(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114450068 A
(43)申请公布日 2022.05.06

(21)申请号 202080067788.1
(22)申请日 2020.07.24
(30)优先权数据
2019902642 2019.07.25 AU
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.25
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/043619 2020.07.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/016601 EN 2021.01.28
(71)申请人 因普利西特生物科学有限公司
地址 澳大利亚昆士兰州
(72)发明人 布莱恩·W·齐格拉尔
大卫·T·克罗
加里·卢埃林·雷德里希
(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 李敏春 郑霞
(51)Int.Cl.
A61P 25/02(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61K 38/00(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)

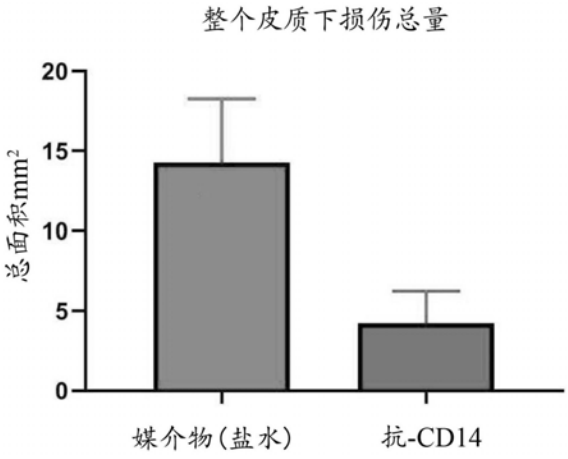
权利要求书5页 说明书23页
序列表10页 附图5页

(54)发明名称

用于治疗急性神经炎性损伤的方法和剂

(57)摘要

本公开总体涉及用于治疗急性神经炎性损伤的方法和剂,所述急性神经炎性损伤诸如中风(例如缺血性中风或出血性中风)、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脑出血。具体而言,本公开涉及CD14拮抗剂抗体用于治疗急性神经炎性损伤的用途。



CN 114450068 A

1.一种用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的方法,所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向所述受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体,其中在损伤后至多48小时向所述受试者施用所述抗体。

2.一种用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的方法,所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向所述受试者全身施用有效量的CD14拮抗剂抗体,其中所述抗体被单独施用。

3.一种用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的方法,所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向所述受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体,其中所述抗体作为单剂量被施用。

4.一种治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的方法,所述方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向所述受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体,其中所述CD14拮抗剂抗体选自:

(i)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7](3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8](3C10 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9](3C10 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10](3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11](3C10 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GYYDYHY[SEQ ID NO:12](3C10 H-CDR3);

(ii)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13](28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14](28C5 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15](28C5 L-CDR3);b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16](28C5 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17](28C5 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18](28C5 H-CDR3);以及

(iii)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19](18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20](18E12 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21](18E12 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22](18E12 H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23](18E12 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24](18E12 H-CDR3)。

5.根据权利要求2-4中任一项所述的方法,其中所述抗体在损伤后至多48小时向所述受试者施用。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述抗体在损伤后至多12小时、18小时或24小时向所述受试者施用。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述抗体在损伤后2小时与48小时之间、4小时与48小时之间、6小时与48小时之间、2小时与24小时之间、4小时与24小时之间、6

小时与24小时之间、2小时与18小时之间、4小时与18小时之间、6小时与18小时之间、2小时与12小时之间、4小时与12小时之间或6小时与12小时之间向所述受试者施用。

8.根据权利要求1、2和4-7中任一项所述的方法，其中所述抗体作为单剂量被施用。

9.根据权利要求1、2、3和5-8中任一项所述的方法，其中所述抗体选自：

(i)包含以下的抗体：a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段，其中：L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7](3C10 L-CDR1)；L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8](3C10 L-CDR2)；并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9](3C10 L-CDR3)；以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段，其中：H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10](3C10 H-CDR1)；H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11](3C10 H-CDR2)；并且H-CDR3包含序列GYYDYHY[SEQ ID NO:12](3C10 H-CDR3)；

(ii)包含以下的抗体：a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段，其中：L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13](28C5 L-CDR1)；L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14](28C5 L-CDR2)；并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15](28C5 L-CDR3)；以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段，其中：H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16](28C5 H-CDR1)；H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17](28C5 H-CDR2)；并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18](28C5 H-CDR3)；以及

(iii)包含以下的抗体：a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段，其中：L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19](18E12 L-CDR1)；L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20](18E12 L-CDR2)；并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21](18E12 L-CDR3)；以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段，其中：H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22](18E12 H-CDR1)；H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23](18E12 H-CDR2)；并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24](18E12 H-CDR3)。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的方法，其中所述抗体选自：

(i)包含以下的抗体：

包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VL结构域：QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGNSFMHWYQQKAGQPPKSSIYRAANLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFCQQSYEDPWTFGGGTKLGNQ[SEQ ID NO:1](3C10 VL)；和

包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域：LVKPGGSLKLSCVASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGTTYYPDNVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARGYYDYHYWGQGTTLTVSS[SEQ ID NO:2](3C10 VH)；

(ii)包含以下的抗体：

包含以下序列以下序列组成、由或基本上由以下序列组成的VL结构域：QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCCQQSNEDPTTFGGGTKLEIK[SEQ ID NO:3](28C5 VL)；和

包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域：LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDT

ATYYCVRGLRFAYWGQGTLVTVSA[SEQ ID NO:4](28C5 VH);以及

(iii)包含以下的抗体:

包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VL结构域:QTPSSLSASLGDRVTISCRASQDIKNYLNWYQQPGGTVKVLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQRGDTLPWTFGGGTKLEIK[SEQ ID NO:5](18E12 VL);和

包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域:LESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTNYDISWIRQPPGKGLEWLGVIWTSGGTNYNSAFMSRLSITKDNSESQVFLKMNGLQTDDTGIYYCVRGDGNFYLYNFDYWGQGTTLTVSS[SEQ ID NO:6](18E12 VH)。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述抗体是人源化的或嵌合的。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述抗体包含轻链和重链,其中:

所述轻链包含氨基酸序列:METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC[SEQ ID NO:25];并且

所述重链包含氨基酸序列:MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK[SEQ ID NO:26]。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述抗体是IC14抗体。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述急性神经炎性损伤选自中风(例如缺血性中风或出血性中风)、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脑出血。

15.CD14拮抗剂抗体在制备用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的药物中的用途,其中所述抗体在损伤后至多48小时向所述受试者施用。

16.CD14拮抗剂抗体在制备用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的药物中的用途,其中所述药物被配制用于向受试者全身施用,并且其中所述药物不包含其他活性剂并且所述药物被单独施用至所述受试者。

17.CD14拮抗剂抗体在制备用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的药物中的用途,其中所述药物以单剂量被施用至所述受试者。

18.CD14拮抗剂抗体在制备用于治疗人受试者中的急性神经炎性损伤的药物中的用途,其中所述抗体选自:

(i)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7](3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8](3C10 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9](3C10 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10](3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列

SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11](3C10 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GYYDYHY[SEQ ID NO:12](3C10 H-CDR3);

(ii)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13](28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14](28C5 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15](28C5 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16](28C5 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17](28C5 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18](28C5 H-CDR3);以及

(iii)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19](18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20](18E12 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21](18E12 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22](18E12 H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23](18E12 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24](18E12 H-CDR3)。

19.根据权利要求15-18中任一项所述的用途,其中所述抗体包含轻链和重链,其中:

所述轻链包含氨基酸序列:METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC[SEQ ID NO:25];并且

所述重链包含氨基酸序列:MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK[SEQ ID NO:26]。

20.根据权利要求15-19中任一项所述的用途,其中所述抗体是IC14抗体。

21.根据权利要求15-20中任一项所述的用途,其中所述药物在损伤后至多48小时向所述受试者施用。

22.根据权利要求14-21中任一项所述的用途,其中所述药物在损伤后至多12小时、18小时或24小时向所述受试者施用。

23.根据权利要求14-22中任一项所述的用途,其中所述抗体在损伤后2小时与48小时之间、4小时与48小时之间、6小时与48小时之间、2小时与24小时之间、4小时与24小时之间、6小时与24小时之间、2小时与18小时之间、4小时与18小时之间、6小时与18小时之间、2小时与12小时之间、4小时与12小时之间或6小时与12小时之间向所述受试者施用。

24.根据权利要求15、16和18-23中任一项所述的用途,其中所述药物作为单剂量被施用。

25.根据权利要求15-24中任一项所述的用途,其中所述急性神经炎性损伤选自中风(例如缺血性中风或出血性中风)、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脑出血。

用于治疗急性神经炎性损伤的方法和剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年7月25日提交的题为“Methods and agents for treating acute neuroinflammatory injury”的澳大利亚临时申请第2019902642号的优先权，该澳大利亚临时申请的内容通过引用以其整体并入本文。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。该序列表作为于2020年7月24日创建的题为229752008140SeqList.TXT的文件提供，该文件的大小为15,258字节。该电子格式的序列表中的信息通过引用以其整体并入。

发明领域

[0005] 本公开总体涉及用于治疗急性神经炎性损伤的方法和剂，所述急性神经炎性损伤诸如中风(例如缺血性中风或出血性中风)、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脑出血。具体而言，本公开涉及CD14拮抗剂抗体用于治疗急性神经炎性损伤的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 中风是世界上导致死亡和失能的主要原因，并且在发达国家被列为首要神经系统疾病负担。中风由脑血管阻塞或破裂引起。脑血流中断导致神经损伤和不可逆的长期感觉运动缺陷。这种损伤由能量耗竭、兴奋性毒性、梗死周围去极化、炎症和程序性细胞死亡引起。存在两种常见的中风类型：(i)缺血性中风，其由向脑部的血流的暂时或永久阻塞引起，并且占中风病例的85％；和(ii)出血性中风，其由血管破裂引起，并且占其余病例的大部分。缺血性中风最常见的原因是大脑中动脉(颈内动脉下游的颅内动脉)闭塞，这损伤大脑。这样的损伤导致偏瘫、半身麻醉，并且取决于受损的大脑半球，导致语言或视觉空间缺陷。仅约50％的出血性中风患者存活，并且85％的缺血性中风患者存活。然而，因完全康复在仅10％左右，大多数中风患者经受长期的使人衰弱的对其身体、心理和社会安宁健康的损伤。

[0008] 中风成为这样的导致死亡和失能的主要原因之一是缺乏合适且有效的治疗。除了再通之外，不存在其他用于急性期中风的治疗。对于患有缺血性中风的患者，恢复向脑受影响区域的血流的早期治疗可以限制损伤程度并增加患者恢复的机会。这种治疗可以包括溶栓(例如通过静脉内施用组织纤溶酶原激活剂)或血栓切除术(其包括从脑中物理去除凝块)。虽然已经显示在症状发作后至多4.5小时应用的溶栓改进恢复，但非常少的中风患者受益于这种治疗，主要是由于入院延迟或发作时间未知。同样值得关注的事实是，在中风后超过3小时应用的溶栓具有显著相关的出血风险。因此，存在通常的在中风后3至4.5小时应用溶栓的短窗口。据估计，在入院的中风患者中，少于15％的中风患者因此有资格接收溶栓。对血栓切除术有资格的中风患者百分比甚至更低，约为10％。

[0009] 因此，对于用于治疗中风和其他急性神经炎性损伤的另外的剂和方法仍然存在需求。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明部分地源于靶向分化簇14(CD14)(诸如通过施用(例如全身施用)抗CD14拮

抗剂抗体)可以治疗中风并且预防、降低或改善中风的相关症状(诸如梗死面积、功能衰退、神经功能缺陷和水肿)的令人惊讶的确定。令人惊讶的是,如本文展示的,仅用单剂量拮抗剂抗体靶向CD14(例如在中风后6小时时)显著降低神经功能缺陷、功能衰退和梗死面积。相反,延长的剂量方案(诸如7天)不太有效。

[0012] 缺氧神经元,诸如中风引起的缺氧神经元,产生多种类型的损伤相关分子模式(DAMP),所述损伤相关分子模式(DAMP)激活位于小胶质细胞、单核细胞(monocytes)和外周巨噬细胞(固有免疫细胞)上的Toll样受体(TLR)及其辅助受体CD14。将DAMP/CD14/TLR轴衔接起来激活小胶质细胞/巨噬细胞并且促进介导损伤的促炎细胞因子释放。多个TLR在神经元损伤中被多个DAMP激活,每个DAMP都导致中风结果。然而,这些DAMP/TLR相互作用中的许多需要与CD14共激活以用于有效信号传导。不受理论束缚,建议在急性期(例如损伤后至多48小时)或早期亚急性期(例如损伤后至多4天)靶向CD14调节中风或其他急性神经炎症损伤后DAMP驱动的神经炎症,从而减轻中风或其他急性神经炎症损伤的症状。相反,在后期亚急性期或慢性期(即损伤后4天之后)靶向CD14可能是不期望的,因为CD14+免疫细胞可能是这一时期神经修复和神经再生的重要贡献者。

[0013] 然而,如本文展示的,在中风或其他急性神经炎性损伤的情况下用抗CD14拮抗剂抗体减弱DAMP/CD14 TLR轴的结果在先前公布的研究看来是根本不可预测的。例如,已经显示,通过基因消融对CD14的调节导致中风小鼠模型中更大的梗死和更差的结果(Janova等人,Glia,2016,64,635-649)。

