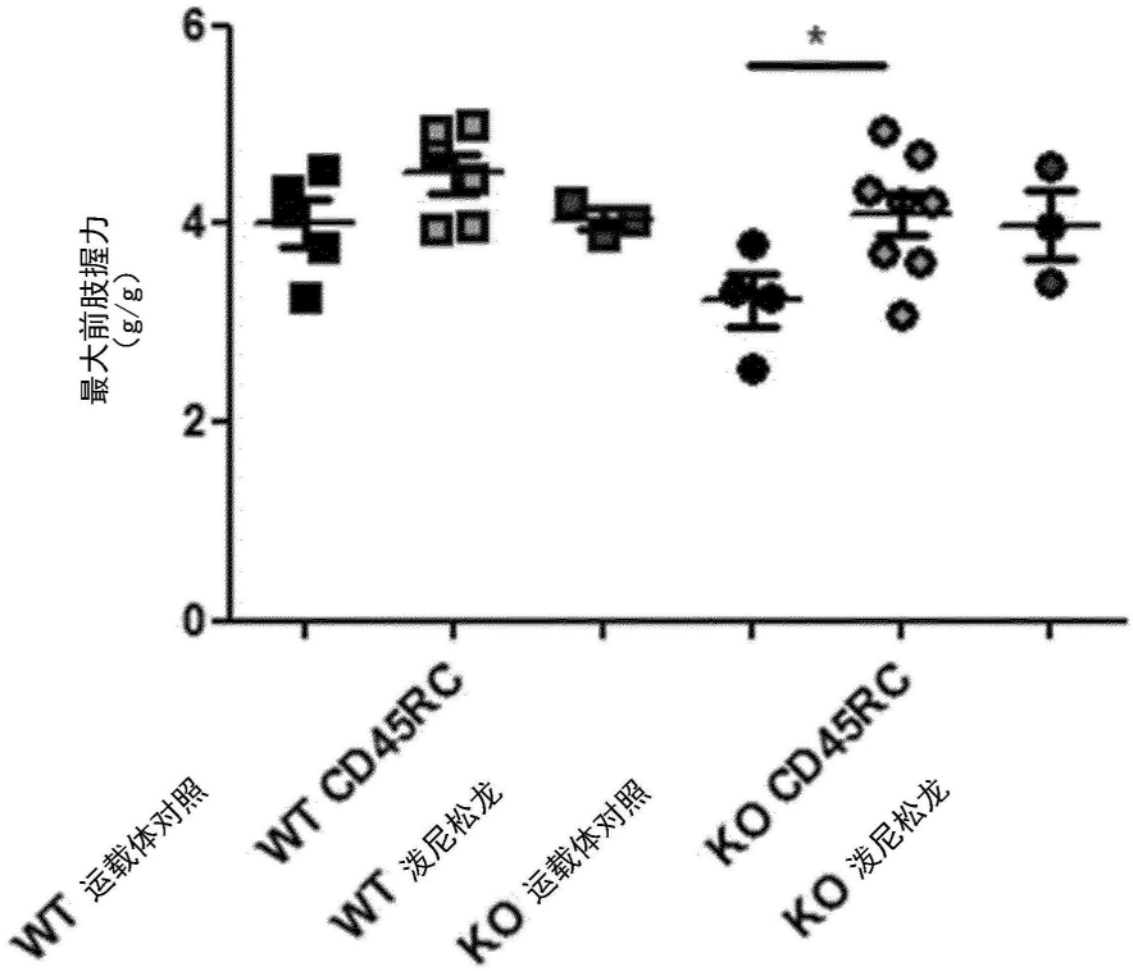

6
4
2
0
最大前肢握力
(g/g)
*
WT 运载体对照
WT CD45RC
WT 泼尼松龙
KO 运载体对照
KO CD45RC
KO 泼尼松龙

图4

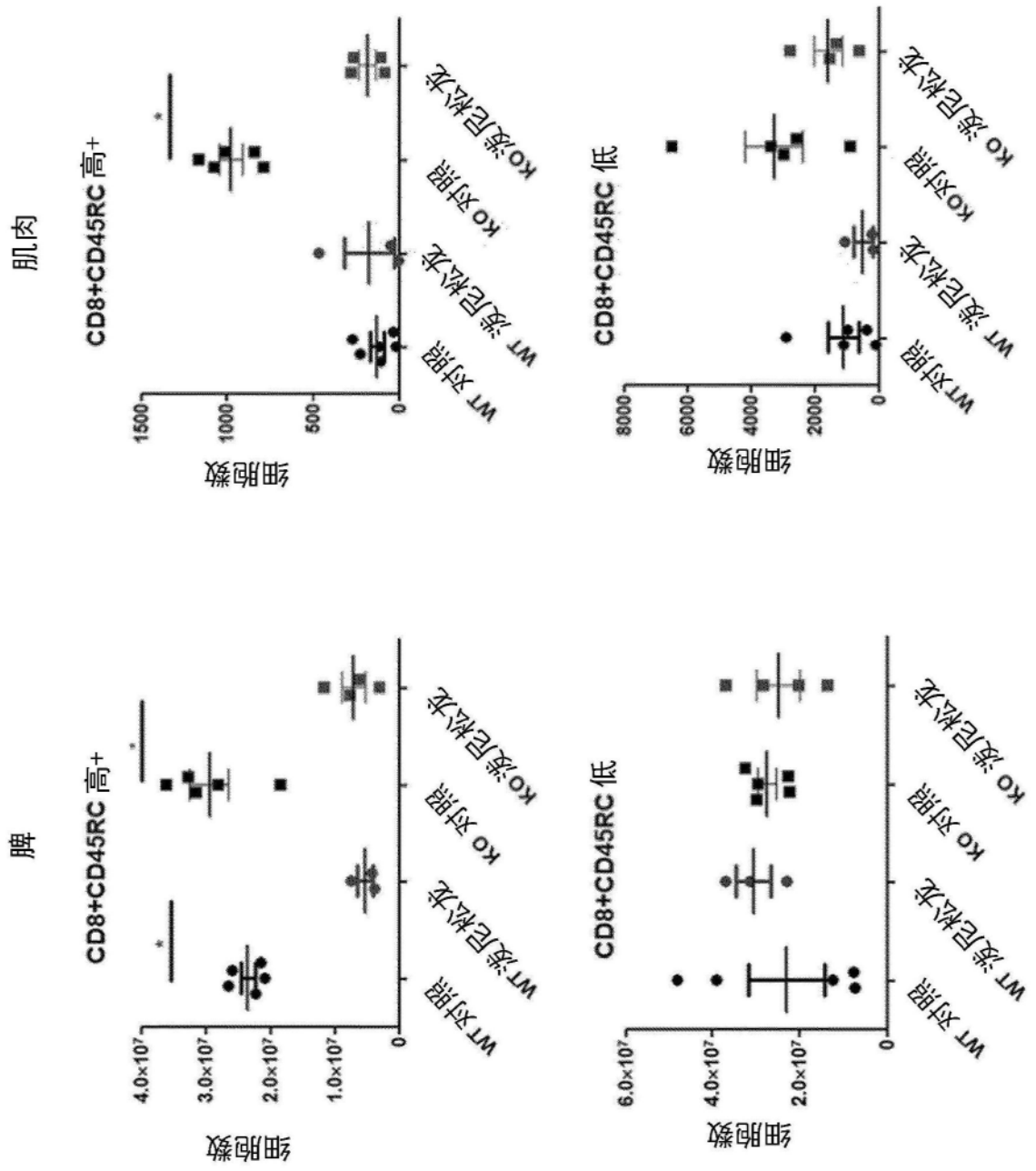

肌肉
脾
CD8+CD45RC 高+
CD8+CD45RC 低
细胞数
WT 对照
WT 淡尼松龙
KO 对照
KO 淡尼松龙
0
500
1000
1500
2000
4000
6000
8000
1.0×10^7
2.0×10^7
3.0×10^7
4.0×10^7
6.0×10^7
*