[0014] 中风后6小时仅单剂量抗CD14拮抗剂抗体的施用有效不仅令人惊讶,而且也具有重要的临床意义。大多数中风患者直到中风后6-12小时才会被诊断。因此,最早的中风干预应在中风后最少6小时时有效。目前的溶栓治疗仅能够在中风后3小时至4.5小时内使用,因为在这段时间之后脑中可能出血。因此,在中风后6小时或更多小时有效的抗CD14拮抗剂抗体的使用代表对目前中风治疗的显著临床改进,并且进一步代表其他急性神经炎性损伤,诸如缺氧缺血性脑损伤,创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脑出血的潜在新治疗。

[0015] 因此,在一方面,本公开提供了一种用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的方法,该方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体,其中所述抗体在损伤后至多48小时向受试者施用。

[0016] 在另一方面,本公开提供了一种用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的方法,该方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向受试者全身施用有效量的CD14拮抗剂抗体,其中抗体被单独施用。在一些实施方案中,抗体在损伤后至多48小时向受试者施用。

[0017] 本公开的另一方面提供了一种用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的方法,该方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体,其中抗体作为单剂量被施用。在一些实施方案中,抗体在损伤后至多48小时向受试者施用。

[0018] 在另外的方面,本公开提供了一种治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的方法,该方法包括以下、由以下组成或基本上由以下组成:向受试者施用有效量的CD14拮抗剂抗体,其中CD14拮抗剂抗体选自:(i)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7]

(3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8](3C10 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9](3C10 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10](3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11](3C10 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GYYDYHY[SEQ ID NO:12](3C10 H-CDR3);(ii)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13](28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14](28C5 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15](28C5 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16](28C5 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17](28C5 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18](28C5 H-CDR3);以及(iii)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:[19](18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20](18E12 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21](18E12 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22](18E12 H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23](18E12 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24](18E12 H-CDR3)。在一些实施方案中,抗体在损伤后至多48小时向受试者施用。

[0019] 在以上方法的特定实施方案中,抗体在损伤后至多12小时、18小时或24小时向受试者施用。例如,抗体可以在损伤后2小时与48小时之间、4小时与48小时之间、6小时与48小时之间、2小时与24小时之间、4小时与24小时之间、6小时与24小时之间、2小时与18小时之间、4小时与18小时之间、6小时与18小时之间、2小时与12小时之间、4小时与12小时之间或6小时与12小时之间向受试者施用。在另外的实施方案中,抗体作为单剂量施用。

[0020] 在一些实施方案中,抗体选自:(i)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7](3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8](3C10 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9](3C10 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10](3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11](3C10 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GYYDYHY[SEQ ID NO:12](3C10 H-CDR3);(ii)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13](28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14](28C5 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15](28C5 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16](28C5 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17](28C5 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18](28C5 H-CDR3);以及(iii)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19](18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20](18E12 L-CDR2);L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21](18E12 L-CDR3);以及

b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段，其中：H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22](18E12 H-CDR1)；H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23](18E12 H-CDR2)；并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24](18E12 H-CDR3)。

[0021] 例如，抗体可以选自：(i)包含以下的抗体：包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VL结构域：QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGNSFMHWYQQKAGQPPKSSIYRAANLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFCQQSYEDPWTFGGGTKLGNQ[SEQ ID NO:1](3C10 VL)；和包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域：LVKPGGSLKLSCVASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGTTYYPDNVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARGYYDYHYWGQGTTLTVSS[SEQ ID NO:2](3C10 VH)；(ii)包含以下的抗体：包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的L结构域：QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCCQQSNEDPTTFGGGTKLEIK[SEQ ID NO:3](28C5 VL)；和包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域：LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTLVTVSA[SEQ ID NO:4](28C5 VH)；以及(iii)包含以下的抗体：包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VL结构域：QTPSSLSASLGDRVTISCRASQDIKNYLNWYQQPGGTVKVLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQRGDTLPWTFGGGTKLEIK[SEQ ID NO:5](18E12 VL)；和包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域：LESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTNYDISWIRQPPGKGLEWLGVIWTSGGTNYNSAFMSRLSITKDNSESQVFLKMNGLQTDDTGIYYCVRGDGNFYLYNFDYWGQGTTLTVSS[SEQ ID NO:6](18E12 VH)。在特定实施方案中，抗体是人源化的或嵌合的。在一个实例中，抗体包含轻链和重链，其中：轻链包含氨基酸序列：METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC[SEQ ID NO:25]；并且重链包含氨基酸序列：MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK[SEQ ID NO:26]。在特定实例中，抗体是IC14抗体。

[0022] 在以上方法中，急性神经炎性损伤可以选自例如中风(例如缺血性中风或出血性中风)、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脑出血。

[0023] 本文还提供了CD14拮抗剂抗体在制备用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤(例如中风，诸如缺血性中风或出血性中风、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血或脑出血)的药物中的用途)，其中抗体在损伤后最多48小时向受试者施用。

[0024] 在另一方面，提供了CD14拮抗剂抗体在制备用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤(例如中风，诸如缺血性中风或出血性中风、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血或脑出血)的药物中的用途，其中药物被配制用于向受试者全身施用，并且其中

药物不包含另外的活性剂。在一种实施方案中，药物在损伤后至多48小时向受试者施用。

[0025] 本公开的另一方面提供了CD14拮抗剂抗体在制备用于治疗人类受试者中的急性神经炎性损伤的药物中的用途，其中药物以单剂量被施用至受试者。在一种实施方案中，药物在损伤后至多48小时物被施用至受试者。

[0026] 在另外的方面，本发明提供了CD14拮抗剂抗体在制备用于人类受试者中的治疗急性神经炎性损伤(例如中风，诸如缺血性中风或出血性中风、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血或脑出血)的药物中的用途，其中抗体选自：(i)包含以下的抗体：a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段，其中：L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7](3C10 L-CDR1)；L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8](3C10 L-CDR2)；并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9](3C10 L-CDR3)；以及b)抗体包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的VH结构域或其抗原结合片段，其中：H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10](3C10 H-CDR1)；H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11](3C10 H-CDR2)；并且H-CDR3包含序列GYYDYHY[SEQ ID NO:12](3C10 H-CDR3)；(ii)包含以下的抗体：a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段，其中：L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13](28C5 L-CDR1)；L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14](28C5 L-CDR2)；并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15](28C5 L-CDR3)；以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段，其中：H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16](28C5 H-CDR1)；H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17](28C5 H-CDR2)；并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18](28C5 H-CDR3)；以及(iii)包含以下的抗体：a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段，其中：L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19](18E12 L-CDR1)；L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20](18E12 L-CDR2)；并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21](18E12 L-CDR3)；以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段，其中：H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22](18E12 H-CDR1)；H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23](18E12 H-CDR2)；并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24](18E12 H-CDR3)。在一种实施方案中，药物在损伤后至多48小时向受试者施用。

[0027] 在本公开用途的一个实例中，抗体包含轻链和重链，其中：轻链包含氨基酸序列：METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC[SEQ ID NO:25]；并且重链包含氨基酸序列：MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK[SEQ ID NO:26]。在特定实例中，抗体是IC14抗体。

[0028] 在以上描述的用途的一些实施方案中，药物在损伤后至多12小时、18小时或24小时向受试者施用。在特定实例中，药物在2小时与48小时之间、4小时与48小时之间、6小时与48小时之间、2小时与24小时之间、4小时与24小时之间、6小时与24小时之间、2小时与18小时之间、4小时与18小时之间、6小时与18小时之间、2小时与12小时之间、4小时与12小时之间或6小时与12小时之间向受试者施用。在另一个实例中，药物作为单剂量施用。

[0029] 附图简述

[0030] 本文通过仅非限制性示例的方式参考以下附图描述了本公开的实施方案。

[0031] 图1展示了抗CD14抗体阻断LPS依赖性细胞因子产生。(A)用IC14预处理的人类小胶质细胞(来自单个供体)显示响应于LPS刺激的降低的TNFα。(B)用IC14预处理的人类外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells)显示响应于LPS刺激的IL-6的剂量依赖性降低。(C)用抗CD14 biG53mAb或其F(Ab')2预处理的鼠RAW264.7细胞显示响应于LPS刺激的TNFα的剂量依赖性降低。

[0032] 图2是显示作为中风后6小时的单剂量或7天内的每天剂量用抗CD14的治疗对小鼠中功能衰退的作用的图形表示。抗CD14 $F(Ab')_2$治疗对(A)身体扭转、前肢屈曲、皮毛状况、体重减轻和发声；保持悬挂在线上的能力；和保持在加速转棒仪上的能力的作用，各自在30min大脑中动脉闭塞(MCAO)之后24小时至7天进行评价。(A)用于评价身体扭转、前肢屈曲、皮毛状况、体重减轻和发声的神经评分结果。(B)吊线测试结果。(C)转棒仪结果。数据表示为平均值±S.E.M(n＝5/组)。

[0033] 图3示出了(A)媒介物(PBS)对照和(B)抗CD14治疗的小鼠在MCAO后脑前部至后部的5个水平切片的NeuN染色。

[0034] 图4是MCAO后7天抗CD14治疗的小鼠和媒介物(PBS)对照中梗死面积定量的图形表示。

[0035] 图5是MCAO后7天抗CD14治疗的小鼠和媒介物(PBS)对照中损伤分布面积的图形表示。

[0036] 发明详述

[0037] 1.定义

[0038] 除非另有定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文描述的那些相似或等效的任何方法和材料都可以用于实践或测试本发明，但描述了优选的方法和材料。为了本发明的目的，在下文中定义了以下术语。

[0039] 冠词“一(a)”和“一(an)”在本文中用于指一个或多于一个(即至少一个)的该冠词的语法对象。通过实例的方式，“要素(an element)”意指一个要素或多于一个要素。

[0040] 如本文使用的，“和/或(and/or)”是指并且涵盖一个或更多个相关列出的项目的任何及所有可能的组合，以及在以可选地解释(或)时缺少组合。

[0041] 术语“活性剂”和“治疗剂”在本文中可互换使用，并且是指预防、降低或改善中风或其他急性神经炎性损伤的至少一种症状的剂。

[0042] 如本文使用的，“急性神经炎性损伤”是指与有害的神经炎性响应相关的脑急性损伤，即在没有治疗干预的情况下导致脑长期损伤和脑功能损失的脑急性损伤。急性神经炎性损伤的说明性实例包括中风(例如缺血性中风或出血性中风)、缺氧缺血性脑损伤、创伤

性脑损伤、蛛网膜下腔出血(即出血位于被称为蛛网膜层的脑保护层之一下方,并进入脑周围的空间)和脑出血(即在脑内的出血)。急性神经炎性损伤的症状包括但不限于偏瘫(身体一侧麻痹);轻偏瘫(身体一侧虚弱);面部肌肉虚弱;麻木;感觉降低;改变的嗅觉、味觉、听觉或视觉;嗅觉、味觉、听力或视力的损失;眼睑下垂(下垂);可检测到的眼肌虚弱;减少的作呕反应;减少的吞咽能力;减少的瞳孔对光的反应性;减少的面部感觉;减少的平衡;眼球震颤;改变的呼吸率;改变的心率;胸锁乳突肌虚弱伴随将头部转向一侧的能力减少或无能力;舌虚弱;失语(无法说话或理解语言);失用症(改变的自主运动);视野缺陷;记忆缺陷;半侧忽视或半侧空间忽视(对病变相对侧的视野空间的注意力缺陷);思维混乱;困惑;过度性行为的发展;病觉缺失(持续否认存在缺陷);行走困难;改变的运动协调性;眩晕;不平衡;意识损失;头痛;和/或呕吐。述及时间段的术语“损伤后”意指急性神经炎性损伤的一种或更多种首发症状发作之后的时间段。因此,例如,述及“损伤后6小时”意指急性神经炎性损伤症状发作之后6小时。如应当理解的,在神经炎性损伤是中风时,“中风后”和“损伤后”在本文中可以可互换使用。

[0043] 术语“并行施用(administration concurrently)”或“并行施用(administering concurrently)”或“共施用(co-administering)”等是指包含两种或更多种剂的单一组合物的施用,或者各种剂作为单独组合物和/或通过单独途径递送同期地(contemporaneously)或同时地(simultaneously)或在足够短的时间段内顺序地施用,其有效结果等同于在所有这样的剂作为单一组合物施用时获得的结果。“同时地(simultaneously)”意指,剂在大体上同一时间并且期望在同一制剂中一起被施用。“同期地(contemporaneously)”意指,剂在时间上紧密地被施用,例如,一种剂在另一种之前或之后约1分钟内至约1天内被施用。任何同期的时间都是有用的。然而,通常的情况将是在不同时地被施用时,剂将在约1分钟内至约8小时内,并且合适地在少于约1小时至约4小时内被施用。在被同期地施用时,剂合适地被施用在受试者上的相同部位上。术语“相同部位(same site)”包括确切位置,但可以在约0.5厘米至约15厘米内,优选地在约0.5厘米至约5厘米内。如本文使用的术语“单独地(separately)”意指,剂以时间间隔被施用,例如以约一天至几周或数月的间隔被施用。剂可以任一顺序被施用。如本文使用的术语“顺序地(sequentially)”意指,剂按顺序被施用,例如以数分钟、数小时、数天或数周的一个或更多个时间间隔被施用。如果适当,剂可以有规律的重复周期被施用。

[0044] 述及CD14拮抗剂抗体或包含CD14拮抗剂抗体的药物的施用的术语“单独”意指在损伤(例如中风)的治疗过程期间没有其他活性剂与CD14拮抗剂抗体或药物一起施用至受试者,即CD14拮抗剂抗体或包含CD14拮抗剂抗体的药物不与另一种活性剂共施用。