图5

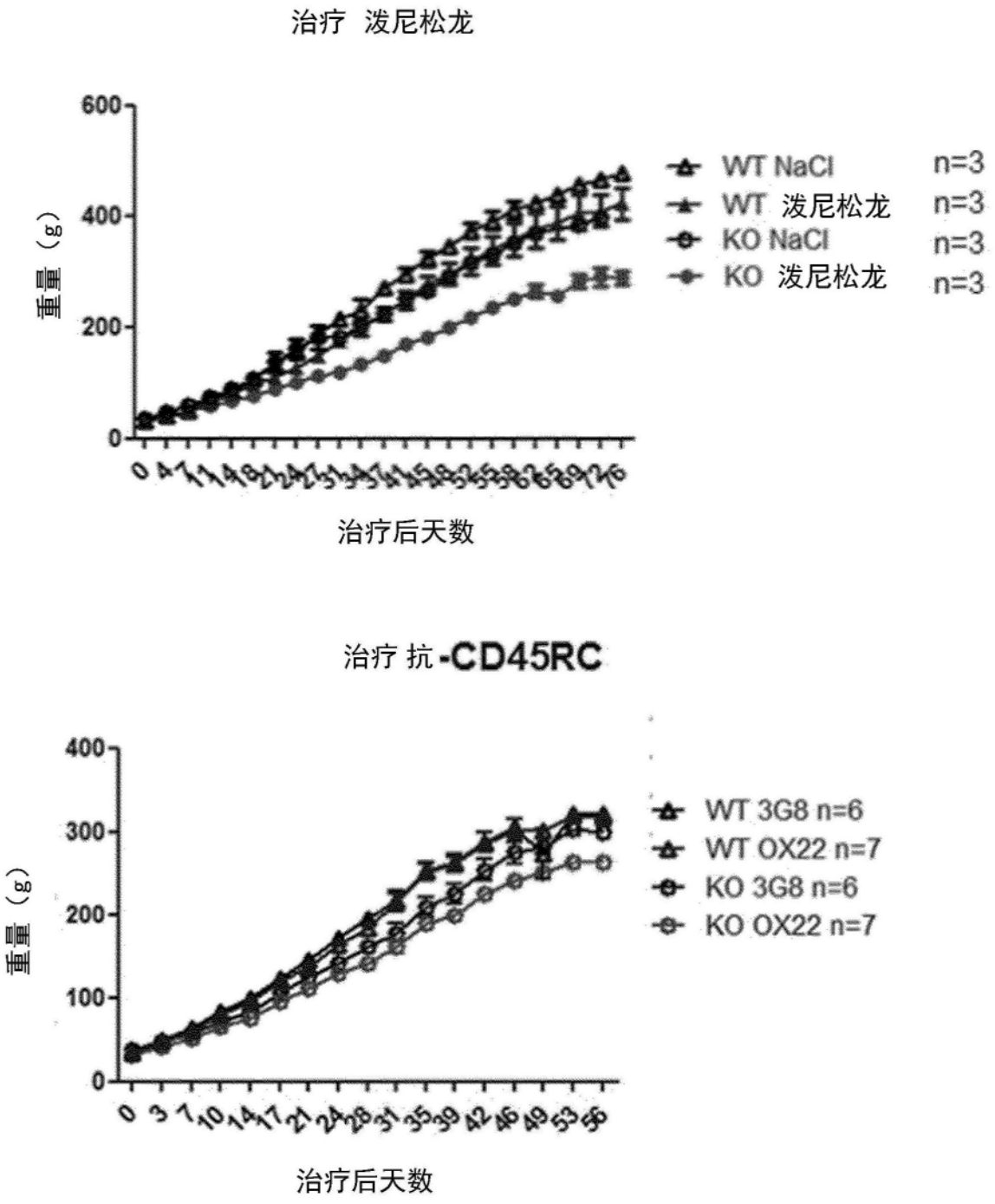

治疗 泼尼松龙
600
400
200
0
重量（g）
WT NaCl n=3
WT 泼尼松龙 n=3
KO NaCl n=3
KO 泼尼松龙 n=3
治疗后天数
治疗 抗-CD45RC
400
300
200
100
0
重量（g）
WT 3G8 n=6
WT OX22 n=7
KO 3G8 n=6
KO OX22 n=7
0 3 7 10 14 17 21 24 28 31 35 39 42 46 49 53 56
治疗后天数