[0045] 术语“拮抗剂抗体”以最广义使用,并且包括抑制或减少抗体与其结合的抗原(例如,CD14)的生物学活性的抗体。例如,拮抗剂抗体可以部分或完全阻断受体(例如,CD14)与配体(例如,DAMP或PAMP)之间的相互作用,或者实际上可以由于受体的三级结构改变或下调而减少相互作用。因此,CD14拮抗剂抗体包括与CD14结合以及以任何有意义的程度阻断、抑制、无效、拮抗、阻抑、减少或降低(包括显著)CD14激动剂活性的抗体,CD14激动剂活性包括激活下游通路诸如Toll样受体(TLR)信号传导通路(例如,TLR4信号传导通路)和包含TIR结构域的衔接子诱导IFN-β(TRIF)通路,或者引发对CD14被CD14配体(例如,DAMP或PAMP)结合的细胞响应(例如,产生促炎介质,包括促炎细胞因子)。

[0046] 本文中的术语“抗体”以最广义使用，并且特别涵盖天然存在的抗体、单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)、抗体片段或任何其他抗原结合分子，只要它们表现出所期望的免疫相互作用即可。天然存在的“抗体”在其范围内包括免疫球蛋白，该免疫球蛋白包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每条重链包含重链可变区(本文简称为VH)和重链恒定区。重链恒定区包含特定的CH结构域(例如CH1、CH2和CH3)。每条轻链包括轻链可变区(本文简称为VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域，CL。VH区和VL区可以进一步细分为散布有更保守的区域(称为框架区(FR))的高变区(称为互补决定区(CDR))。每个VH和VL包含3个CDR和4个FR，按以下顺序从氨基末端至羧基末端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(Clq)的结合。抗体可以是任何同种型(例如，IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)、其亚类或修饰形式(例如，携带L234A和L235A双突变的IgG1同种型(IgG1-LALA))。抗体可以是任何物种的、嵌合的、人源化的或人类的。在其他实施方案中，抗体是缺乏第一恒定区结构域(CH1)但保留其他完整的重链并且能够通过抗原结合结构域结合抗原的同聚重链抗体(例如，骆驼抗体)。抗体-模块识别结构域(MRD)融合体中重链和轻链的可变区将含有与感兴趣的抗原相互作用的功能性结合结构域。

[0047] 如本文使用的，“可变结构域”(轻链可变结构域(VL)、重链可变结构域(VH))表示直接参与抗体与抗原结合的轻链和重链结构域对中的每一个。可变轻链和重链结构域具有相同的一般结构，并且每个结构域包含由三个CDR或“高变区”连接的序列广泛保守的四个FR。FR采用β折叠构象，并且CDR可以形成连接β折叠结构的环。每条链中的CDR由FR保持其三维结构，并且与来自另一条链的CDR一起形成抗原结合位点。

[0048] 在本文中使用时，术语“抗原结合部分”是指抗体的通常负责抗原结合的氨基酸残基，其通常包含来自CDR的氨基酸残基。因此，“氨基酸残或“互补决定区”(也称为“高变区”)在本文中可互换使用，是指抗体轻链和重链的形成有助于抗原结合位点的形成的三维环结构的氨基酸序列。重链和轻链的每个可变区中都存在三个CDR，其被命名为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。如本文使用的，术语“CDR组”是指在结合抗原的单个可变区中出现的三个CDR的组。这些CDR的确切边界已根据不同的系统被不同定义。Kabat(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)和(1991))描述的系统不仅提供了适用于抗体任何可变区的明确的残基编号系统，而且还提供了定义三个CDR的精确残基边界。这些CDR可以称为“Kabat CDR”。Chothia和同事(Chothia和Lesk,1987.J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等人,1989.Nature 342:877-883)发现，尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性，Kabat CDR内的某些子部分采用几乎相同的肽骨架构象。这些亚部分被命名为“L1”、“L2”和“L3”，或“H1”、“H2”和“H3”，其中“L”和“H”分别命名轻链区和重链区。这些区域可以称为“Chothia CDR”，其具有与Kabat CDR重叠的边界。与Kabat CDR重叠的其他定义CDR的边界由Padlan(1995.FASEB J.9:133-139)和MacCallum(1996.J.Mol.Biol.262(5):732-745)描述。仍其他CDR边界定义可能不严格遵循这些系统之一，尽管如此，但仍将与Kabat CDR重叠，虽然根据特定残基或残基组或甚至整个CDR不显著影响抗原结合的预测或实验结果，它们可能被缩短或延长。

[0049] 如本文使用的，术语“框架区”或“FR”是指可变区减去CDR的剩余序列。因此，抗体

的轻链和重链可变结构域从N末端至C末端包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。CDR和FR通常根据Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)的标准定义和/或来自“高变环”的那些残基来确定。

[0050] 如本文使用的,术语“轻链可变区”(“VL”)和“重链可变区”(“VH”)分别是指在轻链和重链的N末端部分处的对于每个抗体具有不同的一级氨基酸序列的区域或结构域。抗体的可变区通常由轻链和重链的氨基末端结构域组成,因为它们折叠在一起形成针对抗原的三维结合位点。例如,如Kabat数据库中列出的,基于结构相似性,VH和VL的几种亚型已被定义。

[0051] 术语“嵌合抗体”是指包含来自一种物种的重链和轻链可变区序列和来自另一物种的恒定区序列的抗体,诸如具有与人类恒定区连接的鼠重链和轻链可变区的抗体。

[0052] 非人类(例如,啮齿动物)抗体的“人源化”形式是包含衍生自非人类免疫球蛋白最小序列的嵌合抗体。大多数情况下,人源化抗体是其中来自受者的高变区的残基被来自非人类物种(供体抗体)的高变区的残基替代的具有期望的特异性、亲和力和/或能力的人类免疫球蛋白(受者抗体),所述非人类物种诸如小鼠、大鼠、兔或非人类灵长类。在一些情况下,人类免疫球蛋白的框架区(FR)残基被对应的非人类残基替代。因此,人源化抗体的FR和CDR不需要精确对应于亲本(即,供体)序列,例如,供体抗体CDR或共有框架可以通过取代、插入和/或缺失至少一个氨基酸残基、使得该位点处的CDR或FR不对应于供体抗体或共有框架而被诱变。然而,这样的突变通常不会是广泛的,并且通常会避免参与对抗原结合的“关键残基”。通常,至少80%、优选地至少85%、更优选地至少90%、并且最优选地至少95%的人源化抗体残基将对应于亲本FR和CDR序列的那些残基。如本文使用的,术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文使用的,术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最频繁出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见,例如,Winnaker,From Genes to Clones(Verlagsgesellschaft,Weinheim,1987))。因此,“共有免疫球蛋白序列”可以包含一个或更多个“共有框架区”和/或一个或更多个“共有CDR”。在免疫球蛋白家族中,共有序列中的每个位置都被家族中该位置处最频繁出现的氨基酸占据。如果两个氨基酸同等频繁地出现,则任何一个都可以包含在共有序列中。通常,人源化抗体将包含至少一个、并且通常两个可变结构域中的大体上全部,其中高变环全部或大体上全部对应于非人类免疫球蛋白的那些,并且FR全部或大体上全部是人类免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体任选地还将通常包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人类免疫球蛋白的一部分。关于进一步的详细信息,请参见Jones等人,(1986.Nature 321:522-525),Riechmann等人(1988.Nature 332:323-329)和Presta(1992.Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596)。人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化抗体可以包含来自多于一种类别或同种型的序列,并且可以使用本领域熟知的技术选择特定的恒定结构域以优化所期望的效应子功能。如本文使用的,术语“关键残基”是指可变区内对抗体、特别地人源化抗体的结合特异性和/或亲和力具有更多的影响的某些残基。关键残基包括但不限于以下一种或更多种:与CDR相邻的残基、潜在的糖基化位点(可以是N糖基化位点或O糖基化位点)、稀有残基、能够与抗原相互作用的残基、能够与CDR相互作用的

残基、典型残基、重链可变区与轻链可变区之间的接触残基、游标区(Vernier zone)内的残基和在可变重链CDR1的Chothia定义与第一重链框架的Kabat定义之间重叠的区域中的残基。

[0053] 如本文使用的,“游标”区是指可以调节CDR结构并且微调对抗原的拟合的框架残基亚组,如由Foote和Winter(1992.J.Mol.Biol.224:487-499)描述的。游标区残基形成在CDR下的层,并且可能影响CDR的结构和抗体的亲和力。

[0054] 如本文使用的,术语“典型”残基是指CDR或框架中的定义如由Chothia等人(1987.J.Mol.Biol.196:901-917;1992.J.Mol.Biol.227:799-817),二者都通过引用并入本文)定义的特定典型CDR结构的残基。根据Chothia等人,许多抗体的CDR的关键部分尽管在氨基酸序列水平上具有大的多样性,但具有几乎相同的肽骨架构象。每个典型结构主要指定形成环的连续氨基酸残基区段的一组肽骨架扭转角。

[0055] 如本文使用的,术语“供体”和“供体抗体”是指向“接受者抗体”提供一个或更多个CDR的抗体。在一些实施方案中,供体抗体是与获得或衍生FR的抗体来自不同物种的抗体。在人源化抗体的背景中,术语“供体抗体”是指提供一个或更多个CDR的非人类抗体。

[0056] 如本文使用的,术语“接受者”和“接受者抗体”是指提供一个或更多个FR的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列的抗体。在一些实施方案中,术语“接受者”是指提供一个或更多个恒定区的抗体氨基酸序列。在其他实施方案中,术语“接受者”是指提供一个或更多个FR和一个或更多个恒定区的抗体氨基酸序列。在特定实施方案中,术语“接受者”是指提供一个或更多个FR的至少80%,优选地至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或100%的氨基酸序列的人类抗体氨基酸序列。根据该实施方案,接受者可以包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或至少10个没有(不)出现在人类抗体的一个或更多个特定位置处的氨基酸残基。接受者框架区和/或一个或更多个接受者恒定区可以例如衍生自或获得自种系抗体基因、成熟抗体基因、功能性抗体(例如、本领域熟知的抗体、开发中的抗体或商购可得的抗体)。

[0057] 如本文使用的,术语“人类抗体”意图包括具有衍生自人类种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人类抗体可以包括不被人类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,并且特别地在CDR3中。然而,如本文使用的术语“人类抗体”不意图包括其中衍生自另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已经被移植到人类框架序列上的抗体。

[0058] 术语“重链可变区CDR1”和“H-CDR1”可互换使用,术语“重链可变区CDR2”和“H-CDR2”、术语“重链可变区CDR3”和“H-CDR3”;术语“轻链可变区CDR1”和“L-CDR1”、术语“轻链可变区CDR2”和“L-CDR2”以及术语“轻链可变区CDR3”和“L-CDR3”抗体片段也同样适用。在整个说明书中,除非另有指定,互补决定区(“CDR”)根据Kabat定义来定义。Kabat定义是用于对抗体中残基编号的标准,并且通常用于鉴定CDR区(Kabat等人,(1991),第5版,NIH公布第91-3242号)。

[0059] 抗原结合可以通过完整抗体的“片段”或“抗原结合片段”进行。在本文,这两个术语可互换使用。包含在术语抗体的“抗体片段”内的结合片段的实例包括Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;F(ab')2片段,包含通过二硫键在铰链区处连接的两个Fab

片段的二价片段;由VH和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;由VH结构域组成的单结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,1989.Nature 341:544-546);和分离的互补决定区(CDR)。在特定实施方案中,本公开的抗体是缺乏Fc区的全部或部分的抗原结合片段。

[0060] “单链可变片段(scFv)”是其中VL和VH区配对形成单价分子的单个蛋白链(称为单链Fv(scFv);参见,例如,Bird等人,1988.Science 242:423-426;和Huston等人,1988.Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。尽管VL和VH两个结构域由单独的基因编码,但它们可以使用重组方法通过人工肽接头连接起来,使得它们能够被制成单个蛋白链。这样的单链抗体包括一个或更多个抗原结合部分。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且可以以与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

[0061] 如本文使用的,术语“单克隆抗体”及缩写“MAb”和“mAb”是指从大体上同质的抗体群体获得的抗体,即,除了可能少量存在的可能天然存在的突变,构成群体的个体抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品相比,每个mAb针对抗原上的单个决定簇。修饰词“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,单克隆抗体可以由抗体产生细胞(包括杂交瘤)的单个克隆产生。术语“杂交瘤”通常是指培养的赘生性淋巴细胞与致敏B-或T-淋巴细胞之间的细胞融合产物,其表达亲代细胞特异性免疫潜力。

[0062] “结合”感兴趣的抗原(例如,CD14)的抗体是以足够的亲和力结合抗原的抗体,使得该抗体可用作靶向表达该抗原的细胞或组织的治疗剂,并且不与其他蛋白显著交叉反应。在这样的实施方案中,抗体与“非靶”蛋白的结合程度将少于抗体、寡肽或其他有机分子与其特定靶蛋白的结合的约10%,如例如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫沉淀或放射免疫沉淀(RIA)确定的。因此,拮抗CD14的抗体合适地抑制或减少促炎介质包括促炎细胞因子/趋化因子的产生。关于抗体与靶分子的结合,术语“特异性结合”特定多肽或特定多肽靶上的表位或“与特定多肽或特定多肽靶上的表位特异性结合”或对于特定多肽或特定多肽靶上的表位是“特异性的”意指与非特异性相互作用可测量地不同的结合。例如,特异性结合可以通过比较确定分子的结合与对照分子的结合来测量,所述对照分子通常是不具有结合活性的类似结构的分子。例如,特异性结合可以通过与类似于靶例如过量的未标记的靶的对照分子竞争来确定。在这种情况下,如果标记的靶与探针的结合被过量的未标记的靶竞争性抑制,则表明特异性结合。抗体结合的抗原特定区域通常称为“表位”。术语“表位”广义地包括抗原上被抗体或T细胞受体特异性识别或以其他方式与分子相互作用的位点。通常,表位是诸如氨基酸或碳水化合物或糖侧链的分子的活性表面分组,并且通常可以具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。如本领域技术人员将理解的,抗体可以特异性结合的几乎任何事物都可以是表位。