图6

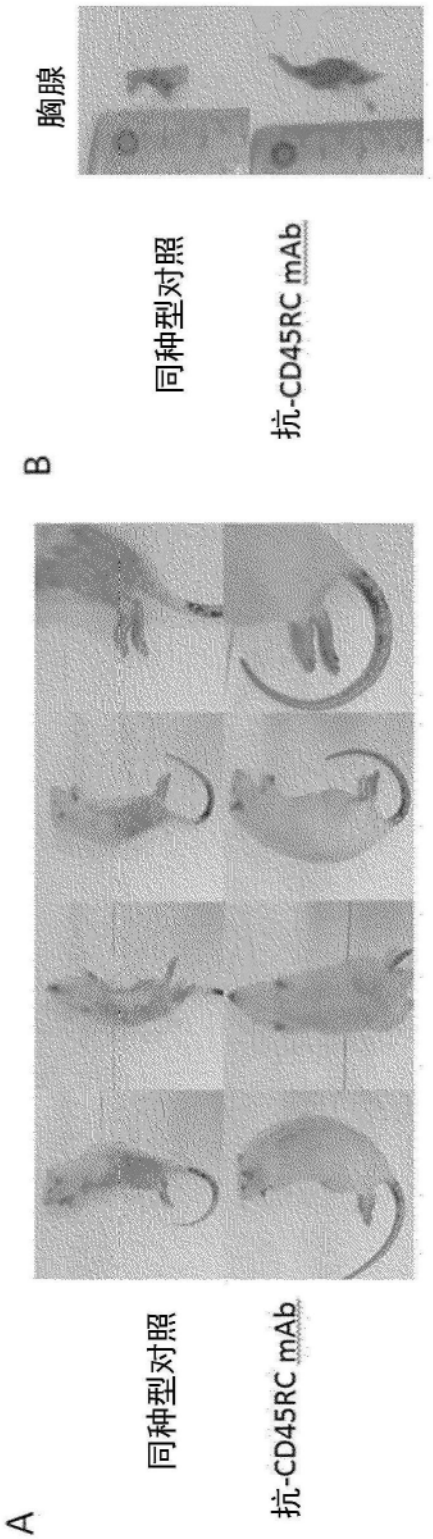


图7A-B

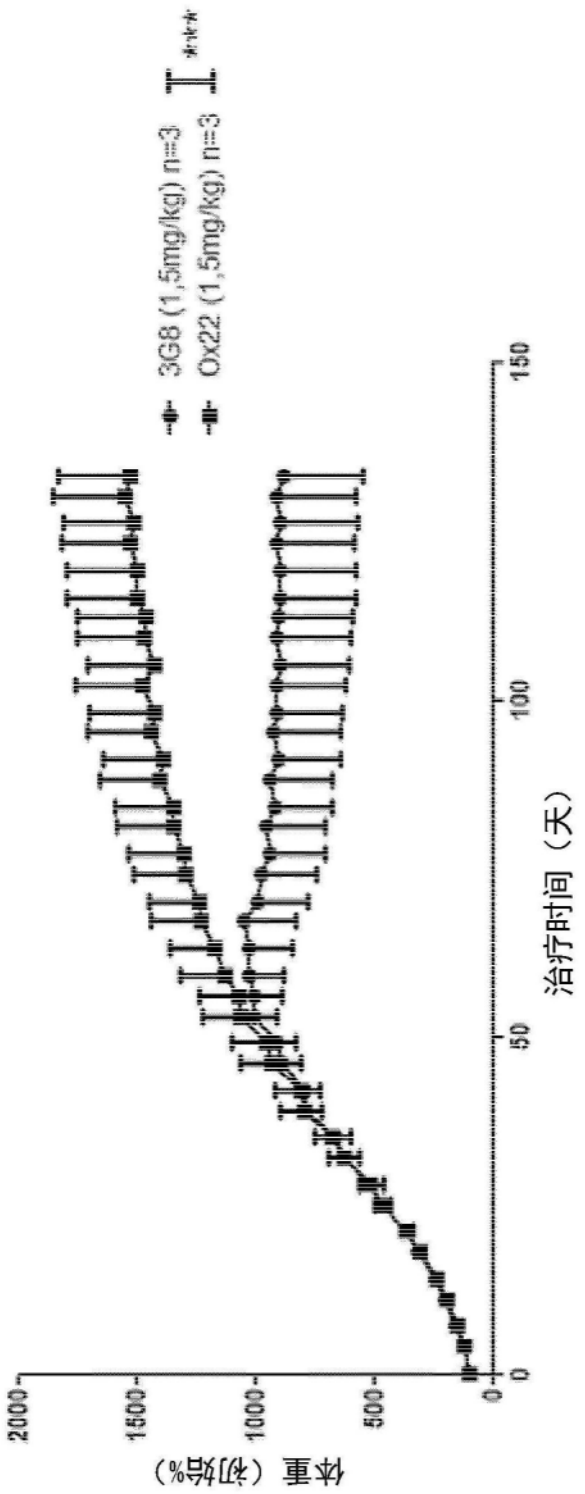

3G8 (1.5mg/kg) n=3
Ox22 (1.5mg/kg) n=3
****
体重（初始%）
2000
1500
1000
500
0
0
50
100
150
治疗时间（天）