[0063] 贯穿本说明书,除非上下文另有要求,否则词语“包含/包括(comprise)”、“包含/包括(comprises)”和“包含/包括(comprising)”将被理解为暗示包含陈述的步骤或要素或者步骤或要素的组,但不排除任何其他步骤或要素或者步骤或要素的组。因此,使用术语“包含/包括(comprising)”等指示列出的要素是必需的或要求的,但其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在。“由...组成(consisting of)”意指包括并且限于措辞“由...组成”之后的任何事物。因此,措辞“由...组成”指示列出的要素是必需的或要求的,并且不可

以存在其他要素。“基本上由...组成(consisting essentially of)”意指包括在该措辞之后列出的任何要素,并且限于不干扰或有助于所列要素在本公开中指定的活性或作用的其他要素。因此,措辞“基本上由...组成”指示列出的要素是必需的或要求的,但其他要素是任选的并且可以存在或可以不存在,这取决于它们是否影响列出的要素的活性或作用。

[0064] “有效量”在治疗状况的背景下意指向需要这种治疗或预防的个体施用的剂或组合物(以单剂量或作为系列的一部分)对于预防该状况的出现症状、控制(holding in check)该状况的此类症状和/或治疗该状况的现有症状是有效的量。有效量将根据待治疗个体的年龄、健康和身体状况以及疾病症状是否明显、待治疗个体的分类群组、组合物的制剂、医学情况的评价和其他相关因素而不同。最佳给药时间表可以根据受试者体内药物积累的测量结果计算。最佳剂量可以根据在个体受试者中的相对效力而不同,并且通常可以基于发现在体外和体内动物模型中有效的EC50值估计。普通技术人员可以容易地确定最佳剂量、给药方法和重复率。预期该量将落入可以通过常规试验确定的相对宽的范围内。

[0065] 如本文使用的,术语“免疫细胞”是指属于免疫系统的细胞。免疫细胞包括造血来源的细胞,诸如但不限于T淋巴细胞(T细胞)、B淋巴细胞(B细胞)、自然杀伤(NK)细胞、粒细胞、中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞和任何前述细胞的专化形式,例如、浆细胞样树突细胞、Langerhans细胞、浆细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、T辅助细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

[0066] 如本文使用的,与细胞的“促炎介质的产生”相关的术语“抑制(inhibit)”、“抑制(inhibiting)”、“减少(decrease)”或“减少(decreasing)”等是指外周细胞产生的促炎介质的水平或量的至少小但可测量的降低。在实施方案中,与未治疗的对照相比,细胞的促炎介质产生被抑制或减少至少20%;在更多实施方案中,抑制或减少为至少50%;在仍更多实施方案中,抑制或减少为至少70%,并且在实施方案中,抑制或减少为至少80%。在体内实施方案中,促炎介质产生的这种降低能够减轻炎性介质级联的有害作用。

[0067] 可以使用合适的体外测定(例如ELISA、RT-PCR)评价CD14拮抗剂抗体在抑制或减少外周细胞的促炎介质产生方面的功效。例如,可以使用竞争性RT-PCR技术测量从细胞内获得的细胞因子mRNA的水平,并且从细胞中释放的表达的细胞因子的水平可以通过夹心ELISA测量,例如,使用与特定的细胞因子特异性结合的一种或更多种单克隆抗体来测量。体内筛选也可以通过本领域熟知的下列程序进行。例如,将CD14拮抗剂抗体施用至动物模型(例如,小鼠)并且收集血液来评价多种细胞因子的水平。技术人员将精通可用于测量细胞因子产生的技术。根据结果,还可以确定适当的剂量范围和全身施用途径。

[0068] 如本文使用的,术语“缺血”是指由供应血液的血管的收缩或阻塞引起的向身体部位的血液流动不充分或停止。

[0069] 术语“缺氧缺血性脑损伤”是指向脑的氧气或血液供应的绝对或相对不足,导致大脑组织损伤或功能失调。缺氧缺血性脑损伤可能是各种疾病、损害或损伤的结果,包括例如心脏骤停、呼吸缺血性中风、头部创伤、窒息或中毒(例如一氧化碳中毒或药物过量)。严重或长期大脑缺血会导致由缺血级联介导的意识丧失、脑损伤或死亡(例如神经元损伤)。

[0070] “分离的”意指物质大体上或基本上不含在其天然状态中通常伴随它的组分。

[0071] 如本文使用的,术语“配体”是指能够结合受体的任何分子。

[0072] “药学上可接受的运载体”意指包括在生物学或其他方面不是不期望的物质的药

物媒介物，即，物质可以与选择的活性剂一起施用至受试者，而不引起任何或显著的不良反应。运载体可以包括赋形剂和其他添加剂，诸如稀释剂、去污剂、着色剂、润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、防腐剂、转染剂等。

[0073] 类似地，如本文提供的化合物的“药学上可接受的”盐、酯、酰胺、前药或衍生物是其在生物学或其他方面不是不期望的盐、酯、酰胺、前药或衍生物。

[0074] 术语“多核苷酸”、“遗传物质”、“遗传形式”、“核酸”和“核苷酸序列”包括RNA、cDNA、基因组DNA、合成形式和混合聚合物(有义链和反义链二者)，并且可以被化学或生物化学修饰或者可以包含非天然或衍生的核苷酸碱基，如本领域技术人员将容易地理解的。

[0075] 术语“促炎介质”意指有利于炎症的免疫调节剂。这样的剂包括细胞因子，诸如趋化因子、白细胞介素(IL)、淋巴因子和肿瘤坏死因子(TNF)以及生长因子。在特定实施方案中，促炎介质是“促炎细胞因子”。通常，促炎细胞因子包括主要负责早期响应的IL-1α、IL-1β、IL-6和TNF-α。其他促炎介质包括LIF、IFN-γ、IFN-β、IFN-α、OSM、CNTF、TGF-β、GM-CSF、TWEAK、IL-11、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-8、IL-16、IL-22、IL-23、IL-31和IL-32(Tato等人，2008.Cell 132:900;Cell 132:500,Cell 132:324)。促炎介质可以充当内源热原(IL-1、IL-6、IL-17、TNF-α)，上调巨噬细胞和间充质细胞(包括成纤维细胞、上皮细胞和内皮细胞)二者的次级介质和促炎细胞因子的合成，刺激急性期蛋白的产生，或者吸引炎性细胞。在特定实施方案中，术语“促炎细胞因子”涉及TNF-α、IL-1α、IL-6、IFNβ、IL-1β、IL-8、IL-17和IL-18。

[0076] 如本文使用的，“中风”是指由于向脑或脑干的血液供应扰乱导致的一种或更多种脑功能损失(通常快速发展)。扰乱可能是由例如血栓形成或栓塞引起的缺血(缺乏血液)，或者可能是由于出血。在一些实例中，脑功能损失伴随着神经元细胞的死亡。在一个实例中，中风由向大脑或其区域的血液扰动或损失引起。中风是由脑血管原因引起的神经功能缺陷，持续超过24小时或在24小时内因死亡而中断(如世界卫生组织(the World Health Organization)定义的)。中风的症状包括偏瘫(身体一侧麻痹)；轻偏瘫(身体一侧虚弱)；面部肌肉虚弱；麻木；感觉降低；改变的嗅觉、味觉、听觉或视觉；嗅觉、味觉、听力或视力的损失；眼睑下垂(下垂)；可检测到的眼肌虚弱；减少的作呕反应；减少的吞咽能力；减少的瞳孔对光的反应性；减少的面部感觉；减少的平衡；眼球震颤；改变的呼吸率；改变的心率；胸锁乳突肌虚弱伴随将头部转向一侧的能力减少或无能力；舌虚弱；失语(无法说话或理解语言)；失用症(改变的自主运动)；视野缺陷；记忆缺陷；半侧忽视或半侧空间忽视(对病变相对侧的视野空间的注意力缺陷)；思维混乱；困惑；过度性行为的发展；病觉缺失(持续否认存在缺陷)；行走困难；改变的运动协调性；眩晕；不平衡；意识损失；头痛；和/或呕吐。述及时间段的术语“中风后”意指中风的一种或更多种首发症状发作之后的时间段。因此，例如，述及“中风后6小时”意指中风症状发作之后6小时。

[0077] 如本文使用的，术语“全身施用(systemic administration)”或“全身施用(administered systemically)”或“全身施用(systemically administered)”意指将剂引入受试者的中枢神经系统外。全身施用包括除直接施用至脊柱或脑外的任何施用途径。因此，明显的是，鞘内和硬膜外施用以及颅内注射或植入都不在术语“全身施用(systemic administration)”、“全身施用(administered systemically)”或“全身施用(systemically administered)”的范围内。如本文描述的剂(例如抗体)或药物组合物可以

任何可接受的形式全身施用，诸如以片剂、液体、胶囊、粉末等形式；通过静脉内、腹膜内、肌内、皮下或肠胃外注射；通过透皮扩散或电泳；以及通过微型泵或其他植入的延长释放装置或制剂。根据一些实施方案，全身施用通过选自由腹膜内、静脉内、皮下和鼻内施用及其组合组成的组的途径进行。

[0078] 在本文中述及“单剂量”的CD14拮抗剂抗体意指在急性神经炎性损伤后仅向受试者施用一个剂量的抗体，例如以一次推注(bolus injection)或一次离散输注。在受试者遭受进一步的急性神经炎性损伤的情况下，可以针对该进一步的急性神经炎性损伤向受试者施用单剂量的抗体。因此，述及单剂量意指受试者在每次急性神经炎性损伤的情况下仅接收一个剂量的抗体。

[0079] 在本文中可互换使用的术语“受试者”、“患者”和“个体”是指已经遭受急性神经炎症损伤的任何受试者，特别地脊椎动物受试者，并且甚至更特别地哺乳动物受试者(例如人类)。

[0080] 术语“创伤性脑损伤”或“TBI”是指由外部物理创伤引起的脑损伤。导致TBI的事件的非限制性实例包括跌倒、车辆碰撞、运动碰撞和打架。该术语包括轻度和重度TBI二者，包括闭合性头部损伤、脑震荡或挫伤和穿透性头部损伤。

[0081] 如本文使用的，术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等是指在需要治疗的受试者，即已经遭受急性神经炎性损伤的受试者中获得期望的药理学和/或生理学作用。“治疗”意指：改善或预防急性神经炎性损伤的一种或更多种症状；改善或预防神经元损伤或神经功能缺陷；和/或改进或延长生活质量。述及“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”或“治疗(treating)”不必意指逆转或预防急性神经炎性损伤的任何或所有症状，或者逆转或预防神经元损伤或神经功能缺陷。例如，受试者可能最终遭受长期的神经功能缺陷，但与未治疗的缺陷程度或生活质量相比，缺陷程度降低和/或生活质量改进。

[0082] 如本文使用的，关于施用CD14拮抗剂抗体述及的损伤后或中风后的时间段的“至多”意指在治疗损伤(例如中风)期间超过该时间段不向受试者施用任何CD14拮抗剂抗体。因此，例如，述及“损伤后至多48小时”向受试者施用CD14拮抗剂抗体意指可以在损伤后0-48小时的任何时间向受试者施用CD14拮抗剂抗体，但48小时之后绝不施用。施用可以包括一个或更多个剂量的CD14拮抗剂抗体，但在指定时间段，例如损伤后48小时之后将没有剂量被施用。然而，应当理解，如果受试者然后遭受进一步的急性神经炎性损伤，可以在针对该进一步的急性神经炎性损伤定义的时间段内向受试者施用CD14拮抗剂抗体。

[0083] 除非另有明确说明，否则在本文中描述的每种实施方案将在细节上做必要修改以适用于每一种及每种实施方案。

[0084] 2.用于治疗神经炎性损伤的组合物和方法

[0085] 本公开提供了用于治疗急性神经炎性损伤的包括CD14拮抗剂抗体的方法、用途和组合物。

[0086] 2.1 CD14拮抗剂抗体

[0087] 本公开考虑了与CD14(例如mCD14或sCD14)结合并阻断DAMP或PAMP与CD14的结合和/或与CD14结合并抑制或减少CD14激动剂介导的导致促炎介质产生(包括促炎细胞因子产生)的响应的任何CD14拮抗剂抗体。在一些实施方案中，本发明的CD14拮抗剂抗体抑制CD14激动剂(合适地DAMP或PAMP)与CD14的结合，因此抑制或减少促炎细胞因子的产生。在