图7C

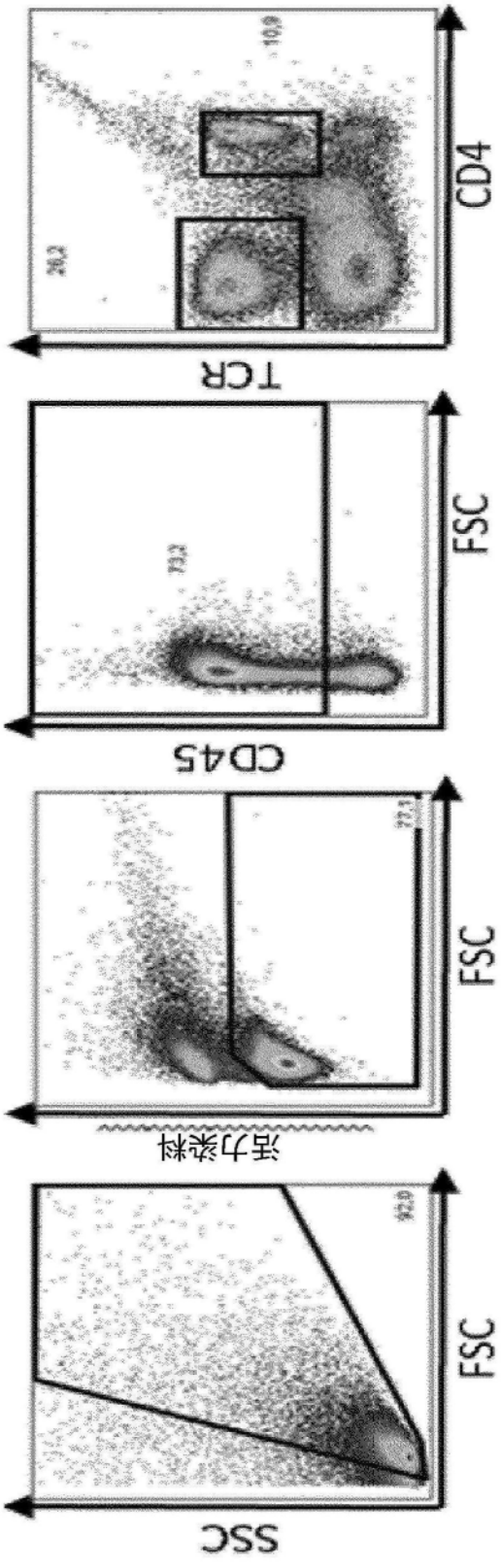


图8

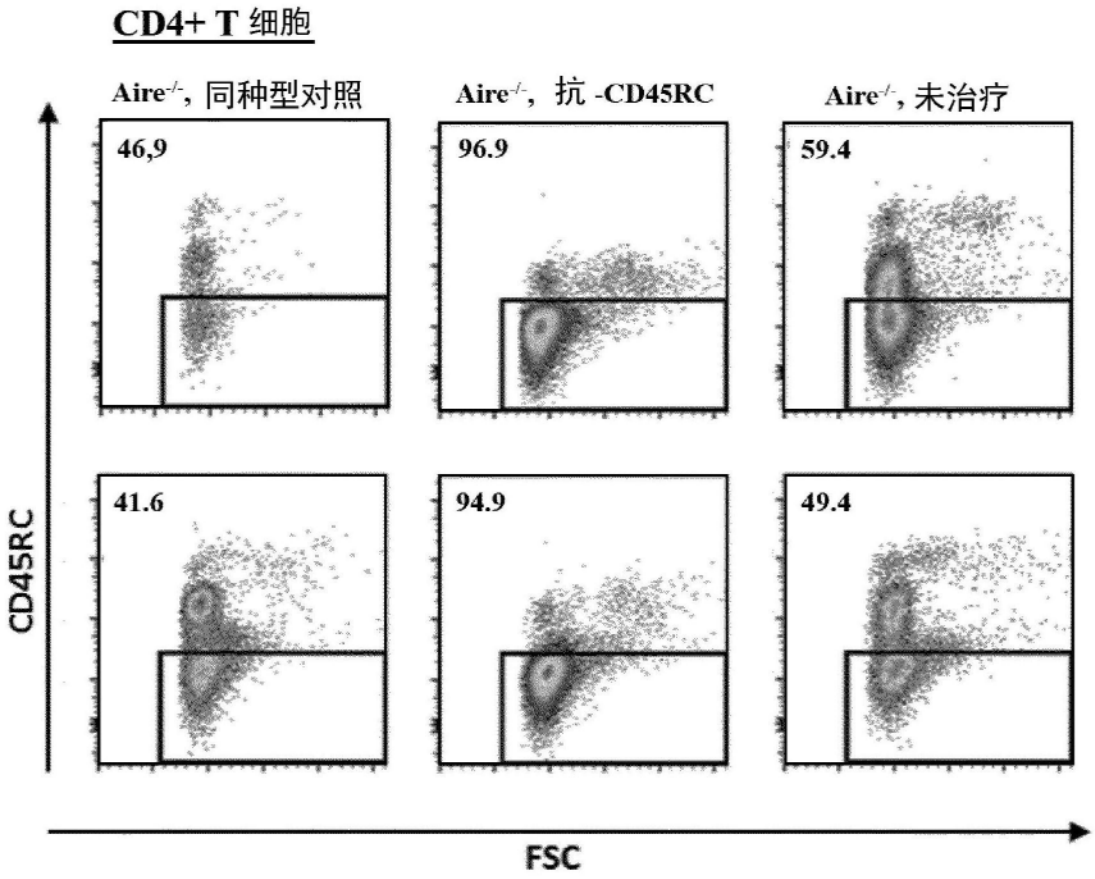

CD4+ T 细胞
Aire-/-, 同种型对照
Aire-/-, 抗 -CD45RC
Aire-/-, 未治疗
46,9
96.9
59.4
41.6
94.9
49.4
CD45RC
FSC

图8(续)