这种类型的说明性实例中,CD14拮抗剂抗体选自结合包含在人类CD14的氨基酸7至氨基酸14的区域的至少一部分中的表位的3C10抗体(van Voohris等人,1983.J.Exp.Med.158:126-145;Juan等人,1995.J.Biol.Chem.270(29):17237-17242),结合包含在CD14的氨基酸57至氨基酸64的区域中的至少一部分中的表位的MEM-18抗体(Bazil等人,1986.Eur.J.Immunol.16(12):1583-1589;Juan等人,1995.J.Biol.Chem.270(10):5219-5224),4C1抗体(Adachi等人,1999.J.Endotoxin Res.5:139-146;Tasaka等人,2003.Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.;2003.29(2):252-258),以及抑制LPS结合并阻抑促炎细胞因子产生的28C5和23G4抗体,以及部分抑制LPS结合并阻抑促炎细胞因子产生的18E12抗体(Leturcq等人的美国专利第5,820,858号、第6,444,206号和第7,326,569号)。在一些实施方案中,本公开的CD14拮抗剂抗体抑制CD14与TLR诸如TLR4的结合,从而阻断CD14激动剂介导的响应,其示例性实例包括国际公布WO2002/42333中公开的F1024抗体。与CD14拮抗剂抗体相关的以上参考文献的每一个均通过引用以其整体并入本文。CD14拮抗剂抗体可以是全长免疫球蛋白抗体或完整抗体的抗原结合片段,其代表性实例包括Fab片段、F(ab')2片段、由VH和CH1结构域组成的Fd片段、由抗体单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段、由VH结构域组成的单结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,1989Nature341:544-546);和分离的CDR。合适地,CD14拮抗剂抗体是嵌合的、人源化的或人类抗体。

[0088] 在一些实施方案中,CD14拮抗剂抗体选自美国专利第5,820,858号中公开的抗体。

[0089] (1)包含以下的抗体:

[0090] 包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VL结构域:QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGNSFMHWYQQKAGQPPKSSIYRAANLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYFCQQSYEDPWTFGGGTKLGNQ[SEQ ID NO:1](3C10 VL);和

[0091] 包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域:LVKPGGSLKLSCVASGFTFSSYAMSWVRQTPEKRLEWVASISSGGTTYYPDNVKGRFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARGYYDYHYWGQGTTLTVSS[SEQ ID NO:2](3C10 VH);

[0092] (2)包含以下的抗体:

[0093] 包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VL结构域:QSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYCCQQSNEDPTTFGGGTKLEIK[SEQ ID NO:3](28C5 VL);和

[0094] 包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域:LQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTLVTVSA[SEQ ID NO:4](28C5 VH);和

[0095] (3)包含以下的抗体:

[0096] 包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VL结构域:QTPSSLSASLGDRVTISCRASQDIKNYLNWYQQPGGTVKVLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFCQRGDTLPWTFGGGTKLEIK[SEQ ID NO:5](18E12 VL);和

[0097] 包含以下序列、由以下序列组成或基本上由以下序列组成的VH结构域:LESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTNYDISWIRQPPGKGLEWLGVIWTSGGTNYNSAFMSRLSITKDNSESQVFLKMNGLQTDDTGIYYCVRGDGNFYLYNFDYWGQGTTLTVSS[SEQ ID NO:6](18E12 VH);

[0098] 还考虑了包含以上抗体的VL和VH CDR序列的抗体,其代表性实施方案包括:

[0099] (1)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSFGNSFMH[SEQ ID NO:7](3C10 L-CDR1);L-CDR2包含序列RAANLES[SEQ ID NO:8](3C10 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSYEDPWT[SEQ ID NO:9](3C10 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SYAMS[SEQ ID NO:10](3C10 H-CDR1);H-CDR2包含序列SISSGGTTYYPDNVKG[SEQ ID NO:11](3C10 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GYYDYHY[SEQ ID NO:12](3C10 H-CDR3);

[0100] (2)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASESVDSYVNSFLH[SEQ ID NO:13](28C5 L-CDR1);L-CDR2包含序列RASNLQS[SEQ ID NO:14](28C5 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QQSNEDPTT[SEQ ID NO:15](28C5 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列SDSAWN[SEQ ID NO:16](28C5 H-CDR1);H-CDR2包含序列YISYSGSTSYNPSLKS[SEQ ID NO:17](28C5 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GLRFAY[SEQ ID NO:18](28C5 H-CDR3);以及

[0101] (3)包含以下的抗体:a)包含L-CDR1、L-CDR2和L-CDR3的抗体VL结构域或其抗原结合片段,其中:L-CDR1包含序列RASQDIKNYLN[SEQ ID NO:19](18E12 L-CDR1);L-CDR2包含序列YTSRLHS[SEQ ID NO:20](18E12 L-CDR2);并且L-CDR3包含序列QRGDTLPWT[SEQ ID NO:21](18E12 L-CDR3);以及b)包含H-CDR1、H-CDR2和H-CDR3的抗体VH结构域或其抗原结合片段,其中:H-CDR1包含序列NYDIS[SEQ ID NO:22](18E12 H-CDR1);H-CDR2包含序列VIWTSGGTNYNSAFMS[SEQ ID NO:23](18E12 H-CDR2);并且H-CDR3包含序列GDGNFYLYNFDY[SEQ ID NO:24](18E12 H-CDR3)。

[0102] 在一些实施方案中,CD14拮抗剂抗体是人源化的。在这种类型的说明性实例中,人源化CD14拮抗剂抗体合适地包含对应于CD14拮抗剂抗体(例如,以上描述的CD14拮抗剂抗体之一)的供体CDR组和人类接受者框架。人类接受者框架可以相对于人类种系接受者框架在选自由以下组成的组的关键残基处包含至少一个氨基酸取代:与CDR相邻的残基;糖基化位点残基;稀有残基;典型残基;重链可变区与轻链可变区之间的接触残基;游标区内的残基;以及在Chothia定义的VH CDR1与Kabat定义的第一重链框架之间重叠的区域中的残基。用于产生人源化mAb的技术是本领域熟知的(参见,例如,Jones等人,1986.Nature 321:522-525;Riechmann等人,1988.Nature 332:323-329;Verhoeyen等人,1988.Science 239:1534-1536;Carter等人,1992.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4285-4289;Sandhu,JS.,1992.Crit.Rev.Biotech.12:437-462和Singer等人,1993.J.Immunol.150:2844-2857)。嵌合或鼠单克隆抗体可以通过将小鼠CDR从小鼠免疫球蛋白的重链和轻链可变链转移到人类抗体的对应可变结构域中而被人源化。嵌合单克隆抗体中的小鼠框架区(FR)也被人类FR序列替代。由于将小鼠CDR简单转移到人类FR中通常导致抗体亲和力降低甚至损失,因此可能需要另外的修饰以便恢复鼠抗体的原始亲和力。这可以通过将FR区中一个或更多个人类残基用其鼠对应物替代以获得对其表位具有良好结合亲和力的抗体来实现。参见,例如,Tempest等人(1991.Biotehnology 9:266-271)和Verhoeyen等人(1988同上)。通常,与其鼠对应物不同并且位于靠近或接触一个或更多个CDR氨基酸残基的那些人类FR氨基酸残基将是取代的候选者。

[0103] 在优选的实施方案中，CD14拮抗剂抗体是IC14抗体(Axtelle等人，2001.J.Endotoxin Res.7:310-314;和美国专利申请第2006/0121574号，所述文献通过引用以其整体并入本文)或其抗原结合片段。IC14抗体是与人类CD14特异性结合的嵌合(鼠/人类)单克隆抗体。该抗体的鼠亲本是以上提到的28C5(参见，Leturcq等人的专利申请第5,820,858号、第6,444,206号和第7,326,569号，以及Leturcq等人，1996.J.Clin.Invest.98:1533-1538)。IC14抗体包含VL结构域和VH结构域，其中：

[0104] VL结构域包含氨基酸序列:METDTILLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYVNSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLQSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC[SEQ ID NO:25];并且

[0105] VH结构域包含氨基酸序列:MKVLSLLYLLTAIPGILSDVQLQQSGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDSAWNWIRQFPGNRLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCVRGLRFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK[SEQ ID NO:26]。

[0106] 适用于治疗神经炎性损伤诸如中风或缺血性脑损伤的另外的CD14拮抗剂抗体可以通过本领域技术人员熟知的方法来鉴定。这些方法通常包括确定抗体是否能够直接拮抗CD14。例如，方法可以包括确定抗体是否能够抑制或减少CD14的量或激动剂活性，其中抑制或减少CD14的量或激动剂活性的能力指示该抗体可能适用于如本文描述的治疗中风或缺血性脑损伤。在一些实施方案中，抗体与CD14或在其表面上表达CD14的细胞或从其表达CD14的核酸序列接触，合适地在CD14激动剂诸如DAMP或PAMP的存在下接触，其中，在激动剂存在的情况下CD14的量或激动剂活性在与对照相比时的减少指示抗体与CD14结合并直接拮抗CD14。CD14激动剂活性的减少或抑制包括，例如抑制或减少下游通路诸如TLR信号传导通路(例如，TLR4信号传导通路)和TRIF通路的激活或者引发细胞响应(例如，促炎介质包括促炎细胞因子的产生)。

[0107] 这些方法可以在体内、离体或者体外进行。特别地，使抗体与CD14或与在其表面上表达CD14的细胞(例如，免疫细胞)接触的步骤可以在体内、离体或者体外进行。方法可以在基于细胞或无细胞的系统中进行。例如，方法可以包括使在其表面上表达CD14的细胞与抗体接触并确定细胞与抗体的接触是否导致CD14的量或激动剂活性减少的步骤。在这样的基于细胞的测定中，CD14和/或抗体可以对宿主细胞是内源的，可以被引入宿主细胞或组织中，可以通过引起或允许表达构建体或载体的表达被引入宿主细胞或组织中或者可以通过刺激或激活细胞中内源基因的表达引入宿主细胞。在这样的基于细胞的方法中，CD14的活性的量可以在存在或不存在抗体的情况下评价，以确定剂是否正在改变细胞中CD14的量，诸如通过调节细胞中的CD14表达或通过使细胞内的CD14蛋白失稳或者改变细胞的CD14激动剂活性。在存在抗体的情况下较低的CD14激动剂活性或细胞表面上减少的CD14量指示该抗体可以是用于根据本公开使用的合适的CD14拮抗剂。

[0108] 在一些实例中，进一步确定抗体是否缺乏与另一种细胞组分(合适地CD14的结合

配体,诸如分泌的(例如,MD2)或位于细胞膜上(例如,TLR4)的CD14结合配体)的大体上或可检测的结合,从而确定该抗体是CD14的特异性拮抗剂。在这种类型的非限制性实例中,使抗体在存在CD14激动剂诸如DAMP或PAMP的情况下下与(1)在其表面上表达CD14的野生型细胞(例如,免疫细胞,诸如巨噬细胞)接触,(2)与CD14阴性细胞(例如,与(1)中相同但在CD14基因中具有功能损失的免疫细胞)接触。如果抗体抑制野生型细胞的CD14激动剂活性,但不抑制CD14阴性细胞的活性,这指示该抗体是CD14特异性拮抗剂。这种类型的细胞可以使用常规程序或动物来构建。

[0109] 在其他实例中,潜在的CD14拮抗剂抗体在体内,诸如,例如,在动物模型中评价。在这样的体内模型中,抗体的作用可以在循环(例如,血液),或其他器官,诸如肝、肾或心中进行评价。在特定实例中,使用缺血模型评价抗体的活性。

[0110] 示例性CD14拮抗剂抗体与不存在该抗体的情况相比实现CD14活性或水平减少至少5%、至少10%、至少25%、至少50%、至少60%、至少75%或至少85%或更多。在一些实例中,抗体可以导致CD14激动剂活性或水平减少,使得CD14激动剂活性或水平在存在抗体的情况下不再是可检测的。这样的减少可以在被测试的样品中观察到,或者例如在动物模型中进行该方法的情况下,特别地在来自动物的组织,诸如循环或其他器官,诸如肝、肾或心中观察到。

[0111] 优选地,抗体是如以上描述的CD14的特异性拮抗剂。然而,这并不意味着CD14的特异性拮抗剂完全没有脱靶拮抗活性。在这方面,CD14的特异性拮抗剂可具有对其他细胞组分的忽略不计或小的直接结合和作用,使得对非CD14细胞组分的活性、信号传导或表达的拮抗作用少于该剂对CD14的活性、信号传导或表达的直接结合和作用的少于15%、少于10%、少于5%、少于1%或少于0.1%。

[0112] CD14的水平或量可以通过评价CD14基因的表达来测量。基因表达可以通过观察mRNA的产生或水平或蛋白的产生或水平来评价。表达产物诸如mRNA和蛋白可以通过本领域已知方法来鉴定或定量。这样的方法可以利用杂交来特异性鉴定感兴趣的mRNA。例如,这样的方法可以包括PCR或实时PCR方法。鉴定或定量感兴趣的蛋白的方法可以包括使用结合该蛋白的抗体。例如,这样的方法可以包括蛋白印迹。CD14基因表达的调节可以在抗体存在和不存在的情况下进行比较。因此,可以鉴定出与不存在抗体的情况下观察到的水平相比,使CD14基因表达减少的抗体。这样的抗体可以是根据本公开的合适的CD14拮抗剂。

[0113] 用于鉴定用于根据本公开使用的合适拮抗剂抗体的方法可以评价CD14的激动剂活性。例如,这样的方法可以使用外周血单个核细胞进行。这样的细胞在响应于例如LPS的刺激时会产生细胞因子,诸如IL-1α、IL-6、TNF-α、IFN-β、IL-1β、IL-17和IL-8。因此,方法可以包括将外周血单个核细胞与抗体或媒介物组合并添加LPS。然后可以将细胞孵育一定量的时间(例如,24小时)以允许产生促炎介质,诸如细胞因子。然后可以评价细胞在该时间段内产生的细胞因子诸如IL-1α、IL-6、TNF-α、IFN-β、IL-1β、IL-17和IL-8的水平。如果抗体具有抗CD14特性,则这样的细胞因子的产生与媒介物处理的细胞相比应该被降低。

[0114] 2.2辅助剂和干预

[0115] CD14拮抗剂抗体可以单独施用或与其他活性剂(也称为“辅助剂”)或其他干预组合施用。在一个实例中,拮抗剂抗体与溶栓剂诸如组织纤溶酶原激活剂(tPA,例如阿替普酶、去氨普酶、替奈普酶或瑞替普酶)、链激酶、尿激酶、纤溶酶和微纤溶酶组合施用。其他辅

助剂包括神经保护剂，诸如但不限于NMDA拮抗剂(例如NA-1)、抗CD49d抗体(例如那他珠单抗)、NXY-059和edavarone；神经修复剂诸如干细胞、pifithrin-α、骨形态发生蛋白7(BMP7)、脑源性神经营养因子(BDNF)、胶质细胞系源性神经营养因子(GDNF)、表皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)以及可卡因和安非他明调节的转录物(cocaine-and amphetamine-regulated transcript，CART)；抗血小板剂诸如阿司匹林；以及抗凝剂诸如肝素、达比加群、阿哌沙班、依度沙班和利伐沙班。在另一个实例中，抗体的施用与干预联合，所述干预诸如血栓切除术、低温治疗、远程缺血预处理和/或颅外或颅内超声溶栓。

[0116] 在期望组合疗法时，CD14拮抗剂抗体与一种或更多种辅助剂或干预单独、同时或顺序施用。在一些实施方案中，这可以通过全身施用包含两种类型的剂的单一组合物或药理学制剂，或者通过在同时施用两种单独的组合物或制剂(其中一种组合物包含CD14拮抗剂抗体并且另一种包括辅助剂)来实现。在其他实施方案中，用CD14拮抗剂抗体治疗可以在用辅助剂治疗之前或之后，间隔范围为数分钟至数小时或甚至数天或数周。例如，神经修复剂可以在施用CD14拮抗剂抗体之后数小时、数天或数周施用。相反，溶栓剂可以在施用CD14拮抗剂抗体之前或与其同时施用。

[0117] 在一些情况下，抗体和辅助剂在彼此的约1-12小时内或彼此的约2-6小时内施用。然而，在其他情况下，可能期望显著延长治疗时间段，其中各个施用之间间隔为一天或更多天(例如1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天)或一周或更多周(例如1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天或8天)。在辅助剂与CD14拮抗剂抗体单独施用的实施方案中，应理解辅助剂可以通过与用于CD14拮抗剂抗体的施用方法不同的方法施用。

[0118] 在将两种或更多种治疗剂“联合”或“并行”施用至受试者的情况下，它们可以在同时以单一组合物或者在同时以单独的组合物或者在时间上分开以单独的组合物施用。

[0119] 2.3组合物

[0120] 如本文描述的，使用CD14拮抗剂抗体，无论是单独使用还是与辅助剂组合使用，可以治疗急性神经炎性损伤，诸如但不限于中风(例如缺血性中风或出血性中风)、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脑出血。CD14拮抗剂抗体以及任选地辅助剂可以本身施用或与药学上可接受的运载体一起施用。因此，本文还提供了用于治疗急性神经炎性损伤的CD14拮抗剂抗体组合物。

[0121] CD14拮抗剂抗体可以使用一种或更多种药学上可接受的运载体、稳定剂或赋形剂(媒介物)以常规方式配制以形成本领域已知(特别地关于蛋白活性剂)的药物组合物。一种或更多种运载体在与组合物的其他成分是相容的并且对其受者(例如患者)是无害的意义上是“可接受的”。合适的运载体通常包括生理盐水或乙醇多元醇，诸如甘油或丙二醇。

[0122] 抗体可以配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与游离氨基基团形成)，并且其与无机酸诸如盐酸或磷酸，或者与有机酸诸如乙酸、草酸、酒石酸或马来酸形成。与游离羧基基团形成的盐还可以衍生自无机碱，诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁；以及有机碱，诸如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸或普鲁卡因。

[0123] 组合物可以合适地配制用于全身施用，包括静脉内、肌内、皮下或腹膜内施用，并且方便地包括抗体的无菌水性溶液，所述抗体的无菌水性溶液优选地与受者的血液等渗。这样的制剂通常通过以下来制备：将固体活性成分溶解于包含生理学上相容物质诸如氯化

钠、甘氨酸等并具有与生理学条件相容的缓冲pH的水中以产生水性溶液，并且使所述溶液无菌。这些可以在单位剂量或多剂量容器例如密封安瓿或小瓶中制备。

[0124] 组合物可以掺入稳定剂，诸如例如聚乙二醇、蛋白、糖类(例如海藻糖)、氨基酸、无机酸及其混合物。稳定剂以适当的浓度和pH的水性溶液使用。将水性溶液的pH调节至在5.0-9.0的范围内，优选地在6-8的范围内。在配制抗体时，可以使用抗吸附剂。其他合适的赋形剂通常可以包括抗氧化剂，诸如抗坏血酸。组合物可以配制为控释制品，所述控释制品可以通过使用聚合物复合或吸收蛋白来实现。用于控释制剂的适当的聚合物包括例如聚酯、聚氨基酸、聚乙烯、吡咯烷酮、乙烯乙酸乙烯酯和甲基纤维素。另一种可能的控释方法是将抗体掺入聚合物物质的颗粒中，所述聚合物物质诸如聚酯、聚氨基酸、水凝胶、聚(乳酸)或乙烯乙酸乙烯酯共聚物。可选地，替代将这些剂掺入聚合物颗粒中，将这些物质包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中或者在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒以及纳米胶囊或粗滴乳液)中是可能的。

[0125] CD14拮抗剂抗体以及任选地辅助剂也可以以气雾剂的形式直接施用于气道。对于作为气雾剂使用，呈溶液或悬浮液的本发明的抑制剂可以与合适的推进剂与常规助剂一起包装在加压气雾剂容器中，所述合适的推进剂例如烃类推进剂如丙烷、丁烷或异丁烷。本发明的物质也可以以非加压形式诸如以喷雾器(nebulizer)或雾化器(atomizer)施用。

[0126] 本领域技术人员将认识到制剂根据其预期用途即施用途径常规设计。

[0127] 3.治疗方法

[0128] 本公开提供了治疗患有急性神经炎性损伤的受试者的治疗方法。因此，这些方法在其范围内包括治疗受试者(诸如人类受试者)中的中风(例如缺血性中风或出血性中风)、缺氧缺血性脑损伤、创伤性脑损伤、蛛网膜下腔出血和脑出血。

[0129] 因此，本文考虑了通过向受试者施用CD14拮抗剂抗体以及任选地辅助剂来用于治疗受试者中的急性神经炎性损伤的方法。CD14拮抗剂抗体以及任选地辅助剂(本文统称为“治疗剂”)，将以一个或更多个“有效量”施用，以在受试者中实现预期目的，诸如降低或预防急性神经炎性损伤中的一种或更多种症状。向患者施用的一种或更多种治疗剂的剂量应足以在受试者中实现有益响应，诸如至少一种症状的减轻。在本方法的一些实施方案中，CD14拮抗剂抗体单独施用，即在急性神经炎性损伤的治疗过程中，不向受试者施用其他活性剂或治疗剂。在其他实例中，向受试者施用的唯一其他活性剂或治疗剂是溶栓剂。

[0130] 待被施用的一种或更多种治疗剂的量或给药频率可以取决于待治疗的受试者，包括其年龄、性别、体重及一般健康状况。在这方面，用于施用的一种或更多种治疗剂的确切量将取决于从业者的判断。本领域技术人员将能够通过常规实验确定用于向受试者施用的CD14拮抗剂抗体以及任选地本文描述的辅助剂的有效的、无毒的量。在特定实例中，向受试者施用的CD14拮抗剂抗体的量为在0.1mg/kg与50mg/kg之间、0.5mg/kg与40mg/kg之间、2mg/kg与20mg/kg之间或5mg/kg与10mg/kg之间。在特定实例中，向受试者施用的CD14拮抗剂抗体的量为(或为约)0.2mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg、21mg/kg、22mg/kg、23mg/kg、24mg/kg、25mg/kg、26mg/kg、27mg/kg、28mg/kg、29mg/kg、30mg/kg、31mg/kg、32mg/kg、33mg/kg、34mg/kg、35mg/

kg、36mg/kg、37mg/kg、38mg/kg、39mg/kg、40mg/kg、41mg/kg、42mg/kg、43mg/kg、44mg/kg、45mg/kg、46mg/kg、47mg/kg、48mg/kg、49mg/kg或50mg/kg。

[0131] CD14拮抗剂抗体可以作为单剂量或多剂量向受试者施用。在特定实施方案中，CD14拮抗剂抗体作为单剂量(例如单次推注或单次离散输注)施用。在CD14拮抗剂抗体作为多剂量施用的实施方案中，优选地施用不多于3个剂量，并且这些在彼此的约6小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、60小时或72小时内施用。在特定实施方案中，仅1个、2个或3个剂量的CD14拮抗剂抗体被施用。

[0132] 通常，CD14拮抗剂抗体在损伤的急性期(例如损伤后6-48小时)或损伤的早期亚急性期(例如损伤后48-96小时)向受试者施用。因此，在示例性实施方案中，CD14拮抗剂抗体在损伤后至多4天(例如中风后4天)的任何时间向受试者施用。在一个实例中，CD14拮抗剂抗体在损伤后(例如中风后)至多6小时、8小时、10小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、84小时或96小时向受试者施用。例如，CD14拮抗剂抗体可以在损伤后至多6小时、8小时、10小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、84小时或96小时以单剂量向受试者施用。在另一个实例中，CD14拮抗剂抗体在损伤后至多6小时、8小时、10小时、12小时、18小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、84小时或96小时以两个剂量向受试者施用。例如，第一剂可以在损伤后至多24小时施用，并且第二剂可以在另外24-48小时后施用。

[0133] 在特定实例中，CD14拮抗剂抗体在损伤后2小时与96小时之间、4小时与96小时之间、6小时与96小时之间、2小时与72小时之间、4小时与72小时之间、6小时与72小时之间、2小时与48小时之间、4小时与48小时之间、6小时与48小时之间、2小时与24小时之间、4小时与24小时之间、6小时与24小时之间、2小时与18小时之间、4小时与18小时之间、6小时与18小时之间、2小时与12小时之间、4小时与12小时之间或6小时与12小时之间向受试者施用。

[0134] 为了使本发明可以容易地理解并将之付诸于实践，现在将通过以下非限制性实施例的方式来描述特定的优选实施方案。

实施例

[0135] 实施例1

[0136] 材料和方法

[0137] CD14拮抗剂抗体

[0138] 研究中使用的活性剂是商购可得的小鼠抗小鼠CD14 mAb(biG53)的$F(Ab')_2$片段。biG53 $F(Ab')_2$抗体被选为目前用于人类和体外研究的抗-人类CD14 mAb(IC14)的最好替代。IC14阻断健康人类受试者和体外人类小胶质细胞/单核细胞中PAMP和DAMP依赖性细胞因子产生(图1)。IC14的物种特异性限于人类、非人灵长类和猪CD14，限制了其在啮齿动物中的应用。因此，制备了替代抗体biG53抗小鼠CD14的$F(Ab')_2$片段。该试剂具有低内毒素/不含叠氮化物的配方，在小鼠中不是免疫原性的，并且缺乏反映Implicit Biosciences IC14的特性的介导抗体和补体依赖性细胞毒性的Fc结构域。已展示，这种抗CD14 $F(Ab')_2$以类似于对IC14在人类小胶质细胞/单核细胞中观察到的剂量依赖性方式功能性抑制PAMP依赖性细胞因子产生(图1C)。

[0139] 通过细丝阻塞在小鼠中诱导中风

[0140] 腔内大脑中动脉阻塞(MCAO)动物模型被认为是研究人类中最常见的中风形式(即由于大脑中动脉阻塞引起的中风)的最佳模型之一。在该模型中,在麻醉状态下,将细规格的缝合线穿过小鼠的颈外动脉,直至其到达大脑中动脉,阻塞向脑一侧的血液流动(使用激光多普勒进行评价)。多组小鼠在30分钟之后去除线,并且使血液流动恢复。这导致小鼠同侧纹状体损伤,并且醒来后行为改变,包括向左转。

[0141] 治疗方案

[0142] 小鼠施用a)第1天在中风后6小时时经由尾静脉注射的5mg/kg单次静脉内剂量的biG53 F(Ab')$_2$抗体,或者b)第1天在中风后6小时时经由尾静脉注射的5mg/kg单次静脉内剂量的biG53 F(Ab')$_2$抗体以及随后每天腹膜内5mg/kg剂量的biG53 F(Ab')$_2$抗体持续7天。仅施用媒介物的对照组也包括在研究中。

[0143] 功能评价

[0144] 所有的行为测试都在对治疗盲的情况下进行。在中风之前以及之后在24小时、48小时、72小时和7天时进行测试。在此中期分析中使用了以下行为测试。

[0145] 根据Clark等人(Neurol.Res.1997,19:641-8)的方法,将小鼠以两个28点量表进行评分。综合评分检查动物的一般健康状况,包括毛发、耳朵、眼睛或姿势的任何变化、自发活动水平以及任何癫痫类行为;和局部评分检查中风特异性缺陷,包括身体对称性、步态、攀爬能力、转圈行为、前肢对称性和胡须响应(McCann等人,PLoS One 9,2014,e110602)。前爪重量支撑使用旋转杆测试进行评价,并且前爪灵活性通过悬挂线测试(Balkaya等人Behav.Brain Res.2018,352:161-171)确定。