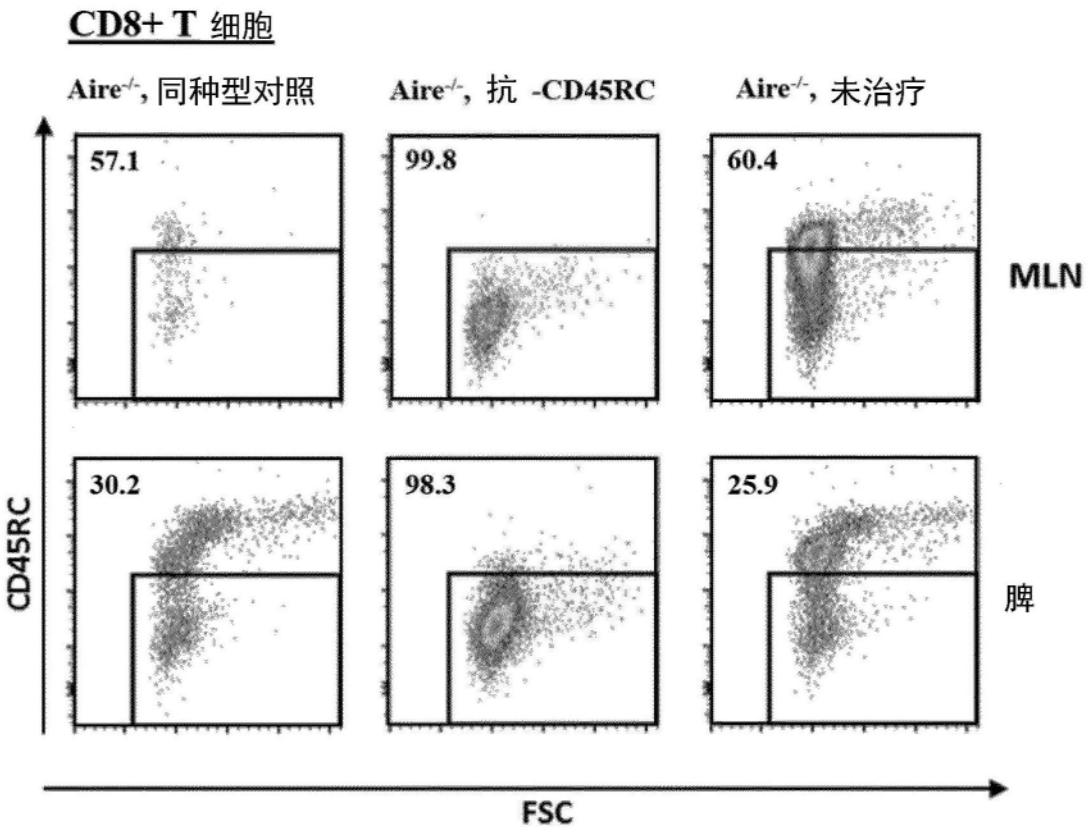

CD8+ T 细胞
Aire-/-, 同种型对照
Aire-/-, 抗 -CD45RC
Aire-/-, 未治疗
57.1
99.8
60.4
MLN
30.2
98.3
25.9
脾
CD45RC
FSC

图8(续)

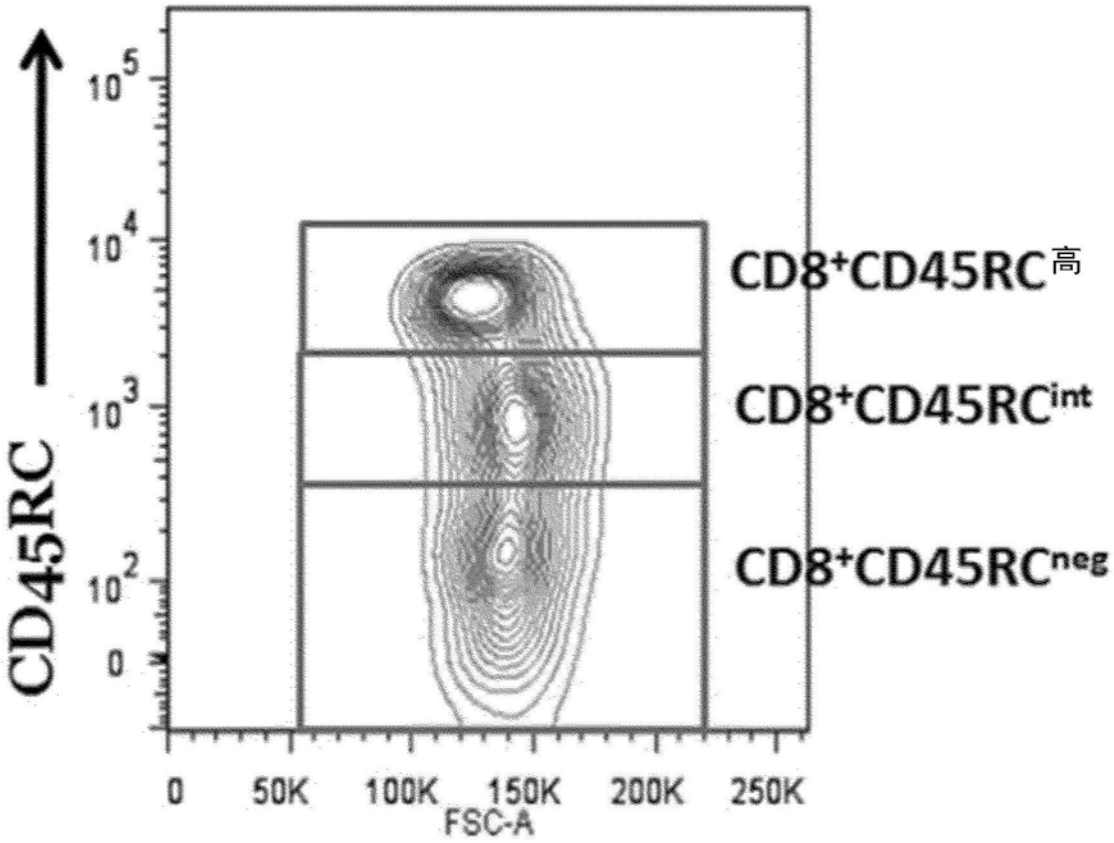
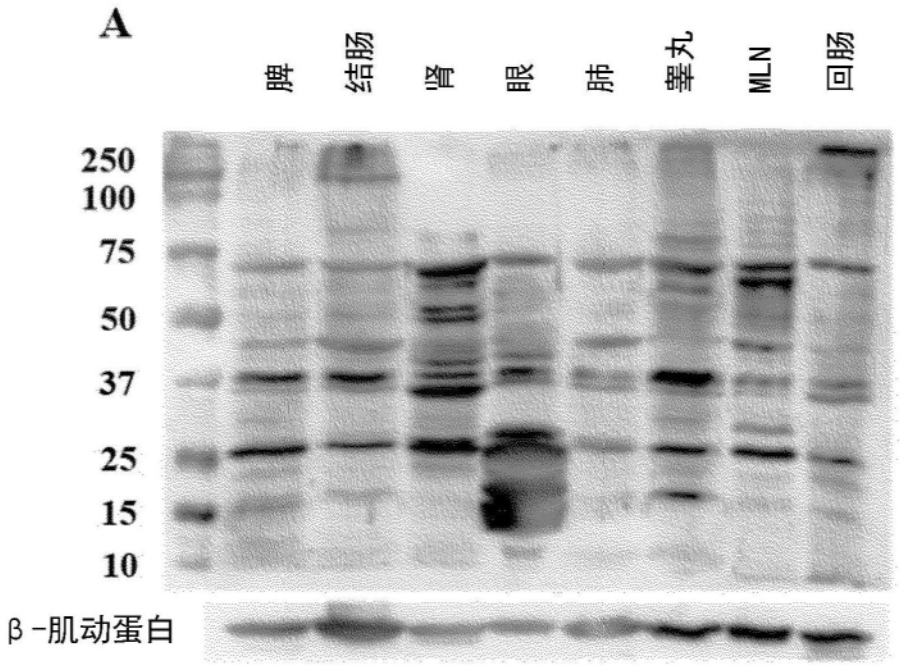