[0146] 脑处理

[0147] 在研究时间段结束时(中风后7天),将小鼠通过颈椎脱位人道处死,并收集前脑用于组织学处理。以6个预定水平(相对于颅骨前囟为-3.2mm至6.8mm)制备连续16μm冠状切片,以包括额叶和顶叶皮层以及背侧和腹侧纹状体。

[0148] 梗死面积和单核细胞/巨噬细胞和小胶质细胞激活

[0149] 使用先前定义的方法(McCann等人PLoS One 9,2014,e110602;Abeysinghe等人Stem Cell Res.Ther.2018,6:186),使用处理切片的双重NeuN/IBa-1免疫荧光染色评价梗死尺寸和固有免疫细胞激活。将来自每个水平的一式三份切片用Olympus(Albertslund,Denmark)显微镜可视化,并且将中风损伤区域鉴定为明显没有NeuN染色的区域,这使用ImageJ软件(NIH,Bethesda,MD,USA)进行分析。

[0150] 实施例2

[0151] 用CD14拮抗剂抗体的治疗对具有MCAO小鼠的作用

[0152] 评价具有MCAO、随后用CD14拮抗剂抗体或仅媒介物治疗的小鼠以确定功能衰退和神经功能缺陷以及梗死面积。

[0153] 功能衰退和神经功能缺陷

[0154] 如图2中示出的,中风在7天内诱导媒介物治疗的对照小鼠的显著功能衰退,其中使用吊线测试在24小时以及使用神经评分和转棒仪评价在48小时检测到峰值下降。值得注意的是,在中风后6小时时施用单剂量抗CD14 F(Ab')的小鼠组中,在24小时时的功能衰退减弱,所有测试中的表现恢复至中风前的基线评分和假手术对照动物72小时的评分。然而有趣的是,在7天内给予每天剂量的抗CD14 F(Ab')2的小鼠组中没有观察到这种功能衰退

的减弱。

[0155] 梗死面积

[0156] 从前部至后部全脑切片的NeuN免疫荧光染色显示治疗动物相对未治疗动物的减小的梗死面积(图3)。跨越所有切片的总损伤面积的定量(对于媒介物和抗CD14治疗动物二者,n＝3只小鼠)确认了组织学观察结果,治疗的动物在总损伤方面表现出3-4倍减少(图4)。此外,治疗小鼠的损伤降低主要在未治疗小鼠中显示出最大损伤的脑区域中被观察到(图5)。

[0157] 讨论

[0158] 数据表明,在中风急性期靶向CD14改进功能和组织学二者的结果。相反,7天内的延长治疗不太有效。功能和神经衰退是中风成功治疗结果的人类相关量度。在中风后6小时时施用单剂量的小鼠中这两个参数的降低表明抗CD14疗法作为急性和亚急性治疗期的中风介入疗法的潜力。功能和神经缺陷是比梗死面积降低更相关的量度,因为有时小的梗死可能导致中风患者中大的功能和神经衰退。然而,治疗小鼠中梗死面积的降低也令人鼓舞,因为现在已知中风之后沿皮质运动脊髓束的神经元存活的证据是功能恢复的正预测因子(Stinear,Lancet Neurol.2017,16:826-836).

[0159] 治疗小鼠中梗死面积和脑损伤总面积的降低表明抗CD14疗法降低了小鼠中风急性期期间的缺血核心向半影区(风险区域)的扩展,并且具有潜在的治疗益处。鉴于抗CD14疗法在减弱DAMP信号传导方面的作用模式,这些数据表明,短期、急性剂量的抗CD14抗体能够减弱在中风后的前几天导致有害结果的促炎性固有免疫应答,并且这导致临床相关的有益结果。

[0160] 大多数中风患者直到事件后6-12小时才会被诊断。因此,任何中风干预都需要在中风后最少6小时时有效。目前的溶栓治疗仅能够在中风后3小时内使用,因为超过此时间使用可能导致危险的脑出血。因此,在本研究中展示的在中风后6小时时的抗CD14干预代表对目前溶栓剂的临床改进,该溶栓剂仅针对凝块的去除,并且不改变固有免疫系统响应于中风的有害的局部和全局作用。

[0161] 本文引用的每个专利、专利申请和出版物的公开通过引用以其整体并入本文。

[0162] 本文中任何参考文献的引用不应被解释为对这样的参考文献作为本申请的“现有技术”可用的承认。

[0163] 在整个说明书中,目的是描述本发明的优选的实施方案,而不将本发明限制于任何一种实施方案或特定的特征集合。因此,本领域技术人员将理解,根据本公开,可以对例示的特定实施方案进行各种修改和改变而不脱离本发明范围。所有这样的修改和改变都意图包括在所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 因普利西特生物科学有限公司

布莱恩·W·齐格拉尔

大卫·T·克罗

加里·卢埃林·雷德里希

<120> 用于治疗急性神经炎性损伤的方法和剂

<130> 22975-20081.40

<140> Not yet assigned

<141> Concurrently herewith

<150> 2019902642

<151> 2019-07-25

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 106

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 1

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

<210> 2

<211> 105

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 2

Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly

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

<210> 3
<211> 106
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 3
Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile
1 5 10 15
Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Val Asn Ser Phe Leu
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Arg Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp
65 70 75 80
Asp Val Ala Thr Tyr Cys Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Thr Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 4
Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser
1 5 10 15

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

<210> 5
<211> 101
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 5

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

<210> 6
<211> 116
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 6

Leu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile
1 5 10 15
Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr Asp Ile Ser Trp

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

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 7
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Phe Gly Asn Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 8
Arg Ala Ala Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 9
Gln Gln Ser Tyr Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 10

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5
<210> 11
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 11
Ser Ile Ser Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Val Lys Gly
1 5 10 15
<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 12
Gly Tyr Tyr Asp Tyr His Tyr
1 5
<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 13
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Val Asn Ser Phe Leu His
1 5 10 15
<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 14
Arg Ala Ser Asn Leu Gln Ser
1 5
<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 15
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Thr Thr
1 5
<210> 16
<211> 6

<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 16
Ser Asp Ser Ala Trp Asn
1 5
<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 17
Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15
<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 18
Gly Leu Arg Phe Ala Tyr
1 5
<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 19
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Lys Asn Tyr Leu Asn
1 5 10
<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 20
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5
<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 21
Gln Arg Gly Asp Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 22

Asn Tyr Asp Ile Ser
1 5

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 23

Val Ile Trp Thr Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 24

Gly Asp Gly Asn Phe Tyr Leu Tyr Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 25

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> IC14 轻链可变结构域

<400> 25

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

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 26
<211> 460
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> IC14 重链可变结构域
<400> 26

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

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
100 105 110
Tyr Cys Val Arg Gly Leu Arg Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
115 120 125
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
130 135 140
Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys
145 150 155 160
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
165 170 175
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
180 185 190
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
195 200 205
Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn
210 215 220
Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
225 230 235 240
Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
245 250 255
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
260 265 270
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
275 280 285
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
290 295 300
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
305 310 315 320
Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
325 330 335
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
340 345 350
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
355 360 365
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
370 375 380
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
385 390 395 400
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser

405 410 415

Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu

420 425 430

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

435 440 445

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

450 455 460

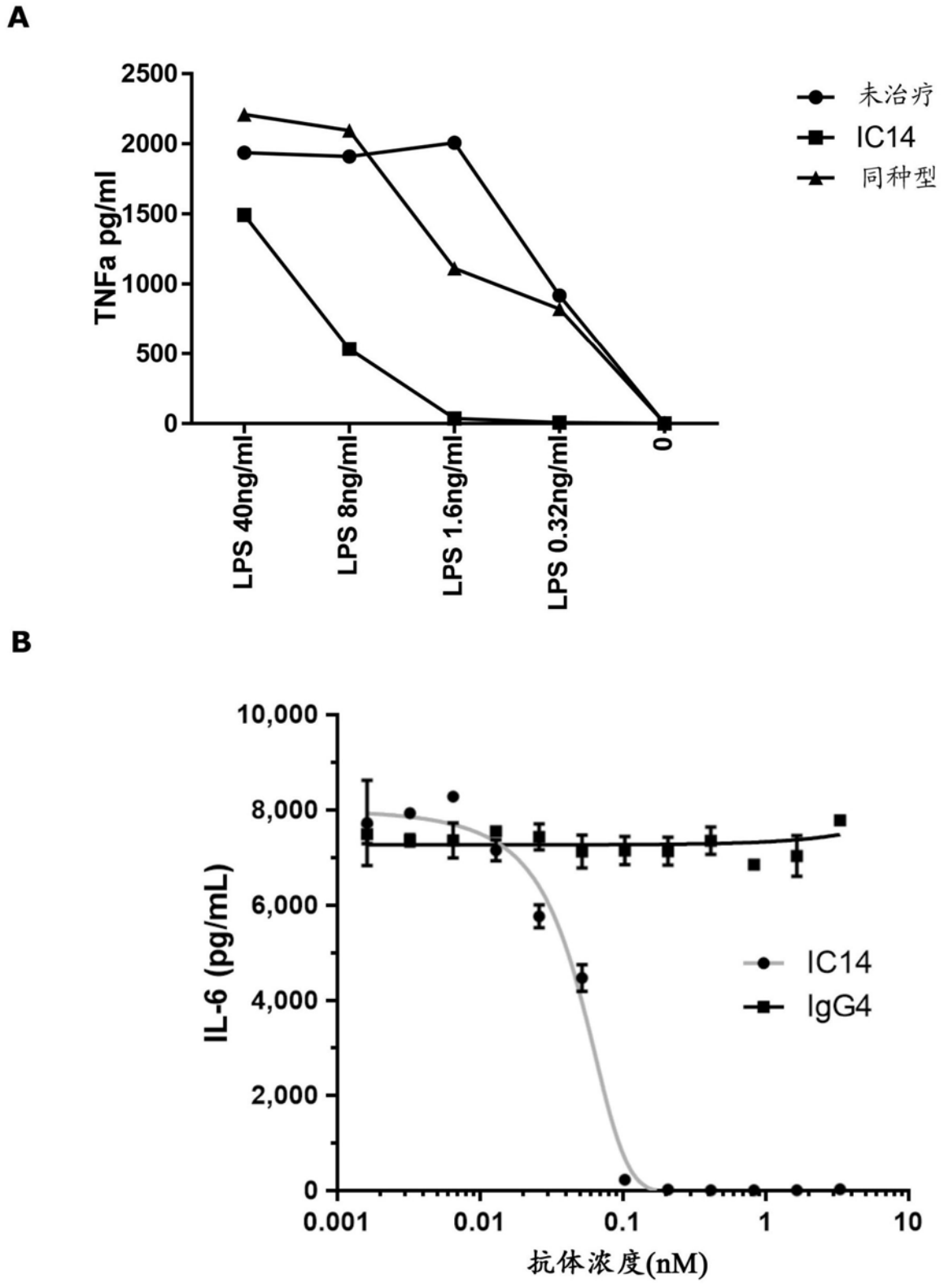

A
2500
2000
1500
1000
500
0
TNFa pg/ml
未治疗
IC14
同种型
LPS 40ng/ml
LPS 8ng/ml
LPS 1.6ng/ml
LPS 0.32ng/ml
0
B
10,000
8,000
6,000
4,000
2,000
0
IL-6 (pg/mL)
IC14
IgG4
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体浓度(nM)

图1

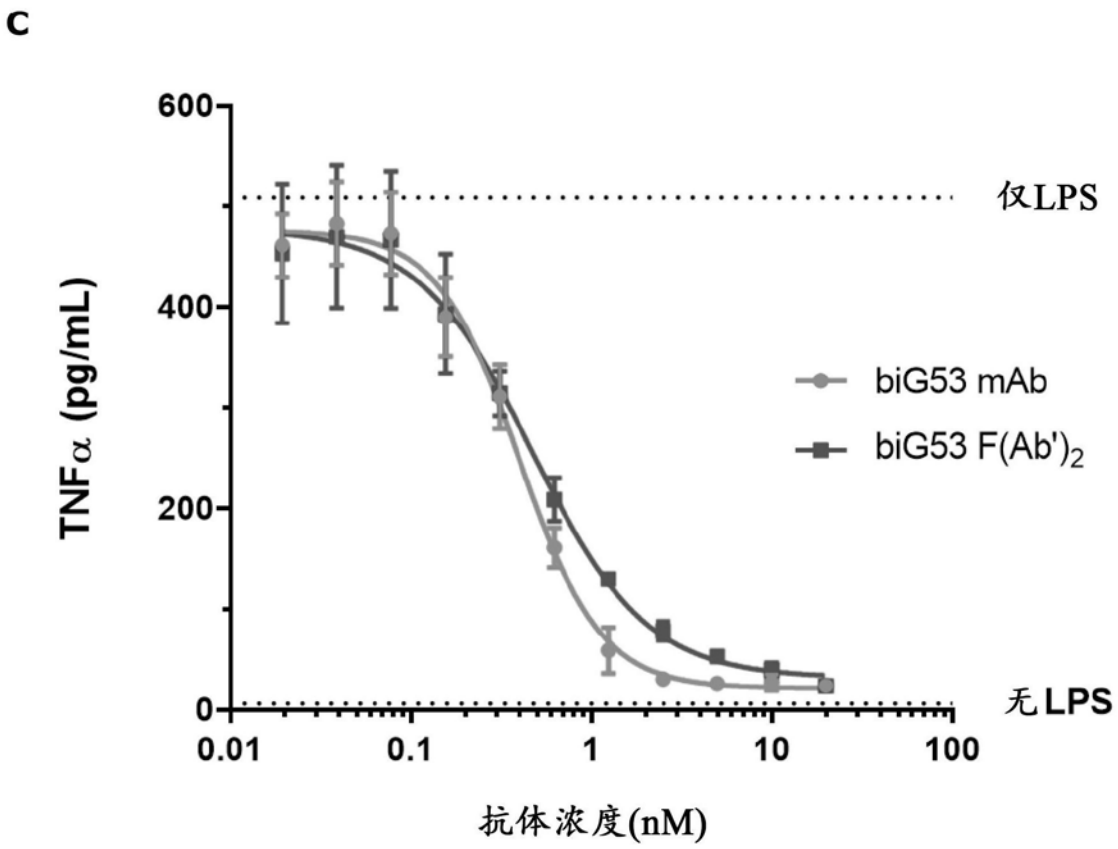

C
600
400
200
0
TNFα (pg/mL)
仅LPS
无LPS
biG53 mAb
biG53 F(Ab')2
0.01
0.1
1
10
100
抗体浓度(nM)