CD45RC
10^5
10^4
10^3
10^2
0
0
50K
100K
150K
200K
250K
FSC-A
CD8+CD45RC高
CD8+CD45RCint
CD8+CD45RCneg

图9


A
脾
结肠
肾
眼
肺
睾丸
MLN
回肠
250
100
75
50
37
25
15
10
β-肌动蛋白

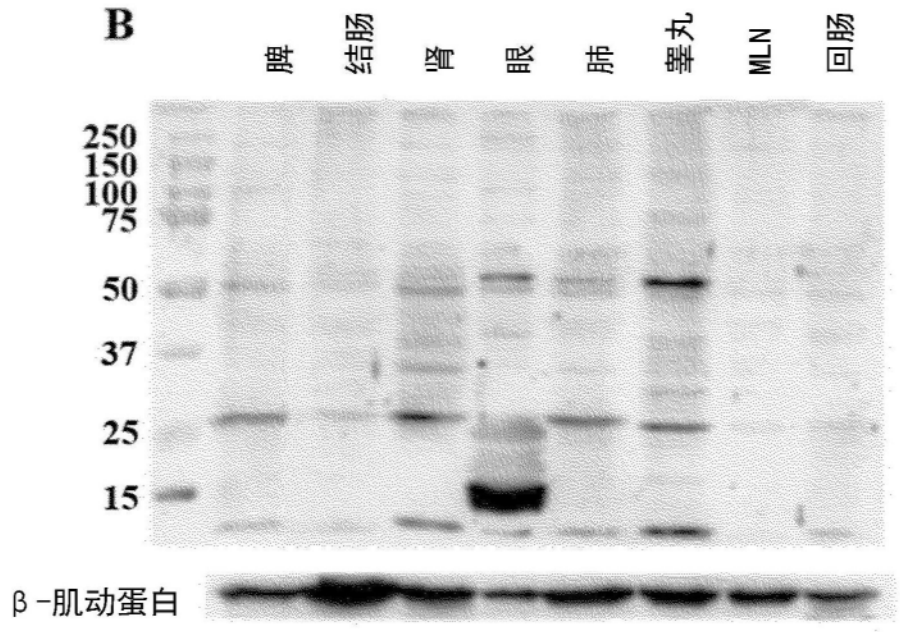

B
脾
结肠
肾
眼
肺
睾丸
MLN
回肠
250
150
100
75
50
37
25
15
β-肌动蛋白

图10

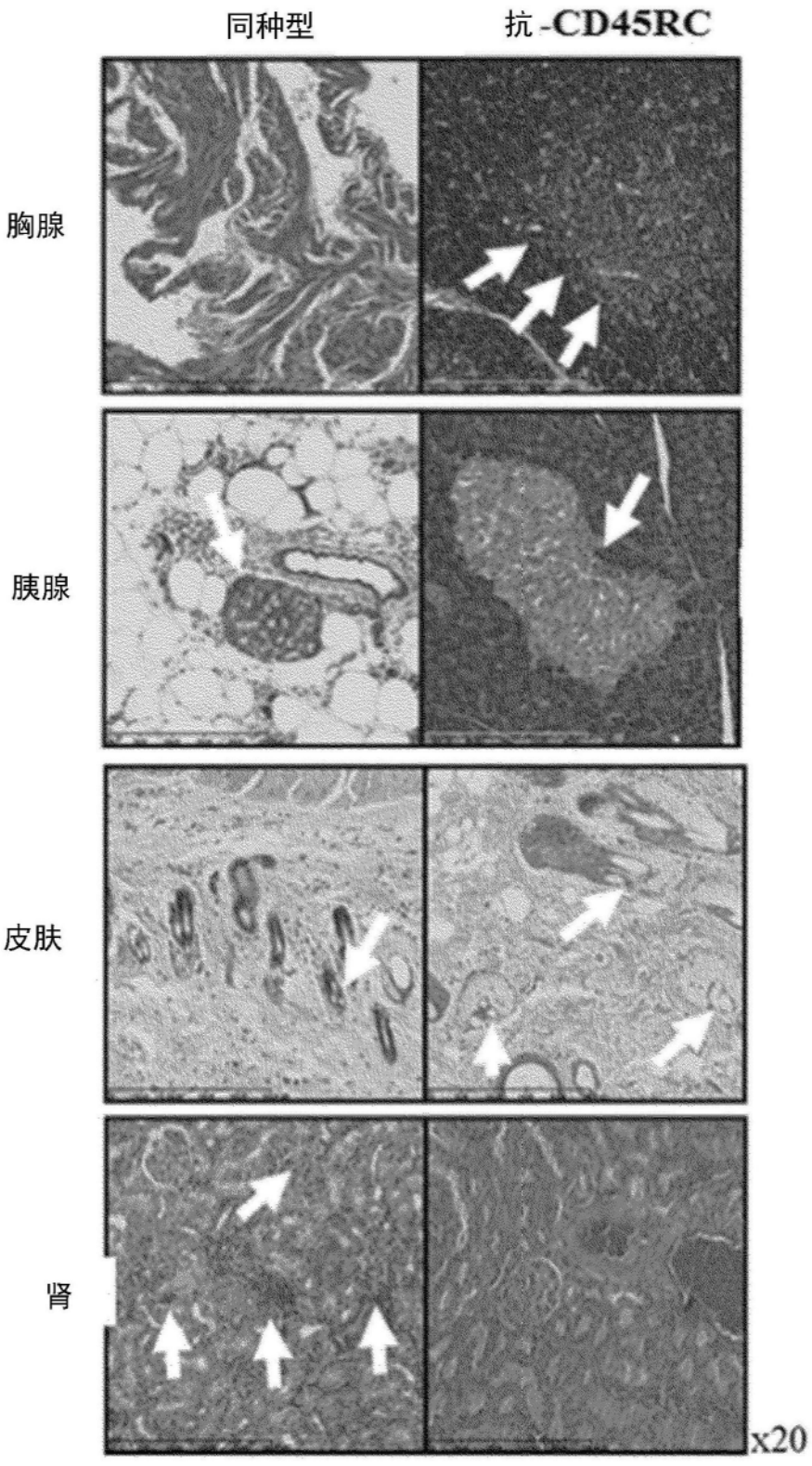


图11