图1(续)

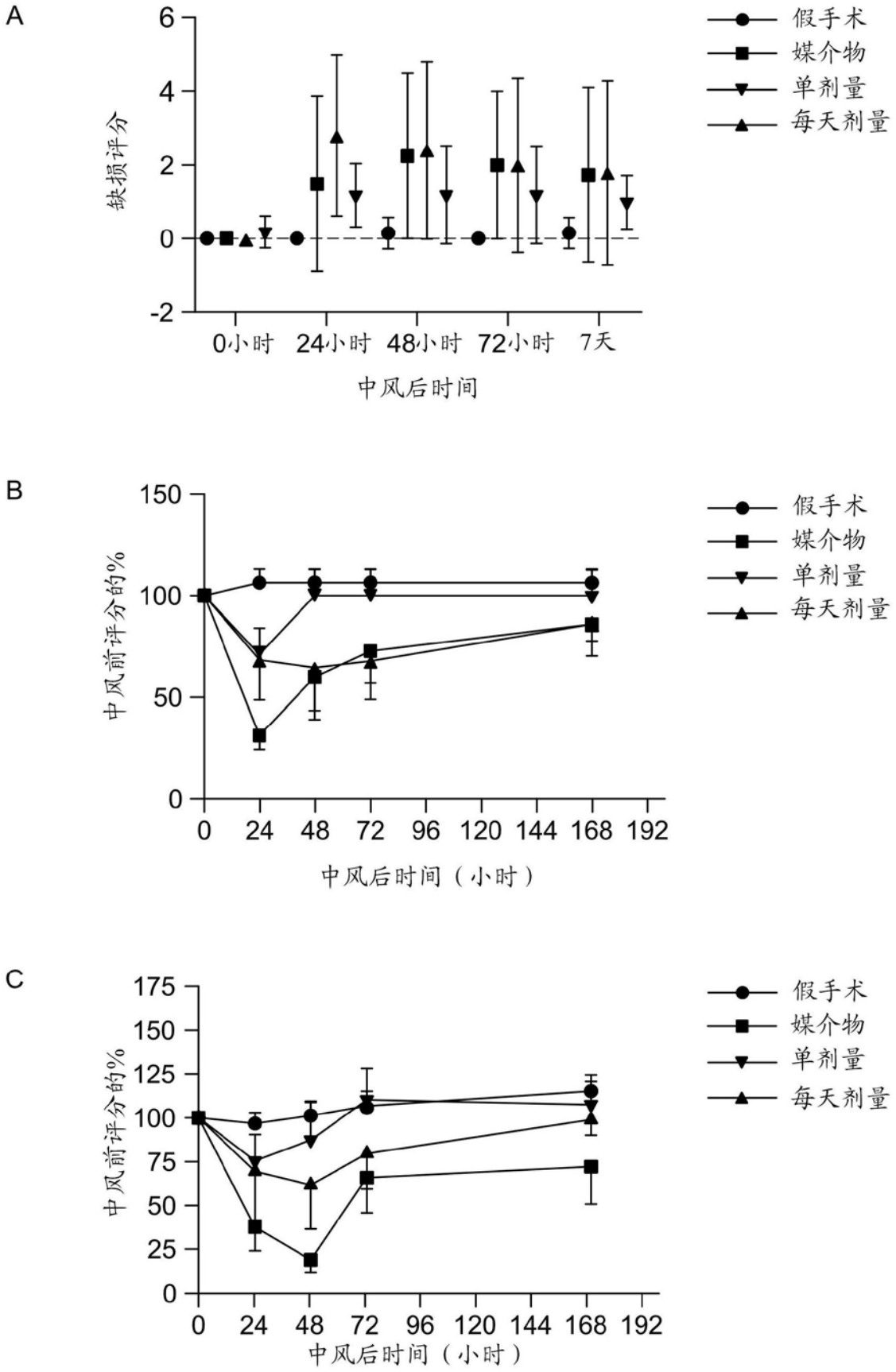

A
6
4
2
0
-2
缺损评分
0小时
24小时
48小时
72小时
7天
中风后时间
假手术
媒介物
单剂量
每天剂量
B
150
100
50
0
中风前评分的%
0
24
48
72
96
120
144
168
192
中风后时间（小时）
假手术
媒介物
单剂量
每天剂量
C
175
150
125
100
75
50
25
0
中风前评分的%
0
24
48
72
96
120
144
168
192
中风后时间（小时）
假手术
媒介物
单剂量
每天剂量

图2

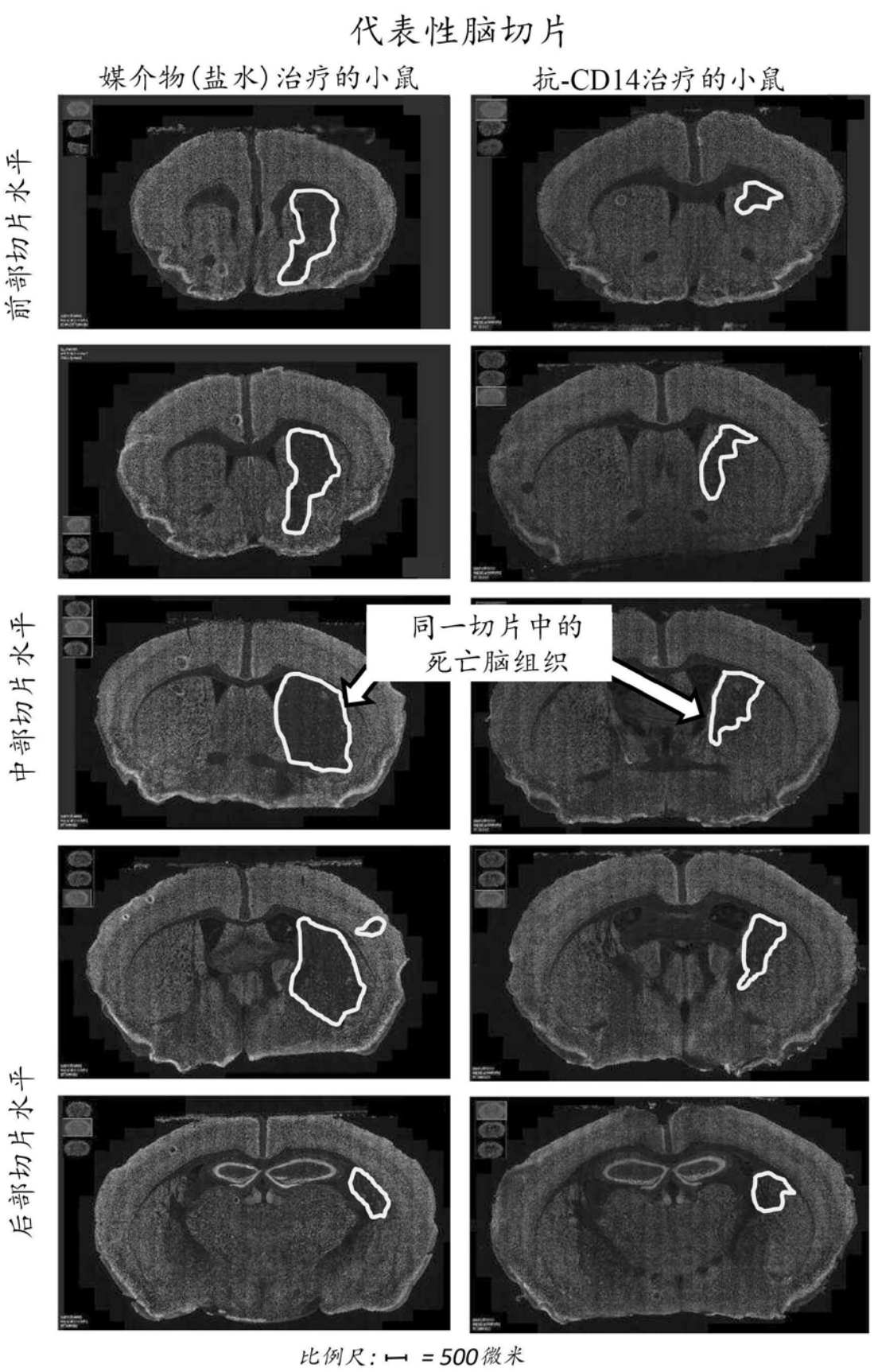

代表性脑切片
媒介物(盐水)治疗的小鼠
抗-CD14治疗的小鼠
前部切片水平
中部切片水平
后部切片水平
同一切片中的
死亡脑组织
比例尺: = 500微米

图3

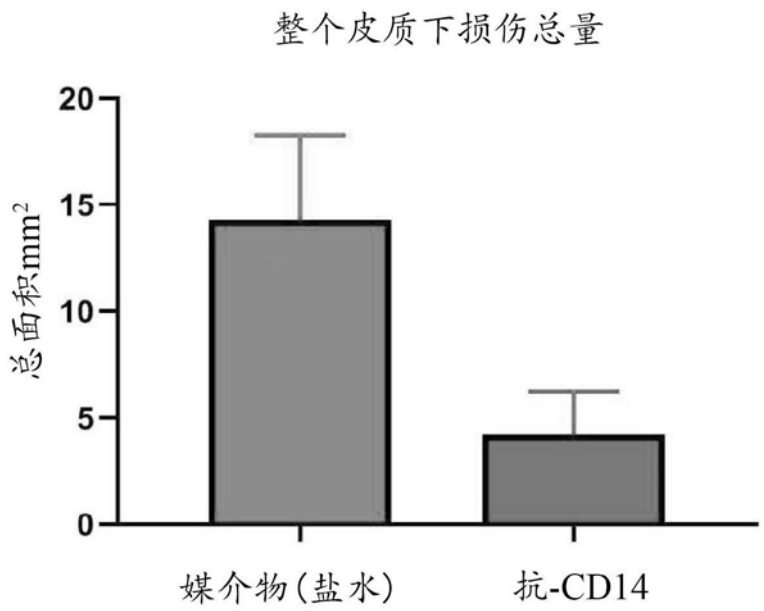

整个皮质下损伤总量
总面积mm²
20
15
10
5
0
媒介物(盐水)
抗-CD14

图4

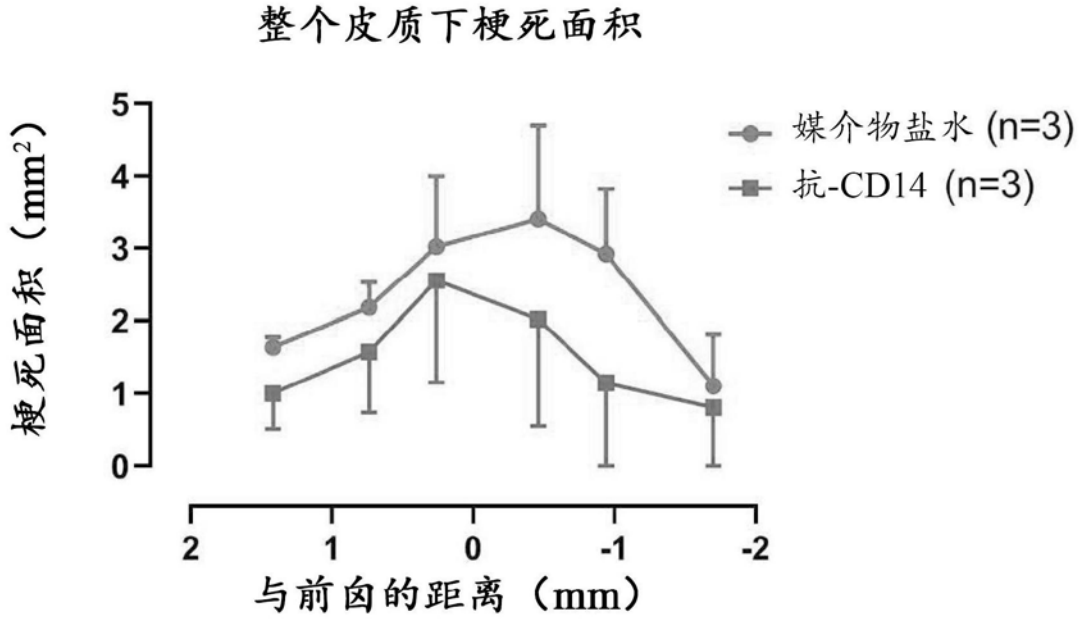

整个皮质下梗死面积
梗死面积（mm²）
5
4
3
2
1
0
媒介物盐水 (n=3)
抗-CD14 (n=3)
2
1
0
-1
-2
与前囟的距离（mm）

图5